酵素による炭素-炭素結合形成反応と有機合成への応用

小倉 協三*

Carbon-Carbon Bond Forming Reactions by Enzymes and Their Application to Organic Synthesis

Kyozo OGURA*

A number of artificially modified substrates for prenyltransferases were designed, including *Z*-3-methyl-3-pentenyl diphosphate and its *E*-isomer, which could be converted into the *R*- and *S*-enantiomers of 4-methyl-*E*,*E*-farnesol, respectively. Chiral synthesis and configurational determination of faranil and 4-methyl juvenile hormone I were achieved by exploiting the stereospecificity of farnesyl diphosphate synthase (FPS) reaction. Molecular cloning and overexpression of the gene for thermostable FPS made it possible to produce sufficient amounts of crystals of the enzyme. Site-directed mutagenesis studies were conducted extensively with FPS, providing detailed information about essential amino acid residues involved in catalysis and substrate binding. Based on these results coupled with those from studies with artificial substrates, a hypothetical mechanism is proposed for the FPS reaction.

Key words: Enzymatic synthesis, Prenyltransferase, Artificial substrate, Farnesyl diphosphate synthase.

1. はじめに

天然には多様なイソプレノイド化合物が存在するが、それらはいずれも炭素数5のイソペンテニル二リン酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) がその異性体であるジメチルアリル二リン酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) をプライマーとして重合的に縮合する炭素鎖伸長反応によって生成する種々の鎖長(C_{5n})のプレニル二リン酸を経て生成されることはよく知られている。この重合的なC-C結合形成反応が生体内で整然と制御されて進行し、必要に応じて一定の鎖長で停まる機構は有機合成化学の見地から興味深い。この仕組みの謎を解くためには、種々の鎖長の生成物に対応してどのような酵素が存在するのかを知ることがまず必要であった。こ

の酵素はIPPにいろいろの鎖長のプレニル基を転位する反応を触媒するという意味で、プレニルトランスフェラーゼと総称される。筆者らは長年にわたって、このプレニルトランスフェラーゼ群の探索・分離を試みてきたが、基本的に重要であると思われる酵素はほぼ見つか、本格的な酵素反応機構の研究に入った。酵素の優れた触媒機能を利用する有用物質の合成に関する研究は多いが、有機化合物合成の基本である炭素-炭素結合形成を触媒する酵素に関するものは少なかった。その理由は、適当な酵素が容易に得られなかったこと他に、「分解系にはたらく酵素は幅広い基質特異性をもつが、合成系の酵素の特異性はきびしく、多くの人工基質への応用が期待できない」とする一般的な先入観があげられよう。しかし、筆者らはプレニルトランスフェラーゼの基質特異性を調べ、その先入観を覆した。また、遺伝子工学的手法が導入できるようになったために、「不安定であり、大量に得にくい」という酵素の最も大きい難点を克服できるようになった。さらに、酵素分子中の任意のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に取り換えて、機能を改変させることもできるようになってきた。したがって、今や

1995年度有機合成化学協会賞受賞

* 東北大学反応化学研究所 ( )

* Institute for Chemical Reaction Science, Tohoku University ( )

Fig.1 Prenyltransferase reactions.

これらの酵素は得体の知れない触媒ではなく、有機化学の言葉で表現できる構造明確な分子触媒として理解できるとともに、大量に入手可能な身近なものになってきた。

2. 新規酵素群の発見

1959年にLynenら¹⁾が酵母の抽出液の中にステロイドの生合成の前駆体であるファルネシル二リン酸の合成酵素を発見したのが始まりである。続いて1966年にBlochら²⁾は、ステロイドの合成能を欠き、カロチノイドの合成能をもつバクテリアの一種 *Micrococcus luteus* から、カロチノイドの前駆体であるゲラニルゲラニル二リン酸の合成酵素を見いだした。これらの2つのプレニルトランスフェラーゼはそれぞれ $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15}$ と $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15} \rightarrow \text{C}_{20}$ の連続的鎖延長反応を触媒するものであった。では、『ステロイドもカロチノイドもつくる能力のある植物には、上記の2種類の酵素が存在するのか？、それとも植物の場合は、ファルネシル二リン酸合成酵素によってつくられた C_{15} のファルネシル二リン酸に1分子のIPPを縮合させる酵素が存在して、 $\text{C}_{15} \rightarrow \text{C}_{20}$ の単一反応を触媒するのか？ または1つの共通の酵素が条件次第で C_{15} をつくったり C_{20} をつくったりするように機能するのだろうか？』というのが次の関心事であった。筆者らはカボチャの果肉部から2つの異なるプレニルトランスフェラーゼを分離して、それらはそれぞれ酵素と細菌の酵素と同じ触媒機能をもつことを明らかにした。これによって植物におけるステロイドやトリテルペンの生合成とカロチノイドやジテルペンの生合成は、反応経路のうえでは $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15}$ の鎖延長を共有しているが、酵素のレベルでは C_5 の段階で分岐独立しており、カロチノイドやジテルペンの生合成のためのゲラニルゲラニル二リン酸はファルネシル二リン酸合成酵素に依存せずに、IPPとDMAPPから一挙に合成されることが示された^{3,4)}。

