人工基質の酵素反応

—酵素を用いたイソプレノイド関連化合物の合成—

小 倉 協 三*

Enzymatic Reactions of Artificial Substrates

—Syntheses of Isoprenoids and Related Compounds by Use of Enzyme—

Kyozo OGURA*

I. はじめに

微生物の営む代謝を利用して有用な化合物を生産する方法は発酵法として、古くから開発され、有機化合物製造法の重要な位置を占めている。また最近では微生物をある特定の反応の触媒として利用したり、さらにはその触媒の本体である酵素そのものを有機合成に利用しようとする方向に向けた研究が多くなってきた¹⁾。固定化酵素の研究はその積極的な例である²⁾。酵素は温和な条件下で特定反応をきわめて特異的に能率よく触媒するという点で非酵素的反応より優れた特徴を發揮するが、生体から切り離して酵素を利用する場合には、天然基質はもちろん、その酵素のもつ基質特異性の許す限り人工基質(修飾基質)にも応用が可能であり、そういう意味で酵素を利用した合成法には従来とは異なった新しい発展の可能性が潜んでいる。しかし、そこまで酵素を活用するためには幅広い系統的な酵素反応の基礎的研究が必要であり、特に有機化学的見地からの酵素の研究が望まれよう。修飾基質を使った酵素反応の研究は反応機構を理解するうえで重要であるばかりではなく、酵素を有機合成に広く応用するという見地からも興味深い。そのような観点から本稿ではイソプレノイドの生合成に關与する酵素を取り上げ、人工基質を用いた酵素反応の研究を紹介し、酵素の有機合成への応用を考えるうえの参考に供したい。

II. イソプレン単位の head-to-tail 縮合

イソプレノイドの生合成における炭素鎖の延長はイソペンテニルピロリン酸(1)とその異性体であるジメチルアリルピロリン酸(2)との縮合によるゲラニルピロリン酸(3)の生成により始まる下式のような繰返し型式の縮合によってなされる。

この反応は $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ 結合が一挙に生成する反応で、立体特異性を抜きにしても、非酵素的には起らないユニークな反応である。この C_5 単位ずつの鎖延長を触媒する酵素は prenyltransferase と総称されるが、その中で最もよく知られているのは C_{15} までの鎖延長に關与する酵素、farnesyl pyrophosphate synthetase である。この酵素は酵母や動植物に広く分布し³⁻⁶⁾、ステロイドやセスキテルペンの生合成の前段階を担っている。この酵素の触媒能は $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10}$ ($1+2 \rightarrow 3$) と $\text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15}$ ($1+3 \rightarrow 4$) の二つの縮合反応を触媒するが(4)にさらにもう1分子の(1)を縮合する触媒能力はない。 C_{20} までの鎖延長にはこれとは別の酵素(geranylgeranyl pyrophosphate synthetase)があって、その酵素は $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15} \rightarrow \text{C}_{20}$ の一連の縮合反応を一挙に触媒するのである^{7,8)}。両酵素反応はともに立体特異的であり、生成物は全トランス

* 東北大学非水溶液化学研究所 ()

* Chemical Research Institute of Non-Aqueous Solutions, Tohoku University ()

のプレニル体である。反応の立体過程は farnesyl pyrophosphate synthetase について Cornforth-Popják のグループにより詳しく調べられ、次式で示されることが証明されている^{9,10)}。

ではこの酵素反応の基質にはどのような構造条件が必要であろうか？ farnesyl pyrophosphate synthetase に関する筆者らの研究を中心にして述べる。

1. アリル性基質の特異性 まず、アリル性基質側の特異性をみるためにシス型のAとトランス型のBのホモログを合成して、(1)との縮合の酵素反応を調べた^{11,12)}。その結果、(A)の系列では、nの数が増加すると

ともに活性が減少し、n=2, 3, 4 まだが辛うじて基質と

して働いたが、n=5 のものは不活性であった。(B)の系列では n=2 と 3 は活性が低下するが、n=4, 5 となるにつれて活性は上昇し、n=5 や 6 の化合物は真の基質と同程度の高い反応性を示した。n=9 までは基質となりうるが、それより長くなると不活性となる。反応性と基質のアルキル基の鎖長の関係は図1ようになる。ここで反応性は基質の一定濃度 (25 μM) における (1) の変換速度の相対値で表わしたもので、真の基質 (2) を標準にしている。

本酵素は本来 C₅→C₁₀→C₁₅ の2つの反応を触媒する

● : シス体 (A) ○ : トランス体 (B)
図1 3-methyl-2-alkenyl pyrophosphate の反応性¹²⁾

ものであるが、各非天然基質から導かれた生成物を調べると、次のような反応が起っていることが明らかになった。

C₆~C₈ までの基質は2分子の(1)と縮合を繰返して、それぞれファルネシルピロリン酸型の C₁₆, C₁₇, C₁₈ 体を与えるが、C₉ 以上の基質は1分子の(1)と縮合するのみでゲラニル型の生成物で縮合が止まる。C₁₃ の基質までは活性であるが、それより長い鎖の化合物はこの酵素の基質となることができない。またゲラニル型の二重結合をもつ(25)も2分子の(1)と縮合しゲラニルゲラニル型二重結合をもつ C₁₈ 体(27)を生ずる。すなわちこの酵素は二重結合の型がゲラニル型、ファルネシル型、ゲラニルゲラニル型の如何にかかわらず、炭素数18までのホモログを合成する触媒能をもっている。そして縮合はすべて全トランス型である。

