特異な生理活性菌類ジテルペン配糖体—フシコクシン, エリナシン—における初期生合成経路の解明と応用

Clarification of the early-stage of the biosynthesis of fusicoccins and erinacines, the biologically active fungal diterpene glycosides, and the application to the creation of their novel derivatives

九州大学機能物質科学研究所

*山形大学農学部

加藤 修雄 Nobuo KATO

張 長山 Chang-Shan ZHANG

兼目 裕充 Hiromichi KENMOKU*

佐々 武史 Takeshi SASSA*

Key words: fungal diterpene glycosides; fusicoccins; erinacines; biosynthetic pathway; tricyclic diterpene synthase

はじめに

旧来の生合成研究は、最終二次代謝生成物に至る各段階の生合成中間体を単離同定することに主眼があった。しかし、近年においては各代謝段階を司る酵素を、遺伝子レベルで解明する方向へ研究が進んでいる。生合成遺伝子が解明できれば遺伝子工学を駆使することで有用天然物の大量生産や新規化合物創出への応用も可能になるからである。最近の分析技術の発達により、生合成関連酵素の機能解析に対して想定される基質さえ準備できれば、その生成物を用意しておくことは必須ではなくなってきた。それでもなお、実証的な生合成研究により各生合成中間体の構造を確定し標品として供給しておくことは、酵素の機能解析などにおいてたいへん重要であることに変わりはない。近年、植物由来の有用テルペノイドに対する環化酵素がいくつか同定されているが、微生物由来のテルペン環化酵素の研究例はまだ極めて少ない。筆者らは、顕著な生理活性から興味をもたれている菌類ジテルペン配糖体、フシコクシンおよびエリナシンの生合成酵素遺伝子の解析、特にアグリコン部に相当するフシコッカおよびシアタン骨格合成酵素遺伝子のクローニングを目指して研究を行っている。ここでは、ゲラニルゲラニル二リン酸 (GGDP) から生合成初期に生成する環化生成物の特定を含む、これらの初期生合成経路に対する実証的な生合成研究について述べる。

1. フシコクシン初期生合成経路の解明

フシコクシン (A: 1, J: 2) および類縁のコチレニン (A: 3) は植物ホルモン様の顕著な生理活性によって古くから注目

され¹⁾、生化学試薬として植物生理学の分野で頻用されてきた。さらに最近、フシコクシンの受容体が H⁺-ATPase と 14-3-3 タンパク質の複合体であることや²⁾、コチレニンにヒト骨髄性白血病細胞に対する分化誘導活性が見いだされ³⁾ 新たに注目を集めている。アグリコン部であるフシコッカ骨格 (5-8-5 三環性骨格) はいわゆるイソプレネール則に従っており、骨格形成経路は有機電子論的考察から自明である印象を受ける。しかし、同様にイソプレネール則に合致するタキソールの生合成中間体・タキサジェンに構造訂正の経緯があるように⁴⁾、特に最終的な二重結合の存在位置に関しては、生合成化学的に慎重でなければならない。従来フシコッカ-1,10(14)-ジエン (4) が初期生合成中間体とされてきたが、二重結合位置異性体である 2,10(14)-ジエン (5) が真の中間体であるとしても過去の標識実験と矛盾しないからである。

そこで、二つのイリドイド単位の縮合を基盤とする合成ルートによって、両者を光学活性体として全合成した。そして、これら合成 4, 5 を標品とする比較分析法によって、フシコクシン産生菌体 (*Phomopsis amygdali*) 中に微量存在する炭化水素が、従来想定されていた 4 ではなく 5 であることを明らかにした⁵⁾。もちろん、この事実だけから 5 が真の生合成中間体であると結論することは早計である。真の中間体が速やかに代謝を受け、菌体中には蓄積されない可能性も考慮する必要がある。そこで、5 およびその 8 β -水酸化体 (7) の同位体標識体を合成し、*P. amygdali* による代謝変換実験を行った。その結果、いずれの場合にも最終代謝産物であるフシコクシンに同位体の取り込みが見られ、5 および 7 が真の中間体であることを立証した。興味あることに、4 の 8 β -水酸化体 (6) も *P. amygdali* によって類似の代謝を受け新配糖体 8 に変換されたが⁶⁾、16 位メチル基は全く酸化を受けず、二重結合の移動に先立ちアリ

