

天然物の環状骨格の構築及び酸化的修飾
に関わる酵素群の構造生物学的研究

2021年1月

藤山 敬介

序章 緒言	4
1. 天然物の生合成と構造生物学	4
2. 天然物の骨格を決定する環化酵素: テルペン合成酵素	8
2-1 テルペン合成酵素の構造的特徴	8
2-2. α ドメインの内部を触媒部位とするテルペン合成酵素の立体構造	9
2-3 β - γ ドメイン間を触媒部位とするテルペン合成酵素の立体構造	10
3. 天然物の骨格を決定する環化酵素: Diels-Alder 反応を触媒する酵素 (DAase).....	14
3-1. PKS、NRPS、及び PKS-NRPS による前駆化合物の生合成.....	14
3-2. DAase の立体構造と DA 反応の触媒メカニズム	19
3-3. 立体選択的なデカリン骨格を構築する DAase.....	21
3-4. 様々なデカリン骨格を構築する Fsa2 ファミリー.....	25
4. 天然物の酸化的修飾を担う酵素: シトクロム P450 (P450)	27
4-1. P450 の命名と分子的性質.....	27
4-2. P450 の種類と反応系.....	29
4-3. P450 の立体構造	33
4-4. P450 の関与によって生合成されるステロイド化合物.....	35
4-5 ステロイド骨格を有する植物ホルモンの生合成と P450	38
5. 天然物の酸化的修飾を担う酵素: 2-oxoglutarate 依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) 40	
5-1. 2OGD の反応機構.....	41
5-2. 2OGD の立体構造.....	43
5-3. 天然物の酸化修飾に関わる 2OGD.....	44
5-4. ステロイド骨格を有する植物由来の二次代謝産物の生合成と 2OGD.....	45
6. 研究目的	47
参考文献	48
1 章 立体選択的 Diels-Alder を触媒するデカリン合成酵素群の結晶構造解析	54
緒言.....	54
1-1. Fsa2 及び Phm7 が触媒する Diels-Alder 反応と生産される化合物の立体化学 ..	54
結果・考察.....	56
1-2. 生化学・構造生物学的な分析による DS の触媒部位の同定.....	56
1-3. 分子動力学シミュレーションによる基質の結合様式の推測	63
1-4. 変異体解析による推定基質結合モデルの検証	68
1-5. Fsa2 と Phm7 による立体選択的なデカリン骨格の構築および Fsa2 ファミリーの機能.....	70

実験手法	73
1-6. Fsa2 と Phm7 の発現	73
1-7. Fsa2 と Phm7 精製	73
1-8. Fsa2 と Phm7 の結晶化	74
1-9. Fsa2 と Phm7 の回折データの収集、構造決定	75
1-10. Fsa2 と Phm7 の基質のドッキングシミュレーション	76
1-11. Fsa2 と Phm7 の生成物の生産活性の測定	76
参考文献	80
2 章 BR 生合成の鍵反応を担う CYP90B1 の結晶構造解析	82
緒言	82
2-1. BR 生合成の初発かつ律速段階を担う CYP90B1 が触媒する水酸化反応	82
結果・考察	84
2-2. CYP90B1 の結晶構造	84
2-3. 基質の結合様式	87
2-4. 基質の位置・立体選択的な水酸化メカニズム	92
2-5. 阻害剤の結合様式	94
2-6. CYP90B1 の構造的可塑性とリガンド結合による F 及び G ヘリックスの構造変化	96
2-7. BR 生合成における構造生物学的な知見と植物 P450 に関する研究の展望	100
実験手法	105
2-8. CYP90B1 の発現	105
2-9. 変異型 CYP90B1 の作製	105
2-10. CYP90B1 の精製	107
2-11. CYP90B1 の結晶化	107
2-12. 回折データの収集、構造決定	108
2-13. 基質及び阻害剤の滴定とアルコール類添加による基質結合の阻害の確認	109
2-14. 活性測定用の変異体の発現と酵素の調製	109
2-15. CYP90B1 の水酸化活性の測定	110
2-16. CR および BRZ2012 のドッキングシミュレーション	111
参考文献	113
3 章 ジャガイモ毒ソラニンの生合成を担う 2OGD と結晶構造解析	116
緒言	116
3-1. 新規ソラニン生合成経路とナス科植物が有する 2OGD の位置・立体選択的酸化反	

応.....	116
結果・考察.....	119
3-2. 16DOX-1 ホモログの tomatine 結合型の結晶構造解析と全体構造.....	119
3-3. tomatine の結合様式.....	123
3-4. C16 位水酸化を起点とした solanidane 骨格構築メカニズム.....	125
3-5. solanidane 骨格の構築に伴う毒性の発現とナス科植物由来の SGA 研究への展望	126
実験手法.....	128
3-6. 発現.....	128
3-7. 精製.....	128
3-8. 結晶化.....	129
3-9. 回折データの収集、構造決定.....	129
参考文献.....	132
終章.....	134
謝辞.....	137

序章 緒言

1. 天然物の生合成と構造生物学

自然界には様々な化合物が存在しており、一般的にそれらは天然物とされている。天然物は有益な生理活性を示す化合物が多く、低分子からポリマーなどの巨大で複雑な分子など、様々な構造を持つことが知られている。そのため、天然物は古くから化成品のビルディングブロックや創薬のリード化合物だけでなく材料化学の原料など、多様な分野で応用されてきた。特に小分子の天然物は医薬品やその原料への応用例が多く、その歴史は1928年のFlemingによるペニシリンの発見と応用に起源がある¹。ペニシリンの発見から100年近く経った現在でも、天然物の医薬品や農薬などへの応用は盛んに行われているため、未だに新規天然物の探索は行われている。例えば、セイヨウイチの樹皮から単離されるtaxolは、細胞の骨格として知られる微小管の構成タンパク質であるチューブリンに結合し、安定化させる活性を有している。チューブリンの安定化は細胞分裂を阻害するため、taxolはがん細胞の無秩序な細胞増殖を抑える抗がん剤として、現代では欠かせない医薬品として扱われている。また、全ての植物が植物ホルモンとして生産しているジベレリンは、過剰投与によって種子形成を抑制する生理活性を示すことから、種のないブドウなどの果物を生産する上で必須の農薬として利用されている (図1)。

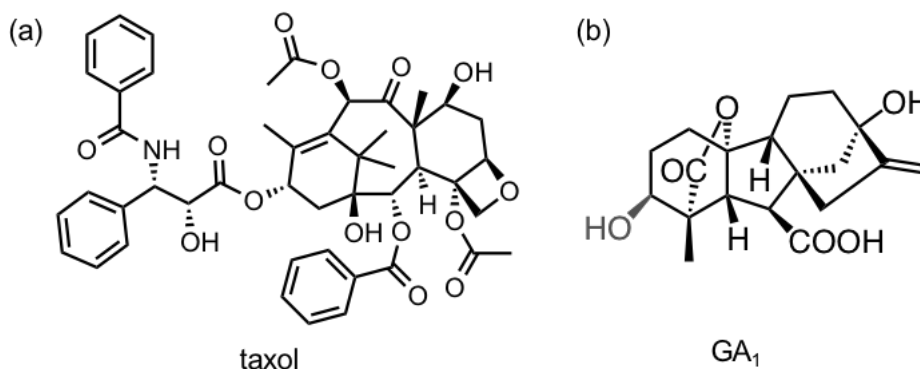


図1 taxolの構造 (a) とジベレリンの一種であるGA₁の構造 (b)

一般に、天然物は主に植物や微生物から単離されるが、数十キロの植物体から数mgしか天然物が得られない場合や、微生物を何百リットル以上のスケールで培養する必要がある程、収量が非常に少ないケースがほとんどである。一方で、有機合成で天然物を得る手法もあるが、複雑な立体化学の制御や分子骨格の構築が必要とされるため、合成法の研究に非常に多くの時間を費やす必要がある。これに対して自然界では、生物は複数の酵素を利用することで天然物を容易に生合成している。例えば、前述したジベレリンは、初めに

geranylgeranyl diphosphate (GGPP) が2種類のテルペン環化酵素によって2度の環化を受けたのち、複数のシトクロムP450 (P450) と2-oxoglutarate依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) による位置・立体選択的な酸化修飾を受けることで生合成される² (図2)。

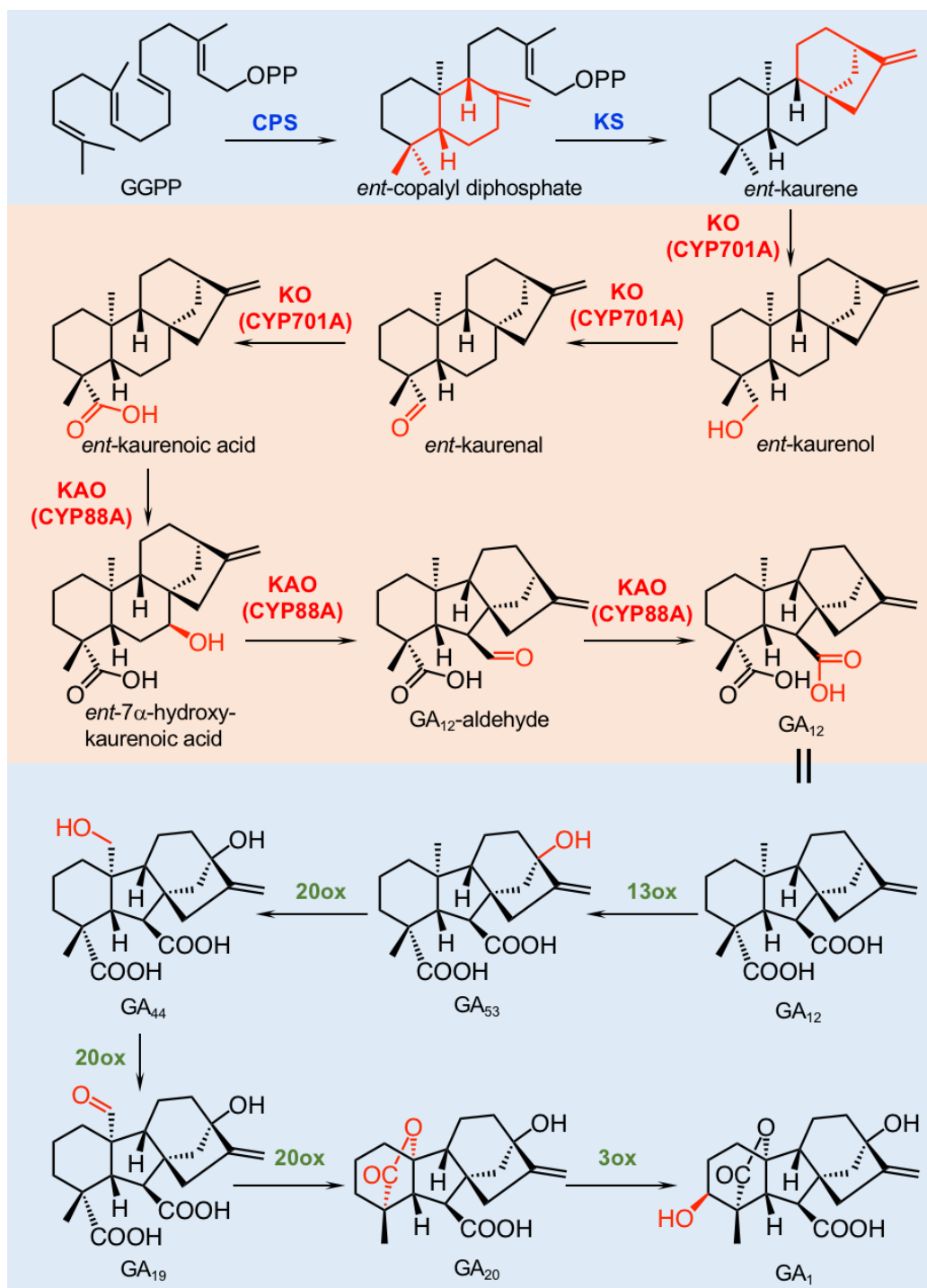


図2 ジベレリン生合成経路と生合成に関わる酵素群

それぞれの酵素の名前は青、赤、緑字で示しており、それぞれはテルペン合成酵素、シトクロムP450、2OGDにそれぞれ分類される。背景が青い領域は水溶性領域で、赤い領域は小胞膜内部で反応が触媒される。

多くの天然物では、このジベレリン生合成のように生合成経路序盤の特異的な環化によって主要骨格が構築され、酸化修飾によって生理活性が発現する。そのため、炭化水素などの不活性な化合物の特異的な環化や、置換基を常温・常圧で位置・立体選択的に導入できる天然物の生合成酵素群は、合成過程において非常に強力なツールとして利用が期待されている。天然物を生合成する酵素群が触媒する酵素反応のメカニズムを解明することができれば、生物を模倣した高収率・高効率な有機合成のアプローチを構築することもできると期待される。また、天然物が多様化しているように、天然物の生合成に関わる酵素群も多様化しており、特に環化酵素と酸化酵素に関しては様々な酵素ファミリーが存在する他、同一ファミリー間でさえも異なる機能を有した分子種が存在する。天然物の生合成酵素の利用や酵素の性質を理解するためには、多様化した環化酵素と酸化酵素の立体構造を明らかにし、構造・機能相関を調べるのが重要かつ最適であると考えられる。実際、多くの天然物の生合成酵素についての構造生物学的な研究は盛んに行われている。例えば、真菌メロテルペノイドである *austinol* の生合成酵素 *AusE* と *paraherquonin* の生合成酵素 *PrhA* は互いに 92 % の相同性を持ち、*preaustinoi* を共通の基質とするが、*AusE* と *PrhA* がそれぞれ異なる反応を触媒することで、*austinol* と *paraherquonin* を作り分けることが知られていた。阿部らは *AusE* と *PrhA* の結晶構造解析を行って立体構造を明らかにし、*AusE* の Leu150 と *PrhA* の Val150、及び *AusE* の Ser232 と *PrhA* の Ala232 を入れ替えた二重変異体をそれぞれ作製することで、野生型の触媒効率を維持した状態で *AusE* と *PrhA* の活性を変換させることに成功した³(図3)。

序章では、天然物の生合成を担う酵素の中でも、重要な骨格構築を担う環化酵素として、テルペン合成酵素と Diels-Alder 反応を触媒する酵素 (DAase) を、天然物の生合成に関して特に多様化している酸化修飾酵素として P450 と 2OGD を取り上げ、これら酵素についての反応機構や立体構造を理解することを目指し、それぞれの領域で明らかにされた内容と現状の課題を概説する。

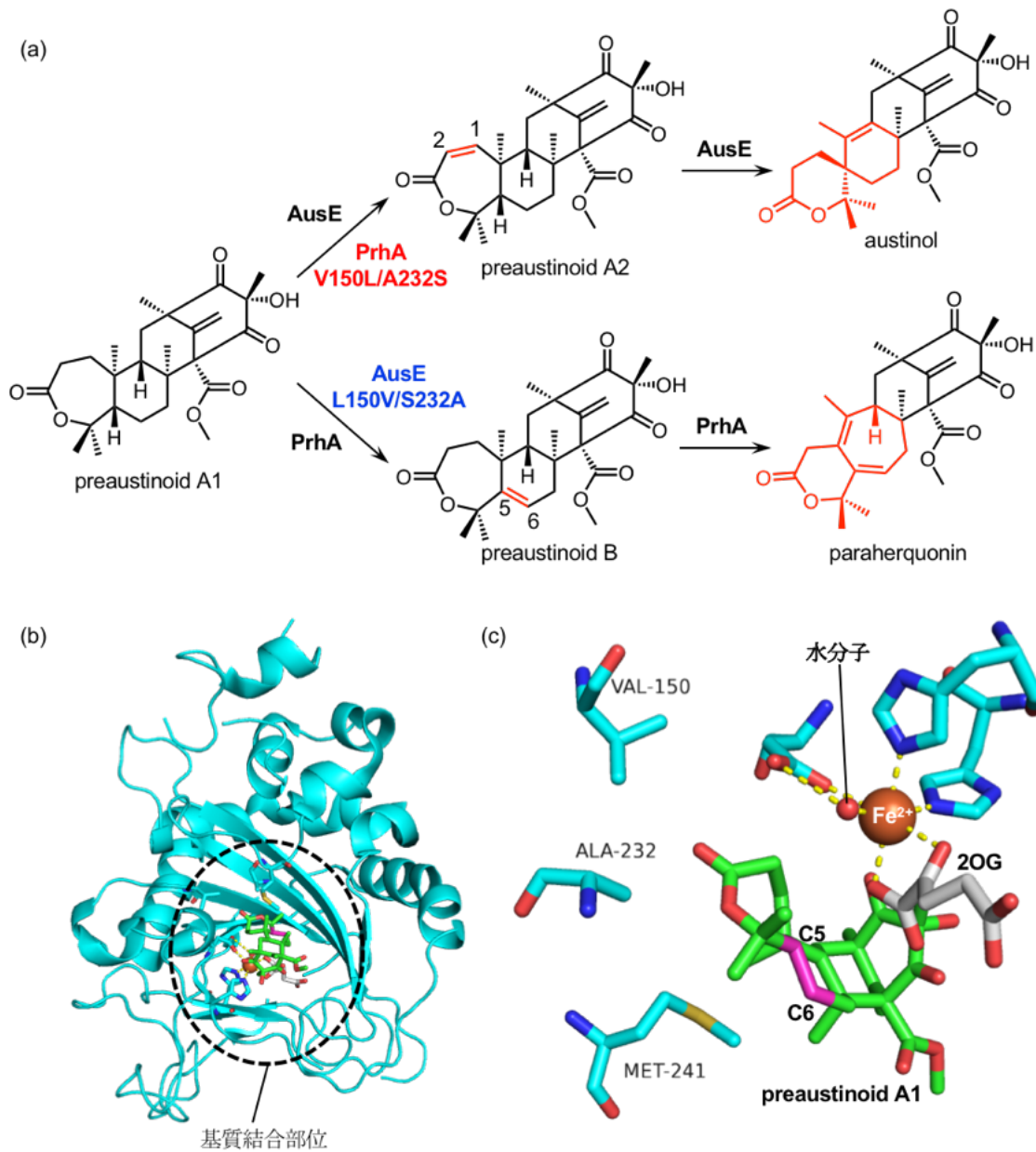


図3 austinolとparaherquoninの生合成、及びAusEとPrhAが触媒する反応

(a) AusEとPrhAによるaustinolとparaherquoninの生合成。(b) preaustinoid A1結合型PrhAの結晶構造 (PDB ID: 5YBO)。Fe原子と2-オキソグルタル酸 (2OG) はPrhAの補因子である。破線の円で囲んだ領域は基質結合部位を示している。(c) PrhAの基質の結合様式と周辺のアミノ酸残基を示している。黄色の破線は配位、または水素結合を、基質のマゼンタで示した部分は不飽和化を受けるC5及びC6位を示している。

2. 天然物の骨格を決定する環化酵素: テルペン合成酵素

天然物の中でも、最大の化合物群の一つとしてテルペノイドが知られている。テルペノイドは炭素原子が5つからなるイソプレン (C5) を基本単位とし、モノテルペノイド (C10)、セスキテルペノイド (C15)、ジテルペノイド (C20)、セスタテルペノイド (C25)、トリテルペノイド (C30)、テトラテルペノイド (C40)、及びポリテルペノイド (C45以上) に分類される。それぞれのテルペノイドの生合成機構は共通しており、①mevalonate経路などによってイソプレン誘導体を生合成・縮合し、炭素鎖を決定、②テルペン合成酵素による環化と骨格の決定、③酸化反応を主とした修飾、の3ステップを経ることで最終的な化合物へと変換される。特にテルペン合成酵素は、単純に伸長された直鎖テルペノイドから閉環した各種テルペノイドの基本骨格を構築する重要な酵素であり、多様なテルペンを作り分ける鍵となる酵素である。そのような背景から、種々のテルペン合成酵素の構造生物学的な研究は盛んに行われており、立体構造の特徴から反応機構、種々のテルペンを作り分けるメカニズムなどがある程度明らかにされている。

2-1 テルペン合成酵素の構造的特徴

テルペン合成酵素は微生物や植物でよく確認されるが、一次構造の保存性はあまり高くない。一方で、その立体構造は高度に保存されており、立体構造としては①微生物型クラスIモノ/セスキテルペン合成酵素、②植物型クラスIモノ/セスキテルペン合成酵素、③植物型クラスIジテルペン合成酵素、④植物型クラスIIジテルペン合成酵素、及び微生物型ジテルペン合成酵素、⑤クラスIIトリテルペン合成酵素に分類される。テルペン合成酵素の立体構造は、 α 、 β 、 γ の3つのドメイン組み合わせから構成されており、①微生物型クラスIモノ/セスキテルペン合成酵素は α ドメインのみから、②植物型クラスIモノ/セスキテルペン合成酵素は α と γ の2ドメインから、④微生物型ジテルペン合成酵素と⑤クラスIIトリテルペン合成酵素は β と γ の2ドメインから、そして③植物型クラスIジテルペン合成酵素と④植物型クラスIIジテルペン合成酵素は α 、 β 、 γ の3ドメインから、構成されている⁴⁵ (図4)。一方で、③植物型クラスIジテルペン合成酵素の触媒部位は、①微生物型クラスIモノ/セスキテルペン合成酵素と同様の α ドメインのキャビティ内部であることに対し、④植物型クラスIIジテルペン合成酵素の触媒部位は、⑤微生物型ジテルペン合成酵素及び⑥クラスIIトリテルペン合成酵素と同様に、 β ドメインと γ ドメインの間であることが明らかとなっている。そのため、現在明らかになっているテルペン合成酵素の立体構造は、フォールドや活生部位の位置から5種類だけと考えられているが、それら以外の新しいドメインや触媒部位の位置が異なるテルペン合成酵素存在の可能性も否定はできない。今後もより多くのテルペン合成酵素が構造生物学的な手法によって解析されることで、テルペン合成酵素についての新たな知見

が明らかにされると考えられる。

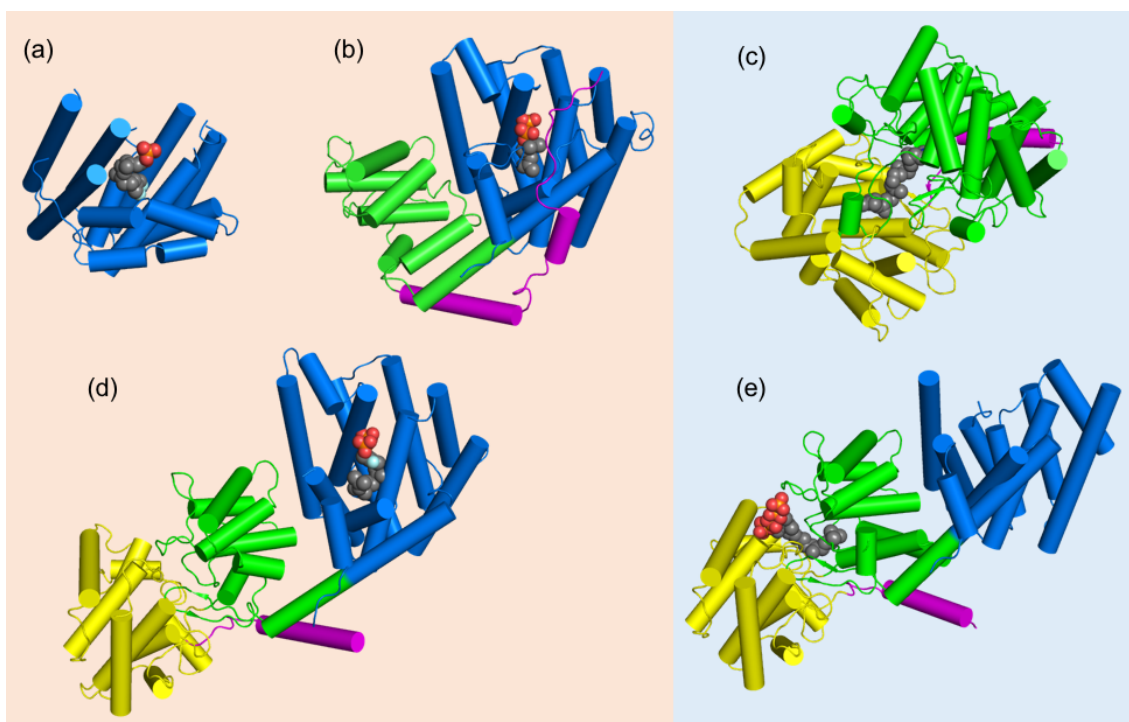


図4 立体構造に基づいたテルペン合成酵素の分類

(a) 微生物型クラスIモノテルペン合成酵素 (PDB ID: 6KWJ)、(b) 植物型クラスIモノテルペン合成酵素 (PDB ID: ONG)、(c) 植物型クラスIIトリテルペン合成酵素、及び微生物型ジテルペン合成酵素 (PDB ID: 3PYA)、(d) 植物型クラスIジテルペン合成酵素 (PDB ID: 1UMP)、(e) 植物型クラスIIジテルペン合成酵素の立体構造 (PDB ID: 3P5R)。αドメインは青、βドメインは緑、γドメインは黄、保存度の低いN末端側はマゼンタで示している。背景が赤の酵素群はαドメインに触媒部位を持つタイプを、背景が青の酵素群はβ-γドメイン間に触媒部位を持つタイプを示しており、触媒部位の内部に表示している球体モデルは結合した基質、もしくは基質アナログを示している。

2-2. αドメインの内部を触媒部位とするテルペン合成酵素の立体構造

現在、立体構造が明らかにされているテルペン合成酵素の触媒部位は、αドメイン内部のキャビティか、β-γドメイン間のキャビティのどちらかである。αドメイン内部を触媒部位とするテルペン合成酵素の場合、Mg²⁺を補因子として利用することでモノテルペン基質の geranyl diphosphate (GPP) の二リン酸の脱離を促し、これを起点として閉環モノテルペンの骨格形成を行う。そのため、モノテルペン合成酵素には二リン酸の脱離に必要なMg²⁺が結合するAspリッチな領域が共通して存在し、それぞれのモノテルペン骨格を選択的に構築するための特異な機構が存在する。(+)limonene合成酵素はαドメイン内部に活性部位を持つモノテルペン合成酵素として結晶構造が報告されている例の1つであるが、Mg²⁺の代わりにMn²⁺を添加した他、フッ素原子を含有する不活性なGPPアナログを用いることで基質の詳細な結合様式を捉えることに成功している。(+)limonene合成酵素の場合、αドメイン

内部には保存されているAspリッチ領域が存在しており、 Mn^{2+} が3分子結合していたことから、二リン酸の脱離に関わる Mg^{2+} は3分子必要であることが明らかとなった。また、このポケットに対してGPPは環化が可能な程度に折りたたまれた状態で結合することで、中間環化物である α -terpinyl cationを生成することができる。一般的に、モノテルペン合成酵素は α -terpinyl cationから様々な化合物を与えることができるが、(+)-limonene合成酵素ではポケットの底部に塩基として働くHisに加え、今までに触媒残基として必須であることが明らかになっていたCysとMetがクラスターとして存在することで、生成物である(+)-limoneneを選択的に生成することが可能となっている⁶⁻⁸ (図5)。

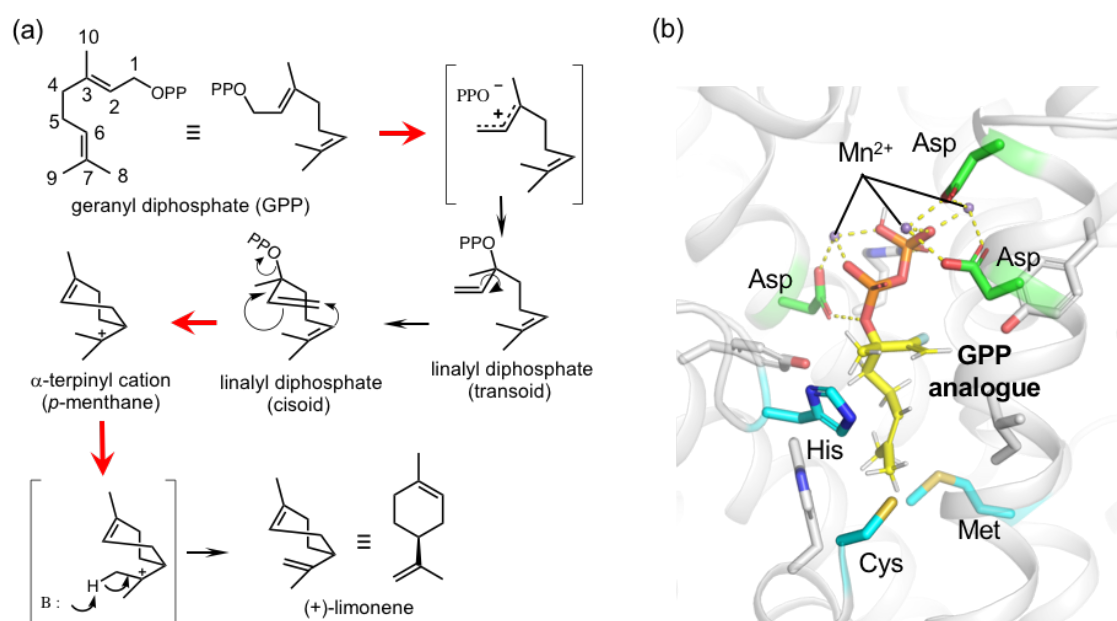


図5 limonene合成酵素の反応メカニズムと基質の結合様式

(a) (+)-limonene合成酵素によるGPPから(+)-limoneneを生成する反応メカニズム。赤矢印は酵素の機能によって直接触媒される反応を示している。B: はプロトンを引き抜く塩基を示している。(b) (+)-limonene合成酵素-GPPアナログ複合体の結晶構造 (PDB ID: 2ONG)の活性中心の構造。GPPと酵素を混合した場合は反応するため、C2の水素原子をフッ素原子に置換した不活性なGPPアナログを用いている。また、 Mg^{2+} 結合部位には Mn^{2+} が結合している。 Mg^{2+} 結合部位に関わるAps残基は緑で、プロトンの引き抜きに関わるアミノ酸残基はシアンで示している。

2-3 β - γ ドメイン間を触媒部位とするテルペン合成酵素の立体構造

β - γ ドメイン間のキャビティを活性部位とするテルペン合成酵素は α ドメインを触媒部位とするテルペン合成酵素と反応機構が異なっており、補因子を必要とせずに環化反応を触媒する。 β - γ ドメイン間を活性部位に持つテルペン合成酵素はプロトン化による折りたたみ反応の開始を共通の触媒機構として保有している。これらテルペン合成酵素についても構造解析は行われており、中でもsqualene-hopene環化酵素 (SHC) と oxidosqualene環化酵

素 (OSC) については詳細に解析されている。

SHCはトリテルペン類のsqualeneを基質としてhopeneを合成する酵素である。hopeneはトリテルペノイドに代表的なホパノイドの基本骨格を持つため、SHCはトリテルペノイドの生合成には欠かせない重要な骨格構築酵素として位置づけられている。SHCによるsqualeneの環化は、複数の環と複数のC-C結合について、複数の不斉中心と立体配座を一挙に制御しつつ行われる反応であり、自然界で最も複雑で美しい反応の一つとされている。SCHの反応機構は立体構造や様々な生化学な解析によって明らかにされており、はじめに、酸-塩基ペアであるAspとHisによってC2-C3の二重結合にプロトンを供与することで反応が開始される。これにより、C2カルボカチオン中間体が生成し、C2-C7間でMarkovnikov型のカチオン-オレフィン付加反応が起こり、C-C結合が形成される。また、これによりC6カルボカチオンが発生し、次のC11と反応する。このようにC-C結合の形成とカルボカチオンの生成を段階的に行うことでhopeneカルボカチオンが生成する。最後に溶媒水によってC24が脱プロトン化し、C23-C24間で二重結合が形成されることで反応が完了し、hopeneが生成される⁹(図6c)。また、hopeneの持つ5つの環構造は全て椅子型配座である*all-chair*型であるが、SHCは基質ポケットに結合したsqualeneを閉環する際に*all-chair*型のみを与えるコンフォメーションで結合させることで、立体配座選択的にhopeneを生成している(図6d)。

一方、OSCはsqualeneのC2-C3間でエポキシ化したoxidosqualeneを基質とし、生成物としてlanosterolを与える反応を触媒する。lanosterolは動物や微生物の細胞膜成分やステロイドホルモンを生合成するために必須なergosterolやcholesterolの前駆体であり、重要な化合物として知られている。そのため、OSCの立体構造はcholesterol生合成を抑える高コレステロール血症の標的酵素としても知られており、早くから立体構造の解析が行われてきた。OSCがlanosterolを生成する反応メカニズムについても盛んに研究が行われており、2004年にlanosterol結合同型OSCの結晶構造が報告された¹⁰(図7)。OSCとSHCは、ポケット内部に多数の芳香族アミノ酸が分布していたことや、触媒残基であるAspがプロトン化される基質のO原子と近い距離に位置する点は同じであった。OSCの反応は、エポキシ環の酸素原子へのプロトンを供給することで反応を開始としていたが、SCHと同様に、生成したカルボカチオンとオレフィンによる連続した閉環反応によって、基本骨格を構築していた。一方で、lanosterolの側鎖は折りたたまれずに伸びた状態で結合していたことから、SHCではC18-C22間で形成される新たなC-C結合が、OSCではC18-C22間でのC-C結合は生成されず、生成物は4環構造になると考えられた。また、C10-C11間の二重結合は、C19位にカルボカチオンを持つ中間体が、付近の水素原子とC10、及びC15位のメチル基の再配置を起こすことによって形成されると考えられた。

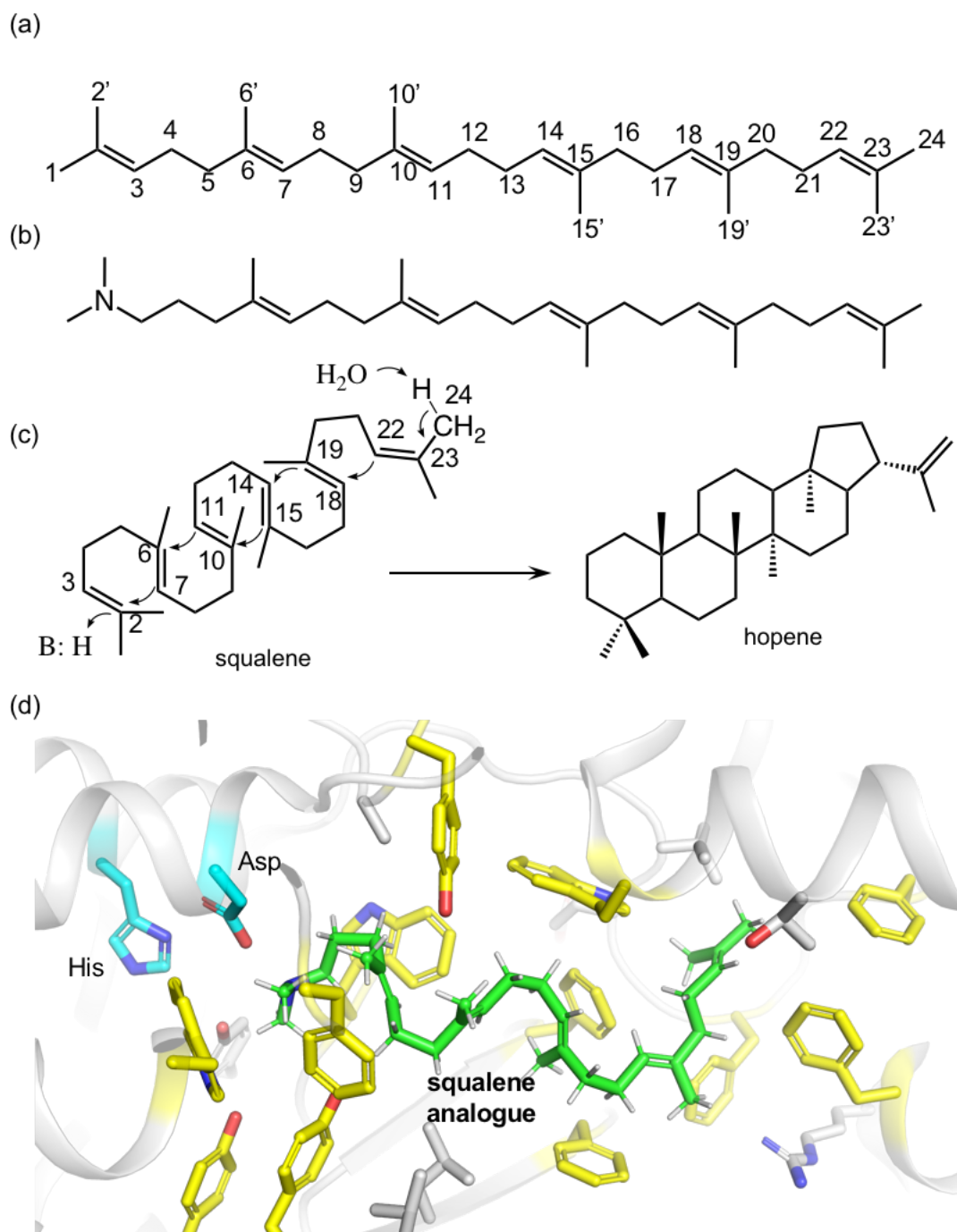


図6 squaleneとsqualeneアナログの化学構造、及びSHCが触媒する反応と触媒部位の立体構造

squaleneの構造 (a) と結晶構造解析に用いられた2-azasqualene (squalene analogue) の構造 (b)、及びSHCによる環化反応機構 (c) を示している。(c) のB: Hはプロトンを供給する酵素中のアミノ酸残基を示している。(d) 2-azasqualene結合型SHCの結晶構造 (PDB ID: 1UMP) のポケット構造を示しており、シアンで色付けされたHis残基とAsp残基はプロトン供給に関わるアミノ酸残基で、基質の結合に重要とされる芳香族性アミノ酸残基は黄色で示している。

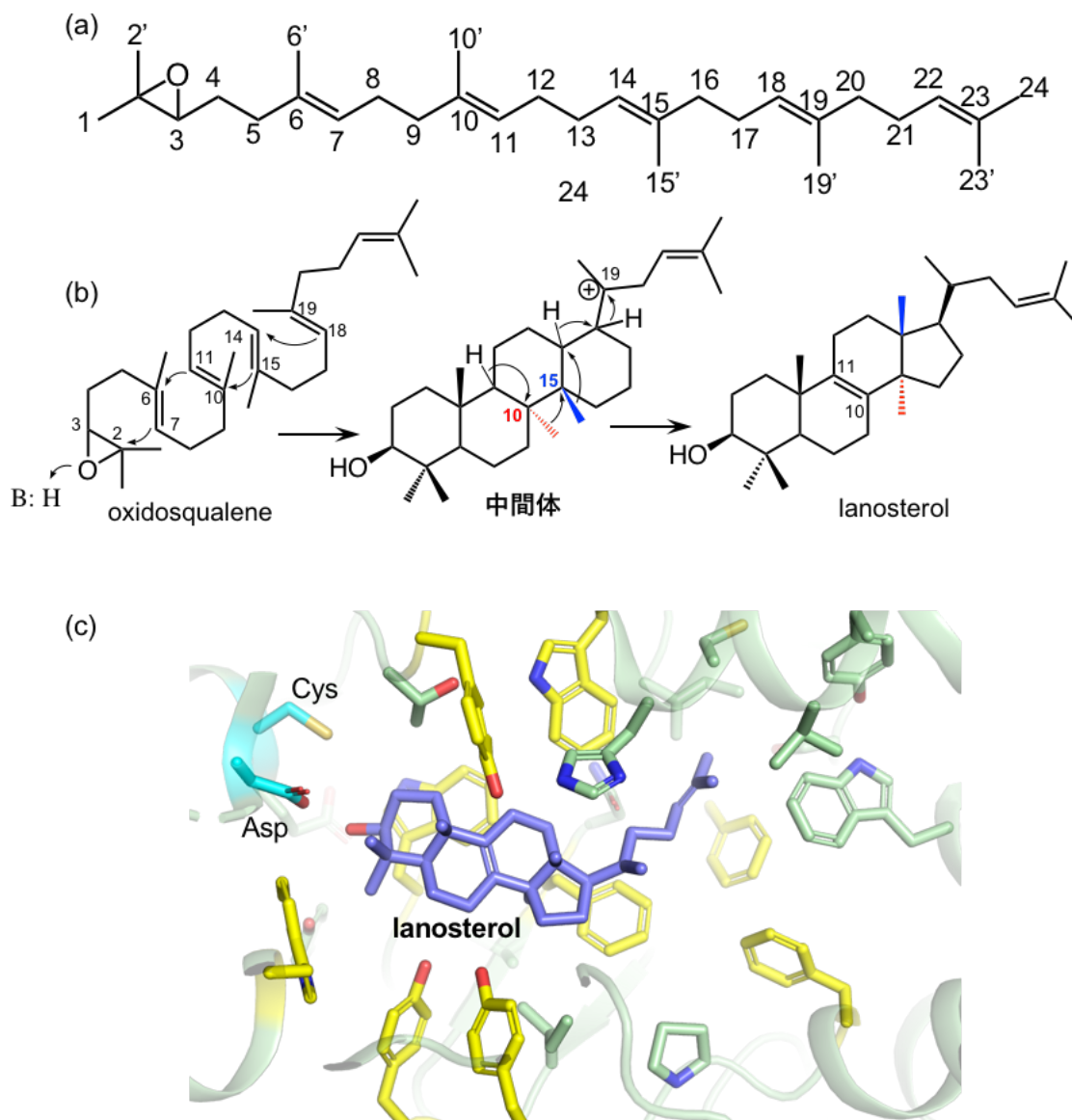


図7 OSCの基質と触媒する反応機構、及び触媒部位における生成物の結合様式

(a) oxidosqualeneの構造 (b) OSCがoxidosqualeneからlanosterolへと変換する反応。B: HはOSCの触媒残基であるプロトン供与体を示す。転移するC10及びC15位のメチル基はそれぞれ赤と青で示している。(C) lanosterol結合型OSCの結晶構造 (PDB ID: 1W6K) 中のlanosterol結合様式。シアンは触媒残基であるAspとCysを示しており、基質の結合に関わるとされる芳香族アミノ酸は黄色で示している。

3. 天然物の骨格を決定する環化酵素: Diels-Alder 反応を触媒する酵素 (DAase)

天然における理活性物質は多様な生合成機構によって生産されている。例えば植物は様々なテルペン合成酵素を用いることで、自信の成長を制御する植物ホルモンから、香りや薬理活性を持つ二次代謝産物などの様々な天然物を作り出している。一方で、放線菌や糸状菌などの微生物は、植物ほど多種多様なテルペンを作り出してはいないが、代わりにポリケチド合成酵素 (PKS) や非リボソームペプチド合成酵素 (NMPS)、及びこれらが融合した PKS-NRPS融合型酵素 (PKS-NRPS) を利用して、多様で複雑な化合物群を作り出している。

一般にPKSが作り出す化合物はポリケチド化合物と呼ばれており、医薬品などのリード化合物となる特徴的な生理活性を持つものが多い。テルペンなどの一般的な天然物は、炭素鎖の伸長を行うステップが存在し、初めにテルペン化合物共通の前駆体であるC5化合物のイソプレンを単位とした炭化水素を生合成することから始まる。テルペン化合物はそれら共通の前駆体をテルペン合成酵素による環化によって、それぞれのテルペン化合物に特異的な骨格を構築している。これに対してPKSやNRPS及びPKS-NRPSは、それぞれの酵素が独自の炭素鎖長を持つ前駆化合物を生合成し、特異的な環化によって最終生成物の基本的な骨格を構築する。また、テルペンの生合成と異なる点としては、生合成の中間生成物には酸素原子や窒素原子などのヘテロ原子が必ず含まれていることや、共役したポリエン領域を有することが挙げられるが、そのような生合成中間体の特徴は、後の環化や修飾を受ける際に大きな役割を果たしている。放線菌や糸状菌は、それら中間生成物を特定の骨格へと環化するために、テルペン合成酵素を利用せず、酸化酵素やメチル基転移酵素など、環化とは全く関係のない酵素の立体構造を有する環化酵素や、新規の立体構造を持つ、他の酵素とは「独立した」立体構造を有する環化酵素を利用している。それら環化酵素によって構築された骨格は、Diels-Alder反応 (DA反応) と呼ばれる[4+2]環化付加反応によって構築されていると推定される場合が多く、実際、その環構造はDiels-Alder反応を触媒する酵素 (DAase) による触媒を受けることで構築されていることが明らかになっている。

3-1. PKS、NRPS、及び PKS-NRPS による前駆化合物の生合成

○PKS

PKSは特定のCoA共役体を初発反応の基質としてポリケトン化合物 (ポリケチド化合物) を生合成する酵素である。PKSはその反応様式などからType-I、II、IIIの3つのクラスに分類されており、それぞれのクラスから生合成される炭素鎖の長さや化合物の特徴、及び最終生成物はある程度特徴づけられている。

Type-I PKSは、1つの機能を有する各ドメインが複数連なることで構成される巨大な酵

素として知られている。通常、Type-I PKSは、ある一連の反応を行う「モジュール」と呼ばれる単位を複数有しており、一つのモジュールにつきケトン鎖（炭素鎖）の伸長を一回行う。また、それぞれのモジュールを構成するドメイン群の構成はある程度決まっているが、生合成する化合物によってドメインの構成が多少変化するため、伸長される炭素鎖の構造はモジュールによって異なることが特徴的である^{11,12}。基本的な炭素鎖の伸長に必須のドメインとその機能としては、各ドメイン間やモジュール間での基質の受け渡しをするアシルキャリアプロテイン（ACP）ドメイン、ACPドメイン上のCys残基に伸長にアセチルCoAやマロニルCoAなどの炭素鎖を供給するアシル基転移酵素（AT）ドメイン、ACP上のアシル基を受け取り、同一モジュール内の伸長基質を持ったACPと縮合するケトシンターゼ（KS）ドメインが挙げられ、これら3つのドメインで炭素鎖の伸長を行う。最初にロードされる基質（スターター基質）には、acyl CoAやCoumaroyl CoAなどの様々なCoA誘導体を利用することができ、炭素鎖を伸長するためにロードされる基質は基本的にmalonyl CoAかmethylmalonyl CoAを利用している（図8a）。この他にも各モジュール内には修飾ドメインとしてケトン還元酵素（KR）ドメインや脱水酵素（DH）ドメイン、エノイル還元酵素（ER）ドメインなどが存在し、これらの追加された修飾ドメインによってさらに化合物の骨格を構築していく。また、骨格の構築が完了すれば、最終的にはチオエステラーゼ（TE）ドメインによって伸長された基質がPKSから切り離される。このような複数のモジュールから成るPKSはModular Type-I PKSと呼ばれている（図8b）。一方で、Type-I PKSには1つのモジュールのみからなる Iterative Type-I PKSと呼ばれるもう一つのサブタイプが存在しており、1つのモジュールで複数回の伸長サイクルを行うことで化合物を合成する^{11,12}。

Type-II PKSはType-I PKSのモジュール構造とは異なり、単一の機能を持つドメインが独立した酵素として存在し、複数のドメインが集合することでポリケチド化合物を生合成している（図8c）。ただし、Type-II PKSを構成する各酵素の働きは、基本的にはType-I PKSの各ドメインと同様であり、Type-I PKSの各ドメインの立体構造とType-II PKSの各酵素の立体構造の大部分もほとんど同様である。また、生合成される化合物の特徴もType-I PKSによって生合成された化合物と似ていることが多い。

Type-III PKSはACPを利用せず、KSドメイン単独で基質のロードや伸長反応を触媒する。反応の触媒は単独の酵素が反復して行うため、Type-III PKSが生成するポリケチド化合物の中間生成物は、他のPKSが生成する化合物と比べて単純な構造を持つものが多い。一方で、伸長を終えたポリケチド化合物はそのままType-III PKSによって環化されるが、環化後の化合物の構造には多様性が見られ、医薬品や色素、香料などの人類にとって有用な化合物を生み出す酵素群であることも知られている。Type-III PKSは植物でよく見られる酵素であるが、放線菌や糸状菌などの微生物でも存在することが確認されている。

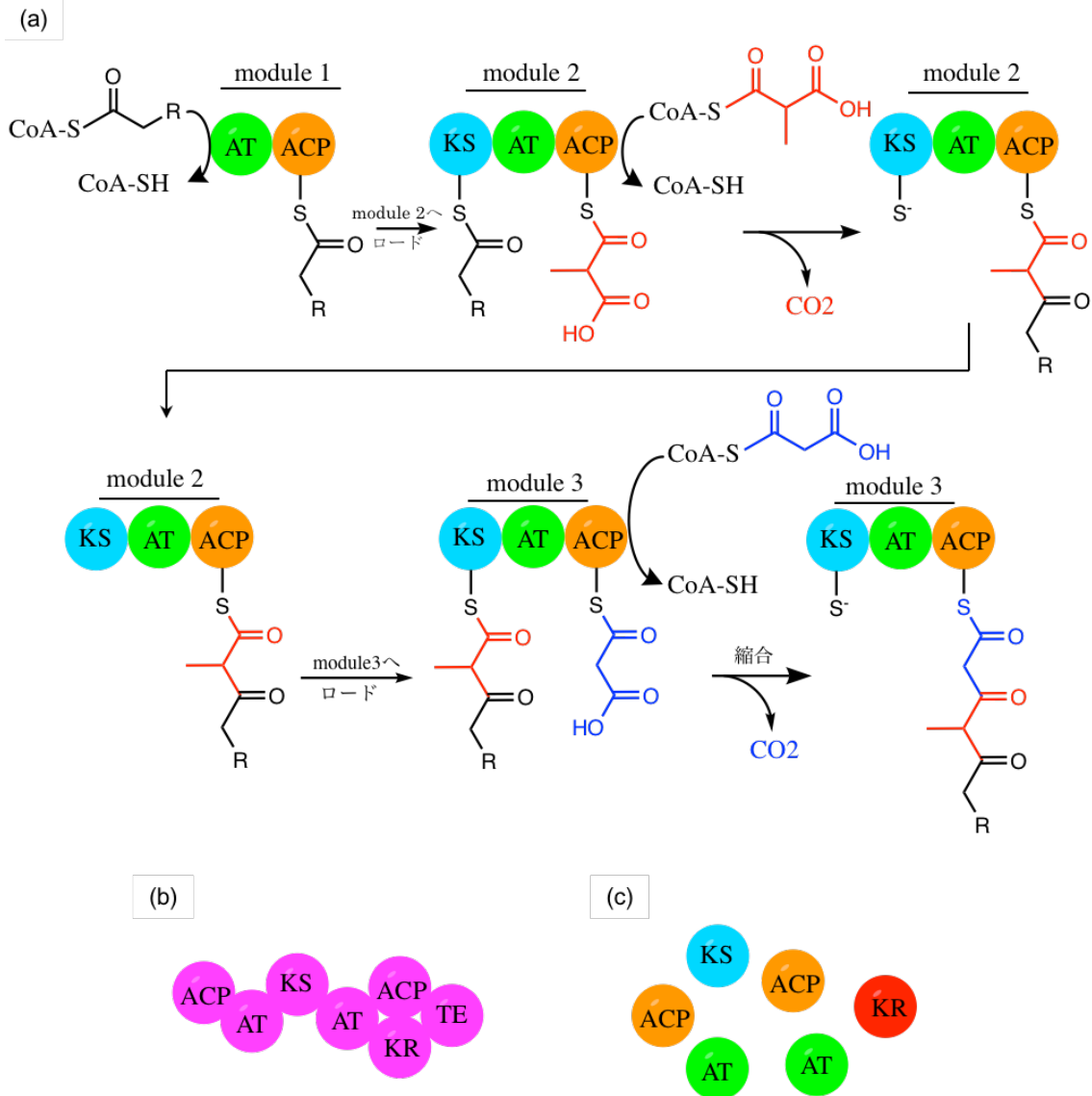


図8 Type-I PKS、及びType-II PKSによるポリケチド化合物の生合成と酵素の模式図

(a) 典型的なType-I PKSによる炭素鎖の伸長反応のメカニズムを示している。モジュール1のスターター基質を黒、モジュール2及びモジュール3の基質を赤と青で示しており、赤は methylmalonyl CoA、青はmalonyl CoAを示している。モジュール1ではそれぞれの酵素が特定のCoA誘導体をスターター基質として利用し、基本的な伸長基質としてはmalonyl CoAかmethylmalonyl CoAを利用している。(b) Type-I PKSのモジュールを構成するドメインと酵素全体の模式図を示している。(c) Typ-II PKSを構成する各酵素の模式図を示している。

○NRPS

タンパク質やペプチドは、通常、mRNAとリボソームを介して翻訳されることで生合成される。一方、単一アミノ酸から成るポリペプチド鎖や環状ペプチドなどの一部のポリペプチドに関しては、翻訳を介さず、NRPSによって生合成される。NRPSはPKSと同じモジュール構造を持つマルチドメイン型の酵素であり、PKSと同様に鎖長の伸長を行う必須ドメ

インと、補助的な機能を持つ修飾ドメインから構成される。NRPSの必須ドメインは、縮合ドメイン (C)、アデニル化ドメイン (A)、ペプチド運搬タンパク質ドメイン (PCP) の3つとされている。アミノ酸をペプチドへと縮合する仕組みとしては、第一モジュール上のAドメインが基質選択性によって特定のアミノ酸と結合し、adenosine triphosphate (ATP) のアデノシル基をアミノ酸へと転移してaminoacyl adenosine monophosphate (aa₁-AMP) を合成する段階から始まることが知られている。その後、aa₁-AMPがホスホパンテテニル化された第一モジュール上のPCP (holoPCP₁) における、ホスホパンテテニルアームのチオール基へと転移され、aa₁-S-holoPCP₁が合成される。このaa₁-S-holoPCP₁が第二モジュール上で合成されたaminoacyl-S-holoPCP (aa₂-S-holoPCP₂) とCドメイン上で縮合されることで、伸長されたペプチド (aa₁-aa₂) が付加されたaa₁-aa₂-S-holoPCP₂が合成される。これにより、PCP上で次々とペプチド鎖が伸長され、最後に修飾ドメインのチオエステラーゼドメインがチオエステル結合を加水分解することでペプチドがリリースされる^{13,14} (図9)。

