

有用物質生産に関わる酸化酵素の機能改変と物質生産

東京大学大学院薬学系研究科

森 貴裕

1. 背景

植物や微生物が生産する二次代謝産物はその構造多様性と複雑さ、高い生物活性から医薬品のリード化合物として大きな役割を担ってきた。一般に、二次代謝産物合成酵素は活性部位の微妙な違いでその反応性が大きく変化することが知られており、その反応性を人為的に拡張する事で、分子多様性と生物活性を備えた広大な非天然型化合物ライブラリーの構築が可能になる。

糸状菌由来メロテルペノイド(ポリケタイド-テルペノイド・ハイブリッド型化合物)や、医薬品として用いられるセファロsporin類などの生合成中に見出される非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸(α -KG)依存性ジオキシゲナーゼは、広く天然に分布しており、抗ウイルス活性、血糖低下作用など多様な生理活性を持つ、アスコクロリンやステロール-*O*-アシル基転移酵素の阻害剤として知られる、ピリピロペンなど、医薬品資源としての利用が期待される化合物が多く見られるメロテルペノイドの生合成遺伝子群にも含まれている。特に、糸状菌メロテルペノイド生合成中においては、 α -KG依存性ジオキシゲナーゼはスピロラクトン環の構築など、大規模な骨格変換を伴ったテルペン骨格の位置選択的、立体特異的酸化反応を触媒し、骨格多様性の構築に重要な役割を担っている^{1,2}。本研究では、創薬ターゲット化合物の創出を目的に、これら酵素に変異を導入して反応性の改良、基質特異性の拡張等を行うことで、新規化合物の創出を試みた。

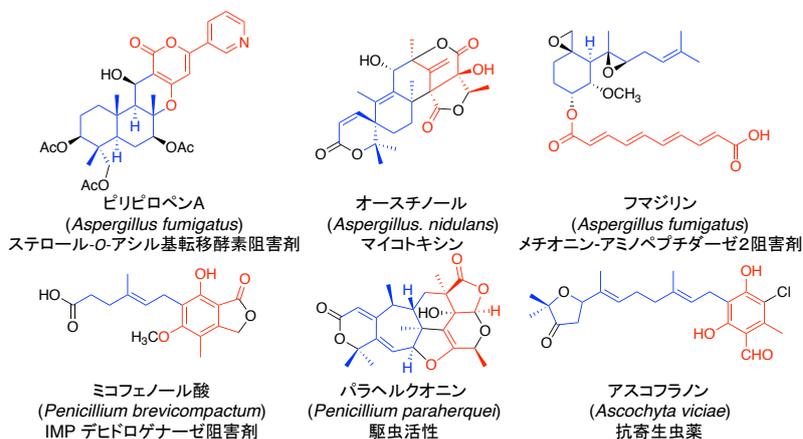


図1: 糸状菌メロテルペノイドの構造と活性

2. 実験、結果

対象酵素として、メロテルペノイド anditomin の生合成中、大規模な骨格変換に関わる α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ、AndAを用いた。AndAは、preandiloid Bを基質として受け入れ、1, 2位に二重結合の導入とその後のC, D環の異性化反応を触媒し、andiconin (**1**)を生成する³ (図2)。AndAの立体構造はすでに我々の研究室において構造が解かれていたため、立体構造を基盤に変異導入を行った。活性部位の容積、形状を変化させることを目的に、活性部位底面を構成するアミノ酸残基Met119/Asn121, Met156/Asn158, Ala228/Ala230の組み合わせに対してそれぞれsite-saturation mutagenesisを行った。縮重プライマーを用いて部位特異的に

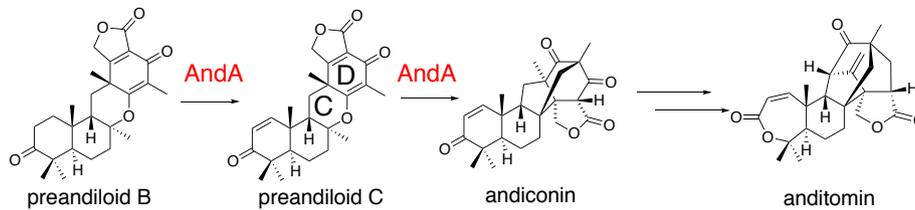


図2: AndAの酵素反応

ランダムな変異を導入し、ランダム変異ライブラリーを作成した。そのライブラリーを大腸菌に形質転換し、96穴ウェルを用いてそれぞれの変異体を6残基のヒスチジンとの融合タンパク質として発現させ、精製酵素と基質を混ぜ合わせることで酵素反応を行なった。その後、酵素反応生成物を液体クロマトグラフィー質量分析法にて解析を行った。野生型と分析プロファイルと比較し、新たなピークを生成した変異体についてラージスケールで培養し、高純度に精製した酵素を用いて再度詳細な酵素反応解析を行った。

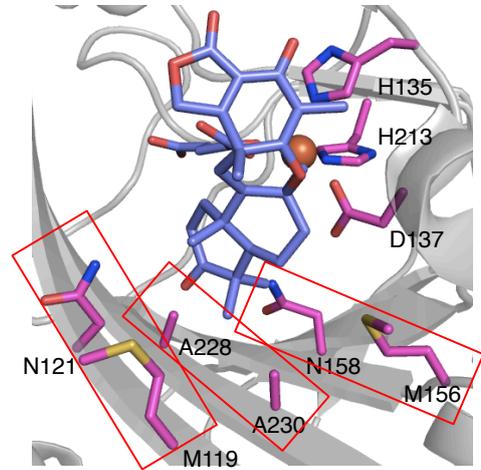


図3: AndA変異導入箇所

その結果、いくつかの変異体において本来の生成物であるpreandiloid C (**2**, m/z 411) やandiconin (**3**, m/z 411)と比較して-2 Daや+14 Da、+16Daの分子量を有する新規生成物**4**, **5**, **6**が得られた(図4)。新たな生成物を与える変異体の配列解析を行なったところ、Met119/Asn121、Met156/Asn158のアミノ酸残基側鎖が小さく疎水性の残基へ置換された場合、またはAla228/Ala230が大きく親水性アミノ酸へと置換された場合にこれらの新規生成物を与えることが明らかとなった。さらに、時間経過での酵素反応を検討したところ、生成物**4**, **6**は**2**から、**5**は**4**から生成することが判明した。また、各種NMRスペクトル解析を用いて化合物**4**と化合物**5**の構造決定を行なった結果、化合物**4**はA、B環の間にA/B環の間に5/6スピロ環を形成した化合物であり、化合物**5**はそのエポキシ体であると構造決定した(図5)。

