

令和 4 年 4 月 5 日現在

機関番号：23803

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2021

課題番号：19KK0150

研究課題名（和文）酵素の酸化反応をテンプレートとした計算化学による理論天然物化学の構築

研究課題名（英文）Integrating Computational and Experimental Approaches for New Paradigms in Molecule Synthesis

研究代表者

渡辺 賢二（Watanabe, Kenji）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：50360938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：DAaseにおける基質認識・立体選択的環化・生成物阻害回避機構について、その分子基盤を解明することを目的に研究を行った。今回、CghAによるIMDA反応の詳細なメカニズムについて、CghAの分子構造・速度論解析および計算化学によるエネルギー計算から、合理的な知見を得ることができた。また、CghAの構造に基づいた部位特異的変異導入により、exo選択的IMDA反応を触媒するDAaseの創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボカリン型の構造を有するDAaseは報告がなく、天然におけるDAaseの収斂進化を示唆するものであった。またCghA-1の複合体結晶構造解析および変異体の速度論解析からは、酵素の基質許容に関する知見が得られ、ジエノフィルの電子求引に関わるアミノ酸残基を明らかにすることができた。さらに立体選択性に関しては、基質のコンフォメーションをendoではなくexo付加に優位となるよう改変することで、立体選択性の異なる酵素の創製に成功した。また、DAaseの生成物阻害回避機構については、計算解析による遷移状態の自由エネルギーを算出することで、合理的な説明が可能となった。

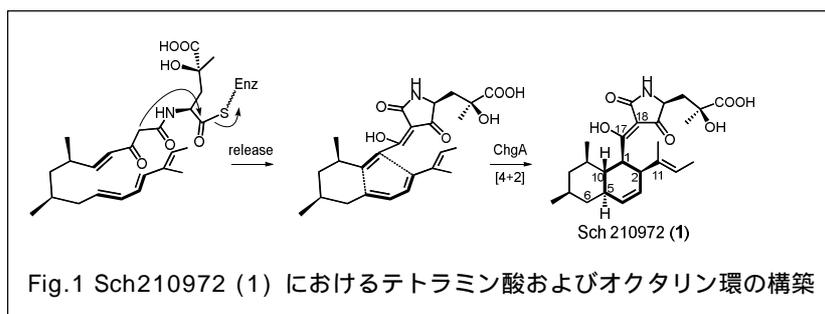
研究成果の概要（英文）：Here we show the crystal structure of CghA-product complex at 2.0 resolution. Our result provides the second structural information of eukaryotic Diels-Alderase and adds yet another fold to the family of proteins reported to catalyze [4+2] cycloaddition reactions. Site-directed mutagenesis-coupled kinetic characterization and computational analyses allowed us to identify key catalytic residues and propose a possible catalytic mechanism. Most interestingly, we were able to rationally engineer CghA such that the mutant was able to catalyze preferentially the formation of the energetically disfavoured exo adduct. This work expands our knowledge and understanding of the emerging and potentially widespread class of natural enzymes capable of catalysing stereoselective Diels-Alder reactions, and paves the way toward developing enzymes potentially useful in various bio/synthetic applications.

研究分野：天然物合成

キーワード：天然物 合成 Diels-Alder 反応メカニズム

1. 研究開始当初の背景

ペリ環状反応は有機合成化学において広く利用されてきたにもかかわらず、生化学(酵素化学)の分野においては、その反応が一次代謝経路中に長らく見出されずにいたことから非常に希少な存在であった。酵素触媒による有機化学変換反応は、主にイオン反応とラジカル反応に大別されるが、Diels-Alder 反応(以下 DA 反応とする)はそのどちらにも属さず、電子環状遷移状態を経るペリ環状反応機構によって二つの炭素-炭素共有結合形成反応を一挙に進行させる(Fig. 1)。有機合成の中で環化分子の構築や炭素骨格の構造に大きな変化を与えるため、生体内 DA 反応を触媒する酵素"Diels-Alderase (DAase)"に極めて高い興味を持たれ、実在性を証明する研究が盛んに行われてきた。



