

創薬を指向する天然物合成酵素の機能改変と応用

東京大学大学院薬学系研究科

森 貴裕

1. 背景

植物や微生物が生産する天然薬物はその構造多様性と複雑さ、高い生物活性から医薬品のリード化合物として大きな役割を担ってきた。天然薬物の生合成遺伝子解析の研究が進み、その全容や鍵反応を担う酵素が明らかとなりつつある現在、次に考慮すべきはその知見をいかに創薬に利用するかである。これまでに、多様な化合物が単離され、構造解析、生合成研究が行われていることに比べ、それら化合物の生理活性や生体内局在、ターゲット分子の解析は例が少ない。これは、天然物が複雑な構造を有しており、部位特異的、立体選択的に蛍光基などの検出するタグを付加することが難しいということや、天然物のターゲット分子との相互作用には官能基が必要であるが、合成的にプローブを作成するためにはその官能基を利用して修飾する必要があることなどが要因として挙げられる。

2018年にいただいた研究助成課題において、我々は医薬品資源としての利用が期待される化合物が多いメロテルペノイド化合物（ポリケタイド-テルペノイド・ハイブリッド型化合物）の生合成遺伝子群中に見出される非ヘム鉄 α -ケトグルタル酸（ α -KG）依存性ジオキシゲナーゼに着目して研究を行った。酵素立体構造を基盤として酵素に変異を導入することで反応性の拡張を行い、非天然型新規化合物の創出に成功した（図1）^{1,2}。

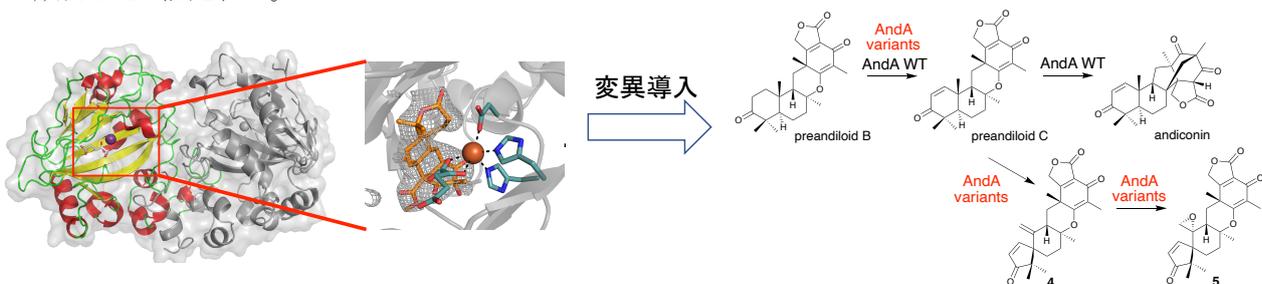


図1. 2018年度研究助成における成果概要

本ステップアップ助成では、酵素を利用し生物活性化合物の修飾することで、新規化合物の創出を目指した。また、酵素の立体構造に基づいた酵素反応性の改変技術を拡張し、触媒反応を従来の酸化反応からアジド化、シアノ化、ニトロ化などのイオン分子の導入反応へと機能改変することで、天然物に合成修飾可能な官能基を付加する技術基盤の確立を図った。これにより、多様な修飾型新規生物活性化合物の創出を試みた。

2. 実験、結果

2.1. TlxI-J野生型の基質特異性解析

本研究で使用する対象酵素として、メロテルペノイドtalaromyolidesの生合成中、骨格変換に関わる α -KG依存性ジオキシゲナーゼ、TlxI-Jを選定した³。本酵素は、 α -KG酵素においてほとんど見られないヘテロダイマーを形成する酵素であり、talaromyolide類の生合成中、骨格変換反応に関わる鍵酵素である。酵素反応において、TlxI-Jは基質のC-5とC-9への段階的水酸化を触媒し、さらに、TlxI-Jはtalaromyolidesの骨格を形成するために、水酸化された基質の異なるコンフォメーションを受け入れる。このことから、本酵素は比較的寛容な基質特異性を有していることが考えられた（図2）。

