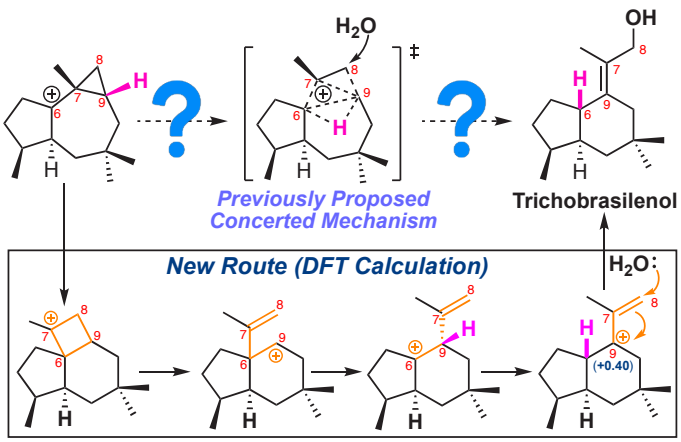
5　天然物生合成経路の理論解析と創薬化学研究への応用	内山　真伸

【目的】「天然物」は、微生物や動植物の持つ生合成のダイナミズムが作り出す多彩な化学構造と機能を持つ有機分子群である。多種多様な天然物の骨格は、(生合成) 酵素内部での複雑な多段階連続反応によって生合成される。しかも、いくつかの酵素は、現在の有機化学では難しいとされる反応さえ簡単に触媒してしまう。ここで得られる知見は、新反応開発にとっても、大変興味深い。生合成は、一般に多段階にわたる連続反応を、緻密に、正確に、短時間で、効率的に行う。このことは同時に、“反応性が高く”“寿命が短い”“手に取り出せない”各種中間体の単離・構造決定や生合成機構の全貌解明が非常に難しいことを示している。一般に、実験化学では、反応機構を明らかにするために、同位体標識化合物のトレーサー実験を行ったり、生合成の各段階を触媒する酵素を単離精製してその性状を調べたり、あるいは速度論的な実験を行う。これらは、反応（生合成）経路に関する情報、すなわち中間体の構造、あわよくば反応遷移状態に関する情報を得ることを目的としている。遷移状態は、化学変換に決定的な役割を果たすからである。しかしながら、実験的手法では、遷移構造を直接『見る』ことはできない。唯一、その姿を直接『見る』ことができる方法が『計算化学』である。計算機ならびに理論手法の発達により大規模系のシミュレーションも可能となりつつある計算化学は、実験困難な化学現象を予測できるポテンシャルを秘めている。そこで本研究では、計算化学的手法を基盤として、当研究グループが独自に開発してきた『遷移構造解析』『反応経路自動探索法』などを駆使して、未解明生合成経路の全容解明を目指し研究を行った。遷移状態を正確に理解することで、これまで理論的な解明が遅れてきた「多段階連続反応」「触媒反応」である生合成の未解明機構解析に挑んだ。

【方法】本研究で用いたすべての計算は、Gaussian16 プログラム上で行い、必要に応じて GRRM11 プログラムを援用し行った。

【結果】本研究を通じて、①「Brasilane 型構造生合成のカラクリ（異常な連続骨格転位反応）(図)」を解明し、また共同研究にて、②インドールジテルペンにおける「Lolitremane 骨格形成 (ラジカル機構による立体選択的環化反応)」、③「Shimalactone 生合成におけるダブルビシクロ環化反応における生合成の謎 (立体選択性に酵素は必要なのか？)」、ならびに④「PreasperterpenoidA の生合成経路に 2 級カチオンは本当に現れるのか？」などを明らかにすることができた。本研究を通じて、理論計算が生合成機構解析にも極めて有効なツールとなることを示せたと考えている。経験と実測を得意とする『実験化学』に、理論を武器とする『計算化学』が加わると、生合成研究に新たな世界が拓けると信じている。理論計算によって得られる三次元構造や立体電子構造は実験化学者の直感を刺激し、また計算化学により思いがけない未知の構造や機構と出会うこともある。理論と実験の協奏により、「超連続」「触媒」反応である生合成経路・遷移状態を正確に理解することで、新たな天然物化学研究を展開したいと考えている。

