

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670050

研究課題名(和文) 酵素による軸不斉を有する二量体化合物創製法の確立

研究課題名(英文) Study on the regioselective coupling reaction to produce atropisomers by enzyme

研究代表者

供田 洋 (Tomoda, Hiroshi)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：70164043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 から発見したモノピノンA (MPA) をビアリル型二量体化合物ダイナピノンA (DPA)へと位置選択的に生合成するモノピノン二量化酵素(monapinone coupling enzyme, MCE)を用いて、芳香環同士が炭素系-炭素結合したビアリル型二量体化合物の生合成制御機構について研究した。

本研究により、MCEを大量に精製する技術確立し、3種の宿主を用いて異種発現系を構築した。さらに、酵素的解析を進め、MCEの基質特異性を明らかにし、その過程で新規二量体化合物の創製にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Atropisomer dinapinones A1 and A2 (DPA1 and DPA2) were isolated from a culture of *Talaromyces pinophilus* FKI-3864. Monapinone coupling enzyme (MCE) which dimerizes naphthopyranone monapinone A (MPA) to regioselectively synthesize DPA (a mixture of atropisomers DPA1 and DPA2) was purified from *T. pinophilus* FKI-3864. In this study, we established an efficient procedure to purify MCE easily and heterologous expression system of MCE gene in *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, to identify regioselective coupling reaction of MCE, enzymatic analysis and substrate specificity were investigated.

研究分野：天然物化学・生化学

キーワード：二量体化 マルチカップーオキシダーゼ ビアリルカップリングエンザイム ダイナピノンA

1. 研究開始当初の背景

我々は、動物細胞における中性脂質(トリアシルグリセロール)蓄積を阻害する物質として、真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 の培養液より芳香環同士が炭素系-炭素結合したビアリル型ナフトピラノン(naphthopyranone)骨格を有するダイナピノン A (DPA) を発見した(図1、Ohte *et al.* *J. Antibiot.* 64, 489 (2011)、Uchida *et al.* *J. Antibiot.* 65, 419 (2012))。DPA は軸異性体である成分 A1(DPA1) と成分 A2 (DPA2) に分離できる。さらに、真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 株を、海水存在下で培養すると DPA の生産量は激減し、代わって単量体であるモナピノン A (MPA) を大量に生産する(図1、Kawamoto *et al.* *J. Antibiot.* 64, 503 (2011))。この知見は、DPA は MPA が二量体化して生成することを示唆するものであった。これまでに微生物培養液中や植物などからビアリル型二量体化合物が多数報告されてきたが、それらが酵素反応によって生成するのか、あるいは化学反応によって生成するのか不明であった。しかし、DPA の場合 MPA から位置特異的に二量体化が起こり、DPA が生成すると予想された。そこで、実際に MPA と生産菌の破碎液をインキュベーションしたところ、選択的に DPA1 と DPA2 が生成することから酵素的に反応が進むことを確認した。さらにこの生産菌の破碎液からモナピノン二量体化酵素(MCE: monapinone coupling enzyme)を精製することに成功した。この MCE 酵素の N 末端側アミノ酸配列と、生産菌 *T. pinophilus* FKI-3864 株の全ゲノム解析の結果と照らし合わせ、DPA 生合成遺伝子として7つの ORF を特定し、各 ORF の機能解析から ORF6 (multicopper oxidase (MCO) と相同性 40~60%) が MCE と予想した。

また、MPA や DPA と構造的に類似しているセミビオキササンチン(SVX)やビオキササンチン(VX)を生産する真菌 *Penicillium citreoviridae* は、立体選択的に VX を生産し、P 体のみが報告されている(Bode SE *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 5916-5920 (2007))。