また、辛うじて基質となった3つのシス型ホモログはいずれも2分子の(1)と縮合した。トランス体では C₆(5), C₇(8), C₈(11) となるにつれて、第1の反応に較べて第2の反応が遅くなり、その結果、ゲラニル型の間体の蓄積が目立ってくるが、シス体では、すべて第2の反応が第1の反応より速く、したがっていずれの場合

もゲラニル型の間体の生成は少ない。このことはアリル性ピロリン酸エステルの C-2 位に関するシス構造がこの酵素反応にいちじるしく不利であることを示している。本酵素がトランス型構造をより好むということは次のデータからいえる¹³⁾。すなわち、同じ炭素数からなる異性体について比較するとトランス型構造の寄与の大

表1 アリル性ピロリン酸エステル類の K_m 値

C ₇ 化合物	K _m (μM)	C ₈ 化合物	K _m
(38)	不活性	(40)	不活性
(8)	13	(11)	7
(39)	13	(41)	10
(31)	40	(42)	16
		(34)	22

きいものほど K_m 値が小さく、酵素との親和性が高いことがわかる。しかし、たとえトランス構造の寄与が大きくとも C-3 位に1個しかアルキル基をもたない(38)や(40)は不活性である。下記の(43)~(48)の化合物

はすべて、不活性である¹⁴⁾。したがって天然基質のジメチルアリルピロリン酸(2)は、この酵素反応の基質となるために最小限必要な構造であり、これ以上の簡単な基質はあり得ない。

アルキル基の分岐構造と活性の関係を調べるために、(C)型の化合物がテストされた^{12,15)}、その結果 n=3 と4のものは十分反応性に富

むが、 $n=0$ や 1 のものは極端に活性が低下することから、二重結合の近傍の分岐構造は基質として不都合である。また環状構造のものでも、(49) や (50) は十分な反応性を示し、縮合を 2 回繰返して (52) と (53) をそれぞれ与える。以上のことはカボチャの酵素、ブタ肝臓の

酵素のいずれについてもいえる。しかし (51) になるとブタ肝臓の酵素の基質としては働くが、カボチャの酵素には不活性である。概してブタ肝臓の酵素の方が基質特異性がゆるい¹⁶⁾。

2. イソペンテニルピロリン酸のホモログの酵素反応 アリル性の基質側に関して本酵素はかなりゆるい構造特異性を示したが、その縮合の相手側である非アリル性側の基質に関してはきびしい特異性を示す。この系統の化合物としては (D), (E) および (F) 型のホモログを合成して、ジメチルアリルピロリン酸 (2) およびゲラニルピロリン酸 (3) との酵素的縮合を検討した結果、

いずれの型のホモログの場合も C_6 体のみが基質となり得ることがわかった。すなわち、(1) のホモログとしては (54), (55) および (56) の 3 つの化合物が酵素的に活性であった。(54) の反応は (1) の場合と同じく完全に

トランス型で進み、 C_6 単位ずつ炭素鎖延長反応が起ることが確認された¹⁷⁾。そこで前に述べたように、本酵素

はアリル性基質の構造に関してはかなり広い許容性を示すから、それと組み合わせると、さらに多彩なファルネソールやゲラニオールのホモログを酵素的に合成できる。たとえば、シス-3-メチル-2-ペンテニルピロリン酸 (28) をプライマーとして反応させれば (60) を経て (61)

が生成する。ここで中間体として生ずる (60) にイソペンテニルピロリン酸 (1) を作用させれば、昆虫幼若ホルモンの骨格をもつホモログ (62) を合成することができ

る¹⁸⁾。これはブタ肝臓の farnesyl pyrophosphate synthetase による結果であるが、実際に昆虫において幼若ホルモン骨格が farnesyl pyrophosphate synthetase によって組み立てられるかどうかははっきりわかっていない。しかし、ファルネソール骨格ができてからメチル基のエチル基への変換が起るのではなく、エチル基はプロピオン酸のエチル基に由来するという実験的証拠があるので、この化合物 (54) や (28) が実際に幼若ホルモンの生合成に関与する可能性が指摘されている¹⁹⁾。はじめから (1) と (54) を共存させて (28) とインキュベートすると、(1) の反応性が (54) のそれに勝るため、主生成物は (30) (この骨格のものも幼若ホルモンの 1 種として知られている) となる。

さて、(54) は真の基質 (1) と同じように 100% トランス型の縮合を行なうが、もう 1 つのホモログである (55) は不思議なことに 100% シス縮合を行なう²⁰⁾。すなわち (55) はブタ肝臓の farnesyl pyrophosphate synthetase の触媒で (2) や (3) と反応して、それぞれ (63) と (64) を特異的に与え、それらのトランス異性体はまったく生成しない。この事実は酵素反応機構を考える上でも、また酵素反応の有機合成への応用という見地からものはなはだ興味深い。(55) との縮合による生成物は (1) の場合とは異なり非アリル性エステルとなるので当然予想され

