

平成 27 年度 海外留学補助金による研究経過・成果報告書
[4+2]環化付加酵素を用いた非天然型天然物の創製

静岡県立大学薬学部

佐藤 道大

[Introduction]

糸状菌から発見された高脂血症薬 lovastatin は、[4+2]-環化付加反応を通して生合成されると考えられている。[4+2]-環化付加反応は、その化合物の基本骨格を構築するカギ反応であり、不斉点の立体制御も含め重要な反応である。しかし、この反応を触媒する酵素に関する報告は少なく、この反応を触媒する酵素は、新たな知見が得られうる魅力的な酵素となっている。加えて、[4+2]-環化付加反応が関わっているとされる天然物は、lovastatin をはじめ数多く存在している (図 1)。そのため、本反応を触媒する酵素群は、多くの活性化化合物の立体選択的閉環反応に応用できるポテンシャルを有する。

著者は、Sch210972 という化合物における[4+2]-環化付加反応を触媒する酵素、CghA をこれまでに発見しており、本酵素の機能を、X 線結晶構造解析により明らかにすることを目的に研究を行ってきた。

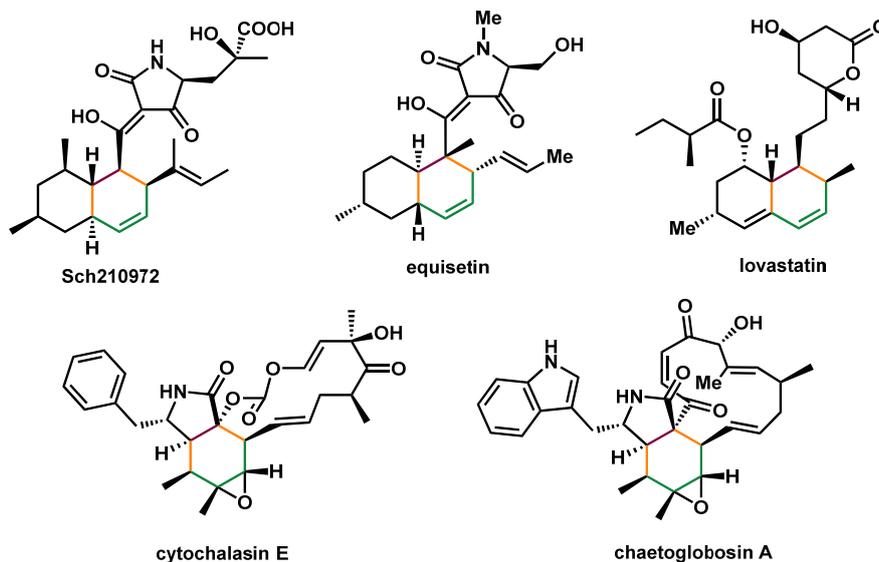


図 1. [4+2]-環化付加反応を通して生合成される化合物

しかしながら、本酵素のタンパク質結晶を獲得するのが困難であったため、本酵素と相同性を持つ他のタンパク質について研究を進めることとした (なお、CghA のタンパク質結晶構造については、共同研究により明らかにすることができた。現在、変異体作成などより詳細な機能解析を行っている)。

CghA をクエリとした相同性検索を行ったところ、相同性を有するタンパク質が数多く見つかった。その中で、*Penicillium oxalicum* のゲノム中に、近隣の遺伝子の並びがこれまでの報告にないものを発見した (図 2, *pox* クラスター)。その遺伝子群には、ポリケタイド合成酵素 (PKS) と PKS-NRPS (非リボソームペプチド合成酵素、ハイブリッド酵素) が並列に存在していた。PKS と PKS-NRPS の二つの酵素によって生合成される化合物に関する報告はなかったことから、この遺伝子群は新規な骨格を有する化合物の生合成を担うことが予想された。