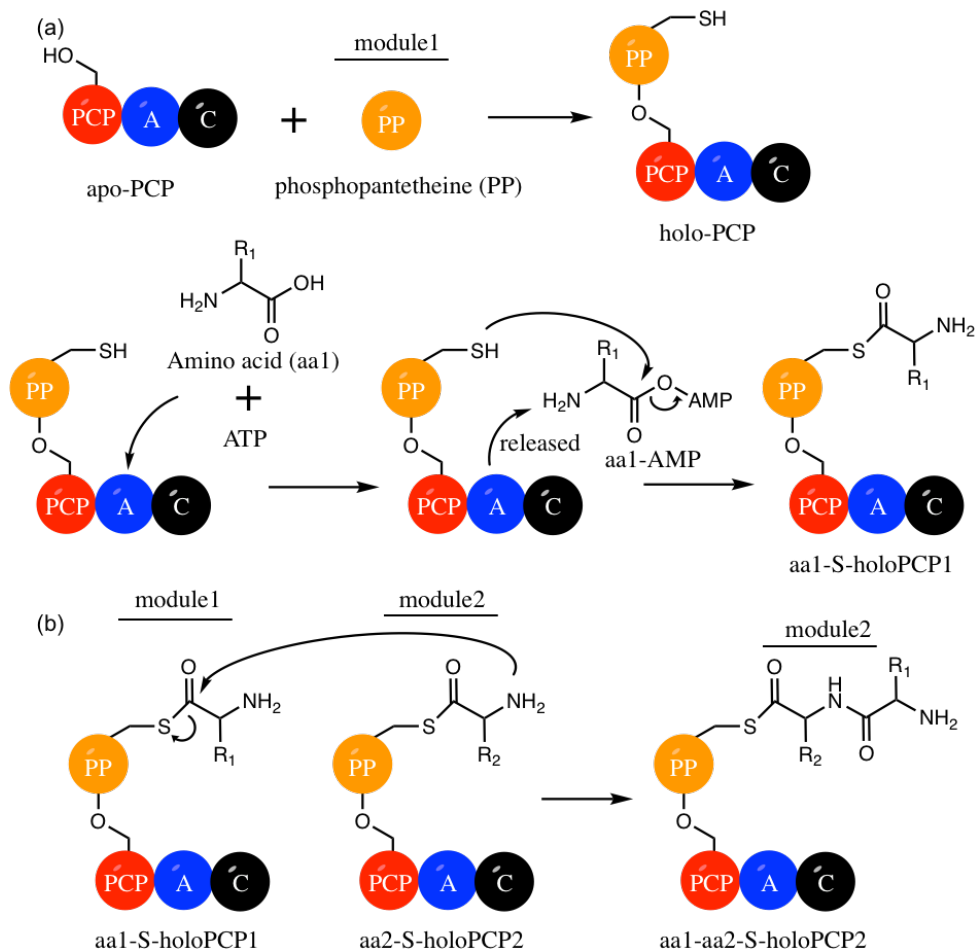


図9 NRPSによる基本的なペプチド鎖の伸長メカニズム

(a) モジュール1のPCPドメインのholo化とアミノ酸の縮合によるaa₁-S-holoPCPの合成。
 (b) モジュール1で合成されたaa₁-S-holoPCP₁とモジュール2で合成されたaa₂-S-holoPCP₂によるペプチドの縮合メカニズム。縮合はCドメインが担っている。

○PKS-NRPS融合型酵素 (PKS-NRPS)

PKSとNRPSは互いを構成するそれぞれのドメインの立体構造は異なるものの、共にモジュール構造を持つ巨大酵素であるという点で共通した特徴を持つ。PKS-NRPSはPKSのモジュールとNRPSのモジュール組み合わせて天然物を作り上げる酵素で、糸状菌や放線菌といった、多種多様で複雑な骨格を持つ有用な天然物を生合成する生物でしばしば確認されている。PKS-NRPSが作り出す天然物の特徴としては、その骨格の内部にアミノ酸由来の置換基やN原子を含むことが挙げられる (図10)。PKS-NRPSは天然物の骨格を構築する重要な酵素だが、典型的で単純なPKS-NRPSの立体構造解析はほとんどされていない。この理由の1つとしては、PKS-NRPSはPKSやNRPSのそれぞれのドメインにおける立体構造はほとんど同様であり、酵素全体が非常に巨大かつ動的であることが構造解析を妨げていることがあげられる。現在、一般的なPKS-NRPSのそれぞれのドメインによる触媒メカニズムについてはPKSやNRPSとほとんど同様と考えられているが、PKS-NRPSにはそれぞれの酵素に特徴的な独自の生合成システムが備わっていることが多く、それぞれの反応機構についてはいくつか研究がされているが、構造生物学的な知見は未だ乏しい現状がある。

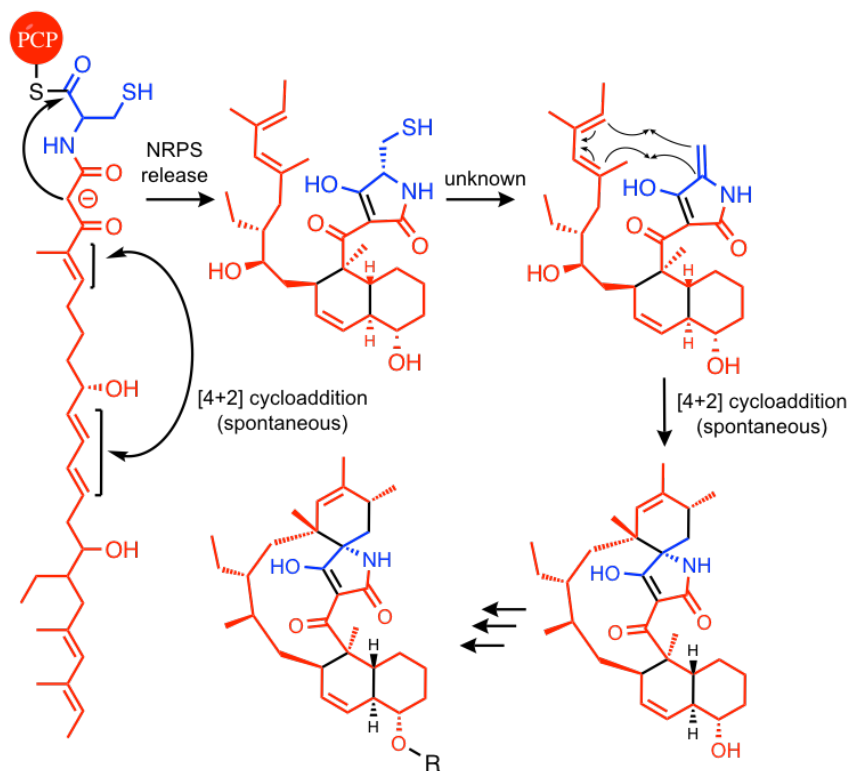


図10 PKS-NRPSによって生合成されるpyrroindomycinの生合成経路¹⁵。

赤はPKSモジュールによって伸長された領域を、青はNRPSモジュールによって付加された領域を示している。この生合成産物に対し、さらにRの領域にグリコシル化、酸化、メチル化等の様々な反応を経ることでpyrroindomycinが合成される。pyrroindomycinの場合、NRPSによって付加されるアミノ酸は1分子のCysであることが明らかとなっている。

3-2. DAase の立体構造と DA 反応の触媒メカニズム

テルペノイドの生合成中間体とは異なり、PKS、NRPS、及びPKS-NRPSによって生合成された中間体は多くのヘテロ原子や共役したポリエン領域を含むため非常に反応性に富んでいる。これらは通常、自発的かつ非特異的な環化や酸化による分解を受けてしまうが、生合成の過程では直ちに酵素による特異的な環化反応が触媒され、安定な化合物へと誘導される。近年、PKS、NRPS、及びPKS-NRPSによって生合成された中間体の一部が、酵素的なDiels-Alder反応 ([4+2]環化付加反応とも呼ばれる) を受けることで環化されることが見出されており、Diels-Alder反応 (DA反応) を触媒する酵素 (DAase) が天然物の基本的な骨格の構築を制御している重要な酵素であることが知られるようになった。DA反応は新たなC-C結合を生み出す反応として、有機合成の分野で一般的に知られている代表的な反応であり、共役したdieneとアルケン (DA反応においては特に「dienophile」と呼称される) が反応することでシクロヘキセン環を形成する。天然物には、DA反応によって構築されたと考えられる骨格がしばしば見出されており、現在ではそれらのいくつかの例がDAaseによって環化された骨格であることが知られている。

テルペン合成酵素とは異なり、DAaseはその「機能」として酵素的に分類されるため、今までに明らかにされたDAaseの立体構造は様々で、特定のフォールドやモチーフを持たないと考えられている。例えば、強力な殺虫作用を示すspinosyn AはPKSによって前駆体のマクロライドが生合成され、DA反応を介することでspinosynの基本骨格が構築される。spinosyn生合成の系では、DA反応は自発的に進むことが確認されているが、DAaseであるSpnFが関与することでDA反応が触媒され、自発的なDA反応よりも約150倍の反応速度で環化が進むことが明らかとなっている¹⁶ (図11a)。SpnFが発見された2010年の段階では、天然のDAaseとしてはまだ5例しかなかったが、2015年にはSpnFの立体構造¹⁷が明らかにされており、その後、DAaseのモデルとして計算化学などの様々な分野で研究が行われた。SpnFの全体構造はS-adenosylmethionine (SAM) 依存性メチル基転移酵素様のモチーフを有しており、活性部位には補因子であるSAM、もしくはSAMのメチル基が脱離したS-adenosylhomocysteine (SAH) が結合することがわかっている (図11b, c)。しかしながら、SpnFが触媒する反応自体はメチル基の転移を伴わないため、SpnFはSAM依存性メチル基転移酵素がspinosyn生合成に適応するために進化した酵素であると考えられている。SpnFに結合したSAM/SAHの役割としては、基質ポケットを閉鎖状態へと誘導することが主であり、反応の触媒には関与しないと考えられている。これにより、ポケットに結合した基質は内部のdieneとdienophileが接近した状態が維持され、DA反応が加速されていると考えられている。

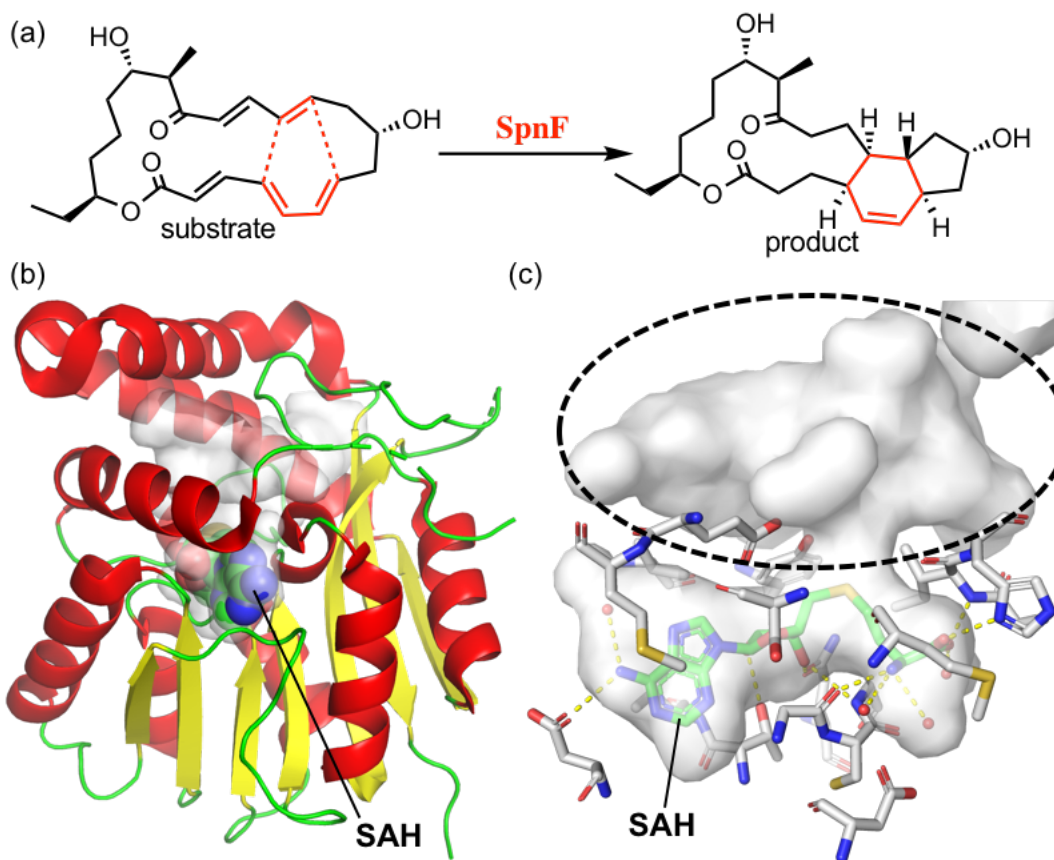


図11 SpnFが触媒する反応と立体構造

(a) SpnFが触媒するDA反応を示している。(b) SpnFの結晶構造 (PDB ID: 4PNE) を示している。 α -ヘリックスを赤で、 β -シートを黄色で示している。リガンドとして結合していたSAHは球体モデルで示している。基質ポケット内部の分子表面は白で示している。(c) SpnFに対するSAHの結合様式と基質ポケットの構造を示している。黄色の破線は水素結合を示している。破線の円で囲んだ領域は基質が結合すると予測されているポケット領域を示している。

また他のDAaseでは、本来は疎水的なリガンドを受容するタンパク質がDAaseとしての機能を獲得したと考えられている分子種も存在する。序章3-1項の図10で示した pyrroindomycinの生合成では、PKS-NRPSによって生合成されたポリケチド中間体が2度にわたるDA反応を介することで、pyrroindomycinの基本骨格が構築される。PyrI4はpyrroindomycinの2度にわたるDA反応のうちの二段階目の反応を触媒する酵素として同定され、2016年に立体構造が明らかにされた¹⁸。PyrI4は β バレル型の立体構造を形成しており、レチナルや脂肪酸といった疎水的な化合物をバレル内部に収納するリポカリンタンパク質様のフォールドを形成していた (図12a)。実際、PyrI4のバレル内部には生成物が結合しており、触媒部位はバレル内部であることが明らかとなった。SpnFとは異なり、PyrI4には補因子が存在せず、DA反応の触媒メカニズムが異なると考えられた。生成物が結合し

た結晶構造や変異体解析などから、PyrI4のDA反応の触媒メカニズムは、Q115とH117が dienophile近傍に存在する2つのカルボニル基と水素結合を形成することで電子吸引効果を引き起こし、dienophileのエネルギー準位を低下させることでdienophileが活性化し、DA反応を加速していると考えられている(図12b, c)。

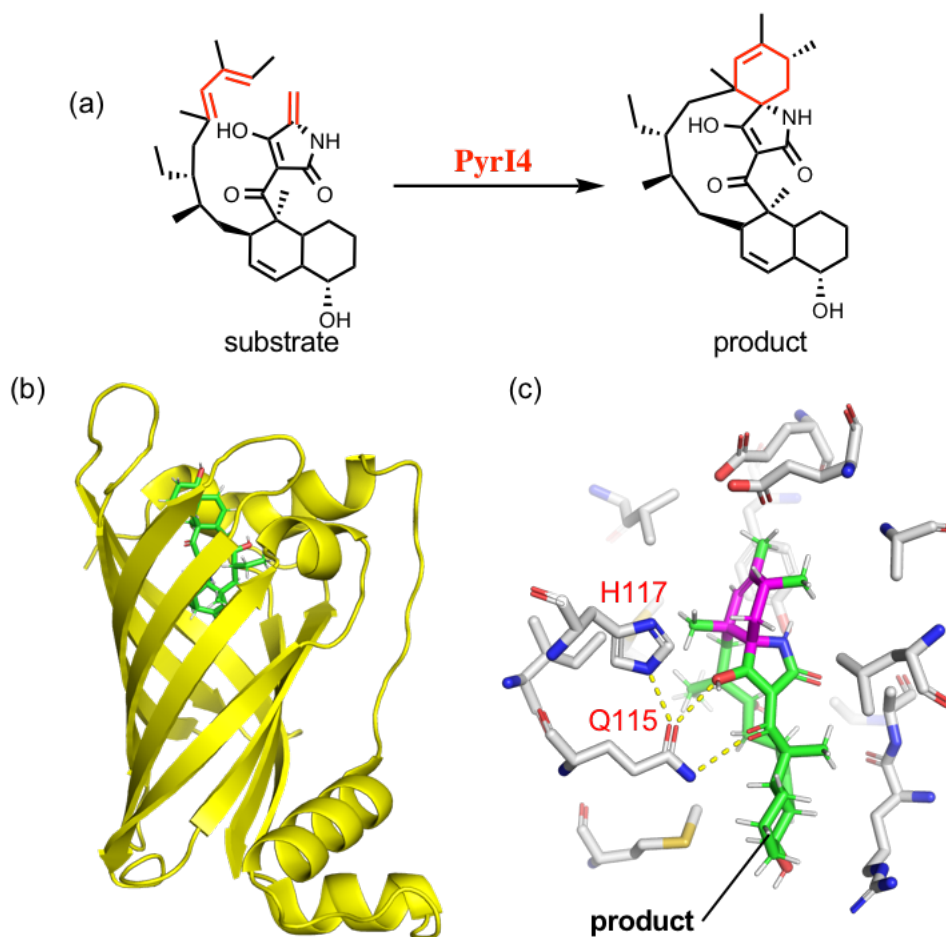


図12 PyrI4が触媒する反応とPyrI4の結晶構造 (PDB ID: 5BU3)

(a) PyrI4が触媒するDA反応を示している。(b) PyrI4の全体構造を示している。スティックモデルはPyrI4に結合したproductを示している。(c) productの結合様式を示している。黄色の破線は水素結合を示している。緑のスティックモデルはproductの炭素原子を、マゼンタはDA反応によって構築されたシクロヘキセン環の炭素を示している。

3-3. 立体選択的なデカリン骨格を構築するDAase

天然物の中には、共通してデカヒドロナフタレン (デカリン) 骨格を有する化合物群 (デカリン化合物) が確認されている。デカリン化合物は有用な生理活性を示すものが多く、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌をはじめとする多剤耐性菌に抗菌活性を示す pyrroindomycin^{15,19}や、ヒト免疫不全ウイルスが持つHIV-Iインテグラーゼに対して阻害活性を示す equisetin と phomasetin²⁰が医薬品のリード化合物として期待されている他、高コ

レステロール血症の治療薬として実用されているlovastatin²¹が知られている (図13)。そのため、デカリン化合物の生合成機構は創薬の観点から興味を持たれており、種々のデカリン化合物を生合成する遺伝子群の同定と機能の解析が進められてきた。現在ではデカリン化合物の主骨格はPKS-NRPSによって構築されていることが明らかとなっており、特に1999年に報告されたlovastatinの生合成酵素の解析など^{22,23}から、主骨格であるデカリンは、PKSによる炭素鎖の伸長ステップの途中で導入されたdieneとdienophileが自発的に分子内DA反応を起こすことで構築されることが明らかとなっている (図14)。しかしながら、化学合成による自発的なDA反応ではlovastatinのジアステレオマーが生成されてしまうことが知られていたため、lovastatinのデカリン骨格に正しい立体化学を与える要因については不明なままであった。そのため、正しい立体化学を与える「何か」が存在すると考えられてきたが、そのような因子は見つかっておらず、以降、デカリン骨格は酵素的に導入されたdieneとdienophileが非酵素的な環化を受けて構築されると考えられてきた。

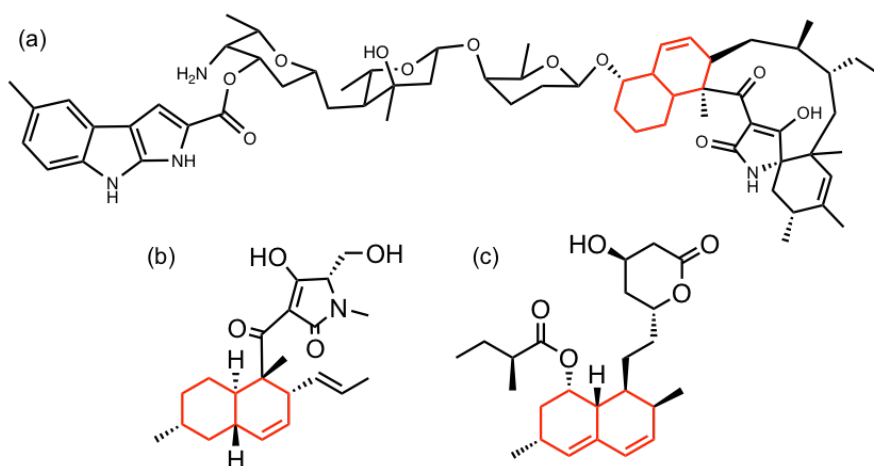


図13 DSによる環化を受けて生合成される天然物

pyrroindomycin (a)、equisetin (b)、及びlovastatin (c) の構造。デカリン骨格は赤で示している。

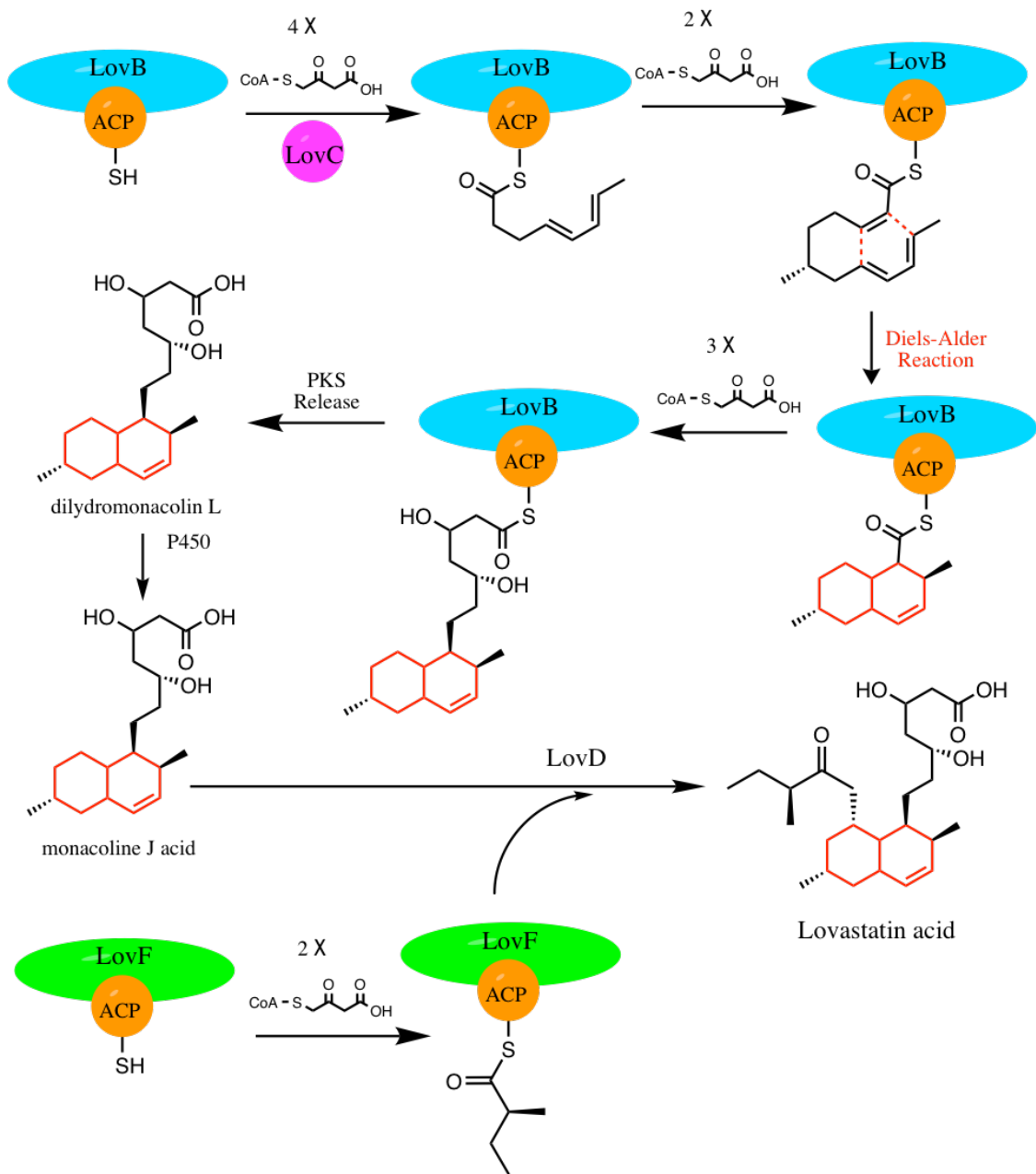


図14 lovastatin生合成経路

デカリン骨格は赤で示している。LovastatinはType-I酵素のLovBとLovFがそれぞれ独立して炭素骨格を合成し、最終的にLovDによって縮合されることで生合成される。デカリン骨格の構築はLovBに繋がれたポリエン中間体が分子内DA反応を起こすことで構築されると考えられている。

しかし、2015年に報告された加藤らによるequisetinの生合成酵素群の解析により、PKSやPKS-NRPSではない、Fsa2と呼ばれる独立した酵素が直接的に分子内DA反応を触媒し、デカリン骨格を構築することを報告した^{24,25}。その後、Fsa2と同様なDA反応を触媒する酵素として、Sch210972の生合成酵素であるCghA²⁵や、myceliothermophin Eの生合成酵素であるMycB²⁶などが次々と同定された。また近年では、pyrroindomycinの持つデカリン骨格を構築する酵素PyrE3の結晶構造が報告され、PyrE3の狭いポケット内に基質が収まることで基質中のdieneとdienophileが接近し、DA反応を加速することでデカリン骨格を構築するメカニズムが提案された²⁷。また、dienophile近傍のカルボニル酸素がGly主鎖のアミドと水素結合し、電子吸引効果が働くことでdienophileが活性し、これによってDA反応が加速されると考えられた (図15)。一方で、PyrE3はflavin adenine dinucleotide (FAD) 依存型モノオキシゲナーゼと同じ構造的特徴を持つが、触媒する反応にはFADの酸化還元状態が全く関与しないことが明らかにされている。そのため、PyrE3はFAD依存型モノオキシゲナーゼが独自に進化し、新たに機能を獲得した酵素であると考えられている。これらデカリン骨格を構築する酵素 (デカリン合成酵素、DS) は、現在見つかっているその他のDAaseと相同生がなく、予測される二次構造のモチーフが明らかに異なっている。そのため、PyrE3の立体構造の解明だけでは、現在広く存在するDSの一般的な構造や機能を説明することが難しい。デカリン骨格の構築とDSの研究は未だ途上段階であるため、まずは、モデルとなる「一般的なDS」を対象とした、構造-機能相関に関する研究が必要である。

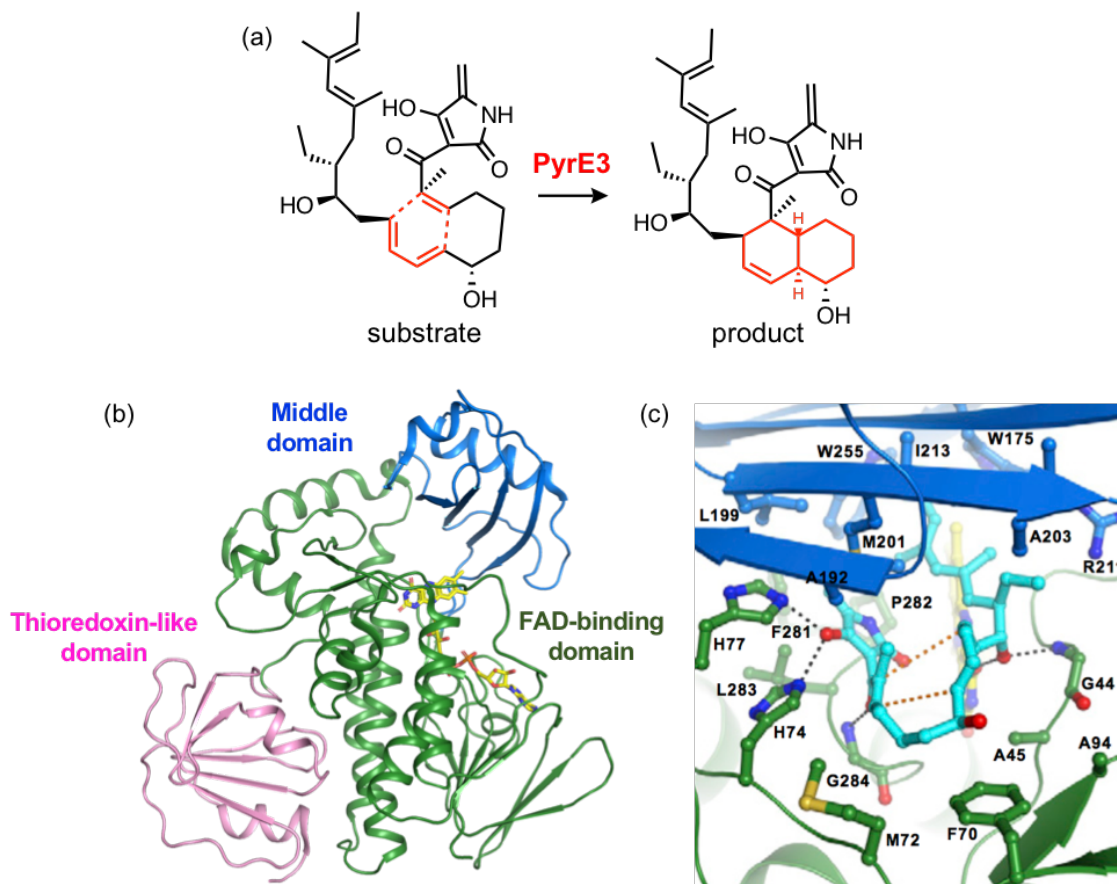


図15 PyrE3が触媒する反応と立体構造

(a) PyrE3が触媒するDA反応 (b) PyrE3の結晶構造 (PDB ID: 5XGV) (c) ドッキングシミュレーションによって予測された基質の結合様式。ドッキングシミュレーションから、dienophile近傍のカルボニル酸素とGly284のアミドが水素結合を形成すると予測された。

3-4. 様々なデカリン骨格を構築する Fsa2 ファミリー

これまでに200種類以上のデカリン骨格を持つ様々な化合物が同定されている²⁸。それらのデカリン骨格を構築するDAaseについては未だ一部しか明らかにされていないが、2015年にDAaseとして発見されたFsa2は、その他に発見された多くのDAaseに対して相同性を示すことがわかっている。Fsa2に相同性を示す酵素群 (Fsa2関連酵素群、Fsa2ファミリー) については未だ立体構造は明らかになっていないが、それぞれの酵素は理論上生成される4種のデカリン骨格、つまり (6*S*,11*R*) もしくは (6*R*,11*S*) の*trans*型のデカリン骨格か、(6*S*,11*S*) もしくは (6*R*,11*R*) の*cis*型のデカリン骨格を選択的に生成できることが知られている^{24,26,29,30} (図16)。過去に発見され構造解析されたDAaseは全て、本来は異なる機能を持っていたタンパク質がDAaseとして進化した場合か、既知の立体構造には全く見られない独自のフォールドを有した、DAaseのみであり、DAaseとしての一般的な議論は困難であった。これに対し、Fsa2関連酵素群は予測される二次構造やモチーフが似

ているため、DAaseとして早期に進化したタンパク質ファミリーであると考えられている。このことから、Fsa2関連酵素群の機能と立体構造の関連を明らかにすることができれば、DAaseとして巨大なファミリーを持つと推測されるFsa2関連酵素の一般的な反応メカニズムを解明できるだけでなく、Fsa2関連酵素間での機能の入れ替えや、一次構造から機能を推定することも可能になると考えられる。デカリン骨格を構築するDAaseは、天然物のデカリン骨格を構築する重要な酵素であるにもかかわらず、その研究は端緒についたばかりである。Fsa2ファミリーによるDA反応のメカニズムや立体選択性を解明するためには、それら多くの酵素について構造解析による構造-機能相関の解明や、理論計算によるなどを行い、構造-機能相関を明らかにする必要があるだろう。

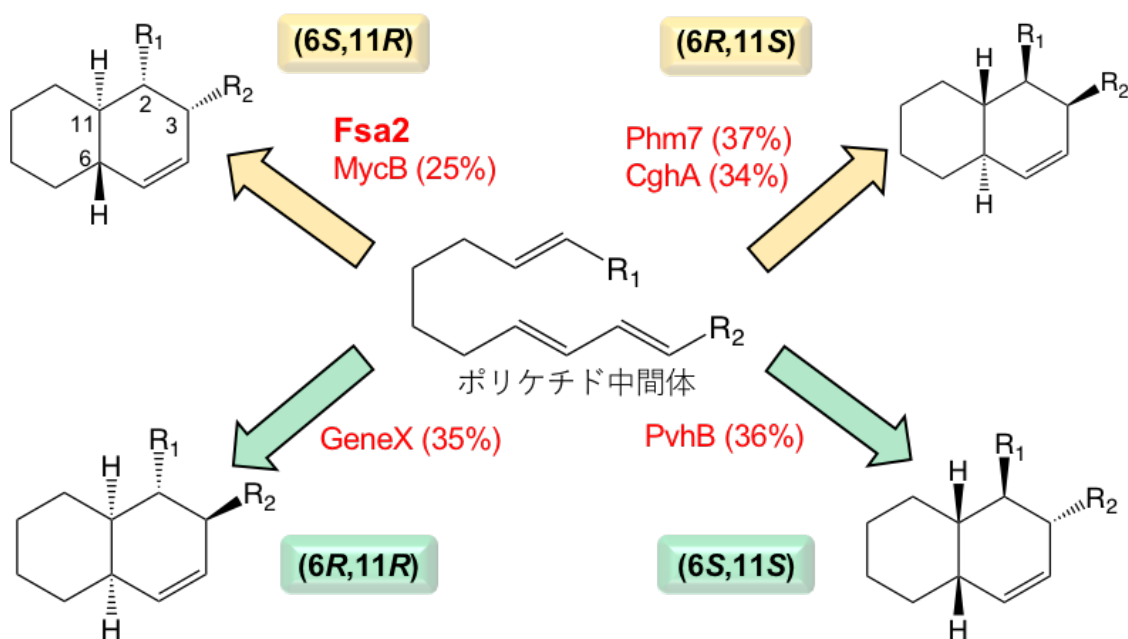


図16 Fsa2関連酵素群が構築する様々なデカリン骨格

DA反応によって作られる4種類のデカリン骨格と、それらを選択的に作り分ける各種Fsa2関連酵素群。基質となるポリケチド中間体は全ての酵素に共通する領域のみを示している。括弧内の数字はFsa2に対する各種遺伝子の相同性を示している。黄、緑色はそれぞれ*trans*型、*cis*型のデカリン骨格を示している。GeneXは非公開のため、相同性のみを記載した。

4. 天然物の酸化修飾を担う酵素: シトクロムP450 (P450)

天然物の生合成では、テルペン合成酵素やDAaseによる環化を経て基本骨格が構築されるが、それらは生理活性を持たない天然物の中間生成物として得られる場合がほとんどである。天然物の生理活性は、構築された骨格が様々な修飾酵素群による置換基の導入や不飽和化などで生み出される場合が多い。特に酸化酵素群による酸化反応は、導入される水酸基やカルボニル基、さらには脱水素反応による不飽和結合の形成などが、その後の生合成経路における置換基の導入や、縮合や環化といった新たな骨格の形成の足場となるため非常に重要である。シトクロムP450 (P450、CYP) は幅広い生物種で存在が確認されている代表的な酸化酵素(一原子酸素添加酵素)の一つである。様々な薬物を代謝できる幅広い基質選択性を示す分子種や、非常に厳密な基質特異性を有し、位置・立体選択的な酸化反応を触媒できる分子種まで、様々な種類が存在する多様性のある酵素である。天然物の生合成においてもよく確認される酵素で、厳密な基質特異性によって多様な天然物を正確に認識し、反応を触媒することで天然物を「修飾」し、生理活性を発現させている。

4-1. P450 の命名と分子的性質

P450は幅広い生物種で存在が確認されているため、どの生物種由来の分子種であるかを定める一般的な命名法が存在する。名称はCYPxyzもしくはP450 xyzと名付けられ、xには生物種を示す番号が、yにはサブファミリーを規定するアルファベット1-2文字が、zには個々の分子種を示す番号がつけられる。特にファミリーの番号を示すxについては詳細に規定されており、動物由来なら1-49番と301-399番を、植物由来なら71-99番と701-799番を、酵母、菌類、原生物には51-69番、501-599番、及び5001-5999番を、その他細菌類には101番を適用することになっている。例えば、様々な薬物等の代謝に関わるヒト由来のP450はCYP1A2と名付けられている。

P450は分子内に補因子として鉄-ポルフィリン錯体であるヘムの一種、ヘム*b*を含んだヘムタンパク質として知られている。一般的にヘムタンパク質は、ヘム中心の鉄原子の第5及び第6配位子としてアミノ酸残基側鎖のヘテロ原子が配位しており、多くの場合でHis残基のイミダゾール環が配位している。ヘムタンパク質は、ヘムに対する配位子や配位する原子の種類によって、それぞれ特徴的な紫外可視吸収スペクトルのパターンを示すことが知られている。ヘムタンパク質としてのP450の大きな特徴の1つに、第5配位子としてCys残基のチオール基が、基質が結合していない休止状態では第6配位子として水分子が配位していることが挙げられる。この休止状態のP450は、6配位低スピン型の吸収スペクトルを示し、ソーレー体 (soret体、 γ 帯) と呼ばれる強い吸収帯を417nm付近に持つ (図17a)。また、P450の第6配位子として存在する水分子は、溶媒中に存在する他のヘム配位子と容易に交換され

る。そのため、第6配座にイミダゾールなどの配位子がN原子を介して配位すれば、ソーレー帯の吸収波長は418-425 nm付近へとシフトし、シアン化物イオンが配位すれば、ソーレー帯は430 nm付近へとシフトするなど、特定の配位子や配位する原子の種類によって特徴的な吸収スペクトルのパターンを示すことが明らかとなっている。特にヘムを還元した還元型P450に対して一酸化炭素 (CO) が配位すると、他のヘムタンパク質には見られない450 nm付近にソーレー帯の吸収が見られる (図17b)。この特徴から、色素を意味する「Pigment」の頭文字のPと、還元CO結合型のソーレー帯の吸収波長である450 nmをとって「P450」と命名された。また、変性などによってP450のヘムへの配位構造が崩れると、還元CO結合型のソーレー帯の極大吸収波長が420 nm付近へとシフトすることから、この状態は「P420」と呼ばれている。一方、基質がP450のヘム第6配座近傍 (基質結合部位) に結合すると、第6配位子の水分子が解離する。ただし、多くのP450は、無極性あるいは極性の偏りがほとんどない炭化水素などを基質とするため、ヘムの配位子にはならず、ヘムの第6配座は「空」となり、5配位高スピン型の吸収スペクトルのパターンを示し、ソーレー帯の極大吸収波長を390 nm付近に持つ (図17c)。これらのことから、P450の検出やそれぞれのP450の分子の性質などを調べる際には、基質や様々な配位子の結合に伴う吸収スペクトルの変化をプローブとした研究手法がよく用いられる。

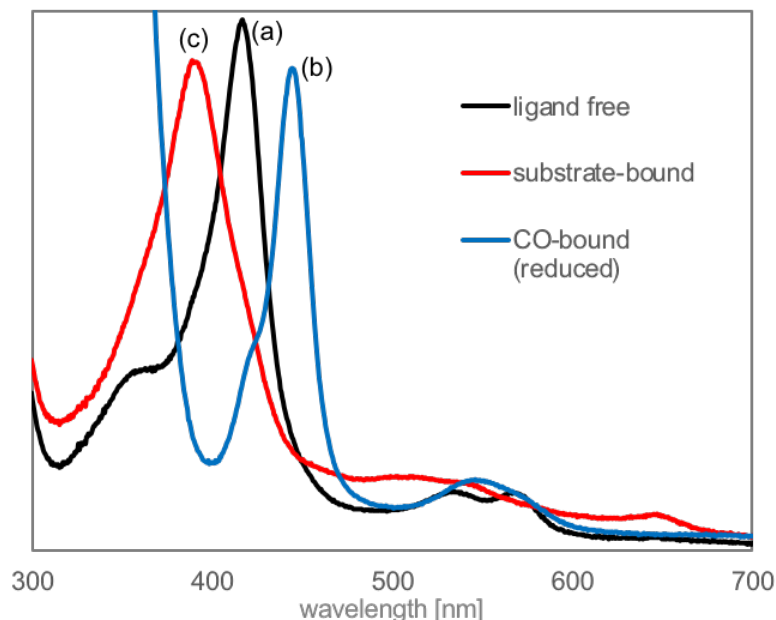


図17 P450が示す吸収スペクトル

(a) はリガンドが結合していない状態、つまり水分子がヘム鉄に配位した状態の吸収スペクトルで、ソーレー帯の吸収極大は約417 nm付近に持つ。(b) は還元したヘム鉄にCOが結合した状態の吸収スペクトルで、P450の名前の由来になった450 nm付近へソーレー帯の吸収極大を持つ。(c) は基質が結合した時の吸収スペクトルで、基質はヘムに直接配位しないため、5配位型の吸収スペクトルをとり、ソーレー帯は390 nm付近へとシフトする。

4-2. P450の種類と反応系

○P450の種類

幅広い生物種で存在が確認されているP450は、長い年月をかけて様々な種類の酵素として進化してきたと考えられる。一般的にP450はマイクロソーム型、ミトコンドリア型、水溶性型の3種類に分類される。

マイクロソーム型P450とミトコンドリア型P450の性質は非常に似ており、2者を合わせて「膜結合型P450」ともいう。これらは発現する際の局在に違いがあり、マイクロソーム型P450は細胞内小器官の1つである滑面小胞体に、ミトコンドリア型P450はミトコンドリア内膜のマトリックス側に局在している。特にマイクロソーム型P450は種類が多く、P450の一般的な分子種として知られている。これらの分子量はおよそ50,000前後で、膜に局在化していることから膜タンパク質に分類されている。膜結合型P450はN末端側のおよそ30残基程度が1回膜貫通ヘリックス構造をとる膜貫通ドメインであり、「膜アンカー」として働くことで膜へ局在化している(図18)。一方、ヘムを持つ触媒領域は一部が膜内部に埋もれているか、もしくは膜表面と相互作用しているが、大部分は細胞質側に露出している。膜結合型P450は、動物では薬物の代謝、ステロイドホルモンの生合成や代謝、脂肪酸の酸化、胆汁酸の生合成などを担っている。植物では前述した植物ホルモン全般の生合成を担っている^{2,31,32}他、二次代謝産物の生合成・代謝など担うことが多く、それらの鍵となる反応段階を触媒することが多い。また昆虫では、幼虫から成虫へと変態するために必須となるエクジステロイドの生合成も担っている³³。このように、膜結合型P450は、様々な生物にとって重要となる反応を触媒することから、創薬の標的になることが多く、実際に様々な薬剤の開発や研究が行われている。

一方、水溶性型P450はマイクロソーム型P450やミトコンドリア型P450と性質が大きく異なり、その名の通り細胞内の細胞質などの可溶性画分に存在する。そのため、膜への局在化に必要なN末端側の膜貫通領域を持っておらず、分子量も40,000前後と、膜結合型P450に比べてコンパクトになっている。水溶性型P450の多くは細菌などの微生物から見つかることが多く、膜結合型P450と比べて扱いも容易である。そのため、1968年に初めて水溶性型P450としてcamphorを水酸化するP450camが発見されたが、膜結合型とは違い、いち早く精製法が確立された³⁴。そのような背景から、水溶性型P450は立体構造の解析³⁵や詳細な反応機構の解析、分光学的な解析など、様々な領域でP450のモデルとして用いられてきた。

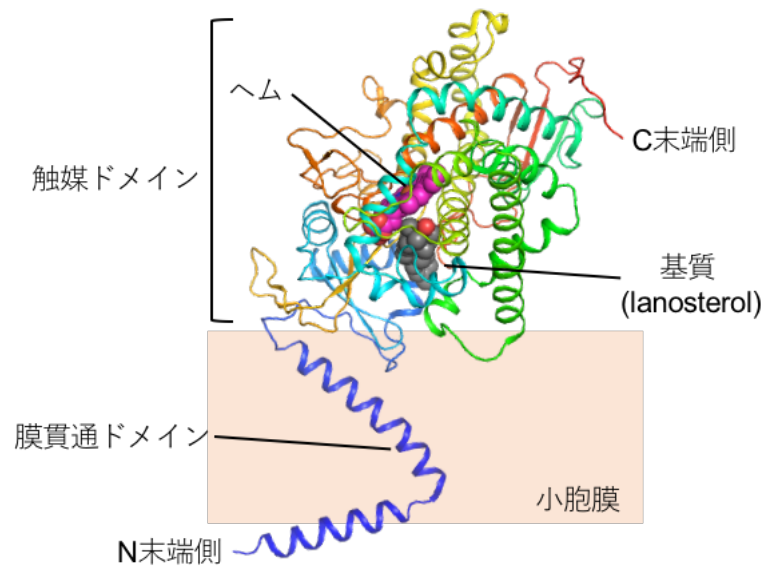


図18ミクロソーム型P450の立体構造と模式的に示した小胞膜との相互作用

図のモデルはCYP51 (PDB ID: 4LXJ)。CYP51は膜貫通ドメインを含むP450の全長で構造決定された数少ない例の一つである³⁶。背景がオレンジの領域が小胞膜を示しており、疎水的な膜貫通ドメインは小胞膜に完全に埋まっている。

○P450の反応機構と還元系

P450が触媒する反応としては、分子状酸素を用いて基質へ酸素原子を添加する「一原子酸素添加反応」が一般的であり、多くの場合は単純な水酸化反応であることが知られている(図19)。水酸化反応の場合、まず、基質の結合に伴ってヘム鉄から水分子が解離し、ヘムが5配位構造を形成する (I-II)。次に還元酵素(真核生物のP450ではP450還元酵素、原核生物やミトコンドリアのP450では鉄-硫黄タンパク質)の1電子供給によってヘムが還元される(III)。その後、分子状酸素がヘム鉄に配位し(IV)、P450還元酵素による2回目の1電子供給を受けてペルオキシ中間体を形成する(V)。この中間体では、ヘムに対して遠位側の酸素原子が直ちにヘム近傍に存在する保存されたAsp/Glu-Thrペアを介したプロトンの供給によって水分子へと変換され、鉄(IV)オキソポルフィリン π -カチオンラジカル(compound I)を形成する(VI)。最後に、このcompound Iが基質の水酸化部位から水素原子を引き抜き、生成したヒドロキシ中間体が同時に生成した基質ラジカルへとリバウンドすることで水酸化物が生成される。また、酵素は「触媒」として機能するために休止状態(I)へと戻る必要があるが、これは生成物が酵素外へとリリースされたのち、水分子が再びヘム鉄へと配位することで得られる。

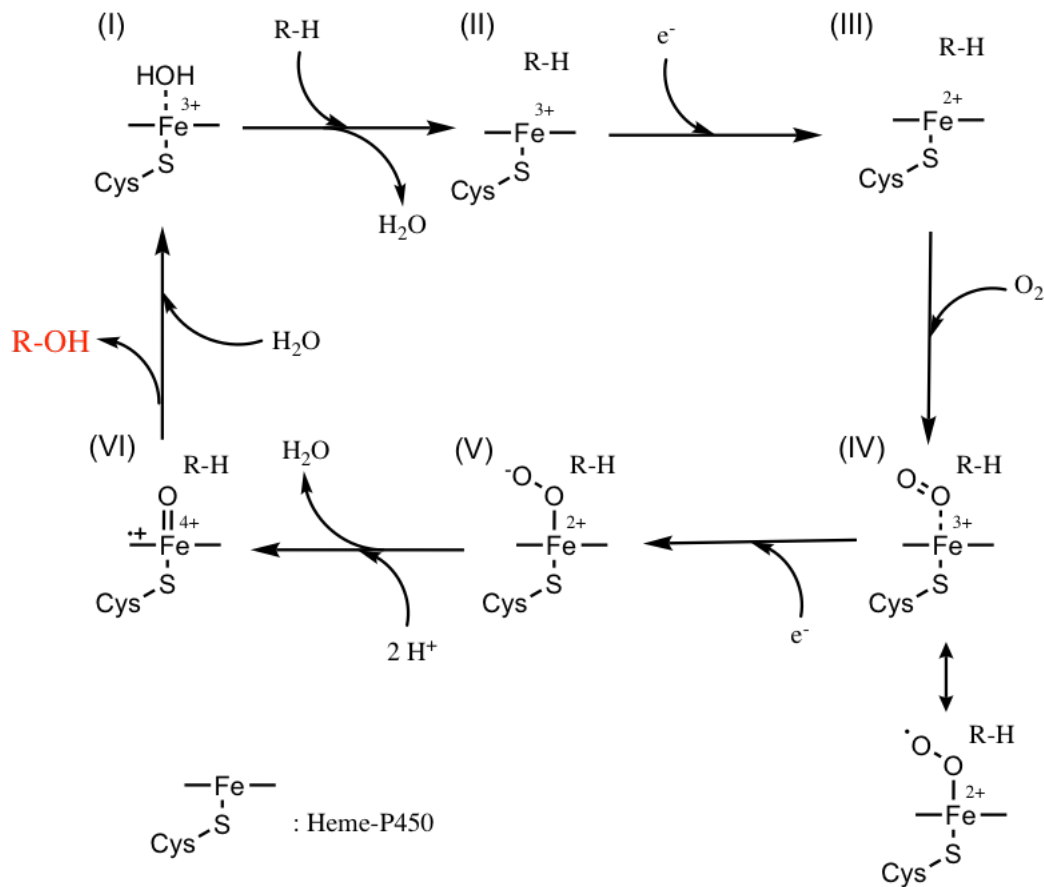


図19 P450の基本的な反応機構³⁷

図中の反応機構は典型的な水酸化反応の場合を示している。(I) から (VI) の順に反応が進む。基質はR-H、生成物はR-OHで示している。

以上のように、P450の反応サイクルには還元酵素による2度の電子供給が必須となる。P450は基本的には全ての生物で共通した立体構造を持つが、P450の還元系やそれに関わる還元酵素は生物種の違いで異なる他、特定のP450でのみ機能する還元系も存在する。一般的な還元系としては、ミクロソーム型P450、ミトコンドリア型P450、バクテリア型P450、P450-P450還元酵素 (CPR) 融合型、その他の例外、に分類される³⁸。

ミクロソーム型P450は最も典型的な還元系を構築しており、多くの真核生物の大部分で利用されている系である。この系は、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) が膜タンパク質であるflavin mononucleotide (FMN)-FAD型CPRに電子を供給し、この電子を用いてP450を還元することで機能している。しかしながら、電子伝達タンパク質であるシトクロムb₅の存在下では活性の増加が見られるケースも確認されており、P450の還元系はFMN-FAD型CPRとP450の2者のみの系ではない可能性が示唆されている。

ミトコンドリア型P450はミクロソーム型P450と同様にNADPHを電子の供給源として

いるが、FMN-NAD型CPRではなく、補因子に[2Fe-2S]クラスターを持つアドレノドキシシン(Adx)と呼ばれる電子伝達タンパク質から電子の供給を受ける。また、アドレノドキシシン自体はNADPHから直接電子を供給されず、電子は含FADタンパク質であるアドレノドキシシン還元酵素(AdR)から電子供給を受ける。つまり、ミトコンドリア型P450はAdR-Adx-P450の三者による還元系によって機能している。

これに対し、バクテリア型P450は電子の供給源をnicotinamide adenine dinucleotide(NADH)に依存することが大きな違いであるが、バクテリア型P450の最も典型的とされる電子伝達系は、ミトコンドリア型P450と似た系の[2Fe-2S]クラスタータンパク質であるフェレドキシシン(Fdx)、含FADタンパク質のFdx還元酵素(FdR)、P450の三者である。しかしながら、バクテリア由来のP450には多様な還元系が存在することが知られている。例えば、近年報告されたリグニン分解産物の脱メチル化を行うCYP255の還元系は、本来はそれぞれ独立したタンパク質であるFdx、FdRが融合したタンパク質との2者間で行う還元系を持っていることが報告された³⁹。

P450-CPR融合型は一部の細菌で見つかっており、NADHを電子の供給源とし、FAD型電子伝達タンパク質とP450がそれぞれドメインとして存在する1つの酵素である。代表的な例としてはP450BM3が挙げられるが、これらは従来から報告されている2者間の還元系よりも活性が非常に高いことから、分子内で高効率に電子が供給されていると考えられている。その理由としては、融合によって還元酵素とP450の相対的な位置が常に近接していることに起因していると考えられている。以上の還元系では、全てP450とは異なるタンパク質が電子伝達を担っていたが、例外的なP450が1種確認されている。

一酸化窒素(NO)を亜酸化窒素(N₂O)へと還元するP450norは、1991年に糸状菌から発見されたP450であり、現在では糸状菌全般が持つと考えられているP450である⁴⁰。P450norの反応はヘム鉄に酸素分子が結合する代わりにNOが結合し、基質ポケットに電子を供給するNADHを「基質」として受け入れ、そのNADHを利用して直接NOをN₂Oへと還元する(図20)。P450norは他の電子伝達タンパク質を介さない例外的な還元系を有するP450であり、現在も同様の還元系を有するP450は他に見つかっていない。

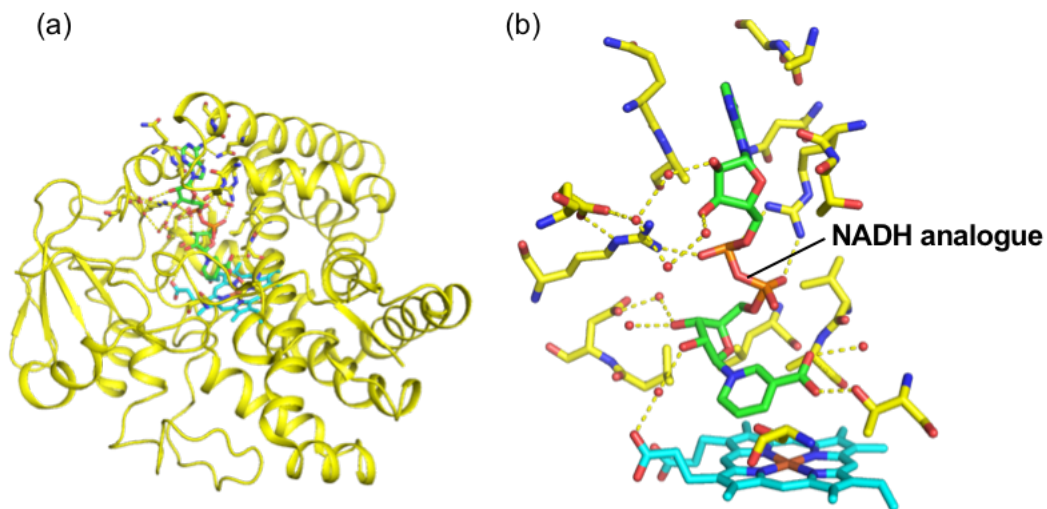


図20 P450norの結晶構造 (PDB ID: 1XQD) と活性中心の構造

(a) P450norの全体構造 (b) P450norに対するNADHアナログの結合様式。NADHアナログは、リン酸部分が2つのArg残基と塩橋を形成していた他、複数の水素結合によって基質ポケット内部に結合していた。P450としては非常に稀な反応を触媒するP450norであったが、NADHアナログ結合型の結晶構造の決定により、NADHが実際に結合することが強く示唆された⁴⁰。

4-3. P450 の立体構造

P450は様々な生物種で見つかっている一方で、アミノ酸の保存度は低い。しかしながら、種々のP450の立体構造は非常に類似しており、立体構造の形成や触媒機能を有するために必要なモチーフやアミノ酸配列は高度に保存されている。具体的には、①膜貫通ドメインと触媒ドメインの間に存在するPro-rich領域、②補因子であるヘムの結合に関わるヘム結合領域 (F-X-X-G-X-R/H-H-C-X-G)、③触媒に必要なプロトンを供給するAsp/Glu-Thrペア、④触媒に必要な電子を供給する電子伝達タンパク質と相互作用すると考えられているK領域 (Kヘリックス上のE-X-X-R) などが挙げられる。P450の立体構造はよく「三角プリズム型」と例えられる立体構造であり、全体的に α ヘリックスに富み、一部に β シートから成る領域を持っている (図21a)。この全体構造はP450の種類や生物種に関わらず共通しており、「P450フォールド」と呼ばれている。多くの α ヘリックスから成るP450の中でも、構造の中心を貫くように存在するIヘリックスと、その上部に配置されている2本のF、GヘリックスはP450の象徴的な二次構造とされており、Iヘリックスはプロトン供給に関わるAsp/Glu-Thrペアが存在する領域で、F、Gヘリックスは基質の認識に関わる、機能的にも重要な役割を持っている。P450における基質の認識機構については大部分が明らかになっており、多くのP450は6箇所の基質結合領域 (Substrate recognition sites: SRS 1-6) で基質を認識することが共通している (図21b)。しかしながら、P450は基本的にアミノ酸配列の保存性が低く、基質ポケットに存在するそれぞれのSRSはP450を構成する配列全体に散り散りに分

