

一回の反応で基質に3つの酸素原子を導入する 世界初の新奇酸素添加酵素の立体構造基盤を解明

1. 発表者：

森 貴裕（東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 助教）
翟 睿（東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 博士課程学生（研究当時））
阿部 郁朗（東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆糸状菌由来複雑骨格メロテルペノイド化合物（注1）、フミガトノイドAのエンドペルオキシド（注2）形成を触媒する非ヘム鉄酸素添加酵素の研究を行い、その反応機構を明らかにしました。
- ◆酵素の精密機能解析とX線結晶構造解析（注3）により、本酵素が前例のないエンドペルオキシド形成機構を有することを明らかにしました。
- ◆本酵素の基質選択性、反応性の改変により、広い範囲の天然物の酸化的修飾に利用可能な生体触媒の創出が期待されます。

3. 発表概要：

エンドペルオキシド構造は天然においても珍しい構造であり、本構造を持つ化合物群は顕著な生物活性を示すことから、重要な医薬品資源として注目されています。これまでに、エンドペルオキシド構造を形成する酵素としては2種類の酵素、ヘム鉄要求性プロスタグランジンH合成酵素（シクロオキシゲナーゼ、COX）（注4）と、*Aspergillus fumigatus*由来の非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸（ α -KG）要求性ジオキシゲナーゼ（注5）であるフミトレモルギンB合成酵素 FtmOx1 が報告されていますが、これらはいずれも基質に2つの酸素原子を導入する酸素添加酵素でした。

今回、東京大学大学院薬学系研究科の森貴裕 助教、翟睿 大学院生（研究当時）、阿部郁朗 教授の研究グループは、糸状菌由来エンドペルオキシド含有天然物フミガトノイドAの生合成に関わる、一回の反応で基質に3つの酸素原子を一挙に導入してエンドペルオキシド構築と水酸化を同時に触媒する世界初の新奇非ヘム鉄酸素添加酵素 NvfI について、酵素反応の立体構造基盤を明らかとしました。安定同位体（注6）を用いた酵素反応の精密機能解析やX線結晶構造解析、さらには立体構造をもとにした部位特異的変異導入により、本酵素はこれまでに解析されているエンドペルオキシド形成酵素とは大きく異なる反応機構でエンドペルオキシド構築と水酸化を同時に触媒することを明らかにしました。自然界には依然として多くの未開拓酵素が眠っており、有機化学の常識を打ち破るような酵素反応を発掘し、その触媒原理を解明し、さらに有用化合物生産へ応用することで、薬科学の発展に貢献できます。

本研究成果は、2021年7月20日（火）公開の *Nature Communications* 誌にオンライン掲載されました。

4. 発表内容：

抗マラリア薬として利用されるアルテミシニン（注7）など、エンドペルオキシド構造を含む化合物は強力な生物活性を示すことから、医薬品資源として重要です。これまでにエンドペルオキシドの形成を触媒する酵素の反応機構としては、ヘム鉄要求性プロスタグランジン H 合成酵素（シクロオキシゲナーゼ、COX）と、*Aspergillus fumigatus* 由来の非ヘム鉄/ α -ケトグルタル酸（ α -KG）要求性ジオキシゲナーゼであるフミトレモルギン B 合成酵素 FtmOx1 の2種類が詳細に解析されていますが、これらはいずれも基質に2つの酸素原子を導入する酸素添加酵素でした。今回、研究グループは、糸状菌 *A. novofumigatus* 由来の複雑骨格メロテルペノイド化合物ノボフミガトニンの生合成において、一挙に3つの酸素原子を導入して、エンドペルオキシド構造と水酸基の形成を同時に触媒する新奇非ヘム鉄酸素添加酵素 NvfI の精密機能解析と反応機構解明を行いました。非ヘム鉄酸素添加酵素 NvfI はアスノボリン A を基質とし、エンドペルオキシド構造と C3'位の水酸基を含む3つの酸素原子を導入し、フミガトノイド A の生成を触媒します（図1）。

まず研究グループは、安定同位体を含んだ水や酸素を用いて酵素反応を行い、NvfI が一回転の酵素反応で基質に3つの酸素原子を一挙に導入することを証明しました。さらに、NvfI の詳細な触媒機構を明らかとするため、酵素の X 線結晶構造解析を行い、NvfI のアポ体構造（注8）と基質との複合体構造の取得に成功しました。アポ体と複合体の活性部位（注9）構造を比較したところ、複数のアミノ酸残基の顕著なコンフォメーション変化が見られ、基質結合によって活性部位構造の大きな動的変化が引き起こされることが判明しました。COX、FtmOx1 の酵素反応機構では、活性部位のチロシン残基がチロシルラジカル（注10）の形成を介してエンドペルオキシド生成反応に重要な役割を果たしていることが知られています。そこで、得られた複合体構造に基づき活性部位のアミノ酸残基に対して部位特異的変異を導入することで、活性部位を構成する各アミノ酸残基の役割と重要性を精査しました。その結果、NvfI は触媒機構において、水素原子の脱離や供与を仲介するためにチロシン残基をはじめとした活性部位のアミノ酸残基を利用しないことが示唆され、NvfI によるエンドペルオキシド形成反応のメカニズムは COX や FtmOx1 とは大きく異なることが明らかとなりました。