るように縮合はただ1回で停止する。天然基質(1)は縮合の相手が(2)でも(3)でもほとんど同じ速度で縮合するが、ホモログ(55)の場合は(2)+(55)の反応速度は(3)+(55)の反応速度よりもはるかに小さい。このことは前述のアリル性基質ホモログに2つのタイプがあることと考え合わせると、本酵素の活性部位には $C_5 \rightarrow C_{10}$ 反応と $C_{10} \rightarrow C_{15}$ 反応にそれぞれ対応する部位があり、まったく共通の部位で連続的に反応が起るのではないという考えを支持する。このことは基質アナログを用いた阻害実験²¹⁾や $C_5 \rightarrow C_{10}$ 反応の触媒能の選択的不活性化の実験²²⁾からも支持されている。

では、天然基質(1)に1個余分の $-\text{CH}_2-$ が挿入されたために、どうして二重結合の生成に関する立体関係が逆

図2 farnesyl pyrophosphate synthetase の binding site のモデル

転するのだろうか? イソペンテニルピロリン酸分子を把らえる酵素側にメチル基結合部位(M-site)とピロリン酸部を把らえる部位(P-site)を仮定すると都合よく説明がつく。基質のメチル基とピロリン酸部が共にきちんとM-siteとP-siteにそれぞれ収まることにより、少なくともC-C結合生成反応のポイントであるエキソメチレンとプロトンとして脱離するイソペンテニルピロリン酸分子のC-2につくPro RのHが適正な空間位置に保持されることが、基質となりうるための必要条件であるとすると、 $-\text{CH}_2-$ を1個余分にもつホモログ(55)がこの条件にかなうためには、メチレン鎖がもちあがり、シス縮合が起るようなコンホメーションを取らざるを得ない。図3にそのモデルを示す。このようなbindingが可能なのは天然基質よりも $-\text{CH}_2-$ が1個余分な時のみであって、2個以上多くても、また1個少なくても基質として働かない。1個少ないものではメチル基と

図3 farnesyl pyrophosphate synthetase における isopentenyl pyrophosphate の binding site のモデル

OPPの間が短かすぎて、P-siteとM-siteに同時に収まりきれず、また長すぎる時にはその間がbulkyになりすぎて、うまく適合しないと解釈できよう。したがって、この両siteが本酵素のトランス型縮合の特異性を支配しているものと考えられる。(54)がトランス型縮合を行なう理由も同じモデルで説明できる。すなわち、メチル基とOPP基がそれぞれM-siteとP-siteに収まりシス型縮合を受けるようなコンホメーションを取ろうとすると、反応点であるエキソメチレンとC-2の水素は正常な位置から大きくずれるが、トランス型縮合を受けるようなコンホメーションを取ると、やや歪みがかかるが、これらの反応点を正常位置に保持することができる。したがって、トランス型縮合を受けるようなコンホメーションを取って酵素と結合した時のみ反応することができる。いい換えればM-siteにはエチル基をやっと収めるだけの許容性があると考えられる。このM-siteとP-siteの重要性は(65)やオルソリン酸エステル(66)がまったく基質となり得ないことから支持される。

3番目の非アリル性人工基質である(56)は前述の2

つのどれよりも反応性が高い ((54) と比較して最大速度が 2.5 倍, K_m 値が約 1/2 である)。このことは M-site と P-site がぴったり適合すれば, それによって反応点が適正な位置からずれないので, 十分な反応性を示すものと考えられる。(56) はジメチルアリルピロリン酸 (2) とともゲラニルピロリン酸 (3) とほぼ同じ速度で縮合する点でも天然基質 (1) に似ている。この反応では不斉炭素が新生するが, その絶対構造は天然基質の反応の立体化学から類推すると, [S] 配置となるが, 絶対構造の証明はまだなされていない。

III. イソペンテニルピロリン酸とそのホモログの酵素的異性化

prenyltransferase による head-to-tail 縮合に先だって起る生成上での反応はイソペンテニルピロリン酸 (1) の異性化によるプライマー (すなわちジメチルアリルピロリン酸 (2)) の生成である。この異性化を触媒する酵素は isopentenyl pyrophosphate isomerase と呼ばれ, 酵母や動植物から分離されている^{6, 23~25)}。この反応における二重結合の移動の様子は prenyltransferase の場合のそれによく似ており, 両酵素の反応機構の関連性は興味深い。異性化反応においては, イソペンテニルピロリン酸のエキソメチレンにプロトンが付加して, C-2 の pro R の水素が特異的に脱離するが, この際エキソメチレンに由来する新生メチル基は CH_2OPP 基に対してトランスとなる。しかし, この異性化の酵素反応は可逆的であること, およびエキソメチレンへのプロトン付加の方向が

prenyltransferase による縮合反応における C-C 結合生成の方向とは正反対である点で両酵素反応は対照的である。すなわち, 異性化の際に起こるエキソメチレンへのプロトン付加は re-re 面 (紙面上側, (1b)→(2b) 式参照) に起こることが証明されている²⁶⁾。逆反応においてはジメチルアリルピロリン酸の C-2 に立体特異的なプロトン付加が起こり, CH_2OPP 基とトランスの関係にあるメチル基の 3 つの水素のうちからどれか 1 つが脱離する。その結果, この可逆反応を長く繰り返すと, イソペンテニルピロリン酸の C-2 につく pro R の水素とエキソメチレン (C-4) につく 2 つの水素は媒体の水からのプロトンで置き換わり, 一方ジメチルアリルピロリン酸においては CH_2OPP 基とトランスの関係にあるメチル基の水素が結局水からのプロトンで置き換わることになる。重水中でこの異性化反応を行なわせて誘導したジメチルアルコールが NMR の測定から (70) であることが確認されている²⁷⁾。