本研究により明らかになった Brasilane 型構造生合成における異常な連続骨格転位反応



5. 天然物生合成経路の理論解析と創薬化学研究への応用

内山　真伸

東京大学 大学院薬学系研究科 基礎有機化学教室

Key words：天然物生合成，理論計算，多段階連続反応，反応経路解析

緒　言

人類が生活していく上で必要な「衣・食・住」は、植物や微生物が作り出す天然有機化合物（以下、天然物）に支えられている。例えば、カイコが生産するフィブロインは絹として使われ、植物の生産する天然ゴムはタイヤなど様々な工業製品に使われてきた。さらに、植物や菌類によって生産されるテルペン化合物は、医農薬、接着剤、ゴム・プラスチックの改質剤、香料原料、洗浄剤、電子材料など、あらゆる分野の製品に応用されており、社会の基盤を支えている。そのため、新奇天然物の発見は人類の生活の充実や新規材料の開発に直結する。しかし、天然資源の枯渇が問題となっている現代において、新奇天然物の発見やその安定供給は困難となってきており、化学者に知恵と打開策が求められている。

「天然物」は、微生物や動植物の持つ生合成のダイナミズムが作り出す多彩な化学構造と機能を持つ有機分子群である。多種多様な天然物の骨格は、（生合成）酵素内部での複雑な多段階連続反応によって生合成される。しかも、いくつかの酵素は、現在の有機化学では難しいとされる反応さえ簡単に触媒してしまう。ここで得られる知見は、新反応開発にとっても、大変興味深い。生合成は、一般に多段階にわたる連続反応を、緻密に、正確に、短時間で、効率的に行う。このことは同時に、“反応性が高く”“寿命が短い”“手に取り出せない”各種中間体の単離・構造決定や生合成機構の全貌解明が非常に難しいことを示している。

一般に、実験化学では、反応機構を明らかにするために、同位体標識化合物のトレーサー実験を行ったり、生合成の各段階を触媒する酵素を単離精製してその性状を調べたり、あるいは速度論的な実験を行う。これらは、反応（生合成）経路に関する情報、すなわち中間体の構造、あわよくば反応遷移状態に関する情報を得ることを目的としている。遷移状態は、化学変換に決定的な役割を果たすからである。しかしながら、実験的手法では、遷移構造を直接『見る』ことはできない。唯一、その姿を直接『見る』ことができる方法が『計算化学』である。計算機ならびに理論手法の発達により大規模系のシミュレーションも可能となりつつある計算化学は、実験困難な化学現象を予測できるポテンシャルを秘めている。

そこで本研究では、計算化学的手法を基盤として、当研究グループが独自に開発してきた『遷移構造解析』『反応経路自動探索法』などを駆使して、未解明生合成経路の全容解明を目指し研究を行った。遷移状態を正確に理解することで、これまで理論的な解明が遅れてきた「多段階連続反応」「触媒反応」である生合成の未解明機構解析に挑んだ。その結果、①「Brasilane 型構造生合成のカラクリ（異常な連続骨格転位反応）[1]」を解明し、また共同研究にて、②インドールジテルペンにおける「Lolitremane 骨格形成（ラジカル機構による立体選択的環化反応）[2]」、③「Shimalactone 生合成におけるダブルビシクロ環化反応における生合成の謎（立体選択性に酵素は必要なのか？）[3]」、ならびに④「PreasperterpenoidA の生合成経路に 2 級カチオンは本当に現れるのか？[4]」などを明らかにすることができた。本稿では、紙面の都合上、①「Brasilane 型構造生合成のカラクリ（異常な連続骨格転位反応）[1]」についてのみ、詳細を述べる。

