

生物由来合成酵素の分子構造情報に基づく新規生体触媒の開発 ～創薬に向けた合理的な生合成リデザインの一步～

1. 発表者：

中嶋 優 (東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻 博士課程3年生)
千田 俊哉 (高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所
構造生物学研究センター センター長)
阿部 郁朗 (東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆X線結晶構造解析により天然物の複雑骨格を構築する多段階反応性酸化酵素の構造を明らかにし、その基質特異性を改変し、触媒能を拡大することに成功した。
- ◆多段階反応を触媒する酸化酵素の構造解析、機能改変に初めて成功し、天然には存在しない新規化合物を創出した。
- ◆活性物質を合成する新規生体触媒の創出によって、創薬研究の発展に貢献することが期待される。

3. 発表概要：

天然に存在する生物由来の物質(天然物)は医薬品の原料として有用ですが、構造が複雑なため、これを人工的に合成することは難しいと考えられています。

東京大学薬学系研究科の阿部 郁朗 教授と中嶋 優 大学院生、高エネルギー加速器研究機構の千田 俊哉 教授らの研究グループは、天然物の酵素の構造情報に基づいて、その機能改変を行うことで、驚異的な多段階反応型酸化触媒の創出に成功しました。研究グループはまず、複雑な骨格形成を触媒する酸化酵素に着目し、それらのX線結晶構造解析を行いました。さらに構造情報に基づく機能改変実験を行って、多段階反応を起こす新規酸化触媒を開発しました。

酵素工学の手法を活かし、活性物質を合成する新規生体触媒を用いた物質生産法を開発することで、創薬研究へ貢献することが期待されます。

4. 発表内容：

世界初の抗生物質として知られるペニシリンを初めとして、糸状菌(カビ類)由来の天然物は、医薬品の原料として重要な役割を果たしています。しかしながら、これらの多くは複雑な骨格を有しており、有機合成的にこれらの化合物を供給することは一般的に困難です。一方で、これら生産菌のゲノム解読が進むにつれ、天然物の生成に関わる多くの生合成遺伝子の存在が明らかになってきています。それに伴い、天然物の複雑骨格形成に中心的役割を担う生合成酵素の発見が相次いでいます。これら生合成酵素の触媒機能を理解し利用することができれば有用生理活性物質の創製に繋がることを期待されます。

特に、糸状菌が生産するメロテルペノイド(注1)は抗がん活性や免疫抑制作用など様々な生理活性を示す化合物群として知られており、高脂血症治療や抗ウイルス、血糖低下など創薬のための重要な研究テーマの一つとなっています。糸状菌由来メロテルペノイドの生合成研究に関しては東京大学薬学系研究科の阿部郁朗教授らのグループによりバークレイダイオンやオースチノール(注2)を含む複数のメロテルペノイド生合成遺伝子とその生合成経路が同定され、これらの複雑構造の構築を担う生合成酵素群が明らかになってきています。その中でも、

複雑骨格の形成に中心的な役割を果たす酵素として α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存性ジオキシゲナーゼ(注3)の存在が明らかとなってきました。これらの酵素群は糸状菌だけでなく、ヒト細胞でも 60 種類以上報告されており、生体内で様々な役割を担っていることが報告されています。

一般に生体内で働く酵素の多くは特定の基質を受け入れ、化学反応を触媒し、特定の生成物を与えます。基質は鍵に、酵素は鍵穴に例えられ、「鍵と鍵穴」の関係を持つことが知られています。興味深い事に、メロテルペノイド生合成に寄与する α -KG 依存性ジオキシゲナーゼの多くは多段階の酵素反応を触媒する多機能性を有しています。つまり、鍵穴と鍵が起こした酵素反応によってもう一つの鍵ができ、同じ酵素が続くもう一つの酵素反応を起こすことができるのです。その反応機構、基質の認識機構は既知の酵素群とは大きく異なるのではないかと考えられますが、多機能性 α -KG 依存性ジオキシゲナーゼの詳細な機能解析は殆ど行われていないのが現状でした。

今回、研究グループは、これまでに見出したメロテルペノイド生合成に関与する α -KG 依存性ジオキシゲナーゼの触媒能の詳細な機能解明を行うべく、高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 フォトンファクトリーでの X線結晶構造解析(注4)に着手し、類似酵素間の触媒機能の比較検討を試みました。具体的にはバークレイダイオン及びオースチノールの生合成に寄与する同酵素ファミリーの PrhA、AusE(注2)に着目しました。これらは共通の基質を受け入れるものの、全く異なる構造の生成物を与えることが知られています。X線結晶構造解析により 2.1 Åの分解能で構造を調べ、酵素基質複合体の構造情報を得て両酵素構造の比較検討を行った結果、PrhAにおいて酵素活性に重要なアミノ酸残基 V150, A232, M241が見出されました。さらに、これらのアミノ酸を AusE型に変異した PrhA 酵素 (PrhA 改変酵素と呼ぶ) を作製し、AusE 反応を触媒してその生成物を与える変異酵素を作り出すことに成功しました。また、それに加えて、PrhA 改変酵素は、AusE 反応を触媒するのみならず、そこからさらに 2-3 回酸化反応が進んだ新規酸化型メロテルペノイド化合物を与えることが明らかにされました(図1)。

多段階酸化反応を引き起こす酵素の結晶構造解析の報告例は極めて少なく、構造解析情報を基に生み出され、新規な酸化能を獲得した変異酵素は他に類を見ません。合理的に機能改変を行うことで、新規な多段階反応型酸化触媒の創出に成功したと言えます。今後、活性物質を合成する新規生体触媒を用いた物質生産法を開発することで、薬学研究への貢献が期待されます。

