

酸化的 C-N 結合形成を触媒するラジカル酵素反応機構の解明と 酵素を利用した非天然型新規活性化合物の創出に成功

1. 発表者：

森 貴裕（東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 助教）

阿部 郁朗（東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆強力な生理活性を示す化合物の骨格形成に関わるユニークな酸化酵素の反応機構を解明し、一連の非天然型新規化合物の創出に成功した。
- ◆自然界には稀な酸化的 C-N 結合の形成を触媒する P450 酸化酵素の詳細な反応機構を初めて解明し、さらに人工基質を設計、作用させることで、新奇骨格を有する画期的な非天然型新規化合物の創出にも成功した。
- ◆合理的な酵素機能の制御による新たなドラッグデザインへの貢献、例えば、有機合成では困難な化学反応への応用や、分子を思い通りに設計して超天然型新規有用機能分子を創製することなどが可能になります。

3. 発表概要：

テレオシジンと呼ばれる化合物は、1960 年代に日本の研究者によって土壌細菌から発見され、その後の研究でガン細胞増殖制御に重要なプロテインキナーゼ C の作用調節に関わる、高い生理活性を示すことが明らかにされてきました。その特徴的な構造と活性から医薬品への応用が期待され、多くの合成研究や誘導体化の研究が行われてきました。しかしながら、生理活性を発揮するのに重要な中心骨格、インドラクタム骨格を構築する酵素の反応機構については未だ不明のままでした。

今回、東京大学大学院薬学系研究科の阿部郁朗教授と森貴裕助教らの研究グループは、酵素に受け入れられる本来の化合物の一部分を変換した類似化合物を用いて酵素反応を行いました。その部分がどのように中心骨格の構築に重要かを確かめることで、メカニズムに対する知見を得るとともに、一連の非天然型新規化合物の創出に成功しました（図 1）。さらに、酵素の立体構造を取得し、それを基に変異を導入することで酵素の活性部位に位置するアミノ酸残基の役割、重要性を明らかにしました。そしてそれらの情報をもとに酸化酵素が触媒する、化合物の活性発現に必要な骨格構築に関わるラジカル反応の分子基盤を初めて明らかにしました。本成果により、合理的な酵素機能の制御による新たなドラッグデザインへの貢献、例えば、有機合成では困難な化学反応に対する酵素の応用や、思い通りに分子を設計して超天然型新規有用機能分子を創製する研究への応用が期待されます。

4. 発表内容：

土壌細菌が生産するテレオシジン類は、強力なプロテインキナーゼ C（PKC、注 1）活性化作用を示す天然物であり、医薬品シードとして注目されている化合物です。過去のテレオシジン誘導体の合成や構造活性相関研究（注 2）により、テレオシジン類に特徴的な 9 員環構造、インドラクタム骨格が活性発現に必須であることが知られています。また、これまでに土壌細菌の生体内でテレオシジン類を生合成する遺伝子は明らかにされており、酸化酵素シトクロム P450（注 3）が分子内で C-N 結合を形成し、インドラクタム骨格の形成に関わることは判明

していました。このシトクロム P450 が触媒する酸化的 C-N 結合の形成は自然界では稀な反応であり、そのメカニズムの解明が待たれていました。これまでに、その酵素反応の推定メカニズムはいくつか提唱されているものの、その詳細については未だ明らかにされていませんでした。

本研究グループは、酵素に受け入れられる本来の化合物の一部分を変換した一連の類似化合物を設計、化学合成し、それらを用いて酵素反応を行いました。変換した部分がどのようにインドラクトム骨格の構築に重要かを確かめ、酵素反応メカニズムに対する知見を得ました。また、得られた酵素反応生成物に対し、それぞれ単離、構造決定を行った結果、これら生成物が天然にはない新奇骨格を有する画期的な構造を持つ化合物であることを見出しました。

さらに、酵素と基質、あるいは基質類似化合物との複合体構造を取得し、酵素反応中において化合物がどのような形で活性部位に結合しているかを明らかにしました。得られた複合体構造を基に活性部位のアミノ酸残基に対して変異を導入することで、各活性部位構成アミノ酸残基の役割、重要性を確認しました。そしてそれらの情報から酸化酵素 P450 が触媒する、インドラクトム骨格を構築する酸化的 C-N 結合の形成反応が、ラジカルが発生する経路により進行することを明らかにしました。同時に、作成した変異体を用いて酵素反応を行うことで、野生型では生産されない新規生物活性化合物の創出にも成功しました。

