

氏 名 なが き まさ ひこ  
長 岐 正 彦

授 与 学 位 博士 (工学)

学位授与年月日 平成 15 年 11 月 4 日

学位授与の根拠法規 学位規則第 4 条第 2 項

最 終 学 歴 昭和 47 年 3 月 25 日

東北大学大学院工学研究科 応用化学専攻 修士課程 修了

学位論文題目 プレニル鎖延長酵素を利用した新規生理活性物質の合成研究

論文審査委員 主査 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 野澤 庸則

東北大学教授 井上 祥雄 東北大学教授 古山 種俊

## 論 文 内 容 要 旨

本研究は、プレニル鎖延長酵素を用いて生物活性を有するイソプレノイド類縁化合物を合成する方法を確立ことを目標として基礎的研究を行った。

第 2 章 *E* 型、および *Z* 型プレニルニリン酸合成酵素を用いた 3-alkyl-IPP ホモログの反応性について

本章では *E* 型酵素として短鎖プレニル基転移酵素から 3 種の FPS (*B. stearothermophilus*, porcine および avian FPS)、中鎖プレニル基転移酵素として *M. luteus* B-P 26 HexPS および *B. subtilis* HepPS さらに、*Z* 型長鎖プレニル基転移酵素から *M. luteus* B-P 26 UPS を用いた。

- ・ホモアリル性基質の 3 位の methyl 基の重要性について調べるために、methyl 基の欠失した 3-desmethyl-IPP を用いて反応を試みた。いずれの酵素を用いた場合にも 1 分子縮合物が得られた時点で反応は停止した。従って、この methyl 基はプレニル基転移酵素反応には必須なものでないことが分かった。
- ・3 位の methyl 基を種々の alkyl 基で置換した 3-alkyl-IPP ホモログを用いてこれらの alkyl 基の高さの影響について検討した。*B. stearothermophilus* FPS を用いて GPP (あるいは DMAPP) と propyl-IPP を反応させたところ 10% の 3-propylFOH (あるいは 29% の 3-propylGOH) が得られた。耐熱性 FPS を用いて DMAPP と 3-butyl-IPP を反応させたところ、4% の相対収率で 3-butylGOH が得られたが、他のどの酵素でも立体障害のため生成物は全く検出されなかった。
- ・上記の HexPS、HepPS あるいは UPS を用いて FPP と ethyl-IPP を反応させたところ、HexPS の場合は 1 分子および 2 分子縮合物までの *E*-ethylGGOH および *E,E*-diethylGFOH を与えた。HepPS では、1 分子縮合物のみを与えた。UPS を用いて同様の反応を試みたところ 2 分子縮合物までの生成物 *Z*-ethylGGOH および *Z,Z*-diethylGFOH が得られた。
- ・アリル性基質の 3 位の methyl 基の重要性について調べるために、上記の酵素を用いて 3-desmethyl-DMAPP (3-desmethyl-FPP、あるいは 3-desmethyl-GGPP) と IPP を反応させたが生成物は全く検出されなかった。従ってプレニル鎖延長酵素反応が生ずるにはアリル性基質の 3 位にメチル基の様なアルキル基が必須であることが分かった。
- ・耐熱性のファルネシルニリン酸合成酵素を用い、3-alkyl-IPP ホモログを利用した 3 位にアルキル基を持つ生理活性物質、幼若ホルモン JH I および JH 0 の合成について考察した。

第 3 章 *E* 型、および *Z* 型プレニルニリン酸合成酵素を用いた homoIPP (4-methyl-3-pentenyl diphosphate) の反応性に関する研究

- ・*B. stearothermophilus* FPS を用いて GPP と homoIPP を反応させたところ、全体で 5.5% の反応率で *Z*-homoFOH のみならず *E*-homoFOH も得られた。これまでの報告では、ブタ肝臓 FPS を用いて同様の反応を行った場合 *Z*-体のみを与えるということであった。また、DMAPP と homoIPP の反応では *E*-homoGOH が 25.5%、*Z*-homoGOH が 45.9% (全体: 71.4%) の相対収率で得られた。
- ・*M. luteus* B-P 26 HexPS を用いて FPP と homoIPP の反応により 8.7% の相対収率で homoGGOH が得られた。
- ・*M. luteus* B-P 26 UPS を用いて同様の反応を行ったところ *Z*-homoGGOH のみが 2.1% 得られた。

ホヤから単離された抗腫瘍活性物質、4,8-dimethylnon-3-en-1-sulfate は、3*Z*-homoGOH と同じ骨格を有する。このため、homoIPP を利用した抗腫瘍活性物質、4,8-dimethylnon-3-en-1-sulfate の合成について考察した。

