

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380112

研究課題名(和文) 船底防汚塗料候補物質含ハロゲン化合物の酵素反応による合成

研究課題名(英文) Biosynthetic enzymes of antifouling halogenated compounds

研究代表者

沖野 龍文 (Okino, Tatsufumi)

北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30280910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：含ハロゲン化合物であるローレンシンを生産するウラソゾから、その生合成酵素の一つとして環化と臭素化を触媒するバナジウム依存型プロモペルオキシダーゼのクローニングに成功し、組換え酵素を用いてその臭素化活性を明らかにした。含ハロゲンセスキテルペノイドであるローリントロールを生産するミツデソゾから、バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼのクローニングに成功し、その性状を明らかにした。さらに、含ハロゲントリテルペノイドを生産するマギレソゾから、同酵素のクローニングに成功し、その性状を明らかにした。プロモアレンを有するC15化合物であるオマエザレンの構造を報告すると共に、その全合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Vanadium dependent bromoperoxidase (VBPO) was cloned from the red alga *Laurencia nipponica* which produces a halogenated compound, laurencin. The enzyme catalyzed cyclization and bromination of a precursor of laurencin. Bromination activity of recombinant enzyme was investigated. A similar type of VBPO was cloned from *L. okamurae* which produces a halogenated sesquiterpenoid, laurinterol. The recombinant enzyme showed bromination activity. In addition, another type of VBPO was cloned from *L. saitoi* which produces a halogenated triterpenoid. Its properties were investigated by using its recombinant protein. The structure of bromoallene containing C15 compound, omaezallene was reported. Its total synthesis was successfully achieved.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：生合成 付着阻害 フジツボ 紅藻 プロモアレン キプリス プロモペルオキシダーゼ テルペノイド

1. 研究開始当初の背景

付着生物を防止するための船底防汚塗料として有機スズ化合物が過去に使われたが、国際条約によりその使用が禁止された。禁止をうけて現在使われている代替防汚塗料の付着防止機能は有機スズ化合物に劣る上、生態毒性のために国によっては一部の使用を禁止している。さらに、生物の越境移動防止の観点からも、バラスト水管理に続いて、船体への生物付着の防止が世界的課題となっていた。そのため、より新しい防汚技術が求められ、付着生物の幼生が付きにくい微細構造や高分子ヒドロゲルなどの開発が進められる一方、付着阻害活性を有する天然有機化合物の探索が各国で盛んであった。我々の研究室で船底防汚塗料開発を目指して天然物を探索した結果、紅藻ソゾ由来の含ハロゲン化合物に付着阻害活性が見いだされていた。また、生合成酵素の研究がめざましく、酵素反応による合成の可能性が著しく高まっていた。一方、ソゾのハロゲン化酵素の研究は配列未決定のタンパク質を使ったものに限られていた。紅藻サンゴモのようにバナジウム依存型のプロモペルオキシダーゼがタンパク質として大量に単離することが可能であるものについては、その性状解析が進んでいた。それでも、2次代謝産物の生合成反応を明確に説明はしていない。一方、放線菌ではバナジウム依存型クロロペルオキシダーゼにより2次代謝産物の塩素化および環化反応を触媒することが我々によって明快に示されていた。

2. 研究の目的

海藻の2次代謝産物への臭素導入および骨格構築に重要な機能を果たしていると考えられるプロモペルオキシダーゼの構造および機能解析を目指した。将来的には本酵素およびテルペノイド生合成酵素あるいは脂肪酸関連物質合成酵素群により付着阻害物質を生産したり、酵素を改変して新規付着阻害物質を創製したりすることができるような知見を得ることが目的である。また、ハロゲンを有する天然付着阻害物質の有機的全合成も目指した。

3. 研究の方法

ローレンシンのプロモペルオキシダーゼ付着阻害活性を有する中員環エーテルであるローレンシンの臭素化と環化を制御するプロモペルオキシダーゼを大腸菌で発現させ、精製したタンパク質を各種試験に供した。モノクロロジメドンをを用いて、塩素化、臭素化、pH依存性などを調べた。さらに、ローレンシン前駆体をローレンシンからの還元により調製し、当該化合物を用いて酵素反応を解析した。しかし、その前駆体は不安定であったので、TMSで保護して反応に供した。ローリントロールのプロモペルオキシダーゼ

ローレンシンのプロモペルオキシダーゼをもとにプライマーを設計して、セスキテルペノイドであるローリントロールを生産するミツデソゾからプロモペルオキシダーゼのクローニングを実施した。得られた遺伝子情報をもとに、プロモペルオキシダーゼの組み換えタンパク質を大腸菌で発現させ、精製後のタンパク質とモノクロロジメドンをを用いて酵素反応を解析した。

