中・大員環生物活性ジテルペンの酵素的全合成研究

Synthetic study of biologically active macrocyclic diterpenes with biosynthetic enzymes

（日本農芸化学会推薦）

代表研究者	北海道大学	及川英秋	Hokkaido University	Hideaki Oikawa
協同研究者	北海道大学	伊藤浩之	Hokkaido University	Hiroyuki Ito
	茨城大学	戸嶋浩明	Ibaraki University	Hiroaki Toshima

The stereochemical course of GGDP cyclization in biosynthesis of phomactins is proposed by the stereochemistry of a cyclization product, phomacta-1(14),3,7-triene, isolated from *Phoma sp.* and the results of incorporation experiments with [1-^{13}C]- and [1,2-^{13}C] acetates. This stereospecific rearrangement suggests that the cyclization of GGDP toward verticillen-12-yl cation proceeds through a boat-form transition state. Isolation of series of phomactatriene derivatives from mycelial extracts of the phomactin-producing fungus indicated involvement of verticilen-12-yl cation. Quantum mechanic methods (MOPAC 6.0) proposed involvement of the related cationic intermediates, verticilen-11-yl, 8-yl and 4-yl cations which would afford phomactatriene, taxadiene and verticillatriene, respectively. To elucidate a detailed reaction mechanism of macrocyclic formation by diterpene synthase, non-enzymatic reaction of verticilen-12-yl cation was conducted. Treatment of verticillol with BF_3•(OEt_2) afforded phomacta-1(15),3,7- triene and taxadiene. These experimental results provide further evidence on involvement of three cationic intermediates which are predicted by MOPAC calculation.

研究目的

従来天然より有用な生物活性物質が単離された場合、これを合成する手段は化学合成をおいて他に方法はなかった。しかし最近の遺伝子工学的手法により、目的天然物の生合成に関わる遺伝子および酵素が入手可能になってきた。化学合成では多工程を要する場合大量供給は困難なため、環境に優しい酵素合成法には大きな魅力がある。我々は既に DNA polymerase αの特異的阻害剤として知られるジテルペンの全生合成遺伝子の取得に成功するとともに、炭素骨格合成に関する環化酵素の反応機構に関して詳細な知見を得た。この成果を生かし、今回化学合成では効率の良い合成法の開発が困難な大員環テルペン phomactin B (**1**)を研究対象に選び、それらの酵素的合成に関する基礎的知見を得ることにした。Phomactin B は *Phoma* 属菌から血小板活性化因子（PAF）アンタゴニストとして単離されたジテルペンで喘息、腎炎などの予防治療用薬剤となる可能性が指摘されている。本化合物の合成で鍵となる骨格合成酵素の反応機構に関して検討を行った。

研究経過と考察

1. 生合成前駆体 phomactatriene 骨格合成の反応経路

Phomactin B (**1**)は geranylgeranyl diphosphate (GGDP)が環化して phomactatriene (**2**, Sch49026) に変換された後、種々の酸化的変換を受けて生合成されるはずである。そこでまず既知化合物 **2** の相対配置を詳細な NOE 実験データに基づき訂正した後、各種 ^{13}C-標識酢酸の取り込み実験を行なった。[1,2-^{13}C]-酢酸による標識パターン（Fig. 1）から環化酵素（phomactatriene 合成酵素）の活性部位内で GGDP が 12 員環を与えるのに都合の良い立体配座を取った後、ピロリン酸の脱離に伴い1,15位および11,12位オレフィンとの間で連続的に炭素炭素結合形成が起こり、verticillen-12-yl cation (**3**)を経て、**2** が生成すると推定された。この反応機構では GGDP からカチオン **3** への環化と **3** から **2** を与える 2 段階の反応に分けて考えると都合が良い（Scheme 1)。取り込み実験の結果C15-15-Meの結合は開裂しないことが解り、これは最初の環化過程では1,15位間の炭素炭素結合形成後生じるカチオン **4** は酵素活性部位中で基質がコンパクトに折り畳まれているため、単結合が回転できないことを示している。すなわち最初の環化過程では大きな立体配座の変化はなく、2 段階目の転移反応で正しい立体化学を持つ **2** を与えるのは、予想される 2 種の経路（Scheme 1）のうち a)に示した舟型遷移状態を経由するものであることが推定された。

