

# 超天然型新規ステロイド骨格の創出

## Engineered Biosynthesis of Unnatural Novel Steroids

(日本薬学会推薦)

代表研究者 東京大学 阿部 郁朗 The University of Tokyo Ikuro ABE

The broad substrate tolerance and catalytic potential of squalene cyclizing enzymes of bacterial and plant origin are remarkable; the enzymes readily accept variety of non-physiological substrate analogues and efficiently perform sequential ring-forming reactions to produce a series of unnatural cyclic triterpenes. By utilizing the catalytic plasticity of the enzymes, it is possible to generate unnatural novel cyclic polyprenoids by enzymatic conversion of chemically synthesized substrate analogues. Here we present recent examples including enzymatic formation of a “supra-natural” hexacyclic polyprenoid as well as heteroaromatic ring containing cyclic polyprenoids by bacterial squalene: hopene cyclase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

### 研究目的

今後の医薬資源の開発について考えた場合、多様性に富む化合物群をいかに効率良く生産し、創薬シードとして提供できるか、が鍵になる。二次代謝酵素の中には、微妙な構造の違いで基質特異性や生成物の構造が大きく変化するものがあり、これが天然物の分子多様性を生み出す大きな要因になっている。それ故、我々は、二次代謝産物の基本骨格構築を担う生合成鍵酵素の研究が、多様な構造と生理活性を示す天然物に匹敵するライブラリー構築に結実し、将来の創薬化学に必ずや貢献するものと信じ、酵素触媒機能の拡張による非天然型新規化合物の創出と、セレンディピティに頼らない合理的な方法論の開発に取り組んでいる。

本研究では、酵素触媒機能の人為的な制御と分子多様性創出の格好のモデル

ともいえる、ステロイドやトリテルペンの基本骨格を構築するスクアレン環化酵素 (SC) をとりあげる。ポリエンの環化により複数の炭素 - 炭素結合と、複数の不斉中心を一挙に構築する反応は、自然界における最も複雑な反応のひとつであり、有機合成化学の技術が格段に進歩した今日においても、酵素のみが唯一効率的に行うことが可能な反応として、半世紀以上にわたって多くの有機化学者を魅了し続けてきた。我々は、スクアレン環化酵素に、化学合成した基質アナログプローブとして作用させることにより、新たな酵素触媒機能の開拓と分子多様性の創出をめざした。即ち、本来 5 環性トリテルペンを産生する微生物由来スクアレン環化酵素に、C<sub>40</sub>、C<sub>45</sub> など鎖長の異なる人工基質や、芳香環・複素環を導入した一連の人工基質を化学的に合成し、これを作用させることにより、これまでに例のない新規骨格を有する一群の非天然型化合物の人為的な創出を試みた。

## 研究経過

### (1) 高度な環構造を有する非天然型ステロイドの創出

中等度好熱好酸菌 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来ホペン合成酵素は、これまでに最もよく研究がなされている SC 酵素である (Fig.1A)。高等動物や植物由来 OSC 酵素とは違って、組み替え酵素を大腸菌において大量発現させることが可能で、しかも比較的安定で取り扱いの容易な膜酵素である。既に X 線結晶構造解析が報告されており、酵素活性部位を構成するアミノ酸残基や酵素反応機構の詳細などが明らかにされている。結晶構造に基づけば、中心部の大きな活性部位キャビティには、鎖長の異なる基質アナログを受け入れるだけの十分なスペースがあるものと予想され、従って、天然型基質の場合と同様な酵素反応の進行が予想される一方で、修飾基質の構造に対応して、酵素活性部位におけるフォールディング・コンフォメーションが影響を受け、在来見られないような骨格をもった生成物を与える可能性も期待される。そこで我々は、C<sub>35</sub>、C<sub>40</sub> など鎖長の異なる一連の基質アナログを化学合成し、酵素に作用させることによって、天然には存在しないような 6 環或いは 7 環といった、高度な環構造を有する「超天然型ステロイド」の人為的な生産を試みた。

基質の合成は、文献記載の方法に基づき、ゲラニオール (C<sub>10</sub>)、ファルネソール (C<sub>15</sub>)、ゲラニルゲラニルオール (C<sub>20</sub>) などを原料としてカップリング反応を行うことにより、非天然型の C<sub>25</sub> (= C<sub>15</sub> + C<sub>20</sub>)、C<sub>30</sub> (= C<sub>10</sub> + C<sub>20</sub>)、C<sub>35</sub> (= C<sub>15</sub> + C<sub>20</sub>)、

C<sub>40</sub> (= C<sub>20</sub> + C<sub>20</sub>) アナログを合成した。これを大腸菌において大量発現させ精製した *A. acidocaldarius* 由来ホペン合成酵素 (SHC) に作用させ、酵素反応生成物を有機溶媒で抽出、TLC や逆相 HPLC により分離精製の後、各種 NMR や MS スペクトルなどを測定して構造解析を行った。

