

氏名・(本籍)	さい とし あき お 齋 藤 昭 夫
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 528号
学位授与年月日	昭和52年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)化学専攻
学位論文題目	Studies on Prenyltransferase with modified Substrates (修飾基質によるプレニルトランスフェラーゼの研究)
論文審査委員	(主査) 教 授 瀬 戸 秀 一      教 授 田 宮 信 雄 教 授 伊 東      椒      助 教 授 小 倉 協 三

## 論 文 目 次

### INTRODUCTION

- Chapter I Syntheses of IPP homologs
- Chapter II Substrate specificity of FPP synthetase with respect to IPP homologs
- Chapter III Enzyme reaction of 4-methylpent-4-enyl Pyrophosphate (2) with GPP and with DPP
- Chapter IV Enzyme reaction of 1-cyclopentene-1-ethyl pyrophosphate (7) with GPP and with DPP
- Chapter V Enzyme reaction of IPP homologs with DPP homologs
- Chapter VI Metal ion effect on FPP synthetase
- Chapter VII Inhibitory effect of IPP homologs on FPP synthetase

### EXPERIMENTAL

### SUMMARY

### REFERENCES

### ACKNOWLEDGMENTS

# 論 文 内 容 要 旨

## 序 論

イソプレノイド化合物と称される一群の天然有機化合物はすべて共通の中間体、すなわち炭素数5のイソペンテニルピロリン酸 (IPPと略す) を経て生成される。このIPPとアリル性ピロリン酸との縮合反応 (炭素鎖延長反応) により、様々な炭素鎖長のプレニルピロリン酸が生成される。この炭素鎖延長反応に関する酵素は一般に、プレニルトランスフェラーゼと呼ばれているが、このなかで、全-E-ファルネシルピロリン酸 (FPPと略す) の合成を触媒するFPP合成酵素 (EC. 2. 5. 1. 1) に関する研究が比較的多く行なわれている。この酵素は2種類の縮合反応を触媒する。すなわち、ジメチルアリルピロリン酸 (DPPと略す) とIPPとの縮合により炭素数10のゲラニルピロリン酸 (GPPと略す) の生成と、GPPとIPPより炭素数15のFPPの生成である。これらの反応の立体過程はCornforthらにより既に明らかにされているが (図1), 2つの縮合反応の相互関係、並びにそれらを触媒する酵素の活性部位近傍の情報に関してはまだ不明の点が多く、天然基質を用いた研究には限界もあった。そこで修飾基質を用いて酵素反応を行なわせ、酵素の基質特異性や反応生成物の詳細な検討により、天然基質のみを用いた研究では得られない成果が期待出来る。FPP合成酵素に関しては、DPP側の修飾は数多く行なわれ、反応機構の解明に多く寄与して来た。しかし一方、IPP側の修飾に関しては研究例が少なく、今までわずか3種の活性化修飾基質が見出されているにすぎず、得られた情報も不十分であった。この様な背景のもとで筆者は、あらたにIPP側の修飾基質 (IPPホモログ) を合成し、酵素反応を行なわせ、反応機構の解明を計る事を目的として研究を行ない、あわせて金属イオン効果や、IPPホモログによる阻害効果にも検討を加えた。

## 第一章 IPPホモログの合成

化学的に下記の11種のIPPホモログの合成を行なった。  
(-PPはピロリン酸エステル略),  $\beta$ -methallyl-PP(1), 4-methylpent-4-enyl-PP(2), 5-methylhex-5-enyl-PP(3), 3,4-dimethylpent-3-enyl-PP(4), E-3-ethylpent-3-enyl-PP(5), Z-3-ethylpent-3-enyl-PP(6), 1-cyclopentene-1-ethyl-PP(7), 1-cyclohexene-1-ethyl-PP(8),  $\beta$ -phenylethyl-PP(9), furfurylmethyl-PP(10), 1,3-dimethylbut-3-enyl-PP(11)

## 第二章 IPPホモログの酵素反応

ブタ肝より精製したFPP合成酵素を用いて、IPPホモログとGPP及びDPPとの反応を行なった。反応生成物は常法に従いアルカリ性ホスファターゼで水解後、エーテル抽出を行ない、GC

—MS による分析を行なった。特にイソプレン鎖の末端の C<sub>5</sub> ユニットの開裂に由来する m/e 69 のイオンピークによるマスフラグメントグラフィ—(MF)を用いて酵素反応生成物の検索を行なった。その結果(2)と(7)はGPPとDPPに対して1分子ずつ縮合を起し、それぞれ相当する生成物が得られた。しかし、これらのIPPホモログはGPPとは収率良く反応するが、DPPとの反応性は非常に低い事がわかった。次に(4)、(5)、(6)及び(8)はGPPとのみ縮合反応を起す事が見出された。