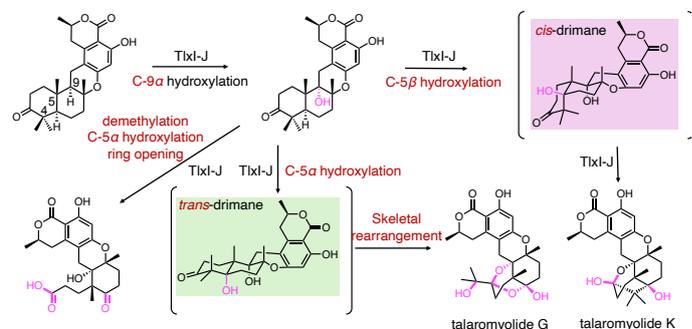


図2. TlxI-Jの触媒する反応

まず、TlxI-J野生型の基質特異性を調査した。様々な生物活性ステロイドホルモンおよび植物ポリケタイドを用いた結果、TlxI-Jは幅広いステロイドホルモンやフラバノンに効率的に受け入れ、新規生成物を与えることが判明した。

生成物の構造決定の結果、TlxI-Jはprogesteroneを受容し、14 α -hydroxy progesteroneおよび9 α ,14 α -dihydroxy progesteroneを生成することが明らかとなった(図3A)。この結果は、ステロイド骨格の14 α 水酸化に関する α -KG依存性ジオキシゲナーゼの初報告であり、digoxine、bufotalin、proligestoneなどのC14官能化ステロイド医薬品の化学-酵素合成の起点となることも期待される。さらに、TlxI-Jは4-androstane-3,17-dioneに対しては、8位に水酸化が進行し、8 β -hydroxy-4-androstane-3,17-dioneを、estra-4,9-dien-3,17-dioneからは、8 β -hydroxy-9,10- β -epoxide化合物を生成した(図3B,C)。6-OH flavanoneおよび7-OH flavanoneに対しては、C2,3位の脱水素化反応を触媒し、flavone化合物を生成した(図3D,E)。この結果から本酵素が植物におけるフラボン生合成の酵素フラボンシンターゼI (FNSI) およびフラボンシンターゼII (FNSII) に類似する反応を触媒できることが判明した。