2. 研究の目的

我々はこれまで糸状菌由来二次代謝産物の生合成における、DAase について研究を行ってきた。その中で抗 HIV 活性を有する化合物, Sch210972 (1) の立体選択的な閉環反応に関わる DAase, CghA を見出した (Fig.1)。CghA は、1 のオクタリン環形成において endo 選択的な分子内 Diels-Alder (IMDA) 反応を触媒する。しかしながら現在までに CghA を含む IMDA 反応を触媒する酵素の構造的知見に関する報告は少ない。我々は、DAase における基質認識・立体選択的環化・生成物阻害回避機構について、その分子基盤を解明することを目的に研究を行った。今回、CghA による IMDA 反応の詳細なメカニズムについて、CghA の分子構造・速度論解析および計算化学によるエネルギー計算から、合理的な知見を得ることができた。また、CghA の構造に基づいた部位特異的変異導入により、exo 選択的 IMDA 反応を触媒する DAase の創出に成功した。

3. 研究の方法

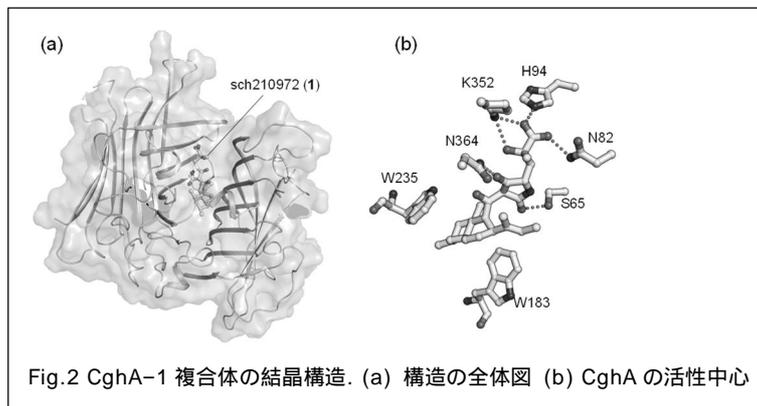
【CghA の結晶構造解析】

糸状菌由来の CghA の塩基配列を大腸菌のコドン頻度に最適化した後、大腸菌を用いて組換え CghA タンパク質を得た。CghA 単体および CghA-1 複合体の結晶化を行い、それぞれ X 線結晶解析に供したところ、両結晶ともに良好な分解能を持った回折像が得られた。得られた結晶構造から CghA は、N 末端および C 末端側にそれぞれ β -バレルドメインを有するリポカリン型の酵素であり、両バレルドメインにより 1 を挟み込んだ構造であることが明らかとなった (Fig. 2A)。また CghA の活性部位においては比較的広い空間が形成されており、1 と相互作用するアミノ酸残基の存在が確認された。

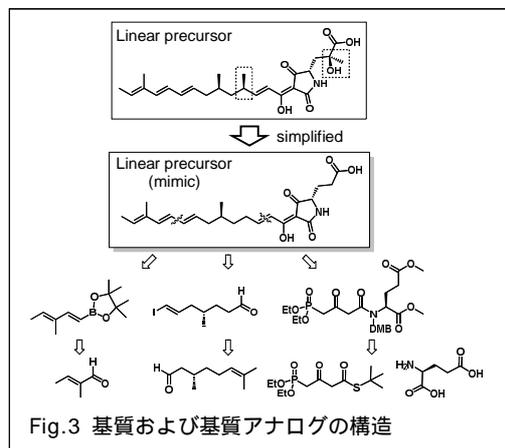
CghA の 3 つのアミノ酸残基, Asn82, His94 および Lys352 は、1 の 23 位の水酸基および 24 位のカルボン酸と水素結合を形成していることが明らかとなった。加えて 2 つのトリプトファン残基 Trp183, Trp235 は、オクタリン環を挟み込む形で配位しており、これらが鎖状基質の酵素への固定化に寄与していると予想された (Fig. 2b)。また、Ser65 および Asn364 がテトラミン酸のカルボニル基とそれぞれ水素結合を形成しており、この水素結合が、鎖状基質における 1-10 位のジエノフィルの LUMO エネルギーを低下させ、それにより DA 反応が加速していることが示唆された。