本研究では、一回転の酵素反応で基質に3つの酸素原子を一挙に導入する世界初の新奇酸素添加酵素 NvfI に着目し、酵素の精密機能解析および立体構造解析から酵素反応の構造基盤を明らかにしました。自然界には未だ機能が明らかとなっていない未開拓酵素が多く存在し、それらの中には有機化学の常識を打ち破るような反応を触媒する酵素が眠っていることも期待されます。今後、そのような酵素を発掘し、機能を解明し、生体触媒や合成生物学的手法へと展開することで、薬科学のさらなる発展に貢献できます。

本研究は、文部科学省 科学研究費補助金（JP16H06443, JP19K15703, JP20H00490, JP20KK0173, JP20K22700）、新学術領域研究（研究領域提案型）「生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学（生合成リデザイン）」、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」（JPNP20011）、科学技術振興機構（JST）さきがけ「植物分子の機能と制御」（JPMJPR20DA）、アステラス病態代謝研究会、武田科学振興財団、野田産業科学研究所の支援を受けて行われたものです。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Nature Communications*」

論文タイトル：Molecular insights into the endoperoxide formation by Fe(II)/ α -KG-dependent oxygenase NvfI

著者：Takahiro Mori, Rui Zhai, Richiro Ushimaru, Yudai Matsuda, and Ikuro Abe

DOI 番号：10.1038/s41467-021-24685-6

URL：https://doi.org/10.1038/s41467-021-24685-6.

6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻

教授 阿部 郁朗（あべ いくろう）

Tel： 03-5841-4740

E-mail： abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学薬学部 庶務チーム

Tel： 03-5841-4719

E-mail： shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

注1) メロテルペノイド化合物：テルペンの部分構造を持つ天然物の一群。多様な生理活性をもつことから医薬品シード化合物として期待されています。具体的には、高脂血症治療薬のシード化合物として期待されるピリピロペンや、その誘導体が免疫抑制剤として用いられるミコフェノール酸などが知られています。

注2) エンドペルオキシド：環内に過酸化物-O-O-構造を含む化合物のことです。

注3) X線結晶構造解析：物質の3次元構造を知る手法のことです。酵素などを結晶化し、散乱されたX線を観測することで、物質の中の電子の分布を知ることができます。

注4) シクロオキシゲナーゼ COX：プロスタグランジンの合成酵素のことです。アラキドン酸をプロスタノイドと呼ばれる生理活性物質の一群に代謝する過程に関与します。

注5) 非ヘム鉄/ α -ケトグルタル酸 (α -KG) 要求性ジオキシゲナーゼ：二価鉄を含む水溶性の酸化酵素のグループであり、低分子化合物からタンパク質やDNAまで様々な生体分子に対して水酸化や脱メチル化など多彩な酸化反応を触媒します。一般的には一回転の反応で1つの酸素原子を基質に導入します。

注6) 安定同位体：原子番号（陽子数）が同じで質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる元素を同位体と言います。その中で、放射線を出さず且つ半永久的に存在量も変わらずに存在する同位体を安定同位体と呼びます。

注 7) アルテミシニン：抗マラリア活性を有する化合物のひとつです。古くから漢方薬として利用されていたヨモギ属の植物であるクソニンジン (*Artemisia annua*) が生産します。

注 8) アポ体構造：酵素構造の中に基質などの化合物が含まれていない状態のことです。

注 9) 活性部位：酵素が反応を行う場のことです。タンパク質のアミノ酸残基で構成され、この部分に基質が結合することで化学反応が触媒されます。

注 10) チロシルラジカル：ラジカルとは、原子の状態のひとつで、通常は 2 個 1 組で軌道上に存在する電子が 1 つしかなくなっている状態のことです。ラジカルは非常に不安定であり、反応性が強いという性質を持っています。チロシルラジカルはアミノ酸の一つであるチロシン状にラジカルが存在している状態のことを指します。

9. 添付資料：

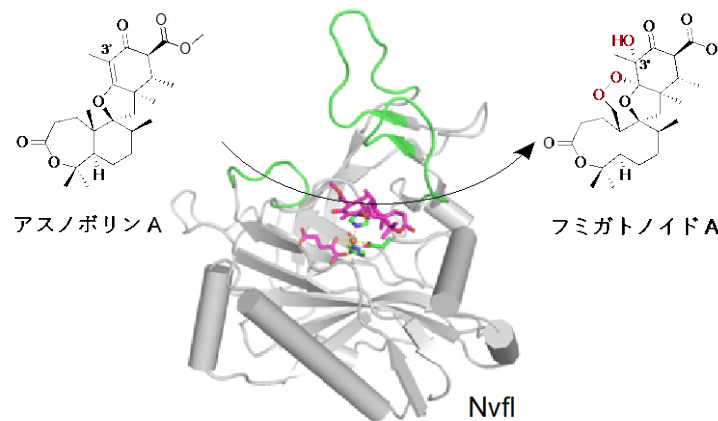


図 1：Nvfl の全体構造と触媒する反応