

天然物生合成酵素群の構造機能解析と機能改変

森 貴裕 Takahiro MORI 東京大学大学院薬学系研究科准教授



1 はじめに

天然由来の二次代謝産物は、優れた生物活性および多様な骨格構造を示すことから、新規医薬品のシード化合物として極めて重要な資源とされている。しかしながら、これら化合物の従来の探索手法である天然資源からの抽出・精製には、多大な労力と膨大な量の原料が必要であり、持続的な供給が困難であるという課題がある。さらに、これまでに膨大な数の天然化合物が報告されており、新たな生物活性を有する化合物、特に未報告の骨格構を持つ化合物の発見は年々困難になりつつある。

近年のゲノム解析技術および合成生物学の進展により、二次代謝産物の生合成に関わる酵素群の機能解明が急速に進んでいる。これらの酵素の中には、広範な基質特異性を示すものも存在するため、天然には存在しない基質を導入することで非天然型の新規化合物を創出することが可能である。さらに、酵素の立体構造情報に基づき、基質認識や触媒反応に関与するアミノ酸残基を改変することで、基質特異性や反応性を人為的に制御した機能改変酵素を創出することが可能となる。このような機能改変

酵素や、生合成経路において律速段階を担う酵素に対して進化工学的手法を適用することで、目的物質の収率や生産性の向上も期待される。以上のような酵素工学的アプローチは、これまで困難であった新規骨格を有する有用天然物の創出や、持続可能な供給体制の確立に大きく寄与するものと考えられる。

本稿では、筆者らが近年解析を行ったリンコサミド類の生合成に関与する酵素について、酵素の構造機能解析および構造情報に基づく変異導入による新規化合物創出の研究成果を紹介する。

2 リンコサミド類の構造と生合成

リンコマイシン A およびセレスチセチンに代表されるリンコサミド類は、放線菌から単離される天然薬物であり、8つの炭素から成り、硫黄原子を糖の構造内に含むチオオクトース骨格と、プロリンもしくはアルキルプロリン由來のアミノ酸部分がアミド結合により連結された構造を持つことが特徴である(図1)。¹⁾ 本化合物群は、原核生物のリボソーム 50S サブユニットへ結合し、ペプチド鎖が伸長する際にペプチド転移反応を阻害することで抗菌活性を示す。^{2,3)} 過去に多くの構造活性相関研究

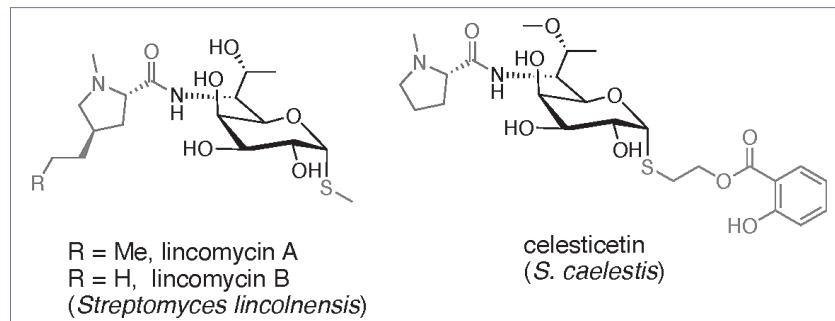


図1 リンコサミド類の構造

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図1)。

が行われており、(アルキル)プロリン部分とチオオクトース骨格の縮合が活性に必須であり、チオオクトースの S-アルキル基の置換基の違いによって活性の差異が生じることが判明している。リンコマイシン A やその半合成誘導体であるクリンダマイシンは、抗菌スペクトルが広く、特にグラム陽性菌に対する有効性から臨床で長年使用されている。

リンコサミド類の生合成については、リンコマイシン A およびセレスチセチンで生合成クラスターの解析などの精力的な研究が行われておらず、リンコマイシン A の生合成経路はすべて解明されている。⁴⁾ リンコマイシン A およびセレスチセチンの生合成経路において、(アルキル)プロリン部分とチオオクトース骨格の縮合は新規縮合酵素 LmbD と CcbD によりそれぞれ触媒され、糖構造への硫黄原子の導入によるチオオクトース骨格の形成は糖転移酵素 LmbT と CcbT により触媒されることが判明している。また、S-アルキル部分の構造多様性はピリドキサール 5'-リン酸(pyridoxal-5'-phosphate: PLP)要求性酵素 LmbF と CcbF により構築される。筆者らはこれらの生合成における鍵酵素群に着目し、酵素の機能解析および立体構造解析に着手した。