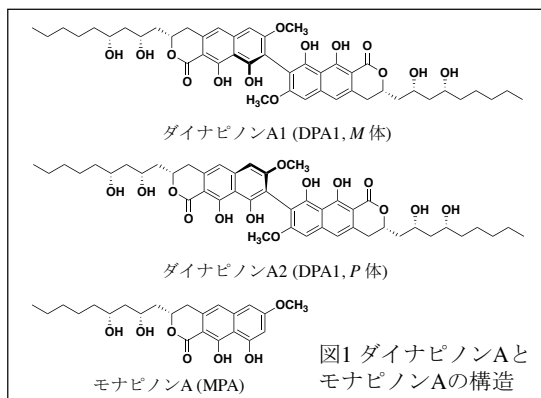


図1 ダイナピノンAとモナピノンAの構造

2. 研究の目的

芳香環同士が炭素系-炭素結合したビアリル

ル (biaryl) 型二量体化合物は自然界に多数存在し、さまざまな生物活性を示す。我々は真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 からビアリル型二量体化合物 DPA とその単量体 MPA を発見した。DPA はモナピノン二量体化酵素(MCE)と命名した酵素によって生成する。そこで本研究では、1) この酵素 MCE を大量に精製する技術の確立、2) 異種発現系の構築、3) 基質特異性の解明、4) 酵素学的解析を通して、酵素による位置選択的な二量体化反応機構の解明を目的とする。さらに、類似の構造を有する SVX や VX を生産するが、二量体化合物の立体制御が大きく異なる真菌 *P. citreoviridae* の二量体化酵素(SCE: semivioxanthin coupling enzyme)と比較する。将来的には、X線による結晶構造の解明や多様なビアリル型二量体化合物ライブラリーを期待する。

3. 研究の方法

MCEに関する研究

1) MCE の大量精製法の確立

真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 株を3日間種培養後、スクロースを主成分とする生産培地で14日間静置培養した。得られた菌体(63 g)に50 mM クエン酸緩衝液(pH 5.0)を加え、氷冷下で15分間超音波破碎した。その後、アセトン分画を行ない、疎水性樹脂によるカラムクロマトグラフィー、最終的にゲル濾過によるカラムクロマトグラフィーにより、目的酵素 MCE を精製した。MCE 酵素活性は、MPA を基質とした二量体化反応により生成した DPA を UFLC で定量した(50°C の条件下、1時間で1 µg の DPA を生成する酵素活性を 1 unit (U) とした)。

2) 異種発現系の構築

発現用宿主として、*Escherichia coli*、*Aspergillus oryzae* および *Saccharomyces cerevisiae* を選択した。次に、MCE 遺伝子をそれぞれの発現ベクターである pColdIV、pTAex3、pYES-DEST52 に組み込み、その形質転換体を作製した。得られた形質転換体を培養し、上記に示した方法で MCE 酵素活性を測定した。

3) 基質特異性の解明

まず、真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 の培養液から得られた MPA から MPE を基質とし、精製した MCE を用いて、50°C で20分間酵素反応後、酢酸エチル抽出を行ない、生成物を UFLC で解析した。さらに、我々の保有する天然化合物ライブラリーや市販の試薬から多環性芳香族構造を有する化合物を選別し、MPA (もしくは MPE) と組み合わせ、同様に、50°C で20分間酵素反応後、酢酸エチル抽出を行ない、生成物を UFLC で解析した。

4) 酵素学的解析

MCE は、MCO に対して相同性が高いので

(40~60%)、MCO ファミリーの酵素学的特徴である金属イオンに対する酵素活性の影響を検討した。すなわち、MPA を基質とし、精製した MCE と 8 種の二価金属イオンを用いて、50℃で 20 分間酵素反応後、酢酸エチル抽出を行ない、生成物を UFLC で解析した。また、MCE 酵素活性に対する NaCl の影響、ウルシ由来ラッカーゼによる酵素反応、MPA と MPE の酵素反応の速度パラメーター (V_{max} と K_m) を求めた。

SCE に関する研究

SCE は、真菌 *P. citreoviridae* ATCC42743 の培養液から SCE を精製する生化学的手法とゲノム配列を取得し、*mce* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を選別し、異種発現株を作製し、SCE を精製する分子生物学的手法からアプローチし、MCE と比較した。