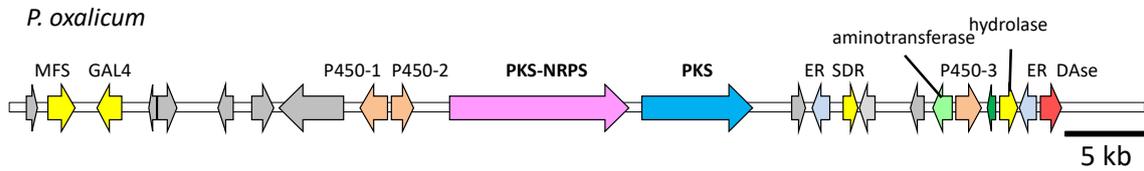


図 2. *pox* クラスターの遺伝子構成

[Result]

RT-PCR の結果、*pox* クラスターは不活性であることが分かったので、クラスターの遺伝子発現を制御している転写因子の活性化を行った (図 3)。活性化した株の抽出物を LCMS により分析したところ、新たに生産された化合物が確認された。それぞれ単離・構造決定をし、新規骨格を含む新規化合物 (**1-10**) であることがわかった (図 3)。これらは天然物には珍しい、スクシンイミドもしくはマレイミド構造を有する化合物であった。

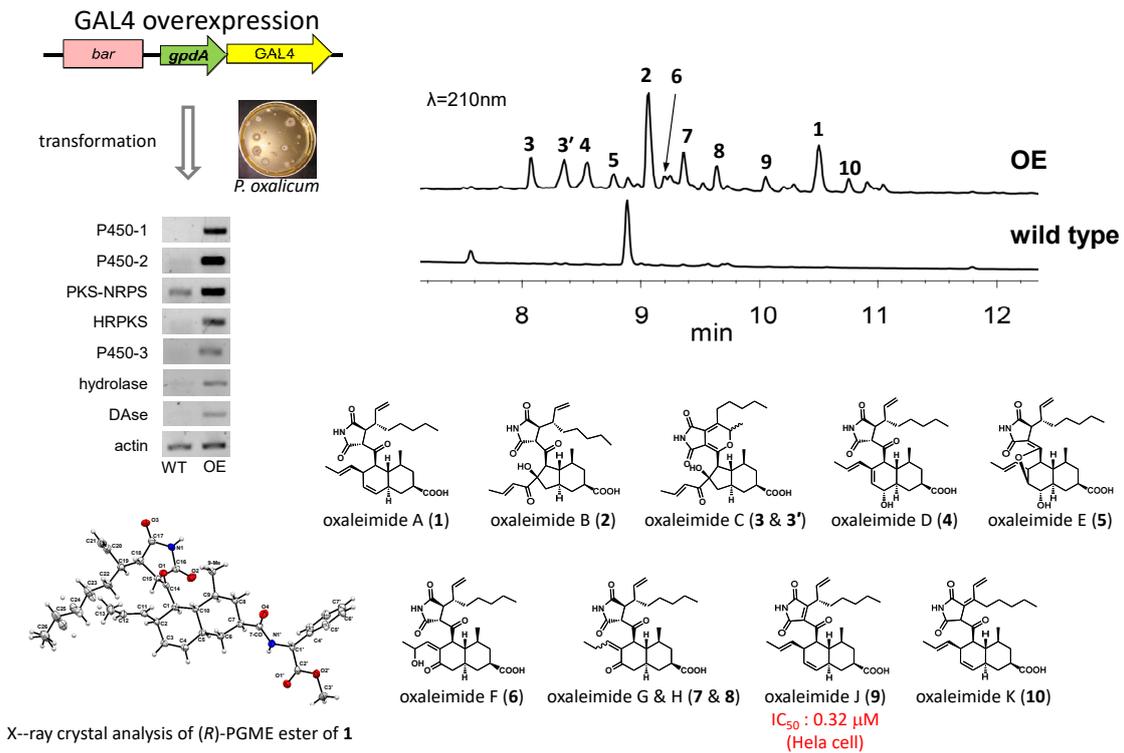


図 3. 転写因子活性化株と野生株の抽出物の LCMS クロマトグラム、および 1-10 の化学構造

マレイミドを有する化合物 **10** は Hela cell に対して強い細胞毒性を有した。一方で、スクシンイミド系化合物は、ほとんど細胞毒性を示さなかった。これは、マレイミドの Michael acceptor としての機能が活性に重要であることを示している。

