スクアレン環化酵素—環化機構と非天然型トリテルペンの創製—

Squalene cyclase: Cyclization mechanism and creation of unnatural natural triterpenes

新潟大学農学部

星野 力 Tsutomu HOSHINO

Key words: squalene; oxidosqualene; triterpene; lanosterol; unnatural natural products

1. はじめに

トリテルペンと称される天然有機化合物の骨格は100種類以上もあると言われている。これらは多彩な生理機能を示す生理活性物質の基本骨格を担っている。スクアレン(SQ) **1** あるいは(3S)-2,3-オキシドスクアレン(OXSQ)を共通の基質とするが、その環化様式の違いによりテルペン骨格の多様性が生じる。この多様性は酵素の微細な構造上の差異に基づくと言われて久しいが、その実体は不明であった。ラノステロール合成酵素(OSCLa)によるOXSQのラノステロールへの環化機構に関しては、なぜ立体化学が厳密に制御されながら、位置特異的に炭素-炭素結合が一挙に構築されるのかという興味深い問題が含まれているため、著明な有機化学者がその解明に長年取り組んできた。筆者らは5環性トリテルペンのホペン**2**を合成するスクアレン環化酵素(SHC)の大腸菌での大量発現に成功し、部位特異的変異実験を通してさまざまな活性部位を同定してきた^{1), 2)}。反応中間体として存在するカルボカチオンの安定化に芳香族アミノ酸によるカチオン/ π 電子相互作用が働くことを π 電子密度の高いチロシンやトリプトファンへ置換した変異株のキネテックス(k_{cat} の増大)の面から証明を試みてきた^{3), 4)}。しかし、酵素内のどのアミノ酸のどのような要因が環化様式を左右するのか不明であった。重要な活性部位のアミノ酸の立体的な高さとその活性型コンホメーションを規定していることの証明を部位特異的変異実験を通して、筆者らは漸次明らかにしてきている。また、基質のメチル基の存在位置にエチル基や水素に置換した基質アナログを化学合成し、その環化反応を調べた結果、基質のバルクサイズも非常に重要であり、環化様式を大きく変えることがわかった。本稿では、これらの研究成果に的を絞って紹介する。なお、さまざまな変異株による環化生成物の構造および基質アナログによる中間体(4~

10)のトラップにより、ホペン生合成経路は図1に示した8段階から成り立っていることをすでに証明している^{1), 2)}。

2. アミノ酸のバルクサイズを変えた酵素改変と非天然型天然物

すでにいくつかの事例を報告してきたが、Ile261およびLeu607のバルクサイズがその環化反応にどのような影響を与えているかを紹介する。

(1) Ile261Ala や Ile261Gly の変異酵素⁵⁾

これらの変異株で得られる数々のトリテルペンの構造を図2に示した。6/6/5系**11**、6/6/6/5系**12**, **13**, 6/6/6/

8 Reaction Steps

1st ring-expansion

2nd ring-expansion

図1 ホペン合成酵素(SHC)によるスクアレン環化反応8段階の反応から成り立っている。6および8はそれぞれ13 β -Hと17 β -Hの立体配置となっている。

略号: SQ, スクアレン; OXSQ, 2,3-オキシドスクアレン; SHC, スクアレン-ホペンシクラーゼ; OSCLa, ラノステロール合成酵素

図2 変異型 SHC (I261A および I261G) によるスクアレン環化生成物 17 は I261G でより多く生成する。

6系 14, 15, および 6/6/6/6/5系 16, 17 の 3~5 環性骨格が 1 の環化産物として得られた。11 や 12 はそれぞれ 14α-H, 17α-H 配向であり、真の中間体 14β-H, 17β-H 配向の 6 および 8 の立体異性体であった。13 は 17α-H 配向から由来する。14 および 15 が生産されたことは、9 が反応中間体として存在することの初めての証明となった。二級カチオン 9 をプロホパニルカチオンと命名し、9 の 18 位のメチル基が C-17 カチオンへ転位したものを prohopene A, イソプレノイド側鎖が転位したものを prohopene B と命名した。これらはまだ天然物として見いだされていない 6/6/6/6 系の非天然型トリテルペンの最初の例となった(一見 shionane 骨格と類似しているが別物である)。Gly 変異株は 2 の生成がかなり減少したにもかかわらず、11~13 の生産が I261A 変異酵素と比較して 2 倍も増加した。このことはバルクサイズを小さくすると真の中間体 6, 8 の立体化学が反転することを意味し、トリテルペン合成の立体化学の制御機構について重要な知見となった。実際、ほぼ同程度のバルクサイズの Val 変異株は 11~17 を与えず、また K_m や k_{cat} は野生株とほぼ同じ値であった⁵⁾。