ファルネシル二リン酸合成酵素やゲラニルゲラニル二リン酸酵素の触媒機能から類推して、 C_{25} 以上の鎖延長に関しても $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15} \rightarrow \dots \rightarrow \text{C}_{5n}$ のように連続する反応を触媒するプレニルトランスフェラーゼの存在が予想された。そこで、筆者らは C_{30} のイソプレノイド側鎖

をもつメナキノン-6をもつ *Micrococcus luteus* B-P26 株の酵素を調べた。その結果、 $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15} \rightarrow \text{C}_{20} \rightarrow \text{C}_{25} \rightarrow \text{C}_{30}$ の連続反応を触媒する酵素は存在せず、 $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15}$ 反応を触媒するファルネシル二リン酸合成酵素と、それによって合成されるファルネシル二リン酸をプライマーとして $\text{C}_{15} \rightarrow \text{C}_{20} \rightarrow \text{C}_{25} \rightarrow \text{C}_{30}$ の反応を触媒する酵素が存在することがわかり、後者をヘキサプレニル二リン酸合成酵素と命名した⁵⁾。驚くべきことに、このヘキサプレニル二リン酸合成酵素は、単独で触媒機能を持たない2種類の蛋白質(成分Aと成分B)が基質の存在下に会合して、はじめて機能を発揮するという先例のない仕組みの酵素であった。

同様にして、 C_{35} の側鎖のメナキノ-7を持つ枯草菌 *Bacillus subtilis* からは $\text{C}_{15} \rightarrow \text{C}_{20} \rightarrow \text{C}_{25} \rightarrow \text{C}_{30} \rightarrow \text{C}_{35}$ の反応を触媒するヘプタプレニル二リン酸合成酵素が見いだされたが⁶⁾、この酵素も解離して存在する2つの異なる蛋白質成分(成分Iと成分II)から成るものであった⁷⁾。 C_{30} と C_{35} の鎖延長はそれぞれこのように2種類の蛋白質成分の協同作用によって触媒されることが明らかになったが、これは水溶性の基質から両親媒性の生成物を合成する触媒反応を効率よくターンオーバーさせる機構として、天然が編み出した仕組みであると思われる。いろいろな実験事実から、図2に示すような動的な会合・解離を介した触媒ターンオーバー機構のモデルが推定さ

Fig.2 Catalytic turnover by dynamic interaction of the two protein components of hexaprenyl diphosphate synthase.

れる。最近、遺伝子クローニングにより、2つの蛋白質成分の構造とそれらの遺伝子の DNA 上の関係が明らかになった⁸⁾。

これら2つの酵素の類推から、C₄₀以上の鎖長の生成物を合成する酵素も同じような仕組みのものと予想された。しかし、この予想に反して、細菌 *Micrococcus luteus* から分離したソラネシル二リン酸(ノナプレニル二リン酸)合成酵素は同一のサブユニットから成る非解離性のホモ二量体であり、それ自身に触媒活性があった。しかし、この酵素は単独では低い酵素活性しか示さず、同細菌中に存在する蛋白質性の活性因子によって著しく反応が促進された⁹⁾。細菌 *Paracoccus denitrificans* から C₅₀ の鎖延長酵素デカプレニル二リン酸合成酵素が分離されたが¹⁰⁾、この酵素も同じような活性化機構をもつものであった。詳細な実験によって、この活性化因子は酵素反応で生成した疎水性の生成物と結合して、それ