さて, このような特異性をもつイソペンテニルピロリン酸異性化酵素は修飾基質に対してどのような挙動を示すだろうか? 人工基質 (54) を用いた結果を述べる。

(54) は前述のように prenyltransferase に対しては天然基質と同じように働いたが, isomerase に対しても正常に働くとするれば, シス体 (28) が特異的に生成するはずである。もし, そうであれば前に述べた昆虫の幼若ホルモンの生成との関連においても興味深い。しかし実験の結果は, 意外なことに, 生成物は 3 種類の異性体の混合物であり, その中で非アリル性の (71) の生成量が一番多かった。この反応を詳細に解析した結果, この異常反応は不可逆で, 正常な反応よりはるかに速く, またこの異常反応生成物は正常な立体関係でそのアリル性異性体と可逆的平衡にあることが明らかになった。すなわち, 基質が修飾されたために新しい酵素反応が誘起されたのである。ここで (72) がまったく生成しないことは重要である。

これらの現象は次のように説明できるだろう。この酵素の活性中心部に少なくとも2つの結合部位、メチル基結合部位 (M-site) とピロリン酸部結合部 (P-site) およびプロトンの授受を司る2つのグループ (XとY) があり、図4に示すように可逆的異性化が触媒される。ところが、メチル基がエチル基になったホモログ (54) においては、M-site と M-site にちょうど適合しようとする、図5のIの状態

図4 isopentenyl pyrophosphate isomerase の結合部位モデル²⁷⁾

に示すように、C-2がY基から遠くなり、Y基によるプロトンの引き抜きが起りにくくなるが、代わってエチル基の-CH₂-がYに近くなる。そのために太矢印で示すような異常反応が優勢になる。ここで生じた異性体 (71) は M-site に都合のよい位置にメチル基をもつので、上下転倒して (IV→V) ぴったり適合することができる。この状態ではXとYは正常な位置関係で働きトランス体との間に可逆的異性化 (V⇌VI) が可能となる。一方、(54) の正常反応は異常反応に比べてはるかに遅く、その結果生成するアリル性異性体 (28) はそのトランス体 (5) のようには都合よく適合しないから、I⇌IIの状

図5 修飾基質 (54) の isopentenyl pyrophosphate isomerase による異性化反応機構のモデル²⁷⁾

態で辛うじて反応が起る。

このように、基質類似体を酵素に与えた場合、酵素は本来の基質とまちがえて、類似の反応を触媒するばかりではなく、本来とは異なった新しい反応を触媒することがあるということは、酵素反応機構の研究上のみならず、酵素による有機化合物の合成がより人為的に広く開発される可能性を示すものとして注目しておきたい。

IV. プレニルピロリン酸類の二量化的縮合

イソプレノイド生成における炭素鎖延長のもう1つの様式はいわゆる tail-to-tail 型縮合であり、これには全トランスのファルネシルピロリン酸から C₃₀ のスクワレンの生成と、全トランスのゲラニルゲラニルピロリン酸から C₄₀ のフィトエンの生成の2つの場合が知られている。それぞれ前者はステロイド、トリテルペンへの、後者はカロチノイドへの生合成経路の導入部であること

はいうまでもない。この縮合反応も有機化学的に見てはなはだ興味深い反応であり、昔からいろいろ反応機構について仮説があったが、比較的最近になって Rilling らによってスクワレン生合成の中間体として presqualene pyrophosphate (73) が証明された²⁸⁻³²⁾。(73') がその絶対構造であるとされている³³⁾。

(73) は補酵素 NADPH を存在させないで、(4) を酵素とイソキュベートすると、蓄積する物質で、これをさらに NADPH とともに酵素と処理すると、スクワレン (74) に変換することからこの二量化的縮合は少なくとも、2段階を経る反応で、NADPH はそのうちの後の段階に関与することが示された。またこの中間体(73)は通常の状態でも肝臓の中に見出されている³⁴⁾。反応機構についてはいろいろ議論があるが、たとえば次のようなものが考えられている^{35,36)}。

この酵素は酵母や動物肝臓のミクロゾーム画分に存在するが、可溶化され部分精製がなされており^{37,38)}、(4)→(73)の反応のみを触媒する画分と(4)→(74)の全反応を触媒する画分に分離され得ることが報告されている³⁹⁾。フィトエンの生合成においても丁度(73)に対応するC₄₀の中間体の存在が証明されている^{40,41)}。しかし酵素の精製はスクワレン生合成の場合ほど進んでいない。

スクワレンの酵素的合成における基質特異性は肝臓のミクロゾーム画分を用いて、NADPH の存在下に人工

基質のいくつかが調べられている。この反応の特異性はかなり厳しく、(7) や (30) は効率よくそれぞれ相当するスクワレン類似体を与えるが、R₁ または R₂ がプロピル基のものは基質として働かない⁴²⁾。ファルネシルピロリン酸 (4) と (7) が共存する系でインキュベートすると、スクワレン (74) と (75) のほかに混合型の (77) も

生成する⁴³⁾。またファルネシル基の末端の二重結合はこの反応に必須ではなく、ある適当な長さのアルキル基があればゲラニル型ホモログでも基質となり得ることが示されている⁴⁴⁾。(15) のホモログである R=n-C₅H₉ や