図1 フシコクシンの生合成経路と生合成中間体の全合成経路の概略

⇒: *P. amygdali* 中の代謝変換経路; *: 同位体標識位置 (5, 6, 7 の重水素標識体を合成的に供給し, 標識が 7, 2, 1, および 8 に取り込まれることを実証した); →: 4~7 およびそれらの標識体の全合成経路の概略。

ルメチル基への酸化が進行する必要があることを示唆している。

以上のように、フシコクシン合成酵素による環化生成物の構造は、従来想定されていた炭化水素 (4) の二重結合位置異性体 (5) であることを明らかにした⁷⁾。GGDP からの環化過程は二リン酸の脱離によるアリルカチオン形成に始まることは疑いなく、その意味でタキサジェン合成酵素と同様である。そうした知見を踏まえ、現在いくつかのプライマーを設計し RT-PCR による cDNA のクローニングを試みている。また、菌類の生合成関連遺伝子がクラスターをなしているとの仮説に立って、別途フシコクシン-アグリコンの各種生合成酵素遺伝子を取得すべく研究を行っている。

なお、ここでは詳述しないが、*P. amygdali* からはフシコクシンだけでなく、メンタン系モノテルペン、ピマラン系ジテルペン、さらにはバリキュラン (5-12-5 三環性骨格) 系セスタテルペン類も得られており、これらの生合成酵素遺伝子の解析が進展すれば、菌類のテルペン環化酵素に対して多くの知見をもたらすものと期待している。

2. エリナシンの生合成に関する知見

シアタン型ジテルペノイドは、数種の担子菌の二次代謝産物として単離され、特異な 5-6-7 員三環性ジテルペン骨格 (シアタン⁸⁾) をもつ。産生菌の種類の相違によって構造にも多様性があるが、その中であってヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*) から単離されたエリナシン類⁹⁾ は、キシロース配糖体である点で他とは異なり、神経成長因子の合成を促す活性などで興味もたれている。

シアタン骨格は前述のフシコクシンと異なりイソプレノ則には合致せず GGDP からの環化過程に C-C 結合の転位が介在していることになる。その二重結合の存在位置に関して疑問を差し挟む余地はなく、Ayer らが提唱した⁸⁾ ようにシアタ-3,12-ジエン (9) が初期環化生成物であると考えて良い。そこで *H. erinaceum* から、生合成関連化合物の探索を行った。

H. erinaceum を人工液体培養し、二次代謝産物の生成過程を追跡した結果、既知のエリナシン A, B (10, 11⁹⁾) に先立って生成する新規エリナシンを単離することに成功した。それをエリナシン P と命名し、構造を 12 と決定した。

図2 シアタン骨格およびエリナシンの生合成経路

⇒: Ayer らによって提唱された⁸⁾シアタン骨格の生合成経路; ⇒: 筆者らの提唱するエリナシン類の変換経路 (12 は、既知の 10 および 11 の生合成前駆体と考えられ、実際、12 から 11 を経た 10 への変換を *in vitro* で再現できる); →: 12 から 9 への半合成経路および条件。

12 は、シアタンジテルペノイドからそのキシロシドである既知エリナシン類に至る、生合成上の missing link に相当する化合物と考えられた。12 が 10, 11 に先立って生成する事実もそれを支持した。実際、biomimetic な反応によって 12 から 10, 11 への変換を *in vitro* で再現することが可能であった¹⁰⁾。