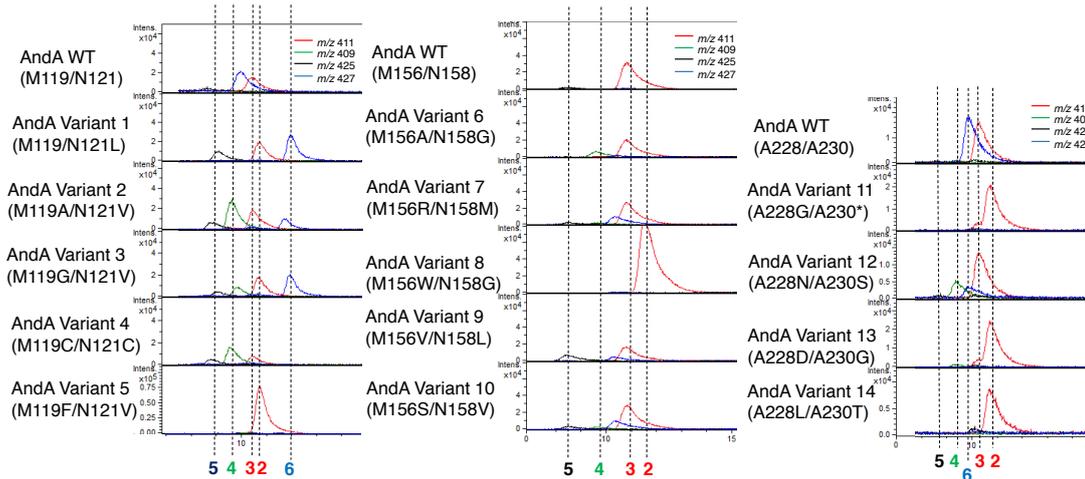


図4: 変異体のLC-MS解析

化合物の構造解析から、AndAの変異体は1段階目の反応は野生型と同様二重結合の導入であるものの、2段階目の反応は、C/D環の異性化反応から、A/B環の骨格変換反応へと変化したことが判明した。野生型の酵素反応メカニズムとしては、活性中心がC12位の水素原子を引き抜き、ラジカルを生成することで酵素反応が開始される。その後、C-O結合の開裂と新たなC-C結合の形成により、C/D環の骨格変換が進行する(図5A)²。一方、AndA変異体のメカ

ニズムとしては、C12位ではなく、C5位からの水素原子により反応が開始されることが考えられる。その後、ラジカルの転移により三環性の中間体を経てA/B環でのスピロ環が形成すると考察する(図5B)。

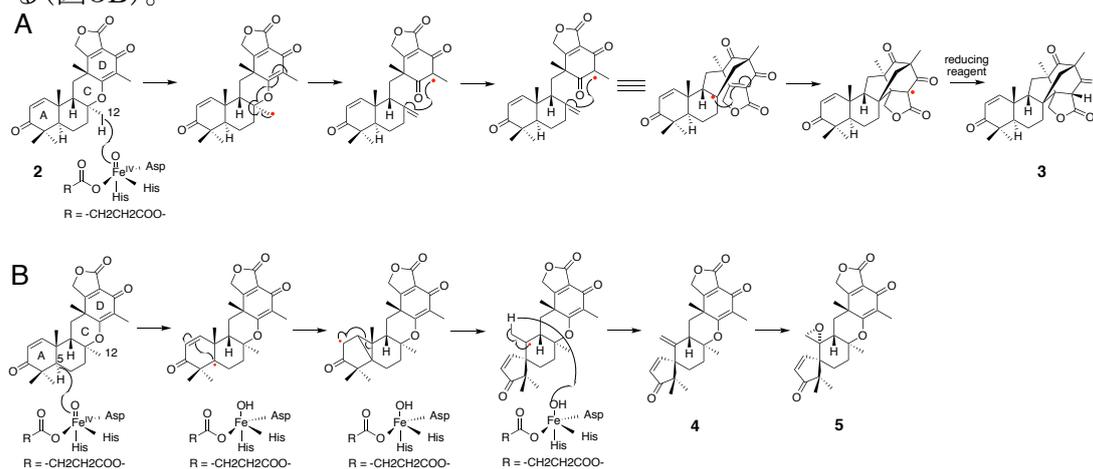


図5: AndA野生型と変異体の推定酵素反応メカニズム

3. 今後の展望

本研究では、活性部位の形状を変化させることで、基質の結合様式が変化し、違う位置からの水素原子の引き抜きが可能になり、野生型では生成しない新規化合物の創出に成功した。今後、本研究により得られた知見をもとに、 α KG依存性ジオキシゲナーゼの酵素工学研究を進め、非天然型化合物ライブラリーを構築し、創薬研究へと展開して行きたいと考えている。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人アステラス病態代謝研究会の研究助成による援助をいただき、東京大学薬学系研究科天然物化学教室において行われたものです。同教室の阿部郁朗教授、共に研究を進めてきた中嶋優博士やその他皆様に深く感謝申し上げます。

5. 参考文献

- (1) Nakamura, H., Matsuda, Y., Abe, I. *Nat. Prod. Rep.*, **35**, 633-645 (2018).
- (2) Y. Nakashima, T. Mori, H. Nakamura, T. Awakawa, S. Hoshino, M. Senda, T. Senda, I. Abe, *Nat. Commun.*, **9**, 104 (2018).
- (3) Y. Nakashima, T. Mitsuhashi, Y. Matsuda, M. Senda, H. Sato, M. Yamazaki, M. Uchiyama, T. Senda, I. Abe, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 9743-9750 (2018).