

三員環形成を触媒する非ヘム鉄酵素の機能解析

東京大学大学院 薬学系研究科 牛丸 理一郎

【略歴】

2011年3月 名古屋大学 理学部 化学科 卒業

2013年3月 名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻 (化学系) 修士課程修了

2019年12月 Ph. D., Department of Chemistry, The University of Texas at Austin

2020年1月 東京大学大学院 薬学系研究科 助教

医薬品化合物の多くは天然物に由来しており、そのほとんどが生物活性発現において重要な役割を果たす環状構造を有している。異種宿主を利用した天然物生合成経路の再構築や変異導入に基づく生合成酵素の触媒機能改変は新規活性物質を効率的に創製するための有力な手段である。しかしながら、生合成システムを最大限利用するためには生合成経路の解明と酵素反応の反応機構解明が必須である。特に、天然物の形や柔軟性を規定する環状構造の生成機構の理解は重要であるものの、天然物にみられる複雑環構造の中には、比較的理解の進んでいるルイス酸・塩基触媒機構のみでは生合成が説明できないものも多く、その解明が待たれる。我々は、複雑骨格天然物の特殊な環構造に着目してその生合成経路解明に取り組み、特異なラジカル環化反応を触媒する新規酵素を同定し、それらの詳細な反応機構を明らかにしてきた。

本研究では、特に、エポキシド、^{1,2}シクロプロパン、³アジリジン⁴などの三員環骨格有する天然物を対象に生合成研究を行うことで、新規三員環合成酵素の同定しそれらの酵素反応機構を解明することを目的とした。三員環構造は多くの天然物に見られ、その高い環歪に由来してDNAやタンパク質など多様な生体分子と反応しうることから、生物活性に深く関与する重要な構造である。しかしながら、歪みの大きい三員環が自然界においてどのように生合成されるかは未だ謎が多い。また、三員環構造はしばしばラジカル反応を触媒する酵素群によって構築されることが知られているものの、反応選択性の制御機構やラジカル中間体の反応性など、その反応機構の詳細については明らかになっていない。エポキシド、シクロプロパン、アジリジンは医薬品にも頻繁に見られる化学構造であるものの、官能基許容性や選択性の観点で実用的な化学合成法は未だ限られている。三員環形成酵素を同定し、その反応機構に基づいて適切に合成化学に応用することができれば、単工程かつ選択的な新規生物活性物質の創製につながる。本研究では遺伝子操作、ゲノムマイニング、重水素化基質の合成や反応、速度論的解析、理論計算など複合的手法を用いることで天然物化学における三員環合成に関する新たな知見を与えるのみならず、同定した触媒機構に基づき酵素機能を強化・改変することで、新規生体触媒の創出も期待される。

立体分岐型シクロプロパン化酵素の同定と解析

ペプチド天然物ホルマオマイシンを構成するニトロシクロプロピルアラニン (NcpAla) の生合成機構を明らかにした。³特に、非ヘム鉄- α -ケトソグルタル酸 (α KG) 依存酵素 HrmJ が 6-ニトロノルロイシンの脱水素型シクロプロパン化を触媒し (1'R,2'R-Ncpa を立体選択的に与えることを見出した (図 1)。このタ

ンパク質ファミリーの既知酵素の多くは基質の水酸化反応を触媒するため、HrmJ が触媒する脱水素型 C-C 結合形成を伴うシクロプロパン化反応は極めて例外的であるといえる。また、ベラクトシン合成経路における HrmJ の相同性酵素 BellL も同定し、BellL は HrmJ の生成物の立体異性体である (1'S,2'S)-Ncpa を与えることが明らかとなった。さらには、重水素標識基質を化学合成し、水素引き抜きの立体選択性を解析した結果、BellL の反応は C4 位において立体

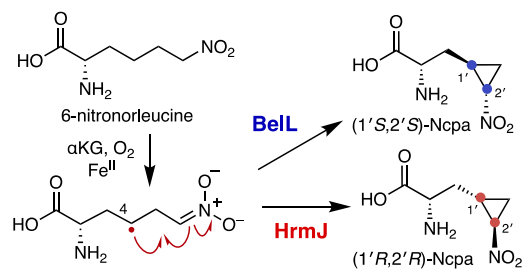


図 1. HrmJ と BellL が触媒する立体分岐型シクロプロパン化反応

保持で進行し、HrmJ の反応は立体反転で進行することが示された。2 種類の酵素において、反応の立体選択性を制御するアミノ酸残基を特定するべく、アミノ酸変異実験を行なったところ、136 番目の残基 (HrmJ では Arg、BellL では His) が生成物の立体化学を厳密に制御していることも見出した。本成果は天然物の複雑環状骨格の形成に寄与するラジカル種中間体の新たな反応性を明らかにするとともに、化学合成が困難なシクロプロパン化合物を立体選択的に供給する方法論を与えるものと期待される。

アミノ酸アジリジン合成酵素 TqaL の反応機構解明

非ヘム鉄- αKG 依存性酵素 TqaL は天然物 tryptoquialanine の生合成経路において、L-バリンの C β -H 結合の開裂を伴いアジリジンを生合成する。アミンを酸化しアジリジンを与える極めて珍しい触媒活性を示すものの、TqaL が触媒する閉環反応機構の詳細は不明であった。本研究では、立体選択的に重水素化した L-バリンを化学合成しプローブとして用いることで、

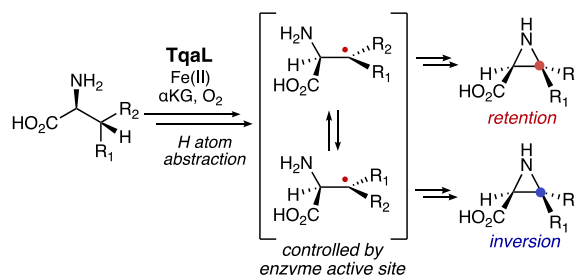


図 2. TqaL の活性部位によるアジリジン立体化学制御

TqaL 触媒による L-Val のアジリジン化反応が、C3 立体中心の保持と反転を伴う混合立体化学過程で進行することを明らかにした (図 2)。⁴また、TqaL は L-イソロイシン と L-*allo*-イソロイシンを受け入れるものの、二つのアジリジン生成物立体異性体を同一の比で与えることが示された。変異体実験により、反応の種類 (アジリジン化または水酸化) と立体選択性は、Ile343 と Phe345 によって制御されていることが明らかになった。本研究は、TqaL の部位に対しアミノ酸置換を導入することで、ラジカル中間体のコンフォメーションを変化させ、アジリジン化反応の立体選択性を人為的に制御しうることを示した。

謝辞

本研究は東京大学薬学系研究科天然物化学教室において行われたものであり、ご指導いただきました阿部郁朗教授をはじめとして指導を賜りました先生方、共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Ushimaru, R., et al. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 1062-1066 (2019).
2. Ushimaru, R., et al. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 7433-7436 (2018).
3. Shimo, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 143, 18413-18418 (2021).
4. Tao, H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 144, 21512-21520 (2022).