R=n-C₅H₁₁ のものは反応しないことから鎖の長さに厳しい制限があることがわかる。

V. 2,3-オキシドスクワレン誘導体の閉環反応

スクワレンからラノステロールへの変換は早くから有機化学者の興味を引いた代表的な酵素反応であるが、2,3-オキシドスクワレンがその変換反応の中間体であることが実証されて^{45,46)}以来、特に有機化学見地からの研究が活発になった。すなわち基質の構造と酵素反応の関係が研究されるとともに、非酵素的閉環反応の研究が行なわれ、生合成類似の有機合成の研究に寄与した。酵素化学的研究の方も、これをきっかけとして進展した。かつてはスクワレン→ラノステロールの変換に与る酵素とし

て squalene-lanosterol oxidocyclase とばく然と呼んでいたが、明らかに異なる2つの酵素すなわち squalene epoxidase と 2,3-oxidosqualene cyclase が関与していることが明らかになった。

この反応はいままでもなく立体特異的に起こる。(81)→(82)の変換における中間体は把えられていない。反応の立体過程は Ruzicka らの考えで⁴⁷⁾よく説明され、この機構は今までのあらゆる実験事実を満足している。しかし、この全過程が果して一挙に協奏的に起こるのか、それとも途中に安定な中間体が存在するのかについてはいろいろ議論がある。

また、2,3-オキシドスクワレンは (82) のみならず、シクロアルテノール (83)⁴⁸⁾、 β -アミリン (84)^{49,50)} やプロトステロール型の基本体である (85)⁵¹⁾ へも酵素的に変換することが知られているが、これらへの環化の酵素反応は互いにどんな関係にあるのかは興味深い問題である。

では、これらの問題に関して人工基質を用いた酵素反応の研究がどこまで知見を与えてくれるだろうか？ 以下述べる研究のほとんどは Tamelen グループ (スタンフォード大学) と Corey グループ (ハーバード大学) によりなされたものである。

1. 天然基質と同じように反応する人工基質⁵²⁻⁵⁵⁾

二重結合の移動に直接関係しないスクワレン-2,3-エポキシドの末端部の構造の修飾はラノステロール型骨格への環化に影響を与えない。すなわち、(86)でRを種々の置換基に変えたものを作り、それらを肝臓のミクロゾーム酵素とインキュベートすると、それぞれ対応するラノステロール誘導体が合成された。これらの末端部の構造修飾により基質としての反応性は必ずしも低下するとは限らず、たとえば (92) はラノステロール自身よりも収率よく生成することが報告されている⁵⁵⁾。

2. プロトステロール型骨格までの閉環を受ける基質——環化と転移の分離 前述の例においては閉環、水素およびメチル基の移動、脱プロトンによる二重結合の生成に至るすべての過程が真の基質の場合とまったく同じように起ったが、次の例にみるように (20), (21) に二重結合を導入して共役系を作ると、環形成までは正常に起こるが、それに続く水素とメチル基の移動は起らないで (94) のような化合物 (*印の炭素の1つに

OH 基がついたもの) を与えることが示された⁵⁶⁾。これは環化の結果生じたカルボニウムイオンが共役系の存在のために安定化し、続いて転移するにはエネルギー的に不十分であり、 $-\text{OH}$ の攻撃を受けて反応が終結したものと解釈される。すなわち、一寸した基質の構造の修飾によって、この cyclase による反応過程を途中で止めることができたと思倣することができる。このことは、ラノステロールは (95) のようなカチオンまたはそれと等価なもの ($\oplus$ のところに求核性基のついたもの) を経て生

成することを示すものとして興味深い実験である。そういう意味で (95) の型のものをプロステロールと呼ぶが、fusidic acid や helvolic acid などはこの骨格のまま導かれるものと考えられる。(95) の状態が転移を伴わずに中和されて安定化するか、転移を伴ってラノステロールやシクロアルテノールにまで進んで安定化するかは、それぞれ対応する酵素の特性に依存するものと考えられるが、その差異の本質はわかっていない。(95) に等価な状態まで導く酵素とそれを転移させてラノステロール型に導く酵素があり、後者が抑制されると、プロトステロールが生成することになるのか、それとも環化と転移は1つの酵素により触媒され、

それと独立して 2,3-オキシドスクワレンからプロトステロールへの環化を触媒する酵素が存在するのかといった問題は今後の研究にまたれる。

プロトステロール型の環化で反応が停止するような基質修飾は次の場合にも見出されている。スクワレンの10位と15位のメチル基を両方水素に変えたものは二重結合はそのままでも環化のみで転移は起らない⁵⁷⁾。しかし、10位または15位のいずれか一方のメチル基1個のみを欠いたものではどちらも環化後の転位が起りラノステロール型の生成物を与える^{58,59)}。したがって、環化後において、これらのメチル基による反発力が続いて起る転位の原動力になっているものと考えられる。

3. 縮環の立体化学が変わる基質 2,3-オキシドスクワレンの6位のメチル基を水素に変えたもの (102) は環化、転位がともに起るが^{60,61)}、この際、A/B トランス体と A/B シス体が 1:3 の割合で生成することが見出されている⁶¹⁾。

