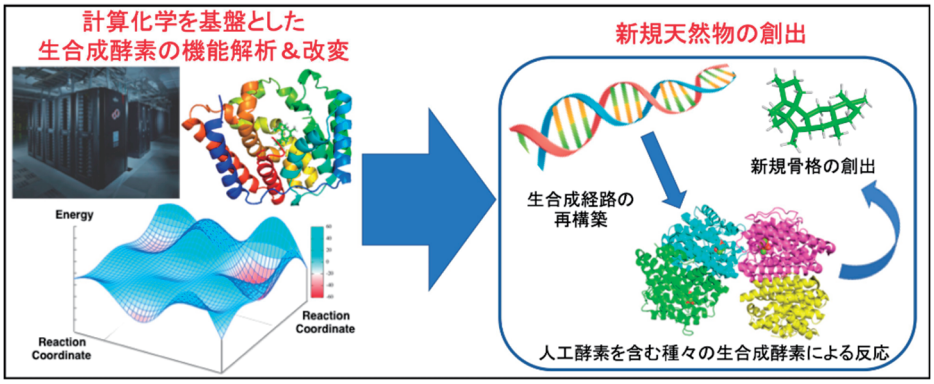
105　計算化学に基づいたテルペン環化酵素の機能解析	佐藤　玄

【目的】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（ポリペプチド）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いる。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、プラスチックの改質剤、香料、洗浄剤、電子材料等、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衣食住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。天然物化学・生合成研究の新たなチャレンジ：20 世紀に入り、バイオテクノロジーの進歩と相まって様々な天然物の生合成遺伝子・酵素が発見された。さらに近年、人工的に生合成経路を再構築する合成生物学的手法が注目を集めている。植物など成長の遅い生物種の生合成遺伝子を大腸菌などに導入（異種発現）することにより、大量かつ安定的に天然物の安定供給が行えると期待されている。しかし、新奇天然物の効率的創出法は未だ存在しない。これは、従来の実験科学を主とする研究手法では酵素反応機構や基質認識メカニズムを完全に解明することが困難であることが大きな要因であり、このことが生合成遺伝子の二次利用を阻んでいる。そこで本研究では、理論と実験の両輪により、酵素反応機構を明らかにし、天然物がどのようにして構造多様性を創出しているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】すべての計算は、Gaussian 16 パッケージを使用して行った。構造最適化は、M06-2X/6-31＋G（d,p）を用いて行った。最適化と同じ計算レベルでの振動数計算を行い、すべての中間体が虚振動を持たないこと、各遷移状態が単一の虚振動を持つことを確認した。すべての遷移状態の IRC（Intrinsic Reaction Coordinate：固有反応座標）計算は、Gaussian 16 に基づく GRRM17 で実施した。

【結果】本研究課題では、spiroalbatene、scalarane、peniroquesine という 3 種のテルペン化合物の生合成反応機構を、計算化学的手法を用いることにより解析した。Spiroalbatene 生合成では、cyclopropylcarbinyl cation という非古典的カチオン種が中間体として存在することが予想されていた。しかし、計算の結果そのような非古典的カチオン種は生成しないことが明らかとなった。また、詳細な解析の結果、その制御がどのようにして行われているのかについて明らかにすることが出来た。Scalarane 型セスタテルペノイドの生合成反応機構解析では、ステロイド骨格における 7 員環生成機構のメカニズムを明らかにした。遠隔位に存在する Me 基によって協奏性と活性化エネルギーが制御されていることも明らかにした。また、peniroquesine 生合成では、複雑な骨格転位反応のメカニズムについて明らかにすることが出来た。

計算化学を用いた天然物生合成機構の解明



105. 計算化学に基づいたテルペン環化酵素の機能解析

佐藤　玄

山梨大学 大学院総合研究部 物質科学系

Key words：テルペン，生合成，DFT

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（ポリペプチド）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いる。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、プラスチックの改質剤、香料、洗浄剤、電子材料等、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衣食住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。

テルペン環化酵素は、超連続多段階反応によって複雑な骨格を構築する。実験科学的手法のみでは、反応機構の詳細を明らかにすることは困難である。我々は、実験科学的手法に計算化学的手法を組み合わせることにより、これまでに種々のテルペン環化酵素の生合成機構の詳細を明らかにしてきた。

本研究課題では、spiroalbatene、scalarane、peniroquesine という 3 種のテルペン化合物の生合成反応機構を、計算化学的手法を用いることにより解析した。