4. 研究成果

MCE に関する研究

1) MCE の大量精製法の確立

MCE を精製した当時は、精製効率が非常に悪かったが、各精製工程の条件検討を進めた結果、初回精製当時に比べて、MCE の精製効率は約 40 倍上昇した。次に、真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 の培養条件の検討も行った。MCE は、活性中心に Cu^{2+} を持つ MCO に相同性 40~60% を示すため、培養液中に Cu^{2+} を添加することで、MCE 酵素活性がどのように影響を与えるか検討した。その結果、生産培地 (Sucrose 3.0%、Soluble starch 3.0%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、Malt extract 1.0%、 KH_2PO_4 0.5%、Ebios 0.3%) に、0.25 mM 及び 2.5 mM $CuSO_4$ を添加すると、MCE 酵素活性は無添加の時と比べて、約 2.5 倍上昇した。現在、確立した精製方法と検討した培養条件を組み合わせ、大量の MCE 調製を進めている。将来的には、X 線による結晶構造解析を目指している。

2) 異種発現系の構築

3 種の異種発現宿主を用いて、MCE の形質転換体を作製した結果、*E. coli* を宿主とした系では MCE タンパク質の発現は SDS-PAGE で確認できたが、MCE 酵素活性は確認できなかった。また、*S. cerevisiae* を宿主とした系では、MCE タンパク質の発現を確認し、MCE 酵素活性も確認できたが、その酵素活性は非常に低かった。*A. oryzae* を宿主とした系では、目的の分子量に MCE タンパク質を確認し、MCE 酵素活性も確認した。菌体量あたりの MCE 酵素活性量は、生産菌 *T. pinophilus* FKI-3864 より約 10 倍高かった。現在、1) で確立した精製方法と作製した形質転換体を用いて、MCE の精製を進めている。最終的には、大量の MCE を調整し、X 線による結晶構造解析を目指している。

さらに、N 末端と C 末端に His タグをつけた MCE の形質転換体の作製にも成功し、タ

グをつけた MCE の精製を、アフィニティークラムを用いて検討している。

3) 基質特異性の解明

単量体 MPA~MPE をそれぞれ単独で反応させ、生成物を UFLC 解析した結果、MPA からホモ二量体 DPA1 (M 体) と DPA2 (P 体)、MPE からホモ二量体 DPE1 (M 体) と DPE2 (P 体) を確認し、本条件では、MPB、MPC 及び MPD のホモ二量体は確認できなかった。次に、5 種の MP から 2 種の MP を混合し反応させ、生成物を UFLC 解析した結果、MPA に MPB から MPE が位置選択的に結合したヘテロ二量体 DPAB から DPAE が生成し、これら全てに 2 つの軸異性体が存在することを確認した。本条件では、MPA から生成したヘテロ二量体よりは生成量が少なかったが、MPE に MPB、MPC、MPD が結合したヘテロ二量体 DPBE、DPDE、DPDE も生成し、これら全てに 2 つの軸異性体が存在することを確認した。ホモ二量体 DPE、ヘテロ二量体 DPBE、DPDE、DPDE は、*T. pinophilus* FKI-3864 の培養液では確認できなかった新規化合物であった。以上の結果から、MCE に対する反応性の高い基質は、MPA、MPE、MPB~MPD の順であった。

次に、MCE 酵素反応の高かった MPA と MPE を用いて、類縁化合物 SVX や多環性芳香族化合物との反応を検討した結果、新規ヘテロ二量体 3 成分を見出し、全てに 2 つの軸異性体が存在することを確認した。現在、ホモ二量体 DPE、ヘテロ二量体 DPBE、DPDE、DPDE を含め新規ヘテロ二量体 7 成分の精製を進め、生物活性 (中性脂質蓄積阻害活性など) の評価を進めている。

