

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：84502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710277

研究課題名(和文)有機合成では困難なサクシニル転移を行う酵素の反応機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of succinyl transferase reaction mechanisms which is difficult to perform by organic synthesis

研究代表者

奥村 英夫 (OKUMURA, Hideo)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員

研究者番号：90377903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症治療薬として開発が期待されているリベロマイシンAを生産する放線菌のゲノム解析により、新規ポリケチド修飾酵素群が発見されてきている。その中で生合成反応産物の三級水酸基にサクシニル基を転移する酵素が見出された。本酵素は有機合成で困難な反応を生理的環境下で行うことが明らかとなっている。本研究は本酵素による反応機構の詳細を立体構造解析によって解明することを目的として行った。本酵素の結晶化条件を探索により結晶を得、大型放射光施設での回折実験を行った結果、1.8 Å分解能に達するデータが得られた。今後構造解析をすすめ、構造の詳細を明らかにすることで反応機構が解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：New enzymes which modify the polyketide compounds have been discovered by the identification of gene cluster of Streptomyces which produce reveromycin A expected as an osteoporotic therapeutic drug candidate. In the gene cluster, the enzyme which catalyzes the biosynthesis reaction that transfers a succinyl group to tertiary alcohol was found. And it is revealed that this enzyme conducts a difficult reaction by organic synthesis under physiological environment. This investigation was intended to elucidate the details of the reaction mechanism with this enzyme by X-ray crystal structure analysis. By the crystallization condition search, the enzyme crystals were obtained. And as the result of the diffraction experiments in synchrotron facility, the diffraction data achieve to 1.8 Å resolution was obtained. By the progress of structure analysis of obtained data, it is expected that the details of the structure of the enzyme become clear and the reaction mechanism is elucidate in future.

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：X線結晶構造解析 ケミカルバイオロジー エステル化反応 基質認識

## 1. 研究開始当初の背景

放線菌(*Streptomyces reveromyceticus*)の二次代謝産物として見出され、骨粗鬆症治療薬として開発が期待されている化合物リベロマイシン A の生合成経路に関連するゲノム配列の解析と遺伝子機能アノテーションが進められ、リベロマイシン生合成遺伝子クラスターに存在する新規ポリケチド修飾酵素群が発見されてきている[1]。その中でリベロマイシン A 生合成中間反応産物の三級水酸基をエステル化し、サクシニル基を転移する新規酵素が見出された。反応に必要な基質、コファクター等の詳細は未だ研究中の段階であるが、その反応は注目すべきものである。二級水酸基をエステル化する酵素の一つとして、放線菌の生産するホスホリパーゼ D があげられる。この酵素は各種アルコール化合物を加えて反応すると、ホスファチジン酸残基をアルコール化合物に転移する反応を触媒する。二級水酸基のエステル化反応は有機合成的にも行われている一方、三級水酸基のエステル化は有機合成では大変困難である。実際に取られている手法としては、三級水酸基に対し無水コハク酸を使用し、GPa クラスの高圧という極限環境下にての反応実験を行った成功例が報告されているが[2]、これを実施すること自体著しくハードルが高い。

さて、薬効が期待される新規薬剤候補化合物が研究者の多大な努力により続々と発見、開発されているが、難溶性を理由に、その後の薬剤としての開発が困難な状況に陥るといったケースが往々にして見られる。実際薬品として市場に出されたものでも、アメリカの例では米国薬局方 USP に記載された薬物のうち、1/3 以上が水に難溶性であるか、又は不溶性であるという報告がなされている[3]。更には多くの薬物について、胃腸管内での吸収過程において、その薬剤が溶解する段階が主として律速となってしまっているということも報告されている[4]。このような状況を改善すべく、水難溶性の薬物の溶解速度を向上させ、且つその生物学的有効率を増大させるための方法(例えば固体分散体の配分を工夫するなど)も開発されている。しかしながらこのような製剤は多くの場合、熱力学的に不安定な可能性があり、また副作用を生じるおそれも考えられる。したがって、水難溶性の薬剤候補化合物の溶解度を上げ、かつ溶解過程を改善するような手段を開発することのニーズが依然として存在していると考えられる。

### (参考文献)

- [1] Takahashi *et al.*, Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat. Chem. Biol.*, 7, 461-468 (2011)
- [2] Shimizu, T. *et al.*, Total synthesis of reveromycin A. *Org. Lett.* 2, 2153-2156 (2000)

[3] Pace, SN. *et al.*, Novel injectable formulations of insoluble drugs. *Pharm. Tech. March*, 116-133 (1999).

[4] Craig, QMD. *et al.*, The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *Int. J. Pharm.* 179, 179-207 (1999)

## 2. 研究の目的

本サクシニル転移反応における酵素の触媒機構の理解には、リベロマイシン A 前駆体を含む基質群の捕捉状態、ならびに通常なら極限環境でしか起き得ないような反応を触媒する反応場を如何にして作り出しているかについて調べることが必須である。そこで本研究では、まず X 線結晶構造解析によって放線菌由来新規サクシニル転移酵素が触媒する三級水酸基のエステル化反応において、如何に基質が捕捉され、そしてどのように反応場が形成され、反応過程が進行していくかを構造生物学的に明らかにし、構造活性相関および作用機序の詳細を解明することを目的とする。さらなるステップとして、得られた知見を基に、有機合成では一般的に困難である新規の三級水酸基エステル化合物を創出することを目的とする。

