

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書


(西暦) 2026 年 1 月 5 日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 行彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 九州大学高等研究院

職 名 准教授

氏 名 牛丸 理一郎 印 

【提出書類】

- (1) 研究実施概要報告書（本紙）
添付書類（A4 版 3 枚以内）：研究状況を示す写真等の資料
- (2) 収支報告書
添付書類：助成金を充当した経費の領収書
領収書を添付しない場合：支払一覧表と支払部門担当者記名捺印

(1) テーマ

※スペースが足りない場合は、

枠を追加いただいて構いません。

酸素活性化酵素を用いた高難易度分子変換反応の開発

(2) 本研究の期間

(西暦) 2025年4月 ~ 2026年3月

(3) 本研究の目的

シクロプロパン、エポキシド、アジリジンなど三員環は大きな環ひずみを持つ化学構造であり、求核剤に対して高い反応性を示すことが知られている。天然物や医薬品の中にもシクロプロパン環に由来する活性を持つ化合物も数多く存在し、その化学構造の違いにより多様な生物活性を示すことから、医薬品のリード化合物として注目を集めている。例えば、強力なプロテアソーム阻害活性を示すベラクトシンや抗生物質活性と抗マラリア活性を示すホルマオマイシンは共に放線菌が生産するシクロプロパン含有天然物である。また、スコポラミンは植物によって生産されるエポキシド含有アルカロイドであり、ムスカリン受容体拮抗薬として使用されている。三員環骨格を有する医薬品や生物活性化合物は数多く知られているものの、環構造の完全な立体制御を伴う選択的化合物合成は現代の有機合成化学技術を駆使してもしばしば困難を伴うため、これらの環構造を高効率、高立体選択的に合成する新技術の開発が求められる。

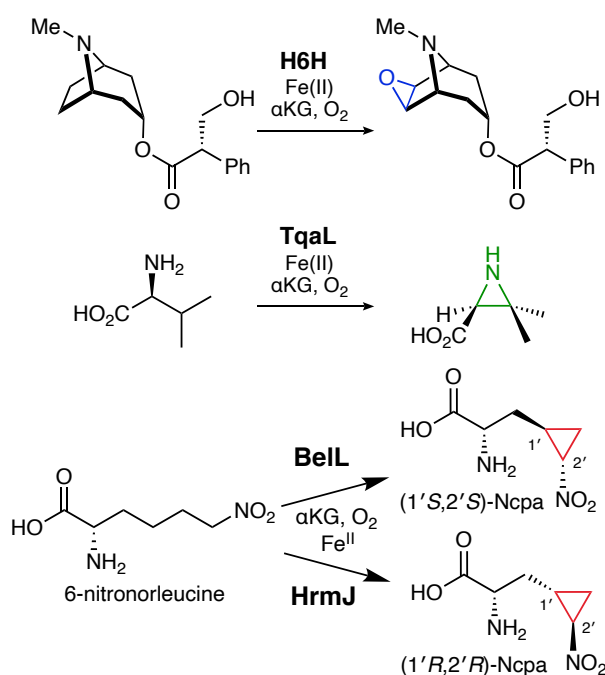
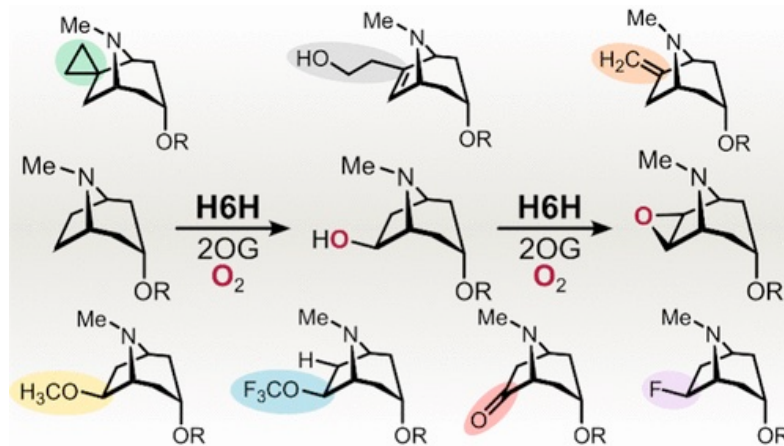


図1.報告者らが同定した三員環合成酵素.

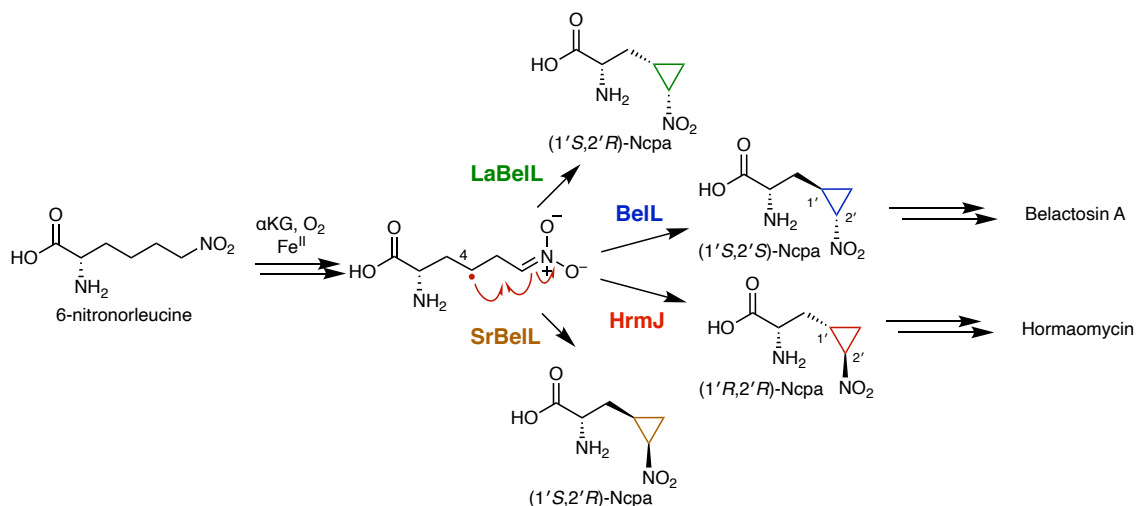
本研究では、エポキシド、シクロプロパン、アジリジンなどの三員環骨格を有する天然物を対象に生合成研究を行うことで、分子状酸素のみを酸化剤として用いる新規依存性三員環合成酵素を同定する。さらには同定した三員環合成酵素やそのホモログ酵素群をタンパク質工学の手法を用い基質適応範囲や触媒機能を強化することで望みの立体化学をもつ三員環骨格を完全な選択性で効率的に与える生体触媒の創出を目指す。

(4) 本研究の概要

本研究では薬用天然物ヒヨスチアミンのエポキシ化反応を触媒する H6H (Hyoscyamine 6 β -hydroxylase) の反応解明を行った。非ヘム鉄酵素である H6H は水酸化反応とエポキシ化反応の両方を触媒するが、どのように二つの反応を制御しているかは不明であった。これまでの結晶構造解析および分光学的研究により、酵素活性部位内での反応中間体となる鉄錯体に対する基質の配置が最終的な反応結果 (水酸化またはエポキシ化) を規定するというモデルが提唱されてきた。本研究では、この「基質-補酵素配置モデル」がどの程度反応予測に有効であるかを検証するため、C6 および C7 位にシクロプロピル、メチリデン、フルオロ、メトキシ、トリフルオロメトキシなど、多様な置換基を導入した H6H 基質類似体を合成し、H6H による反応性を評価した。得られた結果から、従来モデルで想定されていた基質配置だけでは説明できない追加要因が存在することが明らかとなった。特に、基質由来のラジカル中間体とヒドロキシ-鉄中間体の再結合 (rebound) を抑制する水素結合相互作用が、基質ラジカル反応性の決定に影響している可能性が示唆された。これらの相互作用は、基質と補因子の位置関係とも密接に関連すると考えられる。



また、報告者らがシクロプロパン化反応を触媒する HrmJ や BelL の配列情報をもとに HrmJ/BelL をコードする遺伝子を指標に微生物ゲノムデータベースを網羅的に調査したところ、HrmJ/BelL の相同性タンパク質が多数見出された。精製酵素の活性を評価し、熱力学的により不安定なシス体のシクロプロパン異性体 ((1'S,2'R)-NcpA と (1'R,2'S)-NcpA) を与える新規シクロプロパン化酵素を同定した。また、BelL の相同性タンパク質の X 線結晶構造解析を行いシクロプロパン化に重要な「基質配置モデル」を提唱した。



(5) 本研究の内容及び成果

(1) H6H 反応における「基質-補酵素配置モデル」の解析

本研究では、H6H による部位選択的水酸化反応を制御する要因、とくに C6 位の置換基と鉄-オキソ種との水素結合の重要性を精密に検証するため、C6 位に種々の官能基を導入した基質アナログを用いた反応解析が行われた。

まず、C6-メトキシ基を持つヒヨスチアミン誘導体を H6H と反応させると、C6-OCH₃ が水酸化を受けてヘミアセタールを形成し、そこからホルムアルデヒドが脱離した。一方、C6 にトリフルオロメトキシ基を導入した誘導体はさらなる酸化を受けられないため、モデル上は C7 水酸化に誘導されるはずであった。しかし実際には C7 水酸化体は全く形成されず、代替反応として N-メチル基の酸化が進行した。このことから、C6 置換が H 引き抜き位置の位置選択性を左右することが明らかとなった。

C6 位に水素結合供与性を持たない 6β-フルオロ体を反応させると、脱メチル化や通常の 7β 位水酸化を行わず、代わりに C6 ケトン体が得られた。C7 ケトン体はさらに反応し、その C7 位水酸化体を与えた。

以上の結果から、H6H 反応における C6 置換基は、単なる立体効果だけでなく、鉄-オキソ配位子との水素結合形成により基質の精密な位置調整を行い、C7 位での H 引き抜きを誘導する重要な役割を担う。水素結合供与能が失われると C6 または N-メチルからの水素引き抜きが進行し、位置選択性が劇的に変化することが明確に示された。このように、基質-酵素間の微細な相互作用が、H6H の反応制御に決定的な影響を与えていることが明らかになった。

(2) 新規シクロプロパン化酵素の反応と解析

シクロプロパン化酵 BelL と HrmJ は 49% の配列同一性を有するものの、両者がそれぞれ (1' S,2' S) と (1' R,2' R) の立体化学を有する生成物を選択的に生成する理由は、単純なアミノ酸配列比較からは特定できなかった。この立体選択性の起源を明らかにするため、報告者らはまず BLAST 解析を行い、40%以上の相同性を示す約 170 種類のタンパク質を取得した。これらは主に Actinomycetota と Proteobacteria に属する細菌に分布しており、その約 80 種は belK 類似遺伝子と近接して存在していた。ことから、belL/belK のセットが 1 の (1' S,2' S) 型または (1' R,2' R) 型生成に関わると仮説を立てられた。取得可能な細菌株から belL 類似遺伝子 10 種をクローニングし、ヘテロ発現タンパク質を用いて基質 3 の酸化的シクロプロパン化能を検証した。得られた BelL ホモログ群は、いずれも基質 (ニトロノルロイシン) を消費し、新たな立体異性体を与えた。NMR と X 線結晶構造解析により、LaBelL、MspBelL、SaBelL、ScBelL は共通して (1' R,2' S) (シス体) を生成することが判明した。また SrBelL と MiBelL は別の新規ジアステレオマーを与え、その立体化学は (1' S,2' R) -1-Dns と推定された。以上の結果から、BelL/HrmJ ファミリーに属するシクロプロパン化酵素群は、ニトロノルロイシンを共通基点としながらも、4 種類すべてのシクロプロパン立体異性体を生成しうる多様な立体選択性を進化させていることが明らかとなった。これにより、アミノ酸配列の微小な差異が、立体制御影響することが示された。

さらに、これらの酵素について、それぞれ Mn(II) と V(IV)=O を鉄の代わりに用いて X 線結晶構造解析を行った。基質と結合したシクロプロパン化酵素の結晶構造解析からは、H 原子移動がオフラインの π 経路で進行することが示唆された。一方、同様の水酸化酵素の構造解析では、H 原子引き抜きは σ 経路によって進むことが示唆された。得られた知見は、H 原子移動の経路が、生成した基質ラジカルのその後の運命を決定することを示唆している。基質のわずかな位置変化が、水酸化反応をシクロプロパン化反応を制御していると考えられる。

(6) 本研究の考察

本研究で示された H6H の精密な位置選択性制御、および BelL/HrmJ シクロプロパン化酵素群が示す多様な立体選択性は、酵素を用いた三員環構築の将来展開に重要な知見を与える。これらの成果は、わずかな基質構造の変化や活性部位残基の差異が反応経路・立体化学を劇的に変化させることを明確に示し、化学触媒では達成が難しい「反応経路の切り替え」を酵素が実現していることを示唆している。

今後、天然の多様性を出発点として、それぞれの酵素が持つ微妙な残基差異をタンパク質工学的に制御することで、任意の立体化学の三員環を選択的に形成する酵素群を体系的に整備できると期待される。また、H 引き抜き経路の制御に基づく反応機構操作の可能性が挙げられる。 π 経路による環化反応（シクロプロパン化やエポキシド化）と σ 経路による水酸化は、基質配置と活性部位の電子構造のわずかな違いによって切り替わることが示されており、三員環合成生体触媒を創出するにあたり重要な基盤概念となると考えられる。

(7) 共同研究者（所属機関名、役職、氏名）

テキサス大学オースティン校化学科、教授、Hung-wen Liu
ノースカロライナ州立大学化学科、准教授、Wei-Chen Chang

(8) 本研究の成果の公表先

Ushimaru, R., Chen, R., Fan, P.-H., Liu, X., Ruzsyczky, M., Liu, H.-w. "Refining the substrate-cofactor disposition model of hyoscyamine 6 β -hydroxylase catalysis using hyoscyamine analogs" 投稿準備中.

[注] この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。