【鎖状基質の合成】

次に複合体結晶構造から得られた CghA と 1 の相互作用を確認するために、酵素反応に



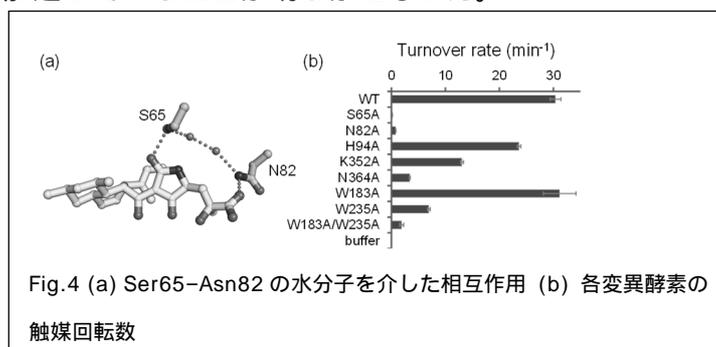
用いる鎖状基質の合成を試みた。基質の合成にあたり、エピメリ化を起こしやすいメチル基を除去し、テトラミン酸を構成するアミノ酸をL-グルタミン酸に置き換えた鎖状基質アナログを設計した (Fig. 3)。3つのフラグメントをそれぞれ合成し、まずテトラミン酸を有する右フラグメントと中央フラグメントのヨウ化ビニルを結合した後、得られたフラグメントを左フラグメントとの鈴木-宮浦カップリング反応に供し、所望の基質を得ることに成功した (Fig. 3)。



4. 研究成果

【CghA および CghA 変異体の速度論解析】

先に述べた複合体結晶より得られた結果をもとに、基質と相互作用する CghA のアミノ酸に変異を導入した酵素を作製した。合成した基質アナログを用いて、変異導入酵素の速度論解析を行った (Fig 4b)。その結果、2つのトリプトファン残基 Trp183, Trp235 によるオクタリン環の相互作用の消失により、大幅な酵素活性低下を確認した。加えて、テトラミン酸のカルボニル基との水素結合形成に關与するアミノ酸 Ser65 の変異においても、活性の消失を確認した。1の γ -ヒドロキシメチルグルタミン酸側鎖結合部位 His94 および Lys352 に変異を導入した酵素においては、約 20~50%程度の活性の低下にとどまった。しかし、同じく γ -ヒドロキシメチルグルタミン酸側鎖と水素結合を形成している Asn82 への変異では、活性の大部分の消失が確認された。複合体結晶構造を詳細に解析したところ、Asn82 は2つの水分子を介して Ser65 と相互作用していることがわかった。以上の結果から CghA は、 γ -ヒドロキシメチルグルタミン酸側鎖およびオクタリン環周辺のアミノ酸残基により基質のコンフォメーションを制御していること、テトラミン酸のカルボニル基との水素結合の形成は必須であり、ジエノフィルの電子求引性増大により、DA 反応を加速していることが明らかとなった。



【CghA のエンジニアリング】

DA 反応によるオクタリン環の形成における立体選択性に関しては、アルキル鎖を受け入れる活性部位の空間的な制御によるものと考えられた。すなわち鎖状基質のジエン周辺のアミノ酸 Ala242, Met257 (Fig.5a) による空間的制御が, *endo* 付加環化選択性の要因と推測された。我々はこれらアミノ酸に *exo* 付加環化に有利となるような変異を導入することで, 天然物とは異なるジアステレオ選択性を生み出す酵素を作製することに成功した (Fig.5b)4。