## 3. 研究の方法

研究目的の達成に必要なとなる構造学的知見基盤を得るために、サクシニル転移酵素の立体構造を、タンパク質 X 線結晶構造解析法を用いて明らかにすることを試みた。

- (1) 酵素タンパク質の調製は発現宿主として大腸菌を用いて行い、遺伝子改変により His-tag を導入したプラスミドを用いることで組換えタンパク質を発現させた。大腸菌培養、収集後、アフィニティークロマトグラフィー、その他イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせて精製を行い、タンパク質結晶化に資する高純度サンプルとして調製を行った。
- (2) 結晶化実験において、初期のスクリーニング実験では市販スクリーニングキットを用いた sitting-drop 蒸気拡散法を行った。続けて初期結晶が得られた後の最適化実験においては hanging-drop 蒸気拡散法を用いて行った。
- (3) X 線回折実験は、全て大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県播磨) の構造生物学ビームラインを利用して行った。

## 4. 研究成果

(1) サクシニル転移酵素の結晶構造解析  
まず、サクシニル転移酵素における基質であるリベロマイシン A 前駆体の捕捉部位ならびにサクシニル基の捕捉部位、そしてサクシニ

ル転移反応の活性中心部位の構造学的関係を明らかにするために、サクシニル転移酵素の精製用タグを含む組換えタンパク質を大腸菌にて発現させ、各種カラムクロマトグラフィの手法を用いて精製、調製を行った。



図1 条件1で得た結晶

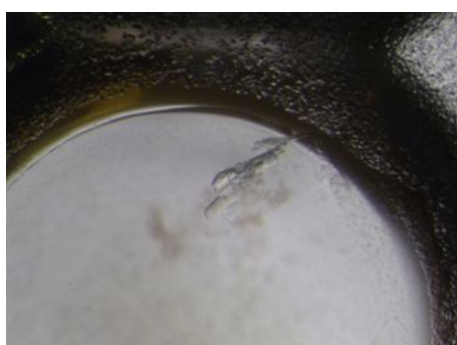


図2 条件2で得た結晶

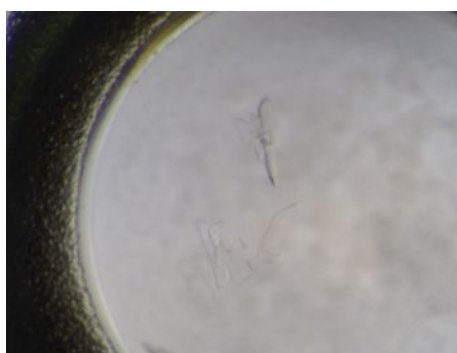


図3 条件3で得た結晶



図4 条件4で得た結晶

得られたサンプルを用いて、市販のタンパク質結晶化スクリーニングキットを使用して初期スクリーニングを行った。その結果、複数の条件にて標的タンパク質の結晶を得ることができた(図1~4)。

得られた結晶化条件を基に、結晶化条件の最適化を行った。得られた結晶を用い、大型放射光施設 SPring-8(兵庫県播磨)の構造生物学ビームラインを利用して、結晶のX線回折実験を行った。その結果、最高で1.8Å分解能に到達する回折斑点を有する回折データを得ることができた。収集したデータセットの統計値の一例を示す(表1)。

(表1)

Cell	a=78.5, b=101.6 c=102.3 (Å) $\alpha, \gamma=90, \beta=112.3 (^{\circ})$
Wavelength (Å)	1.0
Resolution (Å)	50-2.4 (2.48-2.40)
No. of observation	216491
No. of unique reflection	56967
I/σ	7.5 (2.9)
Completeness	97.8 (97.3)
Redundancy	3.8 (3.8)
R <sub>sym</sub> (%)	13.0 (35.7)

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}}$$

括弧内は最外殻の分解能に対する値

本酵素は新規タンパク質であり、既知構造からの分子置換法を用いた位相計算ができなかった。そのため重原子置換体結晶をあらたに調製し、同じく SPring-8 において異常分散データを収集した。現在解析を進めているところである。

(2) 本酵素を作りだす放線菌のゲノム解析、反応に関する生化学的研究の結果、本エステル化反応には二つの新規酵素が関与していることが明らかとなった。そこで、もう一つの酵素について大腸菌を用いた組み換え発現実験、精製実験を行った結果、酵素の高純度精製試料が得られた。精製サンプルを用いてこれまでと同様に結晶化条件の探索を行ったが、結晶を得ることはできなかった。発現条件、精製条件についてさらに再検討し、結晶化スクリーニングを行っているが、現在のところ結晶化に対して良好な結果は得られていない。

(3) 本酵素反応についてさらに生化学的研究が進んだ結果、この二つの酵素を共発現させた系で本エステル化反応を行うと、反応効率が格段に上昇することが明らかとなった。そこで二つの酵素を共発現させるプラスミドを用いて、大腸菌発現実験、精製実験を行い、高純度精製試料を得た。本サンプルを用いて2酵素複合体の結晶化スクリーニングを実行したが、現在のところ、両酵素複合体の結晶は得られていない。

5. 主な発表論文等  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 英夫 (OKUMURA, Hideo)  
公益財団法人高輝度光科学研究センター  
利用研究促進部門 研究員  
研究者番号：90377903

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし