

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 10 年度博士課程進学  
氏名 杉山靖正  
指導教官名 長澤寛道

### 論文題目

糖由来シクロペンタン環骨格を有する微生物二次代謝産物の生合成に関する研究

微生物の二次代謝産物は多彩であり、現在までに多くの有用物質が見い出され、抗菌活性をはじめ、酵素阻害活性、レセプター結合阻害活性など様々な生理活性を有する微生物代謝産物が見い出されている。微生物の生産する生理活性物質の化学構造は多種多様であり、それらの生合成を明らかにすることは、微生物の代謝生理の解明のみならず、有用物質の生産という面からも重要である。トレハゾリン **1** は、トレハラーゼ阻害物質として *Micromonospora coriacea* の代謝産物中に見い出された化合物であり、グルコース残基と、シクロペンタン環を有するアグリコン部分が、*N*-グルコシル結合した特異な骨格を有している。一方、アロサミジン **2** は、キチナーゼ阻害物質として *Streptomyces* sp. AJ9463 の菌体抽出液から単離された化合物であり、2 分子のアロサミンと 1 分子のシクロペンタン環を有するアグリコンから構成されている。天然物で糖由来のシクロペンタン環を持つ化合物は、比較的少なく、その生合成に含まれる炭素-炭素結合形成反応は特異的なものであり、その反応機構及びその反応を触媒する酵素・遺伝子の解析は、有機化学の基礎のみならず、糖質分子変換などへの応用面においても重要である。本研究では、**1** の生合成機構を解明し、**2** のシクロペンタン環骨格の生成機構の詳細について解明することを目的とする。

## 第一部 トレハラーゼ阻害物質トレハゾリンの生合成

### 第一章 トレハゾリンを構成する炭素及び窒素原子の由来

まず、**1** の前駆体と考えられる物質の各種ラベル化合物の取り込み実験を行うため、培養及びラベル化合物の添加の条件を検討した。その結果、培養には、0.1%グルコース濃度の生産培地を使用し、回転数は 210 rpm とし、ラベル化合物は、培養開始後 72 時間目と 120 時間目の 2 回、あるいは 96 時間目に 1 回添加し、培養時間は 240 時間とすることにした。

**1** を構成する炭素及び窒素原子の由来を明らかにするため、各種ラベル化合物の取り込み実験を行った。まず、[1-<sup>13</sup>C]-グルコースの取り込み実験を行い、得られた **1** の <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定した結果、1、1'位の炭素シグナルが明白にエンリッチされていた。続いて、[6-<sup>13</sup>C]-グルコースの取り込み実験を行ったところ、6、6'位の炭素シグナルに <sup>13</sup>C の取り込みが認められた。これらの取り込み実験の結果より、**1** のグルコースとアグリコン部分ともに炭素骨格は、グルコース由来であることが明らかとなった。更に、**1** のシクロペンタン環部分において、前駆体であるグルコースの C-1、C-5 間での環化が起きていることが判明した。

次に、アミノオキサゾリン部分の 2 つの窒素原子と 4 級炭素の由来を調べるため、[<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-尿素より調製した、L-[グアニジノ-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-アルギニンの取り込み実験を行った。その結果得られたトレハゾリンノナアセテートの <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定したところ、7 位の 4 級炭素のシグナルが明白にエンリッチされていた。更にそのシグナルは、ダブルダブレットで観測された。このことは、得られた **1** のアミノオキサゾリン部分では、4 級炭素が <sup>13</sup>C でラベルされるとともに、2 つの窒素原子が同時に <sup>15</sup>N でラベルされていることを示していた。即ち、**1** の生合成の過程でアルギニンのグアニジノ基より生じたアミジノ基が、切断されることなくそのままアミノオキサゾリン骨格部分に導入されることが明らかとなった。以上明らかとなったトレハゾリンを構成する炭素及び窒素原子の由来を図 1 に示した。