布しているため、基質の結合に直接関わる具体的なアミノ酸残基に関しては予測が困難とされている。

また、P450の特徴の1つに、リガンドの結合に伴う構造変化が挙げられる。P450の象徴の1つであるF、Gヘリックスは基質がポケット内部に侵入した際に「蓋」の役割を果たすことが知られている。通常、リガンドを受容していない状態のP450はF、Gヘリックスによる「蓋」が開いた状態を取っているため、構造的な揺らぎが非常に大きいと考えられている。しかしながら、リガンドを受容するとF、Gヘリックスが大きく構造変化して「蓋」が閉じられ、リガンドの構造に合わせたポケット構造を形成する例が多く知られている（図22）。これにより基質は酵素中に安定して保持され、位置・立体選択的な酸化を受けることができる。また、この「蓋」が閉じる機構は、不安定な反応活性種であるcompound Iを溶媒水から隔離する機能も果たしており、P450が安定して反応を触媒することができるようになっている。

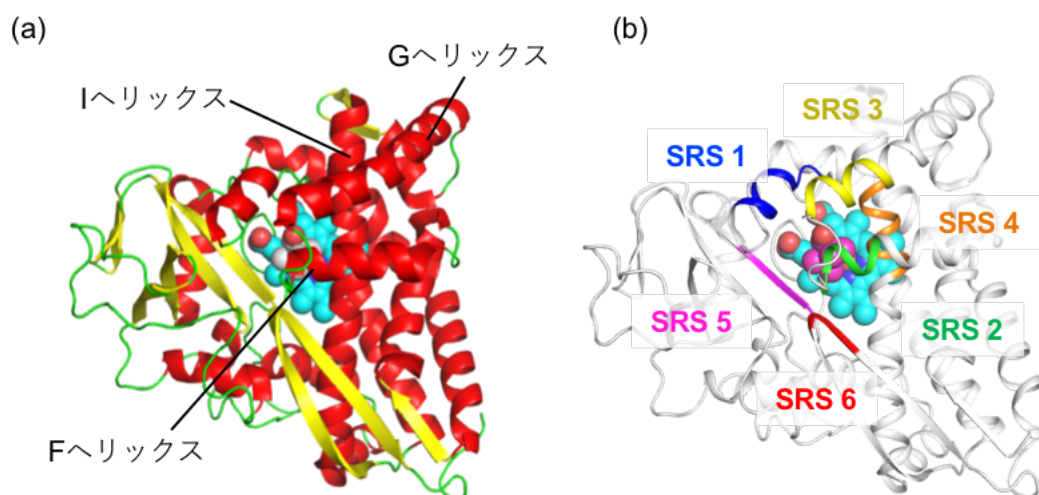


図21 P450camの結晶構造 (PDB ID: 2CPP)

(a) α ヘリックスは赤、 β シートは黄、ループ構造は緑で示している。リガンド (camphar) とヘムは球体モデルで示している。(b) 6箇所のSRSはそれぞれ青、緑、黄、オレンジ、マゼンタ、赤で示している。中心の球体モデルはリガンド (camphar) とヘムを示している。

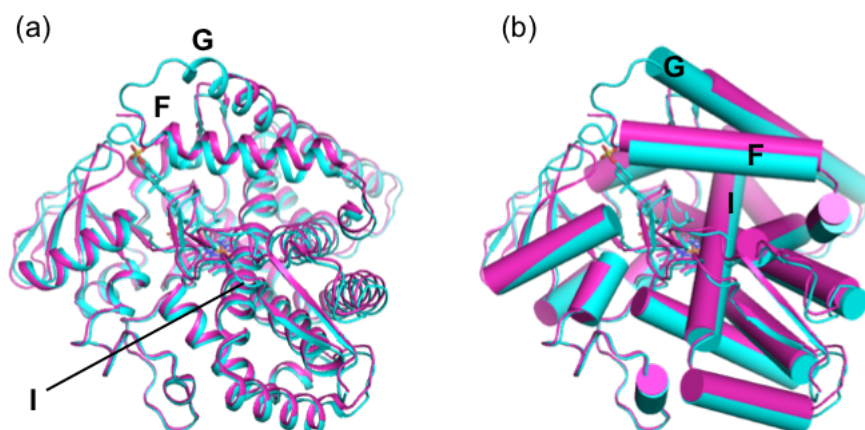


図22 リガンドフリーのCYP46A1 (マゼンタ、PDB ID: 2Q9G) と基質アナログ結合型

CYP46A1 (シアン、PDB ID: 2Q9F) の結晶構造の比較

(a) はリボンモデルで示しており、(b) はヘリックス構造をシリンダーモデルで表示した。リガンドが結合したシヤンのモデルでは、F及びGヘリックスがより基質ポケット内部へと引きつけられている⁴¹。

4-4. P450 の関与によって生合成されるステロイド化合物

天然物の中でも最大の化合物グループの一つであるテルペン類は大部分が植物と微生物から発見されている。一方、哺乳類を含めた全ての生物で共通して生合成されている唯一のテルペノイドが存在することも知られており、トリテルペノイドに分類されるステロイドが該当する。

ステロイドは各生物種における細胞膜の構成成分の一つでありながら、各種ステロイドホルモンやビタミンD類の前駆体としても利用される非常に重要な化合物である。各生物種によって生合成される経路は多少異なるが、最終的に生合成される化学構造はほとんど似ている。一般的にステロイド化合物は生理活性が非常に強力である場合が多く、特にステロイド骨格を持つホルモン (ステロイドホルモン) は極少量で生体機能を調節する他、生物の形態を大きく変化させることができる化合物として知られている。ステロイド化合物は化学構造が類似したものが多いが、立体配座や挿入される酸素原子1つの有無、及びその立体化学の違いで活性が極端に変化する例も確認されている。例えば、植物のステロイドホルモンであるブラシノステロイド (BR) では、castasterone (CS) はBRとしての生理活性を示すが、6-deoxoCSは活性が非常に弱い (活性型BRのbrassinolideに対して50分の1の活性) ことが知られている^{42,43}。また、2,3-*diepi*-CSは高活性型BRのCSと比べて活性が低下していることがrice lamina inclination試験によって確認されている^{31,32,44} (図23)。

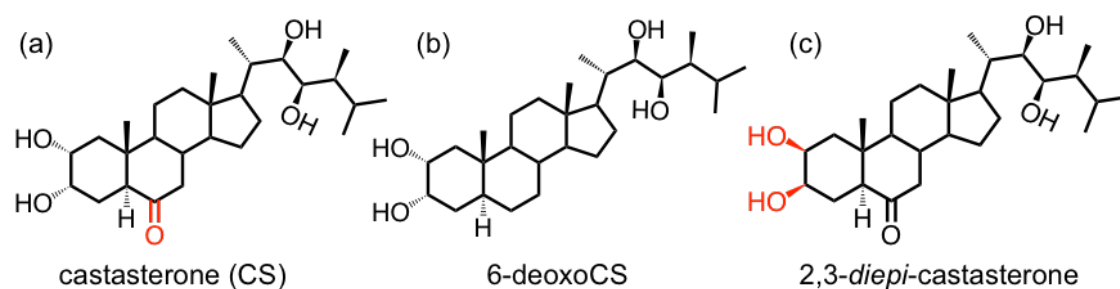


図23 castasterone (a)、6-deoxoCS (b)、および2,3-*diepi*-CS (c) の構造

このことから、ステロイド化合物の生合成では、酵素による位置・立体選択的な置換基の導入が活性を生み出す上で非常に重要となっており、それら酵素は様々な医薬品や農薬などの標的酵素となることが多い。ステロイド化合物やその前駆体の多くは脂溶性であるため、生合成は細胞の膜面分、特に小胞膜上で行われる。ミクロソーム型P450は小胞膜に発現する膜タンパク質の一種であり、膜面分上で位置・立体選択的な酸化反応を触媒することができる数少ない酸化酵素である。そのため、ステロイドなど脂溶性の化合物の生合成では大部分がP450に依存した生合成経路を取ることがしばしば確認されている。例えば、ヒト体内におけるステロイドホルモンの生合成の場合、**cholesterol**を出発物質として10種類の酵素が関わることによって各種ステロイドホルモンが生合成されるが、そのうちの6種類がP450である⁴⁵ (図24)。

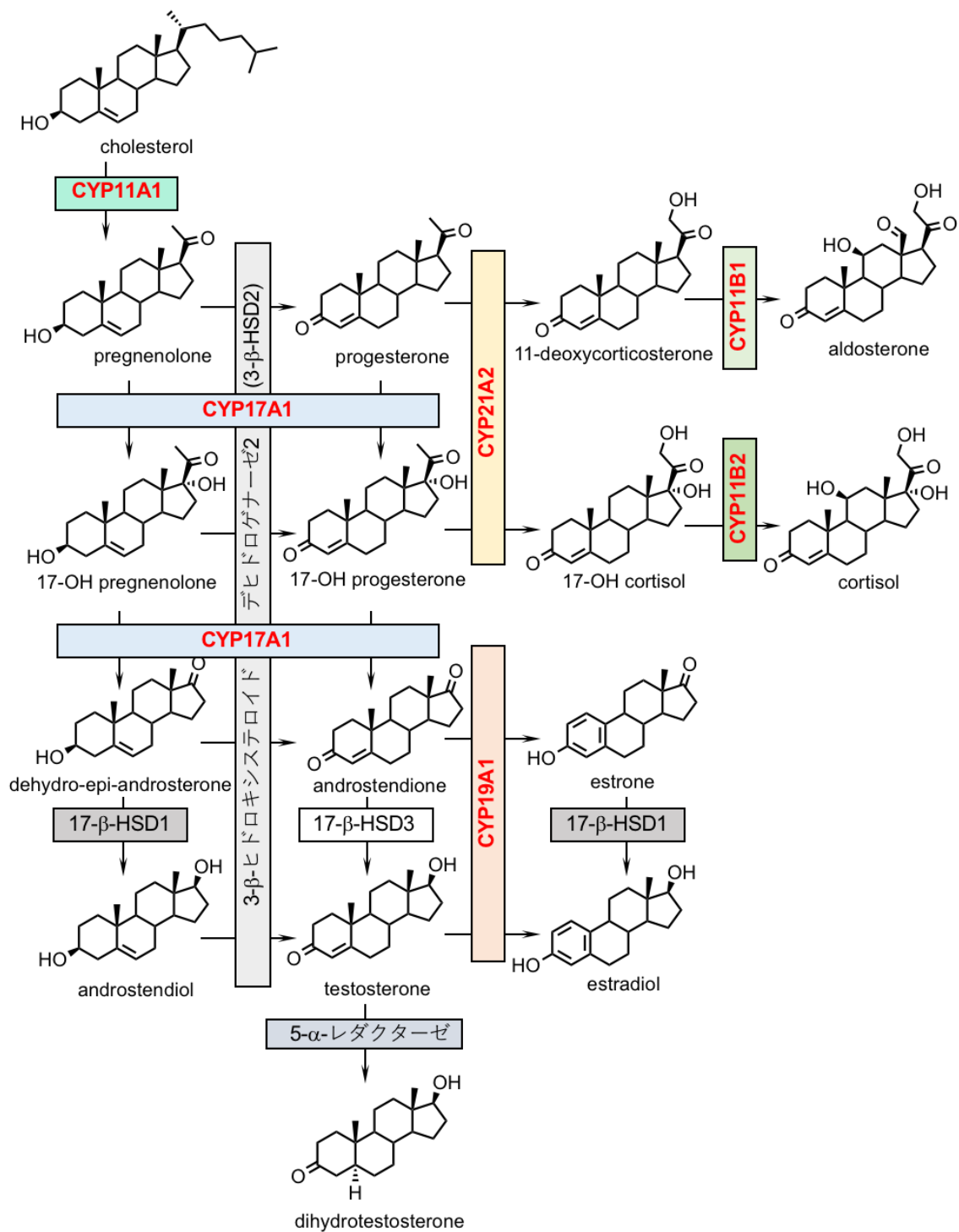


図24 ヒトステロイドホルモンの生合成経路

ヒトではステロイドホルモンの生合成に10種類の酵素が関わっているが、そのうちの6種類がP450によって触媒されている。赤字はP450を示している。

4-5 ステロイド骨格を有する植物ホルモンの生合成とP450

植物が利用する唯一のステロイドホルモンとしてブラシノステロイド (BR) が知られている。BRは植物の伸長成長の促進、細胞分裂の促進、塩や金属に対するストレス耐性の付与などの生理活性を示す。BRは挿入・添加された酸素原子の数や、生合成に使用される基質、および植物間における生合成経路の違いなどから、多くの誘導体が見つかっており、現在では80種程度の類縁体が確認されている⁴⁶。しかしながら、強力な生理活性を示すBRはカステステロン (CS) とブラシノライド (BL) の2種だけであり、その他のBRの生理活性は極端に低いか活性が確認されていない^{31,32,44,47-49}。現在では、BRの生合成経路の大半が明らかになっており、活性を示すCSとBLはBR生合成の最終産物として知られている。BRは植物特有のステロイド化合物であるcampesterol (CR) が複数の酸化・還元反応を受けることで生合成されるが、反応に関わる全ての酵素群については明らかになっていないため、未解決な課題の一つとなっている。また、BR生合成の経路は植物種によって異なると考えられており、特に生合成の中間の反応経路については未だに確定した経路は提唱されていない。今日では、BR生合成の主要経路は「早期C22位水酸化経路」、「早期C6位水酸化経路」、及び「後期C6位水酸化経路」の3経路が主として考えられているが、その中でも早期C22位水酸化経路が植物生体内で最も主流の経路であると考えられている⁵⁰⁻⁵² (図25)。早期C22位水酸化経路ではまず、P450の一種であるCYP90B1が、CRのC22位を水酸化することでBRの生合成を開始する。その後、CYP90A1、DET2、CYP90C1もしくはCYP90D1、CYP85A1、CYP85A2が順に反応を行うことで、高活性種のBLが生合成される。しかしながら、植物種間での生合成経路が厳密には同じでないことや、全ての酵素と基質についてのアフィニティなどが調べられていないこと、一部の反応について、それらを触媒する酵素が未同定であることなどから、BR生合成についての理解は不完全であり、多くの研究課題が残されている。この原因としては、現在同定されているBR生合成に関わる酵素群は全て膜タンパク質であり、異種発現が困難であること、及びそれら酵素の基質の多くが入手困難であることが考えられる。特に、植物由来のP450は異種発現が困難であり、それらの生化学的な研究が難しいという背景もある。一方で、BRの生合成酵素に対する阻害剤はいくつか開発されており、CYP90B1を標的としたブラシナゾール (BRZ)、やCYP90D1を標的としたユカイゾール (YCZ) が知られている⁵³⁻⁵⁶ (図26)。BRZなどの阻害剤はBRのシグナル研究に応用されるケースがある⁵⁷ため、今後のBR生合成に関する分子生物学的な発展には、BRZや新規の阻害剤などが重要な役割を果たすと期待されている。

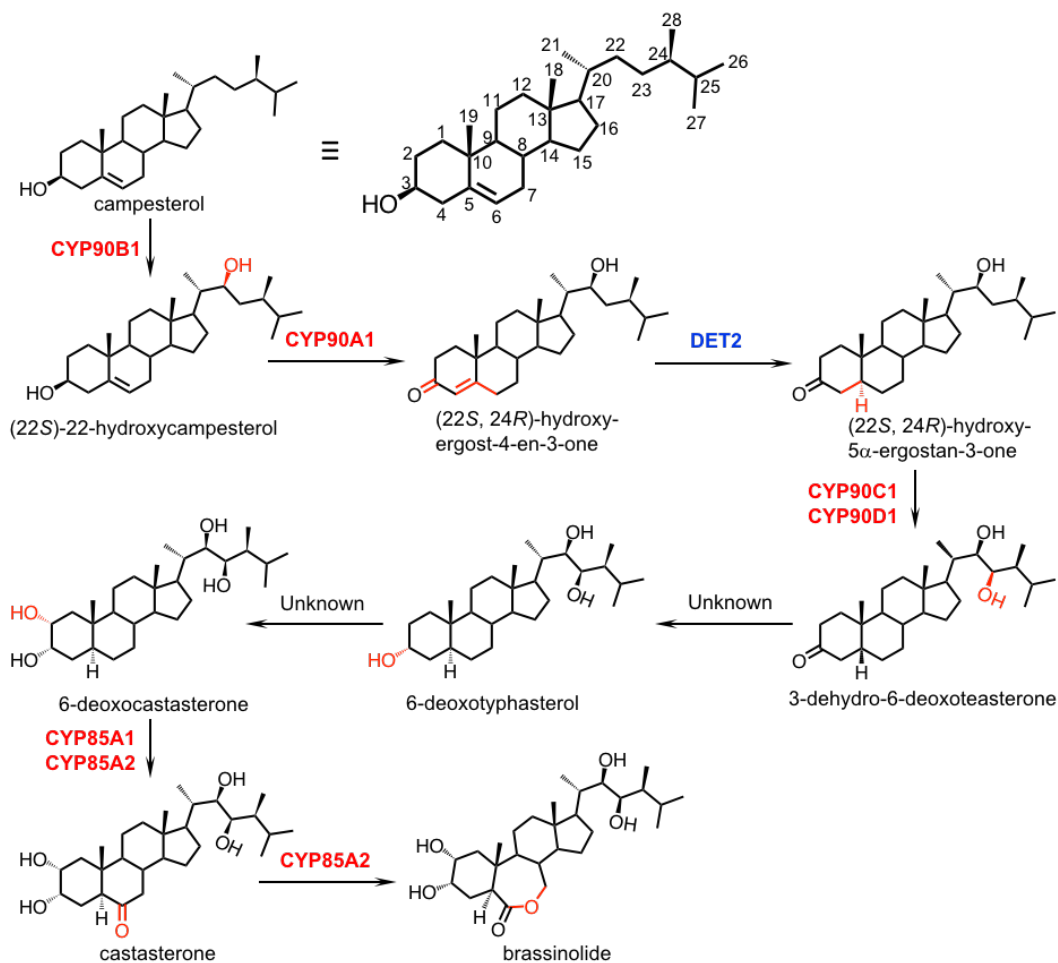


図25 BRの生合成経路

本経路は現在で最も主流の経路として考えられている早期C22位水酸化経路によるBR生合成経路を示している。campesterolに各炭素原子の番号を示している。各反応段階に関わる酵素の名前は矢印の上部に記載した。P450スーパーファミリーに属する酵素は赤色で、それ以外の酵素は青色で、酵素の関与が不明、もしくは遺伝子が同定されていない反応段階はUnknownで示している。

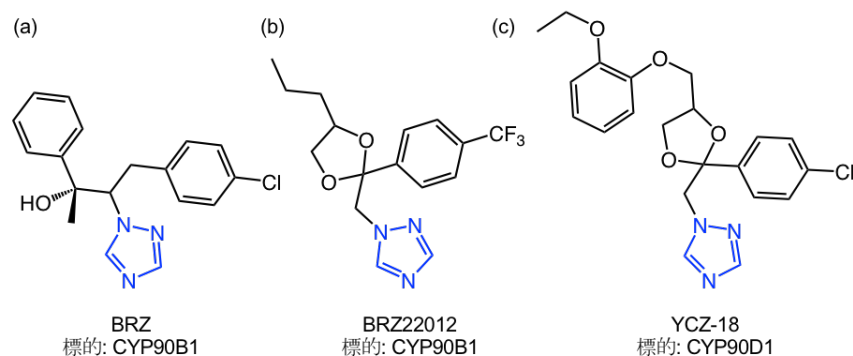


図26 ブラシナゾール (BRZ) (a) と改良型BRZのBRZ22012 (b)、及びユカイゾール (YCZ) の一種であるYCZ-18 (c) の構造

青で示したトリアゾール基がP450のヘムに結合する

5. 天然物の酸化修飾を担う酵素: 2-oxoglutarate 依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD)

2-oxoglutarate依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) は天然物の酸化修飾に関わる酵素として、P450と並ぶ代表的な酵素ファミリーである。2OGDは、反応の触媒に1原子の鉄原子と1分子の2-oxoglutarate (2OG) を補因子として要求し、分子状酸素から酸素原子を基質と2OGにそれぞれ一原子ずつ添加することで反応を行う酸化酵素である。また、2OGDは約30-40 kDa程度のサイズを持つ可溶性の酵素として機能するため、膜結合型P450と比べると分子の性質は大きく異なる。そのようなタンパク質の性質上、P450と2OGDを比較した場合では対象とする基質の性質も大きく異なる点が挙げられる。例えば、膜タンパク質であるP450は比較的疎水性の高い化合物を基質とする場合が多いが、2OGDは比較的に水溶性の高い化合物を基質とする場合が多い。また、膜結合型P450は基質ポケットが小胞膜内部へと繋がっているため、受け入れる基質は小分子に限られているが、基質ポケットが溶媒へ露出している2OGDは、小分子だけではなく、タンパク質や核酸などの比較的大きな物質を基質とする分子種も存在する^{58,59}。例えば、核酸を構成する塩基はヘテロ原子を介した異的な水素結合を形成することで相補性を示すが、これらは生体内に存在する遊離した*S*-adenosylmethionine (SAM) などによってメチル化され、正常な塩基対が形成できなくなることで、核酸の二次構造が保たれず、「遺伝子損傷」といった形で現れる (図27a)。2OGDの一種であるAlkBは、このメチル化によって損傷を受けたDNAを、脱メチル化によって修復する酵素として知られている。AlkBの反応は生物にとって重要な反応であるため、早くから立体構造が解明され、詳細なDNAの認識メカニズムや反応機構が解析されてきた^{59,60} (図27)。一般的に、2OGDは単純な水酸化を触媒する酵素として知られているが、AlkBによる脱メチル化反応は、NもしくはO原子に結合したメチル基を水酸化し、アルデヒドの脱離を伴うことで進行する (図27c)。この反応メカニズムの基本は、同じく水酸化酵素であるP450による*N*もしくは*O*脱メチル化反応と同様であり、AlkBは水酸化反応を触媒する一般的な2OGDと同様の反応を触媒していることが明らかとなった。このような2OGDによる水酸化反応は、生体の維持だけでなく、様々な場面で見られるが、特に二次代謝産物などの天然物の生合成・代謝経路では多く見出されている⁶¹。そのため、2OGDはP450と同様に天然物の生理活性を発現させる上では欠かせない重要な酸化酵素として位置付けられている。

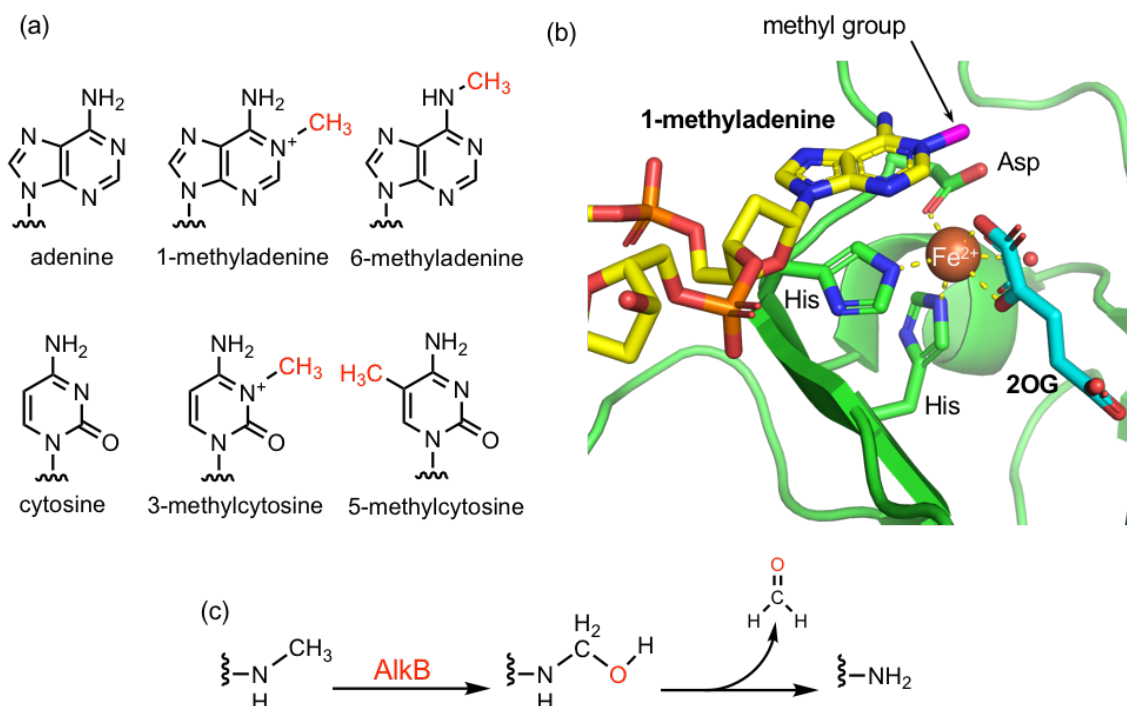


図27 AlkBによるDNAの修復機構

(a) アルキル化された各種塩基。赤字はDNA損傷の原因となるアルキル化された領域を示している。(b) 1-methyladenineを受容したAlkBの立体構造を示している (PDB ID: 2FD8)。緑、シアン、黄はそれぞれAlkB、2OG、核酸の炭素原子を示している。マゼンタはDNA損傷の原因となる付加されたメチル基を示している。黄色の破線は活性中心であるFe原子への配位結合を示している。(c) 2OGDによる*N*もしくは*O*脱メチル化反応のメカニズム。AlkBによって添加された酸素原子は赤で示している。ホルムアルデヒドの脱離はAlkBによる触媒を受けずに自発的に進行する。

5-1. 2OGD の反応機構

2OGDは様々な基質の持つ安定な炭化水素鎖領域へ位置・立体選択的に酸化反応を触媒することが可能である。この反応性は、2OGDが鉄原子を補因子として利用することで、反応性の高い酸化活性種を生み出す機構を備えていることが大きな理由の一つと考えられる。2OGDは反応の触媒に非ヘム鉄と2OGを利用し、1つの酸素分子から2OGと基質にそれぞれ1つの酸素原子を添加することで基質を酸化している。P450と同様に、2OGDが触媒する典型的な反応は水酸化反応であることが知られているが、一部の分子種では、触媒する反応は水酸化だけではなく、不飽和化⁶²や環化⁶³などのP450でも確認されている反応から、塩素化⁶⁴といったP450では見られない反応も触媒することができる。2OGDの詳細な触媒機構について典型的な水酸化反応を例にとると、まずは2OGが結合した酵素 (図28A) に対して基質が結合するところから始まる (図28B)。この状態の酵素に対して酸素が結合すると、2OGが活性化されて脱炭酸を起こし、Fe(IV)=O (酸化活性種) を生成する (図28C, D)。次にこ

の酸化活性種が基質の水酸化部位に存在する水素ラジカルを引き抜き、Fe(III)-OH種と基質ラジカルを生成する (図28E)。最後に基質ラジカルがFe(III)-OH種へ攻撃することで水酸化が完了する。2OGDは一度の水酸化に1分子の2OGを必要とするため、水酸化直後は2OGの結合部位や酸素結合部位には水分子が結合した状態 (図28F) となるが、再度2OGが結合することによって触媒能を獲得することができる。

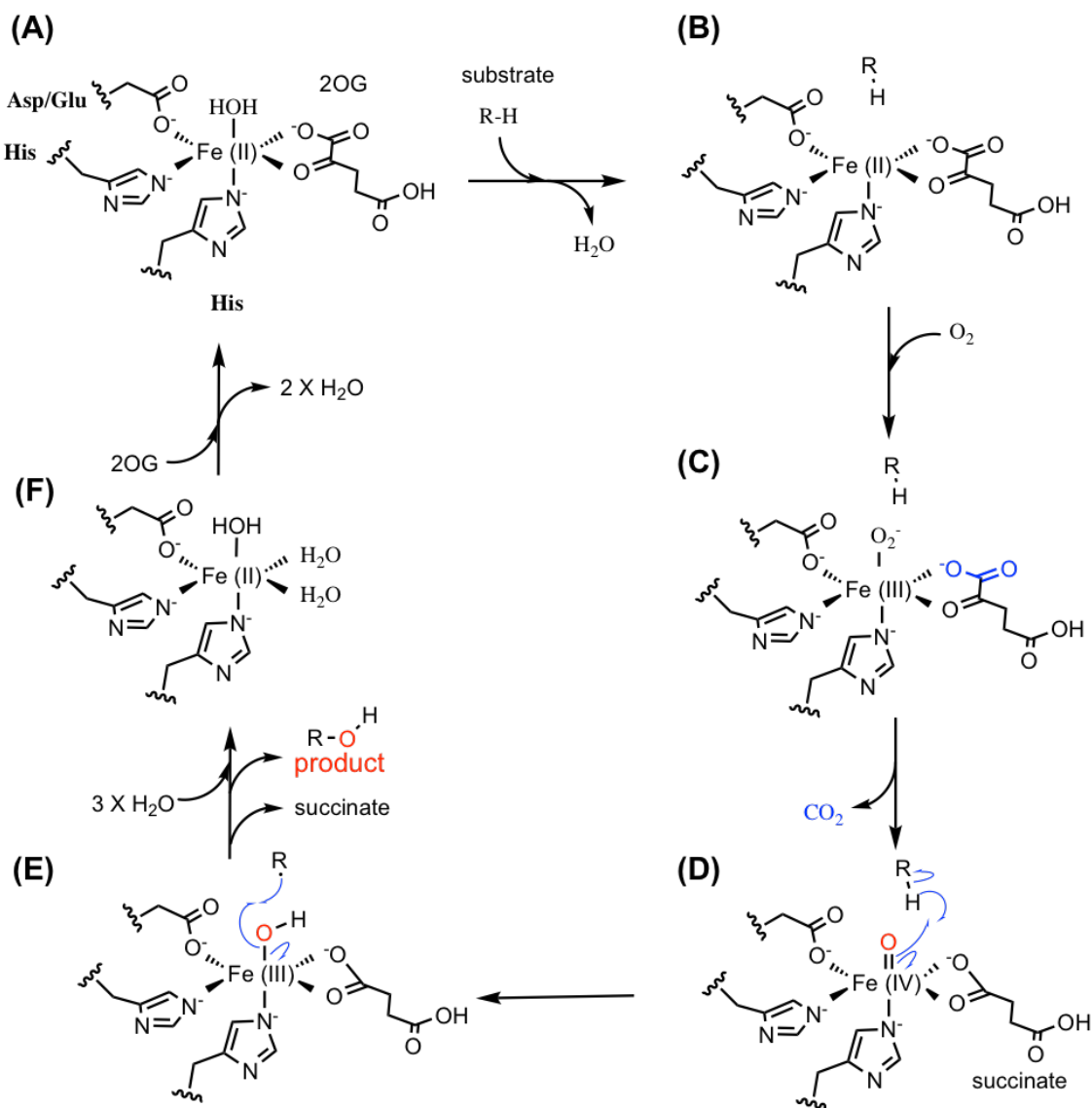


図28 2OGDの触媒サイクル

図は一般的な2OGDが触媒する水酸化を例としている。反応の順番はA-Fの順に進む。R-Hは基質を示している。青の片矢印は移動する電子を示している。

5-2. 2OGDの立体構造

現在までに非常に多くの2OGDの立体構造が明らかにされている。2OGDはdouble stranded β -helix (DSBH) モチーフ（ゼリーロールモチーフ）と呼ばれる特徴的なフォールドを持つことで知られている（図29a）。DSBHの中には、補因子であるFe原子と2OGが結合する部位として2OGD間で共通している。また、これら補因子の結合に関わるアミノ酸残基や結合様式は高度に保存されており、Fe原子はHXD/Eモチーフ（Xは任意のアミノ酸残基）と数十残基先に現れるHis残基、および2OGによる錯体を形成することで結合し、2OGはFe原子から遠位側のカルボキシ基がArg残基と塩橋を形成することで結合する（図29b）。

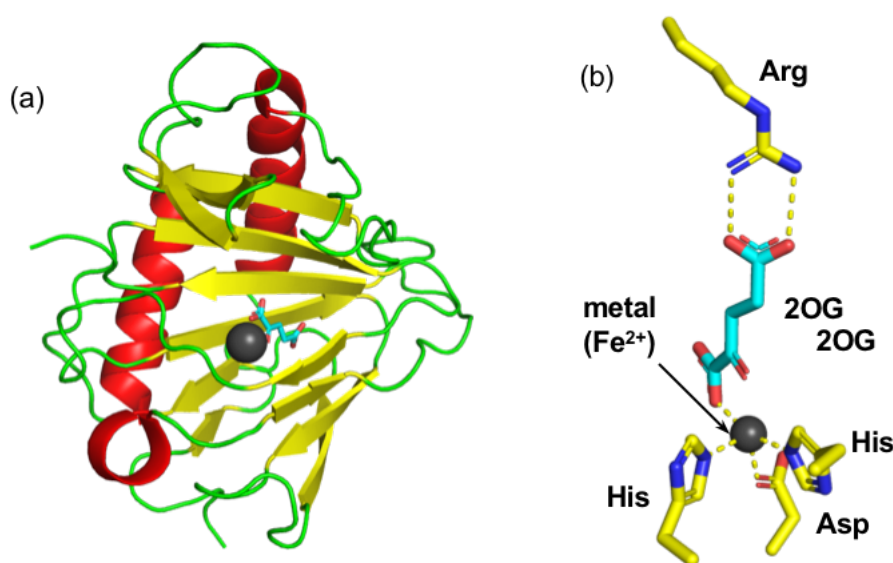


図29 典型的な2OGDの立体構造 (PDB ID: 3BIE)

赤は α ヘリックス構造、黄は β シート構造、緑はループ領域を示している。(a)は全体構造、(b)はFe原子と2OGの結合様式を示している。破線は静電的な相互作用を示している。

2OGDはコアフォールドであるDSBHモチーフや補因子の結合様式などが高度に保存されている一方で、特定のループ領域に対して二次構造が挿入されている他、N末端側やC末端側などにそれぞれの2OGDに特徴的なドメインを有している例も存在する（図30）。例えば、isopenicillin N合成酵素 (IPNS) の基質の結合にはC末端側に存在する α ヘリックス構造が関わっており、基質ポケットに対して「蓋」の働きをすることで、基質の結合と触媒部位を溶媒から隔離する役割を果たしているが、taurin水酸化酵素のTauDのC末端側は基質の結合には全く関与せず、4番目の β シート (β IV) と5番目の β シート (β V) の間のループに α ヘリックス構造が挿入され、これが基質ポケットの蓋の役割を果たしている（図31）。P450ではループ領域などに追加のモチーフなどが存在せず、ほとんどが同様の立体構造であるため、このような2OGDの構造の多様性は、様々な基質の受容や酵素反応を触媒するために

進化した結果であると考えられる。

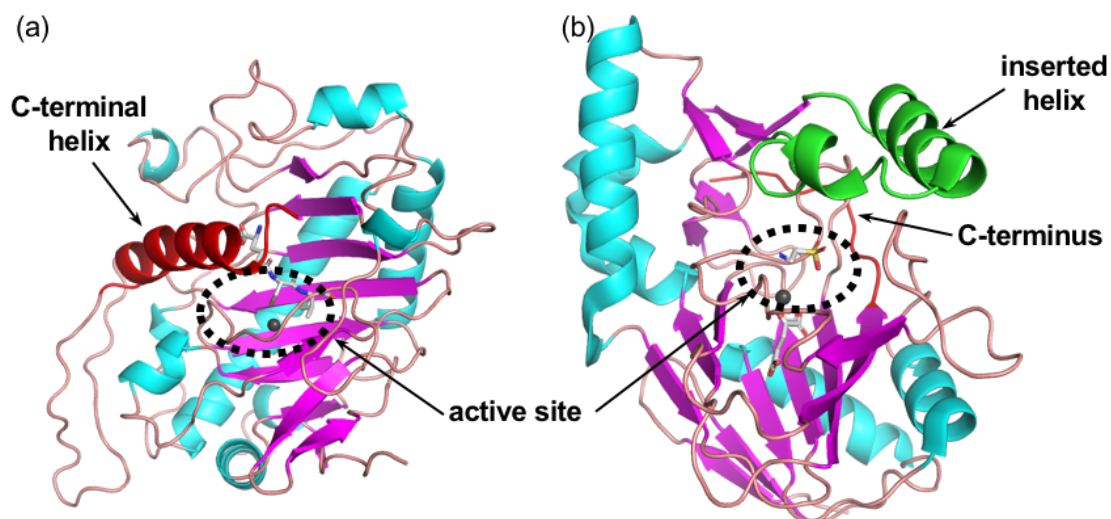


図30 IPNS (PDB ID: 1BK0) とTauD (1OS7) の立体構造

(a), (b) はそれぞれIPNSとTauDを示している。シアンは α -ヘリックス構造、マゼンタは β シート構造、ベージュはループ領域を示している。赤は両酵素のC末端側を示している。緑は β IV- β V間に挿入された構造を示している。黒の破線で囲んだ領域は、両酵素の活性部位を示している。

5-3. 天然物の酸化修飾に関わる 2OGD

2OGDは天然物の生合成経路に水酸基などの置換基を付加する酸化酵素としてよく見出されている。特に天然物の生合成では一般的な水酸化反応だけではなく、不飽和化や環化、塩素化など、多様な反応が2OGDによって触媒されていることが明らかとなっている⁶⁵ (図31)。これらの反応機構について、分子レベルで明らかにされた例は多くはないが、ほとんどの場合において、活性中心である鉄原子と基質の修飾を受ける部位の微妙な距離の違いや角度などが関係していると考えられている。例えば、序章の第1項で紹介したPrhAは、野生型と様々な変異体を用いて結晶構造解析が行われており、不飽和化を触媒する野生型では金属中心と被酸化部位 (C5) との間の距離は5.2 Å離れていたが、PrhAのV150L/A232S二重変異体では触媒部位と被酸化部位 (C2) との間の距離が4.4 Åから4.2 Åと変化し、一段階目にC2位の不飽和化、そして二段階目の反応に7員環から6員環への環の再構築の触媒能を持つ³。

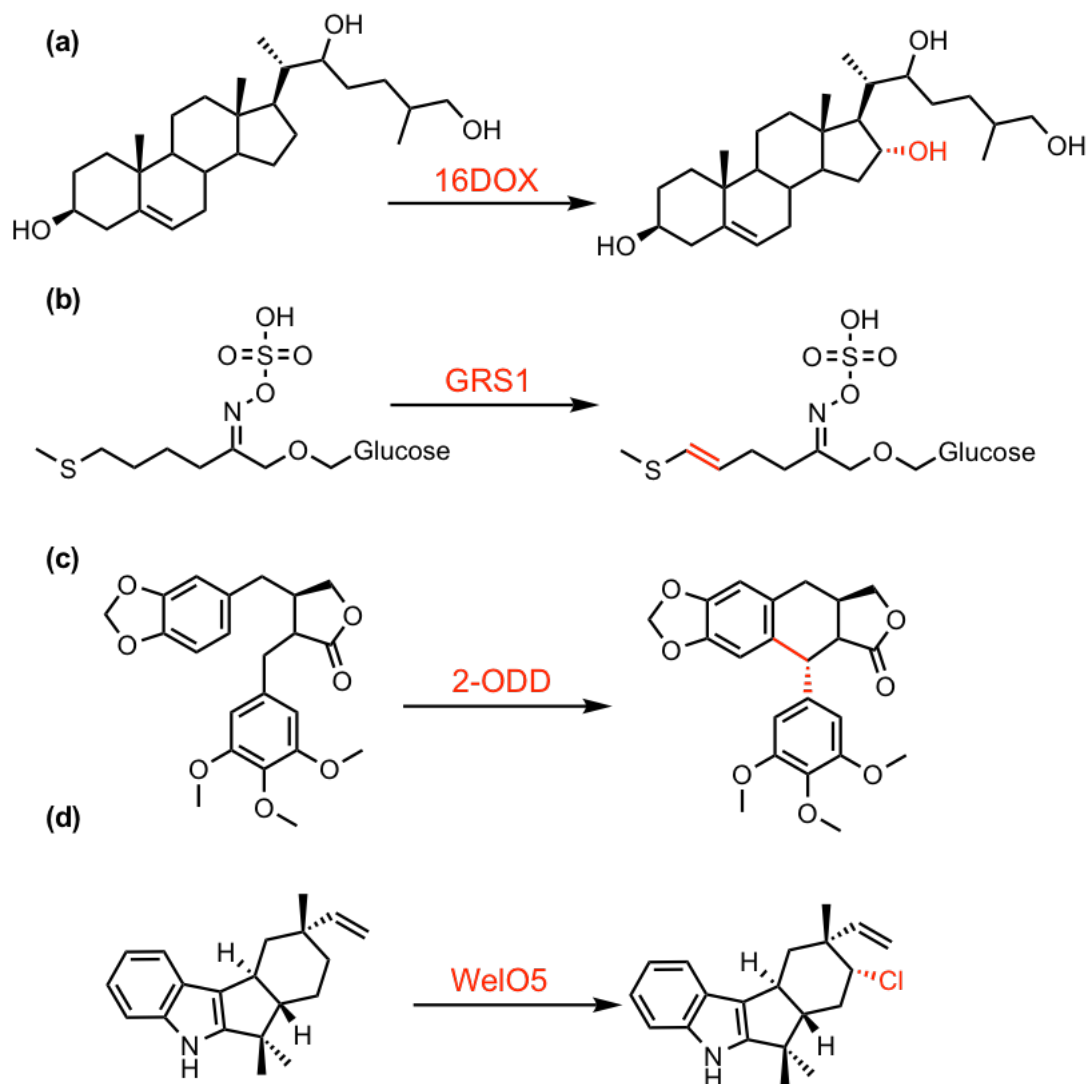


図31 天然物の生合成に関わる種々の2OGDが触媒する反応

生成物の赤で示した領域が各種2OGDによって付加された置換基、もしくは構築された骨格を示している。(a) は水酸化、(b) は不飽和化、(c) は環化、(d) は塩素化の反応を示している。

5-4. ステロイド骨格を有する植物由来の二次代謝産物の生合成と2OGD

テルペノイドやPKS-NRPSによって作り出される天然物の生合成中間体は酸化修飾を受けていない、もしくは数段階しか受けていないため、水溶性が低く、高い脂溶性のために細胞膜や小胞膜中に埋もれる場合がある。ステロイド化合物はその代表的な化合物の一つであり、細胞質中の複数の可溶性酵素によって前駆体のイソプレノイド誘導体から、ステロイド骨格が構築される。真核生物の場合、構築されたステロイド化合物の多くは小胞体中に取り込まれ、膜結合型P450をはじめとする膜タンパク質群によって修飾を受ける。実際、生合成経路が明らかにされている多くのステロイド化合物の酸化修飾はP450が触媒するこ

とがよく知られている⁶⁶。疎水的な天然物の生合成においては、2OGDの関与はしばしば確認されている⁶¹が、ステロイド化合物の生合成系においては、可溶性酵素である2OGDの関与は長年見出されていなかった。

しかしながら、近年ではトマトに含まれる虫の忌避効果を示すtomatineの代謝や、ジャガイモ毒solanineの生合成に関わる2OGDが報告され⁶⁶⁻⁶⁸、ナス科植物が生産するステロイド化合物の生合成・代謝経路では、多くの2OGDが関与することが明らかになってきた。中でもsolanineの生合成については徐々に明らかにされており、いくつかの生合成酵素が同定されている。具体的には、小胞膜に埋没しているcholesterol (CHR) を初発物質とし、P450であるPGA2 (CYP72A188)、PGA1 (CYP72A208)、CYP88B1と、2OGDの16DOX、及びアミノ基転移酵素による修飾を順に受けることで推定中間体が生成する、といった生合成早期の段階が明らかにされている (図32)。tomatineとsolanineは非常に似た構造を有する化合物であるが、tomatineによる人への毒性は低い一方で、solanineの毒性は高く、現代でも摂食による中毒例が報告されている。この毒性の違いは、tomatineの持つspirosoleane骨格とsolanineの持つsolanidane骨格が原因の一つと考えられており、生合成中にsolanidane骨格へと変換されることで人への毒性が生み出されると推測されている。最近、水谷らは、solanine生合成の鍵となるsolanidane骨格を構築する酵素が、水酸化酵素として知られる2OGDであることを示し、solanine生合成の全貌を明らかにした (unpublished)。ジャガイモは世界で非常に多く消費される食物であり、地域によっては主食として扱われている重要な作物である一方で、食中毒の原因となるsolanineを生産している。毒性の原因となるsolanidane骨格を構築する2OGDの立体構造が明らかにできれば、solanidane骨格の構築メカニズムを分子レベルで理解できる他、立体構造をもとに農薬を開発することが可能となり、ジャガイモの「毒」の生産を制御することが可能となる。また、ステロイド化合物を代謝する2OGDの立体構造は明らかにされた例がないため、2OGDがどのようにステロイド骨格を認識しているかについても興味をもたれる。これらのことから、solanidane骨格を構築する2OGDの立体構造を解析することは重要な課題の1つと考えられる。

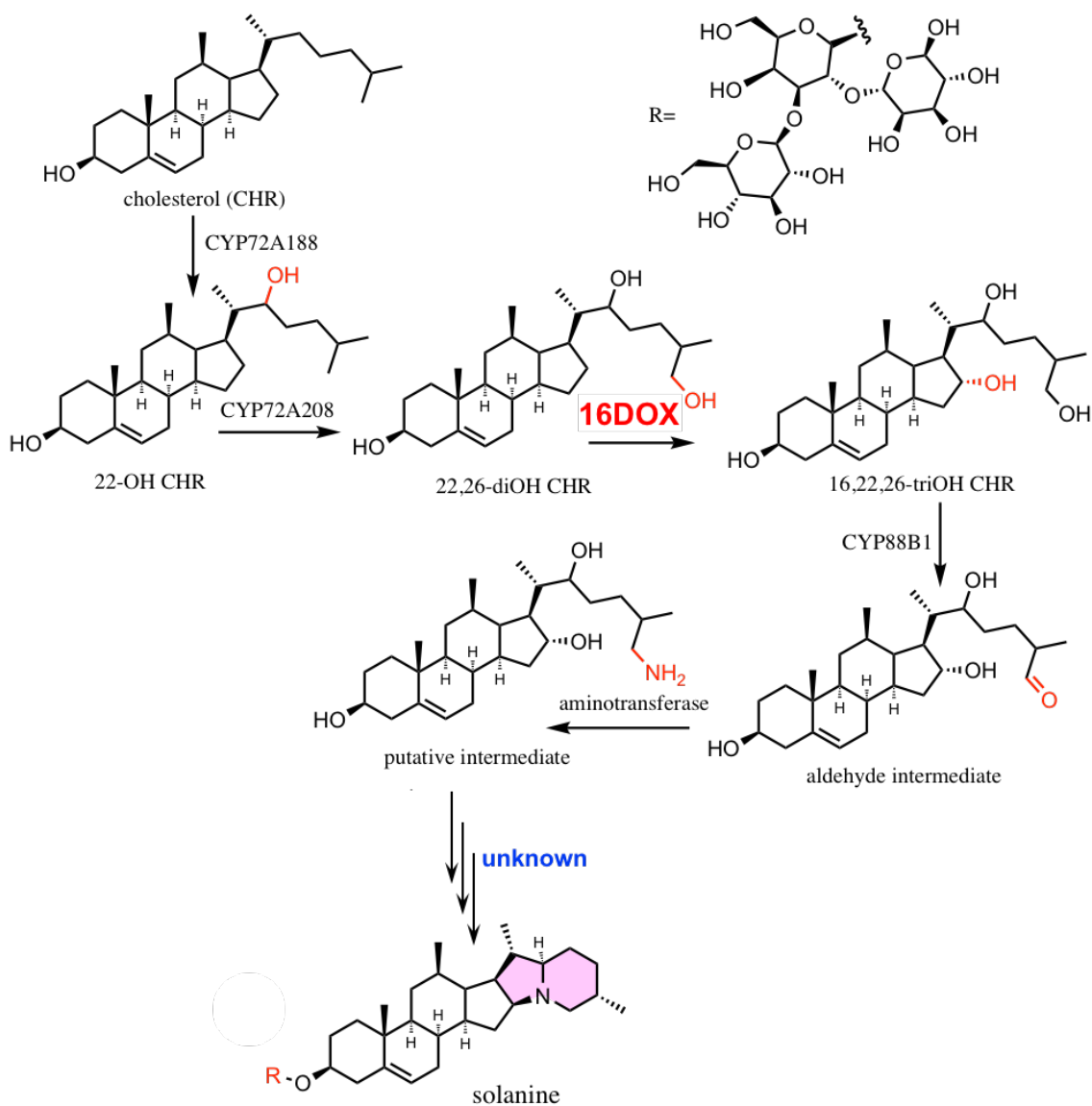


図32 solanineの暫定生成経路

solanineの生合成は小胞膜中に豊富に含まれているCHRが初発物質となり、複数の酸化反応とアミノ化を受けることで推定中間体が生成されることが明らかとなっている。一方で、solanineのピンクで示したsolanidane骨格部分の形成に関わる酵素群に関しては明らかとなっていない。水谷らはunknownの領域にsolanidane骨格を構築する酵素が2OGDであることを明らかにしている。

6. 研究目的

本研究では天然物の生合成における重要な環化による骨格の構築、及び酸化的修飾反応を触媒する酵素について、これら酵素群の反応メカニズムの理解と序章3、4、5項で取り上げた各課題点を構造生物学的な手法を用いて解決することを目指した。

本稿第一章では、近年、骨格構築酵素として研究が盛んに行われているDAaseにおいて、立体選択的にデカリン骨格を構築する酵素ファミリーのFsa2関連酵素群についての研究成

果をまとめた。また、第二章と第三章では、酸化修飾酵素による天然物の位置・立体選択的な酸化反応を理解することを目的とし、構造生物学的な知見がほとんど明らかにされていない植物由来のステロイド骨格を有する天然物の生合成に関する生合成酵素に注目した。代表的な酸化修飾酵素としてP450と2OGDが挙げられるが、第二章ではステロイド骨格を有する植物ホルモンのブラシノステロイド生合成に関するP450を、第三章ではsolanine生合成において酸化的修飾反応によって骨格の構築を行う2OGDについての研究成果をまとめた。

参考文献

- 1 Alexander, F. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226-236, (1929).
- 2 Yamaguchi, S. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 225-251, (2008).
- 3 Nakashima, Y. *et al.* Structure function and engineering of multifunctional non-heme iron dependent oxygenases in fungal meroterpenoid biosynthesis. *Nat. Commun.* **9**, 10, (2018).
- 4 Abdallah, II & Quax, W. J. A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. *International Conference on Natural Resources and Life Science (Nrls-2016)*, 81-98, (2017).
- 5 Kumari, I., Ahmed, M. & Akhter, Y. Evolution of catalytic microenvironment governs substrate and product diversity in trichodiene synthase and other terpene fold enzymes. *Biochimie* **144**, 9-20, (2018).
- 6 Hyatt, D. C. *et al.* Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5360-5365, (2007).
- 7 Williams, D. C., McGarvey, D. J., Katahira, E. J. & Croteau, R. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'Pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* **37**, 12213-12220, (1998).
- 8 Rajaonarivony, J. I. M., Gershenzon, J., Miyazaki, J. & Croteau, R. EVIDENCE FOR AN ESSENTIAL HISTIDINE RESIDUE IN 4S-LIMONENE SYNTHASE AND OTHER TERPENE CYCLASES. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 77-82, (1992).
- 9 Reinert, D. J., Balliano, G. & Schulz, G. E. Conversion of squalene to the

- pentacarbocyclic hopene. *Chem. Biol.* **11**, 121-126, (2004).
- 10 Thoma, R. *et al.* Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* **432**, 118-122, (2004).
 - 11 Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II, and III polyketide synthase paradigms. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **229**, U27-U27 (2005).
 - 12 Chen, H. T. & Du, L. C. Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 541-557, (2016).
 - 13 Walsh, C. T. *et al.* Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 525-534, (2001).
 - 14 Keating, T. A. & Walsh, C. T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 598-606, (1999).
 - 15 Wu, Q. Q., Wu, Z. H., Qu, X. D. & Liu, W. Insights into Pyrroindomycin Biosynthesis Reveal a Uniform Paradigm for Tetramate/Tetronate Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17342-17345, (2012).
 - 16 Kim, H. J., Ruzsyczky, M. W., Choi, S. H., Liu, Y. N. & Liu, H. W. Enzyme-catalysed [4+2] cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A. *Nature* **473**, 109-112, (2011).
 - 17 Fage, C. D. *et al.* The structure of SpnF, a standalone enzyme that catalyzes [4+2] cycloaddition. *Nature Chemical Biology* **11**, 256+, (2015).
 - 18 Zheng, Q. F. *et al.* Enzyme-Dependent [4+2] Cycloaddition Depends on Lid-like Interaction of the N-Terminal Sequence with the Catalytic Core in PyrI4. *Cell Chem. Biol.* **23**, 352-360, (2016).
 - 19 Singh, M. P. *et al.* PYRROINDOMYCINS, NOVEL ANTIBIOTICS PRODUCED BY STREPTOMYCES-RUGOSPORUS LL-42D005 .2. BIOLOGICAL-ACTIVITIES. *J. Antibiot.* **47**, 1258-1265, (1994).
 - 20 Singh, S. B. *et al.* Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2243-2246, (1998).
 - 21 Tobert, J. A. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 517-526, (2003).
 - 22 Kennedy, J. *et al.* Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins

- during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**, 1368-1372, (1999).
- 23 Ma, S. M. & Tang, Y. Biochemical characterization of the minimal polyketide synthase domains in the lovastatin nonaketide synthase LovB. *Febs J.* **274**, 2854-2864, (2007).
- 24 Kato, N. *et al.* A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**, 210-215, (2015).
- 25 Sato, M. *et al.* Involvement of Lipocalin-like CghA in Decalin-Forming Stereoselective Intramolecular [4+2] Cycloaddition. *ChemBioChem* **16**, 2294-2298, (2015).
- 26 Li, L. *et al.* Biochemical Characterization of a Eukaryotic Decalin-Forming Diels-Alderase. *Journal of the American Chemical Society* **138**, 15837-15840, (2016).
- 27 Zheng, Q. F. *et al.* Structural Insights into a Flavin-Dependent [4+2] Cyclase that Catalyzes trans-Decalin Formation in Pyrroindomycin Biosynthesis. *Cell Chem. Biol.* **25**, 718+, (2018).
- 28 Li, G., Kusari, S. & Spiteller, M. Natural products containing 'decalin' motif in microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 1175-1201, (2014).
- 29 Kato, N. *et al.* Control of the Stereochemical Course of [4+2] Cycloaddition during trans-Decalin Formation by Fsa2-Family Enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 9754-9758, (2018).
- 30 Tan, D. *et al.* Genome-Mined Diels-Alderase Catalyzes Formation of the cis-Octahydrodecalins of Varicidin A and B. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 769-773, (2019).
- 31 Fujioka, S. & Yokota, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 137-164, (2003).
- 32 Fujioka, S. & Sakurai, A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol. Plant.* **100**, 710-715, (1997).
- 33 Niwa, R. & Niwa, Y. S. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1283-1292, (2014).
- 34 Masayuki, K., Ganguli, B. N. & Gunsalus, I. C. A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **243**, 3543-3546, (1968).
- 35 Poulos, T. L., Finzel, B. C. & Howard, A. J. HIGH-RESOLUTION CRYSTAL-STRUCTURE OF CYTOCHROME-P450CAM. *J. Mol. Biol.* **195**, 687-700, (1987).
- 36 Monk, B. C. *et al.* Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3865-3870, (2014).
- 37 Meunier, B., de Visser, S. P. & Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947-3980, (2004).
- 38 Omura, T. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J. Biochem.* **147**, 297-306, (2010).
- 39 Mallinson, S. J. B. *et al.* A promiscuous cytochrome P450 aromatic *O*-demethylase for lignin bioconversion. *Nat. Commun.* **9**, 12, (2018).
- 40 Oshima, R. *et al.* Structural evidence for direct hydride transfer from NADH to cytochrome P450nor. *J. Mol. Biol.* **342**, 207-217, (2004).
- 41 Mast, N. *et al.* Crystal structures of substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol hydroxylase in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9546-9551, (2008).
- 42 Bishop, G. J. *et al.* The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1761-1766, (1999).
- 43 Yokota, T., Morita, M. & Takahashi, N. 6-DEOXOCASTASTERONE AND 6-DEOXODOLICHOSTERONE - PUTATIVE PRECURSORS FOR BRASSINOLIDE-RELATED STEROIDS FROM PHASEOLUS-VULGARIS. *Agric. biol. chem* **47**, 2149-2151, (1983).
- 44 Bajguz, A. Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **45**, 95-107, (2007).
- 45 Ghayee, H. K. & Auchus, R. J. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **8**, 289-300, (2007).
- 46 Peres, A. *et al.* Brassinosteroids, the Sixth Class of Phytohormones: A Molecular View from the Discovery to Hormonal Interactions in Plant Development and Stress Adaptation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 33, (2019).
- 47 Wada, K. *et al.* A RICE LAMINA INCLINATION TEST - A MICRO-QUANTITATIVE BIOASSAY FOR BRASSINOSTEROIDS. *Agr. Biol. Chem.* **48**, 719-726, (1984).
- 48 Fujioka, S. *et al.* Biological Activities of Biosynthetically-related Congener of Brassinolide. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1973-1975, (1995).
- 49 Wada, K., Kondo, H. & Marumo, S. A SIMPLE BIOASSAY FOR BRASSINOSTEROIDS - A WHEAT LEAF-UNROLLING TEST. *Agric. biol. chem* **49**, 2249-2251, (1985).
- 50 Ohnishi, T. *et al.* C-23 hydroxylation by Arabidopsis CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **18**, 3275-3288, (2006).