4. 環化過程に異常をもたらす基質 スクワレンの中央部の二重結合はステロイド環系が形成するのに必須であるから、これらを飽和にすれば、環化過程に重大な影響が現われることは当然予期される、事実 10,11-ジ

ヒドロ体 (105) も 14, 15-ジヒドロ体 (106) も基質として働かない⁶²⁾。すなわちA環のみあるいはAB環のみが形成されるというような反応は起らない。ところが, 18, 19-ジヒドロ体 (107) は酵素的に活性で3環性の生成物を与える。しかし, この場合C環は5員環となる⁶³⁾。こ

れは有機化学的にみて期待される結果である。なぜならば, この環化によって生ずる中間体としては電荷が2級炭素上にある (109) よりも3級炭素上にある (110) の方が安定で生成しやすいと考えられるからである。事実 (107) を非酵素的に Lewis 酸と処理すると, 立体構造は異なるが (108) と同じ骨格をもつ異性体の混合物を与えることが知られている⁶³⁾。

天然基質である 2,3-オキドスクワレンの環化による 6-6-5 員環の縮環系の生成をみると, エポキシ環の開裂に始まり, A, B, D 環のいずれもが, その形成に際して3級炭素にカチオンを残す方向に閉環が起こっているが, C環のみが2級炭素に電荷を残す方向に閉環している点に注目されたい。ちなみに 2,3-オキドスクワレンを非酵素的に酸処理して得られるものは 6-6-5 員環系

の (111) と (112) である。ところが, 全トランスのゲラ

ニルゲラニル系について同様の非酵素的酸処理を行なうと, 3環性縮環体が得られるが, この場合はC環も6員環となる (113→114)⁶⁴⁾。すなわち, 非酵素的反応においてはすべて3級カチオンの生成する方向に縮環が進むことを示している。非酵素的環化においては 2,3-オキドスクワレンの 18, 19 二重結合の有無にかかわらず,

生成物は 6-6-5 員環系であるが, 酵素反応においてはこの 18, 19 二重結合は明らかに重要な役割を果しているといえる。このことのもつ意味ははなはだ興味深い。2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase による 18, 19-ジヒドロ体 (107) の (108) への変換が, 前述の isopentenyl pyrophosphate isomerase や prenyltransferase の人工基質による研究例で見られたような基質修飾によるみ誘発された異常反応の結果なのか, それとも正常な反応の途中で反応が止むなく停止した結果と見なし得るものなのかは明らかではないが, もし後者であれば, 2,3-オキドスクワレンのラノステロールへの酵素的変換に対して, もう1つの機構を暗示することになる。van Tamelen はこれに対して次のような反応機構を提出し

ている⁶⁵⁾。すなわち、環形成は3級カチオンを生ずる方向に起るという原則で、まずC環が5員環の三環性の中間体を生じ、これから 1) 水素移動、2) C-C 結合 (3級カチオン生成の方向)、3) 1,2 水素移動によりスピロ型中間体になる。これに再度 1,3 水素移動と C-C 結合の組み替えを考えると、以後 Ruzicka らの協奏的機構と同じようにラノステロールに導かれる。まわりくどい機構であるが、これも今までのラベリングの実験と矛盾しない。

5. 部分的に環化させた 2,3-オキシドスクワレンの酵素反応と非酵素反応 これまでの知見を応用して非酵素的に 6-6-6-5 員環縮環系を作るための基質として、Tamelen らは次のような部分的に環化させたものを考え、これについて酵素的、非酵素的の環化反応を研究⁶⁶⁾した。

した^{66~68)}。その結果次のような興味深い知見が得られた。ここで注目したいことは、変換率は低い(天然基質の場合の 1/30 以下)、(115) と (116) は酵素的に活性であり、非酵素反応の場合とは明らかに異なった生成物を与えることである⁶⁶⁾。すなわち酵素反応生成物の方は完全にラノステロール型であるが、非酵素的反応においては閉環に次ぐメチル基転移が起らない。また 2 個しか二重結合を含まない (116) が酵素的に閉環することは、前述の 14,15-ジヒドロ体 (106) が酵素的に不活性であることと 考え合わせると興味深い。しかし、(115) や (116) がラノステロール型化合物へ酵素的に変換するからといって、2,3-オキシドスクワレンがラノステロールに閉環する際にこのような部分的に環化したものが中間体になるというわけではなく、(115) や (116) は、たまたまこの酵素の基質特異性の許容範囲に入ったあくまでも人工基質とみるべきである。

いままで述べてきた人工基質の研究はすべて 2,3-オキシドスクワレンをラノステロールに環化させる酵素

(肝臓) についてのものであるが、 β -アミリンへの環化を触媒する酵素 (マメの芽からの粗酵素) についても同様に部分環化させた人工基質 (121) を作用させ、低収率ではあるが β -アミリンの生成を確認した実験がある⁶⁹⁾。

6. エポキシ環周辺の修飾 エポキシ環の近傍に関しては特異性がいちじるしく、テストされた 7 種類のうち、(123) と (125) のみが活性であった^{70~72)}。そのほ

か、2,3-オキシドスクワレンの酸素原子を S や NH で置

換えたものも試験されたが、これらはいずれも基質としては働かないが、cyclase の強い阻害剤として働くことが示されている⁷³⁾。またエポキシ環を開裂してグリコールにしたものやモノヒドロキシ体にしたものも基質とならない⁶⁵⁾。これらの基質特異性を含めて、squalen epoxidase と cyclase についての解説⁷⁴⁾ がなされているので参照されたい。