(図2)、ただし、これらの反応性は非常に低かった。一方、残りのIPPホモログはGPPとDPPのいずれに対しても、全く不活性であった。Eの二重結合を持つ(5)は、5員環を有する(7)と類似した立体構造を持っているにもかかわらず、その反応性に著しい差が生じた。これは(5)では、エチル基の自由回転により、酵素の活性部位に於ける適合が妨げられるが、(7)ではメチレン鎖が固定されている為に都合良く適合出来るものとして説明される。今回の実験に於て、GPP及びDPPに対する反応性の著しく異なる修飾基質が見い出されたことより、IPP+GPPとIPP+DPPの両反応が酵素の異なる部位で起るものと推定され、それぞれのIPPの適合部位の環境の相違が、反応性の相違に反映されたものと考えられる。

### 第三章 4-Methylpent-4-enyl-PP (2) と GPP 及び DPP との 酵素反応

(2)とGPPとの反応生成物は、酸処理により水解されないことより非アリル性のピロリン酸エステルであると推定された。このため、標準化合物を化学的に合成し、酵素反応由来の生成物との同定を試みた。その結果、4,8,12-trimethyltrideca-3-Z-7-E-12-triene-1-ol, すなわち、Z二重結合を有する非アリル性のホモフェルネソールのみが生成し、3-E異性体は全く生成しない事が判明した。この様にわずかメチレン鎖が一つ延びただけで、天然物とは全く逆の立体構造を持った化合物が選択的に生じた事は、反応の立体過程、並びに酵素の活性部位を考える上で非常に重要な示唆を与えた。この様な異常反応は、図3で示したモデルで都合よく説明される。すなわち、酵素の活性部位に於て、IPPの適合する部位に、そのメチル基の納まるM-サイトとピロリン酸エステルの入るP-サイトを考慮し、縮合反応が起る為には、酵素のそれぞれの部位を基質の各部位が占める必要があると考える。さて、この様な部位に(2)が入り、そのメチル基とピロリン酸エステルをそれぞれ所定の部位に固定すると、図3に示した様にZ二重結合の生成に都合良いコンフォメーションをとらざるを得なくなる事が理解出来る。また逆に、この様にZ化合物が得られた事より、酵素の活性部位に於けるM-サイト及びP-サイトの存在が強く支持された。尚、このGPPと(2)との酵素反応に於て、(2)、及びGPPに対するkm値はそれぞれ8.5 μM及び10 μMであった。次に(2)とDPPとの反応では収率は非常に低いが、用いた金属イオンにより反応生成物が異なるという興味深い結果が得られた。Mg<sup>++</sup>を用いた場合は単一の生成物を与え、これは化学的に合成した標準化合物、ホモネロールと一致した。次にMn<sup>++</sup>及びCo<sup>++</sup>を用いると、ホ

モノロールが主生成物であるが、その他に副生成物が生じ、そのマススペクトルから縮合生成物であることが確認された。更に興味深いことに、 $\text{Ni}^{++}$ の存在下では、単一の生成物が得られたがそれは $\text{Mn}^{++}$ や $\text{Co}^{++}$ の存在下で得られたものとは完全に異なっていた。この $\text{Ni}^{++}$ の存在下で得られた化合物のマススペクトルより、縮合反応生成物である事は推定されたが、このもののオゾン酸化などの結果より、エキソに二重結合の入った化合物であると思われる。

この様に、金属イオンにより反応生成物が全く異なるという事実は、他のIPP ホモログの反応では勿論、(2)とGPPとの反応でも見られなかった異常現象である。

#### 第四章 1-Cyclopentene-1-ethyl-PP(7)とGPP及びDPPとの酵素反応

(7)はGPP及びDPPと1回の縮合反応を起し、それぞれFPP及びGPPのホモログを与える。(7)とGPPとの縮合反応生成物は、化学的に合成した標準化合物との同定により、アリル性のE-二重結合を持った化合物と断定された。この化合物の特徴は、不斉の炭素原子が導入された点にある。Cornforthらにより証明された反応の立体過程が(7)とGPPとの反応にも適用されるならば、縮合反応生成物はS-立体構造を持ち、光学活性を示す事が期待される。(図4)この点を確かめるために大量スケールで酵素反応を行ない、2.1mgの生成物(アルコール)を得た。この化合物のORDスペクトルを測定したところ、負のカーブを示し、 $[\alpha]_D$ の値は $-3.06 \pm 2.5^\circ$ であった。すなわち反応は立体特異的に起っている事を示している。尚この反応に於ける(7)、及びGPPの $K_m$ 値はそれぞれ $5 \mu\text{M}$ 及び $30 \mu\text{M}$ でありGPPの $K_m$ 値が天然基質どうしの反応の場合に比べて大きくなっている。(7)とDPPとの縮合反応生成物は、GC-MSによる分析の結果、アリル性二重結合を持ったE化合物と推定された。

