

平成21年6月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580128
 研究課題名（和文） 多種生変換反応の組み合わせによる、効率的新規生物活性物質創出技術の確立
 研究課題名（英文） Efficient production of bioactive compounds by sequential bioconversion
 研究代表者
 新藤 一敏（SHINDO KAZUTOSHI）
 日本女子大学・家政学部・准教授
 研究者番号：80350180

研究成果の概要：

我々は生物の有する優れた酵素機能を用いて、新たな化合物を創製する研究を実施している。具体的には oxygenase 酵素及び prenyl transferase 酵素を用いて、フェノール性水酸基及びプレニル側鎖（ジメチルアリル or ゲラニル）を有する多くのナフタレン化合物を創製することに成功した（多くは新規物質）。これらのナフタレン化合物の多くは、極めて優れた抗酸化活性を有しており、新しい医薬品・食品添加剤の候補として期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：phenanthrene dioxygenase, P450, prenyl transferase, 抗酸化活性

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、主に dioxygenase 系芳香族分解酵素群を複合的に利用した（初発酵素のみによる変換、初発+2段目酵素による変換等）増殖連動型菌体反応により、極めて高い効率で多様な構造の化合物を変換し多くの新規物質を創製するという、全く新しい独創的な手法（CellCombiChem; Living Cells-based Combinatorial Chemistryと提唱）の確立に成功している。しかしながらこれまでの変換研究は、dioxygenase 酵素（群）内での変換反応のみでの物質生産に留まっていた。今回の研究では、例えば、市販の物

質（スタート基質）→oxygenase 酵素（群）による変換（＝一次変換物質）→X 酵素による変換（＝二次変換物質）→Y 酵素による変換（三次変換物質）→Z 酵素による変換（四次変換物質）、のように得られた変換物質に対してさらに性質の異なる複数の生変換反応を実施することにより、一つの物質を出発として従来に比べて飛躍的に多種の新規変換物質を創製できる技術を確立しようとするものである。

2. 研究の目的

今回は薬・食品添加剤といった化合物に数多

く見受けられるナフタレン化合物を出発基質とし、複数の酵素変換により新規であり、かつ優れた抗酸化活性を有する化合物の創製を目的とした。抗酸化活性を有する化合物は、動脈硬化等の予防薬として、あるいは食品保存剤として有用である。

3. 研究の方法

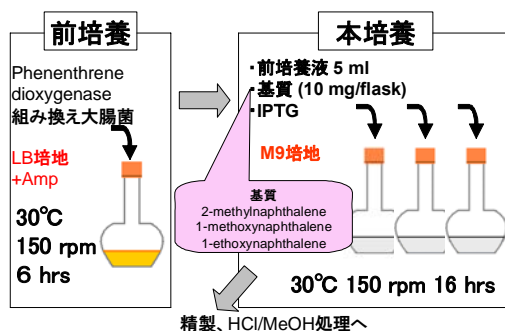
出発基質として、2-methylnaphthalene, 1-methoxynaphthalene, 1-ethoxynaphthalene を選択した。これら基質に対して、まず oxygenase 酵素 {phenanthrene dioxygenase (海洋バクテリア cycloclasticus 由来) 或いは P450 (Bacillus 由来)} を用いて、ナフタレン骨格にフェノール性水酸基を導入した (一次変換)。次に oxygenase 変換により得られた各 phenol 性水酸基含有化合物について phenol 性水酸基の近傍に基質特異性低く prenyl 基を導入できる prenyltransferase {NphB (放線菌由来 geranyl transferase) 或いは SC7190 (放線菌由来 dimethylallyl transferase)} を用いて変換を行った (二次変換)。

また上記一次、二次変換で得られた変換物質については、ラット脳脂質過酸化抑制試験により、その抗酸化能を評価した。以下に各変換実験及び抗酸化試験の概略を列記する。

(1) Phenanthrene dioxygenase による変換

Phenanthrene dioxygenase 酵素による生変換は菌体増殖反応を用いた。変換物は酢酸エチル抽出→シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。本変換による直接の変換化合物は 1,2-dihydrodiol 体であるため、最後に精製物を 10% HCl/MeOH で処理し、phenol 性水酸化化合物へと導いた。本実験の概略を Fig. 1 にまとめる。