チルシフェロールのプロモペルオキシダーゼ

トリテルペノイドであるチルシフェロールを生産するマギレソゾからプロモペルオキシダーゼをクローニングし、塩基配列の全長を決定した。大腸菌を使って組み換えタンパク質を作製・精製し、モノクロロジメドンをを用いて酵素反応を解析した。

オマエザレンおよびハチジョウジマレンの合成

未同定紅藻ソゾから得られた付着阻害活性を有するオマエザレンおよびハチジョウジマレンの全合成を各種条件の検討により実施した。

4. 研究成果

ローレンシンのプロモペルオキシダーゼウラソゾ由来バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼ組み換えタンパク質を大腸菌発現系により作製した。得られた組み換えタンパク質をDE52陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。モノクロロジメドンをを用いた酵素反応に供したところ、塩素化は起こさない一方で、他の海藻のプロモペルオキシダーゼと同程度に臭素化活性を示した。至適pHおよび温度耐性も調べた。ローレンシンの前駆体と考えられるローレジオールを天然ローレンシンの還元により調製し、酵素反応に供したところ、臭素付加・環化によって得られるデアセチルローレンシンと考えられるピークがLC/MSで検出された。同酵素は天然藻体からもタンパク質として精製された。

ローリントロールのプロモペルオキシダーゼ

ミツデソゾ由来バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼ組み換えタンパク質を大腸菌発現系により作製した。得られた組み換えタンパク質を精製後、モノクロロジメドンをを用いた酵素反応に供したところ、ウラソゾの酵素に近い性状を示した。

チルシフェロールのプロモペルオキシダーゼ

マギレソゾ由来バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼをクローニングし、全長塩基配列を決定した。ウラソゾ由来遺伝子との同一性は65%であり、バナジウム活性中心を構成するアミノ酸残基は良好に保存されていたものの、配列の差異が大きいことがわかった。大腸菌発現系で組み換えタンパク質を調製し、酵素反応を解析した。モノクロロジ

メドンに対する臭素付加活性はウラソゾに比べて低かった。他の海藻では至適 pH が 6~7 であるのに対し、8 付近であった。また、透析・濃縮などにより失活するなどウラソゾやミツデソゾ由来酵素に比べて不安定であった。スクワレンエポキシドに対する反応性も調べた。次世代シークエンサーによる RNAseq 解析から、別のプロモペルオキシダーゼの配列を得ることができた。

オマエザレンおよびハチジョウジマレンの全合成

紅藻ソゾ由来のオマエザレンの全合成に成功した。つまり、D-グルコースから合成した既知のアルデヒドから E-オレフィンのプロモエーテル化反応による臭素原子を含む 2 連続不斉中心の立体選択的構築を鍵反応に、18 段階でオマエザレンを合成した。

ハチジョウジマレンの全合成を目指して、13 工程を経て - ヒドロキシケトンを合成した。その後ハチジョウジマレン骨格を合成するための反応を検討した。

まとめ

異なる 2 次代謝産物を生産する 3 種のソゾからバナジウム依存型プロモペルオキシダーゼをクローニングし、その組換えタンパク質を用いて臭素化反応を触媒することおよび pH 依存性の違いなどを明らかにした。また、2 次代謝産物の前駆体を用いて酵素反応に供したところ、LC/MS で期待する反応産物を検出することができた。しかしながら、確実な同定と収率の向上が課題である。オマエザレンの有機合成に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Umezawa, T., Oguri, Y., Matsuura, H., Yamazaki, S., Suzuki, M., Yoshimura, E., Furuta, T., Nogata, Y., Serisawa, Y., Matsuyama-Serisawa, K., Abe, T., Matsuda, E., Suzuki, M., & Okino, T. (2014) Omaezallene from red alga *Laurencia* sp.: Structure elucidation, total synthesis, and antifouling activity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 3909-3912. 査読有

Kaneko, K., Washio, K., Umezawa, T., Matsuda, E., Morikawa, M., & Okino, T. (2014) cDNA cloning and characterization of vanadium-dependent bromoperoxidases from the red alga *Laurencia nipponica*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78, 1310-1319. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

正木志良・金子賢介・小林大毅・石川高史・西川慶祐・森本善樹・鷲尾健司・森川正章・沖野龍文 紅藻マギレソゾ *Laurencia saitoi* 由来プロモペルオキシダーゼの臭素付加反応 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 30 日 札幌コンベンション

センター(札幌市)

石川高史・金子賢介・湯曉蓉・鷲尾健司・森川正章・沖野龍文 紅藻ミツデソゾ (*Laurencia okamurae*) 由来プロモペルオキシダーゼの性状解析 化学系学協会北海道支部 2016 年冬季研究発表会 2016 年 1 月 19 日 北海道大学(札幌市)