### 第二章 トレハゾリンのシクロペンタン環骨格の生成機構

**1** のシクロペンタン環骨格の生成機構を各種重水素ラベルグルコースの取り込み実験により調べた。シクロペンタン環形成は、図 2 に示すように、前駆体であるグルコースの 4 位あるいは 6 位が酸化される経路、フルクトースを経由する経路の 3 つの経路が考えられる。そこでまず、環化の際の、グルコースの 4 位及び 6 位の水素の去就を、それぞれ[4-<sup>2</sup>H]-グルコース、[6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-グルコースの取り込み実験により調べた。[4-<sup>2</sup>H]-グルコースの取り込み実験により得られた **1** を、<sup>2</sup>H-NMR 解析したところ、4'位への重水素の取り込みが観

測された。[6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-グルコースの取り込み実験により得られた **1** からトレハゾラミン **3** を得、さらにヘキサアセテートに誘導した後、<sup>2</sup>H-NMR 及び ESI-MS スペクトルを測定した。その結果、6'位に同時に 2 つの重水素が導入されていることが判明した。この 2 つの取り込み実験から、グルコースの 4 位の水素及び 6 位の 2 つの水素は、シクロペンタン環生成の際に保持されることが示された。次に、フルクトースを経由する経路を検討するため、グルコースの 2 位の水素の去就を調べた。[2-<sup>2</sup>H]-グルコースの取り込み実験を行うにあたって、生産菌が高いグルコースイソメラーゼ活性を有していたため、4 時間おきに 12 回にわたって[2-<sup>2</sup>H]-グルコースを添加する方法で取り込み実験を行った。その結果、得られた **1** の 2'位に重水素が保持されていることが示された。更に、[1-<sup>2</sup>H]-グルコース及び [1,2,3,4,5,6,6-<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-グルコースの取り込み実験により得られた **1** 及び **3** の、<sup>2</sup>H-NMR 及び ESI-MS スペクトル解析の結果、シクロペンタン環生成において、前駆体であるグルコースの水素は、5 位を除いて全て保持されることが明らかになった。そのため **1** のシクロペンタン環は、図 2 の A あるいは B の経路で補酵素が関与し、一連の酸化・還元過程で補酵素との間で同一の水素のやりとりがあり、見かけ上の水素の去就が観測されない反応機構により生成することが示唆された。シクロペンタン環生成反応途中で、4 位あるいは 6 位が一旦酸化されるのであれば、それらの部位を重水素ラベルしたグルコースの変換では、同位体効果による重水素の取り込みの差が観測できる可能性がある。そこで、[4-<sup>2</sup>H]-グルコース及び[6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-グルコースを等量用いた取り込み実験を行った。その結果得られた **1** のシクロペンタン環部分を <sup>2</sup>H-NMR 解析したところ、6'位に比較して 4'位への重水素の取り込みが少ないことが判明した。このことから、**1** のシクロペンタン環は、補酵素が関与する 4 位酸化経路 (図 3) によって、グルコースから生合成されることが推定された。

### 第三章 セルフリー系でのシクロペンタン環の形成

第二章で推定した、**1** のシクロペンタン環の形成機構を証明するために、無細胞抽出液を用いたシクロペンタン環形成反応を試みた。まず、推定される環化反応生成物の標品として、**4** を調製した。**1** の生産菌の菌体を超音波破碎したセルフリー系を用い、グルコース-6-リン酸、NAD、NADP を添加して酵素反応を行った反応液に、アルカリホスファターゼを作用させ、さらにベンゾイル化後、生成物を HPLC 及び LC-MS により解析する酵素反応系を確立した。現在、生成物の詳細な解析を行っている。

### 第二部 キチナーゼ阻害物質アロサミジンのシクロペンタン環骨格の生成機構

これまでに、**2** のシクロペンタン環骨格は、2 位の窒素を含めグルコサミン由来であり、[6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-グルコサミンの取り込み実験から、6-アルデヒド体経路で生成することが明らか

になっている。そこで、6位の酸化・還元過程での立体選択性を明らかにするために、(6R)-及び(6S)-[6-<sup>2</sup>H]-グルコースの取り込み実験を行った。その結果、グルコースの(6R)の重水素は、**2**の6位の *proS* の位置へ取り込まれたが、(6S)の重水素は、**2**のシクロペンタン環へ取り込まれなかった。このことより、図4に示すように、6位の酸化・還元はそれぞれ立体特異的に起こり、その際グルコースの6位の水素の反転が伴うことが示された。次に、[1-<sup>2</sup>H]-グルコースの取り込み実験を行ったところ、重水素の**2**の1位への取り込みが認められた。以上のことより、**2**のシクロペンタン環骨格の生成過程で生じる6-アルデヒド中間体は、シクロペンタン環の環化及び5位のデオキシ化あるいはそのどちらかの反応に参与することが示唆された。