#### 第五章 IPPホモログとDPPホモログとの酵素反応

DPPと縮合反応を起す2種類のIPPホモログ(2)及び(7)が見出された。しかもDPPとGPPに対するこれらIPPホモログの反応性が著しく異なる事からDPPホモログに対するIPPホモログの反応性を調べることは興味があった。DPPのE-メチル基を延長した型のDPPホモログと、IPPホモログ(2)との反応を検討したが、GPPと同じ炭素鎖長を持ったE-3-methyloct-2-en-1-yl-PPのみが、この反応の基質となり得た。一方これとは対照的に(7)との反応では、5員環や6員環を持ったDPPホモログを含む7種類もの活性なDPPホモログが見出された。この様なホモログ同志の縮合反応は非常に多くの組合せが可能であり、しかも酵素反応の特性としての立体選択性を利用すれば、立体異性体の一方のみを巧みに合成する事が可能であり、有機合成の見地からも興味ある点である。

## 第六章 FPP 合成酵素に於ける金属イオンの効果

FPP 合成酵素は活性発現のために 2 価の金属イオンが必須であり  $Mg^{++}$  が最も効果的である事が知られていた。しかし  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  以外の金属イオンはあまり試みられていなかった。そこで、11 種の金属イオン、 $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Hg^{++}$  を用いて酵素反応を行なわせた結果、IPP+DPP と IPP+GPP の両反応とも  $Mg^{++} > Mn^{++} > Co^{++} > Ni^{++}$  の順で効果的であることが示された。その他の金属イオンはほとんど活性発現に寄与せず、また  $Hg^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$  などは強い阻害効果を示した。

## 第七章 FPP 合成酵素に対する IPP ホモログの阻害効果

(2) 及び (7) 以外の IPP ホモログは DPP とは全く縮合反応を起さないことが判明した。そこでこれらのホモログの阻害効果を調べてみた。IPP ホモログ (1), (4), (5), (6), (8), (9), (10), 及び (7), (8) のモノリン酸エステルそれぞれを  $100 \mu M$  の濃度で加えた場合に於ける DPP+IPP と GPP+IPP のそれぞれの酵素反応の相対的な阻害率を測定した。その結果、環状構造を持ったピロリン酸エステル (8), (9), (10) の阻害効果が最も高かった。また (1) 以外の IPP ホモログは両反応を同程度阻害することも判明した。更にこれらのホモログの濃度を変えて阻害効果を調べてみたが、環状構造を有するピロリン酸エステルは低濃度 ( $2 \sim 5 \mu M$ ) で両反応を 50% 程度阻害する事が示された。そこで阻害の形式を知る為に 6 員環を持つ (8) を用いて実験を行なったが、IPP, DPP, GPP のどの基質に対しても非拮抗阻害を示した。すなわち (8) は遊離の酵素とのみならず酵素と基質の複合体とも結合する事を示しており、今まで知られているものは、ほとんど拮抗阻害である事を考えると大へん興味深く思われる。

