

学 位 論 文 題 名

生体内 Diels-Alder 反応を触媒するソラナピロン
合成酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

周辺環状反応の一つである Diels-Alder 反応は、ジエンとジエノフィルの [4+2]環化付加反応であり、その立体選択性、反応性および位置選択性は Woodward-Hoffmann 則、フロンティア軌道理論によって説明される。またこの反応は一挙に 6 員環を形成でき、しかも立体選択性ならびに位置選択性の制御が比較的容易なことから、多環系の化合物などの天然生理活性物質の合成に多用される有機合成化学上最も重要な反応の一つである。以前からテルペン、ポリケタイド、アルカロイド化合物などの天然物の生合成において、この Diels-Alder 反応がその骨格形成に関与していると推定される化合物が多く単離されており、いくつかの化合物については生合成研究も行われている。それらの生合成研究の中で、環化直前のジエンとジエノフィルを備えた前駆体の取り込み実験により生体内 Diels-Alder 反応の直接的な証明に成功した例はこれまでになかった。しかしながら、バレイシヨ夏疫病菌 *Alternaria solani* の生産する植物毒素ソラナピロン類の生合成研究では、各種標識化合物の取り込み実験から炭素骨格および酸素原子の起源を決定するとともに、環化前駆体プロソラナピロン類の菌体への取り込み実験により生体内 Diels-Alder 反応を直接的に証明することに初めて成功した。また前駆体のプロソラナピロン類が不斉中

心を持たないにも関わらず、ソラナビロン類は天然から光学活性体として得られることから、Diels-Alder 反応を触媒する酵素の存在が示唆されていた。本論文は、このソラナビロン生合成に関わるこれまでに例を見ない、Diels-Alder 反応触媒酵素の精製と、この酵素の性質についてまとめたものである。

まず、基質となるプロソラナビロン類を合成し、その非酵素的 Diels-Alder 反応について検討したところ、酸化段階が進むにつれてその反応性が飛躍的に高くなることが明らかになった。また、有機溶媒中での反応に比べて、水溶液中では反応の加速と非常に高い *endo* 選択性を示すことが明らかとなった。天然から得られるソラナビロン類は *exo* 体が優先して生成しているため、酵素反応と非酵素反応は生成物を HPLC 分析することにより容易に区別できると考えられた。

酵素活性は、セリンプロテアーゼ阻害剤であるふっ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を抽出緩衝液に加えることで、無細胞抽出液中に見いだされた。酵素活性は不安定であったが、リン酸緩衝液にグリセロールを 30% 加えることで安定化した。アルデヒド体のプロソラナビロン III を基質として加えた場合には、環化生成物のソラナビロン A (*exo*)、D (*endo*) が、アルコール体のプロソラナビロン II を基質とした場合には酸化生成物のプロソラナビロン III およびそれが環化したソラナビロン A (*exo*)、D (*endo*) が生成した。環化生成物はいずれの基質の場合にも *exo* 体が優先して生成していた。粗抽出液は硫酸による塩析操作、DEAE-Sephrose FF による陰イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、MZE 3328 IV 緩衝液系を用いた分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、Phenyl-Sephrose HR による疎水クロマト

グラフィーにより順次精製し、比活性は約 3,000 倍にまで精製された。スラブ SDS-PAGE による活性タンパクの切り出しを試みたが、バンドの特定には至らなかった。上で述べた精製段階において、プロソラナビロン II から III への酸化活性ならびにプロソラナビロン III からソラナビロン A および D への環化活性は分離されることはなかった。

本酵素の等電点は等電点電気泳動および Mono P HR 5/5 を用いたクロマトフォーカシングから $pI = 4.2$ 、その分子量は、Superdex 200 HR 10/30 によるゲル濾過の溶出位置から 48,000~62,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の活性バンドの位置から 40,000~42,000 と推定され、単量体酵素であると考えられる。至適 pH 7.0 (リン酸緩衝液中) を示し、プロソラナビロン II から III への酸化反応と III からソラナビロン A および D への Diels-Alder 反応を触媒する二機能性酵素 (bifunctional enzyme) であると考えられる。酸化反応はアルゴン雰囲気下ではほとんど進行せず、また分子状酸素の消費と過酸化水素の生成が認められることから、オキシダーゼ型の酸化活性であった。この酵素は $NAD(P)^+$ の要求性を示さない。Diels-Alder 反応は *exo* 優先的に進行し、酵素反応生成物はフローセルを備えた CD 分光計を検出器として用いた HPLC 分析から高い光学純度を有することがわかった。

本酵素の基質特異性を調べるために種々の基質アナログを合成し、酵素反応を行った結果、本酵素はピロン環の置換様式を厳密に認識していると予想され、また疎水性側鎖の長さは酸化反応速度に影響を与えた。また、*exo* 付加体のアルコールであるソラナビロン B が酸化の良い基質となることから、プロソラナビロンのトリエン側鎖は *exo* 付加の遷移状態が安定化されるように酵素と結合す

るものと予想される。

本酵素のプロソラナビロン II および III に対するミカエリス定数 K_m は $16 \mu\text{M}$ および $37 \mu\text{M}$ であり、非常に高い基質親和性を示した。部分精製した酵素について、触媒中心活性 k_{cat} をその最低値として求めた。本酵素により、水中の Diels-Alder 反応の速度に比べて、*endo* 付加の速度は 1,200 倍以上、*exo* 付加の速度は 270,000 倍以上に加速された。Diels-Alder 反応を触媒する触媒抗体、およびペリ環状反応であるクライゼン転移を触媒するコリスメートムターゼと、触媒としての性能を比較したところ、 k_{cat}/K_m の値は抗体酵素のおよそ 10 倍以上の値を示し、本酵素の触媒性能の高さが証明された。コリスメートムターゼの k_{cat}/K_m の値と比較すると、 $1/60$ となるが、本酵素が未精製であることを考慮すると、十分にコリスメートムターゼに匹敵あるいは上回る性能を有するものと考えられる。

以上の結果から、Diels-Alder 反応を触媒する酵素 (Diels-Alderase) の初めの実証に成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 原 耿 民

副 査 教 授 本 間 守

副 査 教 授 小 林 淳 一

学 位 論 文 題 名

生体内 Diels-Alder 反応を触媒するソラナピロン

合成酵素に関する研究

本論文は和文 93 頁、図 32、スキーム 5、表 7、引用文献 73、3 章および実験部からなり、ほかに参考論文 6 編が付されている。

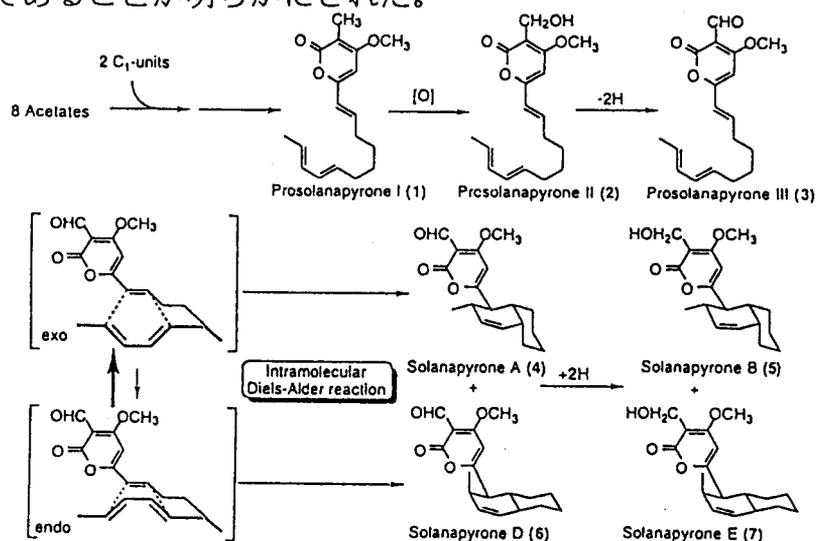
Diels-Alder 反応はジエンとジエノフィルの [4+2] 環化付加反応であり、一挙に 6 員環を形成することができ、しかも立体選択性、位置選択性の制御が可能なることから、多環系天然生理活性物質の合成に汎用されてきた。一方天然有機化合物であるポリケチド、テルペン、アルカロイドなどの骨格形成に、Diels-Alder 反応の関与する可能性が多く研究者により指摘されてきており、いくつかの化合物については生合成研究も行われている。しかし現在まで直接前駆体を取り込ませ生体内 Diels-Alder 反応の存在を証明した例はなかった。本研究ではバレイショ夏疫病菌の生産する植物毒素ソラナピロン(4)の生合成研究において、前駆体の菌体への取り込み実験により生体内 Diels-Alder 反応の存在を初めて証明し、関与する Diels-Alder 反応を触媒する酵素の精製と性質についてまとめたものである。

第一章はまず基質となるプロソラナピロン類の改良合成法を検討し、以前の合成法で隘路となっていたアルドール縮合の段階の改良を行った。この方法を活用し多数のプロソラナピロン類縁体の合成法についても述べられている。

第二章では Diels-Alder 反応を触媒する酵素の抽出および精製について述べられ以下の結果を得ている。セリンプロテアーゼ阻害剤であるふっ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を抽出緩衝液に加えた無細胞抽出液に酵素活性を見出しこの酵素活性は不安定であったが、リン酸緩衝液にグリセロールを 30% 加えることで安定化した。部分精製した酵素を用いてプロソラナピロンⅢ(3) を基質として加えた場合には環化生成物、ソラナピロン A(4) と D(6) が、プロソラナピロンⅡ(2) を基質とした場合にはソラナピロン A(4) と D(6) のほかにプロソラナピロンⅢ(3) も生成しており、いずれの場合も天然存在比と同様に光学活性ソラナピロン A(4) を優先的に生成していた。なお非酵素的 Diels-Alder 反応ではソラナピロン D(6) が優先的に生成することが明らかにされている。粗抽出液は硫酸による塩析操作、DEAE-Sepharose FF による

陰イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、疎水クロマトグラフィーにより順次精製し、比活性は約 3000 倍にまで精製されている。

本酵素は等電点 $pI=4.2$ の可溶性タンパク質で、その分子量はゲル濾過の溶出位置から 48,000~62,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の活性バンドの位置から 40,000~42,000 と推定され、単量体酵素であると考えられる。至適 $pH7.0$ を示し、プロソラナピロン II (2) から III (3) への酸化反応と III (3) からソラナピロン A (4) および D (6) への Diels-Alder 反応を触媒する二機能性酵素 (bifunctional enzyme) である。酸化反応は分子状酸素を消費し過酸化水素を生成することから、オキシダーゼ型の酵素によるものであることが明らかにされた。



第三章では本酵素の基質特異性と速度論的解析を行っている。まず合成したプロソラナピロン類縁体につき酵素反応を検討し、ソラナピロン B (5) が酸化の良い基質となることから、反応の遷移状態の立体配座を推定している。本酵素のプロソラナピロン II (2) および III (3) に対する K_m は $16 \mu M$ および $37 \mu M$ であり、非常に高い基質親和性を示した。触媒中心活性 K_{cat} を求めたところ、水中の付加環化速度に比べて、ソラナピロン A (4) の生成速度は 270,000 倍以上に加速されていることを確認している。Diels-Alder 反応を触媒する触媒抗体と性能の比較をしたところ、 K_{cat}/K_m の値は触媒抗体のおよそ 10 倍以上の値を示し、本酵素の触媒性能の高さが証明された。シグマトロピー反応を触媒するコリスメートムターゼの K_{cat}/K_m の値と比較すると、 $1/60$ となるが、本酵素が未精製であることを考慮すると、十分コリスメートムターゼに匹敵あるいは上回る性能を有するものと考えられ、Diels-Alder 反応を触媒する酵素 (Diels-Alderase) の初めての実証に成功している。

以上、本研究は植物毒素の生合成研究により、初めて生体内 Diels-Alder 反応の存在を基質、酵素レベルで実証したものであり、生物有機化学、植物病理学、有機合成化学分野において貴重な基礎的知見を提供するものである。

よって、審査員一同は別に行った最終試験の結果と併せて、本論文の提出者片山欣哉は博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。