方　法

すべての計算は、Gaussian 16 パッケージを使用して行った。構造最適化は、M06-2X/6-31＋G（d,p）を用いて、対称性の制約を受けずに行われた。最適化と同じ計算レベルでの振動数計算を行い、すべての中間体が虚振動を持たないこと、各遷移状態が単一の虚振動を持つことを確認した。すべての遷移状態の IRC（Intrinsic Reaction Coordinate：固有反応座標）計算は、Gaussian 16 に基づく GRRM17 で実施した。

結果および考察

1.　Spiroalbatene 生合成

Spiroalbatene は、*Allokutzneria albata* よりを単離されたジテルペン化合物である［1］。予想生合成経路では、cyclopropylcarbinyl cation という非古典的カチオン種が中間体として存在することが予想されていた。我々は、これまで種々のテルペン環化酵素の解析をしてきており、さまざまな非古典的カチオン種を明らかにしてきた。しかし、spiroalbatene のような立体化学的に混み合った化合物において 3 員環形成反応が進行するかは疑問であった。そこで、我々は計算化学的手法を用いて spiroalbatene 生合成の反応機構について精査することにした。計算の結果、大きく 3 つの新たな知見が得られた。1）spiroalabatene 生合成では環化の初期過程で *E/Z* 異性化が進行している、2）cyclopropylcarbinyl cation のような非古典的カチオン種は中間体として存在しない、3）spiroalbatene 生合成では一見遠回りに見える転位反応が進行することが明らかとなった。さらに詳細な解析の結果、IM5 における 10 員環部分の立体的制約により 3 員環生成反応が進行しないことが明らかとなった。本研究成果は、今後のテルペン環化酵素の人

工設計や合理的機能改変に有用な知見を与えるものと考えられる。

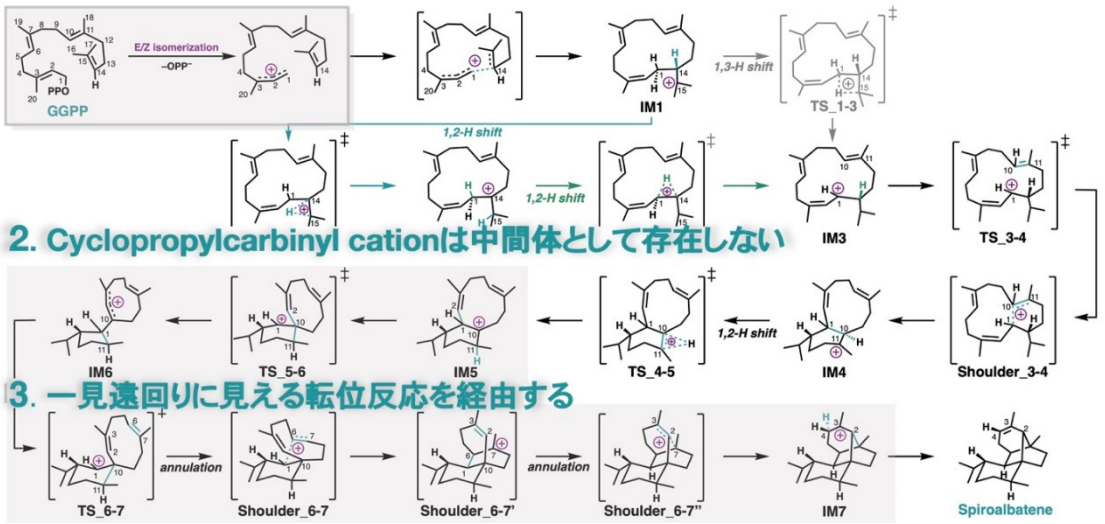


図 1. Spiroalabatene 生合成反応機構解析の結果

2. Scalarane 型セスタテルペノイドの生合成

反応機構解析では、ステロイド骨格における 7 員環生成機構のメカニズムを明らかにした。Scalarane 型セスタテルペノイドの生合成では、図 2B 左の構造に示すように 6 員環部分が開環した後に、転位反応が進行して 7 員環が構築される［2］。その際に図 2B に示す共鳴構造が可能である。我々は、カチオンの安定性について調べるために 8 位の Me 基を置換した人工基質を作製して計算を行った。その結果、図 2C に示すように遠隔位に存在する Me 基によって協奏性と活性化エネルギーが制御されていることを明らかにした。テルペン環化酵素では、反応制御に基質の Me 基が関与していることが示唆されている。本研究結果は、テルペン環化酵素の基質認識と反応制御機構に新たな知見を与えるものと考える。本研究は、*Chem. Eur. J.* 誌に掲載された［3］。

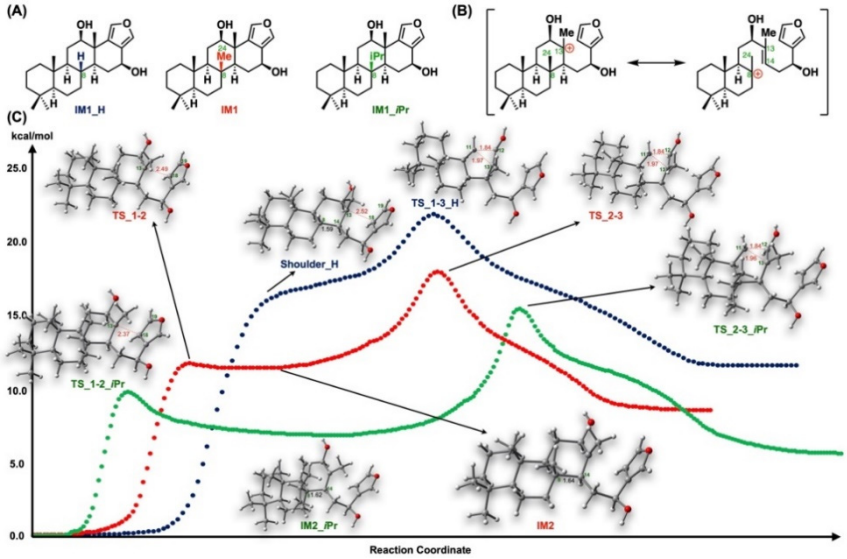


図 2. Scalarane 型セスタテルペノイド生合成での遠隔位 Me 基の効果

A) IM1_H: C8 位を Me 基に置換したモデル中間体、IM1_iPr: C8 位を iPr 基質に置換したモデル中間体。

B) 環拡大反応の中間体における平衡状態。

C) C8 位の置換基を変化させた際のエネルギーダイヤグラム。

3. Peniroquesine 生合成

Peniroquesine は、*Penicillium roqueforti YJ-14* から単離されたセスタテルペノイドである［4］。図 3 に示すように、当初の予想生合成経路では、一般的に不安定とされる 2 級カチオンが 3 連続で生成することが示唆されていた。また、生合成終盤において、7/4 員環の縮環部分において複雑な転位反応が進行して 6/5 員環の D/E 環部分が構築されていたが、こちらの詳細なメカニズムも未解明であった。我々は、計算化学的手法を用いて、この複雑な環化メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、10 段階以上にも及ぶ超連続多段階反応を計算機上で再現することに成功した。 2 級カチオンは、実際には中間体としては存在せず、transient な構造として存在し、協奏的に反応が進行することが明らかとなった。また、転位反応に関しては縮環部分の立体配座が非常に重要であることが明らかとなった。本研究は、*JACSAu* 誌に掲載された［5］。

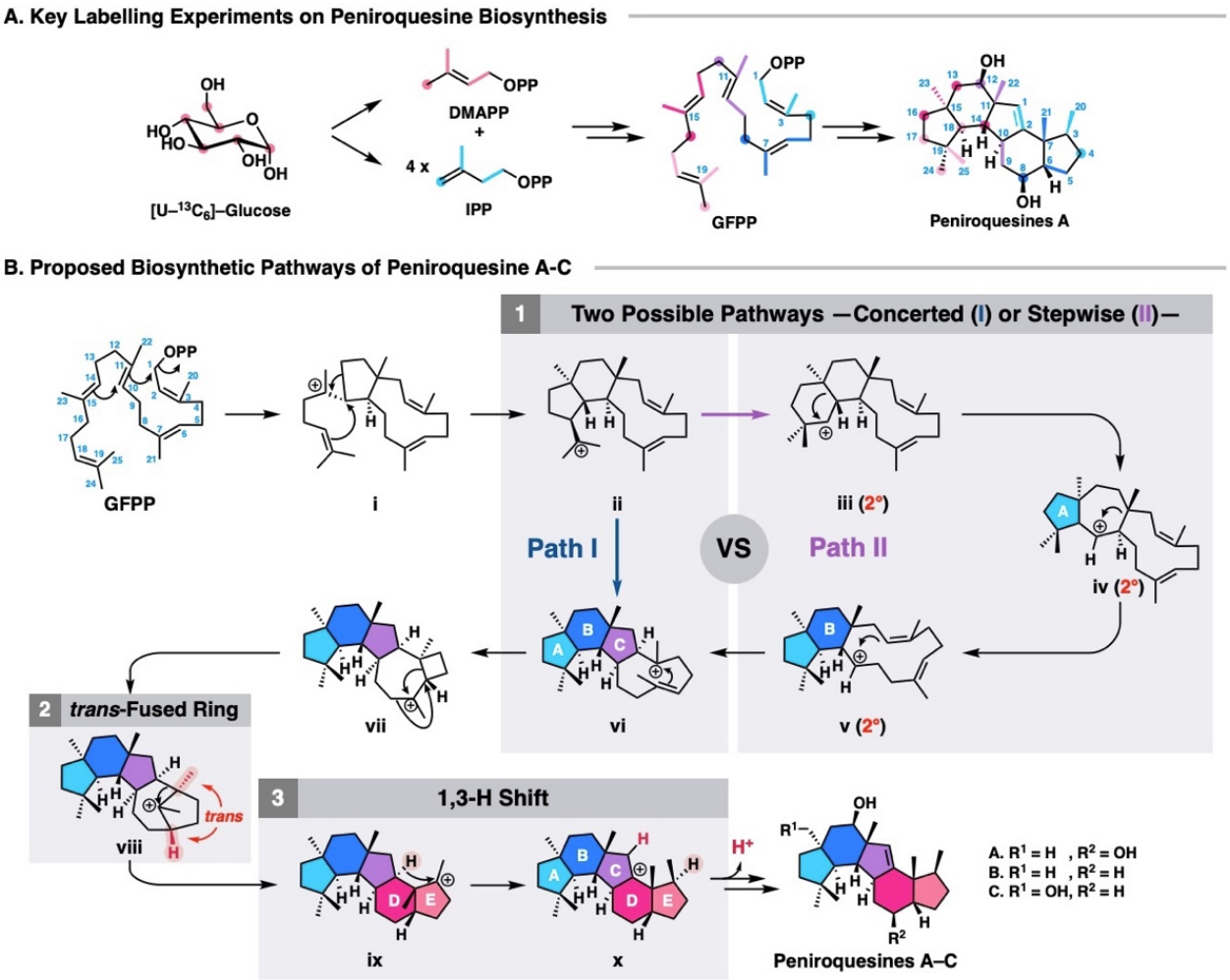


図3. Peniroquesine生合成での予想生合成反応機構

A）Peniroquesineの標識実験の結果。

B）Peniroquesineの予想生合成経路。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科基礎有機化学研究室の内山真伸教授である。

文 献

1) Rinkel J, Lauterbach L, Rabe P, Dickschat JS. Two Diterpene Synthases for Spiroalbatene and Cembrene A from Allokutzneria albata. Angew Chem Int Ed Engl. 2018 Mar 12;57(12):3238–3241. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29377369 DOI: 10.1002/anie.201800385

2) Mahidol C, Prawat H, Sangpetsiripan S, Ruchirawat S. Bioactive scalaranes from the Thai sponge Hyrtios gumminae. J Nat Prod. 2009 Oct;72(10):1870–1874. Epub 2009 Sep 29. PMID: 19788270 DOI: 10.1021/np900267v

3) Sato H, Nakano M. Concertedness and activation energy control by distal methyl group during ring contraction/expansion in scalarane-type sesterterpenoid biosynthesis. Chemistry. Wiley; 2022 Nov 21;e202203076. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36411271 DOI: 10.1002/chem.202203076

4) Wang JP, Yu J, Shu Y, Shi YX, Luo P, Cai L, Ding ZT. Peniroquesines A-C: Sesterterpenoids Possessing a 5-6-5-6-5-Fused Pentacyclic Ring System from Penicillium roqueforti YJ-14. Org Lett. 2018 Sep 21;20(18):5853–5856. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30156854 DOI: 10.1021/acs.orglett.8b02534

5) Matsuyama T, Togashi K, Nakano M, Sato H, Uchiyama M. Revision of Peniroquesine Biosynthetic Pathway by Retro-biosynthetic Theoretical Analysis: Ring Strain Controls the Unique Carbocation Rearrangement Cascade. JACS Au, 2023 May 15;3(6):1596-1603. Epub 2023 Jun 26. PMID: 37388688 DOI: 10.1021/jacsau.3c00039