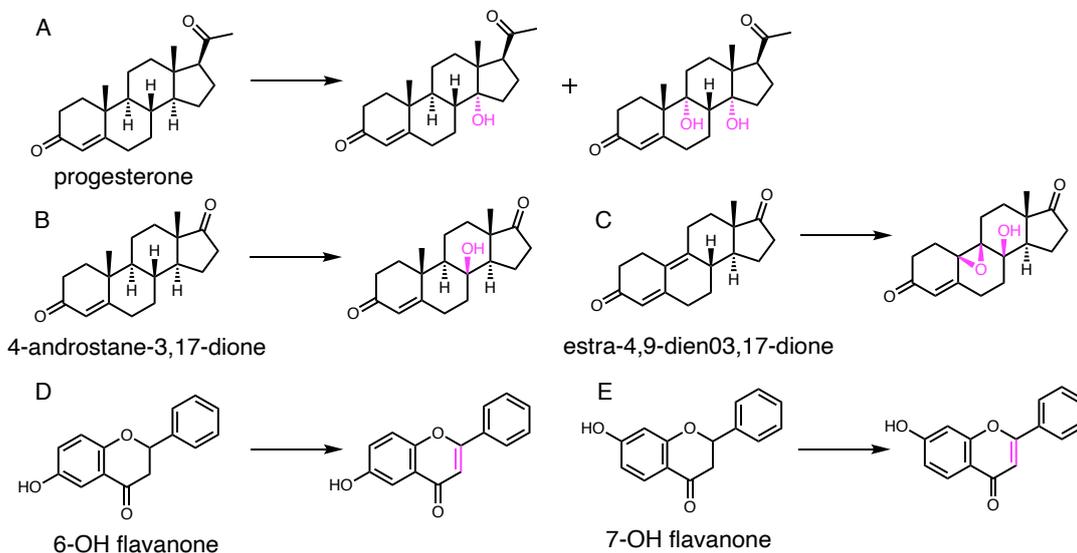


図3. TlxI-TlxI-Jの触媒する酵素反応の生成物

2.2. 進化分子工学及び立体構造を基盤としたアジド化反応への機能改変

触媒反応を酸化反応からアジド化やシアノ化、ニトロ化などのイオン分子の導入反応へと機能改変するため、進化分子工学を実施した。 α -KG依存性ジオキシゲナーゼと類似した α -KG依存性ハログナーゼにおいては、 α -KG依存性ジオキシゲナーゼに保存されている2xHis-1xAspの触媒残基のうち、Aspがglycineに置換されている。そこで、TlxI-Jにおけるアスパラギン酸(D138)をalanineまたはglycineに置換し、鉄に配位するアニオンの導入を試みた。その結果、変異体TlxJ_D138G-TlxI (TlxI-J Mut1)は、progesteroneのアジド化を触媒することが確認された。アジド化反応と水酸化反応の選択性は0.6:1であった。構造決定の結果、TlxI-J Mut1は、プロゲステロンのC14 α 位置にアジド基を導入することが判明した。アジド化活性をさらに向上させるため、TlxI-JのDirected evolutionを実施した。第一ラウンドでは、構造を基盤として、鉄中心周囲の残基や活性部位を囲むループ領域を選択し、部位飽和変異ライブラリーを構築した。約2,000個の変異体をスクリーニングした結果、TlxI-J Mut2が高い基質消費率を示した。さらに、本酵素を鋳型として数ラウンドの進化分子工学を行った結果、アジド化反応とアジド化反応と水酸化反応の選択性は1.26:1までアジド化選択性が上昇した変異体TlxI-J Mut3を取得した(図4)。