第 4 章 *B. stearothermophilus* FPS を用いた 4-alkyl-IPP homolog の反応性とキラル合成に関する研究

本章では *B. stearothermophilus* FPS を用いて IPP の 4 位に methyl 基、ethyl 基、propyl 基、および butyl 基を導入した *E*-体および *Z*-体のホモログを合成してこれらの反応性について検討した。

- ・ GPP と *E*-および *Z*-4-methyl-IPP の反応により得られた生成物をアルデヒド体とし CD スペクトルにより *E*-体から *S*-4-methylfarnesal が、また、*Z*-体からその enantiomer が得られることを確認した。これに準じて 4-ethyl-, 4-propyl-, および 4-butyl -IPP の反応生成物の立体化学について考察した。
- ・ *B. stearothermophilus* FPS を用いて 3,7-diethylocta-2,6-dienyl diphosphate と *E*-4-methyl-IPP からキラルな幼若ホルモン、(*S*)-4-methyl-JH I の合成について検討した。
- ・ *B. stearothermophilus* FPS を用いた DMAPP と 4-methyl-IPP の反応を利用して、ケナガアメイロケアリ (*L. meridionalis*) の顎下腺分泌物から性的誘引物質として性フェロモンの疑いが持たれている (2*S*,3*S*)-lasiol および (2*R*,3*R*)-lasiol の合成について検討した。

#### 第 5 章 *M. luteus* B-P 26 UPS を用いた 4-alkyl-IPP homolog の反応性とキラル合成に関する研究

- ・ 古山等によって *B. subtilis* UPS を用いて FPP と *E*-4-methyl-IPP の反応から *S*-4-methylGGOH が得られ、*Z*-体は生成物を与えないことが報告されているが、本研究では *M. luteus* B-P 26 UPS を用いた FPP と *E*-4-methyl-IPP の反応から *S*-4-methylGGOH (相対収率: 44%) および 2 分子縮合物である *S*,*S*-4,8-dimethylGFOH の生成を確認した。
- ・ FPP と *E*-4-ethyl-IPP の反応から *S*-4-ethylGGOH (20%) の生成を確認し、FPP と *E*-4-propyl-IPP の反応から *S*-4-propylGGOH (3.7%) の生成を確認した。相対収率を括弧に示したが alkyl 基がかさ高くなるにつれて反応率の激減が確認され、propyl 基まで生成物を確認することが出来た。実際のホモログ合成には alkyl 基がメチル基、エチル基、およびプロピル基まで有用であることを確認した。

#### 第 6 章 野生型および変異型の *B. stearothermophilus* FPS を用いた含酸素アリル性基質ホモログ methoxyGPP および propoxyGPP の反応性に関する研究

有機合成への応用をもっと広げる目的でホモログ類に親水性基の側鎖を導入した methoxyGPP と propoxyGPP を基質ホモログとして用い、それらの反応性について検討した。保護基となっている alkoxy 基 (RO-) の alkyl 基を外すことによって即座に水酸基へ、他の官能基へ変換することが可能であるため有機合成に利用するには好都合と考えたからである。また、本章では *B. stearothermophilus* の野生型 FPS の他に、FPS に点変異を導入して GGPS 機能を持つ 3 種類の変異型 FPS を用いた実験も行ったが、これは野生型の FPS では反応しにくい場合や、鎖長の異なる生成物を得るには好都合であった。

- ・ 変異型酵素 FPS Y81D を用いて、methoxyGPP と IPP を反応させた場合 81.6% の相対反応率で methoxyGGOH が得られた。変異型酵素 FPS Y81R を用いて同様の反応を行った場合 58.2% の相対収率で methoxyFOH が得られた (野生型酵素を用いた場合の相対収率: 49.7%)。しかも、37.7% の相対収率で 2 分子縮合物も得られた。FPS Y81S を用いて同様の反応を行った場合 32.4% の相対収率で 2 分子縮合物のみを与えた。
- ・ 野生型 FPS を用いた propoxyGPP と IPP の反応では propoxyFOH が相対反応率 2.1% しか得られないが、FPS Y81R を用いて同様の反応を行った場合は、38.2% の相対収率で propoxyFOH のみを得られた。FPS Y81D を用いた同反応では、35.6% の propoxyFOH の他に、12.6% の相対収率で propoxyGGOH を与えた。
- ・ この様な酵素反応を有機合成に応用する場合には、基礎研究を行った後に、目的に合わせて上手に酵素を選択すべきであることを確認した。

FPS 反応を利用してタテハチョウ (*Danaus chrysippus*) の性フェロモンである (*E*)-3,7-dimethyl-2-octen-1,8-diol 合成について検討した。