3 新規縮合酵素 CcbD の構造機能解析

CcbD は非リボソームペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase: NRPS) の縮合ドメインやその他のアミド結合形成酵素とは異なる

アミノ酸配列を持つ、新規なアミド結合形成酵素である。本酵素は、アデニル化酵素 CcbC の反応により生成したアルキルプロリンが結合した CcbZ のキャリアタンパク質(CcbZ-CP)と、L-エルゴチオネイン(L-ergothioneine: EGT)S-結合型チオオクトースを基質とし、両者をアミド結合で連結する反応を触媒する(図 2)^{2), 1)}

CcbD の X 線結晶構造解析により、その全体構造は従来知られているアミド結合形成酵素(例: NRPS の C ドメインや GNAT ファミリー)とは全く異なっており、既知の構造分類に属さない新しい酵素ファミリーであることが判明した。酵素活性部位にはプロテアーゼでよく保存されている Cys-His-Glu の触媒 3 残基が存在し、いずれも変異によって活性が消失することから、CcbD の酵素反応機構において重要な役割を果たすことが示された。

また、基質アナログであるメチルチオリンコサミドとの複合体構造を取得し、活性部位の解析を行った結果、基質は多数の水素結合を形成しつつ、活性部位ポケットの奥深くに結合していることが明らかとなった(図 3 A)^{付図 3)}

さらに、CcbD と CcbZ-CP との複合体構造も取得し解析を行ったところ、キャリアタンパク質に結合しているホスホパンテテイン基が酵素の活性部位に深く挿入されている様子が確認された(図 3 B)^{付図 3)}。これら 2 種類の複合体構造の比較解析により、CcbD によるアミド結合形成反応は、基質が交互に活性部位に結合する ping-pong 機構で進行すること