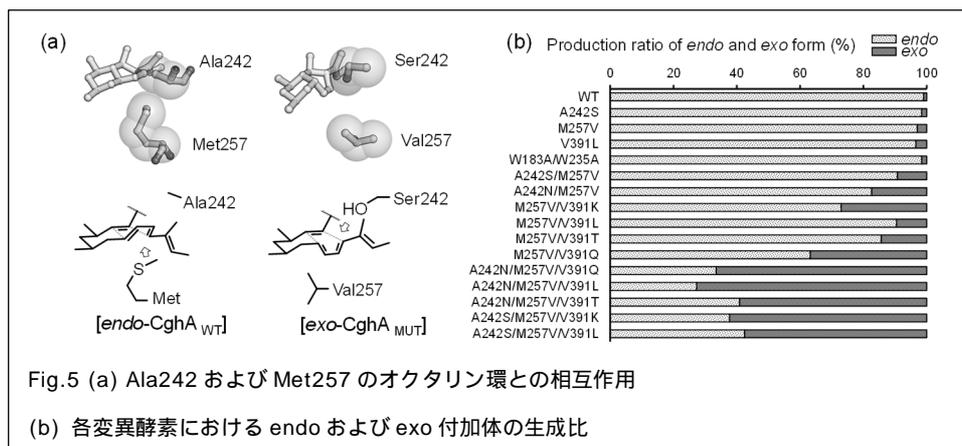


Fig.5 (a) Ala242 および Met257 のオクタリン環との相互作用

(b) 各変異酵素における *endo* および *exo* 付加体の生成比

【DA 反応における遷移状態のエネルギー計算】

DA 反応は合成化学上価値の高い反応であるため, 人為的な酵素すなわち DA 反応を触媒する抗体触媒の開発が古くからおこなわれてきた。しかしながら, このような抗体 DAase の代謝回転数は極めて低いことが知られている。DA 反応を触媒する抗体触媒は, 遷移状態アナログを抗原として作製されるが, DA 反応の遷移状態は生成物に類似していることが, 生成物による酵素活性の障害が引き起こされる要因となっている。一方で天然有機化合物の生合成に関わる DAase においては, 抗体触媒に見られるような生成物障害は観測されない。それらがどのように生成物障害を回避しているのかは, DAase 研究における大きな謎の一つである。そこで複合体結晶構造解析結果と計算化学により算出した DA 反応の遷移状態の自由エネルギー値をもとにその謎の解明にあたった。CghA-1 の複合体結晶構造において, 1 の構造は 17, 18 位が E 体の 1' であることが分かった。一般的に Pyrrolidine-2,4-dione 骨格を有する化合物において, その自由エネルギーは E 体よりも Z 体の方が低い⁵。これが CghA の生成物障害回避機構に関わっていると考え, 予想される生合成中間体の鎖状基質における自由エネルギーを算出した (Fig. 6)。その結果, 予想通り E 体 (R-1') の生合成中間体の自由エネルギーは Z 体 (R-1) よりも大きく, 鎖状基質の DA 反応遷移状態における自由エネルギーは, TS-2' > TS-1' > TS-2 > TS-1 の順となった。17, 18 位が Z 体の基質の自由エネルギーが, E 体よりも小さいにもかかわらず, CghA はエネルギーの高い E 体を基質としていることから, 生合成的に不利な E 体を基質とし, 遷移状態の構造を 1 (Z 体) と異にすることで, 生成物障害を戦略的に回避していることが明らかとなった (Fig. 6)。