2. Phomactatriene 合成酵素が生成する微量成分の構造

最近のテルペン環化酵素に関する研究から、酵素は 100%の収率で生成物を与えるのではなく、途中に生じるカチオン中間体の構造を反映した微量成分を与えることが判ってきた。そこで菌体アセトン抽出物の炭化水素画分の GC 分析を行ったところ、主成分である **2** のほか数%の含量で 10 種以上のジテルペン炭化水素が検出された。このうち 4 成分に関しては標品との比較から、Scheme 2 に示す構造を持つことが判明した。微量成分 **6a**, **6b**, **7** および **9** がすべて 12 員環構造を有することから、これらは仮想環化酵素である phomactatriene 合成酵素により生産されたものと推定した。これら微量成分が中間体カチオン **3** から生じるものと仮定し、最安定配座から生じるカチオンの安定性をMOPACによる分子軌道計算により検討したところ、Scheme 2 に示す 3 種のカチオン **5A** – **5C** が候補としてあがってきた。カチオン **5A** から一連の 1,2-転移が進行すれば **2** および **7** を与え、非常に珍しい分子内 1,5-プロトン転移により生じるカチオン **5B**, **5C** からはそれぞれ **8** および **9** が生成することになる。興味深いことに phomactatriene (**2**)は抗腫瘍性抗生物質 taxol の生合成中間体 taxadiene (**8**)と同一のカチオン中間体 verticillen-12-yl cation (**3**)を経由して骨格構築される。また *Boswellia carterii* という植物の精油成分として知られる verticillatriene (**9**)も **3** を経由して生合成されるはずである。

3. 非酵素的反応の実験結果に基づく酵素反応機構の考察

Phomactatriene 合成酵素および炭化水素 **8**、**9** を与える環化酵素がどのように生成物を作り分けるのかに興味を持ち、verticillen-12-yl cation (**3**)と同じ炭素骨格を持つ verticillol (**10**)を酸処理し生じるカチオンがどのような反応性を示すか調べた。化合物 **10** を CH_2Cl_2 中 BF_3•$(OEt)_2$, -78°C で処理したところ、2 種の脱水生成物 **6a**, **6b** のほか、phomactatriene の二重結合位置に関する異性体 **9** がほぼ 1：1：1 の比で単離された。同一条件下反応温度を上げていくと、 —20° C 以上では taxadiene (**8**)を含む多数の生成物に変換されることがわかった。以上の結果から phomactatriene 型ジテルペン骨格は非酵素的にも容易に形成されることが示され、phomactatriene 合成酵素は 6 員環上で 3 回生じる 1,2-転移の最後の段階を、taxadiene 合成酵素の反応では最初の 1,5-プロトン転移を効果的に触媒していることが合理的に推定できた。Phomactatriene 合成酵素が 1,5-プロトン転移経由の生成物 **9** を微量ながら生成することは、環化酵素をコードする遺伝子に適当な変異を導入することで、抗腫瘍性物質 taxol 生合成の律速酵素 taxadiene 合成酵素に変換しうることを意味する。

研究発表

口頭発表

1. 及川英秋：生合成酵素による天然物合成 —DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin の酵素合成を中心に—，第 37 回天然物談話会（京都）2002. 7.

2. Oikawa, H. and Sassa, T., 2002, International Symposium on Chirality (ISCD 14), "Stereochemical Aspects of Diterpene Biosynthesis: Reaction Mechanism of Aphidicolan-16β-ol Synthase", Hamburg, September, 2002

3. 趙銀敏、岡田敦、兼目裕充、豊増知伸、及川英秋、戸嶋浩明、佐々武史、矢島新、薮田五郎、森謙治、渋谷直人、大森俊雄、西山真、山根久和：イネ培養細胞におけるファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子 OsDTC1 の cDNA クローニングと機能解析、植物化学調節学会第 37 回大会（札幌）2002. 10.

4. 大友一子、豊増知伸、三橋渉、兼目裕充、及川英秋、戸嶋浩明、佐々武史：イネ葉におけるファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子のクローニングと機能解析、植物化学調節学会第 37 回大会（札幌）2002. 10.

5. 福士江里、後藤仁志、及川英秋：ジテルペンの酵素的全合成研究（4）－フォマクチン類生合成中間体の立体構造解析. 日本農芸化学会 2003 年度大会（京都）2003. 3.

6. 大友一子、豊増知伸、三橋渉、及川英秋、戸嶋浩明、伊藤博紀、松岡信、佐々武史：イネのコパリル二リン酸合成酵素遺伝子について、植物化学調節学会第 38 回大会（名古屋）2003. 10.

7. 遠藤妙子、福士江里、常盤野哲生、及川英秋：PAF 拮抗阻害物質－フォマクチン B の生合成研究. 日本化学会第 84 春季年会（西宮）2004. 3.

誌上発表

1. H. Toshima, H. Oikawa, H. Yada, H. Ono, T. Toyomasu and Sassa, T. Total Synthesis of (±)-*syn*-Copalol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, *65*, 2504-2510.

2. 及川英秋：環化酵素を鍵としたジテルペンの酵素的全合成、*日本農芸化学会誌*、**2002**、*76*、1199-1201

3. 及川英秋、佐々武史: 生物活性ジテルペンの酵素的生産を目指して：DNAポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンの酵素的全合成研究、*化学と生物*、**2003**、*41*、807-814

4. Cho, E.-M., A. Okada, H. Kenmoku, K. Otomo, T. Toyomasu, W. Mitsuhashi, T. Sassa, A. Yajima, G. Yabuta, K. Mori, H. Oikawa, H. Toshima, H. Shibuya, T. Omori, M. Nishiyama and H. Yamane, "Molecular Cloning and Characterization of a cDNA Encoding ent-Cassa-12,15-diene Synthase, a Putative Diterpenoid Phytoalexin Biosynthetic Enzyme, from Suspension-cultured Rice Cells Treated with a Chitin Elicitor." *Plant J.* **2004**, *37*, 1-8.

5. Toyomasu, T., K. Nakaminami, H. Toshima, T. Mie, K. Watanabe, H. Ito, H. Matsui, W. Mitsuhashi, T. Sassa and H. Oikawa, "Cloning of a Gene Cluster Responsible for the Biosynthesis of Diterpene Aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase a." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 146-152.

6. Tokiwano, T., Fukushi, E., Endo, T. and Oikawa, H., Biosynthesis of Phomactins: Plausible Cyclization Product Phomactatriene, submitted.

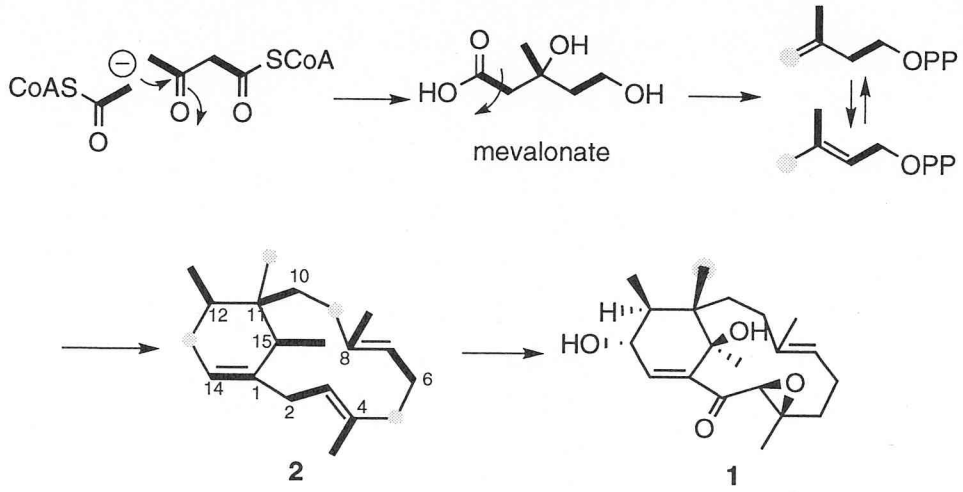
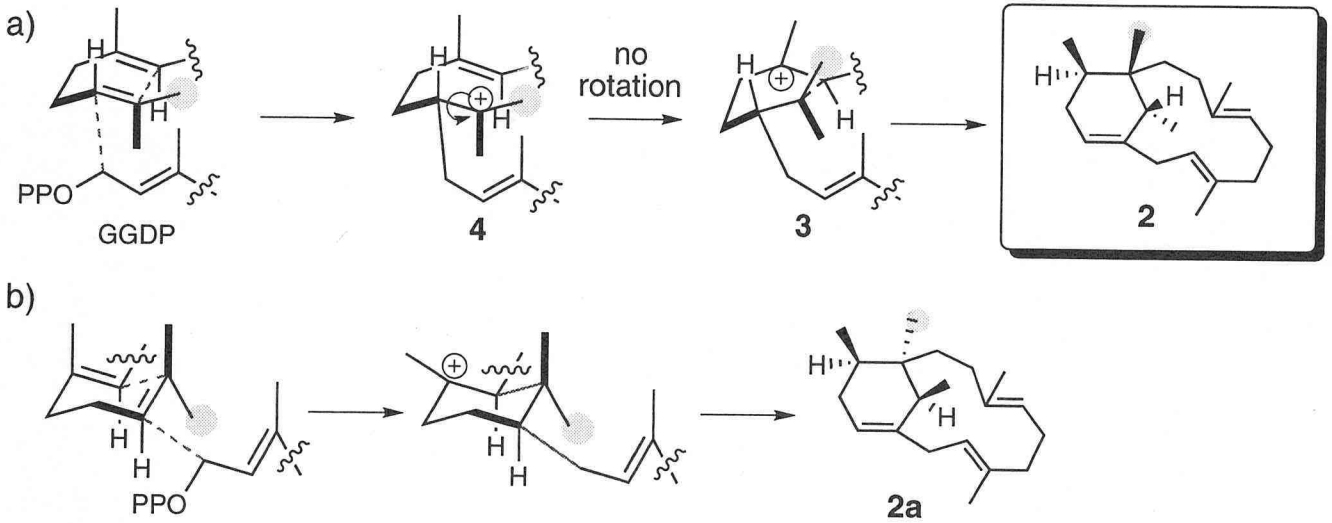
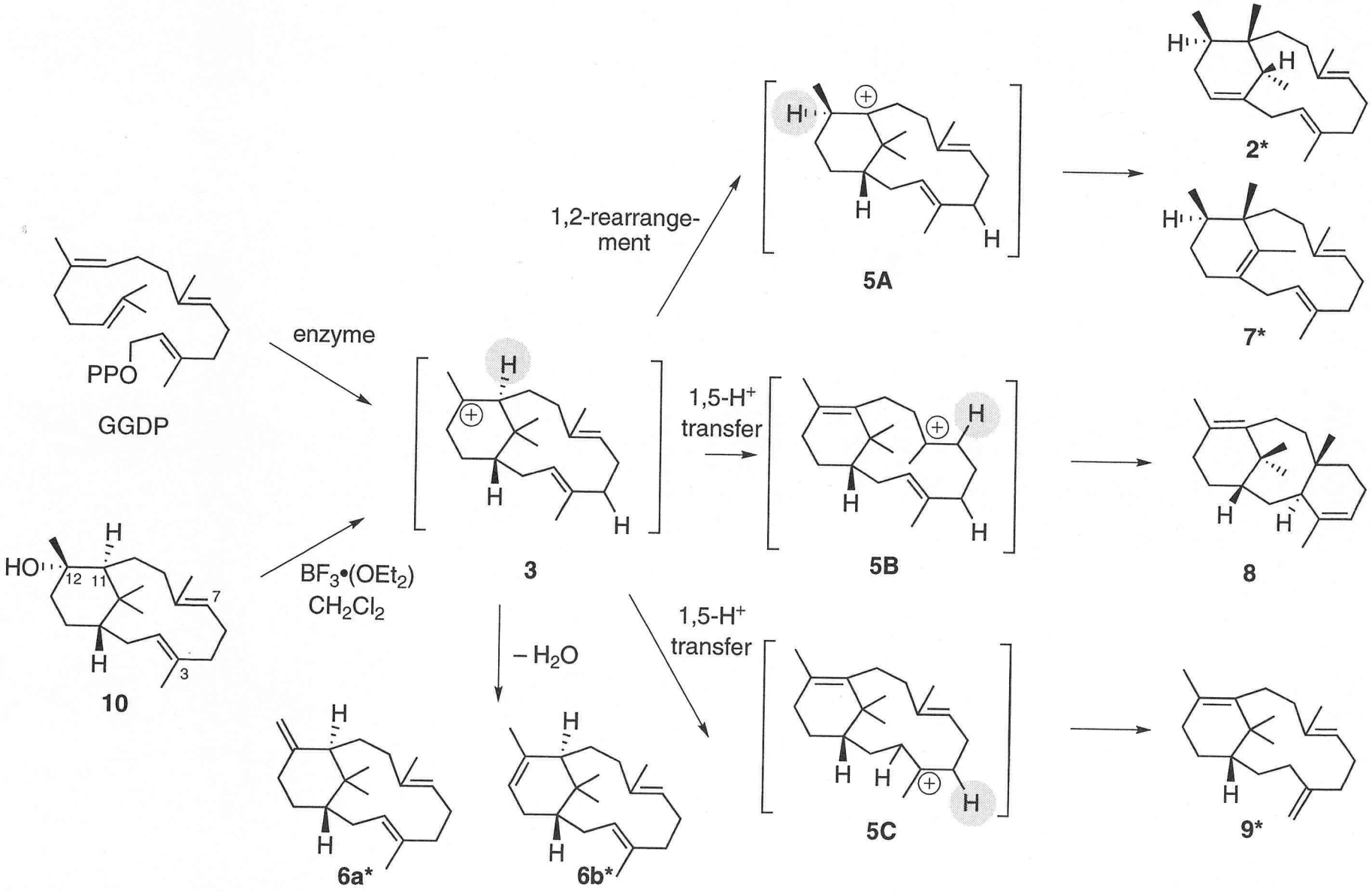

CoAS
SCoA
O
O
O
HO
OH
OH
O
mevalonate
OPP
OPP
10
12
11
15
8
6
14
1
2
4
2
H
HO
OH
O
O
1

Fig. 1



Scheme 1


PPO
GGDP
enzyme
HO
12
11
7
3
10
BF3•(OEt2)
CH2Cl2
3
1,2-rearrange-
ment
5A
2*
7*
1,5-H+
transfer
5B
8
– H2O
6a*
6b*
1,5-H+
transfer
5C
9*

Scheme 2