

スクアレン環化酵素の生合成工学

阿部 郁朗^{a,b}

Engineering of Squalene Cyclizing Enzymes

Ikuro ABE^{a,b}

^aSchool of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, and ^bPRESTO, Japan Science and Technology Agency, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received April 28, 2008)

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 (a) enzymatic formation of a “supra-natural” hexacyclic polyprenoid as well as heteroaromatic ring containing cyclic polyprenoids by bacterial squalene: hopene cyclase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, and (b) enzymatic cyclization of 22,23-dihydro-2,3-oxidosqualene and 24,30-bisnor-2,3-oxidosqualene by plant oxidosqualene: β -amyrin cyclase from *Pisum sativum*.

Key words—squalene cyclase; oxidosqualene cyclase; triterpenes; enzyme; substrate specificity; engineered biosynthesis

1. はじめに

今後の医薬資源の開発について考えた場合、多様に富む化合物群をいかに効率よく生産し、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。それゆえ、筆者は、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、将来の創薬化学にかなら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。本稿では、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を取り上げる。

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1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、半世紀以上に渡って多くの有機化学者を魅了し続けてきた。筆者らは、化学的に合成した人工基質をプローブとして酵素に作用させることにより、微生物や植物由来スクアレン環化酵素が、異例とも言える広範な基質特異性と触媒ポテンシャルを示すことを明らかにした。その結果、立体化学が厳密に制御された超天然型6環性ステロイドやヘテロ芳香環を含有する非天然型トリテルペンなど、これまでに例のない新たな化合物の生産に成功し、酵素触媒機能の拡張と新規分子骨格創出への展望を与えた。以下に、最近の研究成果について紹介する。

2. 微生物由来スクアレン環化酵素

単純なイソプレン単位の繰り返し構造を持つ鎖状のオキシドスクアレン(1)やスクアレン(2)を閉環して、複数の不斉中心を持つ複雑なステロイドやトリテルペンの基本骨格を一挙に構築する酵素は、バクテリアのような下等な生物から高等動物や植物に至

^a静岡県立大学薬学部, ^b科学技術振興機構 PRESTO (〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: abei@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

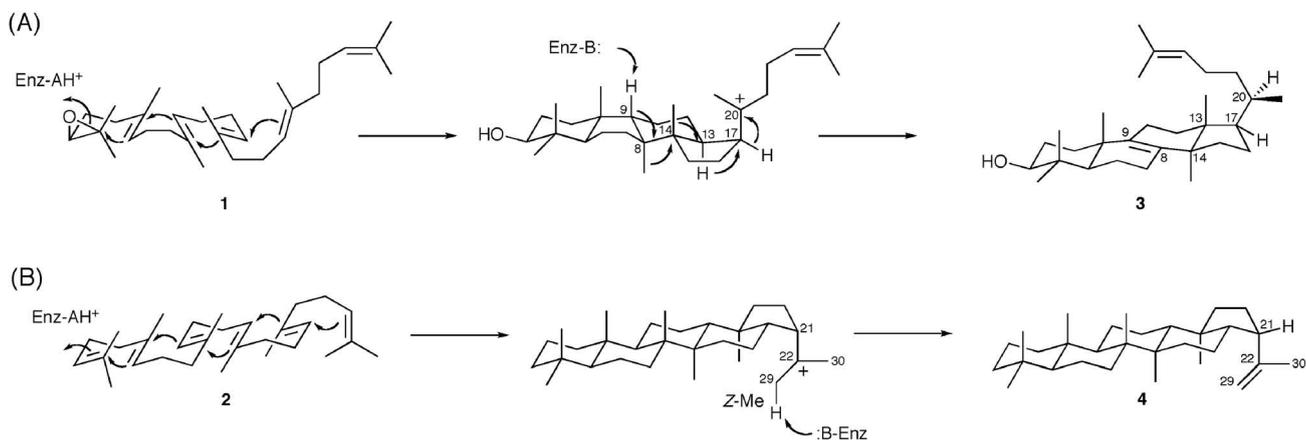


Fig. 1. Enzymatic Formation of (A) Lanosterol from (3S)2,3-oxidosqualne by Animal OSC, and (B) Hopene from Squalene by Bacterial SHC

るまで、生物界に広く分布し、しかも生物の進化の度合に応じて、その閉環様式に大きな違いがあることが知られている。¹⁻⁷⁾ すなわち、細胞膜の構成成分として、動物におけるコレステロールの生合成中間体となるラノステロール(3)、また、植物におけるステロールの前駆体となるシクロアルテノールへの閉環反応では、(3S)-オキシドスクアレン(1)が *chair-boat-chair* 型のコンフォメーションに取り込まれ、末端エポキシ環が求電子攻撃を受けることにより開始される。まず4環性のプロトステロール第3級カチオン中間体へ閉環ののち、メチル基と水素の一連の転位反応がそれに続く [Fig. 1(A)]。一方、一部の微生物やシダ植物などの下等な生物では、スクアレンがオキシドスクアレンに変換されることなく、直接、ホペン(4)など、3位の酸素官能基を欠く5環性トリテルペンに閉環するが、この場合反応はより安定な *all-chair* 型のコンフォメーションを取って進行する [Fig. 1(B)]。