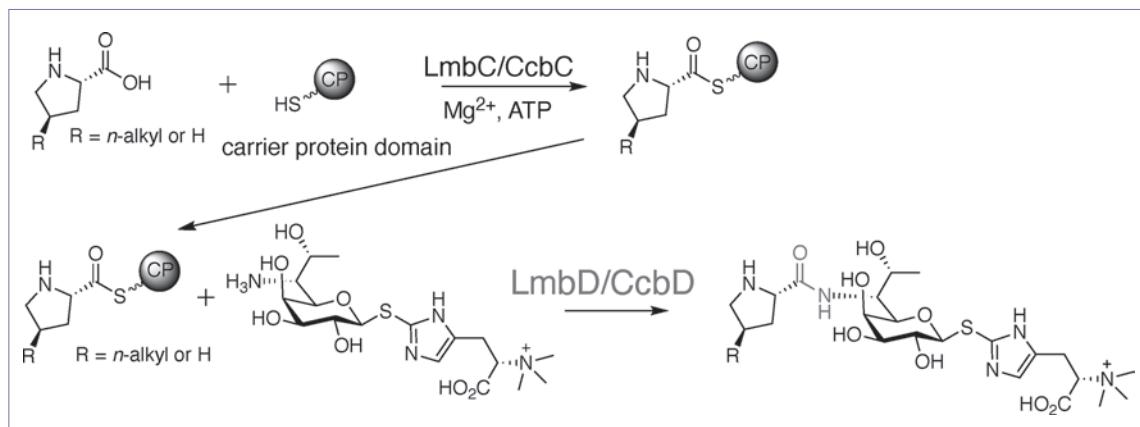


図 2 リンコサミド生合成における縮合反応

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図 2)。

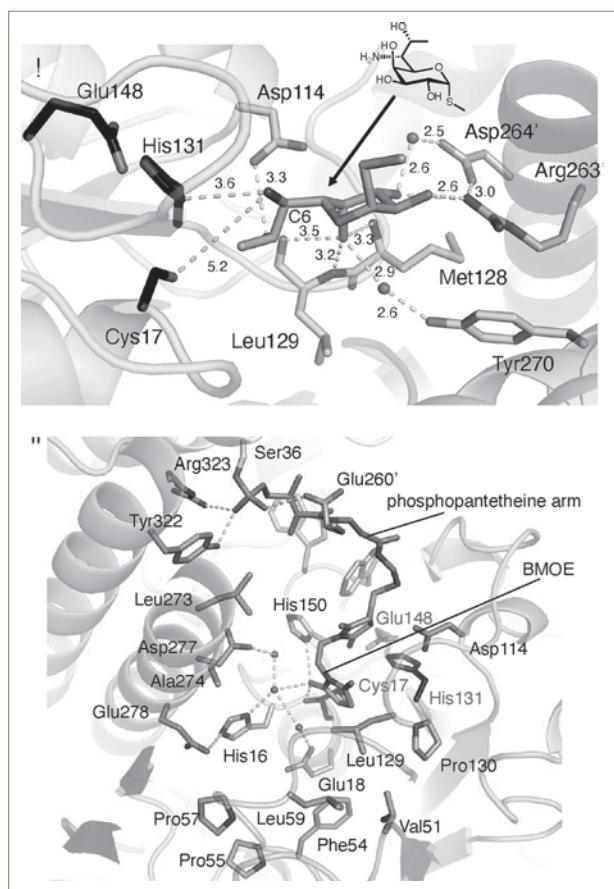


図3 CcbDの活性部位構造

A : CcbD とメチルチオリンコサミドの複合体構造, B : CcbD と CcbZ-CP との複合体構造, bismaleimidoethane(BMOE)は複合体構造取得のために使用した架橋剤。

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図3)。

が強く示唆された。酵素とキャリアタンパク質との相互作用には、複数の静電的および疎水的相互作用が寄与していた。特に、CcbD 上の複数のアルギニン残基(Arg312, Arg316, Arg324など)は、CcbZ-CP 上のグルタミン酸残基(Glu40, Glu41, Glu47)と水素結合や塩橋を形成しており、これらの相互作用により、CcbD は CcbZ-CP を認識していることが示唆された。実際に、これらの相互作用残基に変異を導入した変異体においては、キャリアタンパク質との相互作用効率が大きく低下するとともに、アミド結合形成活性も著しく減少することを確認した。これらの結果は、CcbD が高度に選択性かつ効率的に CP 結合型基質を認識・利用してアミド結合を形成していることを、分子レベルで裏付けるものである。

以上の結果から、CcbD の反応機構を以下のように

提唱した。まずプロリル-CP が酵素に結合し、Cys17 残基がチオエステル結合に求核攻撃してプロリンが酵素上に転移する。次に、EGT-S結合型チオオクトースが酵素に結合し、そのアミノ基が Cys17 上のチオエ斯特に攻撃し、アミド結合が形成される。この際、His131 および Glu148 が求核性の増強に関与すると考察する。

酵素立体構造解析の結果、CcbD は糖結合部位に空間的な余裕を有しており、多様なアミノ基含有化合物や、キャリアタンパク質(CP)に結合したアシル基を受容し得ることが推測された。そこで、多様な基質を用いた酵素反応の検討を行った。まず、アシル供与体として、天然基質であるプロリル-CP の代わりに C2~C8 の脂肪族アシル-CP、ならびにアラニル-, ピペコリル-, フェニルアラニル-などのアミノアシル-CP を用いたところ、CcbD はこれら非天然型アシル基を広く受け入れ、アミド結合形成反応を効率的に進行させることができた。さらに、アシル受容体側であるチオオクトース部分についても、多様なアミノ基含有化合物との反応を実施した。その結果、本酵素はフェニルアラノールやトリプトファノールなどのアミノアルコール類を基質とした反応において、プロリンとアミノアルコールが縮合したジペプチド様構造の生成物を形成することが明らかとなった。

以上の結果から、CcbD は CP に対しては高度な選択性を示す一方で、CP に結合したアシル基や糖部位に対しては広範な基質許容性を有する、極めてユニークな酵素であることが示された。⁵⁾ この酵素の性質は、非天然型リンコサミド誘導体の創製を可能とするだけでなく、創薬におけるシード化合物の多様性拡張にも資する重要な分子基盤となると期待される。

4 糖転移酵素 LmbT の構造機能解析

S-グリコシルトランスフェラーゼ LmbT は、リノコマイシン A の生合成過程で、希少含硫アミノ酸 EGT と GDP-リンコサミドと結合させる反応を触媒する(図4)。本反応は、唯一解析されている天然物中への EGT を導入する酵素反応である。この