Fig. 1 Dioxygenase 変換実験の流れ



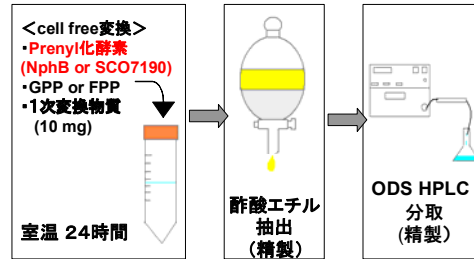
(2) P450 による変換

P450 酵素による生変換も菌体増殖反応を用いた。変換物は酢酸エチル抽出→シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。培養から精製までの方法はほぼ Fig. 1 に準拠したものである。

(3) Prenyl transferase による変換

Prenyltransferase {NphB (放線菌由来 geranyl transferase) 或いは SC7190 (放線菌由来 dimethylallyl transferase)} による一

Fig. 2 Prenyl transferase 変換実験の流れ



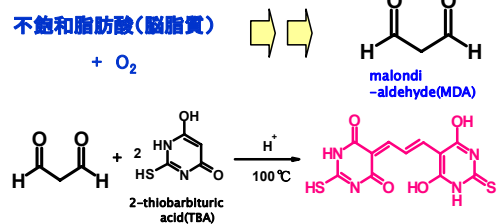
次変換物質の変換は、cell free 反応によって実施した。東京大学 葛山准教授より供与された NphB 及び SCO7190 の粗酵素液 (大腸菌に大量発現させ、菌体破砕、カラム精製を行ったもの) と GPP (NphB) 或いは FPP (SCO7190) を一次変換物質 (基質) とファルコンチューブ内で反応させ、変換を実施した (二次変換物質の取得)。二次変換物質の精製は酢酸エチル抽出→ODS HPLC 分取により実施した。本実験の概略を Fig. 2 にまとめる。

(4) 抗酸化活性の測定

変換により得られた一次変換物質、二次変換物質の抗酸化活性をラット脳脂質過酸化抑制系を用いて検討した。

ラット脳脂質は活性酸素による酸化障害を受けやすいリン脂質、糖脂質などの生体脂質を多く含んでおり、本系での酸化の進行は、活性酸素による生体脂質への障害 (動脈硬化、老化等の原因) を良く反映すると考えられる。生体脂質酸化の進行程度は、脂質酸化反応により生じるマロンジアルデヒド (MDA) 量を測定することにより実施した。すなわち生じた MDA をチオバルビツール酸 (TBA) と反応させ、赤色物質へと導き、この赤色物質の量を λ_{532} nm の吸光度を測定することにより求めた。本実験及び発色の原理を Fig. 3 にまとめる。

Fig. 3 抗酸化活性 (ラット脳脂質過酸化抑制)



脳脂質が活性酸素により酸化されると MDA が発生する。発生した MDA 量は MDA を TBA と反応させて赤色物質へと導くことにより定量される。抗酸化活性を有する化合物が共存すると MDA が生じない。

4. 研究成果

(1) 変換結果

①2-methylnaphthalene

2-methylnaphthalene を基質とする一次変換 (oxygenase による変換) により、以下の変換物を得た。

A) phenanthrene dioxygenase

8-OH-2-methylnaphthalene (1) (収率 25.5%)

B) P450

4-OH-2-methylnaphthalene (2) (収率 0.6%)

次に 1 を基質とする二次変換 (prenyl transferase による変換) を行い、以下の変換物を得た。

C) NphB

8-O-geranyl-2-methylnaphthalene (3) (収率 7.5%)

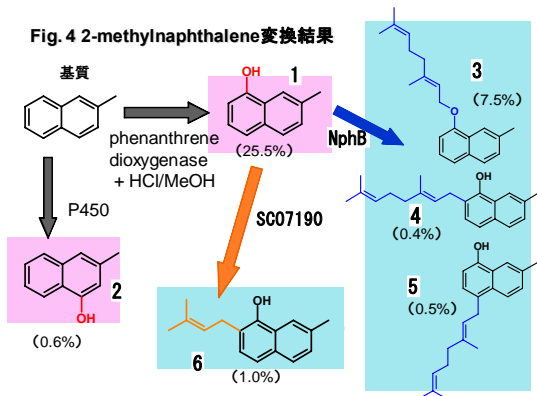
7-C-geranyl-8-OH-2-methylnaphthalene (4) (収率 0.4%)