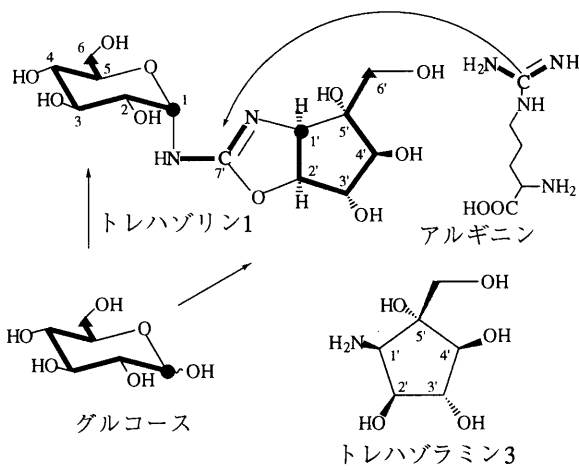


図1 トレハズリンの生合成

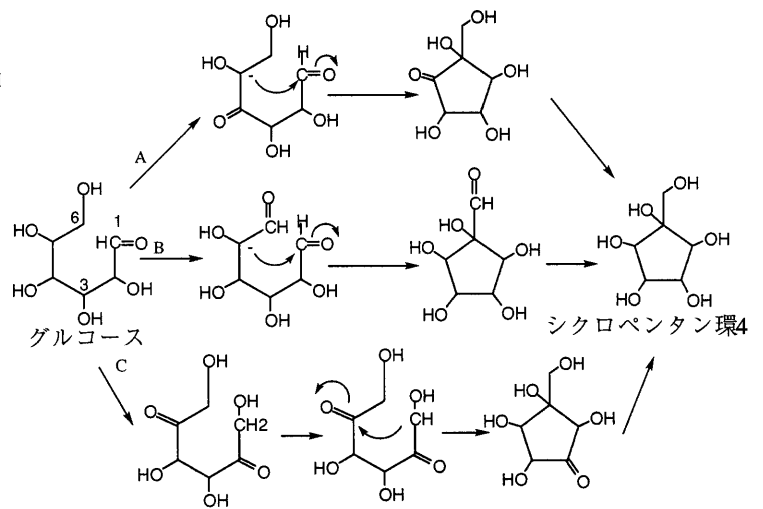


図2 グルコースからのシクロペンタン環生成機構

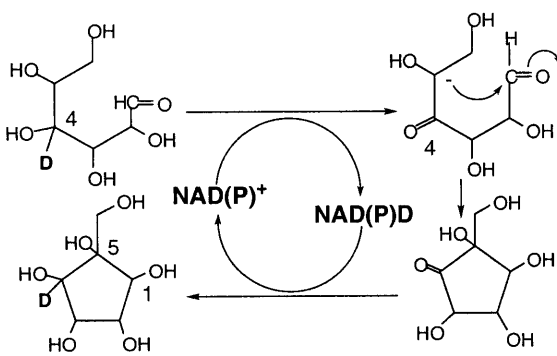


図3 トレハズリンのシクロペンタン環の推定生成機構

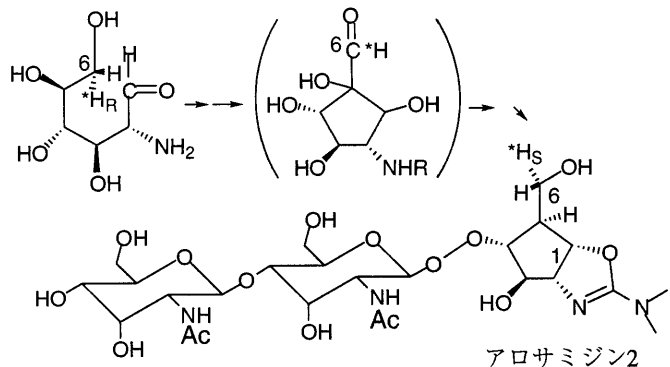


図4 アロサミジンのシクロペンタン環生合成