このように、オキシドスクアレンとスクアレンは各々異なる酵素により、多様な骨格を持ったステロールやトリテルペンに変換されるが、こうした閉環反応機構の差異が、酵素タンパクのどのような構造の違いによるものであるのか、大変興味深いものがあり、筆者も大学院博士課程に進学以来、スクアレン環化酵素の構造機能相関の解明をめざした生物有機化学的研究に取り組んできた。今日ではこうした閉環反応メカニズムの違いは、酵素の活性中心構造の微妙な変化によってもたらされるものと考えられており、最近の研究成果は、高等生物のオキシド

スクアレン環化酵素 (OSC) がより原始的な微生物のスクアレン環化酵素 (SC) から進化したとする分子進化仮説を裏付けつつある。⁵⁾

スクアレンを *all-chair* 型のコンフォメーションに取り込んで単純に閉環する微生物由来 SC 酵素は、高等生物の OSC 酵素に比べて、より原始的なものであると考えられてきた。まず、微生物の酵素によるスクアレンの閉環は、分子状酸素の取り込みを必要としない嫌氣的な過程で、また、反応もより単純で途中炭素骨格の転位はみられない。しかも、微生物由来 SC 酵素の基質特異性は低く、複雑な閉環反応の化学を厳密に制御しなければならない高等生物由来 OSC 酵素と比べて、それほど精巧なシステムを必要とはしないようにも考えられる。逆に言えばそれだけ、人工基質の酵素変換など生合成工学の可能性を探る上で好都合であるとも言える。実際、微生物由来 SC 酵素が示す触媒ポテンシャルには注目すべきものがあり、例えば基質の一方の末端二重結合を還元した人工基質を作用させた場合、閉環反応の様式を劇的に変化させて、本来の生成物とは全く異なる骨格を持った化合物を高収率で生成す



阿部郁朗

1984年東京大学薬学部卒、1989年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了、同年仏政府給費留学生、1991年ニューヨーク州立大学ストーニーブルック校化学科上級博士研究員、研究助教授、1996年ユタ大学医薬化学科研究助教授、1998年静岡県立大学薬学部講師、2008年より准教授、2005年より科学技術振興機構さきがけ兼任。

ることなどを、これまでに筆者らは報告してきた.^{8,9)} しかも、こうした人工基質に対してさえ、酵素反応は酵素により厳密に制御されており、もう1つの複雑な環化反応の立体化学を厳密に制御するだけの能力を既に持ち合わせていたことになる。

2-1. 超天然型6環性ステロイドの創出 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.^{1-3,7,10)} 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(室温に放置しても安定で、60°C, pH 6.0 の条件下で酵素活性を示す)。既に、フライブルグ大学の Schulz 教授らのグループによって X 線結晶構造解析が報告されており,¹¹⁻¹³⁾ 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、したがって、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、在来みられないような骨格を持った生成物を与える可能性も期待される。そこで筆者らは、C₃₅, C₄₀ 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環あるいは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」の人為的な生産に挑戦した。

基質の合成は、文献記載の方法に基づき、ゲラニオール (C₁₀)、ファルネソール (C₁₅)、ゲラニルゲラニルオール (C₂₀) 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 C₂₅(=C₁₅+C₂₀)、C₃₀(=C₁₀+C₂₀)、C₃₅(=C₁₅+C₂₀)、C₄₀(=C₂₀+C₂₀) 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 により分離精製ののち、各種 NMR (¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC, NOESY, NOE 差スペクトル) や MS スペクトルなどを測定して構造解析を行った。

試行錯誤の結果、イソプレン単位が3+4の形で連結した C₃₅(=C₁₅+C₂₀) アナログ(5)を作用させた場合、これまでに全く例のない6/6/6/6/6/5環構造を有する6環性の非天然型新規化合物(6)(収率10%)が、単一生成物として得られることを見出した [Fig. 2(A)].¹⁴⁾ 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。すなわち、酵素反応は本来の基質であるスクアレン (C₃₀=C₁₅+C₁₅) の場合と同様に、C₁₅ ファルネシル単位の側から進行する [Fig. 2(B)]. これに対して、反対側の C₂₀ ゲラニルゲラニル単位の