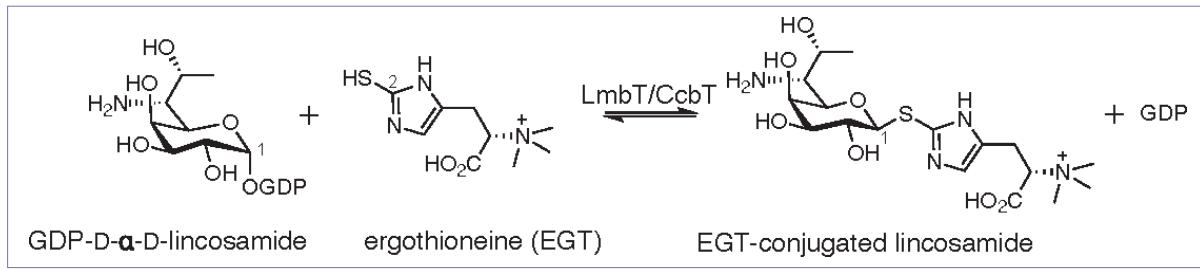


図4 LmbTの酵素反応

反応の選択性や反応機構の詳細を解明するために、LmbTの構造機能解析に着手した。

まず、LmbTの基質特異性を *in vitro* で解析した。糖転移酵素は一般に可逆反応を示すことから、本研究では EGT が結合したリンコサミドと GDP を用い、生合成反応の逆反応系におけるヌクレオチド二リン酸に対する寛容性を評価した。その結果、LmbT は本来の基質である GDP だけでなく、ADP、UDP、IDP など多様なヌクレオチド二リン酸を受け入れて反応することが明らかとなった。一方、糖側の基質選択性としては GDP-リンコサミド以外の核酸糖を受け入れなかつた。これにより、LmbT は塩基部分に対して広い受容性を示す一方で、糖鎖の骨格であるオクトース部分には厳密な認識性を持つことが明らかになった。

次に X 線結晶構造解析により、LmbT のアポ型と GDP および EGT との複合体型の立体構造を取得した。LmbT の全体構造は典型的な GT-B 型グリコシルトランスフェラーゼに属し、2つの Rossmann 型ドメインから構成されていた。アポ型構造と複合体構造の比較から、基質の結合によりこれらのドメイン間で約 6 Å の大規模なコンフォメーション変化が起こり、活性部位が形成されることが判明した。この構造変化により、GDP と EGT が適切な配置で活性部位に結合し、反応が進行可能な状態となる。さらに活性部位の解析の結果、EGT のトリメチルアミノ基は Trp101 とのカチオン-π相互作用、カルボキシル基は Arg260 との塩橋形成により高い親和性で認識されていた(図5)。^{付図4} さらに、EGT のチオール基は Gly162 と水素結合しながら、SN2 反応に適した位置に配置されたことが明らかとなつた。GDP 側では、二リン酸基が Glu337 や Lys268 と相互作用し、グアノシン部分は

Trp258 および Arg290 による π-π 相互作用や水素結合ネットワークで強固に保持されていた。この結合様式は、C1 炭素への求核攻撃が β 面から起こり、C1 位の立体反転が生じる反応を支持している。

これらの残基の重要性を検討するため、構造に基づく部位特異的変異導入実験を行つた結果、Trp101、Trp258、Arg260、Lys268、Glu337 の変異体において、顕著な活性の低下、もしくは消失を確認した。Trp258 のフェニルアラニン置換(W258F)はある程度活性を保つたが、アラニン置換(W258A)では活性が失われた。これらの結果は、酵素による基質の立体的認識が高い精度で行われていることを示している。

本研究は、S-グリコシルトランスフェラーゼという比較的新しい酵素群における分子認識と触媒機構を原子レベルで解明し、天然物の S-グリコシル化合物の生合成に新たな視点を与えるものである。⁶⁾ EGT は強力な抗酸化作用を持ち、かつ毒性が低いことから、近年では医療やサプリメント分野での応用が注目されている。今後は、LmbT の糖基質の

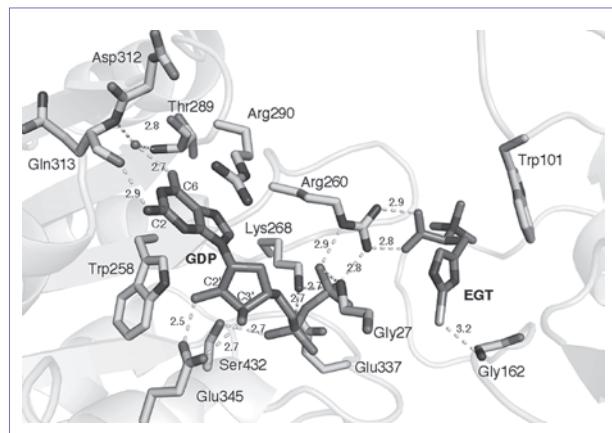


図5 LmbTの活性部位構造

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図4)。

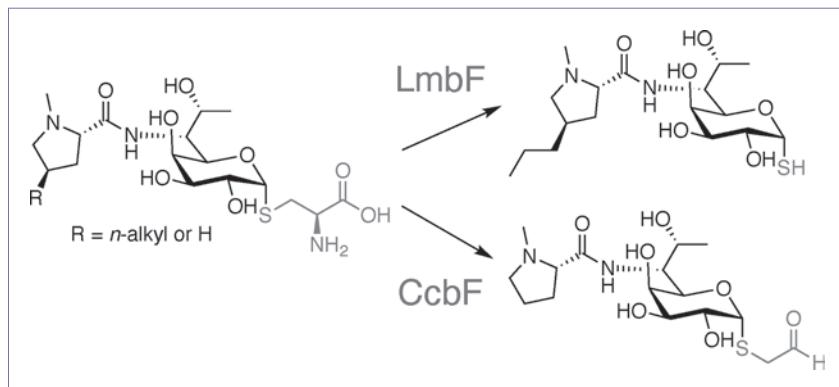


図6 LmbF, CcbFの反応

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図5).

基質選択性を人工的に改変することで、EGTを多様な骨格に導入可能なバイオツールとしての開発や、EGT結合型プロドラッグの開発など新たな応用が期待される。

5 PLP要求性酵素LmbF/CcbFの構造機能解析と機能改変

リンコマイシンAおよびセレスチセチンの生合成において、PLP要求性酵素LmbFとCcbFがS-アルキル構造の多様化に関与している。LmbFとCcbFは互いに40%のアミノ酸相同性を示すにもかかわらず、基質システイン部分のC-S結合切断による β -脱離反応と脱炭酸を伴う酸化的脱アミノ化反応を触媒し、それぞれ異なる生合成中間体を与える(図6)。^{付図5)}これまでに、LmbFとCcbFの触媒する反応は確認されているものの、触媒反応の立体構

造基盤についての検討は行われておらず、酵素触媒反応の違いを生み出している要因は不明であった。そこで本研究では、これらの反応の構造基盤の解明を目的として酵素の構造機能解析に着手した。

LmbFとCcbFのPLPとの複合体結晶構造を、それぞれ1.7 Åと1.8 Åの分解能で取得することに成功した。両酵素の活性部位を比較したところ、PLPの結合様式はよく保存されている一方で、LmbFにおいてPLP近傍に位置するLeu83, Asn205, Phe236, Pro302がCcbFではすべてTyr残基(Tyr72, Tyr195, Tyr226, Tyr292)に置換されており、これらの置換がLmbFとCcbFにおける反応性の違いを制御していることが考えられた(図7)。^{付図6)}

そこで次に、活性部位における基質の結合様式および、反応中の動的変化を明らかとするため、酵素結晶構造をもとにしたドッキングシミュレーション

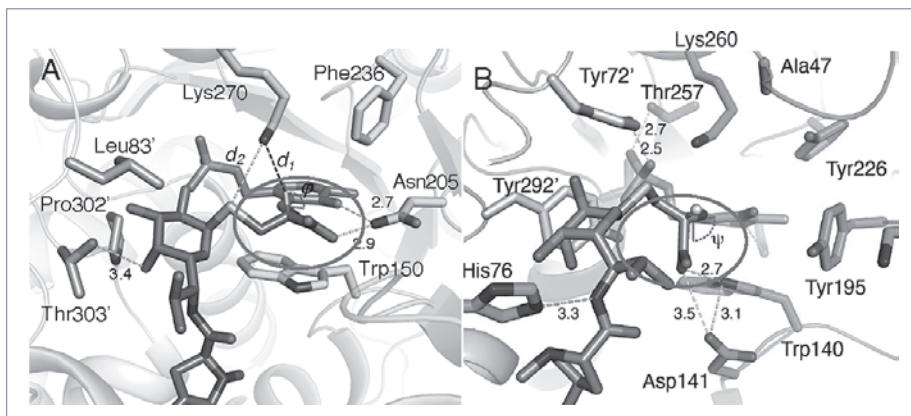


図7 LmbFとCcbFの活性部位構造

A : LmbFと基質のドッキングモデル, B : CcbFと基質のドッキングモデル.
J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図6).