4) 酵素学的解析

4-a) 金属イオンの影響

精製した MCE を用いて、酵素学的検討を進めた。MCO ファミリーは、活性中心に Cu^{2+} を保持し、酵素反応に Cu^{2+} を添加することで、その酵素活性が上昇する (Forootanfar H *et al.*, *Biotechnol Prog.*, 31, 1443-1463 (2015))。そこで、精製した MCE に Cu^{2+} を添加し、MCE 酵素反応を検討した。その結果、10 mM $CuSO_4$ を添加した場合、MCE 酵素活性が約 4 倍上昇した。さらに、他の 2 価金属イオンの MCE 酵素反応に対する影響を評価した結果、 Fe^{2+} が強力に MCE 酵素反応を阻害した。

4-b) NaCl の影響

真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 株を、海水存在下で培養すると DPA の生産量は激減し、代わって単量体であるモノピノン A (MPA) が得られることから、海水により MCE 酵素活性が抑えられることが示唆された。そこで、精製した MCE に NaCl を添加し、MCE 酵素反応を検討した。その結果、用量依存的に MCE 酵素反応は低下し、100 mM NaCl で 90% 以上低下した。海水の NaCl は約 500 mM である

ことから、海水添加した時の真菌 *T. pinophilus* FKI-3864 株の MPA と DPA の生産量と良い一致を示した。

4-c) 他の MCO について

MCO ファミリーの 1 つであるウルシ由来ラッカーゼによる MPA の二量体化反応を検討した。その結果、ウルシ由来ラッカーゼ(1 mg)の二量体化反応は、全く進まなかった。また、精製した MCE を用いて、ラッカーゼの標準活性評価方法であるシリングアルダジンの酸化呈色反応を検討した結果、酸化呈色反応は進まなかった。

4-d) MPA と MPE の Vmax と Km について

3) の実験から MCE に対する基質特異性の高い MPA と MPE について、Vmax と Km を算出した。その結果、MPA の Vmax は 11.6 ± 0.5 nmol/min、Km は 7.1 ± 1.6 μ M、MPE の Vmax は 2.6 ± 0.2 nmol/min、 $K_{33.2} \pm 6.9$ μ M であった。

SCE に関する研究

真菌 *P. citreoviridae* ATCC42743 のゲノム情報から、二量体化酵素 SCE の候補遺伝子の特定に成功した。さらに、*A. oryzae* に発現させ、目的の SCE 酵素活性を確認した。現在、真菌 *P. citreoviridae* ATCC42743 の培養液からの SCE 精製も同時に進めており、SCE と MCE の両者の酵素学的特徴の比較を進めている。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 豊田雅幸、大城太一、出町歩、小林啓介、川口未央、供田 洋「Monapinone 二量体化酵素による新規 dinapinone 類の酵素学的解析」日本薬学会 137 年会(仙台)(2017.3.26)
- 2) 豊田雅幸、石掛太樹、猪腰淳嗣、供田 洋「Monapinone 二量体化酵素の精製方法の改良」日本薬学会第 136 年会(横浜)(2016.3.29)
- 3) 出町歩、石掛太樹、猪腰淳嗣、藤井勲、供田 洋「真菌 *Talaromyces pinophilus* FKI-3864 由来の monapinone カップリング酵素の異種発現系の構築」日本薬学会第 136 年会(横浜)(2016.3.29)
- 4) 供田 洋「微生物由来機能分子のケミカルバイオロジー」高磁場・高感度 NMR 利活用促進のための天然物関連シンポジウム 2015 及び NMR 施設見学会(神奈川)(2015.8.21)
- 5) 供田 洋「脂質代謝を制御する微生物由来化合物」北里大学薬学部創設 50 周年記念第 34 回白金シンポジウム(東京)(2015.2.28)
- 6) 供田 洋「微生物由来脂質代謝阻害剤を

求めて---発見、ケミカルバイオロジー、創薬へ---」第 6 回ケミカルバイオロジー研究会(埼玉)(2014.4.30)

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbchem/wai_sheng_wu_yao_pin_zhi_zao_xue/Welcome.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

供田 洋 (TOMODA Hiroshi)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：70164043