

静岡県立大学薬学部 佐藤道大

酵素的 [4+2] 環化付加反応の分子機構の解明

はじめに

微生物や植物、海洋生物から得られる天然有機化合物は、「人智を超えた」と表現される複雑な構造を有するものも多く、その化学構造に魅せられた研究者が単離-合成-生物活性を基盤に多岐にわたる天然物化学分野を開拓してきた。筆者は先人たちが築き上げてきた実績を礎に、天然物の成り立ち、生合成研究を行ってきた。複雑な構造がどのようにして構築されるのか、自然の叡智を感じられることが、天然物生合成研究の醍醐味のひとつだと思う。筆者は、これまで天然に存在する Diels-Alder 反応を触媒する酵素について、その機能解明研究を展開してきた。以下その概要を紹介する。

1. Diels-Alderase の実在性

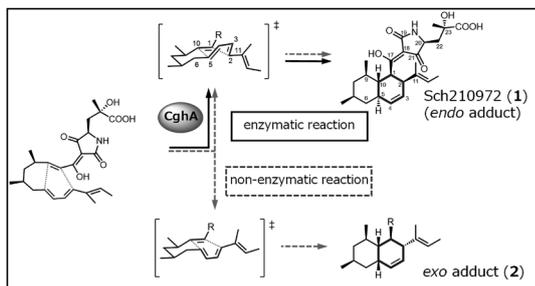
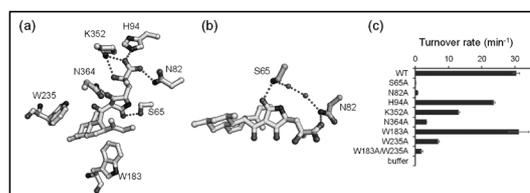
Diels-Alder (DA) 反応は、位置および立体選択的に炭素-炭素結合を形成することができるため、有機合成化学分野において広く用いられてきた。一方で天然物には DA 反応によって構築すると考えられる化合物が数多く見られることから、天然にも Diels-Alder 反応を触媒する機構、すなわち Diels-Alderase (DAase) の存在が示唆されてきた。DA 反応は環化分子の構築や炭素骨格の構造に大きな変化を与えるため、生体内 DA 反応を触媒する DAase には極めて高い興味を持たれていたが、実際にそれが証明されたのは 2000 年と割合最近である。そのマクロフォミン酸合成酵素の発見以降、原核・真核生物由来天然物の生合成に関わる DAase が相次いで発見されているが¹⁾、その詳細な分子機構、すなわち反応の駆動力や位置および立体選択性の発現要因について詳細に解明された報告はない。

筆者は、糸状菌由来抗 HIV 活性を有する化合物、Sch210972 (**1**) のオクタリン環の立体選択的な閉環反応に着目した (図1)。化合物 **1** のオクタリン環の立体化学は、DA 反応における *endo* 付加により生じる立体化学に相当することから、**1** のオクタリン環は酵素的 DA 反応によって構築されると考えられた。そこでその酵素を見出すため **1** の生産菌である糸状菌 *Chaetomium globosum* を用いて、**1** 生合成遺伝子クラスターにおける網羅的な遺伝子欠損株の作製を行った。その結果、リポカリンファミ

リーに属する推定機能未知タンパク質をコードする *cghA* 遺伝子欠損株において、DA 反応の *exo* 付加に相当する立体化学を有する化合物 **2** が生産することを確認した (図1)。このことから、CghA はオクタリン環形成における *endo* 選択的 DA 反応を触媒する酵素と考えられた。この仮説は、**1** の生合成に関わる遺伝子すべてを異種糸状菌の *Aspergillus nidulans* へ導入した **1** 生合成の再構築により確かなものとなった²⁾。しかしながら、CghA による分子内 DA 反応の詳細なメカニズムについては不明なままであった。筆者は、DAase における基質認識・立体選択的環化・生成物阻害回避機構について、その分子基盤の解明を目的に研究を行うこととした。はじめに糸状菌由来の CghA の塩基配列を大腸菌のコドン頻度に最適化した後、大腸菌を用いて組換え CghA タンパク質を得た。得られた CghA タンパク質および **1** の共結晶化を行い、それを X 線結晶解析に供したところ、良好な分解能で回折像を得ることができた。得られた結晶構造から、CghA の活性部位では比較的広い空間が形成されており、**1** と相互作用するアミノ酸残基の存在が確認された (図2a)。

2. 糸状菌由来 Diels-Alderase の精密機能解析およびエンジニアリングによる DAase の改変

CghA の3つのアミノ酸残基、Asn82, His94 および Lys352 は、**1** の23位の水酸基および24位のカルボン酸と水素結合を形成していることが明らかとなった。加えて2つのトリプトファン残基 Trp183, Trp235 は、オクタリン環を挟み込む形で配位しており、これらが鎖状基質の酵素への固定化に寄与していると予想された (図2a)。また、Ser65 および Asn364 はテトラミン酸のカルボニル基とそれぞれ水素結合を形成しており、この水素結合が鎖状基質における1-10位のジェノフィルの LUMO エネルギーを低下させ、それにより DA 反応が加速していることが示唆された。次に CghA と **1** の相互作用を確認するために、複合体結晶より得られた結果をもとに、基質と相互作用する CghA のアミノ酸に変異を導入した酵素を作製し、変異導入酵素の速度論解析を行った (図2c)。その結果、2つのトリプトファン残基 Trp183, Trp235 によるオクタリン環の相互作用の消失により、

図1. Sch210972 (**1**) と *exo* 付加物 (**2**) の化学構造図2. (a) CghA-**1** 複合体の結晶構造における活性中心 (b) S65-N82 の水分子を介した相互作用 (c) 各変異酵素の触媒回転数

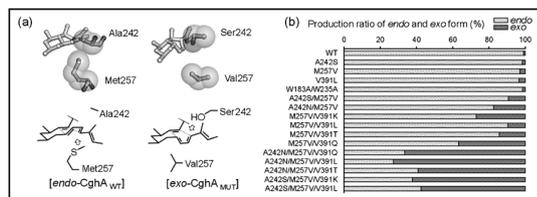


図3. (a) Ala242 および Met257 のオクタリン環との相互作用
(b) 各変異酵素における *endo* および *exo* 付加体の生成比

大幅な酵素活性低下を確認した。加えて、テトラミン酸のカルボニル基との水素結合形成に関与するアミノ酸 Ser65 の変異においても、活性の消失を確認した。化合物 **1** の γ -ヒドロキシメチルグルタミン酸側鎖結合部位 His94 および Lys352 に変異を導入した酵素においては、約 20~50% 程度の活性の低下にとどまった。しかし、同じく γ -ヒドロキシメチルグルタミン酸側鎖と水素結合を形成している Asn82 への変異では、活性の大部分の消失が確認された。このことから Asn82 は、側鎖アミノ酸との相互作用に必要な残基というだけでなく、活性に重要な残基であると考えられた。その理由を明らかにするため複合体結晶構造の水分子を含めた詳細な解析を行った。その結果、Asn82 は 2 つの水分子を介して Ser65 と相互作用していることがわかった (図 2b)。以上の結果から CghA は、 γ -ヒドロキシメチルグルタミン酸側鎖およびオクタリン環周辺のアミノ酸残基により基質のコンフォメーションを制御していること、テトラミン酸のカルボニル基との水素結合の形成は必須であり、ジエノフィルの電子求引性増大により、DA 反応を加速していることが明らかとなった。一方で、DA 反応によるオクタリン環の形成における立体選択性に関しては、アルキル鎖を受け入れる活性部位の空間的な制御によるものと考えられた。すなわち鎖状基質のジエン周辺のアミノ酸 Ala242, Met257 (図 3a) による空間的制御が、*endo* 付加環化選択性の要因と推測された。筆者はこれらアミノ酸に *exo* 付加環化に有利となるような変異を導入することで、天然物とは異なるジアステレオ選択性を生み出す酵素を作製することに成功した (図 3b)³⁾。

3. DAase の生成物阻害回避機構

DA 反応は合成化学上価値の高い反応であるため、人為的な酵素すなわち DA 反応を触媒する抗体触媒の開発が古くからおこなわれてきた。反応遷移状態をミミックした分子を有機合成し抗原 (ハプテン) とし、抗体触媒が作られたのだが活性は極めて低いという結果に終わった。これは DA 反応の遷移状態と生成物の構造が酷似しているためと考えられており、生合成上 DAase が単に遷移状態の活性化エントロピーを下げる空間を提供しているのではないことを示唆している。DAase はどのようにして生成物阻害を回避しているのか、またその駆動力は何なのかなど、有機分子触媒の設計に関わるその反応機構についても多くの興味を持たれている。DAase による生成物阻害回避機構は、DAase 研究における大きな謎の一つである。そこで複合体結晶構造解析結果と計算化学により算出した DA 反応の遷移状態の自由エネルギー値をもとにその謎の解明にあたった。CghA-1 の複合体結晶構造において、**1** の構造は 17, 18 位が *E* 体の **1'** であることが分かった。一般的に Pyrrolidine-2,4-dione 骨格を有する化合物において、その自由エネルギーは *E* 体よりも *Z* 体の方が低い。これが CghA の生成物阻

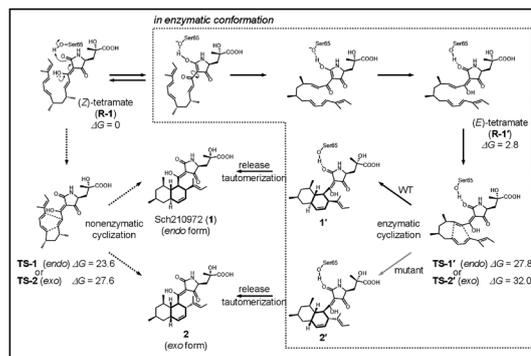


図4. CghA によるオクタリン環形成における分子内 DA 反応の予想経路

害回避機構に関わっていると考え、予想される生合成中間体の鎖状基質における自由エネルギーを算出した。その結果、予想通り *E* 体の生合成中間体の自由エネルギーは *Z* 体よりも大きいことがわかった。17, 18 位が *Z* 体の基質の自由エネルギーが、*E* 体よりも小さいにもかかわらず、CghA はエネルギーの高い *E* 体を基質としていることから、生合成的に不利な *E* 体を基質とし、遷移状態の構造を **1** (*Z* 体) と異にすることで、生成物阻害を戦略的に回避していることが明らかとなった³⁾。

おわりに

これまで DAase における基質認識・立体選択的環化・生成物阻害回避機構について、その分子基盤を解明することを目的に研究を行ってきた。CghA-1 の複合体結晶構造解析および変異体の速度論解析からは、酵素の基質許容に関する知見が得られ、ジエノフィルの電子求引に関わるアミノ酸残基を明らかにすることができた。DAase の生成物阻害回避機構については、計算解析による遷移状態の自由エネルギーを算出することで、合理的な説明が可能となり、酵素の巧妙さを知ることができた。さらに酵素を改変することで、立体選択性の異なる酵素の創製に成功した。これらの結果は、糸状菌由来の DAase の構造基盤に革新的な知見を与えただけでなく、DAase のエンジニアリングに関する今後の重要な指針となったと言える。

(引用文献)

- 1) Minami A. Oikawa H. *J. Antibiot.*, **69**, 500-506 (2016)
- 2) Sato M. Yagishita F. Mino T. Uchiyama N. Patel A. Chooi Y.H. Goda Y. Xu W. Noguchi H. Yamamoto T. Hotta K. Houk K.N. Tang Y. Watanabe K. *ChemBioChem*, **16**, 2294-2298 (2015)
- 3) Sato M. Kishimoto S. Yokoyama M. Jamieson C.S. Narita K. Maeda N. Hara K. Hashimoto H. Tsunematsu Y. Houk K.N. Tang Y. Watanabe K. *Nat. Catal.*, in press (2021)

謝辞 本研究は、静岡県立大学薬学部、米国 University of California, Los Angeles (UCLA) において行われたものです。研究を遂行するにあたりご指導ご鞭撻を賜りました渡辺賢二先生、Yi Tang 先生に厚く御礼申し上げます。本研究の成果は、多くの共同研究者ならびに研究室の学生諸子のご協力によって達成されました。すべての方々のお名前を挙げることはできませんが、本研究に携わった皆様方に深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦いただきました、静岡県立大学薬学部、渡辺賢二先生に厚く御礼申し上げます。