

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14791

研究課題名(和文) 計算化学・有機合成化学・生化学を基盤としたテルペン環化反応の解析

研究課題名(英文) Analysis of terpene cyclization reactions based on computational chemistry, synthetic organic chemistry, and biochemistry

研究代表者

佐藤 玄 (Sato, Hajime)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：80782648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、テルペン環化酵素のメカニズムを実験化学と計算化学を用いて解析した。トリフルオロメチル基を有する人工基質を合成し、カルボカチオンの求電子性向上や二重結合の電子密度低下が環化反応に与える影響とMe基の役割を明らかにした。また、spiroalbateneとpeniroquesineの生合成反応機構を解明した。本研究は、テルペン環化反応機構の深い理解と「自然に学ぶものづくり」への応用という工学的意義、およびカルボカチオンの反応性という基礎学理の追求という意義を併せ持つ。研究成果として、総説1報、原著論文3報を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、テルペン環化反応における反応制御機構の解明を目的とし、CF₃基を有する人工基質を用いて、カルボカチオンと低求核性二重結合の反応性、およびMe基の役割を明らかにすることを目指しています。この研究は、従来の実験科学的手法に加え、最新の計算化学を組み合わせた独自のアプローチを採用しており、学術的に新規性と独創性を有しています。本研究成果により、自在にテルペン化合物を生産する酵素設計や、低環境負荷型物質生産によるSDGsへの貢献の可能性を秘めています。さらに、CF₃基を有する環化生成物は、新規医薬品リード化合物や新規機能性分子としての応用が期待されるため、社会的意義も大きいと考えられます。

研究成果の概要(英文)：In this study, the mechanism of terpene cyclase was analyzed using experimental and computational chemistry. Artificial substrates with trifluoromethyl groups were synthesized to elucidate the role of the Me group and the effect of increased electrophilicity of the carbocation and decreased electron density of the double bond on the cyclization reaction. The biosynthetic reaction mechanism of spiroalbatene and peniroquesine was also elucidated. This research has both an engineering significance of deep understanding of the mechanism of terpene cyclization and its application to “manufacturing by learning from nature” and a significance of pursuing the basic science of the reactivity of carbocation. As research results, one review article and three original papers have been published.

研究分野：計算化学

キーワード：テルペン 計算化学 天然物化学

1. 研究開始当初の背景

『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、これまで薬の種として多くの医薬品や農薬を生み出してきた。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有機化合物（以下、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の成長の早い生物種に導入（異種発現）することにより、大量かつ安定に有用天然物の安定供給が可能となれば、低環境負荷型物質生産による持続可能社会の実現が期待される。また、天然の酵素を再設計・機能改変することにより、自然界には存在しない新規化合物を生産する人工的な酵素の設計技術にも注目が集まっている（図 1）。

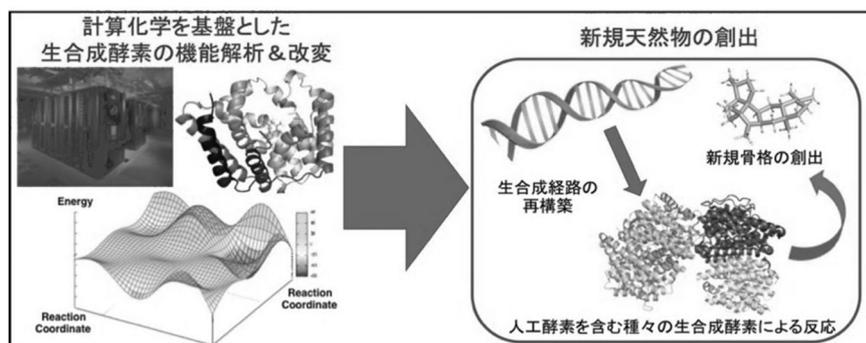


図 1. 計算化学と天然物化学の協奏による新奇天然物・植物分子の創出

人工的な酵素を設計していく上で、生合成反応機構の深い理解は必要不可欠である。しかし、8 万種以上の化合物を含む最大の天然物化合物群であるテルペン化合物でさえ、いまだに反応機構の完全解明はなされておらず、「自然界がどのようにして化合物の構造多様性を生み出しているのか？・どのようにして反応制御を行なっているのか？」などの学術的「問い」に関する答えは見つかっていないのが現状である。テルペン生合成は、「カチオンの化学」と呼ばれており、カルボカチオン中心への二重結合の π 電子による攻撃によって C-C 結合が構築される。カルボカチオンの反応性をより詳細に解析することにより、自在にテルペン化合物を生産する酵素の設計を行うことができると考えられる。

2. 研究の目的

近年の申請者らの研究 (H. Sato, *et al. Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 14752–14757.) と 2002 年の星野らの研究 (T. Hoshino *et al.*, *Chem. Commun.*, **2002**, 291–301.) によりテルペン環化反応では Me 基が反応性の調節に重要であることが示唆されている。そこで本研究課題では、テルペン環化反応の反応制御機構の解明を目的とし、強い電子求引基である CF_3 基を有する人工基質を合成し、超求電子性のカルボカチオン、低求核性二重結合の反応性、Me 基が環化反応において果たす役割、を明らかにすることを目的とし研究を行う。

3. 研究の方法

【計算化学的手法】

有機合成化学実験と生化学実験の結果に加え、DFT 計算も用いることにより閉環反応のメカニズムを精査し、活性化エネルギーや反応機構の詳細を明らかにすることを目的とする。

酵素認識に関しては、David Baker らが開発したタンパク質モデリングソフト Rosetta を使い、2017 年に Tantillo らが発表したテルペン環化酵素のドッキングシミュレーション法に従い進める (T. E. O'Brien, *et al.*, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 4009–4015.)。DFT 計算で得られた基質の初期配座の結果と比較し、Me 基がどのように初期配座に影響を与えるのかを明らかにすることを目的とする。上述の計算化学的手法を駆使して、実験科学によって得られた定性的な結果を定量化する。

4. 研究成果

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。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. spiroalbatene 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。

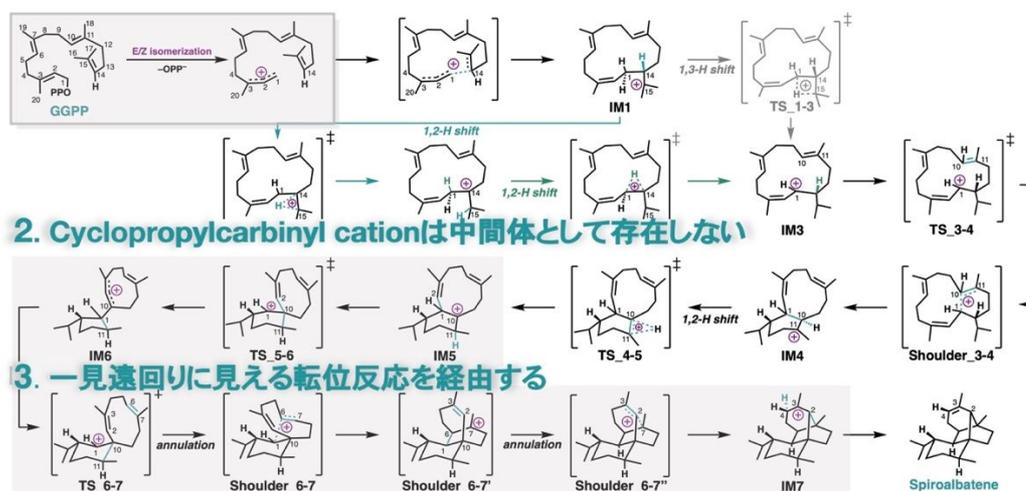


図2 . Spiroalbatene 生合成反応機構解析の結果

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 3 (B) 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 3 (B)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成して計算を行った。その結果、図 3 (C) 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する。本研究は、*Chem. Eur. J.* 誌に掲載された。

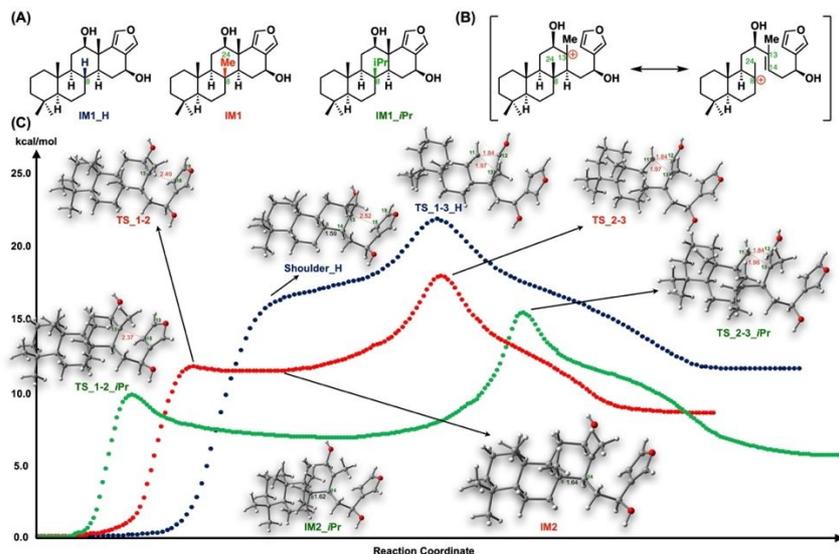


図3 . Scalarane 型セスタテルペノイド生合成での遠隔位 Me 基の効果

- 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アグラム

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。図 4 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、*JACS Au* 誌に掲載された。

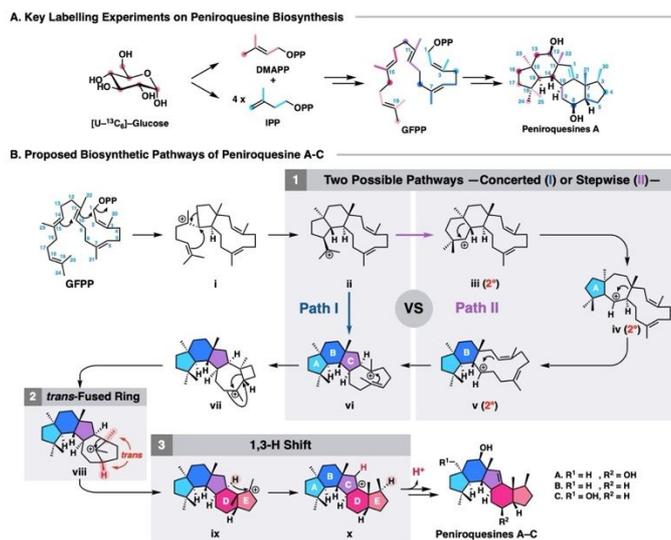


図4 . Peniroquesine 生合成での予想生合成反応機構

- A) Peniroquesine の標識実験の結果、B) Peniroquesine の予想生合成経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Hajime, Nakano Moe	4. 巻 29
2. 論文標題 Concertedness and Activation Energy Control by Distal Methyl Group during Ring Contraction/Expansion in Scalarane Type Sesterterpenoid Biosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry ? A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202203076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202203076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Shintaro, Matsuyama Taro, Ozaki Taro, Takino Junya, Sato Hajime, Uchiyama Masanobu, Minami Atsushi, Oikawa Hideaki	4. 巻 144
2. 論文標題 Elucidation of Late-Stage Biosynthesis of Phomoidride: Proposal of Cyclization Mechanism Affording Characteristic Nine-Membered Ring of Fungal Dimeric Anhydride	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 20998 ~ 21004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c09308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taro Matsuyama, Ko Togashi, Moe Nakano, Hajime Sato, Masanobu Uchiyama	4. 巻 accepted
2. 論文標題 Revision of Peniroquesine Biosynthetic Pathway by Retro-biosynthetic Theoretical Analysis: Ring Strain Controls the Unique Carbocation Rearrangement Cascade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 accepted
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.3c00039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野萌恵, 内山真伸, 佐藤玄
2. 発表標題 Spiroalbatene 生合成におけるカルボカチオン 転移反応の理論解析
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野萌恵, 内山真伸, 佐藤玄
2. 発表標題 Spiroalbatene 生合成の理論研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤玄
2. 発表標題 計算化学を基軸とした天然物の生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野萌恵, 内山真伸, 佐藤玄
2. 発表標題 計算化学を用いた Spiroalbatene 生合成の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hajime Sato, Masanobu Uchiyama
2. 発表標題 THEORETICAL STUDY OF CARBOCATION REARRANGEMENT REACTION IN TERPENE BIOSYNTHESIS
3. 学会等名 Japan-German Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤玄
2. 発表標題 理論計算を基軸とした天然物の生合成機構研究
3. 学会等名 日本薬学会関東支部オンラインシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松山太郎, 中野萌恵, 佐藤玄, 内山真伸
2. 発表標題 逆合成理論解析を用いた peniroquesine の生合成機構解明
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関