VI. おわりに

人工基質を用いた酵素反応の研究をイソプレノイドの生合成に関与するいくつかの酵素について概略述べた。本来の基質の構造を変化させてゆくと、それに応じて酵素はさまざまな挙動を示す。これらの基質アナログを大別すると、1) 本来の基質とすっかり同じように反応するもの、2) 本来の基質とは異なった新しい反応を起すもの、3) 基質としては働かないが、阻害作用を示すもの、4) 基質にも阻害剤にもならないものなどである。いずれも酵素反応機構の研究には重要であるが、とくに2) の場合は天然基質では得られない貴重な知見を与えることが多い。また、酵素反応を有機合成に広く応用するという見地からも興味深い。基質が何であれともかく酵素反応は水を溶媒として中性付近で、20~40°C の程度の温度でスムーズに進行するという点では操作上安全かつ容易である。しかし、これを大量の合成法として実用化するにはまだまだ問題が多い。なかでも酵素の不安定性による問題が大きい。酵素を固定化(不溶化)して安定に保ち、再利用を可能にすれば、実用性は飛躍的に増大するであろう。ある種の酵素についてはすでに開発されている。さらには、酵素側の修飾による触媒能の人為的改良もありうるだろう。いずれにしても酵素を有機合成に取り入れようとする研究は酵素様機能を持つ触媒の開発や新しい合成反応の開発研究と互いにヒントを与え合いながら、広い意味での有機合成の発展をもたらすものと期待する次第である。

本稿中の筆者らの研究は東北大学非水溶液化学研究所瀬戸秀一教授のもとで西野徳三、古山種俊両博士ならびに新家敏弘、斎藤昭夫両修士との共同で行なわれたものであり、各位に心から謝意を表します。

(昭和49年10月24日受理)

文 献

- 山田秀明, 有機化 **32** 259 (1974)
- 千畑一郎, *ibid.* **32** 286 (1974)
- F. Lynen, B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, E.M. Müslein, *Angew. Chem.* **71** 657 (1959)
- J.K. Dorsey, J.A. Dorsey, J.W. Porter, *J. Biol. Chem.* **241** 5353 (1966)
- P.W. Holloway, G. Popják, *Biochem. J.* **104** 57 (1967)
- K. Ogura, T. Nishino, S. Seto, *J. Biochem.* **64** 197 (1968)
- A.A. Kandutsch, H. Paulus, E. Levin, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **239** 2507 (1964)
- K. Ogura, T. Shinka, S. Seto, *J. Biochem.* **72** 1101 (1972)
- J.W. Cornforth, R.H. Cornforth, C. Donninger, G. Popják, *Proc. Roy. Soc. (B)* **163** 492 (1966)
- J.W. Cornforth, R.H. Cornforth, G. Popják, L. Yengoyan, *J. Biol. Chem.* **241** 3970 (1966)
- K. Ogura, T. Nishino, T. Koyama, S. Seto, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 6036 (1970)
- T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *J. Amer. Chem. Soc.* **94** 6849 (1972)
- T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *Biochim. Biophys. Acta* **235** 322 (1971)
- G. Popják, J.L. Rabinowitz, J.M. Baron, *Biochem. J.* **113** 861 (1969)
- G. Popják, P.W. Holloway, J.M. Baron, *Biochem. J.* **111** 325 (1969)
- T. Nishino, K. Ogura, S. Seto, *Biochem. Biophys. Acta* **302** 33 (1973)
- K. Ogura, T. Koyama, S. Seto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972** 881
- T. Koyama, K. Ogura, S. Seto, *Chem. Lett.* **1973** 401
- D.A. Schooley, K.D. Judy, B.J. Bergot, M.S. Hall, J.D. Siddal, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70** 2921 (1973)
- K. Ogura, A. Saito, S. Seto, *J. Amer. Chem. Soc.* **96** 4037 (1974)
- K. Ogura, T. Koyama, T. Shibuya, T. Nishino, S. Seto, *J. Biochem.* **66** 117 (1969)
- K. Ogura, T. Koyama, S. Seto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35** 875 (1969)
- B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, F. Lynen, *J. Biol. Chem.* **235** 326 (1960)
- D.H. Shah, W.W. Cleland, J.W. Porter, *J. Biol. Chem.* **240** 1946 (1965)
- P.W. Holloway, G. Popják, *Biochem. J.* **103** 835 (1968)
- J.W. Cornforth, K. Clifford, R. Mallaby, G.T. Phillips, *Proc. Roy. Soc. (B)* **182** 277 (1972)
- T. Koyama, K. Ogura, S. Seto, *J. Biol. Chem.* **248** 8043 (1973)
- W.W. Epstein, H.C. Rilling, *J. Biol. Chem.* **245** 4597 (1970)
- J. Edmond, G. Popják, S.M. Wong, V.P. Williams, *J. Biol. Chem.* **246** 6254 (1971)
- R.V.M. Campbell, L. Crombie, G. Pattenden, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971** 218