本研究は、文部科学省 科学研究費補助金、新学術領域研究(研究領域提案型)「生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学(生合成リデザイン)」、日本医療研究開発機構(AMED)の創薬等支援技術基盤プラットフォーム(PDIS)と創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援を受けて行われました。

5. 発表雑誌:

雑誌名: *Nature communications* (1月9日オンライン版掲載予定)

論文タイトル: Structure function and engineering of multifunctional non-heme iron dependent oxygenases in fungal meroterpenoid biosynthesis

著者: Yu Nakashima, Takahiro Mori, Hitomi Nakamura, Takayoshi Awakawa, Shotaro Hoshino, Miki Senda, Toshiya Senda*, and Ikuro Abe*

DOI: 10.1038/s41467-017-02371-w

URL: <http://www.nature.com/ncomms>

6. 注意事項：

日本時間1月9日(火)午後7時(イギリス時間：9日(火)午前10時)以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先：

【研究に関するお問い合わせ】

東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻
教授 阿部 郁朗 (あべ いくろう)

電話番号: 03-5841-4740, e-mail: abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター
教授 千田 俊哉 (せんだ としや)

電話番号: 029-879-6178, e-mail: toshiya.senda@kek.jp

【報道に関するお問い合わせ】

東京大学大学院 薬学系研究科 庶務チーム

電話番号: 03-5841-4719, e-mail: shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

高エネルギー加速器研究機構 広報室

電話番号: 029-879-6046, e-mail: press@kek.jp

8. 用語解説：

注1) メロテルペノイド：テルペノイドの部分構造を持つ天然物の一群。多様な生物活性をもつことから医薬品リード化合物として期待されています。具体的にはアスペルギルス属糸状菌より単離され、高脂血症治療薬のリード化合物として期待されるペリピロペンやフザリウム属糸状菌などから単離され、抗ウイルス活性、血糖低下作用を有するアスコクロリンなどが知られています。

注2) バークレイダイオン、オースチノール：AusE、PrhA はそれぞれ異なる糸状菌に存在する α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存性ジオキシゲナーゼ(注3)です。AusE と PrhA は共通してプレオースチノイド A1 を基質として受け入れます。AusE はプレオースチノイド A1 の2位の脱水素からスピロラクトン環形成に至るプレオースチノイド A3(オースチノール前駆体)の生成反応を触媒するのに対し、PrhA はプレオースチノイド A1 の5位の脱水素からシクロヘプタジエン環形成に至るまでのバークレイダイオンの生成反応を触媒します。

注3) α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存性ジオキシゲナーゼ：ミトコンドリアの TCA 回路の中間代謝産物である α -KG を補酵素として利用する酸化酵素のグループ。ヒストン脱メチル化酵素など一次代謝において重要な働きを示す一方で、天然物の生合成にも広く関与しています。

注4) X線結晶構造解析：タンパク質のような小さな分子の構造を見るためには可視光より波長の短いX線を利用します。その結晶にX線を照射することで得られた回折を解析することでタンパク質の立体構造の決定が可能となります。

9. 添付資料：

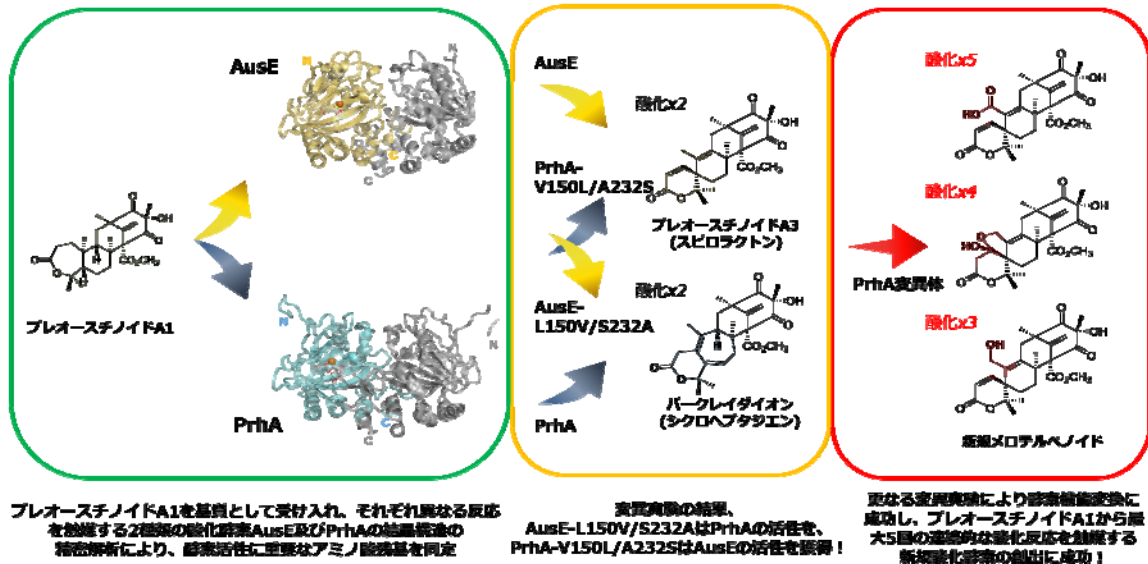


図1：酵素の機能変換による新規酸化触媒の創出