方　法

本研究で用いたすべての計算は、Gaussian16 プログラム上で行い、必要に応じて GRRM11 プログラムを援用し行った。構造最適化は、6-31+G（d,p）系基底を用いて気相中における M06-2X レベルで計算を行った。振動解析は、構造最適化と同じレベルで計算し、各最適化された構造がエネルギー最小値（虚振動なし）か遷移状態（単一の虚振動をもつ）かを確認した。遷移構造から対応する局所最小値までのエネルギーの最小経路を追跡するために、固有反応座標（IRC）計算を行った。必要に応じて、高いレベルでの一点計算を行い、エネルギーや電荷の偏りなどを比較・解析した。本研究での議論に用いた「Gibbs 自由エネルギー」は、気相 Gibbs 自由エネルギー補正を加えて計算した。溶媒効果について検討が必要な場合には、連続誘電体モデル（PCM）を用いた SCRF 法により評価した。

結　果

1.　Brasilane（ブラシラン）型骨格生合成に関するこれまでの研究背景

C15 セスキテルペノイドは、香料・香水や医薬品候補分子としての利用など、工業的および商業的に幅広い用途を持つテルペノイドである。セスキテルペノイドには、6 員環上にジメチル基とイソプロピル基を持つビシクロ[4.3.0]ノナン骨格を持つブラジラン型構造がよく知られる。しかしながら、その生合成経路やメカニズムは、謎に包まれていた。最近、独立に 2 つのグループから、ブラジレン型の骨格を構築するテルペンシクラーゼを同定したとの報告があった。その一つのグループである葛山らはさらに、同位体標識実験を行い（図 1A）、図 1B に示すような複雑な生合成経路を提案した：(i) 1,3–水素（H）移動（C9→C6）、(ii) σ 結合（C6–C7）開裂、(iii) σ 結合（C8–C9）開裂、(iv) σ 結合（C6–C9）形成、(v) π 結合（C7–C9）形成、および (vi) 水酸化（C8 炭素上）が、一段階に含まれている。しかし、この提案された複雑な骨格転位反応には議論の余地がある。例えば、Woodward-Hoffmann 則では、熱的条件下での 1,3–水素移動（suprafacial1,3–sigmatropicrearrangement）を禁じている。さらに、5 つの炭素が結合している場所が 2 組（C6 と C9）あるが、このような高度に歪んだ遷移状態（TS）構造は、軌道相互作用から判断して、エネルギー的に不利なはずである。また、この反応機構では、なぜ水分子が C8 の位置でしか反応しないのかを説明することができない。そこで、筆者らは、提案されているトリコブラシレノールの生合成経路を理論計算で再評価することから研究を始めた。理論計算の結果は、高度に協奏的な多重骨格転位を支持するものではなかった。次に、我々は生合成経路を網羅的に解析し、これまでの生合成実験研究の結果とよく一致する新たな経路を明らかにすることができた。