5-C-geranyl-8-OH-2-methylnaphthalene (5) (収率 0.5%)

D) SC07190

7-C-dimethylallyl-8-OH-2-methylnaphthalene (6) (収率 1.0%)

以上の結果を構造式を含め Fig. 4 にまとめる。



②1-methoxynaphthalene

1-methoxynaphthalene を基質とする一次変換 (oxygenase による変換) により、以下の変換物を得た。

A) phenanthrene dioxygenase

7-OH-1-methoxynaphthalene (7)

B) P450

4-OH-1-methoxynaphthalene (直接の変換物) が phenol oxidation coupling により dimer となったもの (8)

2-OH-1-methoxynaphthalene (9)

5-OH-1-methoxynaphthalene (10)

次に 7 を基質とする二次変換 (prenyl transferase による変換) を行い、以下の変換物を得た。

C) NphB

7-O-geranyl-1-methoxynaphthalene (11)

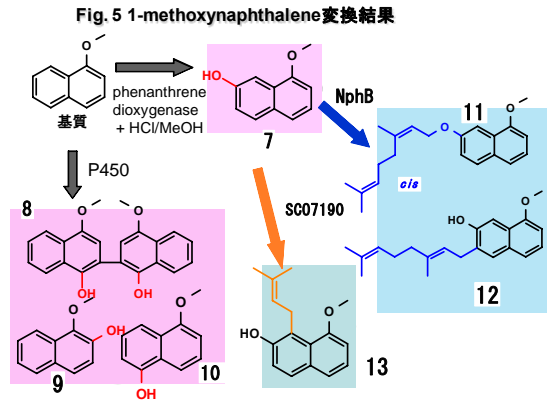
($\Delta^{2,3}$ *cis*)

6-C-geranyl-7-OH-1-methoxynaphthalene (12)

D) SC07190

8-C-dimethylallyl-7-OH-1-methoxynaphthalene (13)

以上の結果を構造式を含め Fig. 5 にまとめる。



③1-ethoxynaphthalene

1-ethoxynaphthalene を基質とする一次変換 (oxygenase による変換) により、以下の変換物を得た。

A) phenanthrene dioxygenase

7-OH-1-ethoxynaphthalene (14)

B) P450

5-OH-1-ethoxynaphthalene (15)

4-OH-1-ethoxynaphthalene (16)

次に 14 を基質とする二次変換 (prenyl transferase による変換) を行い、以下の変換物を得た。

C) NphB

6-C-geranyl-1-ethoxynaphthalene (17)

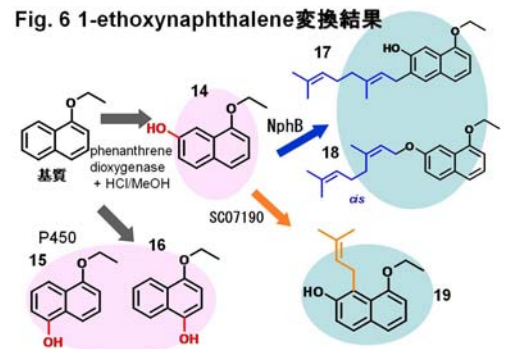
7-O-geranyl-1-methoxynaphthalene (18)

($\Delta^{2,3}$ *cis*)

D) SC07190

8-C-dimethylallyl-7-OH-1-ethoxynaphthalene (19)

以上の結果を構造式を含め Fig. 6 にまとめる。



(2) 抗酸化活性

(1) で記載した変換化合物 1 ~19 について、ラット脳脂質過酸化抑制作用を検討した。各変換物質の IC₅₀ 値 (酸化を 50%抑制する濃度)を一覧として Table 1 に示す。

substate	product	抗酸化活性 (IC ₅₀ (M))
2-methylnaphthalene (>100)	1	9
	2	11
	3	>100
	4	0.05
	5	0.6
	6	0.2
1-methoxynaphthalene (>100)	7	1.3
	8	8.7
	9	7.5
	10	12
	11	>100
	12	1.1
	13	1.5
1-ethoxynaphthalene (>100)	14	2.6
	15	7.7
	16	3.2
	17	2.1
	18	>100
	19	0.9