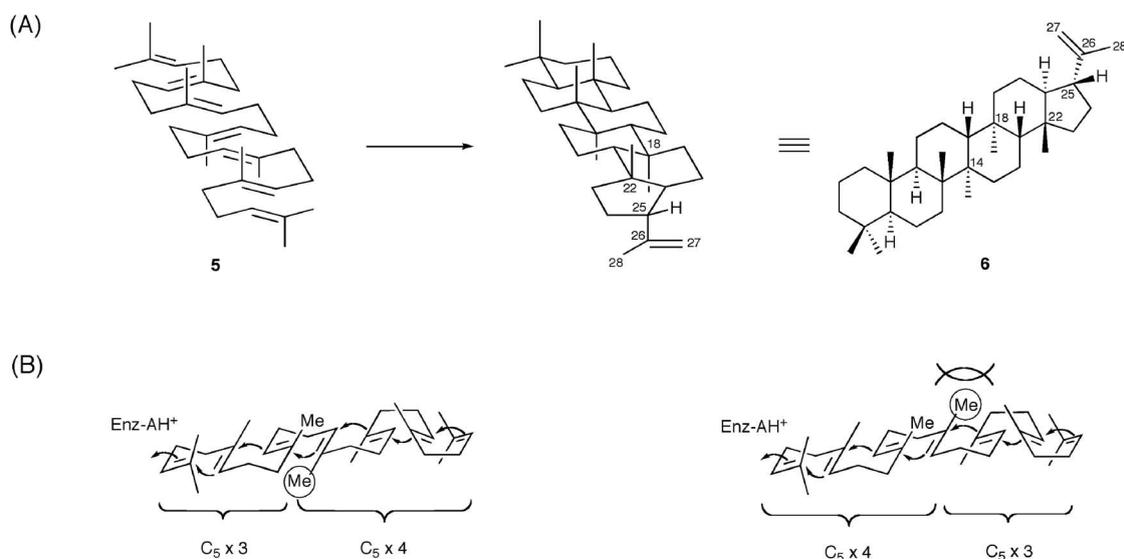


Fig. 2. Enzymatic Formation of “Supra-natural” 6/6/6/6/6/5 Hexacyclic Polyprenoid by *A. acidocaldarius* SHC

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 β 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**6**の22位のメチル基が β -axial、25位のイソプロペニル基が α -axialの配置を取ることから、基質がchair-chair-chair-chair-boat-boat型のコンフォメーションを取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。しかも、このような分子骨格を持った化合物はこれまでに例がなく、ステロイドはホルモンやビタミンなど細胞内情報伝達において中心的役割を演じる生体機能分子であるため、その生物活性についても大いに興味をもたれるところである。

一方、C₃₅アナログに対して、C₁₅ファルネシル単位を含まないC₃₀(=C₁₀+C₂₀)やC₄₀(=C₂₀+C₂₀)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 α 配置を取る必要があり、したがって基質におけるC₁₅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。¹⁴⁾

2-2. ヘテロ芳香環含有非天然型ステロイドの創出 次に筆者らは、より多くの生理活性が期待できる、ヘテロ芳香環を部分構造に持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(**7**)と3-(farnesyl dimethylallyl) indole(**8**)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[Fig. 3(A), 3(B)].¹⁵⁾ このうち、インドール3位にC₂₀ゲラニルゲラニル単位が結合した**7**のエポキシ体3-(ω -oxidogeranylgeranyl) indole(**11**)は、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来ルペオール合成酵素(OSLuC)と反応させた場合、多環形成反応が進行して6/6/6/6/6/5縮合環構造を

有する6環性のインドール含有ジテルペン petromindole(**12**) (天然からカビ毒として単離報告されている)を生成することが[Fig. 3(D)], ライス大学のMatsuda教授らのグループによって報告されている。¹⁶⁾ しかし、興味深いことに*A. acidocaldarius*由来SHCは**7**を基質として全く受け入れず、両酵素間の活性部位構造の違いが示された。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C₁₅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[Fig. 3(C)].¹⁵⁾

一方、イソプレレン単位が3+1の形で連結した基質**8**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(**10**) (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(**9**) (収率3%)として得られた[Fig. 3(B)]. 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取って進行し、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。すなわち、6/6/5環構造の3環性カチオン中間体から、一連の転位反応(H-13 β →14, CH₃-8 β →13 β , CH₃-9 α →8 α)とH-11プロトンの引き抜きが進行すれば主生成物**10**を、また、6/6環構造の2環性カチオン中間体から、転位反応(H-9 α →8 α , CH₃-10 β →9 β , CH₃-5 α →10 α)とH-6プロトンの引き抜きが進行すれば副生成物**9**を与えることになる[Fig. 3(B)]. 両者の場合とも、一連の転位反応の立体化学と特定の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-(farnesyl dimethylallyl) pyrroleを用いた酵素変換実験でも得られている¹⁷⁾。C₂₀ゲ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C₁₅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

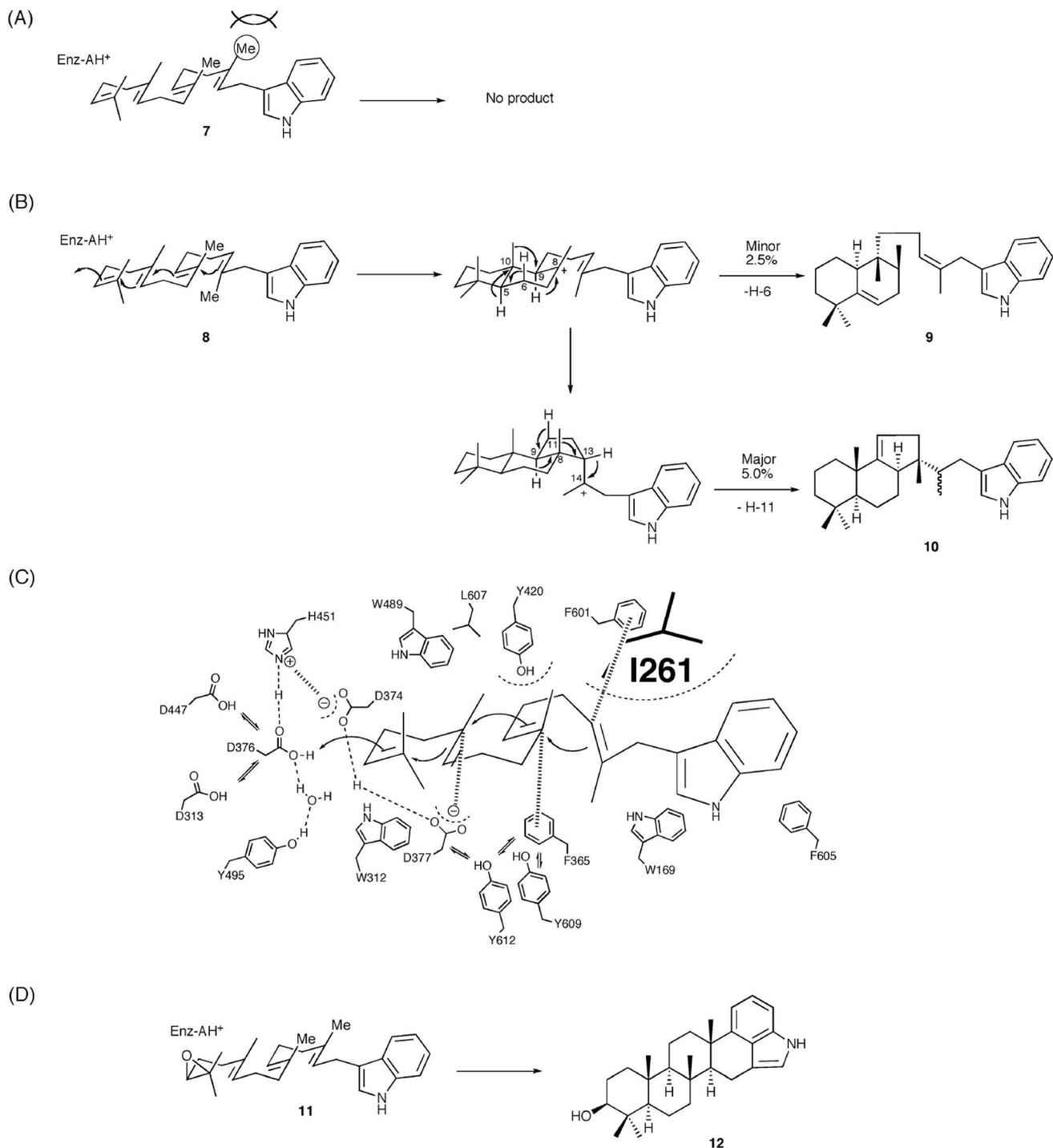


Fig. 3. (A) and (B) Enzymatic Cyclization of Indole-ring Containing Substrates Analogues by *A. acidocaldarius* SHC, (C) Proposed Interactions between the Active-site Amino Acid Residues of *A. acidocaldarius* SHC and 3-(Farnesyl dimethylallyl) indole, and (D) Enzymatic Formation of Petromindole by *A. thaliana* OSLuC

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、 π 電子に富むインドールの方が、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 π - π 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

のと考えられる。

2-3. メチリデン基含有基質アナログの酵素変換

微生物由来 SC 酵素による多環形成反応の立体化学に与える影響を調べる目的で、スクアレンのメチル基の代わりにビニル基を導入した 4 種の C_{31} 基質アナログ；1-, 25-, 26-, 27-methylidenesqualene (MS) を化学合成し、大腸菌において大量発現させ精製した *A. acidocaldarius* 由来 SHC に作用させることにより、酵素反応生成物の単離と構造解析を行った (Fig. 4)。

まず、末端メチル基にメチリデン基を導入した、1-MS (13) 及び 25-MS (14) からは、共通の 5 環性のホペン誘導体 (17) (収率各 35, 38%) が得られ、ホペンにおける E 環形成の酵素反応機構を考える上で重要な知見を得た。¹⁸⁾ すなわち、通常スクアレンからホペンが生成する際には、末端の Z-メチル基の側から位置選択的に脱プロトン化が進行して二重結合を形成し、反応が終結することが知られているが [Fig. 1 (B)], 1-MS 及び 25-MS を基質とした場合には、電子供与性のメチリデン基の存在により 5 環性の C-22 第 3 級カチオン中間体が途中で安定化され、その結果、H-29 プロトンの引き抜きが起こる以前に、C-21-C-22 結合に関する側鎖の回転が進行する可能性が示された [Fig. 4(A)]。

次に、26-MS (15) 及び 27-MS (16) も、同様に *A. acidocaldarius* 由来 SHC の基質として受け入れられ、6/6/6/5+6 環構造を有するユニークな新規骨格をもつ C_{31} ダンマレン誘導体 (18) (収率 10%) (全く同一の骨格を持つ非天然型ダンマレン誘導体が、高等動物由来 OSC 酵素との反応で得られている) とホペン誘導体 (19) (収率 0.3%) の生成がそれぞれ認められ [Fig. 4(B), 4(C)],¹⁹⁾ これにより微生物由来 SC 酵素が示す広範な基質特異性と触媒ポテンシャルが改めて認識されることとなった。一方、筆者らが以前報告した高等動物由来 OSC 酵素の場合と同様に、閉環反応中間体のカチオン中心の α 位にメチリデン基を配置することにより、反応途中で生成するアリルカチオン中間体が、活性中心の求核性アミノ酸残基によりトラップされ、共有結合を形成して、自殺基質として機能する可能性も考えられる。²⁰⁻²²⁾ しかしながら、微生物由来 SC 酵素においては、そのような不可逆的な酵素阻害は観察されず、両生物間の酵素活性部位構造の違いが示