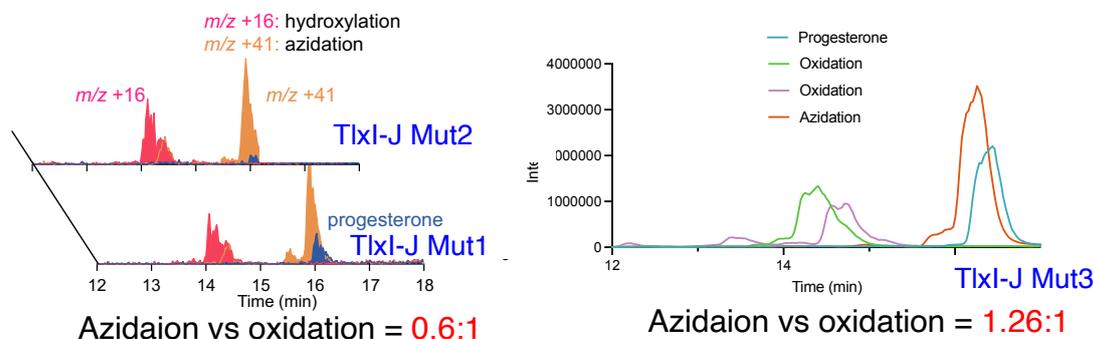


図4. TlxI-J変異体のアジド化反応

2.3. 酸化修飾を介した-OCNとの反応による新規化合物の創出

次に、TlxI-Jによる-OCN導入反応を検討した。TlxI_D138G-TlxI変異体 (TlxI-J Mut1) は、4-androstane-3,17-dioneに対して微量の-OCNが導入した生成物を生成することが確認された。本変異体を鋳型とした3ラウンドのdirected evolutionにより、高い-OCN導入活性を示すTlxI-J Mut4を取得した (図5)。構造決定の結果、2-oxazolidone骨格を有する化合物と決定し、C7位の水酸基とC6位のシアン酸基が2-oxazolidone環を形成していることが判明した。試験管内での反応解析の結果、OCNは非酵素的に反応することが示唆され、さらに、化合物2をTlxI-J Mut4と反応したところ、1は生成しなかった。これらのことから、TlxI-J Mut4はC6位のカルボニル化をまず触媒し、C7位を水酸化することでエノール中間体を生成し、その後OCNが非酵素的に反応することで1が生成すると考えられる (図6)

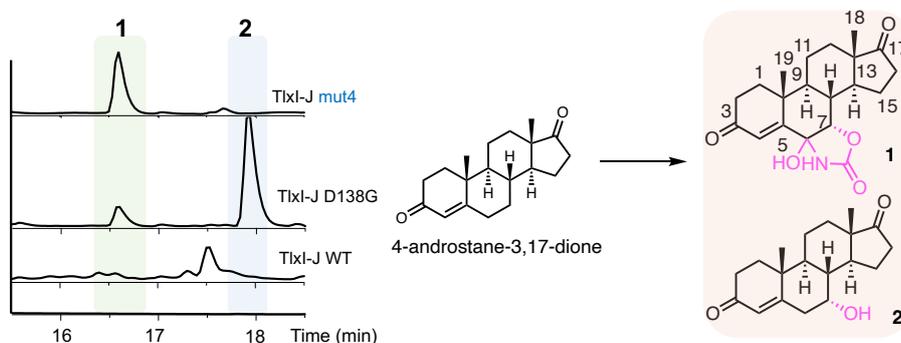


図5. TlxI-J変異体の-OCN化反応

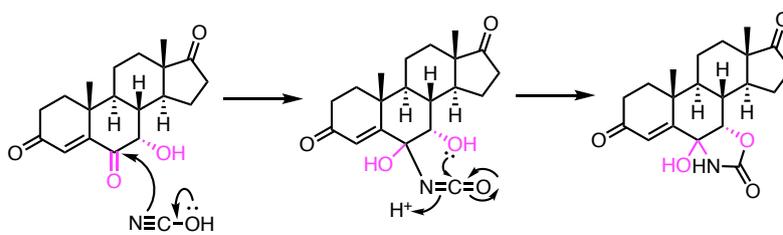


図6. 2-oxazolidone環形成の推定反応機構

3. 今後の展望

本研究では、TlxI-Jがステロイドの三級C-H結合の選択的酸化を触媒する有用な生体触媒であることを明らかにした。また、directed evolutionによりアジド化を効率的に触媒する変異体および、酸化を起点とした-OCN導入反応を行う変異体の創出に成功した。今後、天然物に導入した官能基を足場として合成的に化合物を誘導体化することで、新規生理活性物質の化合物ライブラリーの構築へと展開する予定である。さらには、酵素反応生成物に対して検出可能な蛍光色素や抗体などを結合させ標識することで、天然物が結合するターゲット分子の解析や天然物の細胞内での可視化、生体内における局在解析へとつながることも期待される。

4. 謝辞

本研究は、公益財団法人アステラス病態代謝研究会の研究助成による援助をいただき、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す。同教室の阿部郁朗教授、共に研究を進めてきた学生諸氏に深く感謝申し上げます。

5. 参考文献

- (1) Mori, T., Nakashima, Y., Chen, H., Hoshino, S. Mitsuhashi, T., Abe, I., *Chem. Commun.*, **58**, 5510-5513 (2022)
- (2) Mori, T., Yu, Z., Tao, H., Abe, I., *Org. Lett.*, **24**, 1737-1741 (2022)
- (3) Li, X., Awakawa, T., Mori, T., Ling, M., Hu, D., Wu, B., Abe, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 21425-21432 (2021)