- 51 Guo, Z. X. *et al.* TCP1 Modulates Brassinosteroid Biosynthesis by Regulating the Expression of the Key Biosynthetic Gene DWARF4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 1161-1173, (2010).
- 52 Chung, Y. & Choe, S. The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Crit. Rev. Plant Sci.* **32**, 396-410, (2013).
- 53 Asami, T. *et al.* Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol.* **123**, 93-99, (2000).
- 54 Asami, T. *et al.* Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 25687-25691, (2001).
- 55 Oh, K., Yamada, K. & Yoshizawa, Y. Asymmetric synthesis and effect of absolute stereochemistry of YCZ-2013, a brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 6915-6919, (2013).
- 56 Yamada, K., Yajima, O., Yoshizawa, Y. & Oh, K. Synthesis and biological evaluation of novelazole derivatives as selective potent inhibitors of brassinosteroid biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2451-2461, (2013).
- 57 Yamagami, A. *et al.* Evolutionarily conserved BIL4 suppresses the degradation of brassinosteroid receptor BRI1 and regulates cell elongation. *Sci. Rep.* **7**, 13, (2017).
- 58 Islam, M. S., Leissing, T. M., Chowdhury, R., Hopkinson, R. J. & Schofield, C. J. 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 585-620, (2018).
- 59 Yu, B. *et al.* Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB. *Nature* **439**, 879-884, (2006).
- 60 Falnes, P. O., Johansen, R. F. & Seeberg, E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **419**, 178-182, (2002).
- 61 Hagel, J. M. & Facchini, P. J. Biochemistry and occurrence of O-demethylation in plant metabolism. *Front. Physiol.* **1**, 7, (2010).
- 62 Kakizaki, T. *et al.* A 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase Mediates the Biosynthesis of Glucoraphasatin in Radish. *Plant Physiol.* **173**, 1583-1593, (2017).
- 63 Lau, W. & Sattely, E. S. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. *Science* **349**, 1224-1228, (2015).
- 64 Blasiak, L. C., Vaillancourt, F. H., Walsh, C. T. & Drennan, C. L. Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis. *Nature* **440**, 368-371, (2006).

- 65 Herr, C. Q. & Hausinger, R. P. Amazing Diversity in Biochemical Roles of Fe(II)/2-Oxoglutarate Oxygenases. *Trends Biochem.Sci.* **43**, 517-532, (2018).
- 66 Cardenas, P. D. *et al.* GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. *Nat. Commun.* **7**, 16, (2016).
- 67 Nakayasu, M. *et al.* A Dioxygenase Catalyzes Steroid 16 α -Hydroxylation in Steroidal Glycoalkaloid Biosynthesis. *Plant Physiol.* **175**, 120-133, (2017).
- 68 Nakayasu, M. *et al.* Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiol. Biochem.* **131**, 70-77, (2018).

1章 立体選択的Diels-Alderを触媒するデカリン合成酵素群の結晶構造解析 緒言

1-1. Fsa2 及び Phm7 が触媒する Diels-Alder 反応と生産される化合物の立体化学

一般的に「カビ」と称される糸状菌は、人類にとって有益な天然物を生産する生物として、様々な研究が行われてきた。序章でも述べた通り、デカリン化合物の生合成の理解は創薬において重要な知見となるが、一方で、重要なデカリン骨格の構築に関わる知見については近年少しずつ明らかになっていく程度であり、未解明なところが多い。糸状菌から単離されたデカリン骨格を持つ化合物は様々であり、現在では200種以上が確認されている¹が、中でも共通した骨格を持つ化合物としてテトラミン酸-デカリン複合型化合物が挙げられる(図1-1)。

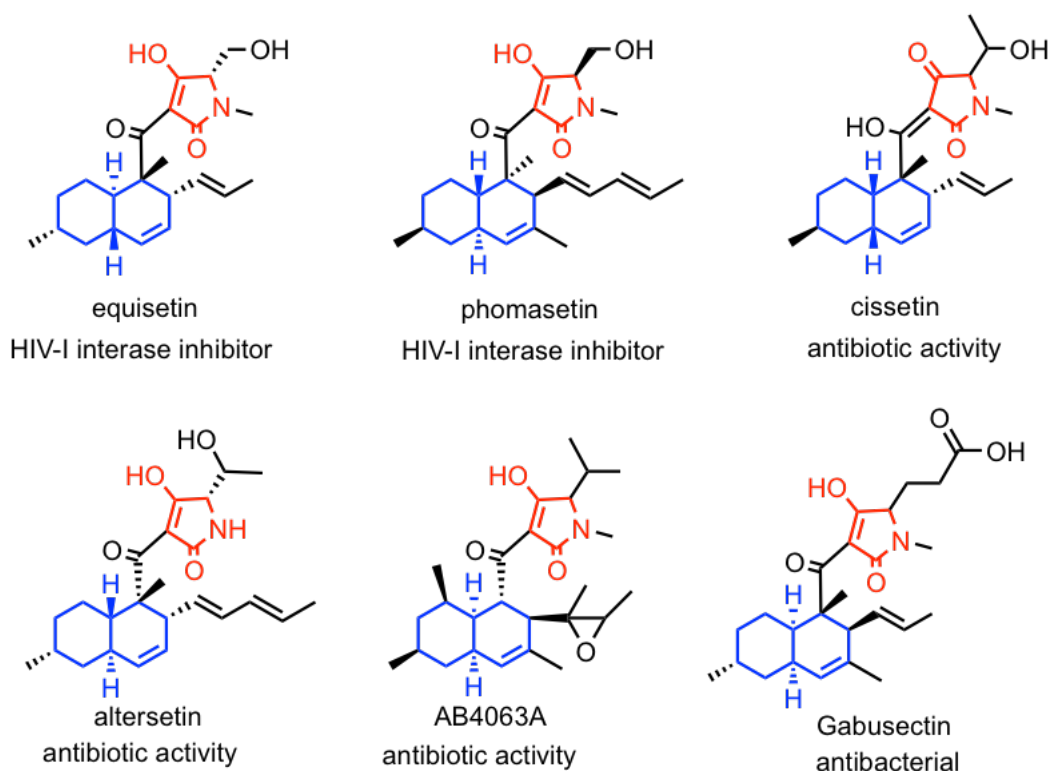


図1-1 テトラミン酸-デカリン複合型化合物の例

テトラミン酸骨格は赤で、デカリン骨格は青で示している。それぞれの化合物の名前の下には主な生理活性を示している。

テトラミン酸-デカリン複合型化合物、もしくはその誘導体の生合成については近年非常によく研究されており、そのほとんどが①PKS-NRPSのPKSモジュールによる炭素鎖の伸長、②PKS-NRPSのNRPSモジュールによるアミノ酸の縮合、③アミノ酸領域の環化によるテトラミン酸骨格の構築、④デカリン合成酵素 (DS) によるデカリン骨格の構築、⑤各種修

飾酵素による置換基の導入によって生合成されていることが明らかとなってきた^{2,6}。これら生合成酵素の中でもデカリン骨格を構築するDSは非常に重要であり、自発的に起こるDiels-Alder反応 (DA反応) では不利な立体化学を持つ特定のデカリン骨格の選択的に生成している。

DSは2015年に加藤らによって初めて報告され、DSの1つであるFsa2が新規な機能を持つ酵素として単離された⁵。Fsa2は、PKS-NRPSによって生合成された中間体を基質とし、*endo*選択的なDA反応を触媒することでequisetinの持つ (6*S*, 11*R*) のデカリン骨格を構築する酵素であるが、詳細な機能や触媒メカニズム、立体構造など、未だに明らかになっていない点が多く存在する。また、加藤らはequisetinの鏡像異性体と非常によく似たphomasetinの (6*R*, 11*S*) デカリン骨格を構築するDSのPhm7も同定し、Fsa2がPhm7の基質を認識して異なる立体化学を持つデカリン骨格を作り分けることを報告した⁶(図1-2)。この報告は、Fsa2とPhm7の遺伝子の組み換えによって非天然型環構造を持つPKS-NRPS化合物を生物に生合成させた世界で最初の例であり、新規生理活性物質の創出の基盤となる非天然化合物の生合成に新たな知見を与えることとなった。また、テトラミン酸-デカリン複合型化合物の生合成に関わるDSは立体選択的なDA反応を触媒し、それぞれの酵素に依存したデカリン骨格を与えることが知られているが、その詳細な反応メカニズムについては未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、環化による天然物の骨格形成反応として新規に発見されたDSについて理解するために、Fsa2とPhm7のX線結晶構造解析や種々の生化学的解析、および理論計算化学を用いて、Fsa2とPhm7の鏡像異性体を作り分けるメカニズム、およびFsa2関連酵素群による基質の認識機構やDA反応の触媒メカニズムを明らかにすることを目指した。

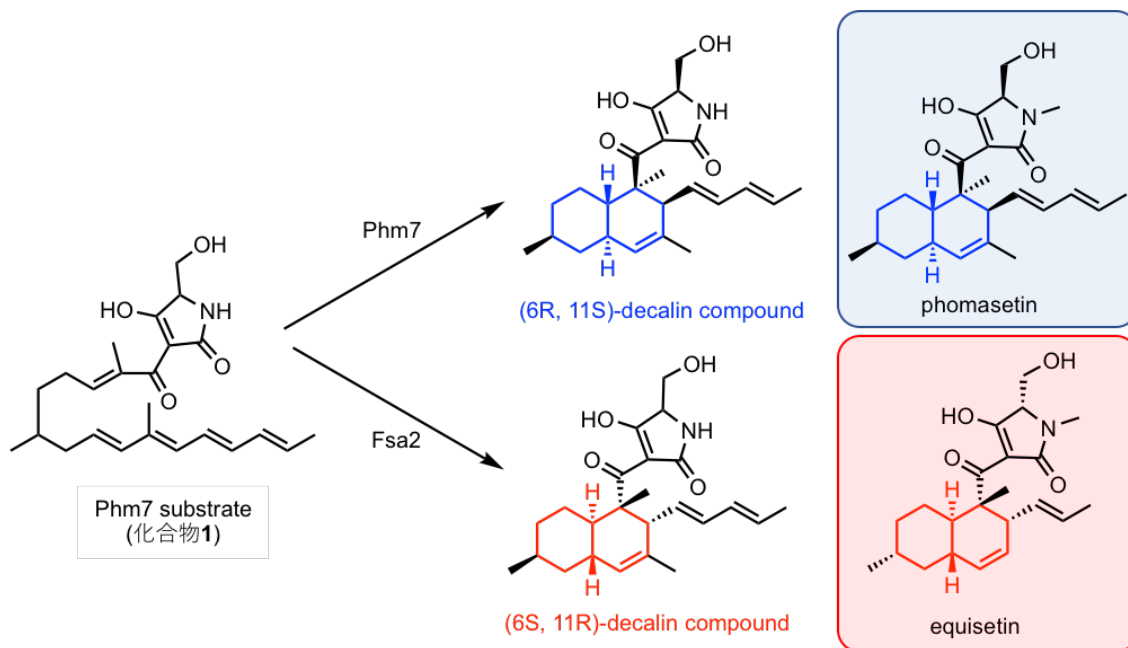


図1-2 phomasetin生産菌の体内で起こる、Phm7とFsa2によるデカリン化合物の生産
 phomasetin生産菌は本来有するPhm7を利用して、青で示した(6*R*, 11*S*)のphomasetin型のデカリン骨格を構築する。一方、Phm7とFsa2の遺伝子を置換したphomasetin生産菌では、赤で示した(6*S*, 11*R*)のequisetin型のデカリン骨格を構築する。

結果・考察

1-2. 生化学・構造生物学的な分析によるDSの触媒部位の同定

まず初めに、先行研究⁶によってFsaとPhm7が*in vivo*でデカリン骨格を作り分けることが可能であることを示した図1-2の内容について、*in vitro*でも同様の実験結果が得られるかを確認した。phomasetin生産能を持つ*Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058株 (phomasetin生産菌) は特定の条件下で大量のphomasetinを生合成することから、Phm7遺伝子欠損株 (Δ phm7-phomasetin生産菌) の菌体内にはPhm7の基質 (化合物1) が大量に蓄積していると推測された。そこで、 Δ phm7-phomasetin生産菌の破砕液を基質溶液として扱い、これに対して大腸菌で発現させ、精製したPhm7、もしくはFsa2を添加することで、*in vitro*でも同様にそれぞれの酵素によるデカリン骨格の作り分けが確認できると考えた。Phm7を添加した反応液では蓄積された化合物1が消費され、(6*R*, 11*S*)型のデカリン骨格を有する化合物2が生産された。一方で、Fsa2を添加した反応液でも同様に化合物1は消費されていたが、Phm7の場合とは異なり、(6*S*, 11*R*)型のデカリン骨格が生産された (図1-3)。(6*R*, 11*S*)型および(6*S*, 11*R*)型のデカリン骨格はそれぞれphomasetinとequisetinが有するデカリン骨格であるため、Phm7とFsa2の酵素反応は、構築した*in vitro*の反応系でも機能することが確認できた。そこで次は、Phm7とFsa2の構造-機能相関を明らかにするためにX線結晶構造

解析を行った。

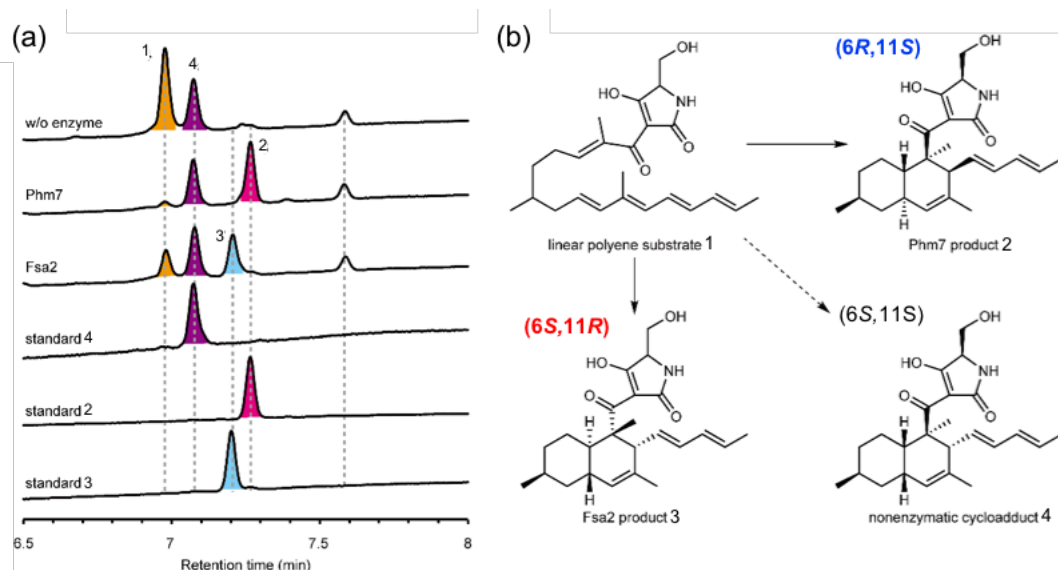


図1-3 $\Delta phm7$ -phomasetin生産菌の破碎液のUPLC分析の結果 (a) とそれぞれのピークが示す予測、もしくは既知化合物の構造 (b)

(a) w/o enzymeは破碎液に対して酵素を添加しなかった際の、Phm7とFsa2はそれぞれの酵素を添加した際のUPLC分析の結果を示している。standard 1-4はそれぞれの標準化合物を単独で分析した際の結果を示している。(b) 化合物1は蓄積されたテトラエン型のPhm7の基質、化合物2は(6*R*,11*S*)型のデカリン骨格を持つPhm7の反応産物、化合物3は(6*S*,11*R*)型のデカリン骨格を持つFsa2の反応産物、化合物4は自発的なDA反応によって生産されたexo付加体のデカリン化合物を示している。

X線結晶構造解析では、アポ型Phm7とアポ型Fsa2の結晶構造をそれぞれ1.62 Åと2.17 Åの分解能で構造決定した(図1-4a, b)。Phm7とFsa2はそれぞれ非対称単位中に3分子と8分子存在していたが、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析から、Phm7とFsa2はどちらも溶液中で単量体として機能すると考えられた(図1-4c, d)。Phm7とFsa2は2つのドメインから構成されており、Nドメインはβ-サンドイッチモチーフを、Cドメインはβ-バレルモチーフを形成していた。今までに立体構造が報告されているDAaseとしては、spinosyn生合成に関わるSpnF⁷やpyrroindomycin生合成に関わるPyrE³⁸などが知られているが、これらはいずれも*S*-adenosylmethionine (SAM) 依存性メチル基転移酵素様のフォールドや、FAD依存性のBaeyer-Villigerモノオキシゲナーゼ様のフォールドといった既知の酵素ファミリーに見られる立体構造を有している。また、どの酵素ファミリーにも構造的な類似性を持たないDAaseとして、抗生物質thiopeptideのpyridine骨格を構築するDAaseのPbtD⁹が知られているが、Fsa2とPhm7はいずれのDAaseにも見られないフォールドを形成しており、DAaseとして新規なフォールドであることが明らかとなった。(図1-4e, f, g)。

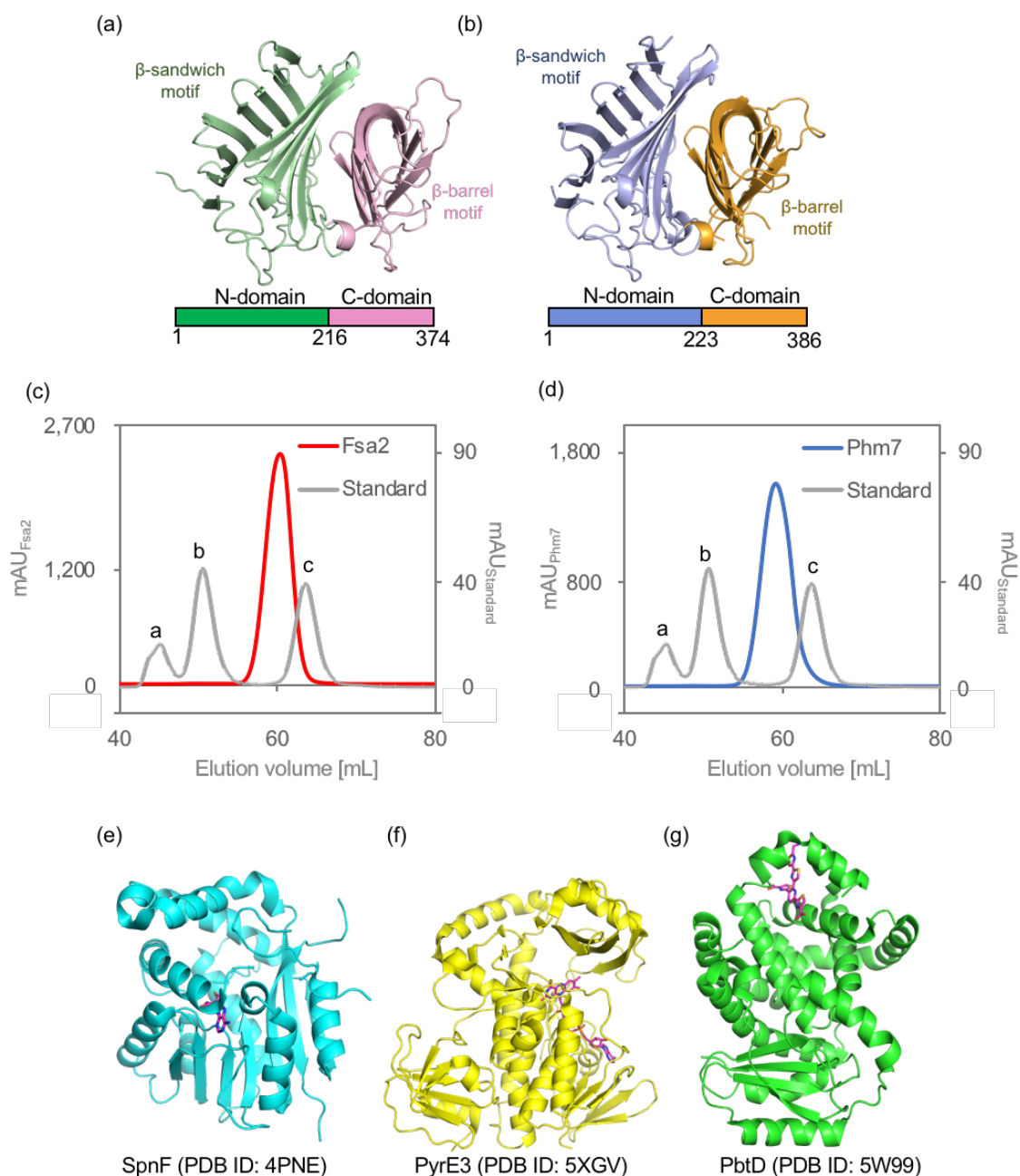


図1-4 単量体として機能するFsa2とPhm7、およびその他のDAaseの立体構造

(a) および (b) はFsa2とPhm7の全体構造を示している。立体構造の色とカラーバーの色はそれぞれのドメインを示しており、カラーバー下の数字はそれぞれのドメインを分けるアミノ酸残基の番号を示している。(c) および (d) はFsa2とPhm7のゲルろ過クロマトグラフィーによる分析結果を示している。Fsa2とPhm7の分子量はそれぞれ42.0 kDaと41.7 kDaである。灰色で示したクロマトグラムは標準タンパク質を含んだ溶液の分析結果で、aは排除限界、bは66 kDaのウシ血清アルブミン (BSA)、cは29 kDaの炭酸脱水酵素の溶出位置を示している。(e)、(f)、(g) はそれぞれSpnF、PyrE3、PbtDの結晶構造を示している。

Phm7およびFsa2の各ドメインに注目してみると、N、Cドメインのどちらもがβ-バレル構造を持つリポカリン様のフォールドを形成していた(図1-5a-d)。リポカリンタンパク質は、β-バレルの内部に疎水的な化合物を収容する機能を有することが知られているタンパク質であり、代表的なリポカリンタンパク質に牛乳の主成分の1つであるβ-ラクトグロブリンが挙げられるが、レチナールやパルミチン酸など、20以上の疎水的な化合物が結合することが知られている¹⁰(図1-5e)。リポカリン様のフォールドを持つタンパク質や酵素としては、coniferyl alcoholsの立体選択的な二量化を行う *dirigent protein*¹¹や、位置・立体選択的なDA反応によってスピロテトラミン骨格の構築を触媒するPyrI4¹²などが知られており、これらは全てバレル内部で環化物を立体選択的に生産している。一方、Fsa2やPhm7のそれぞれのドメインに内部には、推定されている基質を受容することができる大きさの空洞はなく、どちらもドメインの中心は触媒部位ではないことが推測された(図1-5)。

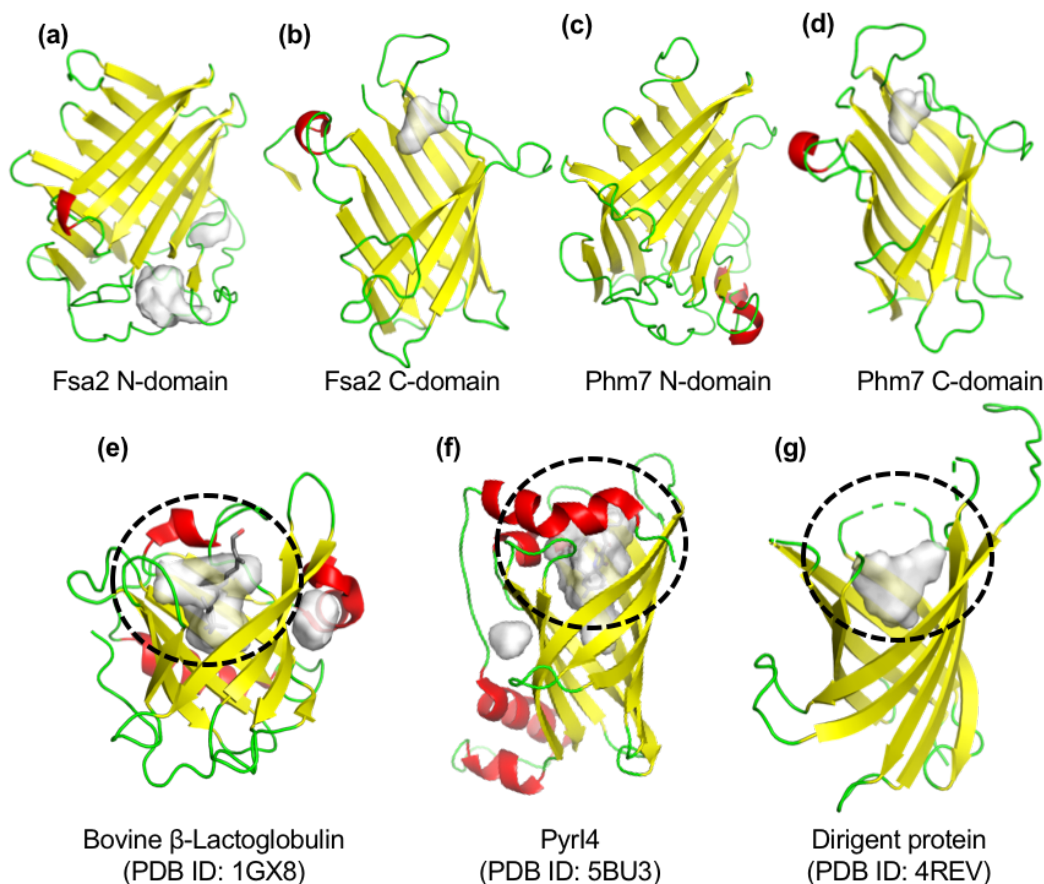


図1-5 Fsa2とPhm7の各ドメインおよびリポカリンフォールドのタンパク質の立体構造

(a)-(d) はFsa2とPhm7のNおよびCドメインのみにおける構造と空洞を示している。(e) は典型的なリポカリンタンパク質として知られるβ-ラクトグロブリンの立体構造と空洞を示しており、(f) と (g) はリポカリン様フォールドを持つ酵素のPyrI4と *dirigent protein*の立体構造と空洞を示している。黄色はβシート構造を、赤はαヘリックス構造を、緑はループ構造を示しており、破線の円はリガンドを受容する空洞の位置を示している。

Phm7とFsa2には、共通して両ドメインの間に基質を受容することができる十分な大きさの空洞が存在しており、この空洞は基質結合ポケットと推測された。推定の基質結合ポケットはドメイン間の短いヘリックス構造上に存在するPhm7のW223やFsa2のW216残基のインドール環によって、親水的な上部の領域と疎水的な下部領域に分断されていた（図1-6）。このTrp残基は、これまでDAase活性が報告されているDSだけでなく、様々な糸状菌の遺伝子情報からDSとして推定されているタンパク質のアミノ酸配列において完全に保存されていた。保存されているTrp残基はDA反応を触媒する上で重要な役割を担っていることが推測された（図1-7）。

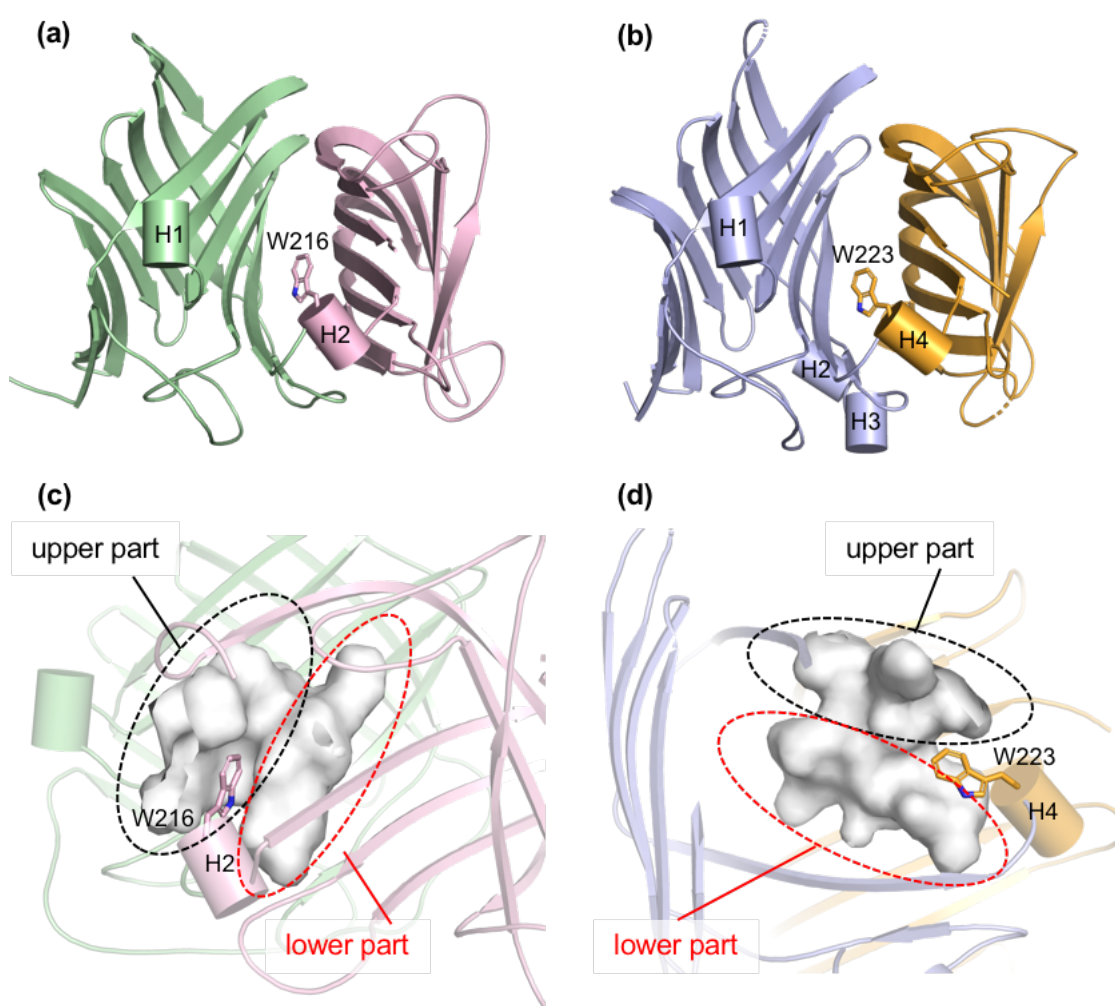


図1-6 DSに保存されているTrp残基の位置と推定基質ポケット構造への関与

(a) と (b) はFsa2とPhm7の全体構造中におけるTrp残基の位置を示しており、保存されたTrpはスティックモデルで表示している。また、 α ヘリックス構造はシリンダーモデルで示している。(c) と (d) はそれぞれTrpによって分断された推定ポケット領域を示しており、黒の破線円が浸水的な領域を、赤の破線円が疎水的な領域を示している。

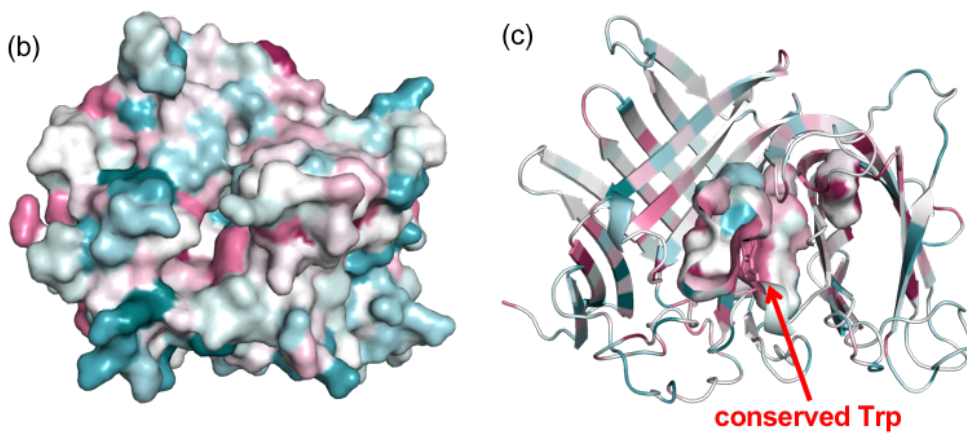


図1-7 同定されている8種類のDSのアミノ酸配列の保存と立体構造の関係

モデルはFsa2を使用している。保存度合いの高さは9色に分けられており、暖色ほど保存性が高く、寒色ほど保存性が低いことを示している。矢印は完全保存されたTrp残基を指している。(a) はアミノ酸配列の比較を、(b) はタンパク質表面における保存されたアミノ酸残基の分布を、(c) はポケット内部における保存されたアミノ酸残基の分布を示している。

この空洞が触媒部位であることを確かめるために、 $\Delta phm7$ -phomasetin生産菌に蓄積しているPhm7の基質である化合物1を利用することを考えた。しかしながら、化合物1は非常に不安定で精製・保存することが難しく、取り扱いが困難であることが予測された。そこで、基質や予測される遷移状態、もしくは生成物の構造の一部に似た骨格を持つ化合物を用いて、リガンド-タンパク質間の相互作用によって変化するタンパク質分子の熱泳動を微量で検出する分析装置（マイクロスケール熱泳動装置）により、Phm7に親和性を示す化合物のスクリーニングを実施した。その結果、化合物5は弱くPhm7に結合し、Phm7の触媒するDA反応を濃度依存的に阻害することがわかった（図1-8a, b）。そこで、Phm7の結晶を化合物5が含まれた溶液へと浸し、浸漬処理したPhm7の結晶を用いてX線結晶構造解析を行った。X線結晶構造解析では、1.61 Åの分解能で化合物5結合型Phm7の結晶構造を決定することができ、1つのPhm7分子に対して、推定触媒部位に1分子の化合物5 (mol A)と表面に2分子の化合物5 (mol B, C) が結合していた（図1-8c, d）。基質結合部位と推定しているポケットに結合したmol Aは保存されていたTrp残基の直下に収容されており、化合物5の持つアミノ基はPhm7のY178、もしくはE51、S66、Y68と水分子を介して水素結合を形成していた。推定触媒部位に結合した化合物5の電子密度は不明瞭であったが、*in vitro*で濃度依存的な阻害活性を示す事実から、化合物5は触媒部位に結合していると考えられ、ドメイン間に存在する空洞はPhm7の基質結合部位であることを強く示唆した。加えて、化合物5はデカリン骨格と部分的に類似しており、保存されたTrp残基直下の疎水的な空間に結合していたことから、化合物5が結合した領域は、DA反応によって環化する基質の炭素鎖領域が結合する領域であると推定された。また、Fsa2はPhm7に対して34%の相同性を示し、Phm7と同様に直鎖のポリエチン化合物1を認識することから、Fsa2においても、このドメイン間の空洞が触媒部位であると考えられる。

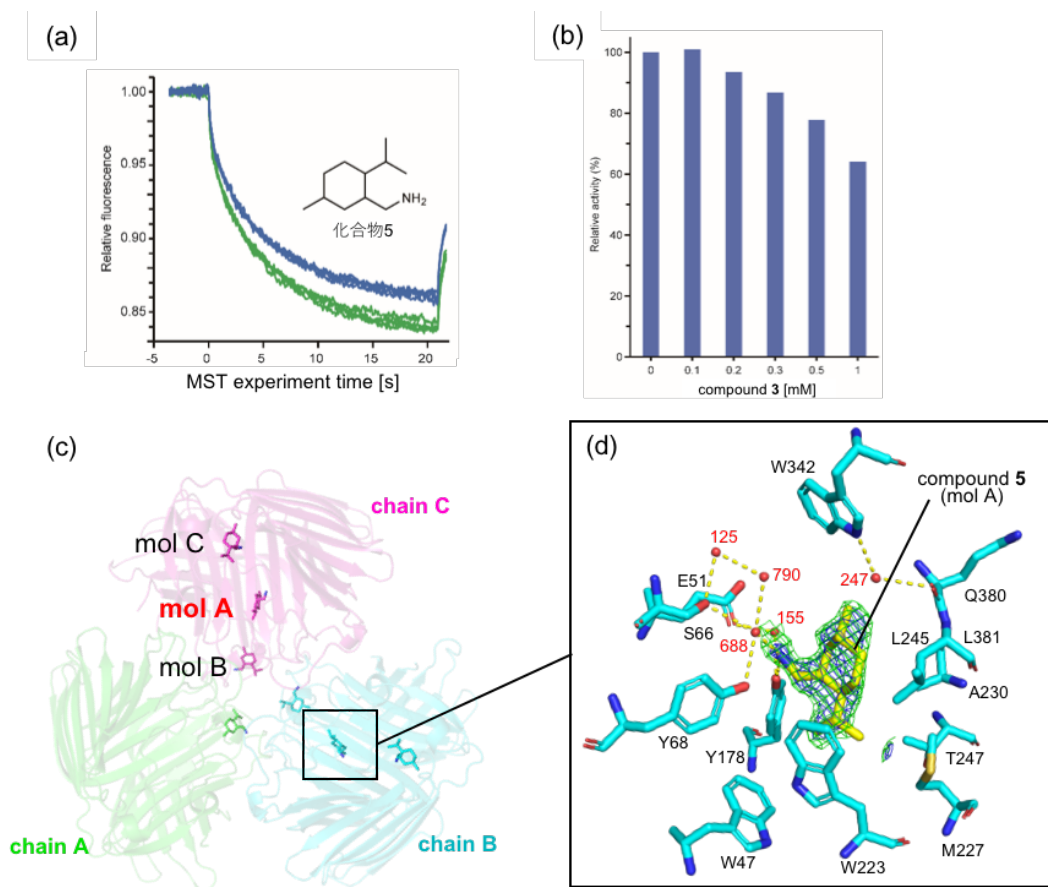


図1-8 Phm7に親和性を示す化合物5の生化学的解析およびPhm7との複合体の結晶構造

(a) 化合物5の構造と化合物5の添加に伴う蛍光値の変化を示している。青が添加前で緑が添加後の蛍光値を示している。系はタンパク質表面に露出した1級アミンを蛍光ラベル化したPhm7の赤色蛍光をモニターしている。(b) $\Delta phm7$ -phomasetin生産菌の破碎液に化合物5を加えた時の*in vitro*アッセイの結果を示している。濃度は添加した化合物5を示している。(c) 化合物5結合型Phm7の結晶構造解析の結果を示しており、非対称単位中に含まれる3分子のPhm7に対して、chain Aは1分子、chain BとCは3分子の化合物5が結合していた。(d) 化合物5の推定活性部位に対する結合様式を示している。メッシュは化合物5のPolder mapを示しており、青は3.0 σ 、緑は2.0 σ を示している。黄色の破線は水素結合を示しており、赤の球体モデルは水分子を示している。赤字は水分子の番号を示している。

1-3. 分子動力学シミュレーションによる基質の結合様式の推測

阻害剤を使った生化学的解析と結晶構造解析から、DAaseとして新規構造であるPhm7やFsa2の活性部位は、ドメイン間に存在する空洞であることが強く示唆された。次にこの推定活性部位に対して基質の結合様式予測するために、まずはドッキングシミュレーションを実施した。ドッキングシミュレーションの基質のモデルには、Phm7では化合物1を用い、Fsa2では*in vitro*でFsa2の基質として認識することが確認されている¹³化合物6を用いた(図1-9a, b)。それぞれの基質が分子内DA反応を起こすためには、基質中のdieneとdienophile領域が接近する必要があるが、ドッキングシミュレーションでは、Phm7とFsa2

のどちらにおいても活性部位内部で基質が折りたたまれ、dieneとdienophileが接近できることがわかった。そこで、レプリカ交換分子動力学 (MD) シミュレーション法の一つであるgREST法 (generalized Replica-Exchange with Solute Tempering法) を用いて、より詳細にPhm7やFsa2に対する基質の結合様式を計算した。また、計算の初期構造には、ドッキングシミュレーションで得られた結合ポーズを精密化して得られたモデルを用いた。

gRESTの結果では、Phm7とFsa2のどちらにおいても計算した100 nsのタイムスケールでは、それぞれの基質は常に活性部位内部に結合しており、それぞれの酵素と相互作用することが示唆された。また、得られたトラジェクトリのすべてのポーズを確認すると、基質の結合コンフォメーションは、フォールド状態、セミフォールド状態、非フォールド状態、の3種類が存在していた。DA反応を起こすためには、基質はdieneとdienophileが接近したフォールド状態をとる必要があるが、Phm7とFsa2のフォールド状態はそれぞれのトラジェクトリの63%と33%を占めていた (図1-9c, d)。Phm7やFsa2がそれぞれの立体選択的な生成物を与えることができる基質の結合ポーズを抽出すると、Phm7の活性部位では化合物1のテトラミン酸が持つ2つの水酸基 (O3とO4) がそれぞれNドメイン上のS66とN84と、及び2つのカルボニル基 (O1とO2) がCドメイン上のK356と水素結合を形成していた (図1-9e)。化合物5が結合していたポケットはW45、L47、Y68、Y178、W223、M227、A230、L245、L381といった疎水的なアミノ酸残基によって形成されていたが、この領域には 酵素反応によって環化する基質の炭素鎖領域が配置されていた。また、基質のポリエン部分は芳香族アミノ酸であるY228、W342、F377に囲まれていたことから、 π - π 相互作用もしくはCH- π 相互作用によって酵素と結合していると考えられた。

Fsa2の場合は、基質と直接水素結合を形成しているアミノ酸残基は確認されなかったが、基質の2つのカルボニル酸素 (O1とO2) がN346の近傍に、Q80がテトラミン酸部分のO4原子の近傍に配置されていた。Fsa2の基質ポケット内部には水素結合を形成するための親水性のアミノ酸残基が非常に少なく、テトラミン酸と静電的な相互作用を形成できるアミノ酸残基は限られていたため、Q80はテトラミン酸との水素結合の形成に関与していると考えられた (図1-9f)。また、[4+2]環化付加反応を起こす炭素鎖領域は、Fsa2のリアクションチャンバーと考えられる疎水的な領域に収容されていた。基質のポリエン領域に関しては、芳香族アミノ酸であるY49、Y171、W332付近に配置されており、Phm7と同様に π - π 相互作用もしくはCH- π 相互作用によって相互作用していると考えられた。これらの結果から、Fsa2とPhm7の活性部位には、基質のテトラミン酸結合領域、ポリエン結合領域、及び炭素鎖結合領域領域がおおよそ同じ部分に存在するため、互いに鏡像異性体の関係にあるデカリン骨格を形成するにもかかわらず、基質の結合様式は非常に似ていることが提案された。

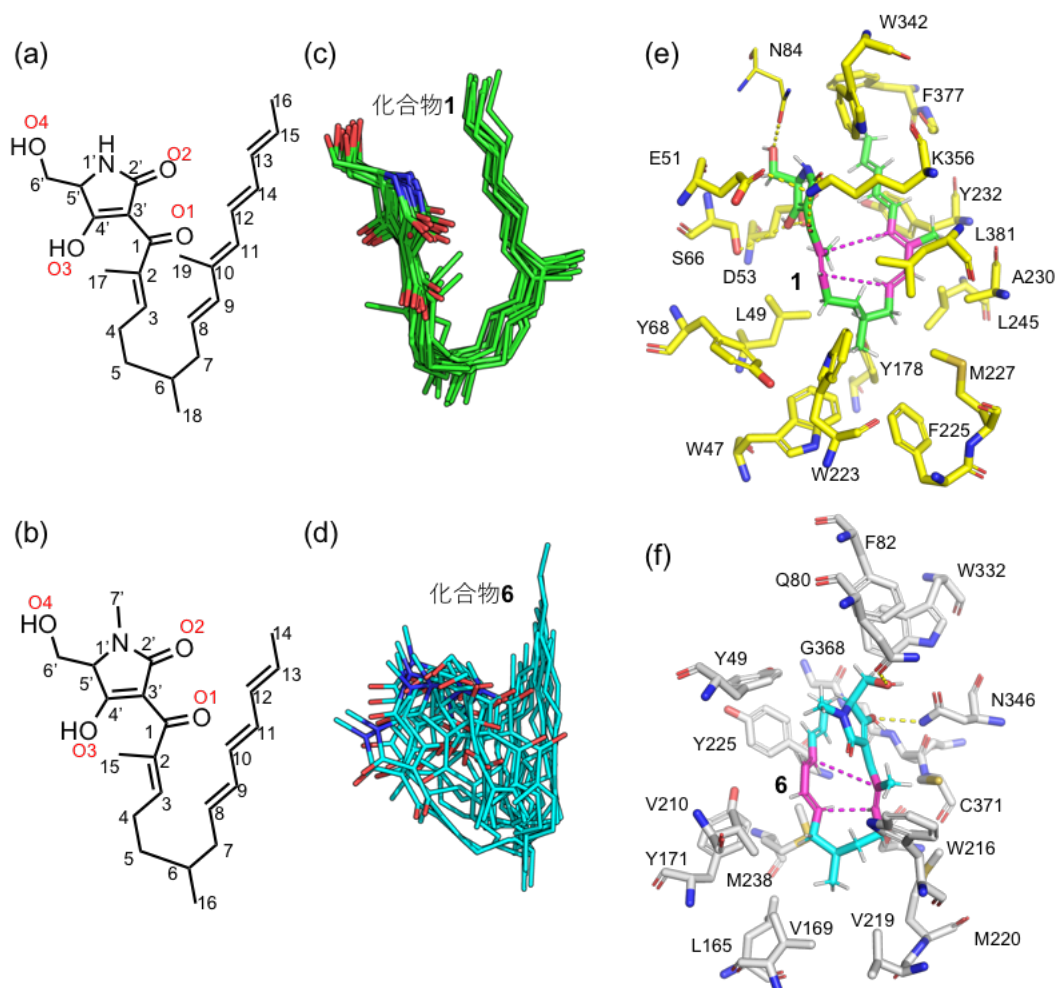


図1-9 MDシミュレーションにより予測されたPhm7とFsa2に対する基質の結合様式

(a), (b) MDシミュレーションで用いた化合物1及び基質6の構造 (c), (d) MDシミュレーションによって得られたトラジェクトリの中から、フォールド状態を形成しているトラジェクトリを抽出した結果。緑がPhm7の基質でシアンがFsa2の基質を示している。(e), (f) MDシミュレーションによる基質の結合様式。Phm7とFsa2がそれぞれのデカリン骨格を生成する上で最も適当と考えられるコンフォメーションを形成している時のトラジェクトリを示している。基質のマゼンタの領域は[4+2]環化付加反応を起こすdieneとdienophileを示しており、マゼンタの破線は環化後に新しく形成されるC-C結合の領域を示している。黄色の破線は水素結合を示している。(e), (f) はそれぞれPhm7とFsa2を示している。

以前の研究⁶では、Phm7とFsa2がそれぞれのデカリン骨格を構築する際の基質の遷移状態と構造におけるエネルギー準位を、密度汎関数理論 (DFT) 計算を用いて算出していた。DFT計算によって、DA反応を起こすことができる基質の状態が算出された結果、gRESTと同様に、Fsa2とPhm7のどちらの場合においても基質はdieneとdienophileが接近したフォールド状態にあった。このフォールド状態の基質における、それぞれのC-C結合の二面角を比較すると、例えば、5番目のC-C結合 (図1-10a、C4-C5結合) ではPhm7は -65.8° 、Fsa2

は65.6° となっており、Phm7とFsa2ではフォールドされたそれぞれの基質のC-C結合の二面角の値が反転していることが明らかとなった。このことから、Fsa2とPhm7が互いに鏡像異性体の関係にある化合物を作り分けるメカニズムは、基質が折りたたまれた際のC-C結合の二面角が重要であると考えられた。

そこで、gRESTによって得られたトラジェクトリの中から、DA反応を起こしうるフォールド状態を形成していたポーズについての二面角をプロットした。その結果、Phm7ではDFT計算で得られた二面角と近い値をとる傾向が見られた (図1-10a, b, c)。またFsa2では、明確なフォールド状態のクラスターがあまり確認できなかったが、DFTの結果と同様に、Phm7の二面角プロットに対して相対的に反対の値をとる傾向が確認された (図1-10d, e, f)。これらの結果は、Fsa2とPhm7に結合した基質は、それぞれの立体化学を持つデカリン骨格を形成しやすい状態で基質ポケット内部に折りたたまれて收容されることを示している。特にフォールド状態でクラスターが確認されたPhm7では、C3-C4、C4-C5、C5-C6結合以外の二面角が制限されていたことから、デカリン骨格の立体を制御するためにはdienophileであるC2-C3結合と、DA反応に関与するdieneを含めたポリエン部分のC-C結合の二面角を制御することが重要であり、Phm7ではこれを制御するためのポケット構造を有していると考えられた。また、Fsa2と基質のMDシミュレーションでは、フォールド状態のモデルが明確にクラスター化していなかったが、dieneとdienophileに関わる結合の二面角はDFTによって算出された値と近い値を示していた。このことから、Phm7と同様に、Fsa2がデカリン骨格の立体化学を制御するためには、dieneとdienophile付近の結合角を制限することが重要であり、Fsa2の基質ポケットの構造的な相補性がこれを可能にしていると考えられる。

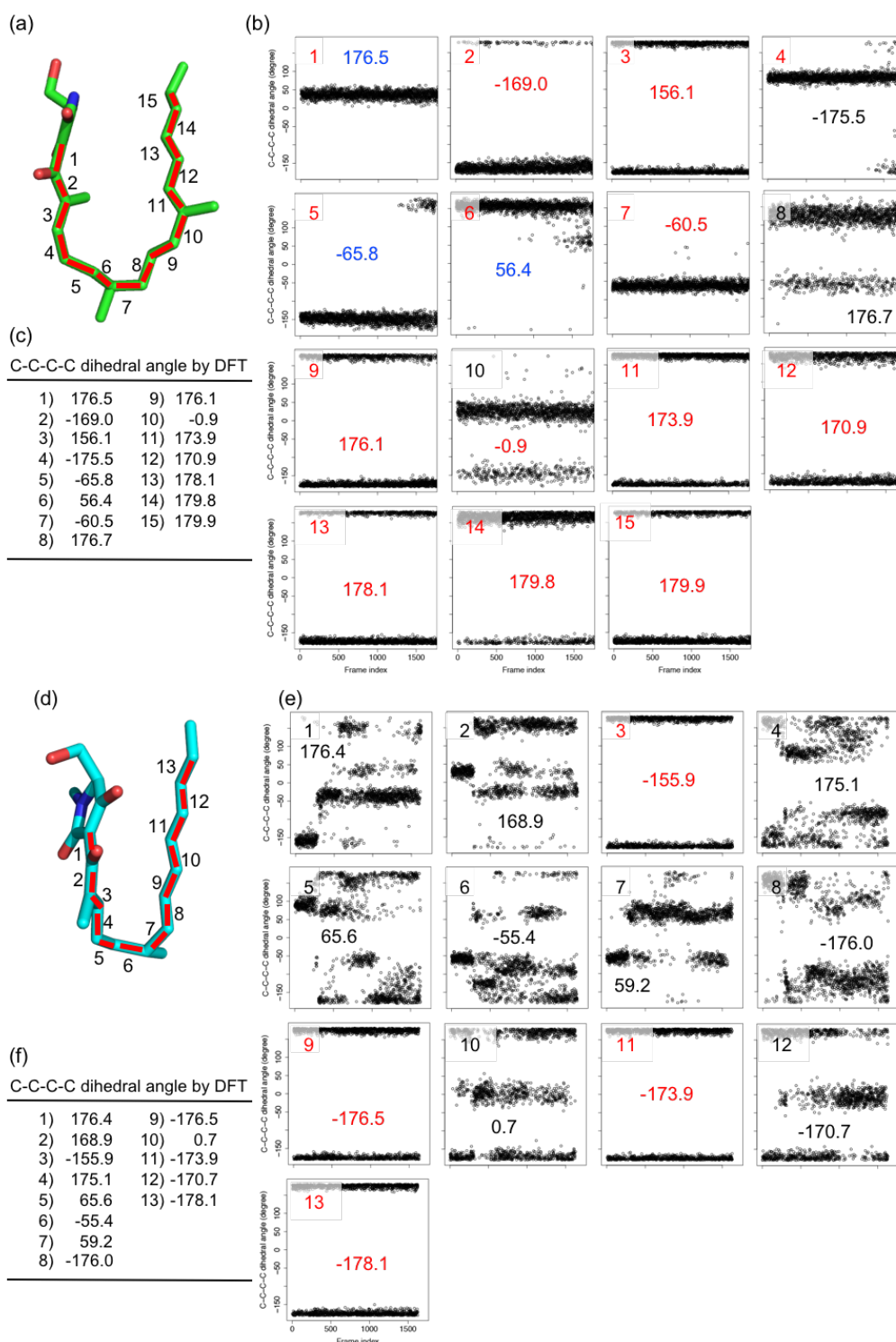


図1-10 MDシミュレーションで得られたトラジェクトリの各C-C結合の二面角プロットとDFT計算によって得られていた各C-C結合の二面角
 (a) と (d) は各基質モデルにおけるC-C結合の番号を示している。(b) はPhm7の二面角プロットを、(d) はFsa2の二面角プロットを示している。各二面角プロット内に記されている数字は、過去の研究⁶で行なったDFT計算から導き出された二面角の値を示している。MDの結果から二面角の値がある程度収束している場合に限り、DFT計算とMDシミュレーションによって得られた二面角の差が 30° 以内の場合を赤字で、 60° 以上差がある場合を青字で示している。DFT計算により算出された角C-C結合の二面角は (c) 及び (f) にまとめた。