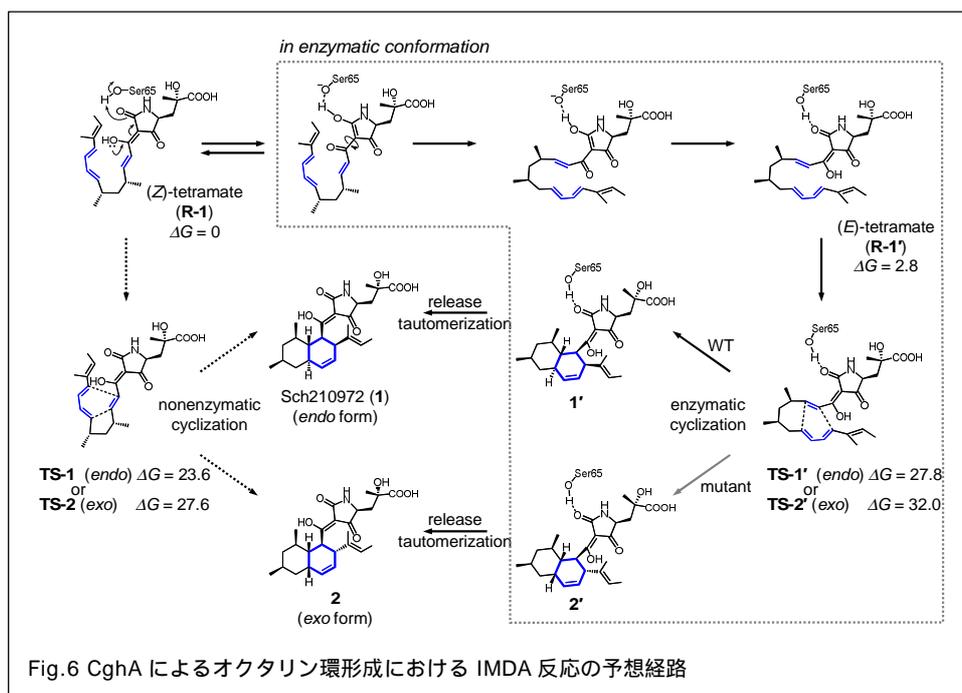


Fig.6 CghA によるオクタリン環形成における IMDA 反応の予想経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Michio, Kishimoto Shinji, Yokoyama Mamoru, Jamieson Cooper S., Narita Kazuto, Maeda Naoya, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Tsunematsu Yuta, Houk Kendall N., Tang Yi, Watanabe Kenji	4. 巻 4
2. 論文標題 Catalytic mechanism and endo-to-exo selectivity reversion of an octalin-forming natural Diels?Alderase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 223 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-021-00577-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe Kenji	4. 巻 1
2. 論文標題 Discovery and investigation of natural Diels?Alderase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-021-01502-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 佐藤道大、渡辺賢二	4. 巻 76
2. 論文標題 ディールス - アルダラーゼとはどういった酵素なのか？	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 72-73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Zhuan, Tamura Yui, Tang Mancheng, Qiao Tianzhang, Sato Michio, Otsu Yoshihiro, Sasamura Satoshi, Taniguchi Masatoshi, Watanabe Kenji, Tang Yi	4. 巻 143
2. 論文標題 Biosynthesis of the Immunosuppressant (?) -FR901483	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 132 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c12352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsunematsu Yuta, Maeda Naoya, Sato Michio, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Watanabe Kenji, Hertweck Christian	4. 巻 143
2. 論文標題 Specialized Flavoprotein Promotes Sulfur Migration and Spiroaminal Formation in Spirochlorine Biosynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 206 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c08879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishimoto Shinji, Tsunematsu Yuta, Matsushita Takuma, Hara Kodai, Hashimoto Hiroshi, Tang Yi, Watanabe Kenji	4. 巻 58
2. 論文標題 Functional and Structural Analyses of trans C-Methyltransferase in Fungal Polyketide Biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3933 ~ 3937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b00702	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsunematsu Yuta, Takanishi Jun, Asai Shihori, Masuya Takahiro, Nakazawa Takehito, Watanabe Kenji	4. 巻 21
2. 論文標題 Genomic Mushroom Hunting Decrypts Coprinoferrin, A Siderophore Secondary Metabolite Vital to Fungal Cell Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 7582 ~ 7586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b02861	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 渡辺賢二
2. 発表標題 Diels-Alderaseのジアステレオ選択性および生成物阻害回避メカニズムの解明
3. 学会等名 新学術領域研究「生合成リデザイン」第9回公開シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤道大, 岸本真治, Cooper S. Jamieson, 原幸大, 橋本博, 恒松雄太, Houk N. Kendall, Yi Tang, 渡辺賢二
2. 発表標題 Diels-Alderase のジアステレオ選択性および生成物阻害回避メカニズムの解明
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸本真治, 佐藤道大, Jamieson Cooper, 横山葵, 成田一仁, 前田直哉, 恒松雄太, 原幸大, 橋本博, Houk Kendall N., 渡辺賢二
2. 発表標題 Diels-Alderase CghA の全容解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤道大, 岸本真治, Jamieson Cooper, 成田一仁, 前田直哉, 原幸大, 橋本博, 恒松雄太, Houk N. Kendall, Yi Tang, 渡辺賢二
2. 発表標題 酵素的Diels-Alder反応におけるジアステレオ選択性の制御機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://swab.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 道大 (Sato Michio) (10629695)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	
研究分担者	恒松 雄太 (Tsunematsu Yuta) (30629697)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	
研究分担者	岸本 真治 (Kishimoto Shinji) (40814330)	静岡県立大学・薬学部・特任助教 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関