Petitbois, Julie; Abdel-Lateff, Ahmed; Alarif, Walied M.; Ayyad, Seif-Eldin N.; Al-Lihaibi, Sultan S.; Yoshimura, Erina; Nogata, Yasuyuki; Okino, Tatsufumi Natural products as antifouling strategy-the case of copounds from organisms of the Red Sea 第 4 回ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」 2015 年 9 月 17 日 函館国際水産・海洋総合研究センター(函館市)

金子賢介・小林大毅・鷲尾健司・森川正章・沖野龍文 紅藻ソゾ属 3 種のプロモペルオキシダーゼの活性評価 日本化学会第 95 春季年会 2015 年 3 月 26 日 日本大学(船橋市)

金子賢介・鷲尾健司・小林大毅・湯曉蓉・梅澤大樹・松田冬彦・森川正章・沖野龍文 *Laurencia* 属紅藻のプロモペルオキシダーゼ 第 56 回天然有機化合物討論会 2014 年 10 月 15 日 高知県立県民文化ホール(高知市)

増田大海・梅澤大樹・松田冬彦 *Hachiojima* lene A の合成研究 日本化学会北海道支部 2014 年夏季研究発表会 2014 年 7 月 12 日 苫小牧高専(苫小牧市)

小栗祐子・松浦裕志・吉村えり奈・野方靖行・沖野龍文 八丈島産ソゾ属海藻より得られたタテジマフジツボ幼生付着阻害物質 *hachiojima* lene A および B の構造 日本化学会北海道支部 2014 年夏季研究発表会 2014 年 7 月 12 日 苫小牧高専(苫小牧市)

沖野龍文 藻類のつくる生物活性物質の構造多様性 第 10 回生合成マシナリー札幌セミナー 2014 年 6 月 18 日 北海道大学(札幌市)

金子賢介・鷲尾健司・梅澤大樹・松田冬彦・森川正章・沖野龍文 紅藻ウラソゾ *Laurencia nipponica* 由来バナジウムの性状解析 日本水産学会春季大会 2014 年 3 月 29 日 北海道大学(函館市)

Okino, T. Chemistry and biology of brominated compounds from marine algae *Laurencia* spp. The 2nd International Conference of the Indonesian Chemical Society 2013 年 10 月 22 日 ジョグジャカルタ(インドネシア)

Okino, T. Antifouling activity and biosynthesis of brominated compounds from the red algae *Laurencia* spp. RACI NSW Natural Products Group Annual One-Day Symposium 2013 年 10 月 4 日 シドニ

ー (オーストラリア)

梅澤大樹・山崎翔平・小栗祐子・松浦裕志・鈴木将洋・沖野龍文・松田冬彦 オマエザレンの全合成と絶対立体化学の決定 第55回天然有機化合物討論会 同志社大学(京都市) 2013年9月19日

Kaneko, K., Washio, K., Umezawa, T., Morikawa, M., Matsuda, F., and Okino, T. Vanadium dependent bromoperoxidase from the red alga *Laurencia nipponica* 14th International Symposium on Marine Natural Products ラトー八(スペイン) 2013年9月18日

湯曉蓉・金子賢介・鷺尾健司・森川正章・沖野龍文 紅藻ミツデソゾ *Laurencia okamurae* のバナジウム依存型プロモペルオキシダーゼの性質 日本化学会北海道支部 2013年夏季研究発表会 北見工大(北見市) 2013年7月20日

山崎翔平・梅澤大樹・松田冬彦 Omaezallene の全合成 日本化学会北海道支部 2013年夏季研究発表会 北見工大(北見市) 2013年7月20日

沖野龍文・鷺尾健司・森川正章・松田冬彦・梅澤大樹 紅藻ウラソゾ *Laurencia nipponica* 由来バナジウム依存型プロモペルオキシダーゼの性状解析 第15回マリンバイオテクノロジー学会大会 沖縄県市町村自治会館(那覇市) 2013年6月1日

沖野龍文ほか 紅藻ウラソゾと軟体動物クロヘリアメフラシから得られた付着阻害物質 laurencin 日本水産学会 東京海洋大学(東京都) 2013年3月29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖野 龍文 (OKINO, Tatsufumi)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・准教授
研究者番号：30280910

(2) 研究分担者

松田 冬彦 (MATSUDA, Fuyuhiko)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・教授
研究者番号：10219446

梅澤 大樹 (UMEZAWA, Taiki)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・准教授
研究者番号：20503618

(3) 連携研究者

野方 靖行 (NOGATA, Yasuyuki)
電力中央研究所・環境科学研究所・主任研究員
研究者番号：10371535

鷺尾 健司 (WASHIO, Kenji)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・助教
研究者番号：50241302