次にこれらの化合物の生合成機構を明らかにすべく、実験を行った。遺伝子欠損株の作成から、筆者らは PKS、P450-3 およびトランスアミナーゼが PKS-NRPS ハイブリッド酵素の基質であるアミノ酸を生合成すると推測した。

この推測を裏付けるため、*Aspergillus nidulans* を用いた異種発現を行った。その結果、これら 3 つの遺伝子により (*S,E*)-2-aminodec-4-enoic acid (**12**) が作られることが明らかとなった (図 4)。

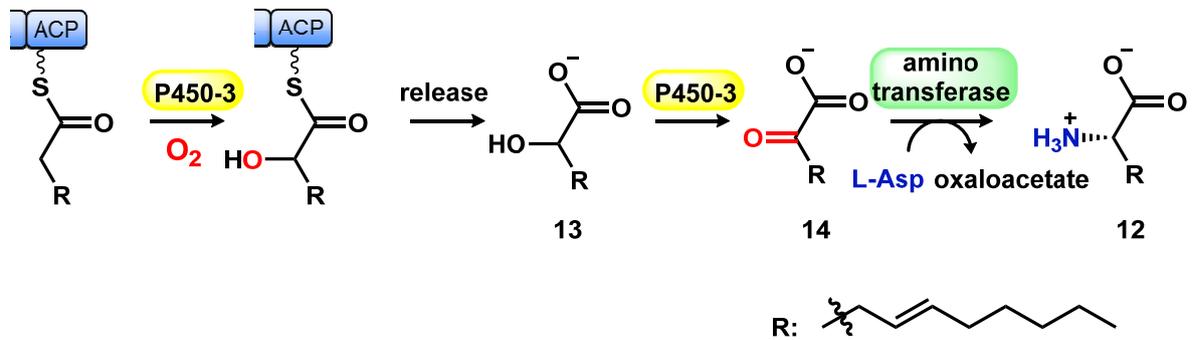


図 4. (S,E)-2-aminodec-4-enoic acid の予想生合成経路

P450-3 は dec-4-enoic acid の alpha 位の炭素に対して 2 度の酸化を行うことで、2-oxodec-4-enoic acid (14) を生合成する。さらにトランスアミナーゼにより、14 から 12 の変換が行われることを *in vitro* 実験により確認した。