これまでに、イソプレン単位が 3 + 4 の形で連結した C<sub>35</sub> (= C<sub>15</sub> + C<sub>20</sub>) アナログを作用させた場合、6/6/6/6/5 環構造を有する 6 環性の非天然型新規化合物 (収率 10%) が、単一生成物として得られることを見出している (Fig.1B)。しかも驚いたことに、閉環反応の立体化学は酵素によって厳密に制御されており、6 個の炭素 - 炭素結合と 11 個の不斉中心を一挙に構築する。即ち、酵素反応は本来の基質であるスクアレン (C<sub>30</sub> = C<sub>15</sub> + C<sub>15</sub>) の場合と同様に、C<sub>15</sub> ファルネシル単位の側から進行する。これに対して、反対側の C<sub>20</sub> ゲラニルゲラニル単位の側から環化が進行した場合には、C 環形成の段階で 14 位のメチル基が  $\beta$  の配置をとることになり、立体障害により閉環反応の進行が妨げられてしまう。次に、フォールディングについてみると、酵素反応生成物の 22 位のメチル基が  $\beta$ -axial、25 位のイソプロペニル基が  $\alpha$ -axial の配置をとることから、基質が *chair-chair-chair-chair-boat-boat* 型のコンフォメーションをとって反応が進行しなければならない。また、反応は本来の生成物であるホペンの場合と同様に、炭素骨格の転位を伴わず、最終的に H-27 プロトンが特異的に引き抜かれて二重結合を形成して終結する。このような炭素数が 5 つも多い人工基質に対してさえも、炭素鎖の末端に至るまで、閉環反応の立体化学が酵素によって厳密に制御されている点は特筆に値する。

一方、C<sub>35</sub> アナログこれに対して、C<sub>15</sub> ファルネシル単位を含まない C<sub>30</sub> (= C<sub>10</sub> + C<sub>20</sub>) や C<sub>40</sub> (= C<sub>20</sub> + C<sub>20</sub>) アナログからは、2 環性の閉環生成物が得られるのみで、多環形成反応の進行はみられなかった。このことから、*A. acidocaldarius* 由来 SHC による 3 環以上の高度な環形成反応が進行するためには、C 環形成の段階で核間 *pro*-C14 メチル基が  $\alpha$  配置をとる必要があり、従って基質における C<sub>15</sub> ファルネシル単位の存在が重要であることが示唆された。

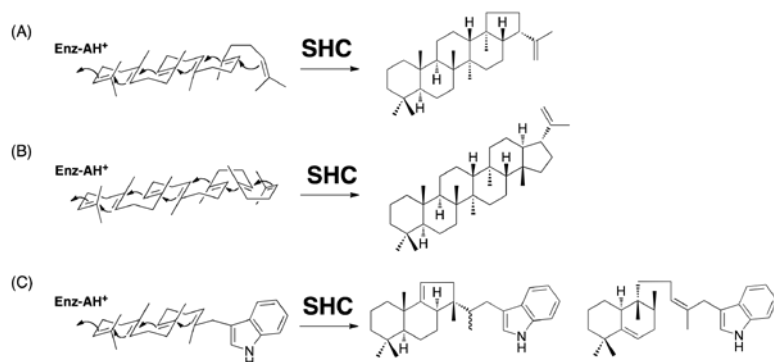


Fig. 1 Enzymatic cyclization of (A) squalene, (B) a C<sub>35</sub> analogue, and (C) indole-containing analogue by *A. acidocaldarius* SHC.

## (2) ヘテロ芳香環含有非天然型ステロイドの創出

次に我々は、より多くの生理活性が期待出来る、ヘテロ芳香環を部分構造にもつ非天然型ステロイドの生産をめざして、インドール環を含有する 2 つの基質アナログ 3 - (geranylgeranyl)indole と 3 - (farnesyltrimethylallyl)indole を新たに合成して、*A. acidocaldarius* 由来 SHC を用いた酵素変換を試みた。しかし、酵素は基質として全く受け入れなかった。上述したように、*A. acidocaldarius* 由来 SHC による 3 環以上の環形成反応が進行するためには、やはり C<sub>15</sub> ファルネシル単位の存在が不可欠であることが改めて示唆された。結晶構造に基づくホペンの C 環及び D 環部分近傍に位置する、立体的に嵩高い、活性中心キャビティ構成アミノ酸残基 Ile261 の存在による立体障害がその原因として推察される。