(2) Leu607Trp や Tyr420Trp の変異酵素⁶⁾

最も大きなサイズの Trp に置換した変異株 Leu607Trp や Tyr420Trp は neoachillapentaene 18 と命名した新規トリテルペンを少量ながら与えた。18 の立体化学を考察すると、SHC による A 環形成が本来は椅子型で進行する

図3 変異型 SHC (L697W や Y420W) による異常環化生成物ネオアチラペンタエン 18 の生成機構
野生株では A 環は椅子型で進行するにもかかわらず、酵素キャビティー内で舟型で進行した。

(図1) はずなのに、舟型で進行したことを表している(図3)。大きな Trp が本来の椅子型 4 の形成を妨げたことを意味し、この異常な環化は、酵素キャビティー内でのアミノ酸のサイズが環化様式を大きく変えることをさらに裏づけることとなった。A 環が舟型で進行した例を筆者らは基質アナログを用いて、すでにラノステロール合成酵素でも証明している(27, 図4)。⁷⁾

3. バルクサイズの異なる基質アナログの環化反応

(1) ラノステロール合成酵素 (OSCLa)

Corey らは基質中央部のメチル基 2 個が欠如した 2,3-オキシド-10,15-ビスノルスクアレンを豚肝ミクロソーム

図4 ラノステロール合成酵素（豚肝ミクロソーム画分）による2,3-オキシドスクアレン類縁体（C1単位が余分に付加）の環化生成物
27は図3で示したような舟型でのフォールディングによって生成。ただし、3R-体が環化している。

画分の OSCLa を用いて酵素反応を行い、chair/chair/boat 型のコンホメーションで反応したと考えられる環化生成物を報告した⁸⁾。ラノステロール生成は chair/boat/chair 型で進行するはずであり、この異常な環化様式に筆者らは興味をもった。そこで、10, 15 位に C1 単位多いエチル基を導入したアナログを合成し酵素反応を行った。その結果を図4に示す。10,15-ジエチル OXSQ 19 は、単環性化合物 20 および 21 を与えた⁹⁾。基質アナログの研究が多数報告されているが、単環性化合物で反応が停止した例はなく、最初の報告となった。単環性化合物で反応が停止したのは、バルクサイズが若干大きくなり、酵素に完全にフィットできなくなり、2環や3環性化合物へと反応が進行できなかったためと考えられる。15-モノエチル体 22 では、3環性 6/6/5 系の 23、4環性 6/6/6/5 系のラノステロールホモログ 24 が同時に生成した¹⁰⁾。この実験は Corey らが提案していた「C環はまず Markovnikov 型で閉環してまず5員環が生成した後、6員環へと環拡張する」という説をさらに裏づける証拠となった¹⁰⁾。10-モノエチル体の OXSQ 25 では環化がさらに大きく変化した。単環性 26、3環性 28、およびラノステロールホモログ 29 を与え、興味深いことに単環性のシクロヘキサノン誘導体

27 が得られた。27 の立体化学を考慮すると、3R-体が舟型で環化したことになる⁷⁾。真核生物のトリテルペン生成は 3S-体のみに特異的であることが知られており、矛盾する。では、なぜ 3R-体が反応したのか？ 3R-体の C(10)-エチル基のバルクサイズが大きいため、25 がキャビティー内で椅子型コンホメーションがとれず舟型となり、本来 3S-体のみに固有な環化開始部位（プロトドンナー）にその舟型エポキシドがトラップされたためと考えられる⁷⁾。この研究は 3S-体に特有なラノステロール合成の反応制御機構に新たな知見をもたらした。構造的には 27 は 18（原核生物の環化酵素産物）と等価と考えられ、環化酵素の分子進化の観点からも興味深い。27 のシクロヘキサノン骨格は原生動物テトラヒメナのテトラヒマノール合成酵素による (3R)-OXSQ 環化産物としても報告されていたが、その立体化学は解明されていなかった¹²⁾。

