

# 天然物生合成酵素利用した酸素依存性環化反応の開発

牛丸 理一郎\*

## Development of Cyclization Reactions Catalyzed by Oxygen-dependent Biosynthetic Enzymes

Richiro USHIMARU\*

Hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase (H6H) is a mononuclear non-heme iron and 2-oxoglutarate dependent oxidase responsible for the biosynthesis of the tropane alkaloid scopolamine. The enzyme catalyzes both C6-hydroxylation of hyoscyamine and epoxidation of the resulting alcohol. Previous crystallographic and spectroscopic studies have led to a model where substrate disposition relative to the intermediary iron complexes determines the reaction outcome. Herein, a number of H6H substrate analogs with fluoro, methoxy and trifluoromethoxy substituents at C6 are assayed with H6H to determine whether the disposition model accurately predicts the reaction outcome. The results suggest that additional factors are likely at play in determining the fate of the individual substrate radicals including H-bonding interactions that stabilize intermediary hydroxy-ferric complexes against rebound. These effects nevertheless are expected to correlate with substrate-cofactor disposition.

### 1. 背景と目的

シクロプロパン、エポキシド、アジリジンなど三員環は大きな環ひずみを持つ化学構造であり、求核剤に対して高い反応性を示す。三員環骨格を有する医薬品や生物活性化合物は数多く知られているものの、環構造の完全な立体制御を伴う選択的有機合成は現代の有機合成化学技術駆使してもしばしば困難を伴うため、これらの三員環構造を高効率、高立体選択的に合成する新技術の開発が求められる。

最近、申請者らは生物活性天然物ベラクトシン、スコポラミン、プレウロシベラアジリジン生合成における3種類の非ヘム単核鉄 $\alpha$ -ケトグルタル酸( $\alpha$ KG)依存性鉄酵素(Be1L, H6H, TqAL)を同定し、それぞれシクロプロパン、エポキシド、アジリジン形成すること明らかにした。本研究では医薬品に頻繁に用いられるエポキシドを高効率、高立体選択的に合成する鉄生体触媒を開発するため、これらのH6H[1, 2]の詳細な反応機構解析を行った。

非ヘム単核鉄 $\alpha$ KG依存性鉄酵素であるヒヨスチアミン6 $\beta$ -ヒドロキシラーゼ(H6H)はヒヨスチアミンの水酸化とつづいて環化反応連続的に触媒する(図1)。他のFe/2OG酵素と同様に、H6Hは保存されたHis/His/Aspが二価鉄イオンを配位している。 $\alpha$ KG、 $O_2$ 、および基質が結合すると、 $\alpha$ KGは $CO_2$ とコハク酸に酸化されると同時に反応性の高いFe(IV)=Oが生成される。このFe(IV)=OによるC6位の水素原子引き抜きによりC6ラジカル中間体が生じ、続いて生成したFe(III)-OHとの反応によりヒドロキシ化される。その結果、6 $\beta$ -ヒドロキシ化生成物が得られる。さらに、6 $\beta$ -ヒドロキシヒヨスチアミンもH6Hの基質となる。C7位からの水素引き抜きとエポキシ化が起こり、最終的にスコポラミンが生成される。しかしながらどのようにヒドロキシ化とエポキシ化が選択的に進行しているかは不明であった。本研究ではヒヨスチアミンの6位に置換基を導入した基質アナログを合成しH6Hと反応させることで、6 $\beta$ -ヒドロキシ基が反応の選択性に与える影響を精査した。

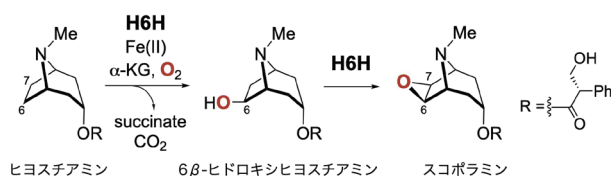


図1 H6Hの反応。

### 2. 6-メトキシおよび6-トリフルオロメトキシヒヨスチアミンの反応

C6位にメトキシ基またはトリフルオロメトキシ基を持つ2種類の基質アナログを合成した。まず、メトキシ基を持つ基質アナログH6Hと反応させると、12時間以内にはほぼ完全に消費され7 $\beta$ -ヒドロキシ化は観察されなかった。一方で、脱メチ

ル化が進行し6 $\beta$ -ヒドロキシヒヨスチアミンとスコポラミンが生成した(図2). 活性部位において, Fe(IV)=Oが近傍に存在するメトキシ基と反応したと考えられる.