を酵素の活性中心から取り除くことによりターンオーバーを維持するように作用することが示された(図3)。この因子は all-*E* 型の C₄₀、C₄₅、C₅₀ のプレニル二リン酸に結合する蛋白質であり、“ポリプレニル二リン酸キャリア蛋白質(Polyprenyl diphosphate Carrier Protein, PCP)”と呼ぶのが適当であろう。

細菌は共通して C₅₀ の all-*E*-ファルネシル-all-*Z*-オクタプレニル二リン酸合成酵素をもつが、この酵素は活性発現に膜成分の脂質を必要とする。この活性化のための膜脂質は Triton X-100 のような界面活性剤でも代用できるが、前述の PCP では代用できないことがわかった。

3. プレニルトランスフェラーゼ反応の立体化学

機能の異なるいろいろなプレニルトランスフェラーゼが分離されたので、ファルネシル二リン酸合成酵素についての Cornforth ら¹¹⁾による立体化学の解明以来、長年の懸案であった *Z* 型鎖延長の酵素反応とファルネシル二リン酸合成酵素以外の *E* 型プレニルトランスフェラーゼの反応の立体化学を図4のように決定することができた^{12,13)}。これによって、*E* 型、*Z* 型のいずれの鎖延長反応においても、C-C 結合は IPP 分子の Si 面側に起こり、それと同じ側に向く4位の水素が脱離する関係にあることが明らかになった。

4. プレニルトランスフェラーゼの基質特異性

プレニルトランスフェラーゼによる C-C 結合生成反応は触媒機構上からも有機合成への応用という観点からも興味深い。そこで、数多くの基質ホモログを合成して、

Fig.3 Catalytic turnover by polyprenyl diphosphate synthase.

Fig.4 Stereochemistry of prenyltransferases.

FPS: farnesyl diphosphate synthase

Scheme 1 Reactions of artificially modified allylic substrates¹⁴⁻²².

(1) Reactions leading to all-*E* products²³

Scheme 2 Homoallylic artificial substrates.

(2) Reactions leading to products with the double-bond stereochemistry reversed^{24, 25}

Scheme 3

(3) Reactions leading to chiral compounds (1)²⁶⁻²⁸

Scheme 4

基質となるための構造条件を系統的に調べた結果、驚くほど多くの人工基質が見いだされた。次の式にその反応例を示す。これらの結果は、酵素基質の結合部位に関して間接的ではあるが、興味ある知見を提供するとともに、これらの酵素を用いる新しい合成法の展開を示唆するものであった。

IPP の 4-位にメチル基をもつ *E* と *Z* 異性体 (43 と 44) が共にファルネシル二リン酸合成酵素の基質としてはたらく、互いにエナンチオマーの関係にある生成物を 100% *ee* で与えることが証明された²⁶⁻²⁸。このことは、酵素が、人工的につくった C-4 のエナンチオ面を無視して、本来の基質と同じように C-3 のエナンチオ面を厳密に識別して、*Si* 面側からのみの C-C 結合形成反応を触媒することを意味する。

また -CH₂- を 1 個挿入した C₆ 化合物 (41) の反応では、生成する二重結合が 100% 逆転して *Z* 型になる^{24, 25} (スキーム 3)。

43 と 44 はソラネシル二リン酸合成酵素 (SPS) の基質としてもはたらく、それぞれ *S* 体と *R* 体の生成物を与えるが、生成物の鎖長は、本来の基質 (IPP) の場合に比べて、イソプレン単位 3 個相当分短い。一方、*Z* 鎖延長酵素であるウンデカプレニル二リン酸合成酵素 (UPS) は 43 を基質として受け入れ、いろいろな 48 型化合物を縮合させて、*Z* 型の 49*S* 化合物を与えるが、44 は UPS の基質にはならない。UPS は本来 EPP に 8 分子の IPP を連続的に縮合させて、C₅₅ 体を与える酵素であるが、43 との反応では、1 分子のみの縮合でとまる (スキーム 5)。

5. 天然物合成への応用

基質特異性の研究で見いだされた人工基質の反応は酵素を有機合成へ応用する観点からも興味深いものであった。ファルネシル二リン酸合成酵素はアリル型の基質に非常に幅広い構造の許容性を示すので、ホモアリル型基質 43 または 44 とのいろいろな組み合わせの反応によって多くのエナンチオマーをセットで合成できる。実際、筆者らはこの不斉合成反応を生理活性天然物の合成に利用して、絶対構造を決定することに成功した。

5.1. ファルナル (昆虫フェロモン) の合成と絶対構造

(4) Reactions leading to chiral compounds (2) ²⁹⁻³¹

UPS: Undecaprenyl diphosphate synthase

SPS: Solanesyl diphosphate synthase

Scheme 5

ファラナルはファラオ蟻の道しるべフェロモンとして Ritter らにより分離され、その構造は **55** と報告されたが、絶対構造は不明であった。筆者らはブタ肝臓のファルネシル二リン酸合成酵素を用いて、図 5 に示すように 4 種類の光学異性体を合成し、昆虫によるフェロモン活性試験の結果、天然フェロモンは 3*S*, 4*R* 体 (**55*R***) であると決定された³²⁾。これとは独立に、森ら³³⁾は有機化学的に光学活性のファラナルを合成し生物試験の結果、筆者らと同じ結論を得た。さらに筆者らは天然物と同じ絶対配置をもつファラナルのホモログを合成し

て、フェロモン活性の構造特異性を明らかにした³⁴⁾。

5.2. 昆虫幼若ホルモン 4-MeJHI の合成と絶対構造

4-MeJHI は 4-位にキラルなメチル基をもつ幼若ホルモン(JH)として、Schooley らによって、蛾の卵から分離されたが、微量のため絶対構造の決定は不斉合成に託された。筆者らは、Schooley のグループと協同で、次のようにしてこれを解決した³⁵⁾。

まず、化学合成したラセミの 4-MeJHI のジアステレオマー混合物をガスクロマトグラフィーで分離する条件を設定した。次に放射性ファルネソールを JHI に変換する能力をもつ蛾のアラタ体培養組織系を確立した。そのうえで、図 6 に示したように 4-MeJHI の生合成上の前駆体と考えられる放射性標識のトリスホモファルネソールの両エナンチオマーをブタ肝臓のファルネシル二リン酸合成酵素を用いて合成し、両者を蛾のアラタ体組織に投与して、生体内変換を追跡した。その結果、両エナンチオマーはいずれも生体内で酸化、エステル化、エポキシ化を受けて、4-MeJHI のジアステレオマーを与えたが、そのうち、**43** を用いて合成したトリスホモファルネソール (**59*S***) に由来するものが、天然の 4-MeJHI にキャピラリーガスクロマトグラフィーで一致した。**59*R*** 由来のジアステレオマーは天然物より長い保持時間を示した。また、このそれぞれの投与実験で得られた代謝物はそれぞれジアステレオマーを含まなかったことから、このエポキシ化反応は 4-位のメチル基の絶対構造に影響されることなく、C-10 のエナンチオ面の一方向からのみ起こることが確認された。したがって、エポキシ部の絶対構造に関しては直接証明はないが、エポキシ環の絶対構造はすべての JH 類について同じ (10*R*) であると考えられる。

現在までに 5 種類の幼若ホルモンが知られているが、前述の 4-MeJHI を含めて、すべての JH 類の生合成前駆体アルコールをこの酵素的合成法によって合成するこ

Fig.5 Synthesis and absolute configuration of faranaral.

Fig.6 Synthesis and absolute configuration of juvenile hormone, 4-MeJHI.

とができた。

6. プレニルトランスフェラーゼの遺伝子クローニングと大量発現

これまで述べてきたように、プレニルトランスフェラーゼは興味ある機能をもつが、この酵素が不安定であり、容易に大量に得にくいという点を解決しない限り有機合成への応用という見地から魅力に欠ける。また、酵素の機能をさらに詳しく調べ反応機構を究明するためにも、安定な酵素の大量確保と酵素タンパク質のX線結晶構造解析による三次元構造の解明が切望される。ラットと大腸菌のファルネシルニリン酸合成酵素の遺伝子クローニングがされていたが^{36,37)}、大量発現はなされていなかった。そこで、筆者らは、小畑らのグループと協同で好熱性細菌の *Bacillus stearothermophilus* のプレニルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングとその過剰発現を企てた。

その結果、まずファルネシルニリン酸合成酵素の遺伝子がクローニングされ、塩基配列が決定された。次に、大量発現させる系を構築し、この発現ベクターで大腸菌を形質転換することにより、目的の耐熱性ファルネシルニリン酸合成酵素を宿主の全タンパク質の20%を占めるほど過剰に生産させることに成功した³⁸⁾。この酵素は大量につくられるうえに耐熱性であるために、形質転換した大腸菌の粗抽出液を加熱処理して変性させた宿主の

タンパク質を遠心分離で除去した後、上清液を2種類のカラムクロマトグラフィーにかけるだけで、電気泳動で単一になるまで精製できた。また、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いる蒸気拡散法で、この酵素蛋白質を結晶化することに成功し、初のX線解析データを得た³⁹⁾。このようにして安定なファルネシルニリン酸合成酵素の大量確保に道がついた。この酵素は55℃での長時間の反応に耐えるうえに、反応の進行に従って生成物が反応系外に析出するため、生成物阻害がかからず、大量合成に応用するのに甚だ都合がよい。この酵素は297個のアミノ酸からなる蛋白質のホモ二量体であり、他の生物由来のプレニルトランスフェラーゼと比べて最も小さく、また、最も高い触媒効率、 $k_{cat}=660/\text{min}$ を示した。これは過去の最高記録をもつトリ肝臓のファルネシルニリン酸合成酵素の k_{cat} の3倍を超える値である。この耐熱性酵素は動物のファルネシルニリン酸合成酵素とアミノ酸配列上で、25%程度の相同性しか示さないが、43と44に対してはブタ肝臓の酵素と同じようにはたらし、不斉合成に有用に利用できることが確認された。植ら⁴⁰⁾は種々のアリル型基質を用いて *B. stearothermophilus* とブタ肝臓のファルネシルニリン酸合成酵素の基質特異性を比較して興味ある結果を得ている。

7. ファルネシルニリン酸合成酵素の一次構造と部位特異的変異導入

種々の生物由来の酵素の一次構造を比較すると、相同性の高い7つの領域があることに気付く(図7)。その中でも、DD---D---RRG(D=アスパラギン酸, Asp; R=アルギニン, Arg; G=グリシン, Gly)とG--FQ--DD--D(F=フェニルアラニン, Phe; Q=グルタミン, Gln)というモチーフをもつ領域IIと領域VIについては、Edwards⁴¹⁾やPoulter⁴²⁾らによって本酵素の活性部位として最も重要であるらしいことが示されたが、筆者らも *B. stearothermophilus* の酵素について部位特異的変異の導入による研究で同じ結論に達した。

7.1. 酸性および塩基性アミノ酸に関する変異体

領域IIとVIの中の6つの保存性アスパラギン酸(D)とアルギニン(R)に番号を付してD¹D²...D³...R¹R²G, G--FQ--D⁴D⁵--D⁶と表すと、ラットの酵素を用いたEdwardsら⁴¹⁾の実験で次のような結果が得られている。D²またはD³をE(グルタミン酸, Glu)に置換した変異体はいずれも野生型の酵素とほとんど変わらない K_m 値を示すが、それらの k_{cat} は1/1000に減少する。一方、D¹をEに置換した変異体は野生型酵素とほとんど変わらない k_{cat} と K_m 値を示す。領域VIIのD⁴をEに置換すると k_{cat}

E.c.: *Bacillus stearothermophilus* E.c.: *Escherichia coli* S.c.: yeast hum.: human

Fig.7 Similarity in the primary structures of various farnesyl diphosphate synthases.

が1/1000に低下するとともに、イソペンテニルニリン酸(IPP)に対する K_m 値が著しく増大する。しかし、ゲラニルゲラニルニリン酸(GPP)に対する K_m 値は変化しない。 D^5 をEで置換したものはIPPとGPPの両方の基質に関して変わらぬ K_m 値を示し、 k_{cat} の低下もわずかである。 D^6 は、Eで置換してもほとんど酵素活性が変わらない。すなわち、領域IIと領域VIの6つのアスパラギン酸の中で D^2 、 D^3 および D^4 が特に触媒機能に重要である。領域IIの2つのアルギニン(R)も触媒機能に決定的に関与しており、 R^1 と R^2 はいずれもK(リシン, Lys)で置換すると、 K_m 値は変わらないが、 k_{cat} が著しく減少する。

これらのことから、領域IIとVIの特徴あるアミノ酸配列の中でアスパラギン酸(D^2 、 D^3 、および D^4)とアルギニン R^1 と R^2 は本酵素の活性中心を形成するように配置し、その酸-塩基としての機能が直接触媒反応に関与するものと思われる。領域VIIにも保存性の高いアルギニンがあるが、筆者らはこれを疎水性アミノ酸に置換してもIPPに対する親和性が低下するが、 k_{cat} は約半分になる程度であり、触媒機能にそれほど重要ではないことを明らかにした⁴³⁾。

7.2. 生成物の鎖長に変化をもたらす変異導入

領域IIと領域VIのアスパラギン酸の重要性については、*B. stearothermophilus*の酵素を用いた筆者らの実験

によっても、ラットや酵母の酵素の場合と同様の結論が得られた。さらに、領域Iと領域Vにそれぞれ保存されているリシン(K 47とK 183)をイソロイシン(I)やバリン(V)のような疎水性アミノ酸で置換したもののK 47IやK 183Vでは、ゲラニルニリン酸(GPP)に対する親和性は変わらないが、イソペンテニルニリン酸(IPP)に対する親和性が著しく減少することを見いだした(表1)⁴⁴⁾。また、これらの疎水性アミノ酸による置換によって、生成物の分布が変わることがわかった。すなわち、ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)とIPPを基質としたときの反応生成物を野生型酵素の場合に比べると、これらの置換体酵素の場合は、GPPの生成の割合が大きいたことがわかった⁵²⁾。

大沼ら⁴⁵⁾は、*B. stearothermophilus*を化学的変異剤と処理してファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子にランダム突然変異を導入し、これを人為的なゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子に変換させることに成功した。ゲラニルゲラニルニリン酸の合成酵素活性を獲得した数種類の変異体を得られたが、特に81番目のチロシン(Y)がヒスチジン(H)に変わった変異体が著しいゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素活性を示したことは興味深い。

7.3. フェニルアラニンとグルタミン残基の役割

アスパラギン酸、アルギニン、リシンの重要性は既に

Table 1 Kinetic parameters of farnesyl diphosphate synthases and its mutants (1).

FPP synthase	K_m (IPP) ^a (μ M)	K_m (GPP) (μ M)	K_m (DMAPP) (μ M)	$k_{cat} \times 10^4$ ^b (s ⁻¹)	k_{rel} ^c
Wild type	16.2	9.7	13.3	109,900	1
D224A	16.4	2.7	12.2	7.9	7.2×10^{-5}
D224E	17.7	3.3	22.3	11.3	1.0×10^{-4}
D225I	16.2	5.2	9.4	2.1	1.9×10^{-5}
D228A	160	8.6	77.9	9,800	8.9×10^{-2}
K238A	70.4	7.8	14.1	3,790	3.4×10^{-2}
K238R	57.9	8.9	11.4	4,260	3.9×10^{-2}
K47I	340	4.8	13.7	1,500	1.4×10^{-2}
K183A	303	11.8	ND ^d	1,600	1.5×10^{-2}

^aFor the reaction with GPP.^b k_{cat} was calculated from the V_{max} value for the reaction with IPP and GPP.^cRelative k_{cat} value.^dNot determined.Table 2 Kinetic parameters of *B. stearothermophilus* farnesyl diphosphate synthases and its mutants (2).

FPP synthase	K_m (IPP) ^a (μ M)	K_m (GPP) (μ M)	K_m (DMAPP) (μ M)	k_{cat} ^b (s ⁻¹)	k_{rel} ^c
Wild-type	16.2	9.7	13.3	10.99	1
F220A	24.9	3.5	22.5	1.18×10^{-4}	1.07×10^{-5}
Q221E	14.8	16.0	327.4	1.14×10^{-2}	1.04×10^{-3}

^aFor the reaction with GPP.^b k_{cat} was calculated from the V_{max} value for the reaction with IPP and GPP.^cRelative k_{cat} value.

述べたが、これらは基質のピロリン酸部分と Mg^{2+} を介して相互作用し、酸-塩基触媒として機能するために重要であることは容易に理解される。しかし、その他に基質の疎水性部分を認識して、それを正しい位置に収納するための部位を形成するアミノ酸残基がなければならないはずである。領域VIに完全に保存されているモチーフ G--FQ--DD--D 中の F220, Q221(F=フェニルアラニン, Phe; Q=グルタミン, Gln)モチーフは、その観点から興味深い。そこで、この2つの残基について変異体を作成してその機能を調べた結果、この2つの残基は極めて重要な役割もつことがわかった(表2)⁴⁶⁾。F220をA

(アラニン, Ala)で置換したもの(F220A)では、 k_{cat} が $1/10^5$ 倍に激減し、フェニル基はメチル基で代用できないことが示された。またQ221をE(グルタミン酸, Gln)で置換したQ221Eでは、 k_{cat} が $1/1000$ に減少し、かつ、ジメチルアリル二リン酸(DMAPP)に対する K_m 値が25倍にも増大した。一方、IPPに対する K_m 値には変化がなかった。したがって、領域VIに位置するFQモチーフのフェニル基と-CONH₂基は決定的に重要な役割を担っていると言える。これらのことは、このPhe-Gln(FQ)はアリル型基質が結合する部位を形成する重要な残基であることを示唆している。筆者らは、基質特異性

Table 3 Kinetic parameters of *B. stearotherophilus* farnesyl diphosphate synthases and its mutants (3).

FPP synthase	K_m (GPP) (μ M)	K_m (IPP) ^a (μ M)	k_{cat} ^b (s ⁻¹)
40 °C ^d			
wild type	5.8	4.7	4.60
C73F	4.9	4.8	2.85
55 °C			
wild type	8.4	13.0	7.86
C289F	7.5	130	2.83
C73S	7.3	11.6	10.57
C289S	6.4	14.3	10.05
C73S-C289S	5.6	13.3	8.41

^a For the reaction with GPP.

^b k_{cat} was calculated from the V_{max} value for the reaction with IPP and GPP.

^d Because of the instability of C73F, kinetic data at 45 °C were compared.

また、この2のコンセンサス配列はファルネシル二リン酸合成酵素以外の他のすべてのプレニルトランスフェラーゼにわたって完全に保存されていることから、生成物の鎖長に関係なく炭素-炭素結合を形成するための官能基群であるといえよう。

一方、基質特異性を支配する要素、ひいては最終生成物の鎖長を決定する要素も、一次構造上の比較データおよび変異体の機能解析によるデータの集積とともに、しだいに明らかになりつつある。酵素を広く有機合成に利用しようとするときの障害として、基質特異性の問題がある。人工基質を用いた研究によって細菌由来と動物由来のファルネシル二リン酸合成酵素の間には基質特異性に大きな、しかも特徴的な差があることが示されており、それらを考慮した両者の一次構造上の比較は基質特異性を変えるための変異体設計の戦略にヒントを与えるであろう。

ブタ肝臓の粗酵素で昆虫フェロモンを合成したときは、酵素側の構造については、何ひとつわかっていなかった。また、酵素が不安定で、分離するには骨が折れた。しかし、“水の中で”どんなに微量の基質にも間違いなくはたらいで“完璧な立体特異的反応”によって目的物に導く酵素の魅力に惹かれて、その機能を追い続けてきた。そして今や、酵素本体の分子構造を基盤にして議論できる時代になった。いよいよ蛋白質機能の有機化学が面白くなるだろう。

9. おわりに

本研究は恩師瀬戸秀一名誉教授の研究室の時代に西野徳三、古山種俊両博士らとともに、カボチャの酵素が非天然基質にもはたらくことを見いだしたことに端を発し、それ以来、多くの協同研究者のお陰で今日のように展開してきた。文献中に引用した多くの協同研究者に深く感謝する。また、この小文をファラナールの合成で大きい貢献をされた故小林正紀博士の御霊に捧げたい。

(平成8年7月15日受理)

文 献

- 1) F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, I. Kessel, *Angew. Chem.*, **70**, 738 (1958)
- 2) A.A. Kandutsch, H. Poulus, E. Levin, K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2507 (1964)
- 3) K. Ogura, T. Nishino, S. Seto, *J. Biochem.*, **64**, 197 (1968)
- 4) K. Ogura, T. Shinka, S. Seto, *J. Biochem.*, **72**, 1101 (1972)
- 5) H. Fujii, T. Koyama, K. Ogura, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14610 (1982)
- 6) I. Takahashi, K. Ogura, S. Seto, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4539 (1980)
- 7) H. Fujii, T. Koyama, K. Ogura, *FEBS Lett.*, **161**, 257 (1983)
- 8) A. Koike-Takeshita, T. Koyama, S. Obata, K. Ogura, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18396 (1995)
- 9) S. Ohnuma, T. Koyama, K. Ogura, *J. Biol. Chem.*, **266**, 22706 (1991)