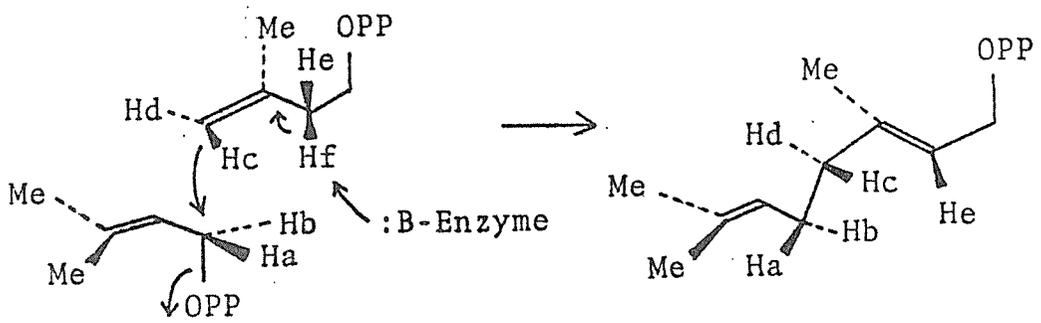


図1. FPP合成酵素の反応機構

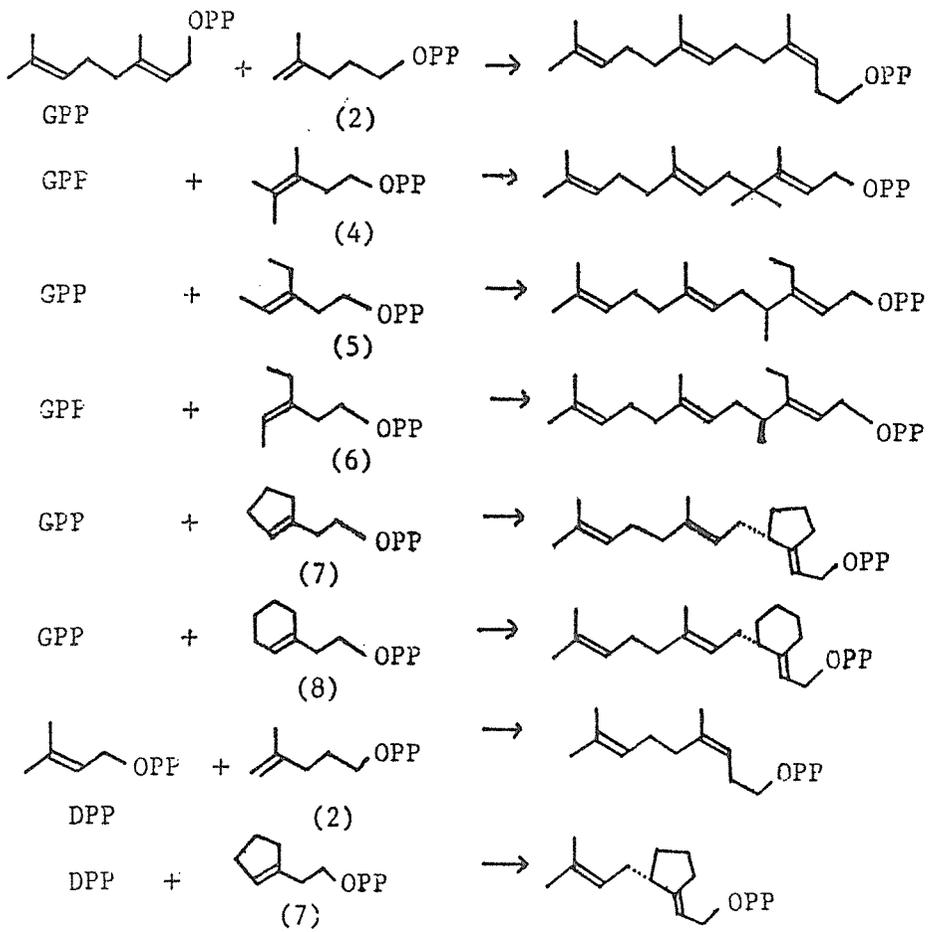


図2. IPPホモログの反応性

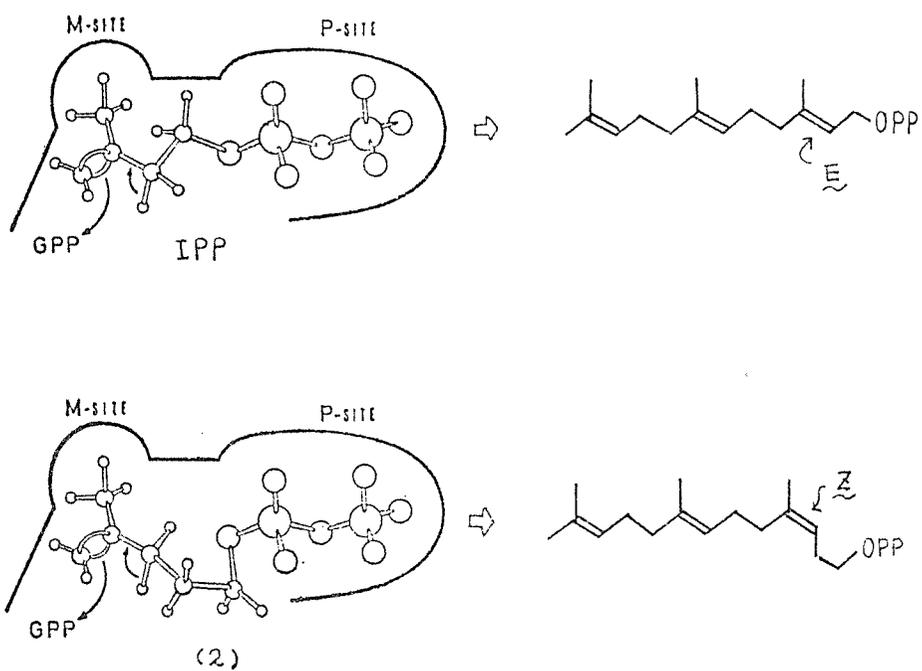


図3 IPP結合部位のモデル

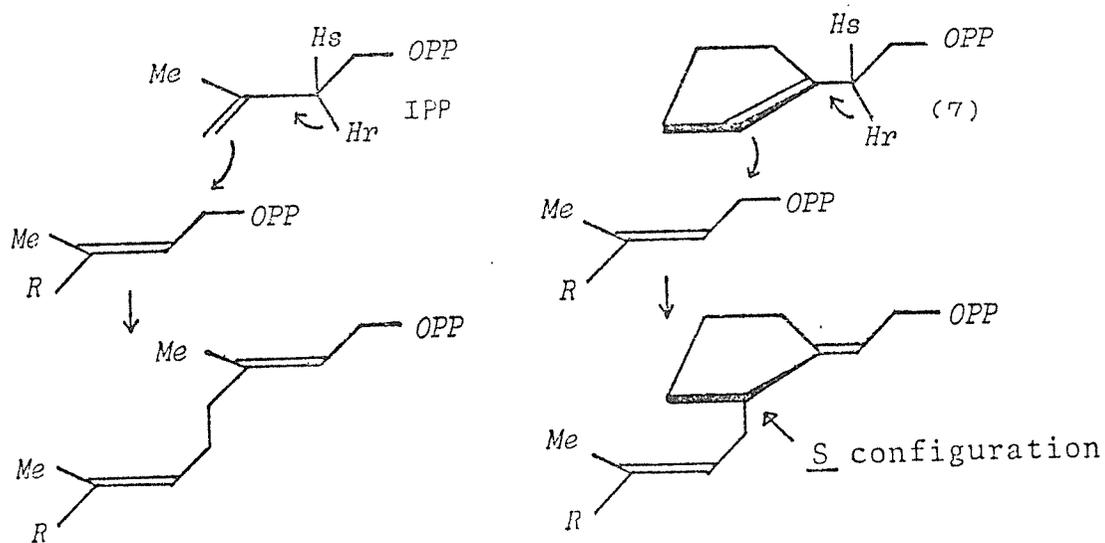


図4 縮合反応の立体過程

## 論文審査の結果の要旨

修飾基質を用いた酵素の研究は、単に基質特異性という立場からのみならず、反応の立体特異性や、生成物の構造との関係においてなされれば、酵素の反応機構や活性部位について、より一層立ち入った議論ができることが期待される。本論文は、そのような見地からなされたプレニルトランスフェラーゼの研究に関するもので、その基質の一つであるイソペンテニルピロリン酸の修飾基質が用いられている。

第一章で11種類の修飾基質の有機化学的合成を述べた後、第二章では、それらの化合物の酵素反応をブタ肝臓のファルネシルピロリン酸合成酵素を用いて、詳細に追跡し、6種類の化合物が基質として働くことを明らかにした。また、これらの修飾基質はいずれもゲラニルピロリン酸とは縮合するが、ジメチルアリルピロリン酸とは極めて反応し難いという重要な知見を得た。第三章はこれらの化合物の中で特に活性の大きい4-methylpent-4-enyl pyrophosphateの反応生成物の構造決定に関するもので、この生成物は本来の基質の場合とは逆にシス型の縮合生成物であるという珍しい事実を明らかにした。このことを主な根拠として、著者は本酵素の活性部位におけるイソペンテニルピロリン酸の結合部にメチル基とピロリン酸部の双方を固定する部位が存在しなければならないと考察し、活性部位のモデルを提唱した。これは他の基質アナログの反応性をもよく説明し得るものであり妥当なモデルであると言える。第四章は5員環を有する1-cyclopentene-1-ethyl pyrophosphateの酵素反応に関するもので、ここでは、その生成物が光学活性体であることからC-C結合生成の立体特異性が論じられている。

第六章では、この酵素反応に対する一連の金属二価イオンの効果を述べ、最後の第七章ではイソペンテニルピロリン酸アナログによる阻害効果を調べた。以上著者は基質アナログの合成、生成物の構造決定など有機化学的手法を取り入れて酵素反応機構の研究を行い重要な貢献をした。これは著者が独立して研究活動を行うために必要な高度の研究能力と学識をもつことを示している。

よって、斎藤昭夫提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。