本研究では、土壌細菌由来の高生理活性化合物であるテレオシジン類の活性発現に必要なインドラクトム骨格の構築機構を初めて明らかにし、さらに設計した基質類縁体を酵素に作用させることで、一連の非天然型新規生物活性化合物の創出にも成功しました (図 1)。本研究を通して、有機合成では困難な化学反応などへの酵素反応の応用や、自在に設計した超天然型新規有用機能分子の創製など、合理的な酵素機能の制御による新たなドラッグデザインへの貢献が期待されます。

本研究は、文部科学省 科学研究費補助金 (JP16H06443、JP17H04763、JP18K19139)、新学術領域研究 (研究領域提案型) 「生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学 (生合成リデザイン)」、J S T 戦略的国際共同研究プログラム (SICORP) 日本-中国 (生物遺伝資源分野)~植物-微生物共生系、微生物叢の機能と制御に着目した基盤技術の創出~ 「植物共生菌相互作用の包括的利用による二次代謝産物の網羅的解析」、小林財団、武田科学振興財団の支援を受けて行われたものです。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Nature Chemical Biology*」

論文タイトル：Molecular basis for the P450-catalyzed C–N bond formation in indolactam biosynthesis

著者：Fei He, Takahiro Mori, Iori Morita, Hitomi Nakamura, Miroslava Alblova, Shotaro Hoshino, Takayoshi Awakawa, and Ikuro Abe*

DOI 番号：10.1038/s41589-019-0380-9

アブストラクト URL：<https://www.nature.com/articles/s41589-019-0380-9>

6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻

教授 阿部 郁朗 (あべ いくろう)

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Tel: 03-5841-4740 E-mail: abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学薬学部庶務チーム

Tel: 03-5841-4719

E-mail: shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

注1) プロテインキナーゼ C (PKC)：タンパク質分子にリン酸基を付加する(リン酸化する)酵素の一種です。PKCは、細胞の増殖や細胞死、細胞間のコミュニケーションなど、多くの細胞機能の制御に関わるタンパク質であり、その発現レベルがガンにおいて多大な影響があると考えられています。そのことからPKCの活性調節を行う化学物質は医薬品のターゲット化合物として注目されています。

注2) 構造活性相関研究：化学物質の構造と生物活性との関係を明らかにする研究のことです。化学物質の構造をさまざまに変換して生物活性を評価することでどの部分が生物活性に重要かを調べます。これにより構造的に類似した化合物の薬効について予測することが可能となります。

注3) シトクロム P450：シトクロム P450 (CYP450) は細菌から植物、哺乳動物に至るまでのほとんどすべての生物に広く分布し、多岐にわたる反応を触媒する酵素です。ヒトにおいては肝臓で解毒を行うほか、ステロイドホルモンの生合成など、生物の正常活動に必要な反応にも関与していますが、天然物の合成においてもさまざまな酸化反応を触媒します。

8. 添付資料：

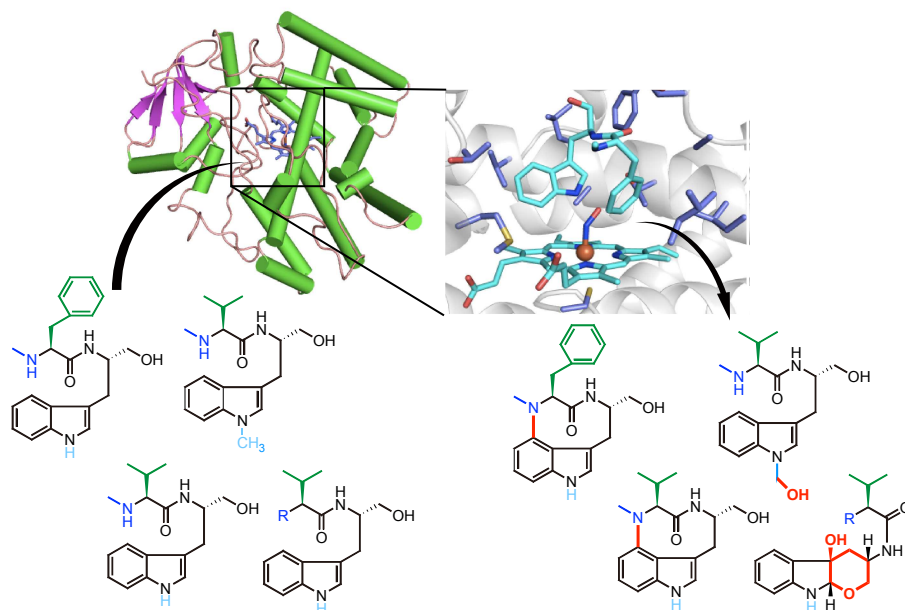


図1：インドラクタム骨格を構築する酸化酵素の反応と結晶構造