1-4. 変異体解析による推定基質結合モデルの検証

MDシミュレーションから、基質の結合はテトラミン酸部分との静電的な相互作用 (Phm7: E51, D53, S66, E82, K356, Fsa2: Q80, N346)、デカリン骨格が形成される関わる炭素鎖領域との疎水的な相互作用 (Phm7: Y68, Y178, G217, W223, A230, L245, L381, Fsa2: L47, V210, W216, S223, M238)、及びポリエーレン部分と芳香族アミノ酸との相互作用 (Phm7: W342, Fsa2: Y49, Y225, W332) が重要であると推定された。これを検証するために、それらアミノ酸残基に対して部位特異的な変異を導入したPhm7とFsa2を調製し、それらの活性を評価した。活性の測定は Δ phm7-phomasetin生産菌に蓄積したテトラミン酸-テトラエン型のPhm7の基質 (化合物1) を用いて酵素反応を行い、生成したデカリン化合物量で活性を評価した。

Phm7ではまず、基質の結合、もしくはDA反応の触媒に関わると推測されたアミノ酸残基に対してAla置換の変異を導入した変異体の活性を測定した。テトラミン酸やdienophile近傍のカルボニル酸素と極性相互作用を形成していると考えられたアミノ酸残基の変異体E51A, D53A, S66A, E82A, K356Aの活性は、WTの活性と比べて約50-90%低下していた (図1-11a)。また、デカリン骨格の形成に関わる炭化水素部分や、ポリエーレン領域と相互作用していると考えられた疎水的なアミノ酸残基のAla置換体では、Y68A, Y178A, G217A, W223A, L245A, W342A, L381Aでも同様に活性が50-90%低下していた。これらアミノ酸残基への変異導入による活性の低下は、MDシミュレーションで提案された結合様式を支持しており、特に活性が70%以上も低下していたD53とK356は、ヘテロ原子を介した基質のテトラミン酸部分との相互作用に非常に重要であると考えられた。また、W223の直下に存在する疎水的なポケット領域は、実際にDA反応が起こる「リアクションチャンバー」であることが示唆された。

次に、リアクションチャンバーを構成するアミノ酸残基A230, L245, T247, K356に対し、基質ポケットの内部を埋める嵩高い側鎖を持つPheへの変異を導入した。Phe置換体では、いずれの変異体でも大きく活性が低下しており、基質の結合が阻害されたと考えられたため、これらアミノ酸残基近傍に基質が配置されることが強く示唆された (図1-11b)。一方、A230SやL245Vといった、基質ポケットの構造をわずかに変化させる変異体では大きな活性の低下が確認されなかったことから、基質はポケット内部である程度「遊び」を持って結合していると考えられた。MDシミュレーションでは、Y68の側鎖は基質との直接的な相互作用は確認できなかったが、Y68AやY68Tによる側鎖構造が大きく変わる変異に関しては、活性が大きく低下していた。MDシミュレーションのトラジェクトリを確認すると、Y68はフォールドしていない基質と相互作用していることが確認された。このことから、Y68は活性部位のポケット内部で基質を折りたたむ過程において重要なアミノ酸残基であると考え

られ、「非フォールド状態」における基質の結合に関与していると推測された。

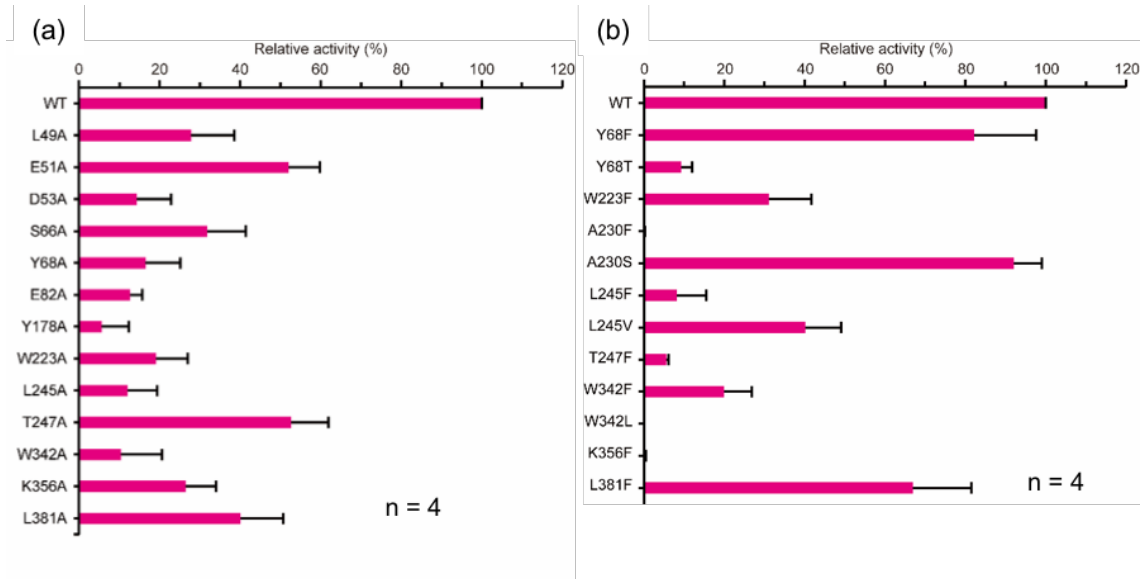


図1-11 $\Delta phm7$ phomasetin生産菌の破碎液を用いたPhm7と各種変異体の活性の測定結果 (a) はAla置換体について、(b) はそれ以外の点変異体についての結果を示している。活性はWTの活性を100とした相対活性で評価しており、UPLCによって検出された(6*R*, 11*S*)型のデカリン化合物の量を相対活性としている。実験は全て4回行い、使用した菌体破碎粉末は全て同じ菌体ロットから得られた試料を使った。

Fsa2では、推定されるFsa2の基質は合成が困難で利用できなかったが、以前の研究⁶や図1-3で示した通り、Fsa2はPhm7の基質を認識して環化付加反応を触媒することが明らかとなっている。Phm7の基質はFsa2に対する親和性が低いと予測され、正確な評価は困難だが、定性的な評価はできると考えられたため、Phm7の基質を用いてFsa2と各種変異体の評価を行なった。Phm7に対して、Fsa2では基質の結合には極性相互作用は少なく、疎水的な相互作用やvan der waals力が重要であることがMDシミュレーションから予測されていた。そのため、テトラミン酸との相互作用に必要と予測されたQ80, N346, 及び疎水的な相互作用やvan der waals相互作用に必要と予測されたL47, Y49, V210, W216, S223, Y225, M238, W332のAla置換体を用いて実験を行なった。その結果、Q80A以外ではFsa2の活性の大幅な低下が確認され、MDシミュレーションで得られた基質の結合様式をある程度支持することが示唆された(図1-12a)。以上の結果は、Fsa2の場合でもMDシミュレーションで予測されたFsa2に対する基質の結合様式を支持していると考えられ、Phm7とFsa2は異なる立体選択性を有しているものの、基本的にはテトラミン酸結合部位や、ポリエーテル結合部位、及びリアクションチャンバーの位置は同様であると考えられた(図1-12b)。

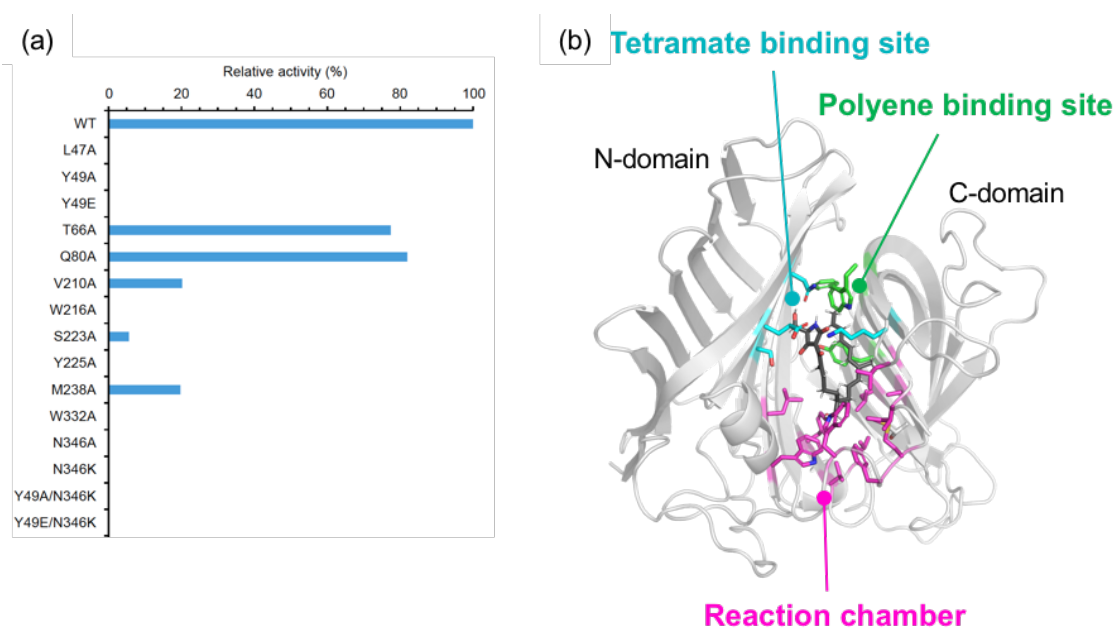


図1-12 Fsa2とその変異体の活性測定の結果、及びFsa2とPhm7の基質結合ポケット内部を構成する各アミノ酸残基の役割

(a) $\Delta phm7$ -phomasetin生産菌の破砕液を用いたFsa2と各種変異体の活性測定の結果。試行回数は1回のみで、WTの活性を100とした場合の相対活性を示している。UPLCによって検出されたFsa2が生産する(6*S*, 11*R*)のデカリン化合物のピーク面積を活性の強度としている。Y49E及びN346KはFsa2のY49とN346の位置に相当するPhm7のアミノ酸残基E53とK356への置換を行なった変異体である。(b) DSの活性部位内部における、それぞれの役割を果たす領域を示している。モデルはPhm7を使っている。シアンはテトラミン酸結合領域、緑はポリエン結合領域、マゼンタはリアクションチャンバーを示している。

1-5. Fsa2とPhm7による立体選択的なデカリン骨格の構築およびFsa2ファミリーの機能

DSは様々な立体異性を持つデカリン骨格の作り分けを行っており、中でも生成するデカリン化合物が鏡像異性の関係にあるPhm7とFsa2は、デカリン骨格を作り分ける機構を明らかにすることが期待できるモデルであると考えられる。以前の研究⁶から、完全と同じではないものの、化合物1を共通の基質として認識することが明らかとなっていたが、詳細な反応メカニズムについては不明であった。本研究では、X線結晶構造解析によって、Phm7とFsa2が持つ2つのドメインの間には基質を受容できる大きな空洞が存在していることが明らかとなった。また、阻害剤である化合物5が結合したPhm7の結晶構造解析や、Phm7の基質が蓄積したphomasetin生産菌の破砕片を用いた生化学的な実験から、その空洞が基質結合ポケットであることが明らかとなった。そこで、MDシミュレーションを行い、Fsa2とPhm7に対する基質の結合様式を推定した。その結果、基質は折りたたまれた状態でポケット内部に結合していたが、Fsa2とPhm7が生み出す反応生成物は鏡像異性体の関係にあるにも関わらず、基質のテトラミン酸部分、オレフィン部分、炭化水素鎖部分はそれぞれのポケット内部に対して、同様な位置で結合していることが推定された。

MDシミュレーションの結果をもとに、基質の結合に関わると推定されるアミノ酸残基を変異させ、デカリン化合物の生産活性を比較したが、Phm7とFsa2のどちらも場合においても、ほとんどの変異体で50%以上の活性が失われていた。そのため、MDシミュレーションによって得られた結合モデルは妥当であると考えられた。一方、Fsa2とPhm7に対する基質の結合モデルを比較すると、どちらもDA反応に関わるdiene部分が*s-cis*構造になっており、*s-cis*構造の向きは両者のポケット内部で鏡像的に配置されていた(図1-13a、b)。この時、互いの基質の*s-cis*構造の向きを揃えて並べると、それぞれのテトラミン酸部分はFsa2では左巻き方向に、Phm7では右巻き方向に折りたたまれていた(図1-13c)。これらの結果から、Fsa2とPhm7は、基質を「左巻き」か「右巻き」の状態で結合させることによって、鏡像異性のあるデカリン骨格を作り分けていることが明らかとなった。

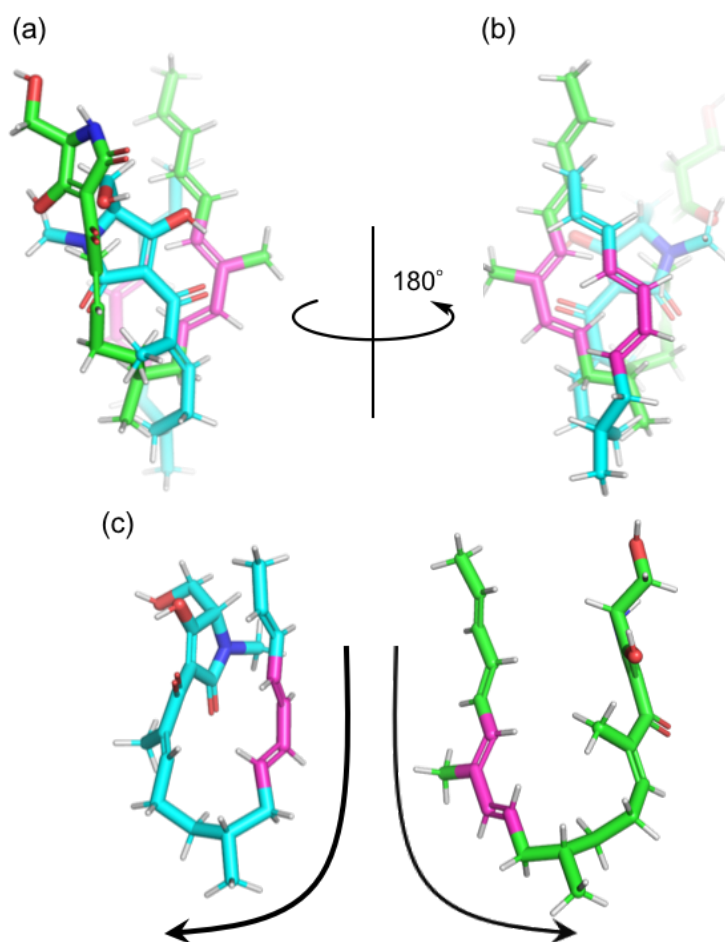


図1-13 MDシミュレーションで予測された基質の結合様式の重ね合わせと比較

モデルの重ね合わせはFsa2とPhm7のタンパク質部分で行なった。Phm7およびFsa2の基質のモデルはそれぞれ緑とシアンで示した。マゼンタはオレフィンの*s-cis*部分を示している。モデルの重ね合わせは(a)と(b)で示しており、(a)はテトラミン酸部分が手前、(b)はオレフィン部分が手前に配置されている。(c)はオレフィンの*s-cis*部分の向きを揃えた場合の、それぞれの結合コンフォメーションを並べて表示している。

本研究の結果から、Fsa2とPhm7の基質結合ポケットは、基質のテトラミン酸部分との結合に極性アミノ酸を介することや、DA反応に関与しないポリエン領域の末端付近と相互作用すると考えられる芳香族アミノ酸が保存されており、変異体解析によってそれらのアミノ酸残基が基質の結合や活性に大きく影響を与えていることが明らかとなった。これまでにいくつかのDAaseの結晶構造が決定され、反応メカニズムについて議論が行われてきた。例えばPyrI4では生成物結合型の結晶構造から、基質のdienophile近傍に存在するカルボニル基と極性アミノ酸残基の側鎖が水素結合を形成し、電子吸引効果を発生させることでdienophileが活性化され、DA反応が加速されるメカニズムが提案されている¹¹。Fsa2とPhm7の場合では、MDシミュレーションによってFsa2はN346と、Phm7はK356とdienophile近傍のカルボニル酸素が相互作用していると予測され、これらアミノ酸残基がdienophileを活性化させると考えられた。しかしながら、Phm7では、K356Aの活性は大きく低下しているものの、その他の残基のAla置換体の活性よりも残存しており、dienophile活性化への寄与は少ないと考えられ、dienophileを活性化するアミノ酸残基は存在しない、もしくはその他のアミノ酸残基が担っていることが考えられた。これらの結果から、Fsa2やPhm7などのFsa2ファミリーとしての機能は、「基質のフォールディングと特定の遷移状態構造への誘導」が主であると考えられた。

最後に、今まで立体構造が明らかにされてきたDAaseの一部では、SAM依存性メチル基転移酵素ファミリーやBaeyer-Villigerモノオキシゲナーゼファミリーのフォールドを持っており、進化の過程で本来の酵素ファミリーの機能とは異なる機能を獲得したと考えられる。そのため、それらDAaseの機能予測は難しく、独立した酵素として発見されることが多かった。一方で、今回明らかにしたDSの立体構造は今まで確認されたこのとのないフォールドであり、2つのドメイン間で酵素反応を触媒していることが明らかとなった。加えて、Fsa2と相同性を示すFsa2ファミリーは、データベース上で多くの相同性を持つタンパク質が見つかっている。これらのことから、Fsa2ファミリーは分子進化上の早期の段階でDAaseとしての機能を獲得し、巨大なファミリーとして進化してきたタンパク質群の1つであると考えられる。また、現在機能が明らかにされているFsa2ファミリーの中には、Fsa2やPhm7とは異なる立体化学を選択的に生み出す分子種も見つかっている。そのため、Fsa2ファミリーはDAaseとして機能を獲得しただけでなく、DSとしても進化してきたと考えられる。この新たなフォールドは今後別の機能未知の酵素の機能を探る上での重要な手がかりになると考えられる他、*de novo*デザインによる新しい機能を持ったタンパク質の創出の鍵になると期待される。

実験手法

1-6. Fsa2とPhm7の発現

Fsa2とPhm7の遺伝子は、それぞれ*Fusarium* sp. FN080326株と*Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058株のゲノムDNAの*fsa2*および*phm7*のORFを鋳型としたPCRによって増幅された。増幅されたDNA断片はまずpGET T-easyベクターに挿入され、PCRによって変異が導入されていないか確認をした。増幅した配列に問題がなかったため、NdeIとXhoIによって消化されたpET28b(+)ベクターとライゲーションを行い、N末端側にHisタグを付加したFsa2とPhm7の発現ベクターを構築した。構築した発現ベクターは摂南大学農学部の加藤直樹准教授から提供してもらった。Phm7にはHisタグと酵素の間にthrombin認識配列を挿入した。どちらの酵素も発現条件は同じであった。Fsa2もしくはPhm7の発現ベクターpET28bを使ってヒートショック法により*E. coli* BL21(DE3) star株を形質転換した。形質転換体は25 µg/mL kanamycin (Kana)を添加したLB寒天培地で37°C一晩培養した。翌日に得られたコロニー一つを、25 µg/mL Kanaを含む30mLのLB培地が入った100 mLフラスコに入れ、37°C一晩培養した。得られた前培養液を、500 mLフラスコ中に入った25 µg/mL Kanaを含む100 mL TBに対し、100倍希釈で加え、37°Cで振とう培養した。OD₆₀₀が0.5に達したら0.5 mM isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、18°Cで24 h振とう培養した。その後、培養液を4°C、6,640gの条件で遠心分離し、上清を破棄して菌体を回収した。

Selenomethionine (SeMet) 誘導型Phm7 (SeMet-Phm7)の発現では、Phm7発現用ベクターのpET28bを使ってヒートショック法によりmethionine要求株の*E. coli* B834(DE3)株を形質転換した。形質転換体は25 µg/mL Kanaを添加したLB寒天培地で37°C一晩培養した。翌日に得られたコロニー一つを、25 µg/mL Kanaを含む10mLのLB培地が入った試験管に接種し、37°Cで培養した。培養液のOD₆₀₀が0.5を超えたら、25 µg/mL Kanaと125 µg/mL SeMetを添加した100 mLのOvernight Express™ Autoinduction System 2 (Merck) を含む500 mLフラスコに50倍希釈となるように接種し、18°Cで4日間振とう培養した。培養した菌体はPhm7と同様の操作を行って回収し、-80°Cで保存した。

1-7. Fsa2とPhm7精製

Fsa2を発現させた菌体をbuffer A (50 mM Tris-HCl pH7.5、200 mM NaCl、10 %(v/v) glycerol) で懸濁し、0.5 mg/mL lysozymeと微量のDNaseIを添加して超音波破碎をした。その後、38,900 g、4°Cで30 min遠心分離して上清を回収した。さらに上清の遠心分離と回収2回繰り返し、十分に粒子を除去した。得られた上清はHis-acceptカラムにアプライし5 mM imidazoleと0.2 %(v/v) Tween20を添加したbuffer Aでカラムの洗浄をした。その後、200 mM imidazoleを添加したbuffer Aで酵素を溶出させた。次に、buffer B1 (50 mM Tris-

HCl pH8.0、10 % (v/v) glycerol、1.0 mM DTT) で酵素溶液を10倍希釈し、HiTrapQカラムにアプライして酵素を吸着させた。その後、buffer B1 とbuffer B2 (50 mM Tris-HCl pH8.0、10 % (v/v) glycerol、1.0 mM DTT、0.50 M NaCl) のグラジエントで溶出を行い、最後にbuffer AでSuperdex75 16/600カラムを用いてゲルろ過を行うことで精製した。精製したサンプルはAmicon Ultra15を用いてbuffer C (50 mM Tris-HCl pH7.5、200 mM NaCl、5.0 mM DTT) に置換し、終濃度30 mg/mLに調製して-80°Cで保存した。

Phm7を発現させた菌体はbuffer D (50 mM Tris-HCl pH7.5、500 mM NaCl、10 % (v/v) glycerol)で懸濁させ、Fsa2と同様に破碎と遠心分離を行なった。得られた上清はNi-NTA agaroseカラムにアプライし、5 mM imidazoleと0.2 % (v/v) Tween20を添加したbuffer Dでカラムの第一洗浄をした。その後、第2洗浄を30 mM のimidazoleが添加されたbuffer Dで行った。最後に200 mM imidazoleが添加されたbuffer Dで酵素を溶出した。溶出した酵素は体積が10 mLになるまでAmicon Ultra15で濃縮を行った。その後、サンプル濃度をnano dropのprotein280のモードで測定し、総タンパク質1 mgに対してthrombineを0.5 U添加した。これをセロハンバッグに入れてbuffer E (50 mM Tris-HCl pH7.5、200 mM NaCl、10 % (v/v) glycerol、20 mM imidazole) を用いて一晩4°C条件下で透析を行った。その後、サンプルをNi-NTA agaroseカラムとBenzamidine sepharose 6Bカラムに順に通して未切断の酵素とthrombinの除去を行った。次にResourceQカラムに酵素を吸着させた後、buffer B1とbuffer B2のグラジエントで酵素の溶出を行い、最後にSuperdex75 16/600カラムを用いてゲルろ過を行うことで精製した。精製後は Amicon Ultra15を用いてbuffer Cに置換し、終濃度14 mg/mLに調製して-80°Cで保存した。SeMet-Phm7の精製はPhm7と同様の操作を行った。

1-8. Fsa2とPhm7の結晶化

Fsa2及びPhm7の結晶化は全て、酵素溶液とリザーバー溶液を1 μ L : 1 μ Lで混合し、sitting drop蒸気拡散法を用いて20°Cで結晶化を行なった。野生型Phm7とSeMet誘導型Phm7の結晶化は同様の手法で行なった。Fsa2は30 mg/mL 酵素溶液とリザーバー溶液A (0.10 M Bis-Tris-HCl pH7.0、26-29 % (w/v) PEG3,350) を混合し、3-5日程度で結晶化した。Phm7は14 mg/mL の酵素溶液とリザーバーB (0.10 M Tris-HCl pH7.0、1.56-1.59 M ammonium sulfate (AmSO₄)、16-19 % (v/v) glycerol) を混合し、2週間程度で結晶化した。しかし、回折実験に利用できる程度の良質かつ大きい結晶の析出には2-6ヶ月程度のインキュベーションが必要だった。

化合物5結合型Phm7の結晶は、リガンドフリーのPhm7の結晶を、化合物5が高濃度に含まれた溶液へソーキングすることで調製した。ソーキングは20 mM Tris-HCl pH7.0、50

mM NaCl、1.6 M AmSO₄、10 %(v/v) glycerol、10 mM 化合物**5**、10 %(v/v) ethanol、10 %(v/v) DMSOを含む溶液で、4°Cで1 h処理を行なった。

1-9. Fsa2とPhm7の回折データの収集、構造決定

全ての結晶はクライオプロテクトで処理した後に、100 Kの窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存した。

Fsa2の結晶は浸透圧に対して非常に壊れやすい結晶で、様々な組成のクライオプロテクトで処理を試したが、回折実験に用いることができる結晶を調製することは困難だった。回折実験に用いることができる結晶を調製するための手段として、結晶を拾ったループ上での乾燥を試みた。乾燥時間を検討した結果、結晶を拾って凍結するまでに、8秒から15秒間乾燥させることで、非晶性の状態で凍結させることができた。リガンドフリーPhm7の結晶は0.10 M Tris-HCl pH7.0、2.0 M AmSO₄、25 %(v/v) glycerol、0.10 M NaClを含む溶液で処理し、化合物**5**結合型Phm7の結晶は50 mM Tris-HCl pH7.0、2.0 M AmSO₄、20 %(v/v) glycerol、2.5 mM 化合物**5**、7.5 %(v/v) ethanol、2.5 %(v/v) DMSOで処理した後に凍結した。Phm7結晶のクライオプロテクト処理は、凍結する直前の数秒だけ実施した。

回折データの収集はSPring-8のビームライン (BL) BL26B1、BL32XU、BL41XUを利用し、100 Kの窒素ガス気流下で実施した。回折データのintegrationとscalingにはXDS¹⁴パッケージもしくはCCP4パッケージのpointless¹⁵、及びaimless¹⁵を使用した。Phm7の初期位相は、SeMet誘導型Phm7の結晶を用い、Se原子の吸収端近傍である波長0.97920 ÅのX線を用いてデータセットを取得し、単波長異常分散 (SAD) 法を利用することで決定した。Se原子位置の探索、位相の計算、位相の改良および自動モデル構築はPHENIXパッケージのAutoSol¹⁶を用いた。初期位相を決定した結果、Phm7は非対称単位中に3分子存在しており、全1158残基中841残基のモデルを置くことができ、内42.5%は側鎖のモデルを置くことができた。その後、Coot¹⁸を使って手動でモデルを構築し、CCP4パッケージのRefmac5¹⁷とPhenixパッケージのPhenix Refine¹⁹を使って構造精密化を行うことで、SeMet誘導型Phm7のモデルを構築した。アポ型Phm7、化合物**5**結合型Phm7、及びアポ型Fsa2の位相は、SeMet誘導型Phm7の構造をサーチモデルとし、CCP4パッケージのphaserMR²⁰で分子置換法 (MR法) 用いることにより決定した。これらモデルの構築は全てCootで行い、CCP4パッケージのRefmac5とPhenixパッケージのPhenix Refineで構造精密化を行った。化合物**5**の分子モデルはChem3Dで作成・精密化を行い、PhenixパッケージのeLBOW²¹で最終的なリガンドファイルを作成した。最終的に決定した構造の統計データは1-7-6項の直後に載せた表1-1にまとめた。 R 値は $R_{\text{factor}} = \sum |F_{\text{obs}}(\text{hkl}) - F_{\text{calc}}(\text{hkl})| / \sum F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ で算出し、 R_{free} 値

は構造精密化に使用していない全反射の5%を用いて計算した。化合物**5**のsimulated annealing omit map ($F_o - F_c$) はPhenixパッケージのPolder map²²で計算した。

1-10. Fsa2とPhm7の基質のドッキングシミュレーション

リガンドモデルの作製はChem3D (ver.16.0) で行い、構造精密化はChem3DパッケージのMolecular Mechanics (MM) 2計算法で行った。Fsa2とPhm7の基質は直接同定されていない。そのため、Fsa2はequisetinの半合成を達成した先行研究で、実際にFsa2が基質として認識する分子をリガンドとし、Phm7が存在する時にのみ生成する環化物から予測される基質をリガンドとした。各リガンドについては、DA反応による環化が起こらないポリエン領域の平面構造を保つために、AutoDockTools (ver.1.5.6)²³ で制限を設けた。レセプターとなる酵素モデルには水素原子を付加し、Fsa2は結晶構造でdisorderしていたW216をフレキシブル設定に、Phm7はdisorderしていたW223とポケット内部の中央に伸びたE83とK356をフレキシブル設定にした。Fsa2とPhm7は非対称単位中それぞれ8分子と3分子存在していたため、これら全ての分子を対象にAutoDockTools (ver.1.5.6) でドッキングシミュレーションは実施した。探索強度は100から200の設定で行い、ポケットの溶媒側に露出しているFsa2のW216及びPhm7のW223の側鎖が十分にカバーできる程度のグリッドボックスを設定した。

1-11. Fsa2とPhm7の生成物の生産活性の測定

Fsa2及びPhm7の全ての変異体は、結晶化に用いたFsa2遺伝子もしくはPhm7遺伝子を鋳型にし、overlap extension PCR法によって作製した。酵素サンプルの調製は結晶化用のサンプル調製法と同じだが、精製はNi担体を用いたステップで終了した。Phm7の変異体は全て、thrombin処理を行っていない。

CYA培地を含んだK1中でPhm7欠損型*Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058株を浸透培養し、3日後にろ紙を使って菌体と培養液を分離し、液体窒素で凍結させた。凍結した菌体は、液体窒素下で乳鉢と乳棒を用いて物理的に破碎した。菌体破碎粉末を液体窒素でよく冷やした薬さじ (すり切れ1杯がおおよそ100 μ L程度の容量) で1杯とり、抽出buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5、10 mM NaCl、10 mM EDTA、1.0 % (v/v) Tween20、200 μ M sinefungin、20 μ g/mL tetracyclin) を260 μ L加えて1 minボルテックスして懸濁した。sinefunginはPhm7の触媒によって生成した環化物を基質とする*S*-アデノシルメチオニン依存性メチル基転移酵素の酵素活性を阻害するために添加した。tetracyclinは反応系に関与しない内部標準物質として添加した。懸濁液を15°C、140,000 rpmで5 min遠心分離し、上清を回収した。回収した上清は不均一に濁っていたため、軽くボルテックスして均一にし、これを基質溶液と

した。基質溶液は氷上で静置し、用事調製をした。あらかじめ濃度を調製しておいた酵素溶液を10 μL と基質溶液30 μL を混合して1秒ボルテックスし、25 $^{\circ}\text{C}$ 下で酵素反応を行なった。尚、Phm7とその変異体では10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Fsa2とその変異体では1.0 mg/mL の酵素溶液を使用し、酵素反応はPhm7では8 min、Fsa2では1 hで実施した。その後、直ちに80 μL の acetonitrile (MeCN) を添加してボルテックスをし、液体窒素で凍結して酵素反応を停止した。凍結させたサンプルは分析まで-80 $^{\circ}\text{C}$ で保管した。

次に凍結したサンプルを15 $^{\circ}\text{C}$ で5 minインキュベートし、140,000 rpmで5 min遠心分離を行い、上清をフィルター処理してUPLC用バイアルにアプライした。分析はAcquity UPLC (Waters) とBEH C18カラム; 2.1 x 100 mm, 1.7 mm (Waters) を用いて行い、A溶液 (0.05 % (v/v) formate-水溶液) とB溶液 (0.05 % (v/v) formate-MeCN溶液) のグラジエント溶出で化合物を分離した。溶出プログラムは5 % B溶液を1 min、5-60 % B溶液のグラジエントを1 min、60-100 % B溶液のグラジエントを4 min、100 % B溶液のグラジエントを6 minで行い、化合物の検出はフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器でモニターし、360 nmのピークエリアで分析サンプルの正規化を行った。

表1-1 Phm7およびFsa2の結晶構造解析に用いた各データの結晶学的統計値

	Phm7		Fsa2
	SeMet derivative	Inhibitor 5-bond form	
Data Collection			
Beam source	BL41XU (Spring-8)	BL32XU (Spring-8)	BL32XU (Spring-8)
Wavelength (Å)	0.979200	1.000000	0.979400
Resolution range (Å)	49.42 - 2.17 (2.25 - 2.17)	45.18 - 1.61 (1.67 - 1.61)	44.64 - 2.17 (2.25 - 2.17)
Space group	C2	C2	P2 ₁
Unit cell parameters			
a, b, c (Å)	a = 91.30, b = 151.71, c = 99.69	a = 91.05, b = 149.88, c = 99.27	a = 133.93, b = 80.23, c = 135.16
α, β, γ (°)	$\alpha = \gamma = 90, \beta = 97.501$	$\alpha = \gamma = 90, \beta = 97.12$	$\alpha = \gamma = 90, \beta = 108.53$
Total reflections	952909 (92401)	583338 (59434)	496700 (49137)
Unique reflections	70874 (7022)	167533 (16704)	141327 (13856)
Multiplicity	13.4 (13.2)	3.5 (3.6)	3.5 (3.5)
Completeness (%)	99.97 (99.99)	99.76 (99.80)	97.61 (96.96)
Mean I / σ (I)	12.06 (2.66)	6.90 (1.58)	8.48 (2.60)
Wilson B-factor	24.76	20.29	29.05
R _{merge} (%)	0.179 (0.906)	0.107 (0.651)	0.109 (0.533)
R _{meas} (%)	0.185 (0.943)	0.126 (0.769)	0.129 (0.629)
CC _{1/2}	0.997 (0.832)	0.988 (0.674)	0.998 (0.780)
Refinement			
Number of reflections	167510 (16704)	169780 (16956)	140531 (13855)
R _{work} / R _{free}	0.1894 / 0.2215	0.1949 / 0.2163	0.1798 / 0.2352
Number of atoms			
Protein	8647	8467	22909
compound 3	-	84	-
Water	820	792	50
Other ligand / ion	176	108	1226
RMSD			
Bond lengths (Å)	0.014	0.015	0.004
Bond angles (°)	1.26	1.94	0.70
Average B-factor			
Protein	25.22	27.00	31.15
Inhibitor 3	-	34.40	-
Water	34.42	36.33	31.54
Other ligand / ion	48.00	45.25	35.98

※ Other molecules were containing sulfate ion, glycerol, and polyethylene glycol molecules.

参考文献

- 1 Li, G., Kusari, S. & Spiteller, M. Natural products containing 'decalin' motif in microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 1175-1201, (2014).
- 2 Li, L. *et al.* Biochemical Characterization of a Eukaryotic Decalin-Forming Diels-Alderase. *Journal of the American Chemical Society* **138**, 15837-15840, (2016).
- 3 Tan, D. *et al.* Genome-Mined Diels-Alderase Catalyzes Formation of the cis-Octahydrodecalins of Varicidin A and B. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 769-773, (2019).
- 4 Zhang, Z. *et al.* Enzyme-Catalyzed Inverse-Electron Demand Diels-Alder Reaction in the Biosynthesis of Antifungal Ilicicolin H. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 5659-5663, (2019).
- 5 Kato, N. *et al.* A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **460**, 210-215, (2015).
- 6 Kato, N. *et al.* Control of the Stereochemical Course of [4+2] Cycloaddition during trans-Decalin Formation by Fsa2-Family Enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 9754-9758, (2018).
- 7 Fage, C. D. *et al.* The structure of SpnF, a standalone enzyme that catalyzes [4+2] cycloaddition. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 256+, (2015).
- 8 Zheng, Q. F. *et al.* Structural Insights into a Flavin-Dependent [4+2] Cyclase that Catalyzes trans-Decalin Formation in Pyrroindomycin Biosynthesis. *Cell Chem. Biol.* **25**, 718+, (2018).
- 9 Cogan, D. P. *et al.* Structural insights into enzymatic [4+2] aza-cycloaddition in thiopeptide antibiotic biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 12928-12933, (2017).
- 10 Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I. & Wu, S. Y. β -lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *Int. Dairy J.* **8**, 65-72, (1998).
- 11 Kim, K. W. *et al.* Trimeric Structure of (+)-Pinoresinol-forming Dirigent Protein at 1.95 angstrom Resolution with Three Isolated Active Sites. *J. Biol. Chem.* **290**, 1308-1318, (2015).
- 12 Zheng, Q. F. *et al.* Enzyme-Dependent [4+2] Cycloaddition Depends on Lid-like Interaction of the N-Terminal Sequence with the Catalytic Core in PyrI4. *Cell Chem. Biol.* **23**, 352-360, (2016).
- 13 Li, X. J., Zheng, Q. F., Yin, J., Liu, W. & Gao, S. H. Chemo-enzymatic synthesis of

- equisetin. *Chem. Commun.* **53**, 4695-4697, (2017).
- 14 Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D* **66**, 125-132, (2010).
- 15 Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D* **69**, 1204-1214, (2013).
- 16 Terwilliger, T. C. *et al.* Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. D* **65**, 582-601, (2009).
- 17 Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D* **67**, 355-367, (2011).
- 18 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486-501, (2010).
- 19 Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D* **68**, 352-367, (2012).
- 20 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674, (2007).
- 21 Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. D* **65**, 1074-1080, (2009).
- 22 Liebschner, D. *et al.* Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent. *Acta Crystallogr. D* **73**, 148-157, (2017).
- 23 Trott, O. & Olson, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461, (2010).

2章 BR生成の鍵反応を担うCYP90B1の結晶構造解析

緒言

2-1. BR生成の初発かつ律速段階を担うCYP90B1が触媒する水酸化反応

序章で述べた通り、BRの生合成では、高活性型のBRであるBLが生産されるまでのほとんどのステップをP450が担っている^{1,2}。BRの生合成に関わるCYP90A1、CYP90B1、CYP90C1、CYP90D1、CYP85A1、及びCYP85A2によって添加される酸素原子はBLが受容体のBRI1に認識されるために必須であるとともに、生合成の過程に関わる酵素の基質特異性にも関わるため、どのP450も欠かすことのできない酵素である^{3,5} (図2-1)。これらBR生合成に関わるP450の1つであるCYP90B1は、植物ステロールの一つであるCRのC22位を水酸化して、(22 β)-OH CRを立体選択的に生成する反応を触媒する。この反応はBR生合成経路の初発段階であるとともに、BR生合成の律速段階としても知られている^{6,7}。そのため、CYP90B1はBR生合成の鍵酵素として広く認識されており、農薬の標的酵素の一つとして考えられている (図2-2)。実際、CYP90B1を特異的に阻害するブラシナゾール (BRZ) は、植物の身長成長を制御する薬剤として利用されており、主に研究分野でBRのシグナル伝達の研究に多く用いられてきた⁸。これらのことから、CYP90B1が触媒する立体選択的な水酸化は、極微量で強力に生理活性を示すBRの生産量を制御する植物生理学的に重要な役割を担っている酵素である。

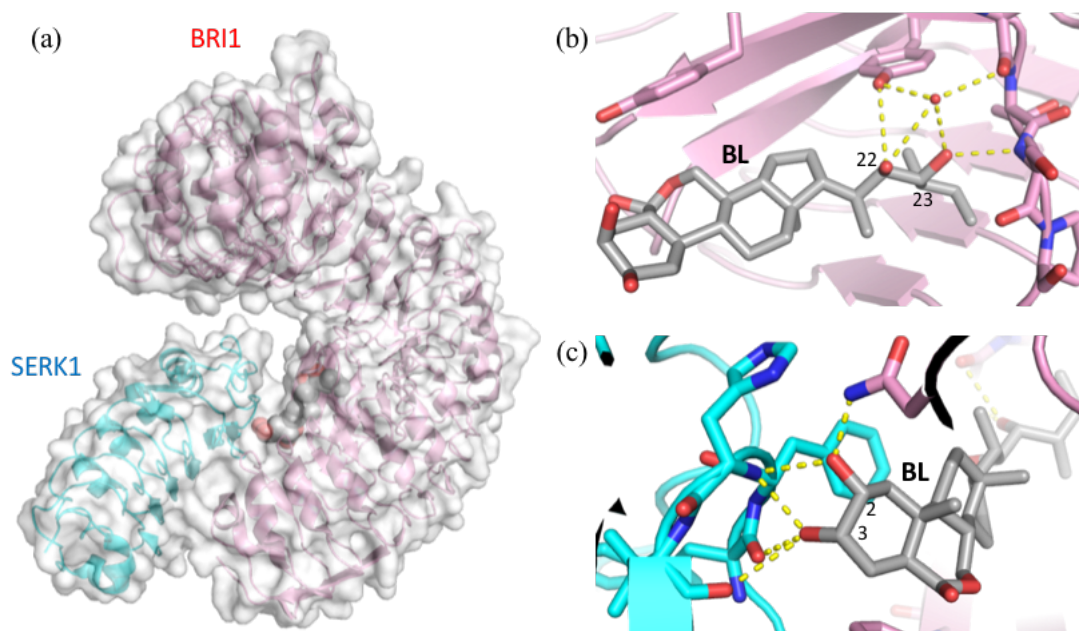


図2-1 BR受容体BRI1の細胞外ドメイン、共受容体キナーゼSERK1細胞外ドメイン、及びBLの三者複合体の結晶構造 (PDB ID: 4LSX)

(a) 3者複合体の全体構造。ピンクがBRI1の細胞外ドメイン、シアンがSERK1細胞外ドメイン、及び2者の中に存在する球体モデルがBLを示している。(b) BLとBRI1との相互作用を示しており、BRI1との結合にはC22位とC23位の水酸基が必須となる。(c) SERK1とBLの相互作用を示しており、C2位及びC3位は共受容体との相互作用に必要な置換基であることが

明らかになっている。

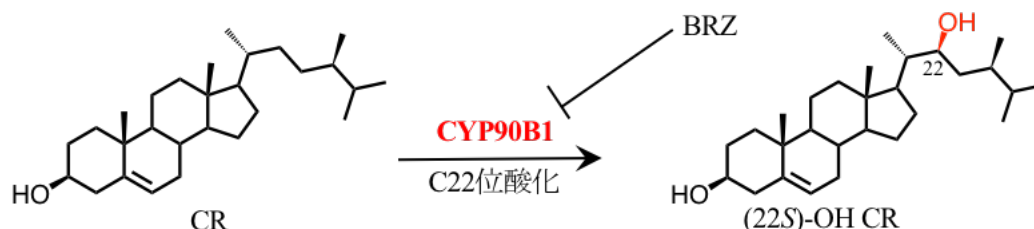


図2-2 CYP90B1が触媒するBR合成の初発段階の水酸化反応

CYP90B1はCRのC22位を立体選択的に水酸化し、(22*S*)-OH CRを生成する。BRZはこの反応を阻害する。

CYP90B1の酵素学的な詳細は2006年に水谷らによって調べられており、CYP90B1はCRの他に、コレステロール (CHR) とシトステロール (SIT) のC22位を水酸化することが明らかとなっている⁶。興味深いことに、一般的な植物での内生量が少ないCHRが高い親和性を示し、次いで内生量の多いCRが中程度の親和性を、最も内生量の多いSITが低い親和性を示す結果が得られている。また、生体内に多く含まれているCRとSITを基質とした場合は立体選択的に22*S*水酸化物を生成するが、CHRと基質とした場合は立体選択性を失い、副生成物の22*R*水酸化物を与える (図2-3)。このことから、植物は内生量、CYP90B1と基質の親和性、及び水酸化の立体選択性の中でもっとも「適当」であるCRをBRの前駆体として利用していると考えられる。しかしながら、CYP90B1がどのようにCHRとCRの違いを認識し、位置・立体選択的な水酸化を行なっているかについては明らかになっておらず、植物由来ミクロソーム型P450の立体構造が明らかにされた例が非常に少ないことから、基質の結合様式を予測することも困難であった。

そこで本研究では、天然物を生合成する修飾酵素の1つとして、植物生理学的に重要な酵素であるCYP90B1の立体構造を明らかにすることにより、CYP90B1が触媒する位置・立体選択的な水酸化反応のメカニズム、及び立体構造をもとにデザインされた新規BR生合成阻害剤の設計に必要な構造基盤を解明することを目的とした。

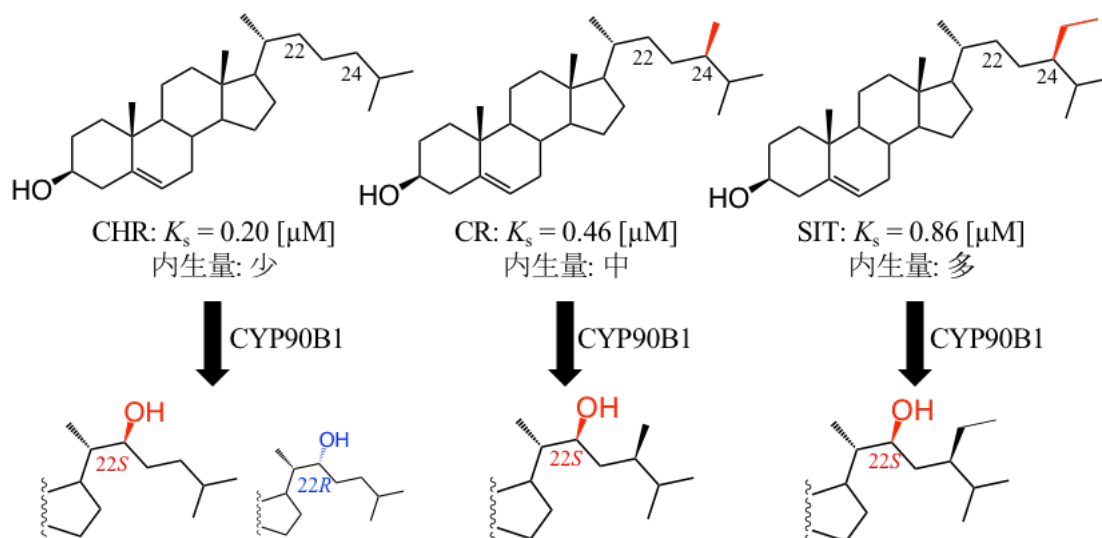


図2-3 植物体内に含まれるステロール化合物とその内生量の関係

K_s は基質の結合に伴うType-Iスペクトル変化から算出したCYP90B1に対する解離定数。CYP90B1によって水酸化されたそれぞれの基質は、CHRでのみ、副生成物として22R水酸化物を生成する。

結果・考察

2-2. CYP90B1の結晶構造

本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナ由来CYP90B1を研究対象とした。CYP90B1はN末端側の28残基までが1回膜貫通ヘリックス構造を持つ膜アンカードメイン領域と推定されていた。一般的に、膜タンパク質は水溶液中への溶解度が低く、界面活性剤を必要とするなどの工夫が必要であり、水溶性のタンパク質と比較すると取り扱いが困難である。そのため、CYP90B1を可溶性酵素として取り扱うために、F2からL28残基目までを欠損させた変異型CYP90B1 (d28-CYP90B1) をデザインした (図2-4)。このd28-CYP90B1に対して、ジベレリン生合成阻害剤として知られるウニコナゾール (UCZ) を用いることで、UCZ結合型CYP90B1の結晶構造を決定した。また、UCZ結合型から明らかになったdisorder領域を欠損させた変異体 (d28-H1) を用いることで、BRZ結合型、CHR結合型、及び1,6-ヘキサンジオール (HDO) 結合型CYP90B1の結晶構造を決定した (図2-5)。

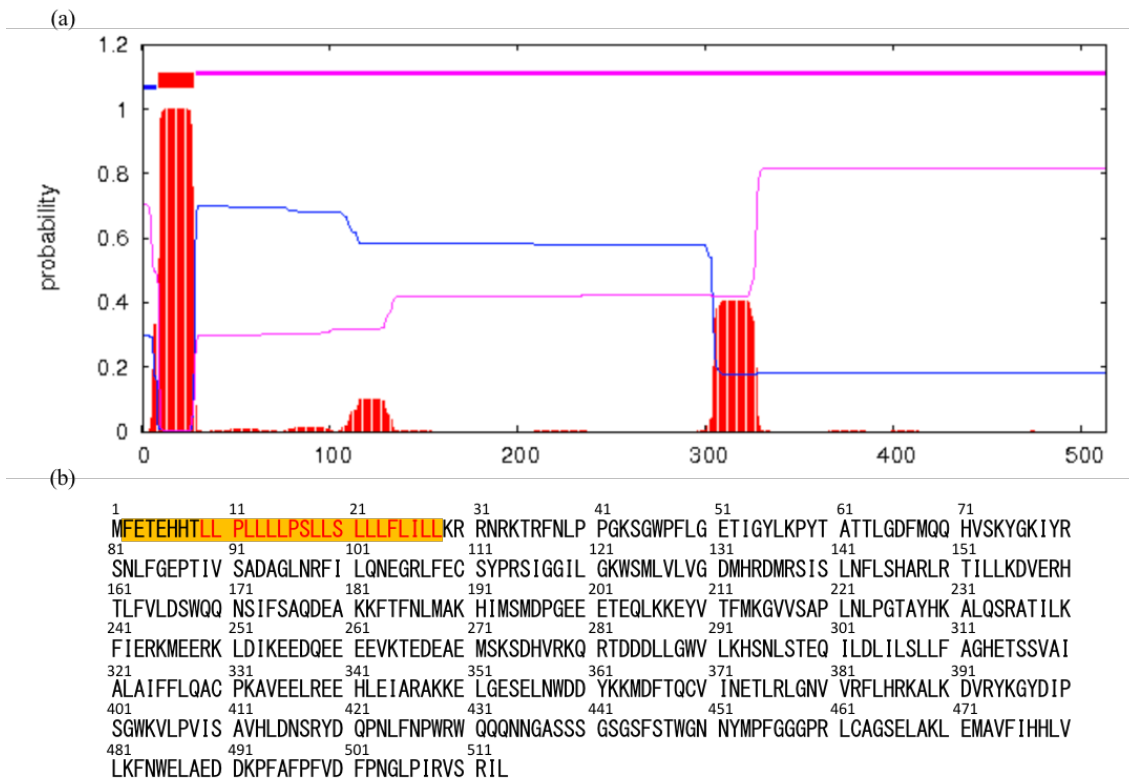


図2-4 CYP90B1の膜アンカードメインの予測と欠損変異体のデザイン

(a) 膜貫通領域予測サーバーTMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) による膜アンカードメイン領域の予測結果。膜貫通領域と予測される領域は赤のバーで示され、青線の領域はタンパク質が細胞質側へ露出することを、マゼンタの線は細胞質外側への露出が予測されることを示している。(b) シロイヌナズナ由来CYP90B1の一次構造。赤文字がTMHMMで予測された膜貫通領域であり、黄色のマーカ部分は欠損させた領域を示す。

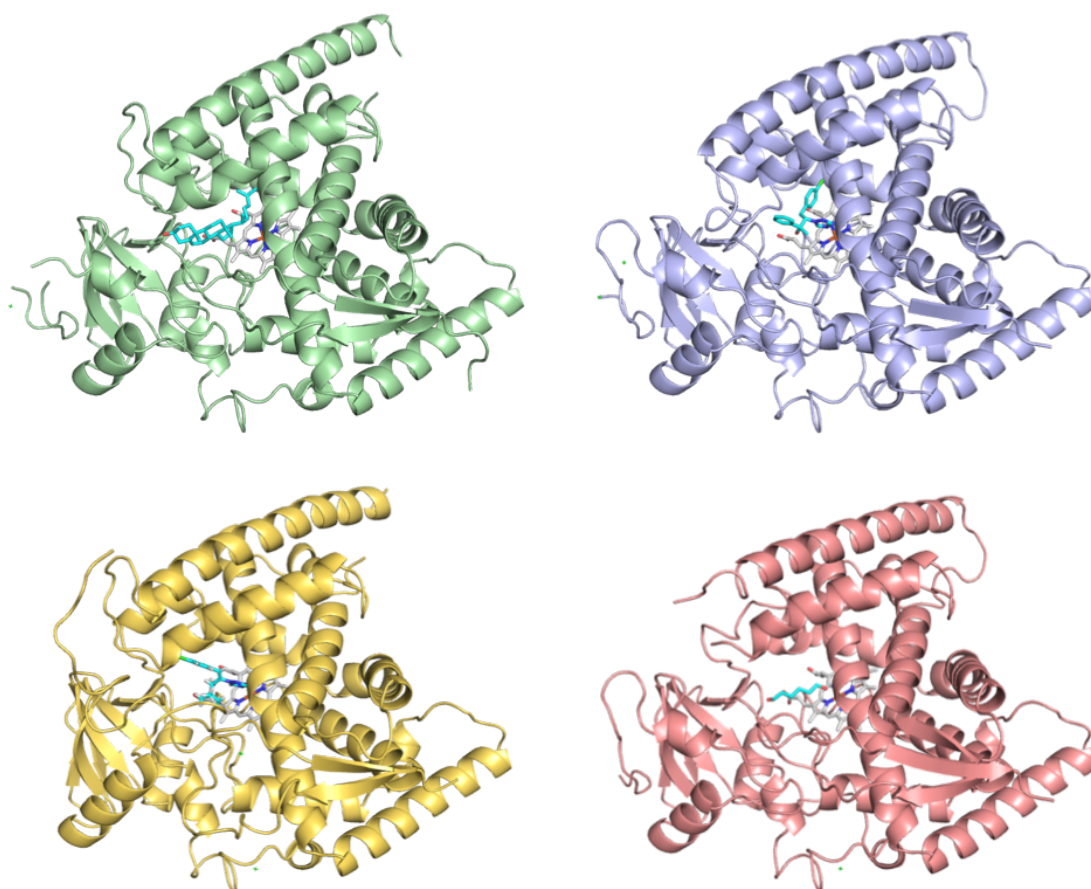


図2-5 各種リガンドが結合したCYP90B1の全体構造

緑はCHR結合型、青はBRZ結合型、黄はUCZ結合型、赤はHDO結合型を示している。

決定したCYP90B1の全体構造は、一般的なP450に見られる三角プリズム型構造をとっていた。また、今までに確認されているP450の立体構造と同様に、 β シート構造に富む β ドメイン領域と α ヘリックス領域に富む触媒領域から構築されていた。今までに植物由来膜結合型P450の解析例は非常に少なく、CYP90B1以外ではtanshinones生合成に関わるCYP76AH1の1例しか報告されていない⁹。本研究でCYP90B1の立体構造を明らかにしたことにより、CYP90B1はこれまでに報告されているP450と同様に、構造的特徴が保存されている典型的なP450フォールドを持つことが明らかとなった。また、各種結晶構造はどれも高い分解能で決定することができたため、それぞれのリガンドの結合コンフォメーションを鮮明に捉えることができた。(図2-6)。

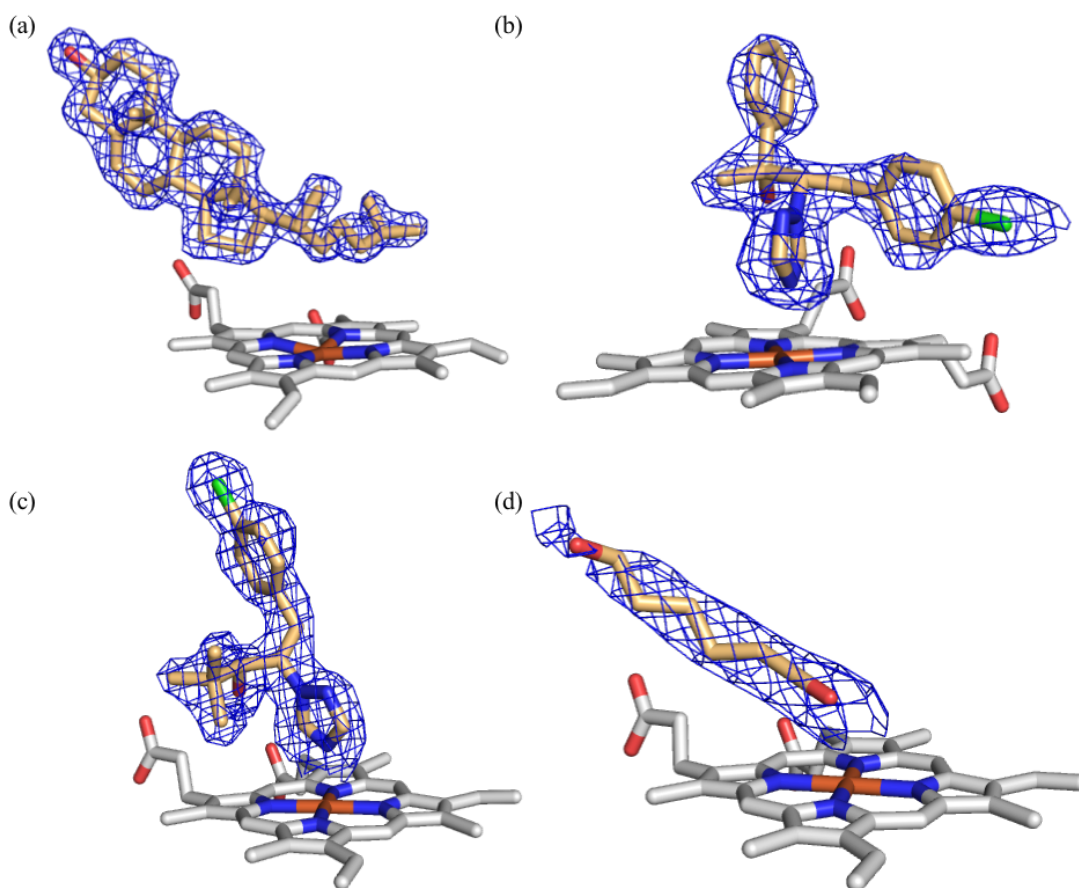


図2-6 各種リガンドの $F_o - F_c$ 電子密度マップ (simulated annealing omit map)

青いメッシュはマップを示しており、マップレベルは 3.0σ で表示している。(a) はCHR、(b) はBRZ、(c) はUCZ、(d) はHDOを示している。

2-3. 基質の結合様式

先行研究⁶により、CYP90B1はCHR、CR、SITの3種の基質として認識し、C22位を水酸化することが知られているが、一般的に植物体内ではCHRの含有量が少ないことや、BLの前駆体はCRであることから、植物体内におけるCYP90B1の真の基質はCRとされている。一方で、*in vitro*におけるCYP90B1に対する解離定数 K_d は、CHR、CR、SITの順に低いことが明らかにされており⁶、結晶構造解析をする上ではCHRが最も都合の良い基質であると推察された。実際、本研究では、CHRを基質として利用することで、CYP90B1質結合型CYP90B1の結晶構造を決定することに成功した。

基質の結合様式を確認すると、CHRは基質ポケット内部を構成する疎水性アミノ酸のTyr112、Leu120、Leu126、Met213、Val216、Phe310、Phe383と疎水的な相互作用をしていた。また、基質の持つ唯一の水酸基はHis385と直接水素結合していた他、水分子を介してVal216の主鎖と水素結合していた。また、CHRは疎水的な基質であるにも関わらず、

複数の水分子がCHRに接する位置でクラスターを形成しており、それら水分子は、基質が結合したポケットの内部に存在する空隙を満たしていた（図2-7）。このことから、CYP90B1の基質ポケットの一部は水分子によって構築されており、基質の結合に適したポケット構造を形成するためには、水分子の存在も重要であることが明らかとなった。

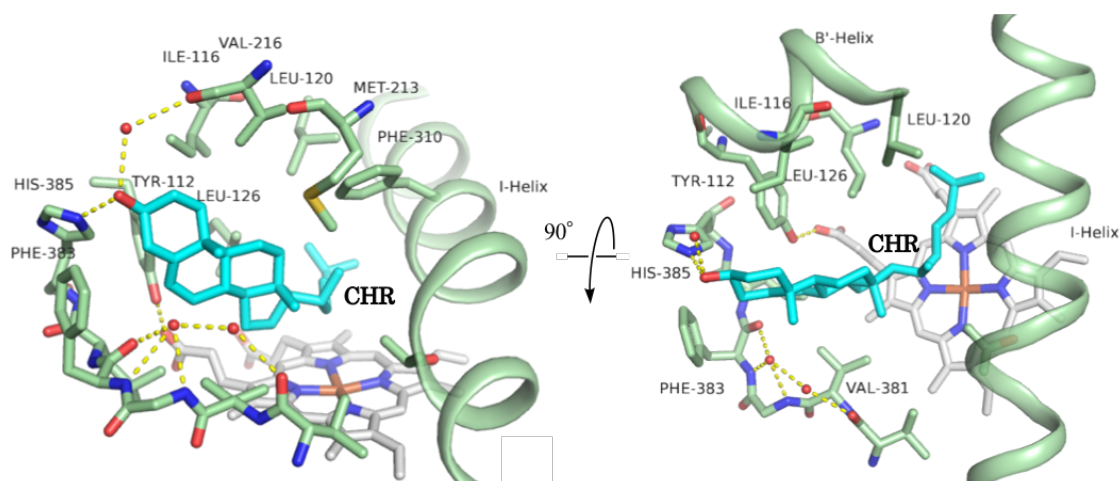


図2-7 CYP90B1に対するCHRの結合様式

CYP90B1の炭素鎖は緑で、CHRの炭素鎖はシアン示している。黄色の破線は水素結合を示している。赤の球体モデルは水分子を示している。

基質結合型の結晶構造から明らかになった相互作用を参考に、基質ポケットを形成する一部のアミノ酸残基についてのAla置換変異体CYP90B1 (Phe383のみF383Vの変異を導入) を作製した。野生型と同等の活性を持つと考えられるd28-CYP90B1変異体と各種Ala変異体の水酸化活性は、基質としてCHRとCRを用い、CYP90B1によって生成されたC22水酸化物の検出量を比較することで評価した。活性測定の結果では、Y112A、L126A、M213A、F383V及びH385Aの変異体で、CHRとCRの両方に対して活性が大幅に低下していることを確認した。結晶構造から、Y112、L126、M213、F383、H385はCHRと直接相互作用をしていたため、これらのアミノ酸残基は基質の結合に重要なアミノ酸残基であると考えられた（図2-8）。一方で、d28-CYP90B1とL126Aを比較すると、CHRを用いた際は検出された主生成物量（(22*S*)-OH CHR）は11.1%であったことに対し、CRを用いた際の検出された生成物量は30.9%で、CRを基質として用いた場合の活性は、CHRを基質として用いた場合の活性よりも低下していなかった。これは、CHRの場合、Leu残基からAla残基への変異はCHRの持つ側鎖との疎水的な相互作用が失われた結果、L126Aの活性が大幅に低下したと考えられる。しかしCRを基質にした場合は、L126A変異によって大きく損なわれるはずの疎水的な相互作用を、CRのC24位のメチル基が少しだけ補い、CHRよりも疎水的な相互作用を形成することができた結果であると考えられる。

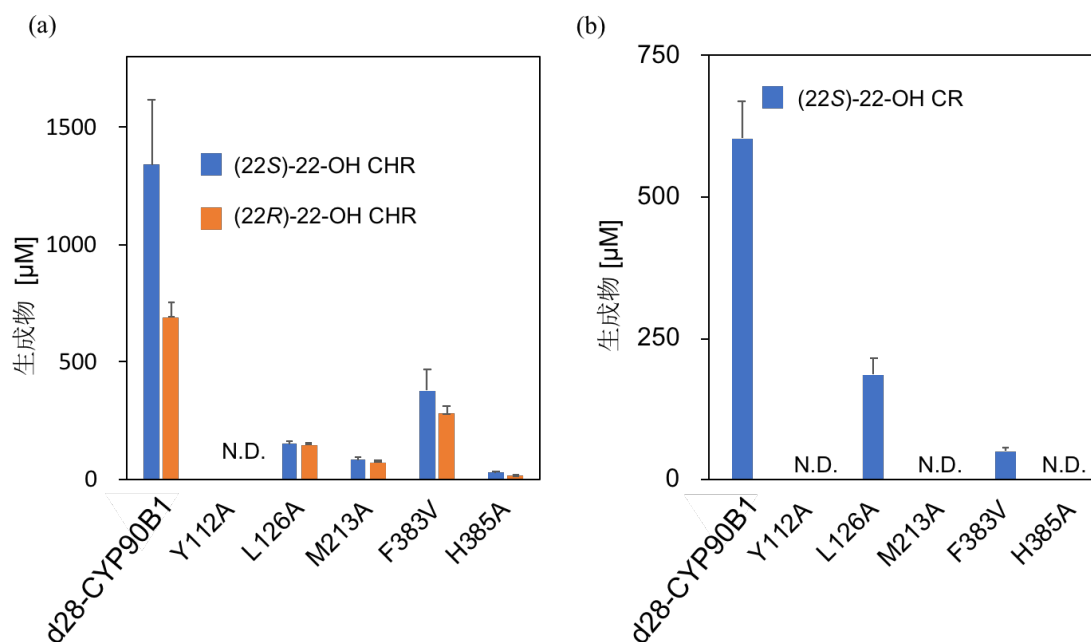


図2-8 CYP90B1の水酸化活性の測定結果

(a) CHRを基質とした際の生成物の検出量を示しており、青は主生成物である22*S*水酸化物 ((22*S*)-22-OH CHR) を、オレンジは副生成物である22*R*水酸化物 ((22*R*)-22-OH CHR) を示している。(b) CRを基質とした場合の生成物の検出量を示している。CRが基質の場合は22*S*水酸化物 ((22*S*)-22-OH CR) を選択的に生成するため、副生成物の22*R*水酸化物は検出していない。

また、変異によって活性が大きく減少したY112、M213、H385については、基質の結合に特に重要であると推測されたため、3種の変異体 (Y112A、M213A、H385A) について、CHR、もしくはCRを滴定することで基質の結合に伴う紫外可視吸収スペクトルの変化を測定し、基質に対する親和性を調べた。滴定実験の結果、活性が大きく失われたY112A、M213A、H385A全ての変異体で、CHR及びCRに対する親和性が大きく失われていることが明らかとなった (表2-1)。特にH385AではY112AやM213Aと比べて、基質の添加に伴う吸収スペクトルの変化がほとんど確認できなかったため、基質がほとんど結合できなかったと考えられる (図2-9および2-10)。H385は基質の持つ唯一の水酸基と水素結合を形成しているアミノ酸残基であるため、CYP90B1が基質と結合するためには、H385と基質の水素結合が非常に重要であることが明らかとなった。また、T112はヘムのプロピオン酸部分と水素結合を形成していたため、Y112Aの活性の低下は、変異による酸化還元電位の変化が影響していると考えられた^{10,11}。しかしながら、滴定実験によってY112Aの活性の低下は基質との結合能が著しく低下していたことが原因であることが明らかとなり、Y112は基質の結合に重要なアミノ酸であることが明らかになった。

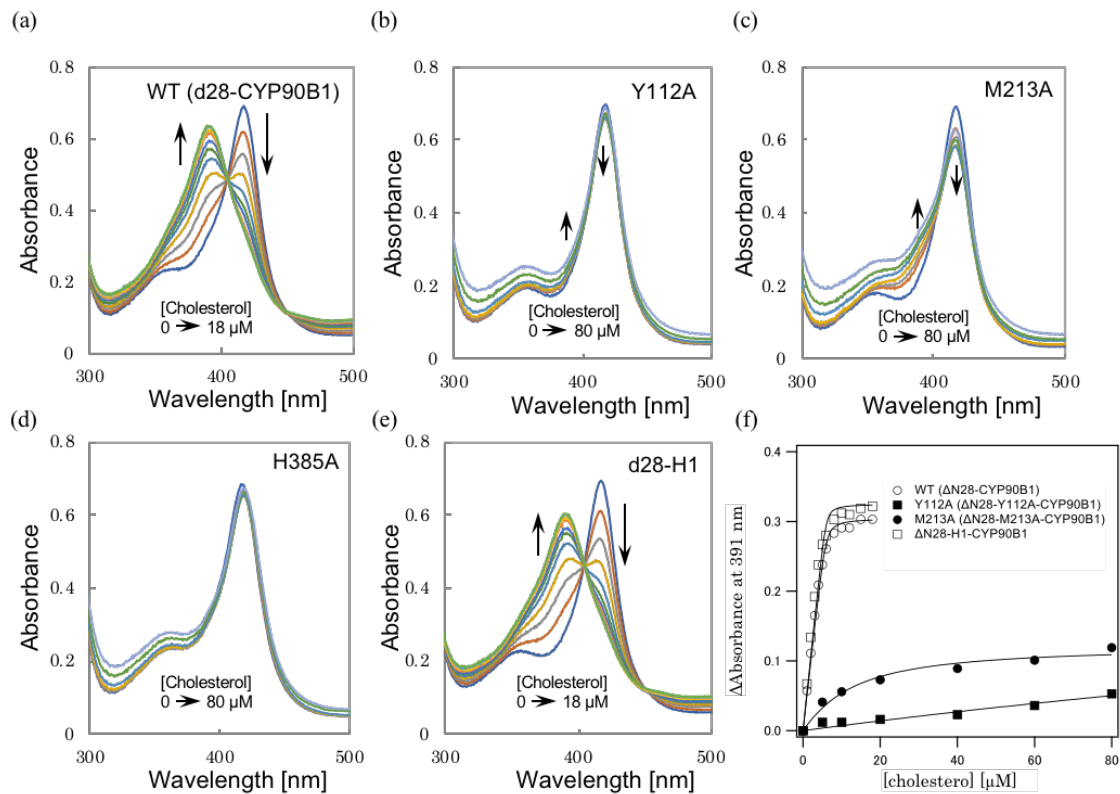


図2-9 CYP90B1の各種変異体に対するCHRの滴定と紫外可視吸収スペクトル変化

それぞれ(a) d28-CYP90B1、(b) Y112A、(c) M213A、(d) H385A、(e) d28-H1に対してCHRを滴定した際の吸収スペクトルの変化を示している。(e) は結晶化に用いた変異体がd28-CYP90B1と同等程度の基質の受容能を持つことを確認するために実施した。(f) (a) から(e) に関して、CHRの添加に伴う391 nmの吸光度の変化をプロットした結果を示している。吸収スペクトルの変化が全く見られなかったH385Aについてはデータを示していない。

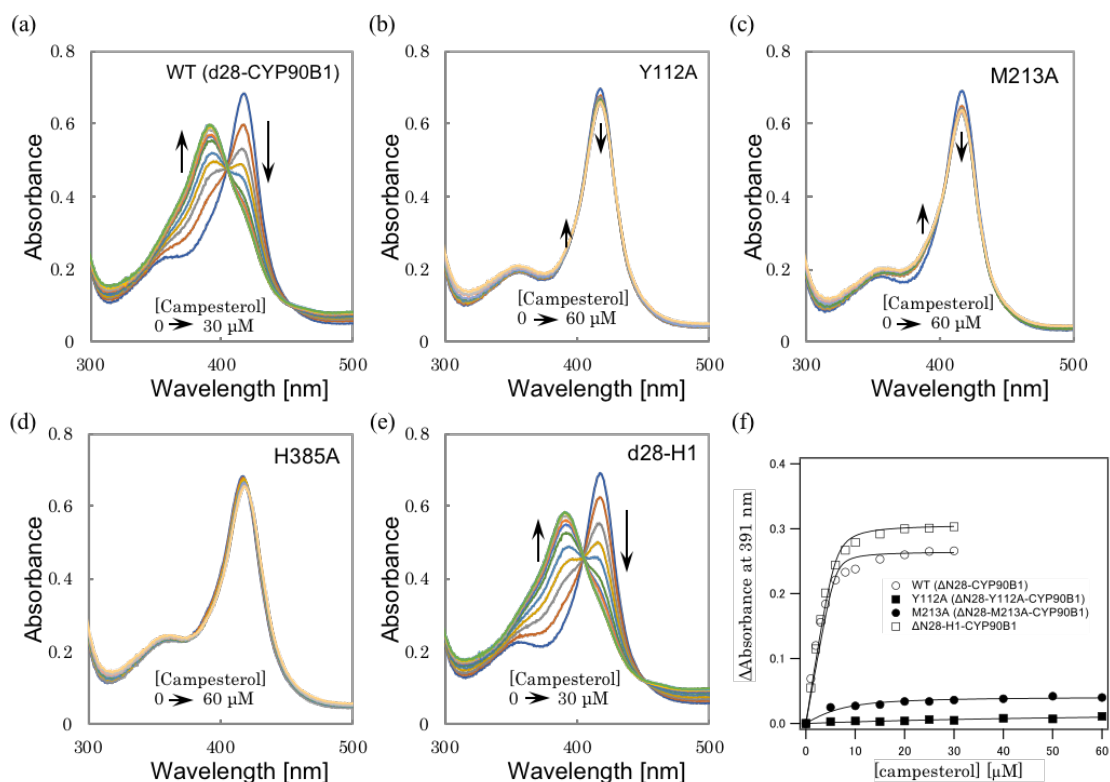


図2-10 CYP90B1の各種変異体に対するCRの滴定と紫外可視吸収スペクトル変化

それぞれ(a) d28-CYP90B1、(b) Y112A、(c) M213A、(d) H385A、(e) d28-H1に対してCRを滴定した際の吸収スペクトルの変化を示している。(e) は結晶化に用いた変異体がd28-CYP90B1と同等程度の基質の受容能を持つことを確認するために実施した。(f) (a) から(e) に関して、CRの添加に伴う391 nmの吸光度の変化をプロットした結果を示している。吸収スペクトルの変化が全く見られなかったH385Aについてはデータを示していない。

表2-1 各種変異型CYP90B1のCHR及びCRに対する解離定数

		d28-CYP90B1 ^(b)	Y112A ^(c)	M2123A ^(c)	H385A ^(c)	d28-H1 ^(d)
K_d [μ M] ^(a)	CHR	0.10	469	9.5	– (e)	0.06
	CR	0.13	68	3.1	– (e)	0.27

(a) 図2-9-f、及び図2-10-fのプロットから算出した値であり、実験は全て1回のみ実施した。

(b) N末端側の1-28残基をMetAla-の2残基と置換した変異体。

(c) d28-CYP90B1を鋳型として導入した変異体。

(d) CHR結合型CYP90B1を得るために利用した変異体。

(e) 吸収スペクトルの変化がほとんどなかったため、正確な K_d の算出が困難であった。

2-4. 基質の位置・立体選択的な水酸化メカニズム

先行研究⁶⁾によって、CYP90B1はCHR、CR、SITの3化合物に対してC22位への位置特異的な水酸化活性を示し、CRとSITに対しては22*S*水酸化物を選択的に生成する立体選択性を示すことが明らかになっている。しかしながら、CYP90B1がどのように基質を認識して位置特異的に水酸化しているか、また、これら基質の構造の違いと立体選択的な水酸化がどのように関連しているかは明らかになっていなかった。

決定したCHR結合型CYP90B1の結晶構造を見ると、CYP90B1に結合したCHRのステロール骨格はヘムに対して垂直に配置されており、水酸化を受けるC22が存在するステロール側鎖はヘムに対して水平に配置されていた。この結合コンフォメーションでは、触媒部位であるヘム鉄と水酸化を受けるC22位との間の距離は4.1Åであり、ヘム鉄に対して最も近くに配置されていた水酸化を受けないC20位までの距離は4.9Åだった(図2-11a)。一方、CHRのC20位とC22位の両者それぞれを部位特異的に水酸化することで知られるCYP11A1のCHR結合型の立体構造^{12,13}では、CHRはヘムに対して分子全体が粗く水平に配置されており、この状態のヘム鉄とC20位及びC22位との間の距離はそれぞれ4.3Åと4.1Åであった(図2-11b)。このことから、CYP90B1はCHRの結合コンフォメーションを制御することによって、C22位のみがヘム鉄に対して水酸化が可能な範囲内に配置され、尚且つその他の炭素原子がヘム鉄から遠い位置に配置することで、C22位特異的な水酸化反応を可能にしていると考えられる。

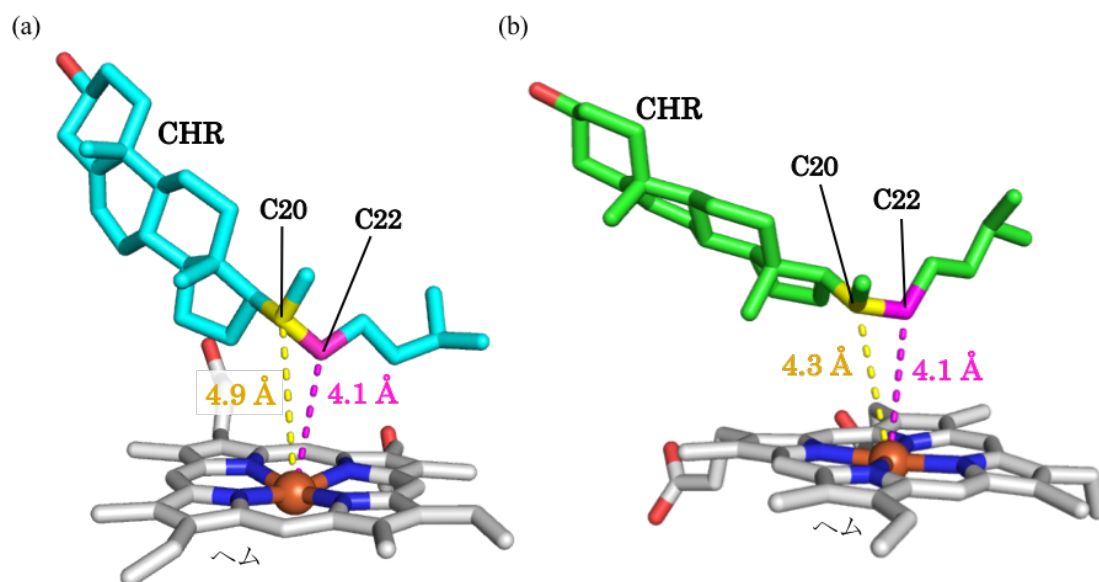


図2-11 CHRのC22位を水酸化するCYP90B1とCYP11A1におけるCHRの結合様式

(a) CYP90B1のCHRの結合様式と (b) CYP11A1のCHR結合様式。CHRのC20位は黄、C22位はマゼンタで示しており、それぞれの炭素原子からヘム鉄までの距離はC20位-ヘム鉄間は黄の破線で、C22位-ヘム鉄間はマゼンタの破線で示している。

次に、CYP90B1がCHRに対して立体選択性が低下している原因を調べるために、CYP90B1に結合したCHRのC22位の2つの水素原子に注目した。C22位の $pro-S$ 位の水素原子 ($pro-SH$) とヘム鉄間の距離は3.5 Åで、 $pro-R$ 位の水素原子 ($pro-RH$) とヘム鉄間の距離は3.6 Åであり、2つの水素原子からヘム鉄までの距離はほとんど同じであった (図2-12a)。この結果から、CYP90B1はCHRのC22位の $pro-SH$ と $pro-RH$ の選択的な認識がうまくできないことが示唆され、これが原因でCYP90B1はCHRに対する立体選択性が低下していると考えられた。一方、CYP90B1はCRやSITに対しては立体選択性を示すことが知られているが、本研究ではCR結合型及びSIT結合型CYP90B1の結晶構造を得ることが困難だった。そのため、CRとSITに対する立体選択的な水酸化反応のメカニズムを明らかにするために、CHR結合型CYP90B1の結晶構造を利用してCRとSITのドッキングシミュレーションを実施し、CYP90B1に対する結合様式を推定した。得られたドッキングモデルでは、CRでは $pro-SH$ -ヘム鉄間と $pro-RH$ -ヘム鉄間の距離はそれぞれ3.7 Åと5.2 Åで、 $pro-RH$ は水酸化できない距離に配置されており、 $pro-SH$ のみが選択的に水酸化できることが推定された。SITでは $pro-SH$ -ヘム鉄間と $pro-RH$ -ヘム鉄間の距離はそれぞれ2.9 Åと4.5 Åであり、CRと同様に $pro-SH$ を選択的に水酸化できることが推定された (図2-12b, c)。これらの結果から、基質の持つC24位に付加された炭素鎖とヘムとの間に生じる立体障害が原因でステロール側鎖のコンフォメーションが制限され、それに伴ってC22位の $pro-SH$ のみが水酸化される距離の範囲内に配置されることで、CYP90B1はCRとSITに対して立体選択的に水酸化できる、ということが明らかとなった。

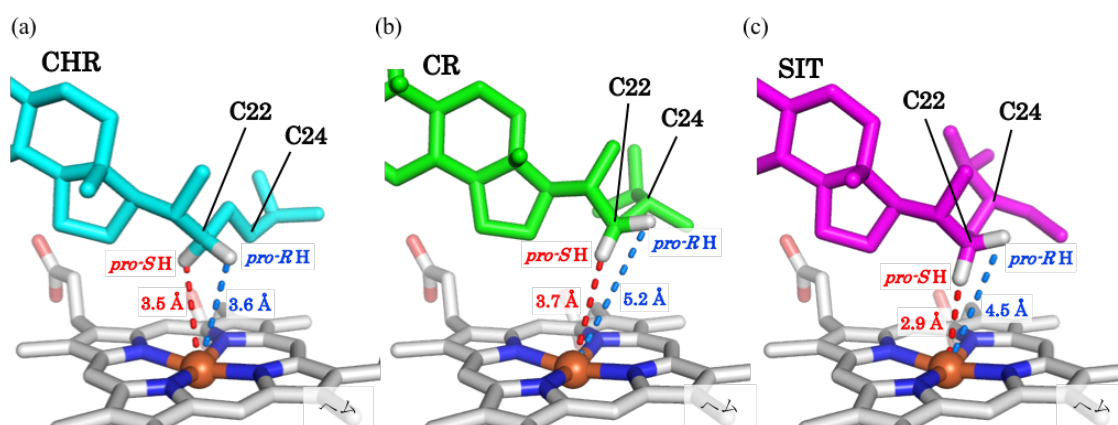


図2-12 結晶構造から明らかになったCYP90B1に対するCHRの結合様式と、ドッキングシミュレーションによって推定されたCR、およびSITの結合様式
 (a) 結晶構造で確認されたCHRの結合様式、(b) ドッキングシミュレーションで予測されたCRの結合様式、及び (c) ドッキングシミュレーションで予測されたSITの結合様式。赤破線はC22位の $pro-SH$ とヘム鉄間の距離を、青破線はC22位の $pro-RH$ とヘム鉄間の距離を示している。

2-5. 阻害剤の結合様式

BR合成阻害剤であるBRZはCYP90B1を標的とすることが知られている^{7,14}。BRZはジベレリン合成酵素の阻害剤として知られているUCZの構造と似ているが、これはUCZが本来標的としていないBR合成酵素も阻害している可能性が挙げられた背景があり、実際にUCZの構造を基盤として合成された化合物である⁷。また、先行研究でもBRZとUCZはCYP90B1に対してそれぞれ1.05 μM 及び6.9 μM という高いアフィニティを示す化合物であることが確認されている⁷。本研究で明らかにしたBRZ及びUCZ結合型CYP90B1構造から、2者の持つトリアゾール環のヘム鉄への配位が高いアフィニティを生み出す要因の一つであることを明らかにした (図2-13)。また、BRZとUCZは共通した位置に水酸基を有しているが、この水酸基が水分子を介してTyr112と水素結合を形成していることが明らかになった。その他の共通した結合様式としては、UCZとBRZの両者はIle116、Leu126、Val216、及びPhe310との疎水性相互作用が確認された。一方で、UCZ結合型では、N末端領域がポケット内部に侵入しており、このN末端領域の一部であるIle53やTyr55もUCZのクロロフェニル基との疎水的な相互作用を形成しており、同様の相互作用はBRZでは確認されなかった。これら阻害剤の結合様式の違いとポケット構造を比較すると、UCZはポケット内部の空隙をほとんど占めており、BRZよりも強固に相互作用していることが考えられた。しかしながら、実際はCYP90B1に対するアフィニティはBRZの方がより高いことが知られている。BRZでは、ヘムの持つ π 共役系と、ヘムに対して垂直に配置されたBRZの持つクロロフェニル基の π 共役系によるT型相互作用が確認されているため、この相互作用がCYP90B1への高いアフィニティを生み出していると考えられる。

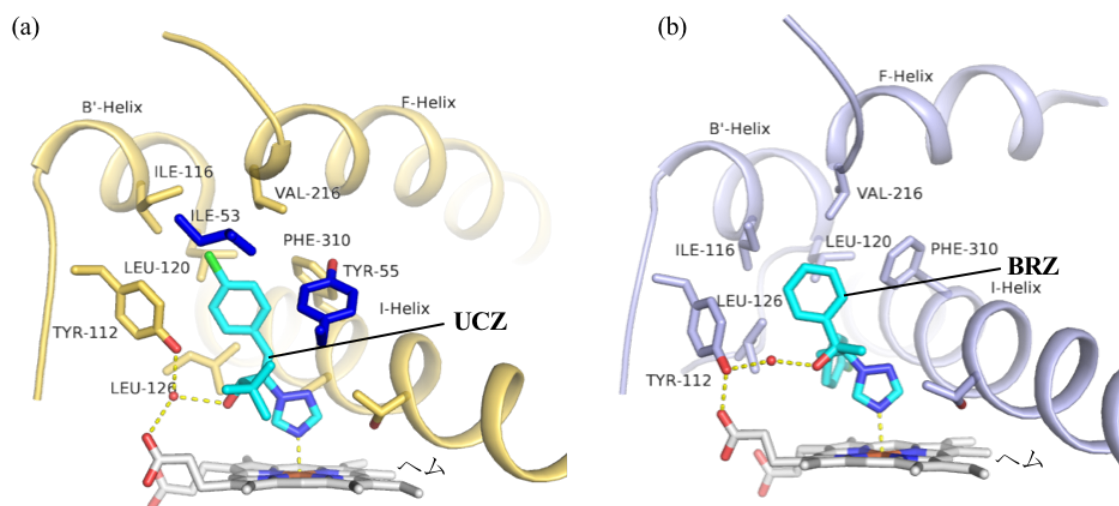


図2-13 CYP90B1に対するUCZとBRZの結合様式

UCZの結合様式 (a) とBRZの結合様式 (b)。破線は水素結合もしくは配位結合を示している。アミノ酸残基の色は、UCZ結合型は黄色、BRZ結合型は青で示しているが、UCZ結合型のポケット内部に侵入していたN-ループ領域は濃い青で示している。

UCZとBRZは共通した置換基としてトリアゾール環、水酸基、及びクロロフェニル基を有する。UCZとBRZの構造は似ているため、これら共通の置換はCYP90B1に対して同様な相互作用を形成すると考えられていた。しかしながら興味深いことに、共通した置換基の一つであるクロロフェニル基とCYP90B1との相互作用の形式は異なっており、比較するとおおよそ90° フリップした位置で相互作用していることが明らかとなった (図2-14)。UCZのクロロフェニル基はビニル基部分に直接結合しているが、このビニル基の二重結合がクロロフェニル基の回転を制限している。これが、CYP90B1に結合したBRZとUCZのクロロフェニル基の配向が異なる原因の一つであると考えられる。

その他の阻害剤に関わる相互作用としては、BRZのフェニル基近傍にはglycerolが1分子結合しており、結合したBRZとCYP90B1の間に生まれた空隙部分を埋めていた (図2-15)。このglycerol分子は主にタンパク質の主鎖に対して、直接、あるいは水分子を介して多数の水素結合のネットワークを形成していた。また、Phe383のフェニル基の中心とBRZのフェニル基の中心に対し、glycerolの疎水的な領域に存在する水素原子が垂直に配置されていた。これら水素原子はそれぞれのフェニル基に対して3.0 Å以内に位置していたことから、CH- π 結合を形成していると考えられる。

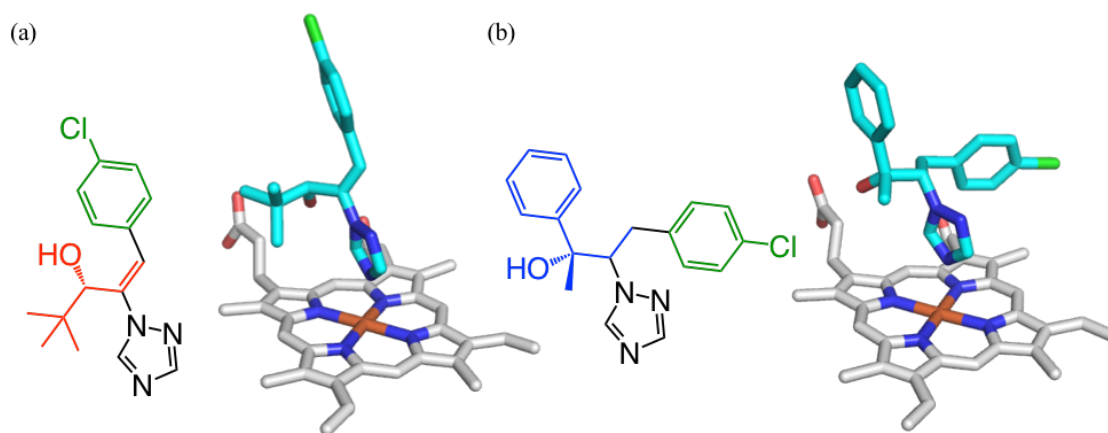


図2-14 CYP90B1に対するUCZとBRZの結合様式の違い

(a) UCZの分子構造とCYP90B1に対する結合コンフォメーション。(b) BRZの分子構造とCYP90B1に対する結合コンフォメーション。緑が2つの阻害剤に共通する置換のクロロフェニル基を示す。

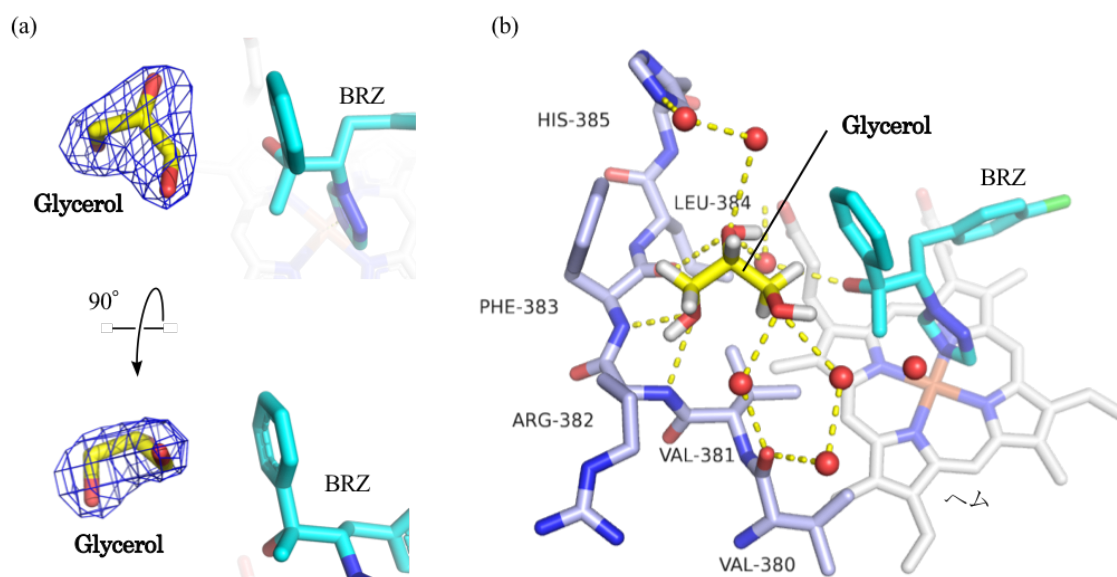


図2-15 BRZ結合型のポケット内部に確認されたglycerol分子の結合様式

(a) はglycerol分子の F_0-F_c 電子密度マップ (simulated annealing omit map) を示している。青いメッシュはマップを示しており、マップレベルは 3.0σ で表示している。(b) glycerol分子との相互作用を示しており、黄色の破線は水素結合を示す。赤の球体モデルは水分子を示す。

2-6. CYP90B1の構造的可塑性とリガンド結合によるF及びGヘリックスの構造変化

各種リガンドが結合した4つのCYP90B1の全体構造を比較した結果、CYP90B1は2種の立体構造 (A構造とB構造) に大別することができた。CHR、BRZ及びHDO結合型で確認されたA構造では、N末端領域には α ヘリックス構造が存在し、C末端領域のループ構造は基質ポケットに接近するなど、二次構造の配置が一般的なP450に見られる特徴を示していた (図2-16)。一方、UCZ結合型のみで確認されたB構造では、N末端側の α ヘリックス構造が崩れてループ構造となり、このループ領域の一部が基質ポケット内部に侵入していた。また、ポケット内部にN末端領域が侵入していることによって立体的な障害が生み出され、C末端領域が基質ポケット付近に存在することができず、ポケットから遠い位置に配置されていた (図2-16b)。このA構造の特徴は一般的なP450の立体構造の特徴と一致しているが、今までに明らかにされてきたP450の立体構造を参照した際に、N及びC末端領域に関して、A構造からB構造への大きな構造変化が認められた例はない。一方、N及びC末端領域による大きな二次構造の変化は、CYP90B1のその他の領域では確認されなかった。このことから、CYP90B1はN末端側の一部とC末端側の一部で大きく構造変化を起こす「可塑性」を有していることが明らかとなり、これはCYP90B1に特有の構造的な特徴であると考えられる。

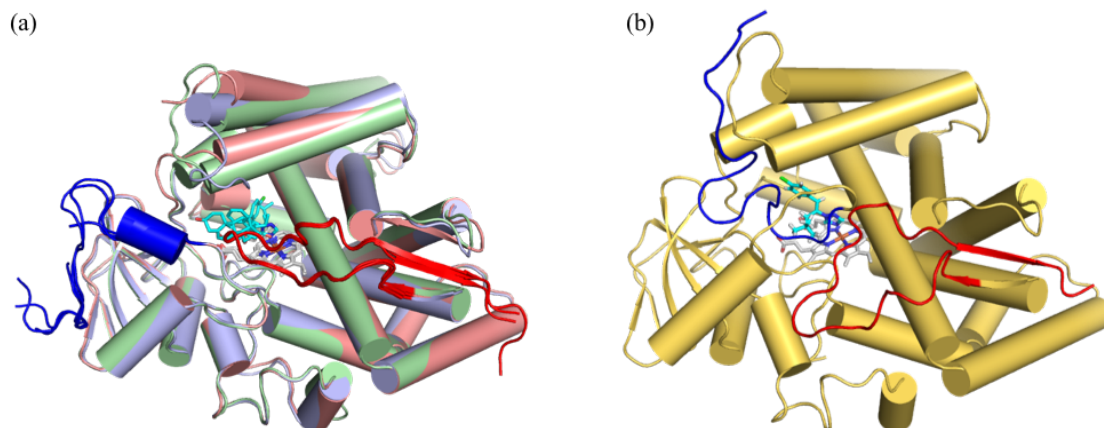


図2-16 複数のCYP90B1の結晶構造から明らかになったN末端側とC末端側の構造変化

CYP90B1におけるA構造 (a) とB構造 (b) を示している。それぞれの全体構造の色はCHR結合型が緑、BRZ結合型が青、UCZ結合型が黄、HDOが赤を示している。各構造のN末端側57残基目まで (N末端領域) は濃い青で示しており、468残基目からC末端まで (C末端領域) を濃い赤で示している。

また、B構造ではN及びC末端領域の構造変化によって、N末端領域の一部がポケット内部に侵入していることが確認されている。この構造変化はポケット構造にも大きく影響を与えており、B構造のポケットはA構造のポケットと比較して非常に小さくなっていた (図2-17)。これらの結果は、CYP90B1は受け入れるリガンドによって大きくポケット構造を変化することを示しており、CYP90B1はこれら4種以外の化合物をリガンドとして受け入れることができると期待される。実際、本研究はCYP90B1の結晶化スクリーニングで多種のアルコール類を使用した。それら低分子アルコールは、CYP90B1に結合した基質をポケット内部から排除することが実験的に確認されている (図2-18)。HDO結合型の結晶構造もその過程で得られたものである。これらは疎水性が高く、ヘムに配位できる置換基を持つ低分子のリガンドであれば、非特異的に結合することを示しており、低分子のアルコールや水酸基を持った疎水的な分子は、CYP90B1を阻害する可能性があると考えられる。

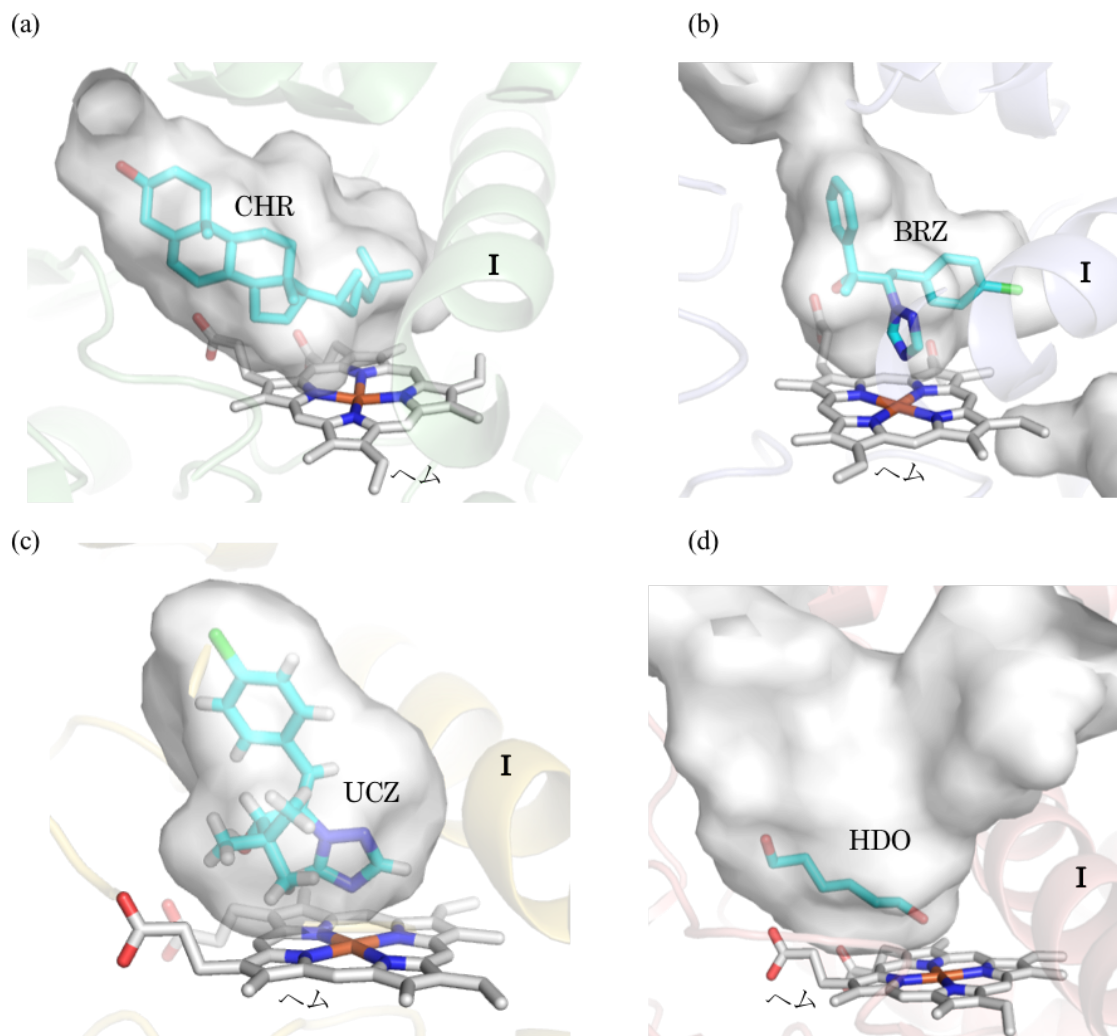


図2-17 各種リガンドが結合したCYP90B1の基質ポケットの構造

(a)、(b)、(c)、(d) はそれぞれCHR結合型、BRZ結合型、UCZ結合型、及びHDO結合型のポケット構造を示している。Iはポケットに隣接するIヘリックスを示している。

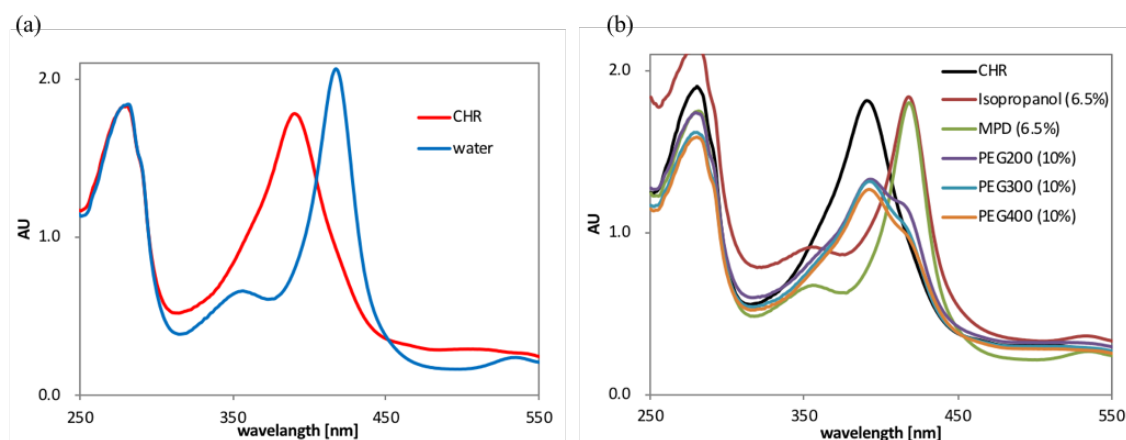


図2-18 CYP90B1の紫外可視吸収スペクトルの変化

(a) CYP90B1のリガンドフリー状態の吸収スペクトル (青) とCHR結合型の吸収スペクトル (赤)。P450は、特定のリガンドが溶液中に存在しない場合は溶液級の水分子がへム鉄に配位し、417 nm付近に吸収の極大をもつ6配位低スピン状態となる。基質が結合した水分子の配位がなくなり、390 nm付近に吸収の極大を示す。(b) CHR結合型CYP90B1を含む溶液に対して様々なアルコール類を添加した際の吸収スペクトルを示す。各種アルコールの持つヒドロキシル基がへム鉄に配位したことで、基質の結合が阻害され、390 nm付近の吸収極大が減少した。

一方、二次構造の大きな変化は認められなかったものの、4種の立体構造間で大きく構造変化していた領域も確認された。一般的にP450は、リガンドを認識することで大きく構造変化を起こす領域を保持していることが知られており、特にFヘリックス、Gヘリックス及びこれらを繋ぐF-Gループで大きな構造変化が認められる。CYP90B1でも同様に、4種の異なるリガンドに対してFヘリックス、Gヘリックス、及びF-Gループの立体構造が大きく変化していることが確認された (図2-19)。4種の構造の中でも、F、Gヘリックスが最もポケットに接近していたCHR結合型と、最も離れていたHDO結合型を比較した場合、F、Gヘリックスの位置はそれぞれ最大で4.3 Åと4.1 Å程度ずれていた。この原因としては、Fヘリックス上に存在しているMet213が基質のCHRとの疎水的な相互作用により、Fヘリックスがポケット内部に引き寄せられる構造変化を起こし、これに伴ってGヘリックスもポケット内部に引き寄せられたと考えられる。一方、HDOはFヘリックス上のアミノ酸残基と相互作用しておらず、ポケット内部に引き込むことができないために、ポケットが大きく開いた構造を取ったと考えられる。

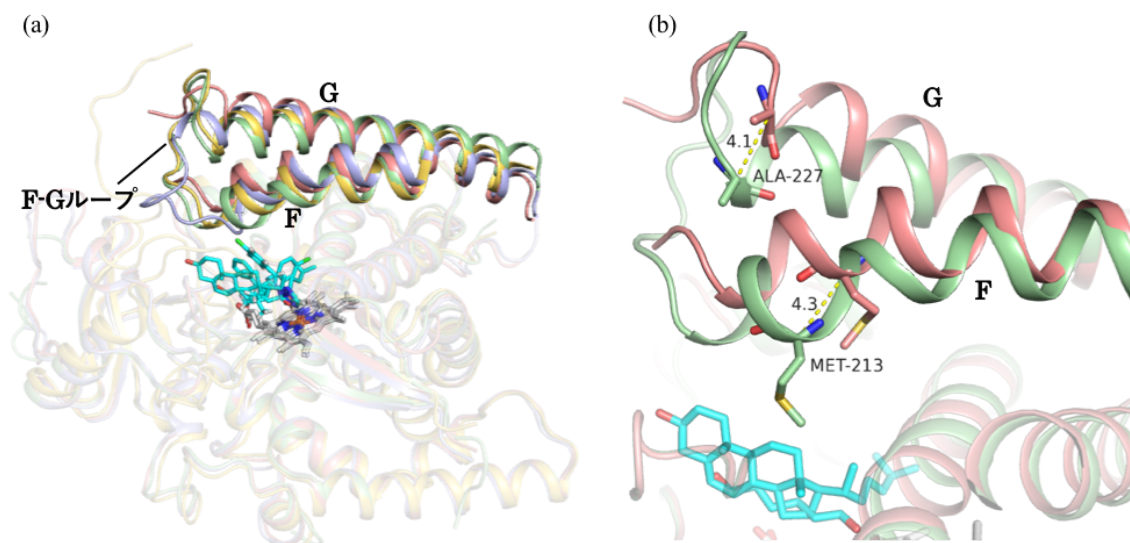


図2-19 各種リガンド結合型CYP90B1のF、Gヘリックス及びF-Gループの構造変化

(a) は4種類のリガンド結合型CYP90B1のF、GヘリックスとF-Gループを、(b) はCHR結合型、及びHDO結合型CYP90B1のF及びGヘリックス構造の比較を示している。緑はCHR結合型、青はBRZ結合型、黄はUCZ結合型、赤はHDO結合型を示している。(b) の黄色の破線はF及びGヘリックス上で最も距離の差が大きかったアミノ酸残基のC α 間の距離を示しており、単位はÅである。

2-7. BR生合成における構造生物学的な知見と植物P450に関する研究の展望

1960年代に大村らによってP450が発見されて以来、様々なP450が発見され、酵素としての性質やそれぞれのP450に関する生理機能が調べられてきた^{15,16}。特にヒト由来のP450は薬物代謝やステロイドホルモンの生合成などに関与するため、その重要性から早期に分子の性質が調べられ、立体構造が明らかにされてきた^{12,17,18}。現在ではウイルスを含め、あらゆる生物種のP450の立体構造が明らかにされてきたが、植物由来の膜結合型P450の立体構造が報告されたのは本研究を含めて2020年代に入るまでに2報しかない^{9,19}。本研究では、BR生合成に関わるP450の一種であるCYP90B1を対象に、その立体構造を明らかにすることができた1つの例となった。特に、CYP90B1に対して4種のリガンドが結合した結晶構造を決定したことで、CYP90B1が触媒する位置・立体選択的な水酸化メカニズムの解明や2種の阻害剤の結合様式、及びCYP90B1特有の構造変化を見出すことができた。現在では非常に多くのP450が発見されているが、植物のP450に関する構造解析例は未だ少ないため、本研究結果は「植物P450の性質の一端」を明らかにしたと考えられる。

また、CYP90B1の立体構造の決定は、植物ホルモンの生合成に関わるP450の立体構造として世界で初めて明らかにした例でもある。植物ホルモンの生合成酵素や代謝酵素の阻害剤は、その植物ホルモンの活性を制御することにより、成長のコントロールやストレス耐性の付加などの薬理活性を持つため、農薬や様々な研究への応用が期待されている。現在ま

でそれら酵素を標的とした阻害剤は多数開発されているが、それらの酵素に対する詳細な結合様式は明らかになっていなかった。今回、4種のリガンドに関して、CYP90B1に対するそれぞれの結合様式を明らかにし、植物ホルモン生合成に関わる酵素の機能とその阻害剤の相互作用を世界で初めて原子レベルで解明した。特に、トリアゾール系阻害剤に分類されるUCZとBRZが結合した立体構造は、農薬の観点からも非常に重要な構造基盤を明らかにしたと言える。BRZはCYP90B1特異的な阻害剤として開発された¹¹が、トリアゾール系阻害剤であるため、その他のP450に対して非特異的に結合してしまう可能性が示唆される。実際、UCZはジベレリン生合成に関わるP450のCYP701Aに対する阻害剤として開発された^{20,21}が、CYP90B1に対しても高いアフィニティを示すことが知られている。本研究ではUCZ結合型CYP90B1の結晶構造を決定したことにより、オフターゲット阻害を起こすUCZの詳細な結合様式を明らかにし、活性部位付近の構造がUCZ結合型では他の阻害剤や基質結合型とは大きく異なることを解明した。また、BRZ結合型では、活性部位のポケットにはまだ空隙が目立つ他、CYP90B1とBRZの間にglycerol分子が入り込むなどの結果が得られているため、例えばglycerol分子の結合様式を模倣した置換基をBRZに導入するなど、阻害剤として改良を重ねることが可能であることを示している。現在では、本研究で使用したBRZの改良型であるBRZ22012がすでに開発されており、CYP90B1に対するアフィニティも向上していることがわかっている^{22,23}。BRZ22012の結合様式は明らかではないが、BRZと似た結合様式であることが推定され、実際にBRZ結合型CYP90B1のモデルを用いたBRZ22012ドッキングシミュレーションをした結果でも、BRZのクロロフェニル基や水酸基の位置に、BRZ22012の芳香環や1,3-ジオキソラン骨格のO原子配置されることが推定された(図2-20)。しかしながら、BR生合成に関わるP450は全てCYP90B1に対して30%以上の相同性を示すため、それら酵素の立体構造はCYP90B1に似ていることが推定され、依然としてBRZやBRZ22012が非特異的に作用する可能性は否定できない。本研究成果はCYP90B1に対して相同性を示すそれら酵素のホモロジーモデルの構築を可能にしたため、CYP90B1やその他のBR生合成に関わるP450の予測構造をもとに、合理的な新規阻害剤の開発が可能となった。今後は、それら阻害剤を開発する分野に期待したい。

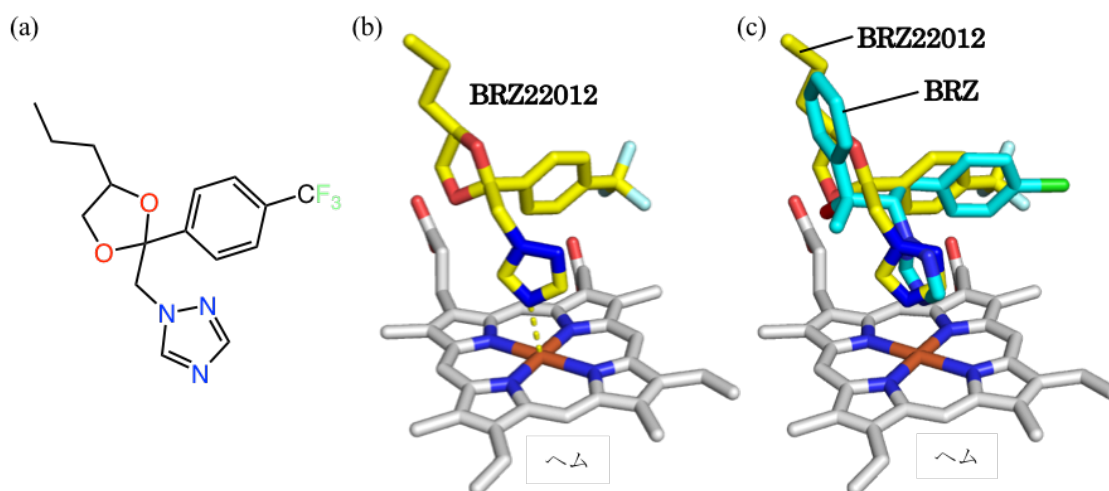


図2-20 改良型BRZの1種、BRZ22012の構造と推定結合様式

(a) BRZ22012の構造。(b) ドッキングシミュレーションによって予測されたBRZ22012の結合様式。(c) BRZとBRZ22012の結合様式の重ね合わせ。