一方、イソプレン単位が 3+1 の形で連結した基質からは、6/6/5 環構造を有する 3 環性のインドール含有非天然型新規化合物が主生成物 (収率 5%) として、また、6/6 環構造を有する 2 環性の新規化合物が副生成物 (収率 3%) として得られた (Fig.1C)。この場合、閉環反応は基質が *chair-chair-chair* 型のコンフォメーションをとって進行し、立体的に嵩高い、電子過剰な、インドール環の存在により、3 環性、あるいは、2 環性カチオン中間体が生成した段階で多環形成反応が中断してしまうものと考えられる。両者の場合とも、一連の転位反応の立体化学とプロトンの引き抜きは、やはり酵素によって厳密に制御されている。

同様な結果が、ピロールを含有する合成基質、2 - (geranylgeranyl)pyrrole と 2 - (farnesyltrimethylallyl)pyrrole を用いた酵素変換実験でも得られた。C<sub>20</sub> グラニルゲラニル単位が結合したアナログが *A. acidocaldarius* 由来 SHC の基質として受け入れなかったのに対して、後者の C<sub>15</sub> ファルネシル単位を含む基質からは、6/6/5

環構造を有する3環性のピロール含有非天然型新規化合物が主生成物(収率1%)として、また、6/6環構造を有する2環性の新規化合物が副生成物(収率0.1%)として得られた。ここでピロール含有生成物の酵素反応収率は、インドールの場合に比べて20%程度に減少しているが、これは立体的にサイズの大きい、 $\pi$ 電子に富むインドールのほうが、より小さなピロールに比べて、酵素活性中心キャビティを構成するアミノ酸残基との間の $\pi$ - $\pi$ 電子相互作用などにより、活性部位によりよく適合して、高い親和性を示すことによるものと考えられた。

## 考察

微生物由来スクアレン環化酵素が示す広範な基質特異性と触媒ポテンシャルには特筆に値する。今後さらに新たに設計した合成人工基質の酵素変換とともに、結晶構造に基づく合理的な変異の導入による酵素触媒機能の拡張により、これまで以上の分子多様性と新たな生物活性を備えた「超天然型」化合物ライブラリーの構築が可能になる。ステロイドホルモンやビタミン、サポニンや強心配糖体、さらにフシジン酸など抗生物質を例に挙げるまでもなく、クアレン環化酵素の反応生成物及びその代謝産物は、その多様な構造および生物活性から、これまで実際に医薬品、農薬、食品添加物などに幅広く応用されているが、今後益々その重要性が増し、新たな展開がみられるものと期待される。

最後に、これら生合成酵素が触媒する反応は、有機合成の技術が格段に進歩した今日にあっても、酵素のみが唯一効率よく行うことの可能なものである。クリーンかつマイルドな条件下、驚くほど単純な工程で、複雑な分子骨格を作り上げることができる。保護・脱保護あるいは官能基変換の繰り返しを必要としない、生体触媒を用いた合成法の利点は計り知れないものがあり、次世代の環境調和型の新合成手法の発展に必ずや大きな貢献をするものと期待される。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 阿部郁朗 ; 「天然物の生合成工学に関する研究」、第128回日本薬学会年会(横浜、2008)
2. 阿部郁朗 ; 「天然薬物の生合成工学」、第129回日本薬学会年会(京都、2009)
3. 阿部郁朗 ; 「酵素の機能制御と超天然型生体触媒の創製」、第2回有機触媒

シンポジウム（京都、2009）

4. 阿部郁朗；「二次代謝酵素の機能制御と生合成工学」、早稲田大学総合研究機構ケミカルバイオロジー研究所シンポジウム（東京、2009）
5. 阿部郁朗；「酵素機能の制御と超天然型新規生体触媒の創製」、第130回日本薬学会年会（岡山、2010）
6. 阿部郁朗；「二次代謝酵素の機能制御と生合成工学」、日本化学会第90春期年会（大阪、2010）
7. 阿部郁朗；「酵素機能の制御と超天然型新規生体触媒の創製」、日本農芸化学会2010年度大会（東京、2010）

誌上発表

1. Ikuro Abe; "Enzymatic Synthesis of Cyclic Triterpenes". *Nat. Prod. Rep.* 24, 1311-1331 (2007).
2. Ikuro Abe; "Bacterial Squalene Cyclase", In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology, Vol. 1*, L. Mander, H.-W. Liu, eds., Elsevier, Oxford, in press (2010).
3. Tetsuo Kushiro, Ikuro Abe; "Enzymatic Synthesis of Cyclic Triterpenes", In *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*, Nova Publishers, in press (2010)
4. Miki Kimura, Tetsuo Kushiro, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka, Ikuro Abe; "Protostadienol Synthase from *Aspergillus fumigatus*: Functional Conversion into Lanosterol Synthase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 899-902 (2010).