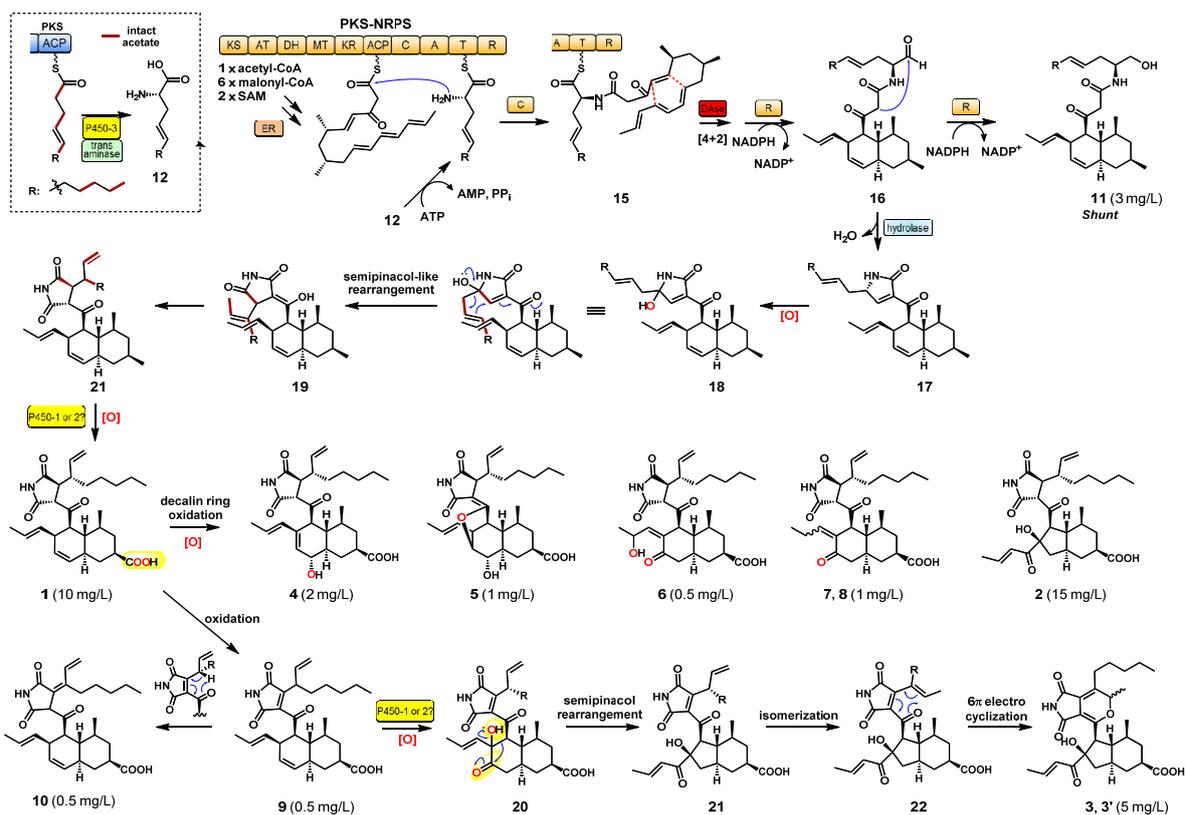


図 5. Oxaleimide 化合物群の予想生合成経路

[Summary]

本化合物の予想生合成経路を図 5 に示す。

本化合物中に存在するデカリン骨格は、[4+2]-環化付加反応を通して生合成されると考えられる。また、セミピナコール型の転位をすることで、末端オレフィンが形成され (18→19)、さらなるセミピナコール転位によって 5,6 員環の形成が行われることが推定された (20→21)。

Oxaleimide 群の類縁体化合物の報告はこれまでに 1 例しかなく、生合成経路はまったくわかっていない。今回筆者は新規骨格 2, 3 を含めた 10 の新規化合物を獲得し、分子生物学的実験によりその生合成経路を大まかではあるが明らかにすることができた (論文投稿中)。今後は詳細な生合成経路について、また本化合物の生物活性についても研究を行っていく予定である。

[最後に]

本留学中では、[4+2]-環化付加反応を触媒する CghA の機能を解明すべく研究を行っていたが、サブテーマとしていた研究に光が見え始め、こちらがメインテーマとなってしまった。運良く結果が出てくれはしたが、プロジェクトの立て方から、重点の置き方など、いろいろと考えさせられた留学期間であった。PI からはプライオリティを常に考えろと言われてきたが、細かいところに集中してしまいがちな筆者にとってはありがたい言葉であった。今後研究を進める上で非常にためになったと思う。CghA の結晶化に関しては、自分の手から離れたわけだが、共同研究者によって触媒メカニズムが明らかにされつつある。今後は変異体の作製などを行い、酵素による [4+2]-環化付加反応について知見を深めていければと思っている。

最後に、非常に有益な留学期間を経済的に支えていただきました、アステラス病態代謝研究会の皆様にご心より感謝申し上げます。