一方、CHR結合型CYP90B1の構造決定は、新規阻害剤開発のための構造基盤を提供できただけでなく、BR合成における植物生理学的に重要な反応を原子レベルで明らかにすることができた。今回の研究では、基質結合型CYP90B1の構造解析によって基質との相互作用にはY112、M213、H385が必須であることを明らかにし、変異体を用いた水酸化活性や基質の解離定数を測定することで、それらアミノ酸残基の重要性を示すことができた。本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナ由来のCYP90B1を研究に用いたが、その他の植物由来のCYP90B1でもこれらのアミノ酸残基は高度に保存されていたため、これらのアミノ酸残基の基質結合や水酸化活性に対する重要性は、ほぼ全ての植物のCYP90B1で共通していると考えられる(図2-21)。また、CYP90B1が触媒する位置・立体選択的な水酸化の反応メカニズムを、結晶構造解析とドッキングシミュレーションによって詳細に明らかにすることができた。BR合成では、複数のP450が関わるが、それぞれはステロイド骨格を酸化するグループとステロイド側鎖を酸化するグループに分けることができ、ステロイド骨格を酸化するグループにはCYP90A1、CYP85A1、CYP85A2が、ステロイド側鎖を酸化するグループにはCYP90B1、CYP90C1、CYP90D1が分類される。これらの酵素は互いに30%以上の相同性を示すため、CYP90B1の構造を利用することで立体構造を予測することが可能である。その中でもステロイド側鎖のC23位を水酸化するグループであるCYP90C1とCYP90D1は、基質の酸化部位がCYP90B1と似ているため、立体構造だけではなく、ステロイド骨格が溶媒側に、ステロイド側鎖部分がヘム上部へ配置されるといった、基質の認識様式も似ている可能性が高いと考えられるため、より高い信頼を持つ立体構造

の予測が可能となった。現在では王らのグループによってCYP90C1やCYP90D1特異的な阻害剤の開発^{24,25,26}が進められているため、今後はそれらに関連した研究の発展が期待される。

最後に、原核生物や昆虫、人などと比較すると、例えばイネのゲノムでは遺伝子の約1%をP450遺伝子が占めるなど、植物は圧倒的に多くのP450遺伝子を持つことが知られており、その多くが膜結合型P450である。これら非常に多種類の植物P450は、植物自身の成長の制御や様々なストレス応答を誘導する植物ホルモン等の生理活性物の生合成・代謝に関わるだけでなく、非常に多様な二次代謝産物の生合成・代謝にも関わっていると推定されている。特に二次代謝産物の多様性は、植物種の数だけ存在する可能性があり、まさに「植物の個性」を象徴している。しかしながら、植物由来のP450の多くが、その機能や触媒する反応が未知である他、立体構造の解析に成功した例は非常に少なく、未だに研究が立ち遅れているのが現状である。本研究は植物由来の膜結合型P450の大腸菌発現系や精製手法、結晶化など、様々な実験における重要な戦略などを駆使することで構造解析に成功した。本研究の成果は、未だ研究が立ち遅れている植物P450の機能・構造解析にとって非常に有益であり、今後、それらに関わる様々な分野での研究の発展が期待される。


```

SP|064989|C90B1_ARATH      VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 149
TR|AOA1J6INWO|AOA1J6INWO_NICAT VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 143
TR|AOA371GFY7|AOA371GFY7_MUCPR VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 149
TR|AOA210A4B6|AOA210A4B6_9ASPA VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 147
TR|AOA210XA56|AOA210XA56_9ASPA VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 147
TR|AOA438GIG9|AOA438GIG9_VITVI VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 143
TR|AOA210WQ87|AOA210WQ87_9ASPA VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 156
TR|AOA371H8H4|AOA371H8H4_MUCPR VSADAGLNRFILQNEGRLFECYPRSIGGILGKWSMLVVGDMHRDMRISLNFSLSHARL 167
****.***:***.*:** ** * . : * :*****. . : : : . ** * : . : *

SP|064989|C90B1_ARATH      RTILLKQDVERHTLVFLDSWQQ--NSIFSAQDEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGEETEQLKK 207
TR|AOA1J6INWO|AOA1J6INWO_NICAT RNQLLREVEKHLLVLSGSKED--SVVCAQDEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGEETEQLKK 201
TR|AOA371GFY7|AOA371GFY7_MUCPR RTHLLKEVENHTLLVLSNWGNQNNTFSAQDEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGDIETEQLKK 209
TR|AOA210A4B6|AOA210A4B6_9ASPA RAVLLPEVERQTLVMSWKE--GVAFSAQEEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGEETEKLRR 205
TR|AOA210XA56|AOA210XA56_9ASPA RSILLPEIERHTLLAISWKE--DVSFSAQDEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGEEMETEKLRR 205
TR|AOA438GIG9|AOA438GIG9_VITVI RTHLLPEVVKHTLLVLSWKE--NCTFSAQDEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGKPEETEQLKK 201
TR|AOA210WQ87|AOA210WQ87_9ASPA KADFLLDIEEQAVQISAWRE--NITFSAHEEAKKFTFNLMMAKHIMSMDPMPETAQLRK 214
TR|AOA371H8H4|AOA371H8H4_MUCPR RSHIFKEVERHALLVLSWQ--NCTFSAQQAKKFTFNLMMAKHIMSMDPGNPESEQLKR 225
. . : : : : : : : : * : . . : : : ** * : : * : : : * : : :

SP|064989|C90B1_ARATH      EYVTFMKGVS--APLNLPGTAYRKALQSRSTILKFIERKMEERKLDIKEEDQEEEEEVKE 266
TR|AOA1J6INWO|AOA1J6INWO_NICAT EYVTFMKGVS--APLNLPGTAYRRALQSRSTILNFIERKMEERLKEMIGD----- 250
TR|AOA371GFY7|AOA371GFY7_MUCPR EYVTFMKGVS--APLNLPGTAYRKALQSRSTILKFIERKMEERVKRQI--GNE----- 260
TR|AOA210A4B6|AOA210A4B6_9ASPA EYVTFMKGVS--APLNLPGTAYRKALQSRSTILGVIETKMEERKQRMVLG----- 254
TR|AOA210XA56|AOA210XA56_9ASPA EYVTFMKGVS--APLNLPGTAYRKALQSRSTILRVIIEKMEERSHERNEE----- 254
TR|AOA438GIG9|AOA438GIG9_VITVI EYVTFMKGVS--APLNLPGTAYRKALQSRSTILKFIERKMEERIQKLRGGGFE----- 253
TR|AOA210WQ87|AOA210WQ87_9ASPA EYVTFMKGVS--IPLNLPGTAYRKALQSRSTILKFIIEGDKLDEKVNIEEG----- 263
TR|AOA371H8H4|AOA371H8H4_MUCPR EYVTFMKGVSPTPLNLPGTAYRKALQSRSTILKFIIEGDMEARAKRIQKGNPS----- 278
** * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

SP|064989|C90B1_ARATH      DEAMSKSDHVRKQRTDDDLLGWVLKHSNLSTEQILDLLSLLFAGHETSSVAIALAIAIFF 326
TR|AOA1J6INWO|AOA1J6INWO_NICAT -----EKSDLLGWVLKHSNLSTEQILDLLSLLFAGHETSSVAIALAIAIYF 295
TR|AOA371GFY7|AOA371GFY7_MUCPR -----NLEEDDLLNWVLKHSNLSTEQILDLLSLLFAGHETSSVAIALAIAIYF 307
TR|AOA210A4B6|AOA210A4B6_9ASPA -----TDEEDDLLGWALKKSSSLSTEQILDLLSLLFAGHETSSMALALAVFF 301
TR|AOA210XA56|AOA210XA56_9ASPA -----KEEDDLLGWALKQSSSLSTEQILDLLSLLFAGHETSSMALALTIF 301
TR|AOA438GIG9|AOA438GIG9_VITVI -----NMEEDDLLGWVLKHSNLSTEQILDLLSLLFAGHETSSVAIALAIAIYF 300
TR|AOA210WQ87|AOA210WQ87_9ASPA -----LQGDLLLASVVKNTDLKREQILDLLSLLFAGHETSSAAISLAIAIYF 310
TR|AOA371H8H4|AOA371H8H4_MUCPR -----LEEDHLLNWALKHSNLSTEQILDLLSLLFAGHETSSVALAIAIYF 325
. * * * . : : : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

SP|064989|C90B1_ARATH      LQACPKAVEELREEHLEIARAKKELGESELNWDDYKMEFTQCVINETLRLGNVVRFLR 386
TR|AOA1J6INWO|AOA1J6INWO_NICAT LQACPKAVEELREEHLEIARAKKESGVTELTWDDYKMEFTQCVISETLRLGNVVRFLR 355
TR|AOA371GFY7|AOA371GFY7_MUCPR LPACPRAIQQLREEHSEIARAKKQAGEVELTWEDYKMEFTHCVVNETLRLGNVVRFLR 367
TR|AOA210A4B6|AOA210A4B6_9ASPA LERCPKAVRQLREEHQIARRKMERGETGLDWEDYKMEFTLCVINETLRLGNVVRFLR 358
TR|AOA210XA56|AOA210XA56_9ASPA LEGCPKAVQQLREEHQIARRKMERGETGLDWEDYKMEFTSQCVINETLRLGNVVRFLR 361
TR|AOA438GIG9|AOA438GIG9_VITVI LEGCPNAVQQLREEHLEIARAKKQSGEELSWEDYKMEFTQCVISETLRLGNVVRFLR 360
TR|AOA210WQ87|AOA210WQ87_9ASPA LQSCPALKQLREEHLSKSRKMEMGETRLNWDDYKMEFTKCVINETLRLGNLTKFLR 370
TR|AOA371H8H4|AOA371H8H4_MUCPR LPACPRAIQQLREEHSEIARAKKQAGEVELTWEDYKMEFTHCVVNETLRLGNVVRFLR 385
* * * . : * * * * * * * : * * * : * : * : * : * : * : *

```

図2-21 シロイヌナズナ由来、及び各植物由来のCYP90B1のアミノ酸配列の比較

配列は遺伝子データバンクのUniProtから取得した。左の列は遺伝子のIDを、右の列は遺伝子のIDした対応したアミノ酸配列を示す。CYP90B1と同定もしくはアノテーションされている遺伝子を並べており、064989/C90B1_ARATHは本研究中で扱ったシロイヌナズナ由来のCYP90B1を示す。「*」は各配列間で完全一致した配列、「:」は保存度が高い配列、「.」は低度に保存されている箇所を示す。赤のハイライトは基質の結合に必要なTyr、Met、及びHis残基を示す。

実験手法

2-8. CYP90B1の発現

神戸大学大学院農学研究科の水谷正治准教授に提供して頂いた*Arabidopsis thaliana*由来CYP90B1 (d28-CYP90B1) の遺伝子をpET17bに組み込み、香川らが育種した真核生物由来P450の高発現が期待できるBL21(DE3) 株由来大腸菌をヒートショック法により形質転換した。この大腸菌株にはあらかじめ分子シャペロン共発現用プラスミドであるpGro12が導入されているため、形質転換体の培地には全て100 µg/mL ampicillin (Amp) と50 µg/mL kanamycin (Kana) を添加した。形質転換体をLuria-Bertani (LB) 寒天培地に塗布し、37°Cで一晩静置培養した。得られたコロニー一つを用いてLB培地に植菌し、37°Cで一晩培養した。この前培養液を、0.5 mM ϵ -aminolevulinic acid、0.2 % (w/v) glucose、1滴の消泡剤SI を添加したTerrific Broth (TB) に、100倍希釈で添加し37°Cで培養した。培養液のOD₆₀₀が1.0に達した時点で発現誘導物質として0.1 mM IPTG、0.1 % (w/v) L-arabinose、1.0 µg/mL chloramphenicolを添加し、25°Cで48時間振とう培養した。その後、培養液を4°C、6,640gの条件で遠心分離し、上清を破棄して菌体を回収した。菌体は-80 °Cで保存した。尚、TBは500 mL三角フラスコ1本あたりに100 mLの割合で用いた。

2-9. 変異型CYP90B1の作製

d28-CYP90B1を用いた結晶構造解析では、UCZ結合型の結晶構造を決定した。しかしながら、CYP90B1特異的な阻害剤であるBRZ結合型や基質結合型では、良質な回折斑点が得られなかったために結晶構造の決定には至らなかった。UCZ結合型の結晶構造において、d28-CYP90B1には2箇所のdisorder領域 (領域1: L251-D284、領域2: Q434-N450)が確認されたため、結晶性の向上を期待してこれら2箇所のdisorder領域を欠損させた変異型CYP90B1を作製した。欠損による酵素の不安定化などが予測されるため、領域1、2において、それぞれの領域で欠損させる配列が異なる変異体を数種類デザインした (図2-22)。それぞれの変異体の作製方法は、プラスミド全体を増幅させると同時に欠損変異を導入できるoverlap extension PCR法を用いた。尚、本章で扱った各種点変異体はd28-CYP90B1を鋳型とし、同様の手法で点変異を導入した。

まず初めに、領域1を欠損させた変異体11種 (d28-M1-M11) を作製し、発現量を指標にこれらの中から二次スクリーニングを行う変異体の選抜を行った。発現量の比較には、P450を特異的に検出することができるCO差スペクトルの450 nmの吸光度を利用した。d28-CYP90B1と同様の手順でd28-M1-11変異体を発現させ、集菌した。菌体を発現確認buffer (1.0 M Kpi pH7.4、10 % (v/v) Glycerol、1 mM dithiothreitol (DTT)) で懸濁したのち、pulse=30 %、output=2.5、2 min出力-1 min停止を3サイクルの条件で超音波破碎し、

257,000 g、4°Cで1 h超遠心分離を行った。上清を回収し、300 nm-600 nmの範囲で酸化型の吸収スペクトルを測定した。次に、サンプルに1.0 mM sodium dithioniteを添加してよく攪拌し、直ちに還元型の吸収スペクトルを測定した。その後、速やかにサンプルを回収し、50 mL/minでCOガスを1 min吹き付け、直ちにCO結合型の吸収スペクトルを測定した。還元型CO差スペクトルの算出はCO結合型と還元型の差スペクトルで算出した。還元型CO差スペクトルでは、450 nmのピークの値が最も高かったd28-M8が選抜されたため、さらにd28-M8を鋳型として、同様の操作により領域2を欠損させた変異体を11種 (d28-H1-11) 作製した。d28-H1-H11の選抜は高発現であることに加え、d28-CYP90B1と同様に精製が可能であることを指標とした。最終的なスクリーニングの結果では、d28-H1変異体のみが選抜されたため、これを用いてBRZ、CHR、およびHDO結合型の結晶構造解析に用いた。

変異体名	251	領域1	284	434	領域2	450
d28	<u>LDIKEEDQEEEEVKTEDEAEMSKSDHVRKQRTDD</u>				<u>QNNGASSSGSGSFSTWGNN</u>	
d28-M1	LDIKEED-----		RKQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M2	LDIKEED-----		KQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M3	LDIKEED-----		QRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M4	LDIKEED-----		RTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M5	LDIKEE-----		RKQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M6	LDIKEE-----		KQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M7	LDIKEE-----		QRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M8	LDIKE-----		RKQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M9	LDIKE-----		KQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M10	LDIK-----		RKQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-M11	LDIKEEDQEEEEV-----		SDHVRKQRTDD		QNNGASSSGSGSFSTWGNN	
d28-H1	LDIKE-----		RKQRTDD		QN-----TWGNN	
d28-H2	LDIKE-----		RKQRTDD		QN-----STWGNN	
d28-H3	LDIKE-----		RKQRTDD		QN-----FSTWGNN	
d28-H4	LDIKE-----		RKQRTDD		QNGA-----NN	
d28-H5	LDIKE-----		RKQRTDD		QNGAS-----NN	
d28-H6	LDIKE-----		RKQRTDD		QNGASS-----NN	
d28-H7	LDIKE-----		RKQRTDD		QNG-----WGNN	
d28-H8	LDIKE-----		RKQRTDD		QNG-----GNN	
d28-H9	LDIKE-----		RKQRTDD		QNN-----WGNN	
d28-H10	LDIKE-----		RKQRTDD		QNN-----TWGNN	
d28-H11	LDIKE-----		RKQRTDD		QNGA-----GNN	

図2-22 結晶構造解析に向けた変異型CYP90B1のデザインと変異を導入した領域

UCZ結合型の結晶構造で確認されたdisorder領域1及び領域2と、これら領域を欠損させた変異体の種類を示した。d28-M1-M11は1次スクリーニングでデザインした変異体を示しており、発現量が多かったd28-M8変異体を選抜した (赤字)。太字で示したd28-H1-H11変異体は2次スクリーニングでデザインした変異体であり、d28-M8変異体を鋳型に作製した。

2-10. CYP90B1の精製

d28-CYP90B1、d28-M8、およびd28-H1-11は以下の手順で精製した。菌体20 g以下に対して破砕 buffer (20 mM potassium phosphate buffer (KPi) pH 7.4、1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride: PMSF) を加えて懸濁し、最終体積を100 mLにした。これをpulse=30%、output=4.0、2 min出力・1 minを6サイクルの条件で超音波破碎し、257,000 g、4°Cで1 h超遠心分離を行なった。その後、沈殿した膜画分を回収し、抽出buffer (20 mM KPi pH 7.4、1.0 mM PMSF、10 %(v/v) glycerol、20 mM imidazole) で懸濁した。この懸濁液に対して同じ体積の可溶化buffer (2.0 M KPi pH 7.4、1.0 mM PMSF、10 %(v/v) glycerol、20 mM imidazole) と微量の結晶DNaseIを加えて4°Cにおいて優しくスターラーで攪拌することで可溶化を行なった。可溶化後の懸濁液は257,000 g、4°Cで1 hの超遠心により分離し、その上清を回収した。0.45 μ m フィルターで微粒子を除去後、Ni-NTA agarose カラムに通し、担体体積の10倍量の洗浄buffer (50 mM KPi pH 7.4、300 mM NaCl、10 %(v/v) glycerol、25 mM imidazole) で洗浄した後に、6倍量の溶出buffer (50 mM KPi pH 7.4、300 mM NaCl、10 %(v/v) glycerol、300 mM imidazole、1 mM DTT)で溶出させた。この試料をイオン交換A buffer (50 mM KPi pH 7.4、10 %(v/v) glycerol、2.0 mM DTT) で2倍以上希釈し、HiTrapSPカラムに吸着させた後に、イオン交換buffer Aとイオン交換buffer B (50 mM KPi pH 7.4、10 %(v/v) glycerol、2.0 mM DTT、1.0 M NaCl) のグラジエント溶出を行なった。各フラクションをSDS-PAGEで分析し、純度の高いフラクションを回収した。回収した試料はAmiconUltra15を用いて結晶化buffer A (50 mM KPi pH 7.4、300 mM NaCl、10 %(v/v) glycerol、2.0 mM DTT) もしくは結晶化buffer B (50 mM KPi pH 7.4、300 mM NaCl、10 %(v/v) glycerol、2.0 mM DTT、200 mM L-lysine-HCl) に置換、濃縮を行い、液体窒素で凍結させ、-80°Cに保管した。尚、結晶化に用いたd28-CYP90B1はHitrapSPの後に、ResourceQカラムに通してイオン交換buffer A及びBを用いて溶出させ、結晶化buffer Aに置換して-80°Cに保存した。

2-11. CYP90B1の結晶化

全ての結晶化はsitting drop 蒸気拡散法を用い、各種リザーバー溶液とタンパク質溶液を1 μ L : 1 μ Lで混合して20°C下で実施した。UCZ、BRZ、及びHDO結合型CYP90B1は結晶化buffer Aに置換した試料で結晶化を行い、CHR結合型CYP90B1は結晶化buffer Bに置換した試料を用いた。UCZ結合型について、位相決定に用いた結晶は10 mg/mL d28-CYP90B1に0.4 mM UCZを添加し、これとリザーバー溶液A (0.26-0.28 M ギ酸Mg) を混合することで作成した。高分解能のデータセットの収集にはリザーバー溶液B (0.20 M KCl、0.40 M NaCl、22 %(w/v) polyethyleneglycol (PEG) 3,350) を混合して得られた結晶を用い

た。BRZ結合型は13 mg/mL d28-H1に0.52 mM BRZを添加し、リザーバー溶液C (0.90 M NaCl, 0.10 M Na/K Pi pH 6.2, 10 % (w/v) PEG8,000) を加えることで結晶化した。CHR結合型は10 mg/mL d28-H1に対し、45 % (w/v) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2HPBCD) 溶液に溶解した30 mM CHR溶液を使って終濃度が1.0 mM CHRとなるように添加し、リザーバー溶液D (0.10 M trisodium citrate-HCl pH 4.8) を加えて2週間蒸気拡散させることで結晶を得た。HDO結合型の結晶は10 mg/mL d28-H1に対し、45 % (w/v) 2HPBCD溶液に溶解した14 mM CHRを使って0.4 mM CHRを添加し、リザーバー溶液E (0.12M KCl, 0.08 M NaCl, 0.10 M sodium cacodylate-HCl pH 6.5, 2 % (w/v) HDO) と混合することで得られた。

2-12. 回折データの収集、構造決定

X線回折実験に用いた結晶は、リガンドごとで以下に示すクライオプロテクタントで処理した後に、液体窒素もしくは100 Kの窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存した。UCZ結合型の結晶に用いたクライオプロテクタントの組成は50 mM KPi pH 7.4, 0.60 M NaCl, 0.30 M magnesium formate, 30 % (v/v) glycerolで、BRZ結合型は0.10 M Na/K Pi pH 6.2, 1.0 M NaCl, 18 % (w/v) PEG8,000, 30 % (v/v) glycerol、CHR結合型は0.10 M trisodium citrate-HCl pH 4.8, 50 mM KPi pH 7.4, 0.20 M NaCl, 0.2 M L-lysine-HCl, 1.0 mM CHR, 1.2 % (w/v) 2HPBCD, 30 % (v/v) glycerol、HDO結合型は25 mM KPi pH 7.4, 25 mM sodium cacodylate-HCl pH 6.5, 80 mM KCl, 0.23 M NaCl, 1.5 % (w/v) HDO, 5 % (w/v) 2HPBCD, 0.40 mM CHR, 21 % (v/v) glycerolを使用した。CHR結合型の結晶に関しては、クライオプロテクタントの処理時に結晶の溶解が確認されたため、1-5秒程度処理し、凍結した。

回折データの収集はSPRING-8のビームライン (BL) BL26B1, BL32XU, BL41XUを利用し、100 Kの窒素ガス気流下で実施した。回折データのintegrationとscalingにはXDS²⁷パッケージもしくはCCP4パッケージのpointless²⁸、及びaimless²⁸を使用した。初期位相の決定は、空間群 $P2_1$ のUCZ結合型の結晶を用い、Fe原子の吸収端近傍である波長1.739 ÅのX線を用いてデータセットを取得し、単波長異常分散 (SAD) 法を利用することで決定した。Fe原子位置の探索、位相の計算、位相の改良および自動モデル構築はPHENIXパッケージのAutoSol²⁹を用いた。UCZ結合型の高分解能での立体構造決定には、空間群 $C2$ の結晶を用いた。次にHDO結合型のデータセットを収集し、位相はUCZの構造を鋳型とした分子置換 (MR) 法によって決定した。CHR及びBRZ結合型は、HDO結合型の構造を鋳型としたMR法で位相を決定した。MR法はCCP4パッケージのPhaserMR³⁰を用いた。これらの分子モデルの構築はCoot³¹を利用し、構造精密化にはCCP4パッケージのRefmac5³²とPHENIXパッ

ページのPhenix Refine³³を用いた。UCZ、BRZ、CHR、及びHDOの分子モデルは全て同様に作成した。初期モデルはChem3Dで作成し、PHENIXパッケージのeLBOW³⁴で最終的なリガンドファイルを作成した。最終的に決定した構造の統計データは1-6-9項の直後に載せた表2-2にまとめた。 R 値は $R_{\text{factor}} = \sum hkl | F_{\text{obs}}(hkl) - F_{\text{calc}}(hkl) | / \sum hkl F_{\text{obs}}(hkl)$ で算出し、 R_{free} 値は構造精密化に使用していない全反射の5%を用いて計算した。

2-13. 基質及び阻害剤の滴定とアルコール類添加による基質結合の阻害の確認

使用した全ての変異酵素 (d28、d28-H1、Y112A、M213A、H385A) は精製試料を用い、結晶化buffer Aでヘム濃度が6 μM となるように調製した。ヘム濃度の算出はP450camの酸化型のソーレー帯 (417 nm) の吸収から算出されたモル吸光係数115 [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]³⁵を利用した。酵素試料を含んだ溶液を光路長1.0 cmの石英キュベットに1.0 mL入れ、分光光度計 (U-3010、Hitachi) で測定した。分析条件は波長250-700 nmの範囲をスキャンスピード300 nm/min、スリット0.5 nmで行った。酵素溶液の紫外可視吸収スペクトルは、酵素溶液に対して基質を1.0 μL 滴定するたびに測定を行なった。CHR及びCRは45% (w/v) 2HPBCDを用いて溶解させた。UCZとBRZの溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。実験から得られたデータはIgor Pro (WaveMetrics) で分析を行い、式プロットに対する曲線のフィッティングを行うことで解離定数 K_d を算出した。フィッティングは以下の式を用いた³⁸。以下の式では、 A 、 A_{∞} 、 L 、 P 、 K_d はそれぞれ、測定された吸光度、最大吸光度、リガンド濃度、タンパク質濃度、解離定数を示している。フィッティングパラメーターは A_{∞} と K_d で、 A には、各リガンド濃度における391 nmの吸光度とリガンド未添加時の391 nmの吸光度の差の値を用いた。

$$A = 2A_{\infty}L / \{ (L + K_d + P) + [(L + K_d + P)^2 - 4PL]^{1/2} \}$$

アルコール類と基質の競合に関する滴定実験では、40 μM CHRを含んだヘム濃度20 μM d28-H1変異体溶液を調製し、石英キュベットに240 μL 充填して同様の条件で紫外可視吸収スペクトルを測定した。50% (w/vもしくはv/v) のHDO、MPD、PEG200、PEG300、PEG400、を含んだ結晶化bufferを調製し、これらをアルコール溶液とした。アルコール溶液をH1変異体が充填されたキュベットにアルコールの終濃度が10% (w/vもしくはv/v) になるまで徐々に滴下した。吸収スペクトルの変化を追跡するため、アルコール溶液を滴下するたびに吸収スペクトルを測定した。

2-14. 活性測定用の変異体の発現と酵素の調製

CYP90B1の活性の測定 (2章2-3項) は、神戸大学大学院農学研究科の水谷正治准教授と李栄宰博士研究員が実施した。活性測定のためのd28、d28-H1、及びd28を鋳型に作製した点

変異体の発現は、各変異体の遺伝子が組み込まれたpET17bを用いて*E. coli* BL21(DE3) をヒートショック法で形質転換した。その後順に、100 µg/mL Ampを含んだLB培地10 mL中で一晚培養し、300 mL三角フラスコ中に入った100 µg/mL Amp、0.5 mM ε-aminolevulinic acid、0.2 % (w/v) glucoseを添加した100 mL TBに植菌してから3時間培養した。その後、0.10 mM IPTGと1.0 µg/mL Chloramphenicolを添加して発現誘導を行い、以降は25 °C、72 h培養した。

各変異体を発現させた菌体は遠心分離で回収し、0.5 mg/mL リゾチームを含んだbuffer (50 mM Tris-HCl、250 mM sucrose、0.5 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA)、0.1 mM DTT、1 mM PMSF) で処理した。その後、沈殿物をbuffer E (20 mM KPi pH7.25、20 % (w/v) glycerol、1 mM EDTA、0.1 mM DTT、1 mM PMSF) で懸濁して超音波破碎を行ない、4°C、10.000 gで30 min遠心分離した。この沈殿物を再度buffer Eで懸濁して-80°Cで保存した。得られた各変異体とNADPH依存型P450還元酵素の濃縮方法などについては先行研究で記載した通りに実施した³⁶。

2-15. CYP90B1の水酸化活性の測定

CYP90B1を発現させた大腸菌の膜画分に対し、バキュロウイルス-昆虫細胞系で発現させ、精製したシロイヌナズナ由来NADPH依存性P450還元酵素、NADPH、および基質 (CHR、CR) を混合させることで、CYP90B1の酵素反応を行なった。反応溶液は100 mM KPi pH7.25、25 pmol/mL CYP90B1、0.1 U NADPH依存性P450還元酵素、25 µM CHRもしくはCRを含む組成で、体積は100 µLとした。これに2 mM NADPHを添加して反応を開始とし、30°Cで60 minインキュベートした。その後、100 µLの酢酸エチルを加えて有機層を回収し、これを3回繰り返すことで反応生成物を回収した。回収した有機層はエバポレータで乾燥させた。得られた残渣はTMS-HT試薬 (無水Pyridineで溶解させたhexamethyldisilazane -Chlorotrimethylsilane溶液) で80°C、30 minトリメチルシリル化処理して揮発性を上げた。その後、この誘導化した残渣をGC/MS (測定装置: GC-MS-QP2010 Ultra, Shimadzu、キャピラリーカラム: DB-1 MS (30 m × 0.25 mm、0.25 µm film thickness、J&W Scientific) を用いて分析した。分析条件は以下の通りである。カラム温度については180°Cを1 min、これを20 °C/min で280°Cまで上昇させ、その後さらに2 °C/minの速度で300°Cまで上昇させた。最後に300°Cを16 min維持した。サンプルインジェクション時は250°Cで行い、ヘリウムガスの流速は1.0 min/mLで行った。接続部とイオン源の温度はそれぞれ300°Cと250°Cで維持した。マススペクトル測定モードでは、*m/z*の範囲を50から700以内のスキャン範囲で行い、CHRとCRのデータは*m/z*がそれぞれ173と187で取得した。

2-16. CRおよびBRZ2012のドッキングシミュレーション

CRとBRZ2012の分子モデルの作製はChem3D (ver.16.0) で行い、構造精密化はChem3DパッケージのMolecular Mechanics (MM) 2計算法で行った。分子モデルには複数のキラル中心が存在するため、AutoDockTools (ver.1.5.6)³⁷で部分的な構造の制限を設けてドッキングシミュレーションの過程での異性化を防いだ。レセプターにはCHR結合型とBRZ結合型を選択し、AutoDockToolsでレセプターに水素原子を付加した後、それぞれに対してCRとBRZ2012のドッキングシミュレーションを行った。CRのドッキングシミュレーションでは、C24位のメチル基の立体障害が原因で、CHRの側鎖が収まっていたポケット領域にCRの側鎖が収まる解が得られなかったため、L126の側鎖をフレキシブル設定にし、リガンドと同様に計算の対象とした。ドッキングシミュレーションは、CRとBRZ2012に対してそれぞれ基質ポケットに探索領域として $40 \times 50 \times 60$ 及び $34 \times 40 \times 38$ のグリッドボックスを設け、探索強度を100から200の範囲に設定して実施した。

表 1-2. CYP90B1 の各リガンド結合型の構造データの収集及び構造精密化後の統計値

<i>Data Collection</i>	Uniconazole-bond form		Cholesterol-bond form		Brassinazol-bond form		1,6-hexandiol-bond form	
	Fe-SAD data	High resolution data						
Protein	4N28-CYP90B1	4N28-CYP90B1	4N28-H1 CYP90B1	4N28-H1 CYP90B1	4N28-H1 CYP90B1	4N28-H1 CYP90B1	4N28-H1 CYP90B1	4N28-H1 CYP90B1
Beam source	BL419X (SPring-8)	BL32XU (SPring-8)	BL32XU (SPring-8)	BL26B1 (SPring-8)	BL26B1 (SPring-8)	BL32XU (SPring-8)	BL32XU (SPring-8)	BL32XU (SPring-8)
Wavelength (Å)	1.73900	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
Resolution range (Å)	35.26 - 2.26 (2.34 - 2.26)	45.57 - 1.998 (2.07 - 1.998)	41.52 - 1.79 (1.854 - 1.79)	41.52 - 1.79 (1.854 - 1.79)	49.04 - 2.301 (2.384 - 2.301)	49.04 - 2.301 (2.384 - 2.301)	48.02 - 2.48 (2.569 - 2.48)	48.02 - 2.48 (2.569 - 2.48)
Space group	P21	C2	P212121	P212121	P6122	P6122	P65	P65
Unit cell parameters								
a, b, c (Å)	a = 68.33, b = 103.93, c = 81.36	a = 102.25, b = 57.64, c = 92.28	a = 76.82, b = 80.57, c = 80.03	a = 76.82, b = 80.57, c = 80.03	a = b = 58.86, c = 539.22	a = b = 58.86, c = 539.22	a = b = 146.72, c = 64.61	a = b = 146.72, c = 64.61
α, β, γ (°)	$\alpha = \gamma = 90, \beta = 99.23$	$\alpha = \gamma = 90, \beta = 100.43$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	$\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Total reflections	617467 (57478)	136055 (12992)	218839 (17250)	218839 (17250)	217122 (3393)	217122 (3393)	107777 (10687)	107777 (10687)
Unique reflections	49060 (4449)	35966 (3473)	49003 (4685)	49003 (4685)	25669 (1841)	25669 (1841)	28328 (2805)	28328 (2805)
Multiplicity	6.3 (6.5)	3.8 (3.7)	4.5 (3.7)	4.5 (3.7)	8.5 (1.8)	8.5 (1.8)	3.8 (3.8)	3.8 (3.8)
Completeness (%)	93.3 (92.2)	99.40 (97.61)	99.38 (96.52)	99.38 (96.52)	97.24 (72.28)	97.24 (72.28)	99.78 (99.93)	99.78 (99.93)
Mean I/sigma(I)	14.9 (3.8)	9.16 (2.88)	9.61 (2.37)	9.61 (2.37)	19.21 (1.75)	19.21 (1.75)	10.45 (1.49)	10.45 (1.49)
Wilson B-factor	42.8	19.17	20.09	20.09	35.38	35.38	53.58	53.58
Rmerge (%)	0.089 (0.603)	0.1534 (0.7386)	0.1178 (0.4866)	0.1178 (0.4866)	0.07893 (0.3575)	0.07893 (0.3575)	0.09978 (1.037)	0.09978 (1.037)
Rmeas (%)	0.097 (0.655)	0.1792 (0.8625)	0.1335 (0.5669)	0.1335 (0.5669)	0.08368 (0.4563)	0.08368 (0.4563)	0.1162 (1.206)	0.1162 (1.206)
CC1/2	0.999 (0.971)	0.986 (0.639)	0.99 (0.796)	0.99 (0.796)	0.999 (0.918)	0.999 (0.918)	0.994 (0.492)	0.994 (0.492)
Refinement								
Number of reflections	35817 (3473)	48938 (4684)	25661 (1841)	25661 (1841)	28275 (2805)	28275 (2805)	28275 (2805)	28275 (2805)
Rwork / Rfree	0.1671 / 0.2016	0.1557 / 0.1840	0.2337 / 0.2747	0.2337 / 0.2747	0.1826 / 0.2161	0.1826 / 0.2161	0.1826 / 0.2161	0.1826 / 0.2161
Number of atoms								
Protein	3555	3559	3607	3607	3565	3565	3565	3565
Heme	43	43	43	43	43	43	43	43
Water	342	333	106	106	72	72	72	72
Fe-ligand	20 (uniconazole)	28 (cholesterol)	23 (brassinazole)	23 (brassinazole)	8 (1,6-hexandiol)	8 (1,6-hexandiol)	8 (1,6-hexandiol)	8 (1,6-hexandiol)
Other ligand / Ion	14	31	14	14				
RMSD								
Bond lengths (Å)	0.004	0.019	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.005
Bond angles (°)	0.64	1.51	0.53	0.53	0.78	0.78	0.78	0.78
Average B-factor								
Protein	22.29	23.97	39.58	39.58	58.15	58.15	58.15	58.15
Heme	12.39	14.96	28.34	28.34	42.44	42.44	42.44	42.44
Water	31.45	34.39	35.58	35.58	54.63	54.63	54.63	54.63
Fe-ligand	15.06	14.84	30.51	30.51	65.31	65.31	65.31	65.31
Other ligand / Ion	35.1	39.64	37.57	37.57	48.64	48.64	48.64	48.64

* Other molecules were containing Cl ion and glycerol molecules

参考文献

- 1 Fujioka, S. & Yokota, T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 137-164, (2003).
- 2 Chung, Y. & Choe, S. The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in Arabidopsis. *Crit. Rev. Plant Sci.* **32**, 396-410, (2013).
- 3 She, J. *et al.* Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **474**, 472-U496, (2011).
- 4 Hothorn, M. *et al.* Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* **474**, 467-U490, (2011).
- 5 Santiago, J., Henzler, C. & Hothorn, M. Molecular Mechanism for Plant Steroid Receptor Activation by Somatic Embryogenesis Co-Receptor Kinases. *Science* **341**, 889-892, (2013).
- 6 Fujita, S. *et al.* Arabidopsis CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C-27, C-28 and C-29 sterols. *Plant J.* **45**, 765-774, (2006).
- 7 Asami, T. *et al.* Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in *Planta*. *J. Biol. Chem.* **276**, 25687-25691, (2001).
- 8 Shimada, S. *et al.* Formation and Dissociation of the BSS1 Protein Complex Regulates Plant Development via Brassinosteroid Signaling. *Plant Cell* **27**, 375-390, (2015).
- 9 Gu, M. Y. *et al.* Crystal structure of CYP76AH1 in 4-PI-bound state from *Salvia miltiorrhiza*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **511**, 813-819, (2019).
- 10 Das, D. K. & Medhi, O. K. The role of heme propionate in controlling the redox potential of heme: Square wave voltammetry of protoporphyrinato IX iron(III) in aqueous surfactant micelles. *J. Inorg. Biochem.* **70**, 83-90, (1998).
- 11 Moore, G. R., Harris, D. E., Leitch, F. A. & Pettigrew, G. W. CHARACTERIZATION OF IONIZATIONS THAT INFLUENCE THE REDOX POTENTIAL OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME-C AND PHOTOSYNTHETIC BACTERIAL CYTOCHROMES C₂. *Biochim. Biophys. Acta* **764**, 331-342, (1984).
- 12 Mast, N. *et al.* Structural Basis for Three-step Sequential Catalysis by the Cholesterol Side Chain Cleavage Enzyme CYP11A1. *J. Biol. Chem.* **286**, 5607-5613, (2011).
- 13 Strushkevich, N. *et al.* Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10139-10143, (2011).

- 14 Nagata, N., Min, Y. K., Nakano, T., Asami, T. & Yoshida, S. Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants. *Planta* **211**, 781-790, (2000).
- 15 Omura, T. & Sato, R. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**, 1375-1376, (1962).
- 16 Omura, T. & Sato, R. Fractional solubilization of haemoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 221-224, (1963).
- 17 Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M. & Pangborn, W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* **457**, 219-U119, (2009).
- 18 DeVore, N. M. & Scott, E. E. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001. *Nature* **482**, 116-U149, (2012).
- 19 Fujiyama, K. *et al.* Structural insights into a key step of brassinosteroid biosynthesis and its inhibition. *Nat. Plants* **5**, 589-594, (2019).
- 20 Miyazaki, S., Katsumata, T., Natsume, M. & Kawaide, H. The CYP701B1 of *Physcomitrella patens* is an ent-kaurene oxidase that resists inhibition by uniconazole-P. *FEBS Lett.* **585**, 1879-1883, (2011).
- 21 Noguchi, K., Kuramochi, H., Takeuchi, Y., Konnai, M. & Yoneyama, K. Restoration of gibberellin biosynthesis by 2,6-diisopropylphenoxyacetic acid in uniconazole-treated rice plants. *Plant Growth Regul.* **28**, 67-72, (1999).
- 22 Sekimata, K. *et al.* Brz220 interacts with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase in brassinosteroid biosynthesis, and exerts biological activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 7-12, (2008).
- 23 Sekimata, K. *et al.* A specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Brz2001: evaluation of its effects on *Arabidopsis*, cress, tobacco, and rice. *Planta* **213**, 716-721, (2001).
- 24 Oh, K., Yamada, K. & Yoshizawa, Y. Asymmetric synthesis and effect of absolute stereochemistry of YCZ-2013, a brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 6915-6919, (2013).
- 25 Oh, K. *et al.* YCZ-18 Is a New Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor. *PLoS One* **10**, 20, (2015).
- 26 Yamada, K., Yajima, O., Yoshizawa, Y. & Oh, K. Synthesis and biological evaluation of novel azole derivatives as selective potent inhibitors of brassinosteroid biosynthesis.

- Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2451-2461, (2013).
- 27 Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D* **66**, 125-132, (2010).
- 28 Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D* **69**, 1204-1214, (2013).
- 29 Terwilliger, T. C. *et al.* Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. *Acta Crystallogr. D* **65**, 582-601, (2009).
- 30 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674, (2007).
- 31 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486-501, (2010).
- 32 Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D* **67**, 355-367, (2011).
- 33 Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D* **68**, 352-367, (2012).
- 34 Moriarty, N. W., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. D* **65**, 1074-1080, (2009).
- 35 Gunsalus, I. C. & Wagner, G. C. Bacterial P-450_{cam} methylene monooxygenase components: cytochrome *m*, putidaredoxin, and putidaredoxin reductase. *Methods Enzymol.* **52**, 166-188, (1978).
- 36 Saito, S. *et al.* Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol.* **134**, 1439-1449, (2004).
- 37 Trott, O. & Olson, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461, (2010).
- 38 Tanaka, M., Nagano, S., Ishimori, K. & Morishima, I. Hydrogen bond network in the distal site of peroxidases: Spectroscopic properties of Asn70->Asp horseradish peroxidase mutant. *Biochemistry* **36**, 9791-9798, (1997).

3章 ジャガイモ毒ソラニンの生合成を担う2OGDと結晶構造解析

緒言

3-1. 新規ソラニン生合成経路とナス科植物が有する2OGDの位置・立体選択的酸化反応

植物は様々な生理活性を示す天然物を生産しているが、同一の植物種間では天然物の基本的な骨格はある程度保存されている場合が多い。トマトやジャガイモなどが属するナス科植物ではステロイド骨格を有する多様な天然物が見出されており、例えば、ジャガイモの芽に含まれる毒成分である α -solanine (solanine) や、未成熟のトマト果実に含まれる α -tomatin (tomatine) などのステロイドグリコアルカロイド (SGA)、また、ヤムイモから得られるサポニン類である dioscin などが該当する (図3-1)。これらナス科に見出されるステロイド化合物は様々な利用価値が期待されており、例えば豊富に得られる dioscin は動物性ステロイドの合成中間体として利用されている他、害虫の忌避効果を持ち、人体への毒性が非常に低い tomatine¹ は天然由来の農薬として利用が期待されている。一方で、ジャガイモに含まれる solanine は摂食によって食中毒を引き起こすため、現代でも solanine による食中毒被害がしばしば報告²されており、食の安全性を脅かす化合物として知られている。そのため、様々な利用価値や生理活生を示すナス科のステロイド化合物の生合成経路は、医薬品や農薬への応用だけでなく、毒性を低減させた植物の育種という側面からも重要視されている。特に solanine に関しては、ジャガイモが世界での消費量が多く、一部の地域では主食となっている食物であるため、その生合成経路の解明が期待されている。

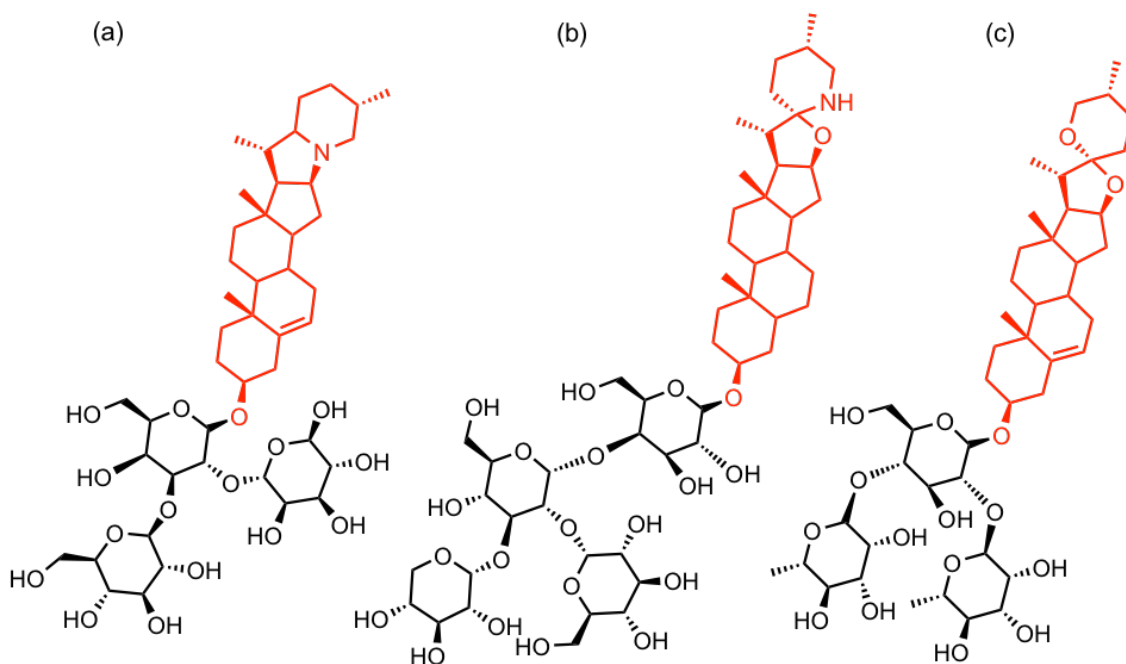


図3-1 ナス科植物が生産するステロイド骨格を有する天然物

(a) solanine、(b) tomatine、及び (c) dioscinの構造。赤い部分はステロイド骨格を示す。

現在までに、水谷らによってsolanine生合成の序盤を担う酵素群が同定されている。具体的には、ジャガイモに蓄積されたcholesterol (CHR) を出発物質とし、CYP72A188 (PGA2) による22位の水酸化、CYP72A208 (PGA1) による26位の水酸化、および2OGDファミリーに属する16DOXによる16位の水酸化を経て、16,22,26-triOH CHRが生産され、次いでCYP88B1 (PGA3) の26位のアルデヒド化、およびアミノトランスフェラーゼ (PGA4) による26位のアミノ化を経るまでの生合成経路が明らかにされている³⁻⁶ (図3-2, pathway B)。一方、最近水谷らによって、ジャガイモが生産するsolanineは、同じナス科植物であるトマトが生産するtomatineの前駆体として知られるdehydrotomatidineを経由することによって生合成されることが提案されている。水谷らの提案では、ジャガイモ体内でdehydrotomatidineが生合成された後に、solanine生合成経路に関わるグルクロン酸転移酵素 (UGT) によって糖鎖の付加を受け、spirosolane骨格からsolanidane骨格へ変換されることで、solanineが生合成されると推測されている。実際、水谷らはspirosolane骨格からsolanidane骨格を作り出す酵素16DOX-1を単離したのち、この骨格の構築は酸化酵素である2OGDが触媒していることを明らかにし、solanine生合成経路全体の概要を提唱した (図3-2, pathway A)。

一般的に、2OGDは単純な水酸化酵素であるため、spirosolane骨格の水酸化の後にsolanidane骨格へ再構築されると考えると、水酸化部位はsolamarineのC16位を水酸化することが最も妥当であると考えられたが、生成物である16-OH solamarineの検出は困難であるため、16DOX-1が実際に16位を水酸化しているかどうかは推定の域を出ていない。そこで本研究では、水谷らによって提案されたsolanine生合成の鍵反応となる、自発的な骨格の再構築を促す酸化的修飾を触媒する16DOX-1についての反応機構を明らかにすることを目的とし、X線結晶構造解析によって基質の結合様式を明らかにすることで、2OGDによるsolanidane骨格の構築メカニズムを解明することを目指した。

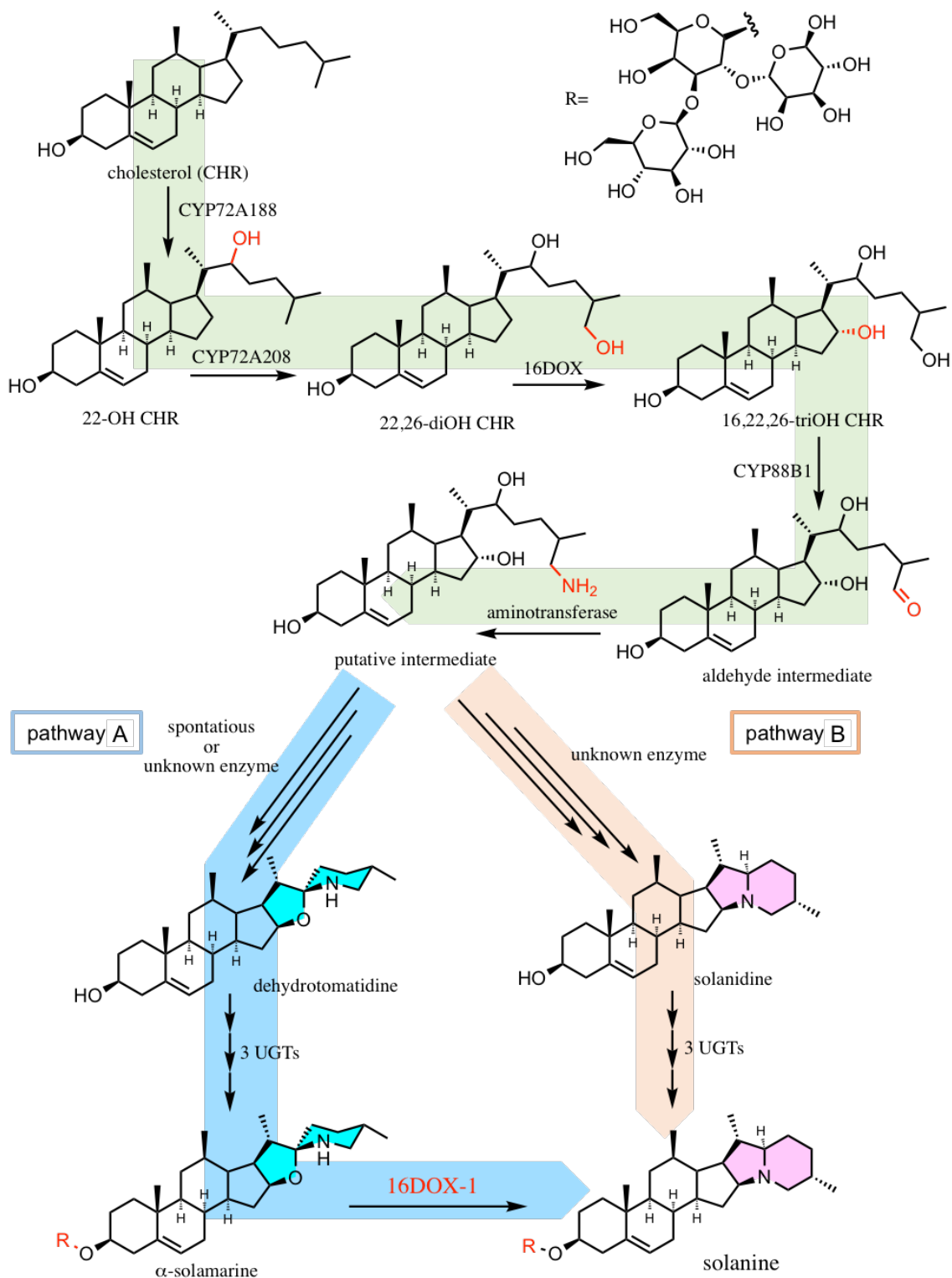


図3-2 ソラニンの推定生合成経路

pathway Aは論文として発表されていないが、水谷らの実験事実に基づいて提唱された、spirosolane骨格 (赤塗りされた骨格部分) で、pathway Bは現在報告されている生合成経路 (緑) から solanidane骨格 (青塗りされた骨格部分) が構築される推定経路を示している。

結果・考察

3-2. 16DOX-1ホモログのtomatine結合型の結晶構造解析と全体構造

水谷らは、ジャガイモ由来の16DOX-1に対して相同性を示し、同様の機能を持つ遺伝子を他種のジャガイモからも複数見出した (図3-3)。

16DOX-5	MASTKVTIPTIDFFNSELKPNTPQWELTKVQVFEALQFEGCFEAIYNKVPNEIREGMFDT
16DOX-2	MASTKVKIPTINFENSELKPNTPQWESTKVQVFEALQFEGCFEAIYDKVPNEIREGIFDT
16DOX-3	MASTKVKIPTIEFCNLELKPNTPQWESTKVQVFEALKEFGCFEARYDKVPNEIREGMFDT
16DOX-4	MASTKVKIPTIDFCSELELKPNTPQWESTKVQVFEALKEFGCFEALYEVN-NEIREGMFDT
	*****.****.* . ***** *****:***** *: *****:***
16DOX-5	LKEVDFPLSKLIEYREKPFHIYDGGIPSVPLFGSVYSADLVLPNSVETFANTFWSHGNP
16DOX-2	LKEVDFPLSKLIEYREKPFHVYDGGIPSVPLFGSVYSADLVLPNSVETFANTFWPHGNP
16DOX-3	LKEVDFPLSKLIEYREK-PHIYDGGIPSIPLYGSVSSADLVLPNSVETFANTFWSGDNP
16DOX-4	LKEVDFPLSKLIEYREK-PHIYDGGIPGIPLYGSVSSADLVLPNSVETFANTFWSGDNP
	***** ***** *:*****.:::** *****.***
16DOX-5	NFSNVAKSYFKQLMELNGMVEKMLVLESLGLKNYIDFLNSNVYMSRFTNYKVIKGENENK
16DOX-2	NFSNVAKSYFKQLMELNDMVKKMLVLESLGLKNYIGFLNPNVYMSRFTNYKVIKGENQNK
16DOX-3	NFSNVAKSYFKQLMELNDMVEKMLVLESLGQKNYIDFLNSNVFVSRFTNYKVIKGEDENK
16DOX-4	NFSNVAKSYFKQLMELNDMVEKMLVLESLGKTNYIDEILNSNVFVSRFTSYKVIKGEDENR
	*****.****.*:***** .***.*:**.***:****.*****:***:
16DOX-5	SGLPSHTDSSYLTIKQNGQLQVLYKNGEWIELNHTSPNSYIVLSADALMAWTNDRDLS
16DOX-2	SALPSHTDSSYLTIKQNGQLQVLYKNGEWIELNHTSPNSYIVLSADVFMWTNDRDLS
16DOX-3	SELPHTDSGYLTIKQNGQLQVLYKNGEWIELNHTSPNSYIVLSADAFMAWTNDSLTS
16DOX-4	SELPHTDSGYLTIKQNGQLQVLYKNGEWIELNHTTPNSYIVLSADAFRAWTNDSLTS
	* **,****.*****:*****:*****:*****.*****:***** **
16DOX-5	AQHRVVTGDKDRFSVQLFSLVNPDYTLKVPKELVDEEHPLMYKPFKMPYKYLMLGAK
16DOX-2	AQHRVVTGDKDRFSIQVFSFPNPDYTKVPQELVDEEHPLMFKPKLPEFNKYIKLGAK
16DOX-3	AEHRVVTGDKDRLSIQLFSFPKSRFCCEGPKRISGZ-----
16DOX-4	AEHRVVTGDRDRLSIQLFSFPKSRFCCEGPKRISGZ-----
	*:*****:***:**:**: .: .: .: *::: .
16DOX-5	NGLGVKNYCGLZ
16DOX-2	NGPGLKNYCGY-
16DOX-3	-----
16DOX-4	-----