Table 1 変換化合物の抗酸化活性

ここで変換物質間の活性の強弱を考慮するため、2-methylnaphthalene の変換物質 (1-6) の濃度-酸化阻害率の関係を、Fig. 7 にまとめた。

Fig. 7 2-methylnaphthalene変換物 (1-6)の抗酸化活性

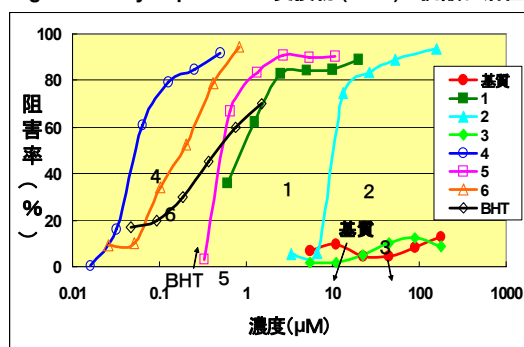


Fig. 7 から明らかなように、phenol 性水酸基の存在しない基質及び 3 には、抗酸化活性が存在しない。従って本活性には phenol 性水酸基の存在が必須であることが明らかとなった。このことから、naphthalene 環に phenol 性水酸基を導入できる oxygenase による生変換反応は、有用な抗酸化物質の創製に有用であることが示された。さらに Fig. 7 を考察すると、phenol 性水酸基を含有する変換物質間で抗酸化活性の強弱を考察して見ると、基質の C-8 に phenol 性水酸基が導入されたのみの変換物である 1 に比較して、1 の naphthalene 骨格に prenyl 基が導入され

た 4, 5, 6 はいずれも 1 より優れた抗酸化活性を示すことが明らかである。同様の傾向は基質が 1-methoxynaphthalene, 1-ethoxynaphthalene の場合にも観察された。これは prenyl 基が高い脂溶性と剛性を持つことから、低極性の脂質アルキル構造と強いアフィニティーを示し、脂質酸化反応が発生する空間に prenyl 基を含有する化合物が存在する確率が高いからではないかと考察される。従って脂質の酸化を抑制する作用を有する物質を効率的に創製することに対して、prenyl 化反応がきわめて優れた性質を有することが、今回の研究で初めて明らかに示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① K. Shindo, Y. Shindo, T. Hasegawa, A. Osawa, O. Kagami, K. Furukawa, and N. Misawa, Synthesis of Highly Hydroxylated Aromatics by Evolved Biphenyl Dioxygenase and Subsequent Dihydrodiol Dehydrogenase, Appl. Microbio. Biotech., 75(5), 1063-1069 (2007) 査読有
- ② K. Shindo, A. Osawa, Y. Kasai, N. Iba, A. Saotome, and N. Misawa, Hydroxylations of substituted naphthalenes by *Escherichia coli* expressing aromatic dihydroxylating dioxygenase genes from polycyclic aromatic hydrocarbon-utilizing marine bacteria, Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 48 (3-4), 77-83 (2007) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 新藤一敏、立花綾子、田中亜由美、尾崎太郎、三沢典彦、西山真、葛山智久、フェナンスレンジオキシゲナーゼ反応とプレニル基転移酵素反応を組み合わせた用いた新規抗酸化ナフタレン類の創製、2009 年度農芸化学会、3 月、福岡
- ② 牧野拓也、新藤一敏、音松俊彦、緒方武比古、大山莞爾、三沢典彦、シアノバクテリア由来シトクロム P450 のフラボン合成反応への応用、2009 年度農芸化学会、3 月、福岡
- ③ 新藤一敏、峽戸千絵、菊田美穂、清水恵子、原田尚志、三沢典彦、フェノール性水酸基が導入されたナフタレン類の創製、2008

年度農芸化学会、3月、名古屋

[その他]

ホームページ情報

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~kshindo/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新藤一敏

日本女子大額家政学部食物学科・准教授

研究者番号：80350180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし