

計算化学と実験科学の協奏によるテルペン環化酵素設計

東京大学 大学院農学生命科学研究科
応用生命工学専攻 生物情報工学研究室
佐藤 玄

研究目的

本研究の学術的背景 植物や微生物が作り出す『天然有機化合物（以下、天然物）』は人類の「衣・食・住」を支えてきた。例えば、カイコが生産するポリペプチド（フィブロイン）は絹として使われ、植物が生産する天然ゴムはタイヤなど様々な工業製品に使われている。さらに、植物や菌類が生産するテルペン化合物は、医薬品・接着剤・香料・電子材料などあらゆる分野に応用され、社会の基盤を支えている。これは、ひとえに天然物が多種多様な立体電子構造を持ち、様々な機能を提供してきたからに他ならない。言い換えれば、新奇天然物の発見は新材料・医薬品の開発に直結する（ための『化学空間』を提供しうる）。一方で、天然資源からの新奇天然物の発見は年々困難となっており、化学者に知恵と打開策が求められている。何より新奇天然物の効率的創出法は未だに存在しない。これは、従来の実験化学を主とする研究手法では酵素反応機構や基質認識メカニズムを完全に解明することが困難であることが大きな要因であり、このことが生合成遺伝子の二次利用を阻んできた。

本研究の目的 本研究課題では、天然物がどのようにして構造多様性を生み出しているのか？という天然物化学研究の根源的な問いに計算化学と実験科学の両面のアプローチを用いて迫ることを第一の目的とする。計算結果に基づいて望みの構造を持つ天然物を「創り出す」人工酵素の設計手法の確立を目指すことを第二の目的とする。

結果および考察

1. Variexenol 生合成経路

本研究では、Dickschat らが最近報告した新規ジテルペン化合物 variexenol A および B の生合成経路に着目した[1]。これらの化合物は iso-GGPP とよばれる基質アナログから *Aspergillus brasiliensis* の variediene 合成酵素(AbVS) を経て合成される。

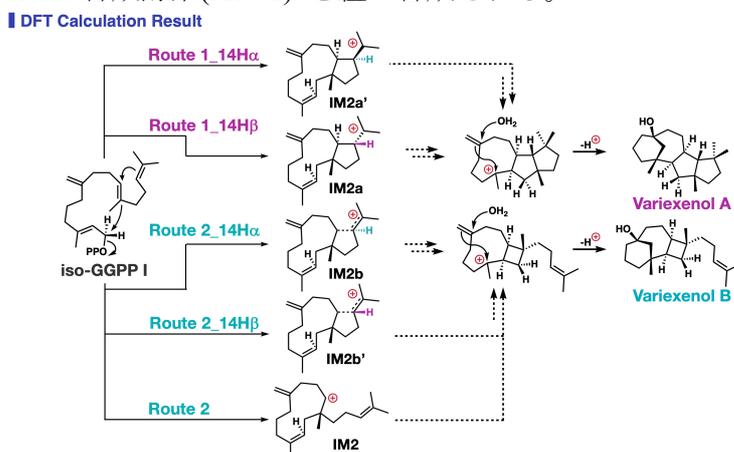


図 1. Variexenol A と B の生合成経路

本研究では、DFT 計算を用いて、variexenol の反応機構の詳細を明らかにし (図 1)、*Beilstein J. Org. Chem.* 誌に報告した。[2]

テルペン環化酵素のドッキングシミュレーションは一般に難しいとされている。それは、テルペン環化反応の基質中間体が炭素と水素のみで構成されていることと、テルペン環化酵素の酵素活性部位が疎水性残基によって構成されているために、水素結合などが無いことに起因する。テルペン環化酵素の設計を行うためには、まずはテルペン環化酵素の正確なドッキング手法の開発が必要である。そこで、本研究ではタンパク質モデリングソフト Rosetta を用いて、TerDockin と呼ばれる手法でドッキングシミュレーションを行った。図 2 に示すように各中間体間の RMSD 値の小さいドッキングモードを得ることに成功した。

テルペン環化酵素は、基質の初期構造を適切に固定することにより、環化反応の立体選択性・化学選択性を制御していると考えられている。今回得られた基質-酵素複合体の結果から、芳香族性アミノ酸残基によって基質の Me 基が取り囲まれていることが分かってきた。今後は、TerDockin 手法を発展させ、また今回の研究を通して得られた知見をもとに、テルペン環化酵素の設計を行う予定である。

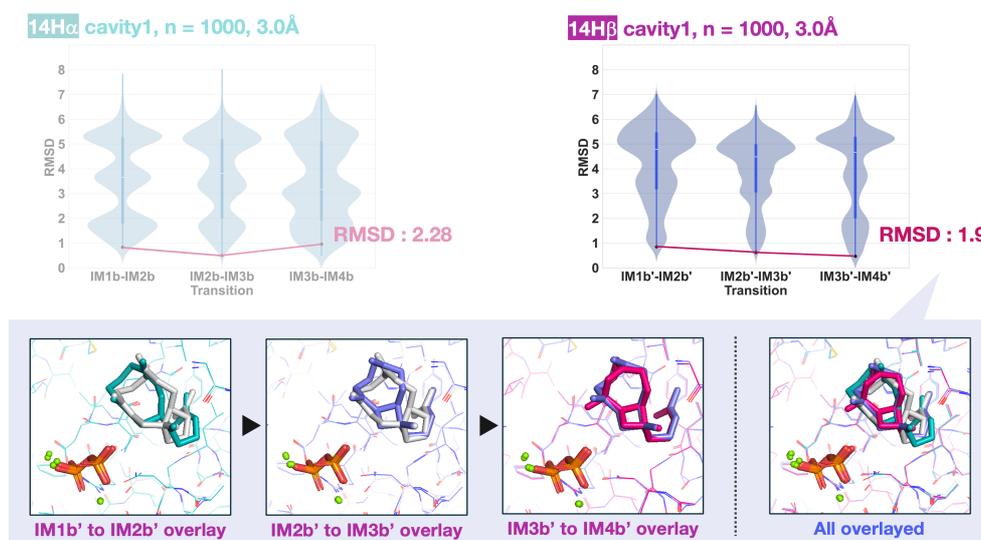


図 2. テルペン環化酵素のドッキングシミュレーションの結果

2. peniroquesine 生合成

peniroquesine は、*Penicillium roqueforti* YJ-14 から単離されたセスタテルペノイドである。[4] 図 3 に示すように、当初の予想生合成経路では、一般的に不安定とされる 2 級カチオンが 3 連続で生成することが示唆されていた。また、生合成終盤において、7/4 員環の縮環部分において複雑な転位反応が進行して 6/5 員環の D/E 環部分が構築されていたが、こちらの詳細なメカニズムも未解明であった。我々は、計算化学的手法を用いて、この複雑な環化メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、10 段階以上にも及ぶ超連続多段階反応を計算機上で再現することに成功した。2 級カチオンは、実際には中間体としては存在せず、transient な構造として存在し、協奏的に反応が進行することが明らかとなった。また、転位反応に関しては縮環部分の立体配座が非常に重要であることが明らかとなった。本研究およびその応用研究は、ともに *JACS Au* 誌に掲載された。[5,6]

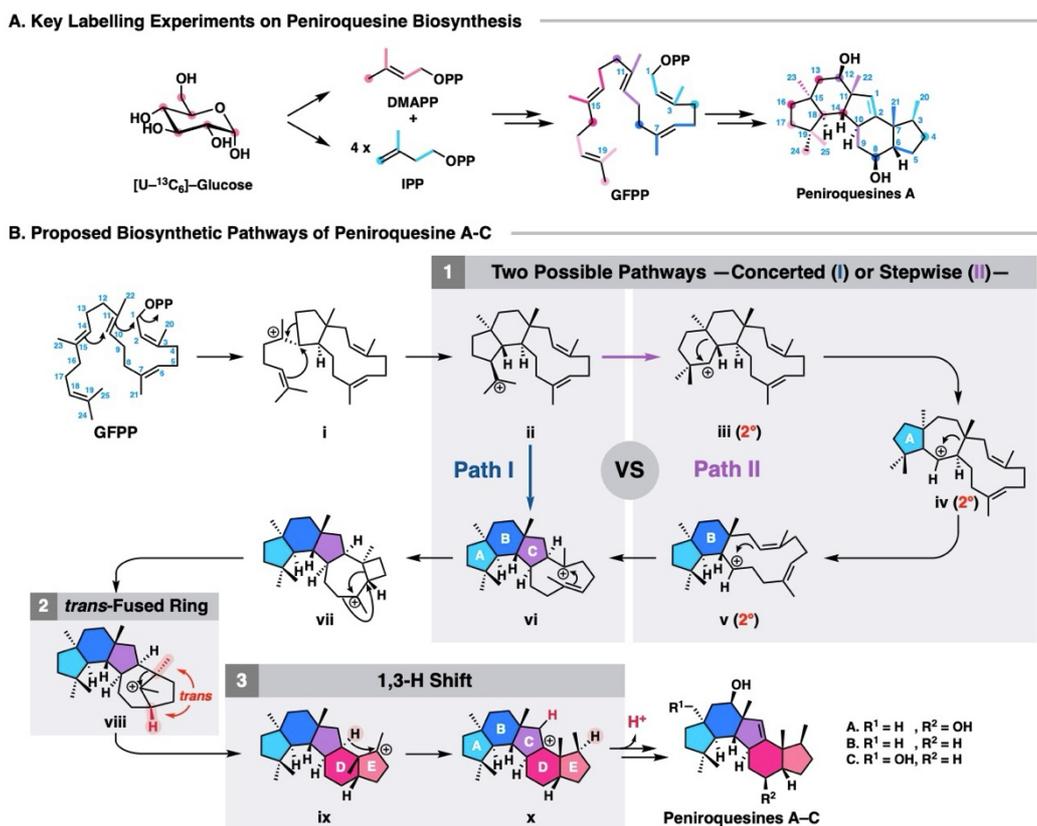


図3. Peniroquesine 生合成での予想生合成反応機構

A) Peniroquesine の標識実験の結果、B) Peniroquesine の予想生合成経路

文献

- Heng Li and Jeroen S. Dickschat* Diterpene Biosynthesis from Geranylgeranyl Diphosphate Analogues with Changed Reactivities Expands Skeletal Diversity
Angew. Chem. Int. Ed. **2022**, *61*, e202211054.
- Moe Nakano, Rintaro Gemma, Hajime Sato* Unraveling the Role of Prenyl Side-Chain Interactions in Stabilizing the Secondary Carbocation in the Biosynthesis of Variexenol B.
Beilstein J. Org. Chem., **2023**, *19*, 1503-1510.
- Wang JP, Yu J, Shu Y, Shi YX, Luo P, Cai L, Ding ZT. Peniroquesines A-C: Sesterterpenoids Possessing a 5-6-5-6-5-Fused Pentacyclic Ring System from *Penicillium roqueforti* YJ-14. *Org Lett.* **2018**, *20*, 5853–5856.
- Matsuyama T, Togashi K, Nakano M, Sato H, Uchiyama M. Revision of Peniroquesine Biosynthetic Pathway by Retro-biosynthetic Theoretical Analysis: Ring Strain Controls the Unique Carbocation Rearrangement Cascade.
JACS Au, **2023**, *3*, 1596-1603.
- Yuichiro Watanabe, Takahiro Hashishin, Hajime Sato,* Taro Matsuyama, Masaya Nakajima, Jun-ichi Haruta, Masanobu Uchiyama*
JACS Au, **2024**, *4*, 3484–3491.