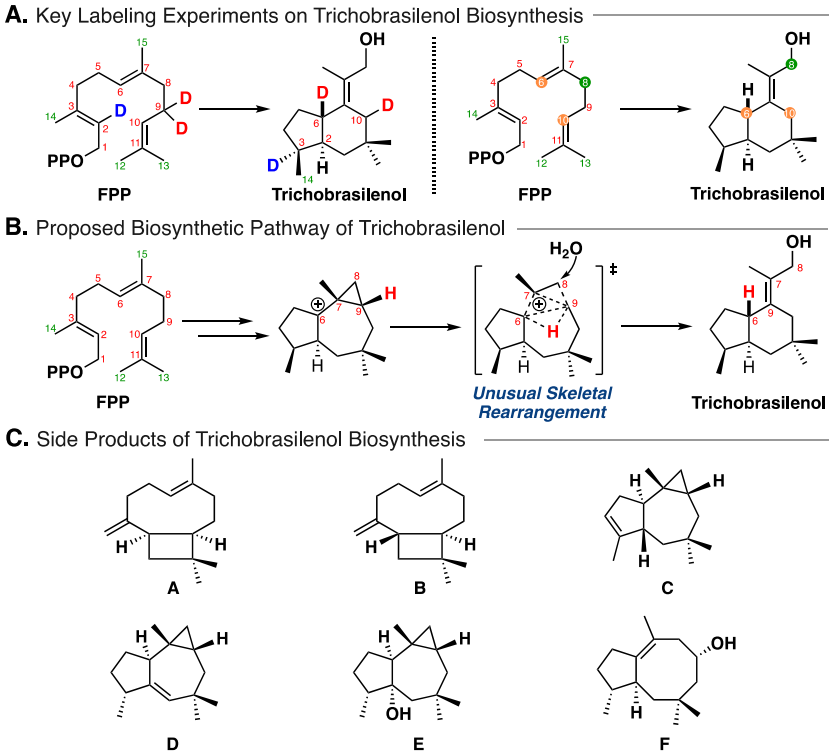


図1. Trichobrasilenolの生合成に関するこれまでの研究背景

A) 同位体標識実験の結果。

B) 提案されていた生合成経路。

C) 生合成過程でみられる副生成物。

2. 理論計算により新たなに提案する生合成経路

理論計算により、今回新たに提案することができた生合成経路を図 2 に示す。本反応は、原料である FPP から二リン酸が酵素によって脱離されることによって開始される。生成するアリルカチオン中間体（**M1**）は、遠位の C10–C11 二重結合とのカチオン–π 相互作用によって部分的に安定化されていることが、電荷解析によっても明らかとなった。こうして、カチオンを介する閉環反応は円滑に進行し、いわゆるフムリルカチオン（**IM2**）を形成し、これは 1,2–水素移動を経て、大きな安定化エネルギーを持つ最初のホモアリルカチオン（**IM3**）を与えた。**IM3** の電荷分布から明らかなように、「ホモアリルカチオン（**IM3**）」は対応する「シクロプロピルカルビニルカチオン」と平衡状態にあり、高度に歪んだシクロプロパン環の C–C 結合が隣接するカルボカチオンを効果的に安定化していることが判明した。こうして、**IM3** は 2 級カルボカチオンであるにもかかわらず、予想外に安定であることがわかった。その後、シクロプロピルカルビニルカチオンを介して第 2／第 3 の環化反応が起こり、5／7／3 三環式中間体 **IM4** が形成する。その後、3 級カルボカチオンの相互変換を伴う 2 つの連続的な 1，2–水素移動が起こり、続いて 1，3–カチオン移動が進行し、最も安定な（シクロプロピルカルビニル）3 級カチオン **IM6a** が形成される。その後、非常に小さな活性化障壁を持つ **TS_6a-6b** を介した **IM6a** の中央 7 員環の構造変化により、別のシクロプロピルカルビニルカチオン **IM6b** が得られる（C5–C6–C7–C9 の二面角は 170.7°から 138.8°に変化している）。中間体 **IM6b** は非常に歪んだシクロプロパン環を有しており、C7–C9 結合の伸長（1.64 Å）と短い C6–C7 結合（1.39 Å）からも明らかなように、伸長した C7–C9σ 軌道が隣接する C6 カルボカチオンの安定化に寄与していることが判明した。**TS_6b-7a** を経由して、5／6 の二環式中間体（**IM7a**）を生成しながら、環縮小を伴う異常な骨格転位が進行する。詳細な IRC 解析の結果、このステップには 3 つの化学反応が含まれていることがわかった：(i) 5／7／3 から 5／6／4 三環系への骨格の転位によるシクロブチル 3 級カチオン（**shoulder_6b-7a**）の生成、(ii) C8–C9σ 結合の切断と C7–C9π 結合の形成によるホモアリルカチオン　（**TS_6b-7a**）の形成、(iii) イソプロペニル基の 1，2–移動（**shoulder2_6b-7a**）による新たなホモアリルカチオン（**IM7a**）。**IM7a**

は、ブラジラン型構造によく見られる 6 員環上のジメチル基とイソプロピル基を持つビシクロ[4.3.0]ノナン骨格を既に有している。活性化障壁の小さい **IM7a** から **IM7d** へのコンフォメーション変化の後、1，2–水素移動が起こり、エネルギー的により安定なアリルカルボカチオン **IM8** が生成する。最後に、C8 位で S_N2'型の水和反応が進行し、トリコブラシレノールが生合成される。