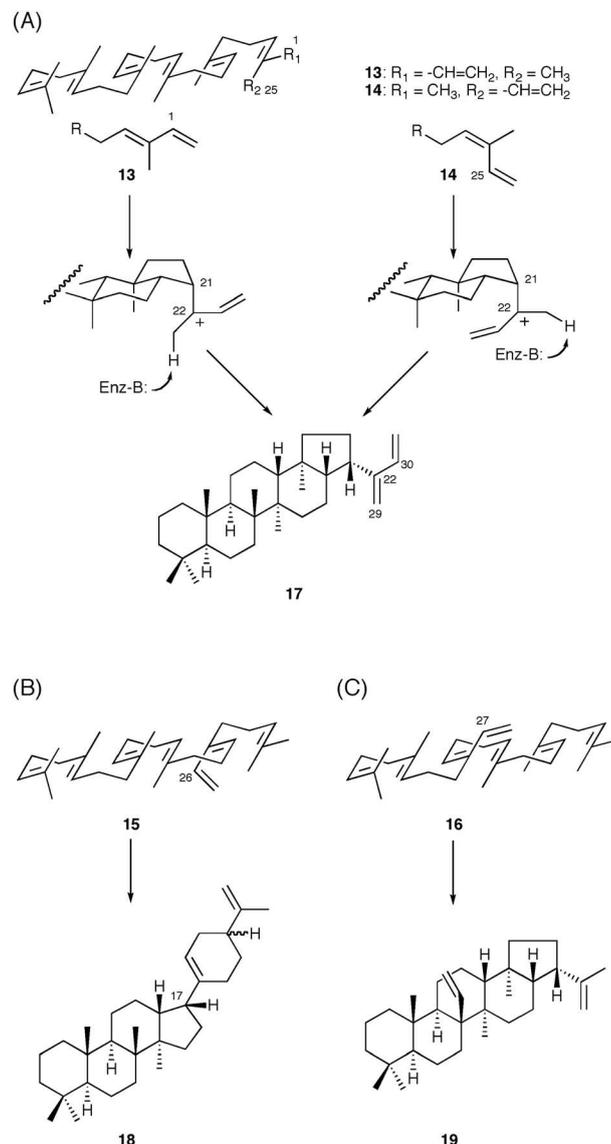


Fig. 4. Enzymatic Cyclization of Methylidene-extended Substrate Analogues by *A. acidocaldarius* SHC

された。

3. 植物由来オキドスクアレン環化酵素

高等植物に広く分布する β -アミリン (20) の生合成については、1955 年にチューリッヒ工科大学の Ruzicka 一門が「生合成イソプレネ則」で提唱したように、オキドスクアレン (1) が *chair-chair-chair-boat* 型のコンフォメーションに取り込まれ、6/6/6/5 環構造の 4 環性のダンマレンカチオン中間体を生成ののち、D 環や E 環の環拡大など、一連の複雑な炭素骨格の転位を経て、8 個の不斉中心を有する 6/6/6/6/6 環構造の 5 環性の β -アミリン骨格を形成するものと考えられている (Fig. 5).⁴⁾ 実際にこの反応を触媒する β -アミリン合成酵素 (OS-

β AC) については、近年、東京大学の海老塚教授のグループにより、酵素遺伝子のクローニングや、キメラ酵素及び部位特異的変異酵素の機能解析などが報告されている。^{23,24)}しかし、酵素の結晶化はいまだ達成されておらず、酵素活性中心構造の詳細などについては今後の研究が待たれているのが現状である。そこで筆者らは、さらなる多環形成反応機構の解明と非天然型新規化合物の酵素合成をめざして、2つの末端メチル基を欠損させた 24,30-bisnor-2,3-oxidosqualene (BNOS) (**21**)と、末端二重結合を還元した 22,23-dihydro-2,3-oxidosqualene (DHOS) (**25**)を、いずれもラセミ体として化学合成し、酵母に異種発現したエンドウマメ由来 OS β AC に作用させることにより、酵素反応に及ぼす効果を検討した。^{25,26)}

3-1. ビスノルオキドスクアレンの酵素変換
 β -アミリンの骨格構築において、BNOS (**21**)における2つの末端メチル基の欠損が、E環形成にどの

ような影響を及ぼすか興味をもたれるところである。実際に酵母に異種発現したエンドウマメ (*Pisum sativum*) 由来 OS β AC に作用させたところ、主生成物として5環性の6/6/6/6/6環構造を有する非天然型トリテルペン bisnor- β -amyrin (**22**) (収率19%)が、副生成物である二重結合に関する2つの位置異性体 bisnorgermanicol (**23**) (収率7%)、bisnor- δ -amyrin (**24**) (収率1%)とともに得られることが示された (Fig. 5)²⁵⁾ (ハーバード大学の Corey 教授らも1968年の論文で、エンドウマメ種子芽生えの粗酵素抽出液を用いて、BNOS から bisnor- β -amyrin の生成を報告している²⁷⁾).

