

研究区分	教員特別研究推進 プロジェクト支援
------	-------------------

研究テーマ	日本学術振興会 国際交流事業 研究拠点形成事業				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	渡辺 賢二
	研究分担者	所属・職名	米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校・教授	氏名	Kendall Houk
		所属・職名	米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校・教授	氏名	Yi Tang
		所属・職名	米国スタンフォード大学・教授	氏名	Chaitan Khosla
	発表者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	渡辺 賢二

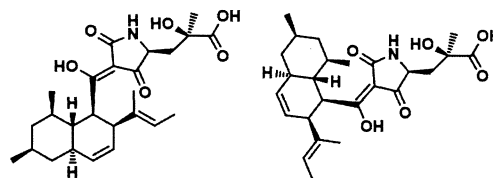
講演題目	Diels-Alderase CghA の反応メカニズムの解析
------	---------------------------------

研究の目的、成果及び今後の展望

【背景・目的】糸状菌 *Chaetomium globosum* 由来の二次代謝物 Sch210972 (Sch) のオクタリン骨格は Diels-Alderase である CghA によって立体選択的に合成されている<sup>1</sup>。これまでに我々は CghA の触媒メカニズムに関する研究を展開しており、前年度大会にて CghA の結晶構造と合成基質を活用した CghA の立体選択性制御機構の解明を報告した<sup>2</sup>。CghA の触媒メカニズムにおいて未解明だったのは生成物阻害回避機構である。Diels-Alder 反応では反応の遷移状態と生成物の構造が非常によく似ているため、何らかの制御がなければ生成物が反応を阻害してしまうと考えられている。実際に Diels-Alder 反応の遷移状態をハプテンとした抗体触媒は、Diels-Alder 反応を触媒するものの生成物が抗体内に留まるため反応速度が著しく小さい<sup>3</sup>。一方、CghA は抗体触媒よりも反応速度が明らかに大きく、生成物阻害を回避するメカニズムがあると考えられたため、これを明らかにするべく研究を行った。

【方法・結果】CghA と Sch の共結晶構造を精査することで CghA 中の Sch の立体配置を調べた。すると、Sch 単独の結晶ではテトラミン酸が Z 体の enol (1) として存在しているのに対して、CghA 中で Sch のテトラミン酸は E 体の enol (2) として存在していた。そこでこの二つの立体配置での基質のエネルギー差を計算したところ、E 体は Z 体よりも 2.8 kcal/mol エネルギーが高いことが明らかとなった。このことから CghA は酵素的に基質を E 体に異性化させていることが示唆されたため、テトラミン酸周辺のアミノ酸残基に変異を導入して酵素活性の変化を調べた。ケトンのカルボニル酸素に配位している Asn364 の変異で野生型の 10%程度まで活性が低下し、アミドのカルボニル酸素に配位している Ser65 の変異と Ser65 に水二分子を介して水素結合している Asn82 の変異ではそれぞれ野生型の 0.5%、2.5%とさらに顕著に活性が低下していた。

【考察】エネルギー計算の結果と変異体酵素の活性の変化から、CghA は Asn82 と Ser65 を介して基質を E 体へと誘導していることが示唆された。この結果と反応遷移状態のエネルギー計算から導き出した CghA の生成物阻害回避機構を含む触媒メカニズムの全容については本発表にて紹介する。



(Z)-enol (1)

(E)-enol (2)

【参考文献】

1. Sato M. *et al.* *ChemBioChem* 2015, 16, 2294-2295.
2. 佐藤道大, 渡辺賢二, 化学, 2021年2月号, vol. 76, 72-73, 化学同人.
3. Sato M. *et al.* *Nature Catalysis* 2021, 4, 223-232.