

C-N 結合形成酵素の反応機構解明と C-S 結合形成への応用

東京大学大学院 薬学系研究科 森 貴裕

【略歴】

2010 年 静岡県立大学薬学部卒業

2014 年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程中退

2014 年 東京大学大学院薬学系研究科・助教

2016 年 博士 (薬科学)・東京大学

2016 年 ETH Zürich, Department of Chemistry and Applied Biosciences 博士研究員

2018 年 東京大学大学院薬学系研究科・助教 現在に至る

2020 年 JST 戦略的創造研究推進事業さきがけ「革新的植物分子デザイン」研究者 (兼任)

テレオシジン B は 1960 年に放線菌から単離された細胞毒性物質であり、PKC 活性化作用を持つため、癌の進行を研究するにあたり有用な生化学的ツールとなりうる。またその生合成中間体である indolactam V は、PKC 活性化作用に必須な構造であり、PKC 活性化作用に加え、iPS 細胞・ES 細胞の分化誘導作用を有することも報告されている¹。我々の研究室において、*Streptomyces blastmyceticus* のゲノムシーケンスよりテレオシジン生合成遺伝子クラスターを同定し、TleB が C-N 結合の形成を触媒し、活性発現に必須の indolactam 環の構築を行うことを明らかとした^{2,3} (図 1)。

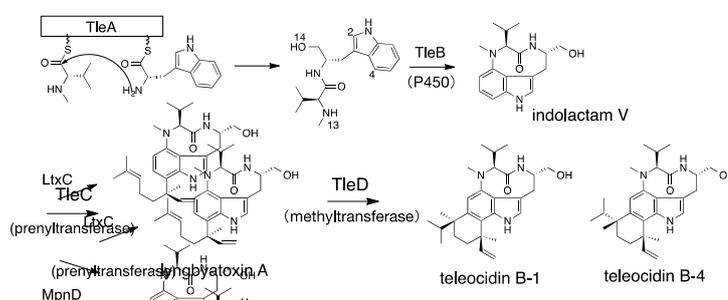


図 1 : テレオシジン類の生合成

プローブ基質、X 線結晶構造解析に基づいた C-N 結合反応触媒機構の解明

非天然型テレオシジン類縁体の酵素合成を最終目標とし、まず基質アナログをプローブとした酵素機能解析や、X 線結晶構造解析により TleB とそのホモログ酵素 HinD の触媒機構の解明を行なった。N13 位、N1 位の置換基の違いによる酵素の基質特異性や反応性を検討すべく、13 位の -NHCH₃ 基を -NH₂、-OCH₃、-OH、N-cyclopropyl 基へ置換した化合物や、indole 環を benzo[*b*]thiophene や N1-methyl indole へ置換した化合物を合成し酵素反応を行った。その結果、TleB、HinD はすべての化合物を基質として受け入れ、-NH₂基、-OCH₃基、-OH 基へと置換した基質からは、14-OH から C2 位への 6 員環形成反応が進行した 6/5/6 縮環化合物や脱メチル化反応が進行した化合物を生成した。N-cyclopropyl 基からは cyclopropane 環が開環した化合物を取得した。また、benzo[*b*]thiophene 置換体からも 13 位の脱メチル化が進行した化合物を、さらに N1-methyl indole 置換体からは N1-methyl 基が酸化された化合物を生成した。本結果より、N13 位と N1 位が反応点であり、酵素反応において N1 位と N13

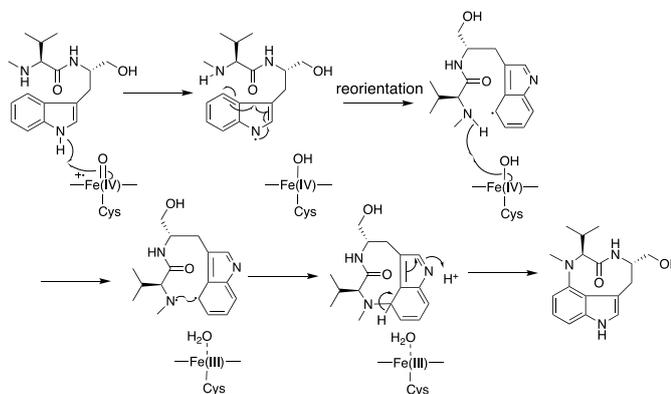


図 2 : TleB、HinD の 9 員環ラクタム生成機構

位の水素原子が引き抜かれて C-N 結合形成反応が進行することが示唆された。

次に、構造の観点から TleB と HinD の詳細な酵素触媒機構を明らかとするため、酵素の X 線結晶構造解析に着手した。その結果、TleB と HinD の基質、-OH 置換アナログ、benzo[*b*]thiophene 置換アナログとの複合体構造の取得に成功した。基質の活性部位における結合様式を精査したところ、基質、-OH 置換アナログいずれの場合においても indole 環の N1 位がヘム鉄に近接することが判明し、C-N 結合形成、および、6 員環形成反応は、まず N1 位からの水素原子の引き抜きによって開始することが示唆された。一方、benzo[*b*]thiophene 置換アナログとの複合体構造においては、N13 位がヘム近傍に位置しており、N1 位の水素原子の引き抜きの後、基質酵素複合体のコンフォメーションに変化が生じ、N13 位がヘムに接近することでヘム鉄が N13 位の水素原子を引き抜き、ラジカルを生成すると考えられた。以上の基質アナログを用いた *in vitro* 酵素反応と、X 線結晶構造解析の結果から、TleB と HinD の酵素反応機構は、N1 位と N13 位の二つの位置から水素原子を引き抜きジラジカルが形成し、ラジカルカップリング反応により酸化的に C-N 結合を形成するものと考察した⁴ (図 2)。

酵素の C-S 結合形成への応用

上述した結果をもとに C-N 結合形成反応を C-S 結合形成に利用するため、13 位の -NHCH₃ 基を、より解離エネルギーの低い -SH 基へと置換した化合物を合成し、酵素反応を行なった。その結果、2 種類の酵素反応生成物が得られ、酵素反応生成物の構造解析の結果、一つは S13 位と indole 環 4 位の間でチオエー

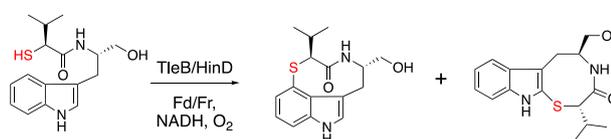


図 3：チオール置換化合物との酵素反応

テル結合を形成した thioindolactam V と構造決定した。もう一方の生成物は、indole 環 C2 位と S13 位間で C-S 結合を形成した新規 6/5/8 縮環構造を有する化合物と決定した (図 3)。興味深いことに、他のヘテロ原子で置換した基質アナログからは 8 員環構造は形成されず、この反応は硫黄原子の高い求核性が関与していると推察される⁵。

また、DFT 計算及び metadynamics 法によって thioindolactam V が理論上取りうる各配座⁵に関して、溶液中における熱力学的安定性及び動的挙動を解析したところ、thioindolactam V は溶液中において indolactam V と異なる配座で存在することが示唆された。

今後の展望

本研究では、酵素の試験管内での機能解析、X 線結晶構造解析の手法を用い、より詳細な酵素機能や反応メカニズムを深く理解した上で、反応メカニズムに基づいた合理的な基質設計により新規化合物を創出することに成功した。今後、本研究例をモデルケースとして様々な P450 酸化の反応機構を基盤とした基質設計と新規化合物の創出を行いたいと考えている。

謝辞

本研究は東京大学薬学系研究科天然物化学教室と東京大学大学院薬学系研究科 大和田智彦教授、東京大学大学院工学系研究科 藤田誠教授のグループとの共同研究で行われたものです。阿部郁朗教授をはじめとして指導を賜りました先生方、その他皆様に深く感謝申し上げます。

1. Thatava T, *et al.*, *Gene Ther.* **18**, 283–93 (2011).
2. Awakawa, T., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9910–9913 (2014).
3. Morita, I., Mori, T., Abe, I. *Chem. Eur. J.* **27**, 2963–2972 (2021).
4. Morita, I., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 3988–3993 (2020).
5. He, F., *et al.*, *Nature Chem. Biol.* **15**, 1206–1213 (2019).