- 31) L.J. Altman, D.C. Kowerski, H. Rilling, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 1782 (1971)
- 32) R.M. Coates, W.H. Robinson, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 1785 (1971)
- 33) G. Popják, J. Edmond, S.M. Wong, *J. Amer. Chem. Soc.* **95** 2713 (1973)
- 34) F. Muscio, J.P. Carlson, L. Kuehl, H.C. Rilling, *J. Biol. Chem.* **249** 3746 (1974)
- 35) E.E. van Tamelen, M.A. Schwartz, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 1780 (1971)
- 36) H.C. Rilling, C.D. Poulter, W.W. Epstein, B. Larsen, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 1783 (1971)
- 37) G. Krishna, W. Witlock, D.H. Feldbruegge, J.W. Porter, *Arch. Biochem. Biophys.* **114** 200 (1966)
- 38) I. Shechter, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **246** 7690 (1971)
- 39) A.A. Qureshi, E.D. Beytia, J.W. Porter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48** 1123 (1972)
- 40) L.J. Altman, L. Ash, R.C. Kowerski, W.W. Epstein, B.R. Larsen, H.C. Rilling, F. Muscio, D.E. Gregonis, *J. Amer. Chem. Soc.* **94** 3257 (1972)
- 41) A.A. Qureshi, F.J. Barnes, E.J. Semmlar, J.W. Porter, *J. Biol. Chem.* **248** 2755 (1973)
- 42) K. Ogura, T. Koyama, S. Seto, *J. Amer. Chem. Soc.* **94** 307 (1972)
- 43) A. Polto, G. Popják, T. Parker, *J. Biol. Chem.* **247** 3464 (1972)
- 44) T. Koyama, K. Ogura, S. Seto, *Chem. Lett.* **1974** 529
- 45) E.J. Corey, W.E. Russey, P.R. Ortiz de Montellano, *J. Amer. Chem. Soc.* **88** 4750 (1966)
- 46) E.E. van Tamelen, J.D. Willett, R.B. Clayton, K.E. Lord, *J. Amer. Chem. Soc.* **88** 4752 (1966)
- 47) A. Eschemoser, L. Ruzicka, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **38** 1890 (1955)
- 48) H.H. Rees, L.J. Goad, T.W. Goodwin, *Tetrahedron Lett.* **1968** 723
- 49) E.J. Corey, P.R. Ortiz de Montellano, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 3362 (1967)
- 50) D.H.R. Barton, G. Mellows, D.A. Widdowson, J.J. Wright, *J. Chem. Soc. (C)* **1971** 1142
- 51) A. Kawaguchi, H. Kobayashi, S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* **21** 577 (1973)
- 52) E.E. van Tamelen, K.S. Sharpless, J.D. Willet, R.B. Clayton, A.L.B. Burlingame, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 3920 (1967)
- 53) E.J. Corey, S.K. Gross, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 4561 (1967)
- 54) R.J. Anderson, R.P. Hanzlik, K.B. Sharpless, E.E. van Tamelen, R.B. Clayton, *Chem. Commun.* **1969** 53
- 55) T. Shishibori, T. Fukui, T. Suga, *Chem. Lett.* **1973** 1289
- 56) E.J. Corey, K. Lin, H. Yamamoto, *J. Amer. Chem. Soc.* **91** 2132 (1969)
- 57) E.J. Corey, P.R. Ortiz de Montellano, H. Yamamoto, *J. Amer. Chem. Soc.* **90** 6254 (1968)
- 58) E.E. van Tamelen, R.P. Hanzlik, K.B. Sharpless, R.B. Clayton, W.J. Richter, A.L. Burlingame, *J. Amer. Chem. Soc.* **90** 3284 (1968)
- 59) E.E. van Tamelen, R.P. Hanzlik, R.B. Clayton, A.L. Burlingame, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 2137 (1970)
- 60) E.J. Corey, A. Krief, H. Yamamoto, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 1493 (1971)
- 61) E.E. van Tamelen, J.A. Smaal, R.B. Clayton, *J. Amer. Chem. Soc.* **93** 5279 (1971)
- 62) E.J. Corey, W.E. Russey, *J. Amer. Chem. Soc.* **88** 4751 (1966)
- 63) E.E. van Tamelen, K.B. Sharpless, R. Hanzlik, R.B. Clayton, A.L. Burlingame, P.C. Wszolek, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 7150 (1967)
- 64) E.E. van Tamelen, R.G. Nadeau, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 176 (1967)
- 65) E.E. van Tamelen, J.D. Willett, R.B. Clayton, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 3371 (1967)
- 66) E.E. van Tamelen, J.H. Freed, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 7206 (1970)
- 67) E.E. van Tamelen, G.M. Milne, M.I. Suffness, M.C. Rudler, R.J. Anderson, R.S. Achini, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 7202 (1970)
- 68) E.E. van Tamelen, J.W. Murphy, *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 7204 (1970)
- 69) H. Horan, J.P. McCormick, D. Arigoni, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973** 73
- 70) E.J. Corey, K. Lin, M. Jautet, *J. Amer. Chem. Soc.* **90** 2724 (1968)
- 71) R.B. Clayton, E.E. van Tamelen, R.G. Nadeau, *J. Amer. Chem. Soc.* **90** 820 (1968)
- 72) L.O. Crosby, E.E. van Tamelen, R.B. Clayton, *Chem. Commun.* **1969** 532
- 73) E.J. Corey, P.R. Ortiz de Montellano, K. Lin, P.D.G. Dean, *J. Amer. Chem. Soc.* **89** 2797 (1967)
- 74) 山本尚三, 蛋白質核酸酵素 **15** 4 (1970)