そこで筆者らはさらに、E環形成反応機構の解明を目的として、安定同位体で標識した [23-¹³C]-及び [23,23-²H]-BNOS を別途合成し、酵素反応を行って、NMR スペクトルにおける α シフトや β シフトなどアイソトープ効果を詳細に解析した結果、生成物の C-19 が選択的に¹³C 標識されること、また、

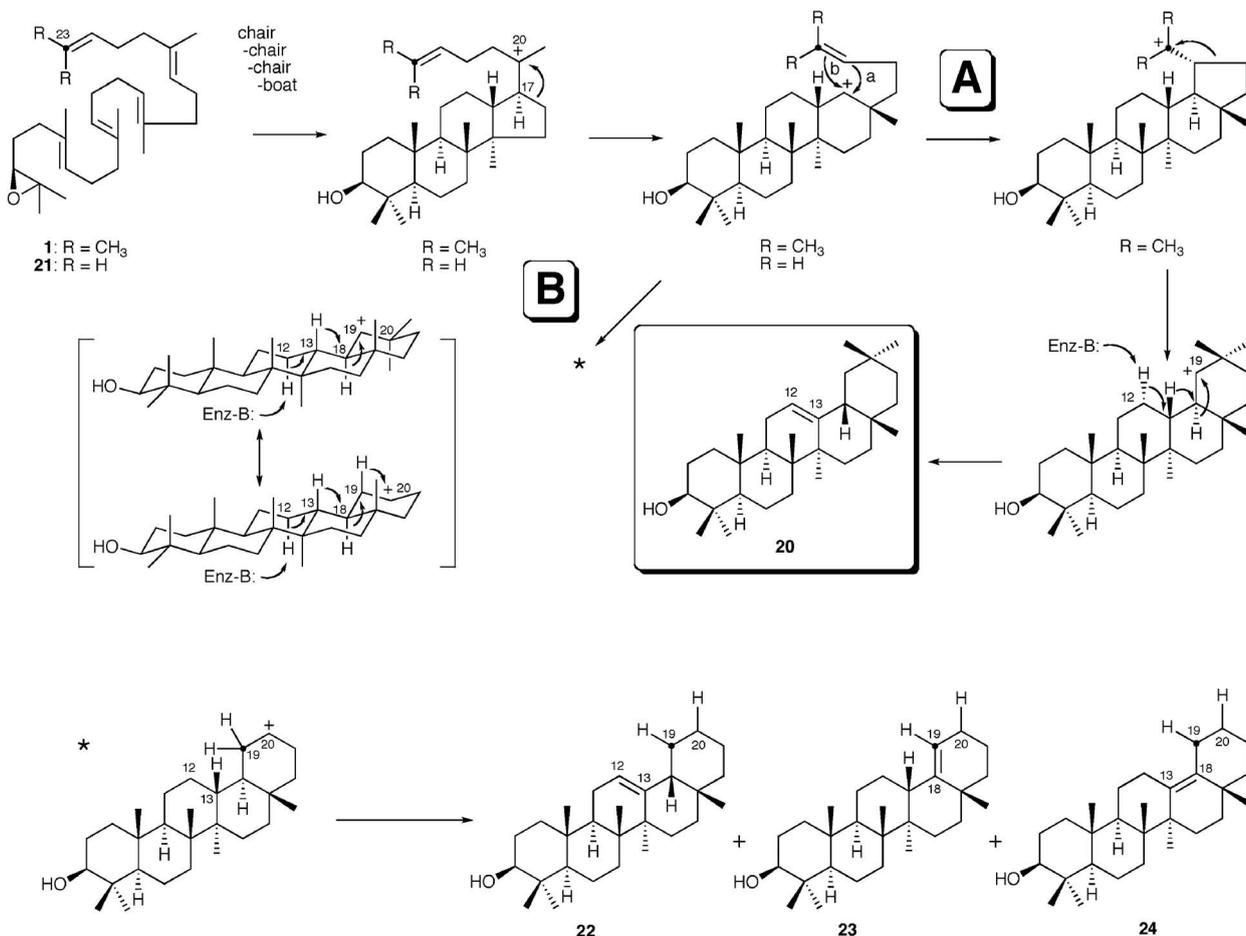


Fig. 5. Enzymatic Formation of β -Amyrin, and Enzymatic Cyclization of Bisnoroxidosqualene by *P. sativum* OS β AC

C-19 と C-20 が特異的に²H 標識されることが示され、E 環形成の反応機構を考える上で重要な知見を得た (Fig. 5).²⁵⁾ すなわち、酵素反応生成物の標識パターンから、ビスノル・アミリンへの閉環反応は、末端メチル基の欠損により第1級カチオンとなるビスノル・ルパニルカチオンを経由する A のルートではなく、熱力学的により安定で、E 環がひずみのより少ない6員環構造を取るビスノル・オレアニル第2級カチオンの生成を経由する B のルートで、特異的に進行することが示された。一方、 Δ^{12} , $\Delta^{13(18)}$, Δ^{18} といった二重結合に関する3つの位置異性体の生成は、最終段階のビスノル・オレアニル C-20 カチオン中間体以降の転位反応が酵素によって厳密には制御され得ないことを示唆している。本来の β -アミリンの生成においては、オレアニル C-19 カチオン (all-chair 型コンフォメーション) においてアンチパラレル型の2回の1,2-ヒドリド転位 ($H-18\alpha \rightarrow 19\alpha$, $H-13\beta \rightarrow 18\beta$) が進行するのに対し、ビスノル・アミリンの生成では、3回の1,2-ヒドリド転位 ($H-19\beta \rightarrow 20\beta$, $H-18\alpha \rightarrow 19\alpha$, $H-13\beta \rightarrow 18\beta$) が進行することになる (Fig. 5)。この際、2つの末端メチル基の欠損によって、酵素活性部位におけるビスノル・オレアニル C-20 カチオン中間体の E 環部分のフォールディングに揺らぎを生じ、その結果、転位反応が完全な形で進行せず、複数の生成物を与えたものと推察される。

3-2. ジヒドロオキシドスクアレンの酵素変換

オキシドスクアレンの末端二重結合を還元した DHOS (25) を酵素に作用させた場合、どのような骨格を持つ生成物を与えるのか興味をもたれるところである。まず、最初に生成するはずのカチオン中間体の D 環は、熱力学的により安定な5員環構造を取るのか、それとも、6員環への環拡大が進行するのか。そして次に何が起こるか？ 水和反応やプロトンの脱離など様々な可能性が考えられる。実際にエンドウマメ由来 OS β AC を用いて酵素反応を行ったところ、驚いたことに閉環反応の様式を劇的に変化させて、本来の生成物である5環性の β -アミリンとは全く異なる骨格を持った、2種の非天然型4環性トリテルペンを生成することを見出した。すなわち、主生成物として、D 環が5員環で7位の二重結合と 20R の立体配置を取る euph-7-en-3 β -ol (26) (収率4%) が、また、副生成物として、D 環

が6員環で12位に二重結合をもつ bacchar-12-en-3 β -ol (27) (収率1%) が得られた (Fig. 6).²⁶⁾ 20位の立体化学を含む構造決定については、天然より得られた eupha-7,24-dien-3 β -ol と bacchara-12,24-dien-3 β -ol の側鎖二重結合を接触還元して得た化合物をそれぞれ標品として、スペクトルデータが完全に一致することから確認した。6/6/6/6 環構造を有する4環性のバッカレン骨格を持つトリテルペンの酵素合成としてはこれが最初の例である。

いずれの場合も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、主生成物 euph-7-en-3 β -ol (26) への反応では、より熱学的に安定な、6/6/6/5 環構造を有する4環性の第3級カチオン中間体から、一連の転位反応 ($H-17\alpha \rightarrow 20\alpha$, $H-13\beta \rightarrow 17\beta$, $CH_3-14\alpha \rightarrow 13\alpha$, $CH_3-8\beta \rightarrow 14\beta$) と H-7 プロトンの引き抜きが進行して、C-20R の立体化学を達成する。一方、副生成物 bacchar-12-en-3 β -ol (27) については、D 環拡大によりバッカレニル第2級カチオン中間体を生成のち、転位反応 ($H-13\beta \rightarrow 18\beta$) と H-12 プロトンの引き抜きが進行するものと考えられる。ここで、末端二重結合の π 電子の供与なしに、anti-Markovnikov 型の D 環拡大反応が進行する点は有機化学的にも大変重要な知見である。また、上述したように、スクアレンから5環性のテトラヒマノールを生成する原生動物 *Tetrahymena pyriformis* 由来 SC 酵素に、2,3-dihydrosqualene を作用させた場合にも、全く同一の骨格を有する euph-7-ene の生成が報告されている。^{8,9)} これまでスクアレン環化酵素の反応生成物の多様性は、酵素活性中心構造の微妙な変化によってもたらされるものと考えられてきたが、これら酵素においては、もう1つの複雑なポリエン環化反応の立体化学を制御するだけのポテンシャルを既に持ち併せていたことになる。一方、オタネニンジン (*Panax ginseng*) 由来 OS β AC の W259L 点変異酵素が、 β -アミリンに加えて、eupha-7,24-dien-3 β -ol を産生することも報告されており、²⁴⁾ このように酵素活性中心構造の微妙な変化や基質の修飾が、酵素による閉環反応の様式を劇的に変化させる点は注目に値する。

4. おわりに

植物や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

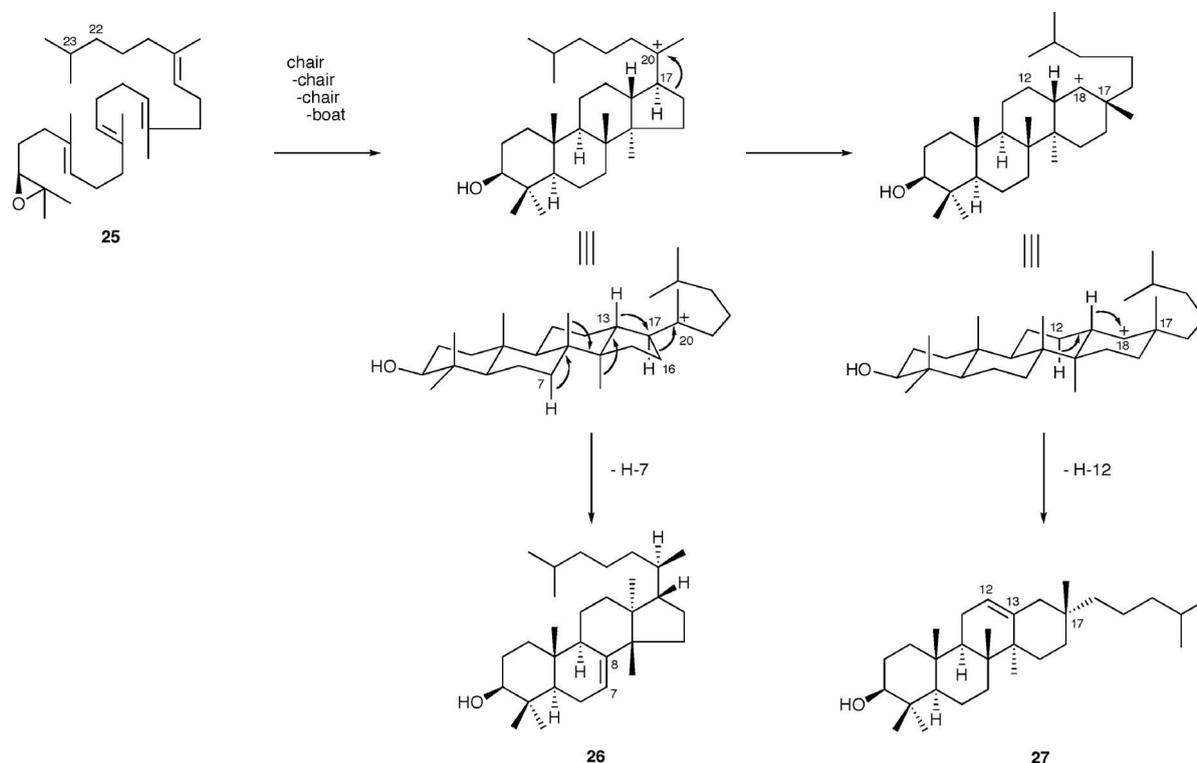


Fig. 6. Enzymatic Cyclization of Dihydroxidosqualene by *P. sativum* OSβAC

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、その多様な構造及び生物活性から、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であっても、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かならずや大きな貢献をするものと期待される。

謝辞 本稿執筆に当たり、静岡県立大学薬学部・野口博司教授をはじめとする共同研究者の諸先生、並びに、大学院生・学生諸氏に厚く御礼申し上げます。また、学生時代に生合成研究に魅せられて研究室の門をたたいて以来、終始ご指導ご鞭撻を賜りました恩師、東京大学薬学部名誉教授・三川 潮先生、東京大学大学院薬学系研究科教授・海老塚豊先生に深く感謝致します。本研究は、文部科学省、日本学術振興会、並びに、科学技術振興機構の研究助成により行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Abe I., Rohmer M., Prestwich G. D., *Chem. Rev.*, **93**, 2189–2206 (1993).
- 2) Abe I., *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 1311–1331 (2007).
- 3) Wendt K. U., Schulz G. E., Corey E. J., Liu D. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 2812–2833 (2000).
- 4) Eschenmoser A., Ruzicka L., Jeger O., Arigoni D., *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1890–1904 (1955).

- 5) Ourisson G., Rohmer M., Poralla K., *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 301–333 (1987).
- 6) Xu R., Fazio G. C., Matsuda S. P. T., *Phytochemistry*, **65**, 261–291 (2004).
- 7) Hoshino T., Sato T., *Chem. Commun.*, 291–301 (2002).
- 8) Abe I., Rohmer M., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 902–903 (1991).
- 9) Abe I., Rohmer M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 783–791 (1994).
- 10) Poralla K., “Comprehensive Natural Products Chemistry,” Vol 2., eds. by Barton D. H. R., Nakanishi K., Pergamon, New York, 1999.
- 11) Wendt K. U., Poralla K., Schulz G. E., *Science*, **277**, 1811–1815 (1997).
- 12) Wendt K. U., Lenhart A., Schulz G. E., *J. Mol. Biol.*, **286**, 175–187 (1999).
- 13) Reinert D. J., Balliano G., Schulz G. E., *Chem. Biol.*, **11**, 121–126 (2004).
- 14) Abe I., Tanaka H., Noguchi H., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14514–14515 (2002).
- 15) Tanaka H., Noguchi H., Abe I., *Org. Lett.*, **7**, 5873–5876 (2005).
- 16) Xiong Q., Zhu X., Wilson W. K., Ganesan A., Matsuda S. P. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9002–9003 (2003).
- 17) Tanaka H., Noma H., Noguchi H., Abe I., *Tetrahedron Lett.*, **47**, 3085–3089 (2006).
- 18) Tanaka H., Noguchi H., Abe I., *Org. Lett.*, **6**, 803–806 (2004).
- 19) Tanaka H., Noguchi H., Abe I., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 3093–3096 (2004).
- 20) Abe I., Prestwich G. D., *J. Biol. Chem.*, **269**, 802–804 (1994).
- 21) Abe I., Prestwich G. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 9274–9278 (1995).
- 22) Abe I., Dang T., Zheng Y.-F., Madden B. A., Feil C., Poralla K., Prestwich G. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11333–11334 (1997).
- 23) Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1208–1216 (1999).
- 24) Kushiro T., Shibuya M., Masuda K., Ebizuka Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6816–6824 (2000).
- 25) Abe I., Sakano Y., Sodeyama M., Tanaka H., Noguchi H., Shibuya M., Ebizuka Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6880–6881 (2004).
- 26) Abe I., Sakano Y., Tanaka H., Lou W., Noguchi H., Shibuya M., Ebizuka Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3426–3427 (2004).
- 27) Corey E. J., Gross S. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4561–4562 (1967).