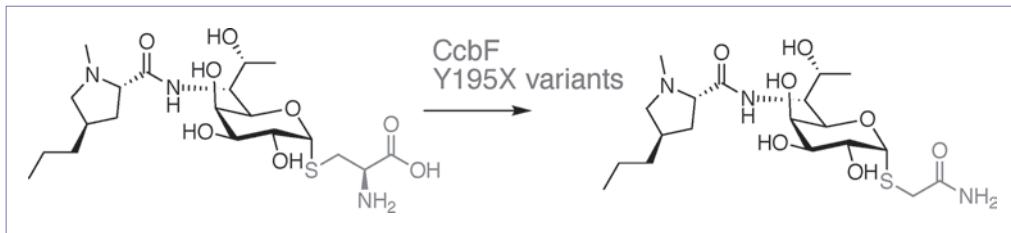


図8 CcbF Y195G 変異体の反応

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図7)。

および分子動力学 (molecular dynamics: MD) シミュレーションを行った。その結果、LmbF と CcbF の活性部位においては基質結合様式が異なることが示唆された。LmbF の結合様式においては、C α -H 結合と PLP のピリジン環の二面角が約 90 度であり、C α -H 結合が external aldimine 中間体のピリジン環とイミンで形成される共役系の p-軌道と平行に維持されていることが示唆された。一方、CcbF 活性部位では嵩高いチロシン残基が活性部位に突き出すことで、基質結合様式が変わり、システイン部分のカルボン酸の C α -COOH 結合が p-軌道と平行に維持されることが示唆され、それにより脱炭酸反応が β -脱離反応に優先して進行しやすくなると考えられた。

結晶構造と MD シミュレーションの結果をもとに LmbF および CcbF に変異を導入することで酵素の機能改変に着手した。興味深いことに、CcbF の活性部位アミノ酸残基 Tyr195 を LmbF の対応するアミノ酸残基 Asn へと変異させたところ、微量ながら新規化合物の生成を確認した。本化合物の収量を増大させるため、195 番目の残基に対して飽和変異を導入した結果、CcbF Y195G 変異体において新規化合物を单一生成物として与えることが判明した。構造解析の結果、新規化合物は酸化的アミド化反応が進行した化合物と決定した(図8)。^{付図7)}

CcbF Y195G 変異体からさらに Tyr72 と Tyr226 に変異を導入した結果、CcbF Y72L/Y195G/Y226F 三重変異体において LmbF 型生成物を单一生成物として与えることが判明した。すなわち、CcbF の酸化的脱アミノ化反応を LmbF の β -脱離反応へと完全に変換することに成功した。⁷⁾

今後、多様な PLP 要求性酵素の構造機能解析により触媒反応選択性の構造基盤を明らかにしていくことで、PLP 要求性酵素の触媒機能の人工制御と、

生体触媒にも利用可能な有用酵素の創出への展開が期待される。

6 おわりに

本稿では、リンコサミド類の生合成に関与する一連の酵素群に焦点を当てて、それらの構造機能解析および酵素工学的改変による新規化合物の創出について紹介した。これらの成果は、天然物生合成に関する酵素の構造と機能の解明が、新規骨格を有する有用化合物の創出に直結することを示すものであり、天然物化学、酵素工学、合成生物学の融合による新たなモダリティ開発の可能性を大きく広げるものである。

今後は、構造情報に基づく更なる酵素の高機能化や、人工生合成経路の再構築による創薬リード化合物の網羅的な創出、また持続可能な微生物生産系の構築など、医薬品・機能性物質の開発において極めて重要な展開が期待される。

参考文献

- 1) Janata J. *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, 35, 257–289 (2018).
- 2) Tenson T., Ehrenberg M., *Cell*, 108, 591–594 (2002).
- 3) Schlünzen F. *et al.*, *Nature*, 413, 814–821 (2001).
- 4) Mori T., Abe I., *ChemBioChem*, 25, e202300840 (2024).
- 5) Mori T. *et al.*, *Nat. Catal.*, 6, 531–542 (2023).
- 6) Mori T. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 62, e202304989 (2023).
- 7) Mori T. *et al.*, *Nat. Chem.*, 17, 256–264 (2025)

キーワード

天然物化学、生合成酵素、構造生物学、酵素工学