一方, トリフルオロメトキシ基もつ32は, さらにC6位が酸化されないため, C7位での水酸化反応に切り替わると予想された. しかしながら, 6-トリフルオロメトキシヒヨスチアミンH6Hと反応させたとき, 7 $\beta$ -ヒドロキシ化は観察されなかった. HPLC解析の結果, N-脱メチル化が進行していることが明らかとなった. すなわち, C6-トリフルオロメトキシ基導入することで酸化の標的がC7からN-メチル部位へと切り替わったと考えられる.

### 3. 6-フルオロおよび6-ケトヒヨスチアミンの反応

6 $\beta$ -ヒドロキシヒヨスチアミンのC6位の水素引き抜きとオキシ配位子との間に想定される水素結合相互作用の重要性さらに検証するため, 6 $\beta$ -フルオロヒヨスチアミン合成した. フルオロ基もつC6は酸化されにくく, 水酸基とほぼ同じ大きさであるものの, Fe(IV)=Oのオキシ配位子に対して水素結合供与体としては機能できない. H6Hの標準条件下で6 $\beta$ -ヒドロキシヒヨスチアミン反応させたところ, 完全に消費されたが, 脱メチル化生成物や酸素添加生成物は検出されなかった(図3). その代わりに, 6-ケトヒヨスチアミンの生成が確認された. 反応時間伸ばすと, 6-ケトヒヨスチアミンはさらに参加され6-ケト7-ヒドロキシヒヨスチアミンが生成した.

6 $\beta$ -フルオロヒヨスチアミンから6-ケトヒヨスチアミンへの酸化は, C6位からの水素引き抜きとそれに続くヒドロキシリバウンドにより説明できる. したがって, 想定されたC6位の水素結合相互作用は, C7位での水素引き抜き誘導する上で重要な役割果たしていると考えられる.

### 4. 結論と展望

エポキシ化と水酸化のどちらが起こるかは, H原子引き抜き後の基質ラジカルの空間的な(角度的な)位置関係と関係しているように見えるが, 必ずしもそれだけが直接的な原因ではない. むしろ, 生成したラジカルの反応経路は, ラジカルとFe(III)-OHとの距離関係や, その錯体の安定化の度合いによって決まると考えられる. 特に, 6 $\beta$ -ヒドロキシヒヨスチアミンのC6-OHとFe(IV)=Oとの間の水素結合相互作用は, C7位からのH原子引き抜き誘導する働きだけでなく, その後のFe(III)-OHからのヒドロキシリバウンド抑制する役割も果たしている可能性がある. この水素結合ネットワークが崩れると, ラジカル中心で容易にヒドロキシリバウンドが起こるようになる.

本研究で明らかになったように, 非ヘム単核鉄 $\alpha$ KG依存性鉄酵素では, 基質と金属中心との微妙な相互作用が反応経路(エポキシ化または水酸化)決定づける. その中でも, 基質側官能基とFe=O種との水素結合ネットワークは, H原子引き抜きの方向性やリバウンド反応精密に制御する重要な要素である. この知見は, 酵素反応の理解にとどまらず, 人工的に反応選択性設計するための新たな指針を与える. 今後は, 構造解析・分子設計・計算科学統合し, こうした水素結合制御基盤とした高選択的酸化酵素や合成触媒の開発が期待される.

### REFERENCES

- 1) R. Ushimaru, M. W. Ruszczycky and H. W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **141** (2019) 1062-1066.
- 2) R. Ushimaru, M. W. Ruszczycky, W.-C. Chang, F. Yan, Y.-N. Liu and H. W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **140** (2018) 7433-7436.

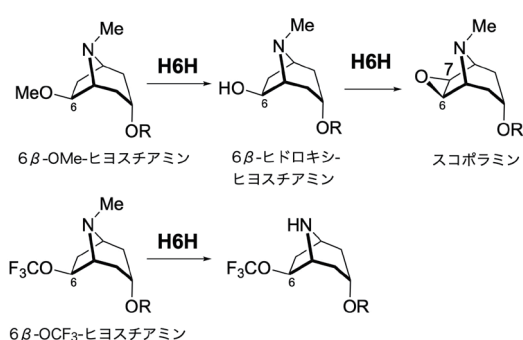


図2 6-メトキシおよび6-トリフルオロメトキシヒヨスチアミンの反応.

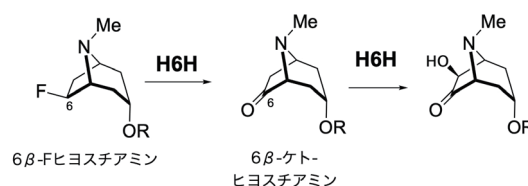


図3 6-フルオロおよび6-ケトヒヨスチアミンの反応.