図3-3 16DOX-1と相同性を示す2OGD。

[*]は完全に保存されている配列を、[::]は保存度合いが高く、異なるアミノ酸残基でも性質が似ている配列を、[.]はある程度保存されている配列を示している。

結晶構造解析にあたり、酵素の発現や精製などの過程で最も適したサンプルとして16DOX-2が最も適していたため、16DOX-2を対象に結晶構造解析を行った。16DOX-2が属する2OGDファミリーは、精製する過程で補因子である2OGと鉄イオンがタンパク質から解離することがよく知られているため、補因子の2OG、およびFe³⁺の代わりに阻害剤として働くZn²⁺を添加し、酵素を再構成した。また基質のsolamarineの入手は困難であったため、solamarineと構造が類似しており、同様の触媒反応を受けるtomatineを基質アナログとして結晶化に用いた。

結晶構造解析の結果、tomatine/ Zn^{2+} /2OG/16DOX-2複合体の結晶構造を1.83 Åの分解能で決定した。16DOX-2は非対称単位中に2分子 (chain A、chain B) 含まれていた (図3-4a)。chain Aとchain Bはそれぞれの分子表面において、添加した Zn^{2+} を介して2OGDで見られる一般的な金属結合部位のモチーフと酷似した構造を形成していた (図3-4b, c)。また、chain Aとchain Bはそれぞれが接触する分子表面でCysを介したジスルフィド結合が確認された (図3-4d)。分子表面での金属錯体構造の形成に関わる領域は、精製の過程で使用したスロビンによって切り残された非天然の配列であり、本来の16DOX-2にはない配列である他、ゲルろ過の結果ではモノマーと考えられる分子量の位置で溶出されていることから、16DOX-2は溶液中では単量体で働くと考えられた (図3-4)。また、高分解能のデータセットを収集した結晶は、結晶成長に2-4週間程度かけた試料であるため、分子表面のジスルフィド結合は結晶化の過程で偶然的に形成されたと考えられた。

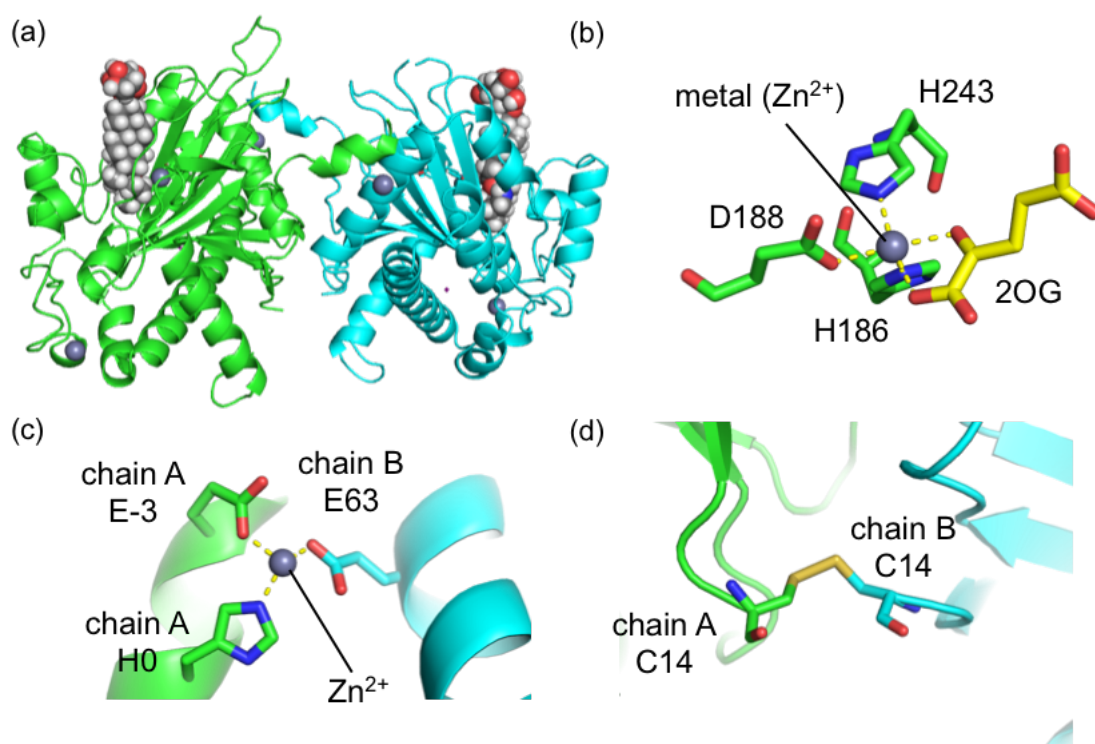


図3-4 16DOX-2の結晶構造

(a) 非対称単位中に見られた2分子の16DOX-2と全体構造。chain AおよびBはそれぞれ緑とシアンで示している。表示している球状モデルは基質アナログであるtomatin、もしくは Zn^{2+} を示している。(b) 16DOX-2金属結合部位構造を示している。この構造は2OGDに保存された金属結合モチーフであった。(c) 分子表面で確認された金属結合部位に見られるモチーフ様の構造。(d) chain Aとchain Bの接触領域で確認されたジスルフィド結合を示している。

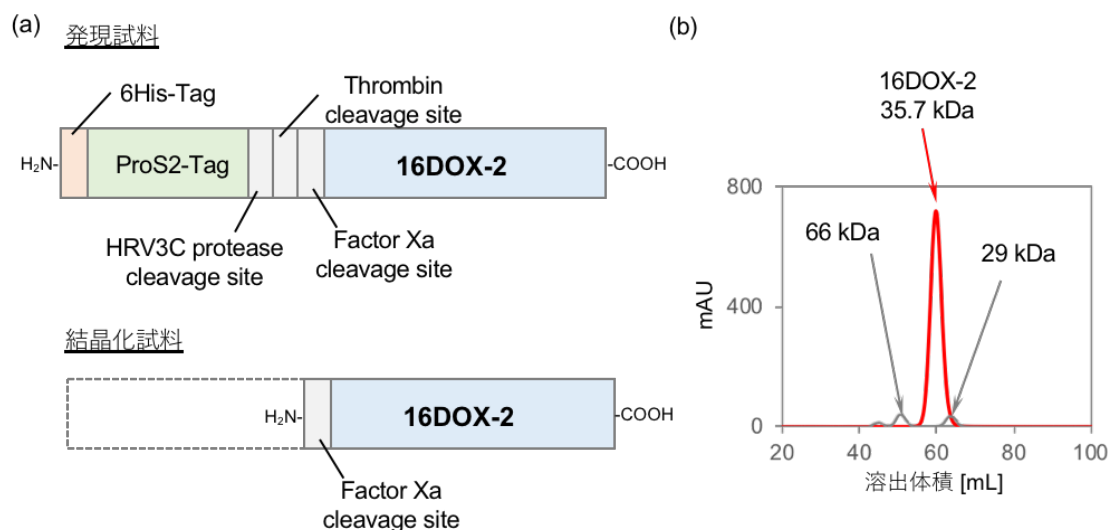


図3-5 結晶化に用いた16DOX-2のサンプルのプロファイル

(a) 結晶化に用いた16DOX-2の配列の模式図 (b) ゲルろ過クロマトグラフィーによる16DOX-2の分析結果。赤が16DOX-2で灰色が標準タンパク質溶液を示している。標準タンパク質はウシ血清アルブミン (BSA: 66 kDa) と炭酸脱水素酵素 (29 kDa) を用いた。分析にはHiLoad Superdex75 16/600 (GE Healthcare) を用いた。

16DOX-2の全体構造としては、2OGDファミリーによく保存されている Double Stranded β -Helix (DSBH) モチーフを形成しており、典型的な2OGDと同様の立体構造を有していた (図3-6a)。また、2OGDの持つDSBHモチーフは、その内部に補因子である2OGと金属の結合部位が存在するが、16DOX-2では2OGとの相互作用にR253が、金属イオンの配位にはH186、D188、H243が関わっていた (図3-6b)。また、明らかにした16DOX-2の全体構造は、植物ホルモンのauxinの一種であるindole-3-acetate (IAA) を代謝する2OGD (OsDAO) の全体構造⁷と最も似ており、特に2OGDで特徴的なDSBHモチーフの主鎖の位置は高度に保存されていた (図3-7a)。IAAは非常に小さい分子である一方で、tomatinは比較的大きな骨格を持つ低分子であるが、これら2OGDはアミノ酸配列の違いや基質ポケット付近の構造の違いをうまく利用することでそれぞれの基質を認識していると考えられる。16DOX-2の場合は、OsDAOにはないループ構造を基質ポケット付近に有しており、実際にこのループ構造がtomatinに沿う形で配置されていることから、16DOX-2にとって重要な構造であると考えられる (図3-7b)。一方で、報告されているOsDAOの結晶構造は、公開されているデータを参照すると、金属が含まれておらず、2OGDやIAAのモデルは電子密度にフィットしていないことから、OsDAOはアボ型の構造であると推測される。16DOX-2はアボ型OsDAOと構造的な類似性を示したが、OsDAOが金属や2OG、及びIAAと結合した場合は、基質ポケット周辺の立体構造は大きく変化すると予測される。

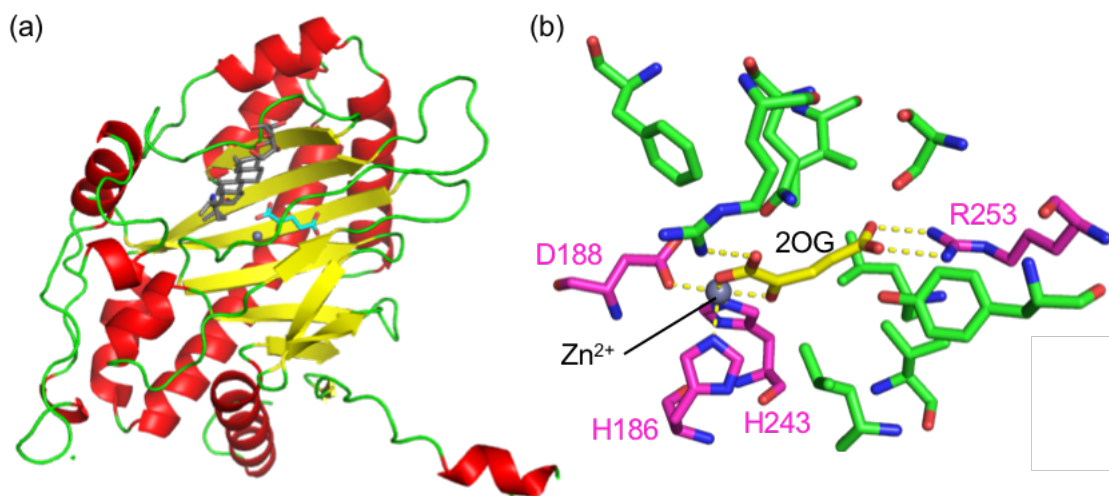


図3-6 16DOX-2の単量体の立体構造と2ODGモチーフ

(a) 全体構造を示しており、赤が α -ヘリックス、黄が β -シート、緑がループ構造を示している。(b) DSBHモチーフ内部の補因子結合部位の構造を示しており、緑は補因子を取り囲むアミノ酸残基を、マゼンタはほぼ全ての2OGD間で保存されており、補因子との結合に不可欠なアミノ酸を示している。

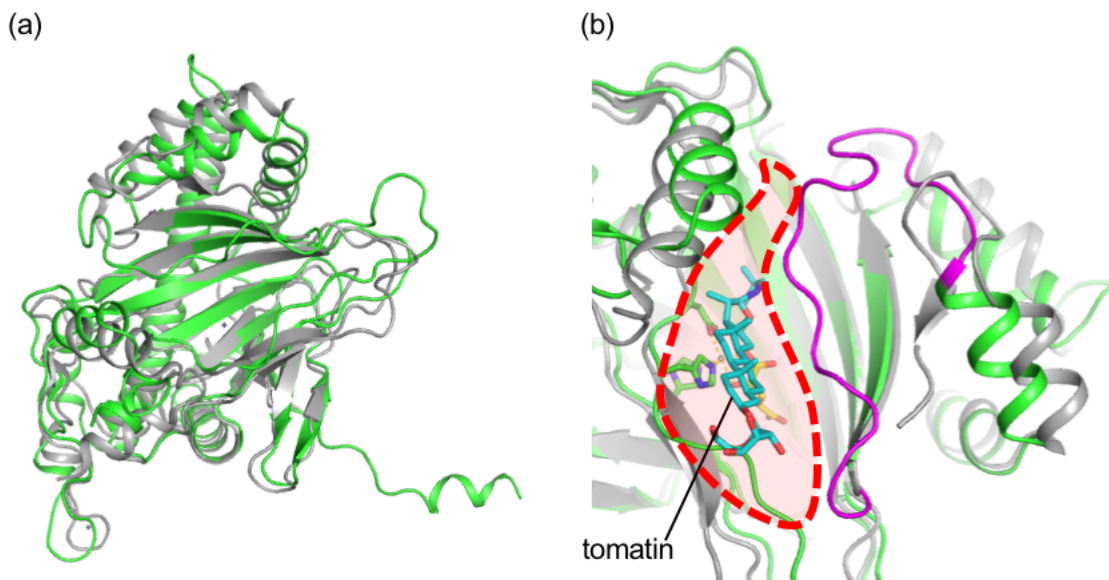


図3-7 16DOX-2とIAAを代謝する2OGDの立体構造の比較

立体構造の比較は16DOX-2のchain AとIAAを代謝する2OGDのchain Aを利用した。緑が16DOX-2で、灰色がIAAを代謝する2OGDを示している。(a) 2者を重ね合わせた図を示しており、RMSDは2.351 Åだった。(b) 基質ポケット付近の構造的差異を示しており、マゼンタは16DOX-2のみに存在したループ構造を示している。また、赤枠で囲んだ領域は16DOX-2の基質ポケットを示している。

3-3. tomatineの結合様式

16DOX-2の本来の基質はsolamarineであるが本研究ではsolamarineと構造が非常に似ているtomatineを用いることで基質アナログ結合型の結晶構造を決定することに成功した(図3-8)。

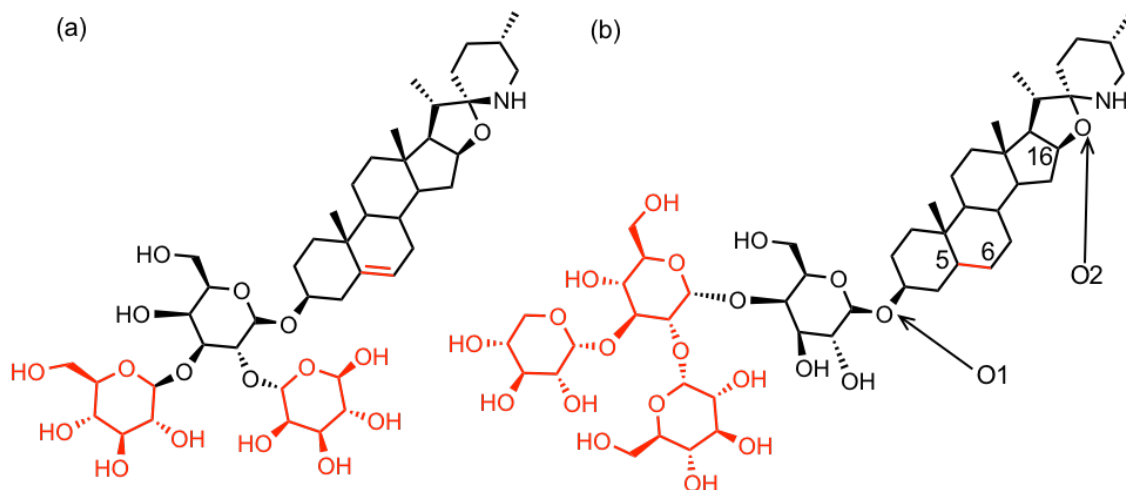


図3-8 solamaeineの化学構造 (a) と tomatineの化学構造 (b)

結晶構造解析の結果では、tomatinの糖鎖部分の電子密度はほとんど確認できず、モデルとしてはステロール骨格と直接グリコシド結合を形成している1つ目の糖鎖であるgalactoseまでしか配置できなかった(図3-9a, b)。これは、16DOX-2が糖鎖をほとんど認識していない、もしくは酵素への結合は糖鎖を必要とせず、糖鎖自体は可溶性酵素である2OGDへのアクセスを容易にするために付加されたものであると考えられる。また、本来の基質であるsolamarineとtomatineのステロイド骨格における違いはC5-C6間の不飽和結合の有無のみであるが、この領域はV90、P91、L183、P184の疎水的な側鎖で形成された溝に「ほどよい程度」で収まっており、C5-C6間の結合を厳密に認識していないと考えられた。そのため、本来の基質ではないtomatineも16DOX-2へ結合することができたと考えられる。tomatineの大部分は炭化水素からなる疎水的な化合物であるため、16DOX-2への結合は疎水性アミノ酸との疎水的な相互作用によって維持されていた。一方で、tomatineに含まれるヘテロ原子の一つであるO2はR166と水素結合を形成していた他、tomatineに含まれるN原子はP88の主鎖のカルボニル酸素と水素結合を形成していた(図3-9c)。一般的に、疎水的な相互作用は特異性が高くないため、疎水的な化合物を基質とする酵素の基質特異性は、ポケット構造と基質の構造的な相補性や、数少ない水素結合などの極性相互作用によって生み出される。そのため、16DOX-2による基質認識には、基質との水素結合に関わるR166とP88や、基質ポケットの構造を形成するV90、P91、L183、P184が非常に重要な役割を果た

していると考えられた。また、金属イオンに配位しているH186とD188は基質ポケット構造の形成にも関わっており、H186は側鎖の持つイミダゾール環の平面構造が、tomatineの有する比較的平面なステロイド骨格に対して水平に配置されていたことや、D188の主鎖の疎水的な領域であるC_α部分が基質ポケットの内壁の一部となっていたことが、基質への親和性を高めていると考えられた。

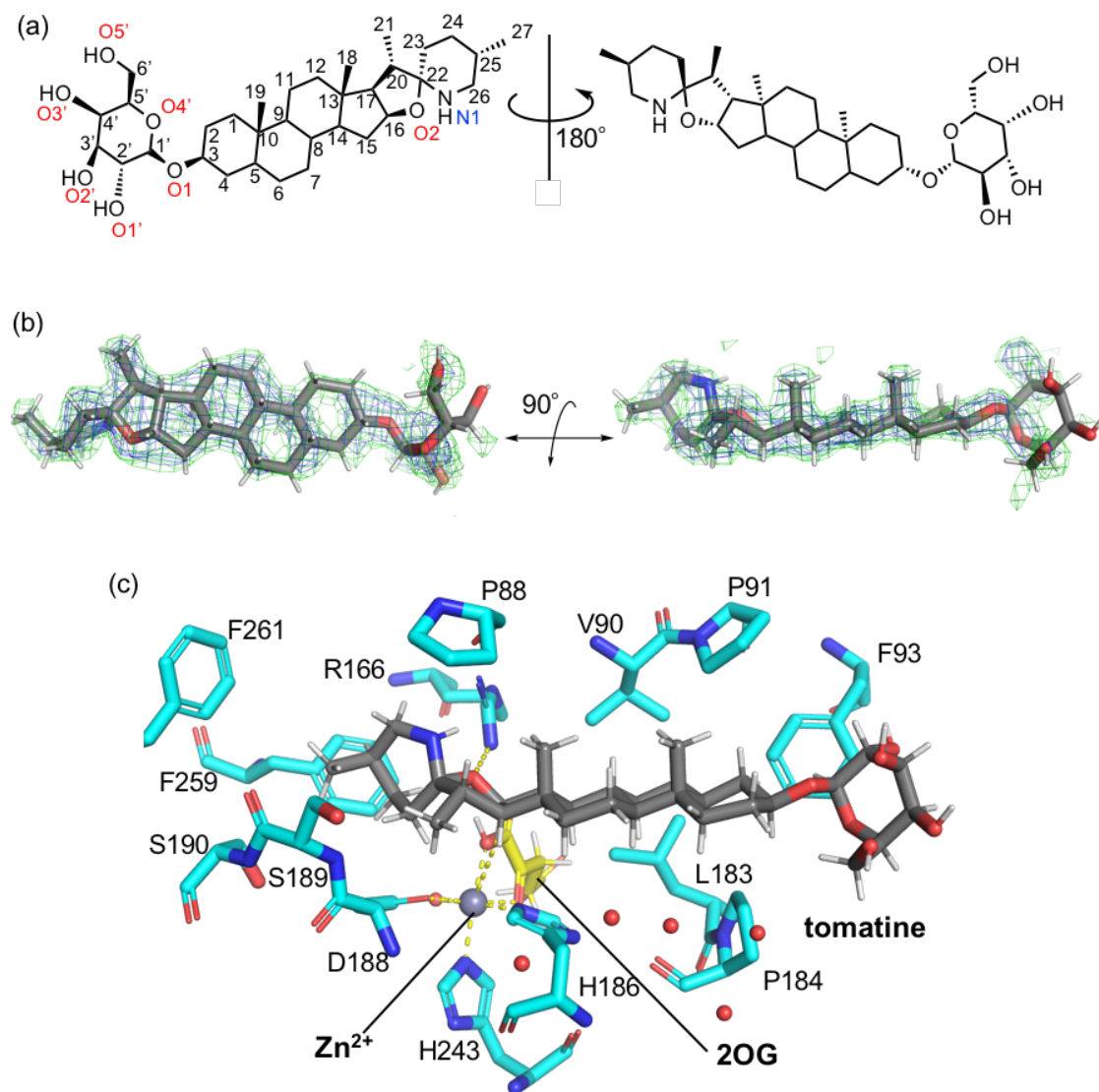


図3-9 16DOX-2に対するtomatineの結合様式

(a) 本研究の結晶構造解析において、トマチンの分子モデルとして使用したtomatine galactosideの構造と各原子の番号を示している。炭素原子の番号は黒、酸素原子の番号は赤、窒素原子の番号は青で示している。(b) メッシュはtomatineのPolder mapを示しており、青は3.0 σ 、緑は2.0 σ を示している。(c) tomatineの結合様式と基質ポケットを構成する各アミノ酸残基を示している。黄色の破線は水素結合を示している。

3-4. C16位水酸化を起点としたsolanidane骨格構築メカニズム

solanine生合成に関わる2OGDの16DOX-1は、solamarineの持つspirosolane骨格からsolanineの持つsolanidane骨格を形成することが、水谷らの実験によって明らかとなっている。これはC16位への水酸化によってspirosolane骨格が不安定化し、自発的な環構造の再構築が起きたものであると推測されている（図3-10）。

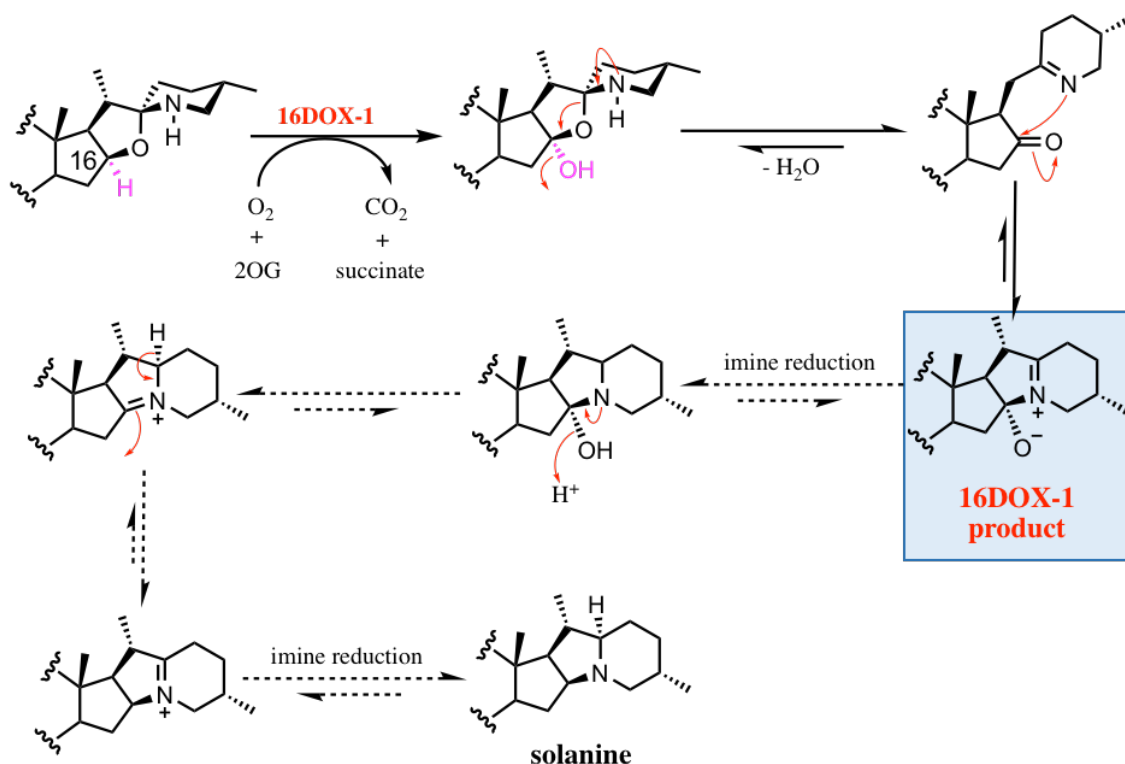


図3-10 spirosolane骨格のC16の水酸化による不安定化とsolanidane骨格への再構築の推定反応機構。

赤矢印は電子の移動を示している。両方向片矢印は自発的に進むと考えられている反応であり、破線で示した両方向片矢印は推定されている反応機構であり、図の流れで自発的に反応していると推定されている。青枠で囲んだ構造は、水谷らによって実際にNMRで構造決定された16DOX-1の反応生成物を指している。

tomatine結合型16DOX-2の結晶構造では、金属中心とtomatineのC16の距離が4.5 Åの距離に配置されており、tomatineを構成する炭素原子の中で最も金属に接近していた。さらに、酸素原子が挿入されるC16の水素原子の位置は、金属との距離が3.5 Åの距離に配置されており、C16-金属間の距離と同様に、水素原子も金属に対して最も接近していた（図3-11）。一般的な水酸化を触媒する2OGDでは、水酸化に適した炭素-金属間の距離は4.0-5.0 Å程度とされている⁸⁻¹⁰。そのため、16DOX-2がC16を位置特異的に水酸化することは可能であり、16DOX-2は典型的な水酸化を触媒すると考えられた。このことから、16DOX-2やそれらホモログであるsolanidane骨格を構築する2OGDが触媒する反応は、C16位の水酸化反

応であり、典型的な2OGDと同様に高原子価鉄オキシの酸化活性種がC16の水素原子を引き抜き、これによって生成した基質ラジカルへヒドロキシラジカルが再結合することによって水酸基が導入されると考えられる (図3-12)。

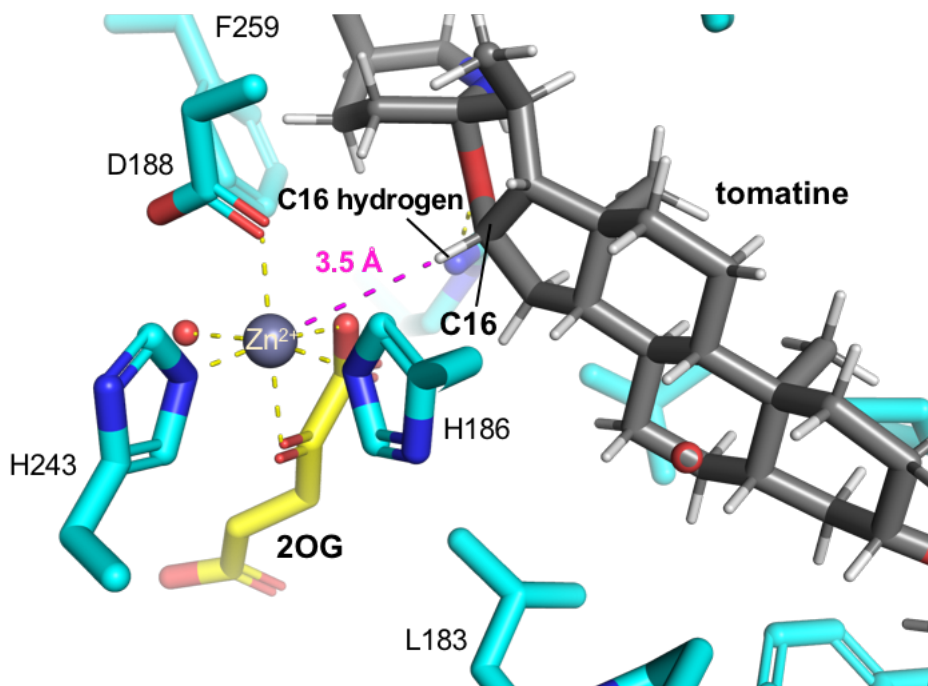


図3-11 金属結合部位と基質の配置

黄色の破線は金属に対する配位結合を示している。マゼンタの破線はC16の水素原子と金属を直線的に結んだものであり、その距離は3.5 Åだった。

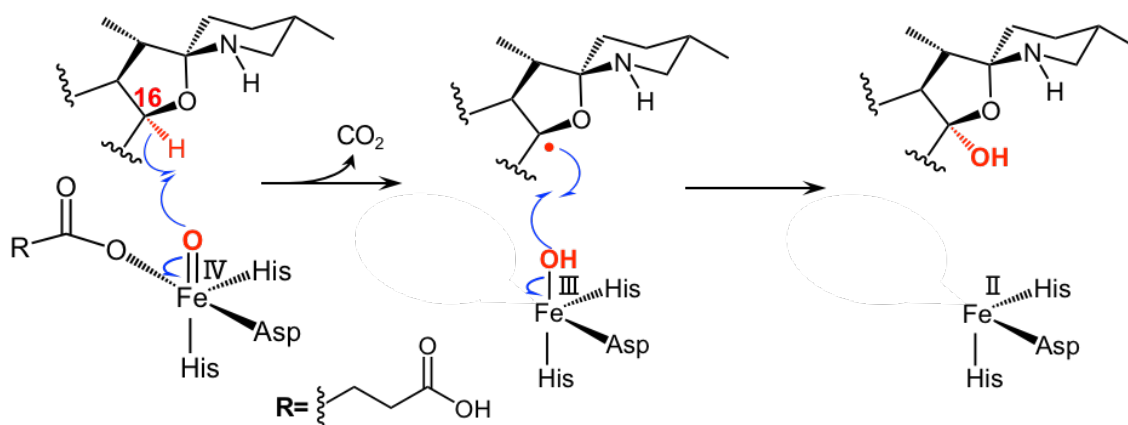


図3-12 16DOX-2によるC16水酸化の反応機構

3-5. solanidane骨格の構築に伴う毒性の発現とナス科植物由来のSGA研究への展望

食の安全に関わるジャガイモの毒の生産メカニズムを理解することは、毒のないジャガ

イモの育種や、毒の生産を抑える薬剤の開発などに重要な情報となる。現在ではジャガイモ毒solanineの生合成経路の全容は報告されていないものの、共同研究を行なっている水谷らの研究から、現時点でsolanineの生合成については大部分が明らかとなっている。トマトに含まれるSGAのtomatineは、中毒等による被害の報告例が一件もなく、ヒトに対しての毒性は極端に低が、一方で、ジャガイモ毒のsolanineの毒性は非常に強く、食中毒の報告例は後を絶たない。solanineは神経伝達物質であるacetylcholineの加水分解酵素acetylcholineエステラーゼ (AChE) を阻害することで毒性を示すことが知られている^{11,12}。AChEは非常に広い疎水的な基質ポケットを有しており、蛍光物質のthioflavin Tや、AChEの阻害剤として知られる(-)-galanthamine、疎水性リガンドのCPT-11など、様々な平面性の高い疎水性リガンド (図3-13) が結合した結晶構造が明らかにされている¹³⁻¹⁵ことから、立体的な骨格であるspirosoleane骨格はAChEへの結合が難しく、平面的かつ疎水的なsolanidane骨格を有するsolanineはAChEを阻害することが容易に推測できる。そのため、tomatineとsolanineの毒性の違いは、tomatineのspirosoleane骨格とsolanineの持つsolanidane骨格が大きく関与していると考えられ、この骨格構築の鍵反応を担う酵素16DOX-1は、ジャガイモが毒を生産する上で重要な役割を果たしている。

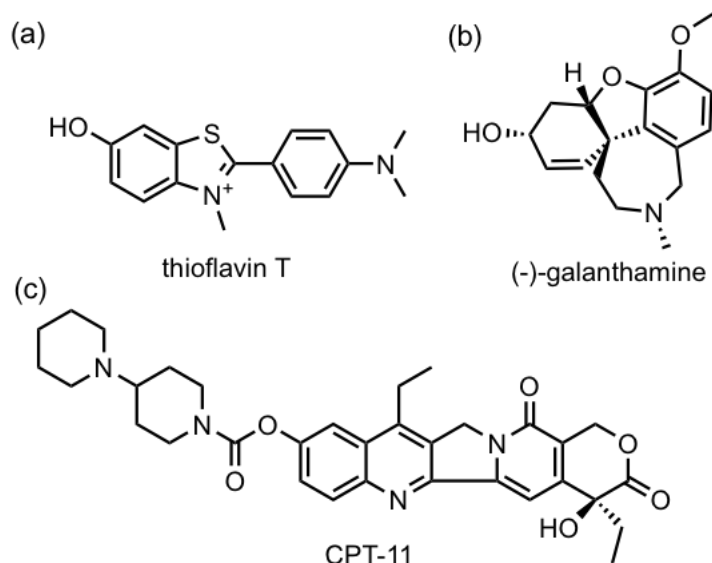


図3-13 AChEに結合する平面性の高い疎水性リガンド

本研究では16DOX-1のホモログである16DOX-2のtomatine結合型の結晶構造を決定し、今まで推測の域を超えていなかったsolamarine C16位水酸化酵素としての機能を明らかにし、基質の結合様式と水酸化メカニズムを明らかにした。また、solanineの植物毒の原因と考えられるsolanidane骨格を構築する酵素の立体構造を分子レベルで明らかにすることができたため、solanine生合成の阻害剤の開発が可能となった。C16位を水酸化する2ODGの

基質であるsolamarineの生物活性自体は未だ調べられていないものの、tomatineとほとんど同様の構造を持つことから、昆虫の忌避効果があると期待される。そのため、16DOX-1を阻害する薬剤が開発されれば、毒であるsolanineの生産を抑えるだけでなく、忌避効果のあると考えられるsolamarineを蓄積させ、害虫による食害を抑えることも可能であると考えられる。

また、soramarine C16位水酸化酵素はジャガイモから数種類のホモログが見出されているが、ジャガイモの近縁種である他のナス科植物は、solanineと構造が類似したSGAを生産することが知られているため、一部のナス科植物についてはsoramarine C16位水酸化酵素のホモログを有している可能性が示唆されている。実際、ナス科植物のトマトは果実の成熟の過程でtomatineを様々な経路で代謝することが明らかとなっている^{16,17}が、それらの初発反応は全て16DOX-1と相同性を持つ2OGDであることが判明している。そのため、本研究成果はトマト内で行われるtomatine代謝についても構造生物学的な知見をもたらしたと考えられ、延いては、SGAを生産する様々なナス科植物のSGA生合成・代謝経路を解き明かす鍵になることが期待される。

実験手法

3-6. 発現

ジャガイモ (*S. chacoense*) 由来16DOX-2の発現用プラスミドのpCold ProS2は神戸大学大学院農学研究科の水谷正治准教授に提供して頂いた。このプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、50 mg/mL Ampを含んだLB寒天培地に塗布し、37 °Cで一晩静置することで形質転換体を獲得した。得られた形質転換体大腸菌を37°C下で50 mg/mL Ampを含んだLB培地を用いて前培養した後、50 mg/mL Ampを含んだTB培地に植菌し、37°Cで振盪培養した。OD₆₀₀が0.5を超えたら、培地を氷上に移して15-30 min程度静置して十分に冷却し、0.1 mM IPTGを加えて15°Cで24 h振とう培養した。その後、培養液を4°C、6,640gの条件で遠心分離し、上清を破棄して菌体を回収した。菌体は-80 °Cで保存した。

3-7. 精製

凍結した菌体を解凍し、10 mM imidazoleと10 mM PMSFを添加したbuffer A (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 10 %(v/v) Glycerol) で菌体を懸濁し、超音波処理した。得られた懸濁液を38,900 g、4°Cで30 min遠心分離して上清を回収した後、Ni-NTA agarose (Qiagen) カラムに入れ、上清に含まれる16DOX-2を担体へ結合させた。担体の体積の10倍量の30 mM imidazoleと0.5 mM 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl Fluoride Hydrochloride (ABESF) を含んだbuffer Aで洗浄し、200 mM imidazoleを含んだbuffer A

で溶出した。その後、サンプル中の総タンパク質量1 mgに対してThrombinを1.0 U添加し、buffer B (100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH7.5、10 % (v/v) Glycerol、1 mM DTT) を用いて4 °C下で18 h透析処理した。Thrombinで消化した試料をNi-NTA agaroseに通すことで、未消化の試料と6His-Tagが付加したProS2-Tagを担体に結合させ、Tagが除去された16DOX-2を素通り画分で回収した。得られた試料の塩濃度を下げるために、buffer C (50 mM Tris-HCl pH8.0、10 % (v/v) Glycerol、1 mM DTT) で希釈して、試料をイオン担体 (HiTrapQ, GE Healthcare) へ結合させ、buffer Cと1.0 M NaClを含んだbuffer Cによるグラジエントを利用して試料を溶出させた。最後に、1 mM DTTを含んだbuffer Aを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、16DOX-2の精製を調製した。精製した試料はAmicon Ultra-15を用いて結晶化buffer (100 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH7.5、2 mM DTT) への置換と濃縮を行い、20もしくは25 mg/mL 16DOX-2溶液を調製した。タンパク質濃度はNano Drop (Thermo Scientific) による280 nmの吸光度の測定から算出された値を参考にした。

3-8. 結晶化.

全ての結晶化はsitting蒸気拡散法を用いて実験を行い、各種リザーバー溶液とタンパク質溶液を1 μ L : 1 μ Lで混合して20°C下で結晶化を実施した。Zn-SAD用の結晶は以下の手順で調製した。まず結晶化bufferに置換した16DOX-2溶液を25 mg/mLに調製し、10 mM 2OG、7.0 mM ZnSO₄、1.5 mM tomatidineを添加したタンパク質溶液Aを調製した。これとリザーバー溶液A (0.15 M NH₄Cl、27 % (w/v) PEG3,350) を混合し、1-2週間程度静置することで結晶を得た。一方で、同様の手法では基質ポケットにおけるtomatineの占有率が非常に低いことが明らかとなっていたため、tomatine結合型の高分解能データセットを得るための結晶の調製を行なった。tomatine結合型の結晶は、タンパク質溶液B (20 mg/mL 16DOX-2、5.6 mM 2OG、5.6 mM ZnSO₄) とリザーバー溶液B (0.2~0.3 M NaI、13~18 % (w/v) PEG3,350) を混合し、1-2週間程度静置することによって基質フリーの16DOX-2の結晶を調製した。その後、この結晶をソーキング溶液 (0.15 M NaI、30 % (w/v) PEG3,350、5 % (v/v) Glycerol、5.6 mM 2OG、5.6 mM ZnSO₄、20 mM tomatine、5 % (v/v) ethanol、8.2 % (w/v) 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) に4 °C下で6 h浸すことによって調製した。

3-9. 回折データの収集、構造決定

全ての結晶はクライオプロテクタントで処理した後に、100 Kの窒素ガス気流下で瞬間的に凍結させ、液体窒素下で保存した。Zn-SAD用16DOX-2の結晶は、クライオプロテクタ

ント溶液 (0.25 M NH₄Cl、0.1 M Na₂SO₄、38 % (w/v) PEG3,350) に5-10分浸し、その後凍結した。tomatine結合型16DOX-2の結晶は、ソーキング溶液に6 h浸した後に、そのまま凍結した。

X線回折実験はSPring-8のビームライン (BL) BL26B1、BL32XU、BL41XUもしくはフォトンファクトリーのBL1A、およびBL17Aを利用し、100 Kの窒素ガス気流下で実施した。回折データのintegrationとscalingにはXDS¹⁸パッケージもしくはCCP4パッケージのpointless¹⁹、及びaimless¹⁹を使用した。16DOX-2の結晶は阻害剤として添加したZnイオンを含んでいたため、初期位相の決定は、Zn原子の吸収端近傍である波長1.2825 ÅのX線を用いてデータセットを取得し、単波長異常分散 (SAD) 法を利用することで決定した。初期位相の決定にはCCP4パッケージのphsaser SAD pipeline²⁰を用いた。Zn原子位置の探索、位相の計算、位相の改良および自動モデル構築はCCP4パッケージのphsaser SAD pipelineを用いた。このときに得られたポリアラニンモデルとZn原子の位相を利用し、phsaser SAD pipelineを使用してMR/SAD法を適用することにより全体構造を決定した。16DOX-2の高分解能データは、0.999994 Åの波長のX線でデータセットを取得し、Zn-SADで構造決定したモデルと鑄型としてMR法を用いることにより、位相を決定した。MR法はCCP4パッケージのPhaserMR²⁰を用いた。分子モデルの構築はCoot²¹を利用し、構造精密化にはCCP4パッケージのRefmac5²²とPHENIXパッケージのPhenix Refine²³を用いた。tomatine分子の初期モデルはChem3D (ver.16.0) で構築し、Chem3DパッケージのMolecular Mechanics (MM) 2計算法を使って構造精密化した。さらに、作成した分子モデルファイルを使い、Grade Web Server²⁴ (<http://grade.globalphasing.org/cgi-bin/grade/server.cgi>) を用いることで、tomatine分子のモデルを作成した。決定した構造データの統計値は表3-1にまとめた。 R 値は $R_{\text{factor}} = \sum hkl | F_{\text{obs}}(hkl) - F_{\text{calc}}(hkl) | / \sum hkl F_{\text{obs}}(hkl)$ で算出し、 R_{free} 値は構造精密化に使用していない全反射の5%を用いて計算した。

表3-1 16DOX-2の結晶構造解析に用いたデータの結晶学的統計値

16DOX-2		
	Zn-SAD data	tomatine-bond form
Data Collection		
Beam source	BL32XU (SPring-8)	BL32XU (SPring-8)
Wavelength (Å)	1.282500	0.999994
Resolution range (Å)	45.54 - 1.74 (1.80 - 1.74)	47.33 - 1.83 (1.895 - 1.83)
Space group	$P2_1 2_1 2_1$	$P2_1 2_1 2_1$
Unit cell parameters		
a, b, c (Å)	a = 64.47, b = 90.83, c = 105.27	a = 65.30, b = 90.10, c = 106.15
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Total reflections	857126 (82980)	756279 (75184)
Unique reflections	64177 (6220)	55933 (5486)
Multiplicity	13.4 (13.3)	13.5 (13.7)
Completeness (%)	99.71 (98.59)	99.90 (99.98)
Mean $I/\sigma(I)$	7.89 (1.11)	8.94 (1.53)
Wilson B-factor	14.74	19.97
R_{merge} (%)	0.364 (1.548)	0.2531 (1.571)
R_{meas} (%)	0.379 (1.609)	0.2633 (1.632)
$CC_{1/2}$	0.911 (0.606)	0.975 (0.638)
Refinement		
Number of reflections		55879 (5486)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$		0.2436 / 0.2874
Number of atoms		
Protein		5641
2OG		5028
Zn		20
tomatine		6
Other molecules		82
Water		2
Water		503
RMSD		
Bond lengths (Å)		0.006
Bond angles (°)		0.90
Average B-factor		
Protein		24.64
2OG		19.99
Zn		25.09
tomatine		34.85
Other molecules		24.06
Water		31.76

※ Other molecules were Iodide ions

参考文献

- 1 Robert, H. W., George, W. P. & Floyd, D. Some pharmacologic and toxicologic properties of tomatine and its derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **3**, 39-48 (1961).
- 2 厚生労働省, 過去 10 年間の有毒植物による食中毒発生状況, 自然毒のリスクプロファイル (高等植物: ジャガイモ), (2019).
- 3 Umemoto, N. *et al.* Two Cytochrome P450 Monooxygenases Catalyze Early Hydroxylation Steps in the Potato Steroid Glycoalkaloid Biosynthetic Pathway. *Plant Physiol.* **171**, 2458-2467, (2016).
- 4 Nakayasu, M. *et al.* Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiol. Biochem.* **131**, 70-77, (2018).
- 5 Akiyama, R., Nakayasu, M., Umemoto, N., Muranaka, T. & Mizutani, M. Molecular breeding of SGA-free potatoes accumulating pharmaceutically useful saponins. *Regul. Plant Growth Dev.* **52**, 92-98 (2017).
- 6 Nakayasu, M. *et al.* A Dioxygenase Catalyzes Steroid 16 α -Hydroxylation in Steroidal Glycoalkaloid Biosynthesis. *Plant Physiol.* **175**, 120-133, (2017).
- 7 Takehara, S. *et al.* A common allosteric mechanism regulates homeostatic inactivation of auxin and gibberellin. *Nat. Commun.* **11**, 10, (2020).
- 8 Elkins, J. M. *et al.* X-ray crystal structure of Escherichia coli taurine/ α -ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates. *Biochemistry* **41**, 5185-5192, (2002).
- 9 Mitchell, A. J. *et al.* Visualizing the Reaction Cycle in an Iron(II)- and 2-(Oxo)-glutarate-Dependent Hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 13830-13836, (2017).
- 10 Koketsu, K. *et al.* Refined Regio- and Stereoselective Hydroxylation of L-Pipecolic Acid by Protein Engineering of L-Proline *cis*-4-Hydroxylase Based on the X-ray Crystal Structure. *ACS Synth. Biol.* **4**, 383-392, (2015).
- 11 Nigg, H. N. *et al.* Inhibition of human plasma and serum butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) by α -chaconine and α -solanine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **33**, 272-281, (1996).
- 12 Rietjens, I., Martena, M. J., Boersma, M. G., Spiegelberg, W. & Alink, G. M. Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 131-158, (2005).
- 13 Harel, M., Sonoda, L. K., Silman, I., Sussman, J. L. & Rosenberry, T. L. Crystal structure of thioflavin T bound to the peripheral site of *Torpedo californica*

- acetylcholinesterase reveals how thioflavin T acts as a sensitive fluorescent reporter of ligand binding to the acylation site. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7856-7861, (2008).
- 14 Greenblatt, H. M. *et al.* The complex of a bivalent derivative of galanthamine with *torpedo* acetylcholinesterase displays drastic deformation of the active-site gorge: Implications for structure-based drug design. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15405-15411, (2004).
- 15 Harel, M. *et al.* The crystal structure of the complex of the anticancer prodrug 7-ethyl-10- 4-(1-piperidino)-1-piperidino carbonyloxycamptothecin (CPT-11) with *Torpedo californica* acetylcholinesterase provides a molecular explanation for its cholinergic action. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1874-1881, (2005).
- 16 Itkin, M. *et al.* Biosynthesis of Antinutritional Alkaloids in Solanaceous Crops Is Mediated by Clustered Genes. *Science* **341**, 175-179, (2013).
- 17 Cardenas, P. D. *et al.* The bitter side of the nightshades: Genomics drives discovery in Solanaceae steroidal alkaloid metabolism. *Phytochemistry* **113**, 24-32, (2015).
- 18 Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D* **66**, 125-132, (2010).
- 19 Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D* **69**, 1204-1214, (2013).
- 20 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658-674, (2007).
- 21 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* **66**, 486-501, (2010).
- 22 Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D* **67**, 355-367, (2011).
- 23 Afonine, P. V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D* **68**, 352-367, (2012).
- 24 Steiner, R. A. & Tucker, J. A. Keep it together: restraints in crystallographic refinement of macromolecule-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D* **73**, 93-102, (2017).

終章

本研究では構造生物学的な観点から天然物の生合成の理解と発展を目指し、骨格形成に関わる新規酵素や、植物性ステロイド化合物の生合成における酸化酵素群といった、未だ知見の少ない分野における様々な酵素を対象に、その立体構造を明らかにしてきた。また、生物が様々な酵素を駆使して天然物の生合成を支えていることを構造生物学的な観点から理解・考察することができた。

天然物の骨格構築を行う酵素に関しては、未だ知見の少ない環化酵素の一つDAaseについて、デカリン骨格を形成するFsa2とPhm7を研究対象とした。Fsa2とPhm7は互いに異なる立体化学を有するデカリン骨格を選択的に作り分け、互いに鏡像異性の関係にあるデカリン化合物を生成するが、これらは基質ポケット構造の微細な違いによって基質の折りたたみ方を制御することで、鏡像異性体を作り分けていることを明らかにした。また、Fsa2と相同性を示すDSは、DAaseとしては一群のタンパク質ファミリーを形成している珍しいタンパク質であるが、本研究では、Fsa2ファミリーの主な機能は「基質の折りたたみ方の制御」であり、それらは主に基質の分子内DA反応に関わるdieneとdienophile周辺のC-C結合のコンフォメーション制限によって誘導されていることを明らかにした。Fsa2ファミリーは既知の酵素群には見られない、リポカリンフォールドを持つ二つのドメインから構成される新規構造の酵素であり、このファミリーは元来異なる機能を有するタンパク質をつなげ、それによって新たに形成されたポケットを触媒部位として利用していることが考えられた。近年では、コンピュータープログラムや機械学習によるタンパク質の立体構造予測技術の発展により、人工タンパク質の*de novo*デザインと合成に関する研究分野も盛んになってきているが、Fsa2ファミリーの立体構造や触媒部位の形成に関わるアイデアは、新たな人工タンパク質を生み出す上でも重要な基盤になると考えられる。

酸化修飾酵素では、BR生合成に関わるP450のCYP90B1と、ジャガイモ由来のSGAとして知られるsolanine生合成のslanidane骨格を構築する16DOX-2について構造生物学的な研究を行った。

CYP90B1の結晶構造解析では、4種類のリガンドが結合した様々なCYP90B1の結晶構造を決定した。基質結合型の結晶構造解析では、変異体を用いた水酸化活性の測定や、基質の添加による吸収スペクトル変化の測定を行うことにより、基質の結合に関わる重要なアミノ酸残基を同定した。また、植物体内におけるCYP90B1の基質のCRについてドッキングシミュレーションを行うことにより、CYP90B1が触媒する水酸化反応は、基質の結合様式や、植物ステロールに特有のC24位に存在する炭素鎖とヘムとの間に発生する立体障害が、水酸化に関わるC22位の水素原子の空間的な位置を決定することで位置・立体選択的に進むことが明らかとなった。阻害剤結合型の結晶構造からは、今までに開発されて

きた一部のBR生合成酵素の阻害剤の詳細な結合様式や、本来は別の酵素に対して開発された阻害剤に関するCYP90B1への結合様式を明らかにした。2つの阻害剤の結合様式から、阻害剤を構成するそれぞれの置換基の役割や、CYP90B1が有する立体構造の可塑性を理解することができた他、阻害剤によるオフターゲット阻害が起こりうる可能性を示すことができた。CYP90B1に関する研究では、P450が触媒する精緻な反応機構を理解することができたと共に、天然物に生理活性を発現させる重要な酸化的修飾反応の一端を分子レベルで明らかにすることができた。P450は特に植物で多くの遺伝子が見つかっており、様々な天然物の生合成系に関わることが知られている一方で、その機能や立体構造など、明らかになっていないことが多く存在する。そのため、本研究結果は、それらP450に関わる発展途上段階にある研究の情動的な基盤になると考えられ、それらの研究の発展に貢献することが期待される。

solanine生合成に関わる2OGDの研究では、16DOX-1やそのホモログは、基質のC16位を水酸化する典型的な2OGDであったが、基質の持つspirosoleane骨格の性質と水酸基を導入する位置を巧みに利用することで、solanidane骨格への再構築を促していたことが明らかとなった。このことから、16DOX-1は「酸化修飾酵素」であると同時に「骨格構築酵素」でもあるため、天然物の多様性を生み出す重要な反応を分子レベルで明らかにかにすることができ、天然物の巧みな生合成戦略を理解することができた。また、solanineは世界中で食中毒の原因になっている化合物であるが、毒性を生み出す重要な反応を触媒する16DOX-1のホモログの立体構造を明らかにできたため、本研究結果は、ジャガイモの「毒」の生産を抑える農薬の開発基盤になると考えられ、延いては世界中の食の安全を守る研究において、重要な情報になることが期待される。

以上のことから、本研究では構造生物学的な知見が乏しい幾つかの天然物の生合成系を標的とし、それらを生合成する上で鍵となる反応を触媒する酵素について研究を行ってきた。標的とした天然物は様々であるが、天然物を創る上で重要かつ代表的な酵素を取り上げ、立体構造から詳細な反応機構を明らかにしてきたことにより、本研究に関連する多くの天然物における生合成酵素についても理解を示すことができたと考えられる。天然物は医薬品や農薬品、あるいはそれらの原料になることが多く、人類にとって非常に重要な資源である。一方で、現代でも合成困難な化合物は多いため、それらを合成する酵素の基質認識機構や触媒メカニズムは注目されている。本研究で扱った酵素群はそれらの一部に過ぎないものの、異なる反応を触媒するホモログや、異なる基質を認識するホモログなども多く存在するため、それら酵素を利用することにより、合成困難な化合物を大量に作るができることと期待される。また、そのようなホモログの情報を組み合わせることで、タンパク質工学による機能の改変・活性の向上ができれば、天然物を生合成する酵素の利用へ

の期待がより一層向上する。加えて、様々な基質や酵素、及び機能改変した酵素を組み合わせることにより、天然からは得られない非天然物を創出することも可能になる。それらは新たな生理活性を持つ可能性を秘めており、既存の化合物では対抗できなかった細菌やウイルスなどに対する医薬品になるかもしれない。今後は、天然物を作る酵素を利用した研究に注目し、その発展によって人々の暮らしがより豊かになることを期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの指導や助言、及び様々な支援をして頂いた構造生物学研究室の永野真吾教授、日野智也准教授、佐藤祐介テニュアトラック講師、及び今までのメンバーに深く感謝致します。

神戸大学大学院 農学研究科 生命機能化学専攻 水谷正治准教授には、ベクター等のサンプルや結晶化に必要な備品の提供、及びCYP90B1の活性測定を行なって頂いただけでなく、学会会場等でお会いした際に大変お世話になりました。心より感謝を申し上げます。

理化学研究所 環境資源科学研究センター 天然物生合成ユニット ユニットリーダーの高橋俊二先生、元研究員（現摂南大学 農学部准教授）加藤直樹先生、及びスタッフ一同には、研究を進めるにあたって短期の研修生として受け入れて頂きありがとうございました。合計で1ヶ月程と短期ではありましたが、自由に実験をさせて頂いたお陰で、DAaseの研究を大きく進めることができました。心より感謝致します。

理化学研究所 基幹研究所 杉田理論分子科学研究室 主任研究員の杉田有治先生、及び元研究員（現国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター プロジェクト研究員）の李秀栄先生にはDAaseの研究を進めるにあたり、MDシミュレーションを行っていただきました。MDシミュレーションで基質の結合様式を推定していただいたことにより、DAaseの研究を大きく進めることができました。心より感謝致します。

鳥取大学 化学・バイオ系学科の先生方には、分野外の私に対する専門的なアドバイスや、進路等に関する相談にのって頂きありがとうございました。深く感謝致します。

博士論文の作成にあたり、審査員として勤めて頂いた大城隆教授、溝端知宏教授、永野真吾教授に深く感謝致します。また、多くの指導や助言をして頂いた方々に感謝致します。

最後に、ここまで様々な面で支援して頂いた両親に心から感謝致します。