- 10) K. Ishii, H. Sagami, K. Ogura, *Biochim. Biophys. Acta*, **835**, 291 (1985)
- 11) J.W. Cornforth, R.H. Cornforth, G. Popják, L. Yengoyan, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3970 (1965)
- 12) M. Kobayashi, M. Ito, T. Koyama, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4588 (1985)
- 13) M. Ito, M. Kobayashi, T. Koyama, K. Ogura, *Biochemistry*, **26**, 4745 (1987)
- 14) K. Ogura, T. Nishino, T. Koyama, S. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 603 (1970)
- 15) T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 794 (1971)
- 16) T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6849 (1972)
- 17) T. Koyama, K. Ogura, S. Seto, *Chem. Lett.*, **1973**, 401
- 18) T. Koyama, H. Inoue, S. Ohnuma, K. Ogura, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 4189 (1990)
- 19) Y. Maki, H. Sato, M. Kurihara, T. Endo, G. Watanabe, K. Ogura, *Chem. Lett.*, **1994**, 1841
- 20) Y. Maki, M. Kurihara, T. Endo, M. Abiko, K. Saito, G. Watanabe, K. Ogura, *Chem. Lett.*, **1995**, 389
- 21) T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 322 (1971)
- 22) T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 33 (1973)
- 23) K. Ogura, T. Koyama, S. Seto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1972**, 881
- 24) K. Ogura, A. Saito, S. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 4037 (1974)
- 25) A. Saito, K. Ogura, S. Seto, *Chem. Lett.*, **1975**, 1013
- 26) T. Koyama, K. Ogura, S. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1999 (1977)
- 27) T. Koyama, A. Saito, K. Ogura, S. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3614 (1980)
- 28) S. Ohnuma, T. Koyama, K. Ogura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2742 (1989)
- 29) T. Koyama, M. Ito, S. Ohnuma, K. Ogura, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 3807 (1988)
- 30) T. Koyama, M. Ito, S. Ohnuma, K. Ogura, *Tetrahedron*, **45**, 6145 (1989)
- 31) S. Ohnuma, T. Koyama, K. Ogura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 2733 (1993)
- 32) M. Kobayashi, T. Koyama, K. Ogura, S. Seto, F.J. Ritter, I.E.M. Brüggemann-Rotgans, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6602 (1980)
- 33) K. Mori, H. Ueda, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 461 (1987)
- 34) T. Koyama, M. Matsubara, K. Ogura, *Naturwissenschaften*, **70**, 469 (1983)
- 35) T. Koyama, K. Ogura, F.C. Baker, G.C. Jamieson, D.A. Schooley, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2853 (1987)
- 36) C.F. Clarke, R.D. Tanaka, K. Svenson, M. Wamsley, A.M. Fogelman, P.A. Edwards, *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3138 (1987)
- 37) S. Fujisaki, H. Hara, Y. Nishimura, K. Horiuchi, T. Nishino, *J. Biochem.*, **108**, 995 (1990)
- 38) T. Koyama, S. Obata, M. Osabe, A. Takeshita, K. Yokoyama, M. Uchida, T. Nishino, K. Ogura, *J. Biochem.*, **113**, 363 (1993)
- 39) H. Nakane, T. Koyama, S. Obata, M. Osabe, A. Takeshita, T. Nishino, K. Ogura, K. Miki, *J. Mol. Biol.*, **233**, 787 (1993)
- 40) Y. Maki, A. Masukawa, H. Ono, T. Endo, T. Koyama, K. Ogura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 1605 (1995)
- 41) A. Joly, P.A. Edwards, *J. Biol. Chem.*, **268**, 26983 (1993)
- 42) L. Song, C.D. Poulter, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **91**, 3044 (1994)
- 43) T. Koyama, A. Saito, K. Ogura, A. Takeshita, *Can. J. Chem.*, **72**, 75 (1994)
- 44) T. Koyama, M. Tajima, H. Sano, T. Doi, A. Koike-Takeshita, S. Obata, T. Nishino, K. Ogura, *Biochemistry*, **35**, 9533 (1996)
- 45) S. Ohnuma, T. Nakazawa, H. Hemmi, A-M. Hallberg, T. Koyama, K. Ogura, T. Nishino, *J. Biol. Chem.*, **271**, 1087 (1996)
- 46) T. Koyama, M. Tajima, T. Nishino, K. Ogura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 681 (1995)
- 47) T. Koyama, S. Obata, K. Saito, A.T. Koike, K. Ogura, *Biochemistry*, **33**, 12644 (1994)
- 48) L.C. Tarshis, M. Yan, C.D. Poulter, J.C. Sacchettini, *Biochemistry*, **33**, 10871 (1994)