#### 第 7 章 野生型および変異型の *B. stearothermophilus* FPS を用いた含酸素アリル性基質ホモログ epoxyGPP の反応性ならびに反応生成物の生物活性に関する研究

- ・ 野生型 FPS を用いて epoxyGPP と IPP の反応により 21.3% の相対反応率で epoxyFOH を得た。(*S*)-epoxyFOH のエナンチオマー過剰率 (ee%) を 30.0% と決定した。
- ・ FPS Y81 R (Y81D、あるいは Y81S) を用いて同様の反応を行った場合、いずれも二分子縮合物である、epoxyGGOH を相対反応率 13.6% (10.0%、あるいは 1.3%) 得ることを確認した。なお、1 分子縮合物は得られなかった。
- ・ 野生型 FPS を用いた epoxyGPP と 3-ethyl-IPP の反応から、142.6% の相対反応率で 3-ethyl-10,11-epoxyFOH が得られることを確認した。また、epoxyGPP と 3-propyl-IPP の反応では生成物は得られなかった。

今回の酵素反応生成物 epoxyFOH が種々の昆虫フェロモンと構造的に似ているためこの生成物の何らかの昆虫フェロモン様活性があるのではないかと考えて生物活性試験を行った。青森県りんご試験場の病害虫防除試験園にあるふじ (りんご) の成木に epoxyFOH のトラップを設置し観察したところ、数回にわたってキンモンホソガの大量誘殺が認められた。今回の実験だけでは、キンモンホソガのフェロモン様活性があると決めることが出来ないためこの様な試験を再度行う必要がある。

青森県の主要産物であるりんご等の安全性を高めるために、環境に優しい総合防除資材の開発を今後の研究課題としたい。

## 論文審査結果の要旨及びその担当者

論文提出者氏名	長岐 正彦
論文題目	プレニル鎖延長酵素を利用した新規生理活性物質の合成研究
論文審査担当者	主査 教授 西野 徳三 教授 野澤 庸則 教授 古山 種俊 (生命科学研究科) 教授 井上 祥雄
<p style="text-align: center;"><b>論文審査結果の要旨</b></p> <p>本学位論文は、プレニル鎖延長酵素を用いて新規な生理活性を有するイソプレノイド類縁化合物の合成法の確立を目的として研究したものである。特に近年、生態系のバランスや農薬の耐性等が問題となっており環境に適合した総合防除資材の開発が求められている。これらの生理活性物質合成の基礎的研究について緒論から総括まで全 8 章から構成されている。</p> <p>第 1 章は緒論であり、本研究の背景、目的などについて述べている。</p> <p>第 2 章はプレニル鎖延長酵素の基質の 3 位のメチル基の重要性について調べるために、メチル基の欠失したホモログを用いて反応を行い、ホモアリル性基質のメチル基はプレニル鎖延長酵素反応には必須ではないが、アリル性基質の 3 位にはメチル基 (アルキル基) が必須であるという結論を得ている。さらに、このメチル基を種々のアルキル基で置換した 3-アルキルイソペンテニルニリン酸 (3-alkyl-IPP) ホモログを用いてこれらのアルキル基の高さの影響および反応性について検討した後、これらのホモログを利用した生理活性物質である幼若ホルモン JH I および JH 0 の合成について考察し、その有用性について述べている。</p> <p>第 3 章は homoIPP (4-methyl-3-pentenyl diphosphate) の反応性に関する研究を行い、ホヤから単離された抗腫瘍活性物質、4,8-dimethylnon-3-en-1-sulfate は、酵素反応生成物 3Z-homogeraniol と同じ骨格を有するため homoIPP を利用した抗腫瘍活性物質の合成について考察している。</p> <p>第 4 章および第 5 章では、それぞれ、ファルネシルニリン酸合成酵素 (FPS) およびウンデカプレニルニリン酸合成酵素 (UPS) を用いた 4-alkyl-IPP のホモログ類の反応性とキラル合成に関する実験を行った後、キラルな幼若ホルモン (S)-4-methyl-JH I の合成およびケナガアメイロケアリ (<i>L. meridionalis</i>) の顎下腺分泌物から性的誘引物質として性フェロモンの疑いが持たれている (2S,3S)-lasiol および (2R,3R)-lasiol の合成について検討し、これらホモログのキラル合成における有用性について述べている。</p> <p>第 6 章ではホモログ類として ω 末端に親水性基の側鎖を導入したアルコキシゲラニルニリン酸を基質ホモログとした場合の反応性について検討している。また本章では <i>B. stearothersophilus</i> の野生型 FPS の他に、FPS に点変異を導入してゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素の機能を持つ 3 種類の変異型 FPS を用いた実験も行い、野生型の FPS では反応しにくい場合や、鎖長の異なる生成物を得る場合に有用であることを確認している。また、ホモログを利用した場合、タテハチョウ (<i>Danaus chrysippus</i>) の性フェロモンである (E)-3,7-dimethyl-2-octen-1,8-diol 合成に有用であることを述べている。</p> <p>第 7 章では野生型および変異型の <i>B. stearothersophilus</i> FPS を用いたエポキシゲラニルニリン酸の反応性について調べた後、酵素反応生成物エポキシファルネソールが種々の昆虫フェロモン類と構造的類似性が見られることから、生物活性に関する実験としてフェロモン様活性試験を行い、数回にわたってキンモンホソガの大量誘殺を確認している。</p> <p>第 8 章は以上を総括している。</p> <p>以上要するに本論文は、種々のホモログ類を用いたプレニル鎖延長酵素の基質特異性について調べた後、これらの知見を基に新規な生理活性物質の合成に応用したものであり、種々の生理活性物質の精密合成の発展に寄与するところが少なくない。</p> <p>よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として合格と認める。</p>	
<p style="text-align: center;"><b>学力確認結果の要旨</b></p> <p>平成 15 年 11 月 25 日、審査委員ならびに関連教官出席のもとに、学力確認のための諮問を行った結果、本人は生物工学に関する十分な学力と研究指導能力を有することを確認した。</p> <p>なお、英語で書かれた学術論文に対する理解力から見て、外国語に対する学力も十分であることを認めた。</p>	