(2) スクアレンの 10 位メチル基の重要性

エチル基というバルクサイズが若干大きな基質アナログではなく、メチル基が欠如したノルスクアレンを基質とした場合も、環化様式が大きく変化した。特に 1 の末端のメチル基が 1 個欠如すると、2 の E 環が 6 員環となったテトラヒマノール骨格（5 環性の 6/6/6/6/6 ring system）となり、また、メチル基が欠如したサイトからは環化が進行しないこともわかった¹³⁾。特に興味深いのは、基質中央部の 10 位のメチル基が欠如すると環化コンホメーションが大きく変化したことである（図5）¹⁴⁾。30 や 31 の環状骨格構造はいまだ自然界から得られてない。10 位メチル基の重要性は、OSCLa ですでに指摘されていたが⁸⁾、30 や 31 のように環化様式が大きく変わった例は報告されてない。6, 15, 19 位のノル体は環化様式が大きく変わらず 2 と同様なホパン骨格を与えた^{14), 15)}。SHC による 1 の環化では、環化開始、基質中央部の 10 位、および環化終了部位のメチル基の適切なバルクサイズが 2 へ導くのに必須であることがわかった。

4. おわりに

鎖状分子 1 が酵素内で折り畳まれる様式は多数存在し、そのコンホメーションによってさまざまな骨格をもつトリテルペンを生成する。本稿では、活性部位と称されるアミノ酸のバルクサイズの大小により、その環化様式が大きく変化する事例を紹介した。植物由来のシクロアルテノール合成酵素の活性部位のバルクサイズを変えることにより、カビや脊椎動物に必須のラノステロールが生成したという興味深い報告がなされた¹⁶⁾。筆者らは酵素改変により、いくつかの非天然型トリテルペンの創製に成功しているが、バルクサイズを変えた基質アナログの研究も環化機構の考

図5 SHCによる10-ノルスqualenの環化メカニズムと生成物の構造
6/5+5/5+(6)系の化合物30と31は前例のない環状炭素骨格である。

察に極めて興味深い知見を与えることも示した。酵素改変と基質アナログの併用により、さらに新しい環状テルペン骨格が生産可能と考えられる。本稿では紙面の都合で紹介できなかったが、本研究を開始した当時酵素キャビティーのサイズについてイメージがわからなかった。しかし、基質アナログの研究を通して、反応が行われるキャビティー内は当初考えていたより極めてコンパクトであることがわかった。基質がいったん酵素内へ入ると、もうフレキシブルなコンホメーションがとれない¹⁷⁾。重要なアミノ酸の立体的なバルクサイズの大小がSQやOXSQのコンホメーションを規定し、多種多様なテルペン骨格構築に寄与していると言えるであろう。

- 1) 星野 力: バイオサイエンスとインダストリー, **59**, 167-170 (2001).
- 2) T. Hoshino and T. Sato: *Chem. Commun.*, **2002**, 291-301.
- 3) T. Hoshino and T. Sato: *Chem. Commun.*, **1999**, 2005-2006.
- 4) T. Hoshino, M. Kouda, T. Abe, and T. Sato: *Chem. Commun.*, **2000**, 1485-1486.
- 5) T. Hoshino, T. Abe, and M. Kouda: *Chem. Commun.*, **2000**, 441-442.

- 6) T. Sato, S. Sasahara, T. Yamakami, and T. Hoshino: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1660-1670 (2002).
- 7) T. Hoshino and Y. Sakai: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 7319-7323 (2001).
- 8) E. J. Corey, S. C. Virgil, D. R. Liu, and S. Sarsha: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1524-1525 (1992).
- 9) T. Hoshino, E. Ishibashi, and K. Kaneko: *Chem. Commun.*, **1995**, 2401-2402.
- 10) T. Hoshino and Y. Sakai: *Chem. Commun.*, **1998**, 1591-1592.
- 11) E. J. Corey and H. Cheng: *Tetrahedron Lett.*, **37**, 2709-2712 (1996).
- 12) I. Abe and M. Rohmer: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 783-791.
- 13) T. Hoshino and T. Kondo: *Chem. Commun.*, **1999**, 731-732.
- 14) T. Hoshino and S. Ohashi: *Org. Lett.*, **4**, 2553-2556 (2002).
- 15) 大橋主弥, 星野 力: 第43回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集, pp. 229-231 (1999).
- 16) S. P. T. Matsuda, L. B. Darr, E. A. Hart, J. B. R. Herrera, K. E. McCann, M. M. Meyer, J. Pang, and H. G. Schepmann: *Org. Lett.*, **2**, 2261-2264 (2000).
- 17) 阿部孝政, 星野 力: 2002年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 224 (2002).