理論計算によって得られたこの新たな経路は、熱力学的にも速度論的にも有利な経路であることが明らかとなった。すなわち、(1) 20 kcal mol^{-1}以上のエネルギー障壁は全く存在せず、(2) 全体を通して得られる安定化エネルギーは約 30 kcal mol^{-1}と大きい。ユニークな骨格転位（**IM6b→TS_6b-7a**）には 16.6 kcal mol^{-1}の活性化エネルギーが必要で、この生合成の反応速度を決定するステップであった。これは、上記 (i) ～ (iii) の 3 つの化学イベントが 1 つのステップに含まれていることに起因していると考えられる。それにもかかわらず、この活性化エネルギーの値は、常温で反応がスムーズに進行するに十分である。

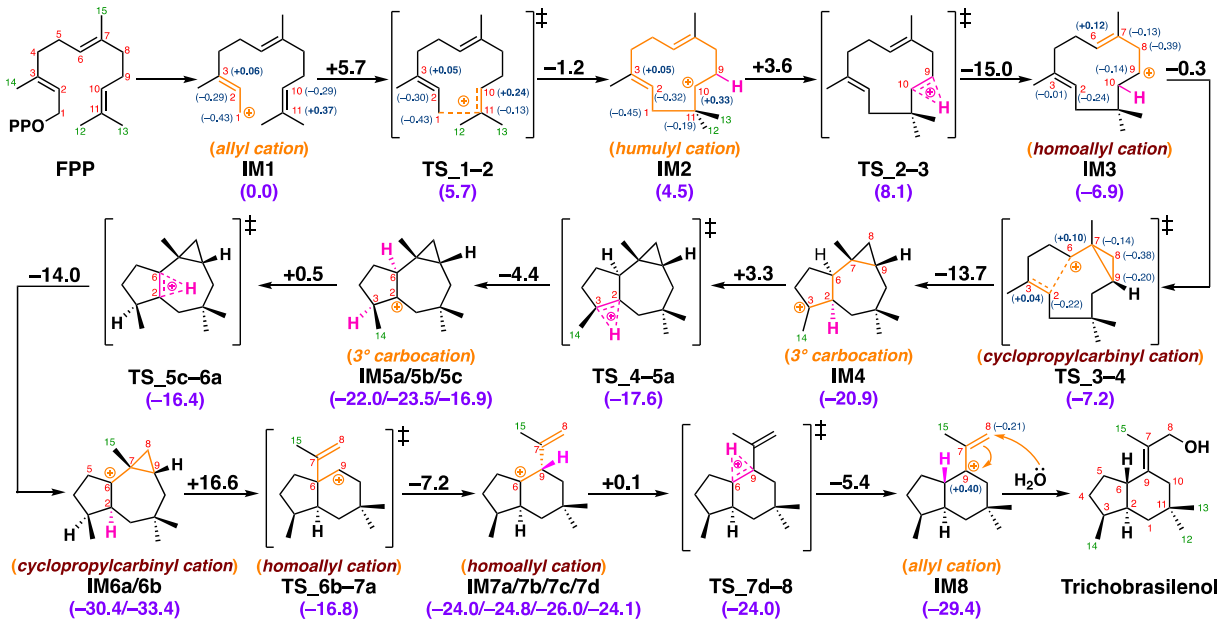


図2. Trichobrasilenolの新たな生合成経路

IM1に対するポテンシャルエネルギー（k cal mol^{-1}、M06-2X/6-31+G（d,p）で計算した構造に対して、mPW1PW91/6-31+G（d,p）レベルで1点計算したギブス自由エネルギー）を紫字で示す。**IM**は中間状態を示す。**TS**は遷移状態を示す。mPW1PW91/6-31+G（d,p）レベルで計算したNPA電荷（au）を青字で示す。

さらに、この新たに提案した生合成経路／機構は、副生するテルペン／テルペノイドの合理的な生合成の説明も可能であった（図 3）。例えば、副生成物 **A** および **B** は **IM2** から C2–C3π 結合が閉環した結果得られたと考えられ、副生成物 **C**、**D/E**、および **F** は、対応する **IM** のエピマー（それぞれ **2-epi-IM4**、**3-epi-IM5**、および **3-epi-IM6b**）から生合成されているように見える。我々は、トリコブラシレノールテルペンシクラーゼ（TaTC6）は **FPP** の（C2–C3 結合に関する）構造異性体を受け入れることができると仮定しているが、結果として得られるエピマー中間体は、より低い親和性のために活性部位から容易に放出される可能性がある。さらに、この経路は、コノセファレノール、ブラシラ-5(10),6-ジエン、ブラシラ-1(6),5(10)-ジエン、トレフォラン A のような他のタイプのブラシラン型セスキテルペンを導く汎用性の高い生合成経路とみなすことができる。また、**shoulder_6b-7a** はトリコブラシレノール生合成の一過性の構造ではあるが、その 3–エピマー体は、トレフォラン A 生合成の中間体である可能性が高い。これらのブラシラン型セスキテルペンの合成を担うテルペンシクラーゼの構造を慎重に比較することは、酵素がその基質の構造の多様化をどのように制御しているかを解明するのに役立つと考えられ、酵素工学にも役立つはずである。

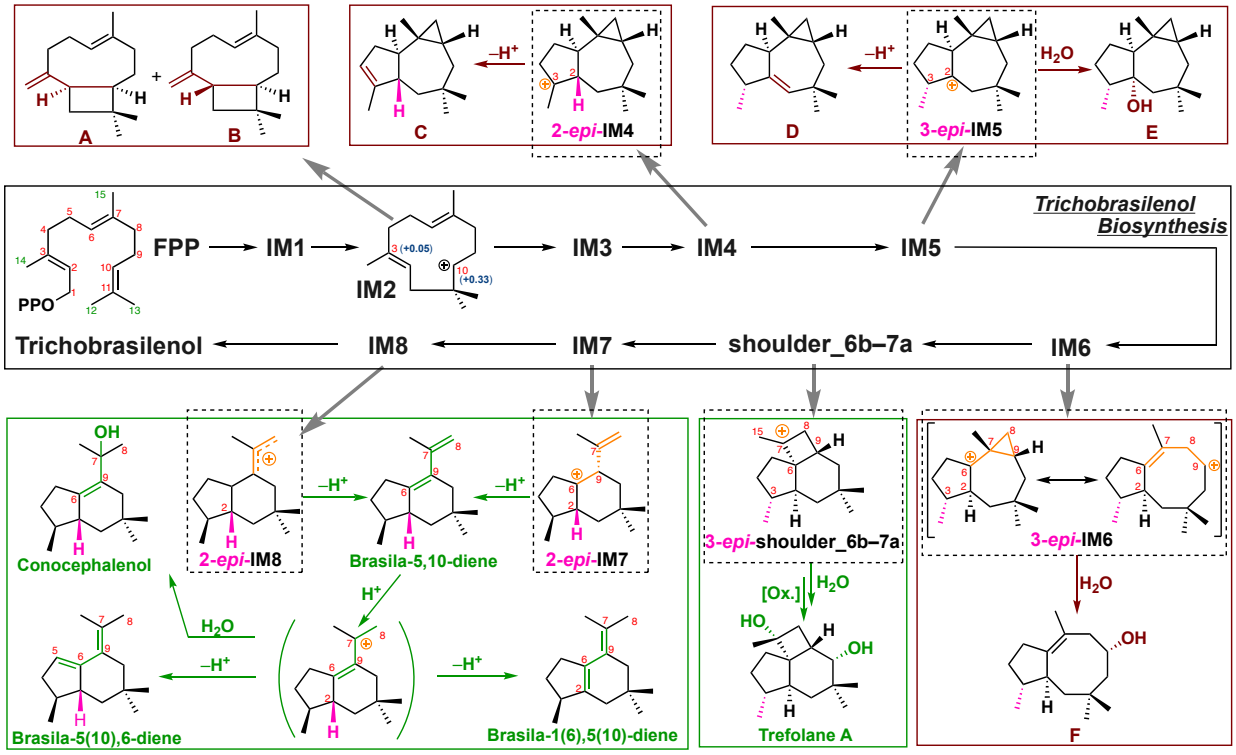


図 3. Trichobrasilenol の新たな生合成経路とその関連化合物の生合成経路の接点

考　察

本研究を通じて、理論計算が生合成機構解析にも極めて有効なツールとなることを示せた。生合成は、多段階にわたる化学反応が、極めて短時間で、連続的に行われる。一般に、化学反応は、「フェムト（千兆分の一）秒」という超短時間に起こることが多く、実（験的観）測は極めて困難である。このことは、生合成経路を実験化学的手法だけを用いて全貌解明することが非常に難しいことを示している。本研究では、理論化学・計算化学を駆使して分子の動きをスナップショットで取りだし、スローモーションにして“見る”方法を開発し、一つひとつの化学反応を原子・電子レベルで“診る”ことで、生合成経路の謎に迫った。コンピューターの目覚ましい進歩と理論の進化によって、計算化学も実験化学と足並みを揃えられるようになってきた。経験と実測を得意とする『実験化学』に、理論を武器とする『計算化学』が加わると、生合成研究に新たな世界が拓けると信じている。理論計算によって得られる三次元構造や立体電子構造は実験化学者の直感を刺激し、また計算化学により思いがけない未知の構造や機構と出会うこともある。理論と実験の協奏により、「超連続」「触媒」反応である生合成経路・遷移状態を正確に理解することで、新たな天然物化学研究を展開したいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究成果は、山梨大学大学院総合研究部の佐藤玄特任助教との共同研究である。また、本研究成果の一部は、主に実験を担当して頂いた方々との共同研究によって実現したものである。岩手医科大学薬学部の藤井勲教授、千葉大学大学院薬学研究科の山崎真巳教授、北海道大学大学院理学研究科の及川英秋教授ならびにその研究室の共同研究者の方々に感謝する。

文　献

1) Sato H, Hashishin T, Kanazawa J, Miyamoto K, Uchiyama M. DFT Study of a Missing Piece in Brasilane-Type Structure Biosynthesis: An Unusual Skeletal Rearrangement. J Am Chem Soc. 2020 Nov 25;142 (47):19830-19834. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33124823 DOI: 10.1021/jacs.0c09616.

2) Jiang Y, Ozaki T, Harada M, Miyasaka T, Sato H, Miyamoto K, Kanazawa J, Liu C, Maruyama JI, Adachi M, Nakazaki A, Nishikawa T, Uchiyama M, Minami A, Oikawa H. Biosynthesis of Indole Diterpene Lolitrems: Radical-Induced Cyclization of an Epoxyalcohol Affording a Characteristic Lolitremane Skeleton. Angew Chem Int Ed Engl. 2020 Oct 5;59 (41):17996-18002. Epub 2020 Aug 18. PMID: 32677206 DOI: 10.1002/anie.202007280.

3) Fujii I, Hashimoto M, Konishi K, Unezawa A, Sakuraba H, Suzuki K, Tsushima H, Iwasaki M, Yoshida S, Kudo A, Fujita R, Hichiwa A, Saito K, Asano T, Ishikawa J, Wakana D, Goda Y, Watanabe A, Watanabe M, Masumoto Y, Kanazawa J, Sato H, Uchiyama M. Shimalactone Biosynthesis Involves Spontaneous Double Bicyclo-Ring Formation with 8π-6π Electrocyclization. Angew Chem Int Ed Engl. 2020 May 25;59 (22):8464-8470. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32129542 DOI: 10.1002/anie.202001024.

4) Sato H, Yamazaki M, Uchiyama M. DFT Study on the Biosynthesis of Preasperterpenoid A: Role of Secondary Carbocations in the Carbocation Cascade. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2020;68 (5):487-490. PMID: 32378547 DOI: 10.1248/cpb.c20-00037.