初期環化生成物 9 についても、菌体から二重結合位置異性体 13 とともに単離することに成功した。さらに、9 はエリナシン P (12) から短段階で半合成することができ、二重結合の位置を含めて構造を確定した¹¹⁾。また、標識 GGDP を *H. erinaceum* のセルフリース系で処理することで標識 9 が得られることを確認し、シアタン合成酵素の存在を確認することができた。フシコッカ合成酵素遺伝子の場合と同様、現在、環化酵素遺伝子を含む生合成関連酵素遺伝子の取得について研究を行っている。

3. 初期生合成過程の解明に立脚した新規誘導体の創製

初期生合成経路を明らかにできると、化学修飾生合成中間体の合成的供給と、天然物産生菌体の代謝変換能を連携することで、直接効率良く新規天然物誘導体を創製することが可能になる。

図3 化学修飾生合成中間体の代謝変換による修飾フシコキシンの創製
さまざまな誘導体への変換が期待できる 20-CN 体についても同様の代謝変換が可能であることをすでに確認している。

7 の 19- および 20-フルオロ誘導体 (14, 15) は、7 やその同位体標識体の合成ルートを改良することで比較的容易に全合成することができる。これらを投与基質として *P. amygdali* で代謝変換したところ、14 からは 43% で、15 からは 72% の収率で相当するフッ素化フシコシン (16, 17) を得ることができた¹²⁾。これら新規フッ素化フシコシンは、アブジシン酸存在下 (発芽抑制状態) のレタス種子に対して、天然のフシコシン J (2) を凌駕する発芽誘起活性を示した。代謝実験を何度か行ったが、9, 10 に対す

る代謝変換効率には実験的誤差を超えた有為の差が認められた。19位と20位はジアステレオメリックな関係にあり、分子モデル的考察からは前者が分子のconvex面に位置するのに対して、後者はconcave面に位置する。*P. amygdali*の酸化酵素系にとって、後者の方が真の基質との差が小さいと考えられ、このことが代謝変換効率に反映されたものと考えられる。この事実、今後関連のさまざまな誘導体創製に対する本手法の適用に対して、重要な指針を与えてくれると言えるだろう。

いずれにしても、テルペノイドの初期生合成中間体は例外なくほとんど官能基をもたない。したがって、合成的供給が容易であると同時に、修飾の位置や修飾基の選択を比較的自由に行うことができる。この利点を活かし、現在機能化誘導体創製に向けた新たな方法の展開を図っている。

- 1) E. Marré: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 273-288 (1979).
- 2) 島崎研一郎: 化学と生物, **38**, 774-776 (2000).

- 3) K. Yamada, Y. Honma, K. Asahi, T. Sassa, K. Hino, and S. Tomoyasu: *British J. Haematol.*, **114**, 814-821 (2001).
- 4) X. Lin, M. Hezari, A. E. Koepp, H. G. Floss, and R. Croteau: *Biochemistry*, **35**, 2968-2977 (1996).
- 5) N. Kato, C.-S. Zhang, T. Matsui, H. Iwabuchi, A. Mori, A. Ballio, and T. Sassa: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 2473-2474.
- 6) N. Kato, C.-S. Zhang, A. Mori, N. Tajima, T. Sassa, and A. Graniti: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1999**, 367-368.
- 7) T. Sassa, C.-S. Zhang, M. Sato, N. Tajima, N. Kato, and A. Mori: *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2401-2404 (2000).
- 8) W. A. Ayer and S. P. Lee: *Can. J. Chem.*, **57**, 3332-3337 (1979).
- 9) 河岸洋和: 化学と生物, **39**, 567-569 (2001).
- 10) H. Kenmoku, T. Sassa, and N. Kato: *Tetrahedron Lett.*, **41**, 4389-4393 (2000).
- 11) H. Kenmoku, N. Kato, M. Shimada, M. Omoto, A. Mori, W. Mitsuhashi, and T. Sassa: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 7439-7442 (2001).
- 12) 張 長山, 田島直人, 加藤修雄, 森 章, 佐々武史: 日本化学会第78春季年会講演要旨集II, p. 1365 (2000) [本年度天然物化学部門ポスター賞受賞].