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は、プレニル鎖延長酵素を用いて新規な生理活性を有するイソプレノイド類縁化合物の合成法の確立を目的として研究したものである。特に近年、生態系のバランスや農薬の耐性等が問題となっており環境に適合した総合防除資材の開発が求められている。これらの生理活性物質合成の基礎的研究について緒論から総括まで全8章から構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の背景、目的などについて述べている。

第2章はプレニル鎖延長酵素の基質の3位のメチル基の重要性について調べるために、メチル基の欠失したホモログを用いて反応を行い、ホモアリル性基質のメチル基はプレニル鎖延長酵素反応には必須ではないが、アリル性基質の3位にはメチル基(アルキル基)が必須であるという結論を得ている。さらに、このメチル基を種々のアルキル基で置換した3-アルキルイソペンテニルニリン酸(3-alkyl-IPP)ホモログを用いてこれらのアルキル基の高さの影響および反応性について検討した後、これらのホモログを利用した生理活性物質である幼若ホルモンJH IおよびJH 0の合成について考察し、その有用性について述べている。

第3章はhomoIPP(4-methyl-3-pentenyl diphosphate)の反応性に関する研究を行い、ホヤから単離された抗腫瘍活性物質、4,8-dimethylnon-3-en-1-sulfateは、酵素反応生成物3Z-homogeraniolと同じ骨格を有するためhomoIPPを利用した抗腫瘍活性物質の合成について考察している。

第4章および第5章では、それぞれ、ファルネシルニリン酸合成酵素(FPS)およびウンデカプレニルニリン酸合成酵素(UPS)を用いた4-alkyl-IPPのホモログ類の反応性とキラル合成に関する実験を行った後、キラルな幼若ホルモン(S)-4-methyl-JH Iの合成およびケナガアメイロケアリ(*L. meridionalis*)の顎下腺分泌物から性的誘引物質として性フェロモンの疑いが持たれている(2*S*,3*S*)-lasiol および(2*R*,3*R*)-lasiolの合成について検討し、これらホモログのキラル合成における有用性について述べている。

第6章ではホモログ類として $\omega$ 末端に親水性基の側鎖を導入したアルコキシゲラニルニリン酸を基質ホモログとした場合の反応性について検討している。また本章では*B. stearothersophilus*の野生型FPSの他に、FPSに点変異を導入してゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素の機能を持つ3種類の変異型FPSを用いた実験も行い、野生型のFPSでは反応しにくい場合や、鎖長の異なる生成物を得る場合に有用であることを確認している。また、ホモログを利用した場合、タテハチョウ(*Danaus chrysippus*)の性フェロモンである(*E*)-3,7-dimethyl-2-octen-1,8-diol合成に有用であることを述べている。

第7章では野生型および変異型の*B. stearothersophilus* FPSを用いたエポキシゲラニルニリン酸の反応性について調べた後、酵素反応生成物エポキシファルネソールが種々の昆虫フェロモン類と構造的類似性が見られることから、生物活性に関する実験としてフェロモン様活性試験を行い、数回にわたってキンモンホソガの大量誘殺を確認している。

第8章は以上を総括している。

以上要するに本論文は、種々のホモログ類を用いたプレニル鎖延長酵素の基質特異性について調べた後、これらの知見を基に新規な生理活性物質の合成に応用したものであり、種々の生理活性物質の精密合成の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。