

令和元年5月11日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01798

研究課題名(和文) 合成基質を利用した渦鞭毛藻由来環状エーテル化合物の生合成関連酵素の探索

研究課題名(英文) Exploration of biosynthetic enzymes of marine cyclic ethers in dinoflagellates

研究代表者

佐竹 真幸 (Satake, Masayuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：90261495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：海産環状エーテル化合物は、特異な構造と強力な生物活性を有していることから、構造決定や全合成研究が盛んに行われてきた。その一方で、生合成研究は、渦鞭毛藻のゲノム解析が進んでいないこと、渦鞭毛藻による生産量が微量であること、梯子状ポリエーテル化合物の構造が複雑であることなどのために、あまり進んでいなかった。

環状エーテル化合物の推定生合成前駆体モデル化合物を合成し、渦鞭毛藻酵素抽出液とのインキュベーション実験により、環状エーテル化合物の生合成に関与すると考えられる側鎖の酸化反応とエポキシドの開環を触媒する酵素を渦鞭毛藻酵素液中に発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

渦鞭毛藻が生産する環状エーテル化合物の生合成酵素の発見は、これまで不明であった海産天然物の生合成機構の詳細を明らかとした。本酵素の利用により、環状エーテル化合物の合成が有機試薬、溶媒の使用無く行えることになる。有機溶媒を使用しないため、製品の安全性が向上し、今後、医薬品や化学品への応用が可能となる。また、酵素阻害剤の開発により有毒物質生産制御につながり、赤潮被害や海産食中毒予防が可能となり、公衆衛生および水産業保護にも貢献する。

研究成果の概要(英文)：Ladder-shaped polyethers (LSPs) are secondary metabolites produced by marine dinoflagellates and have unique structures and strong bioactivities. The biosynthesis of LSPs has been proposed. However, the fused ether ring formation of marine LSPs has not yet been elucidated because of a lack of genetic information of dinoflagellates and the complexity of these structures. For exploration of biosynthetic enzymes such as epoxidase and an epoxide-opening enzyme, model precursor compounds were synthesized. Incubation of the model compounds with dinoflagellate extracts gave rise to a 6-membered ether ring products. These results strongly indicated that the epoxide-opening enzyme was found in the extract from dinoflagellates.

研究分野：天然物化学

キーワード：環状エーテル 生合成酵素 海洋微細藻

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

赤潮による魚類大量死や海産食中毒の原因物質である海産環状エーテル化合物は、微細藻類である渦鞭毛藻とハプト藻のみが生産する特徴的な二次代謝産物である。複雑な構造と強力かつ特異的な生理活性を有することから、これまで構造決定や有機合成研究が盛んに行われてきた。一方で、その生合成研究は、渦鞭毛藻のゲノム解析が遅れていることや複雑な構造を有すること、渦鞭毛藻による生産量が低いなどの理由から、あまり進んでいなかった。

2. 研究の目的

渦鞭毛藻が生産する環状エーテル化合物の生合成機構の解明は、天然物化学的重要性に加えて、将来的な酵素阻害剤の開発により有毒物質生産制御につながる公衆衛生および水産業保護にも波及する重要な研究課題である。渦鞭毛藻のゲノムサイズが大きいため、生合成遺伝子取得が困難であることから、生合成関連酵素に着目した研究を行った。海洋天然物の環状ポリエーテル構造は、エポキシド前駆体のエンド型エポキシド開環反応により生成すると推定されている。そこで、エポキシド推定前駆体モデル化合物を化学合成し、渦鞭毛藻酵素抽出液とのインキュベーション実験により、エンド型エポキシド開環反応を触媒する酵素を探索し、環状エーテル化合物の生合成機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

単環性エーテル化合物プレビサミドの推定前駆体の合成は、1,3-プロパンジオールから Brown の不斉クロチル化反応などにより合成したエステル中間体を経てヨウ素体フラグメントを合成した。次に、メタクリル酸メチルから臭素体フラグメントを合成し、ヨウ素体フラグメントと臭素体フラグメントの鈴木-宮浦クロスカップリングと 1 級 TES 基の選択的脱保護によって共通中間体であるアリルアルコールを得た。アリルアルコールから 6 工程でトランスオレフィン前駆体が合成された。また、アリルアルコールを香月 - Sharpless 不斉エポキシ化により位置および立体選択的にエポキシドに変換してエポキシド前駆体を合成した。

次に、梯子状ポリエーテル化合物イエソトキシンの AB 環部と共通構造を有するイエソトキシンの AB 環エポキシ化合物を酵素反応のモデル基質として合成した。D-グルコースを出発原料とし、ポリ環状エーテル AB 環モデル化合物を合成した。

定常期に達した渦鞭毛藻の培養液を遠心分離し、上澄みを除去した。次に、沈殿した鞭毛藻をバッファーで洗浄し、再び遠心分離して上澄みを除去した。この洗い込みを 2 回行った後、抽出溶液に鞭毛藻の藻体を移し、超音波破砕機で藻体を破砕抽出して遠心分離し、抽出液を得た。この抽出液にエポキシド前駆体を各種条件下でインキュベーションし、メタノールで反応を停止した。その後、遠心分離により不溶化物を除去し、上澄みを液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC/ESI-MS) によって分析した。

4. 研究成果

海洋プランクトンから単離された単環性エーテル化合物プレビサミドの推定生合成前駆体合成に成功した。プレビサミド生合成前駆体をプランクトンの酵素抽出液と混合して反応させ、目的の酵素反応生成物を検出することで、環状エーテル化合物の生合成に関与する酵素の探索を行った。環状エーテル化合物を生産する 3 種類の渦鞭毛藻の抽出液に、推定生合成前駆体化合物を加えてインキュベートした後、メタノールで反応を停止し、溶液を遠心分離して得た上澄みを LC-ESI/MS で分析し、マススペクトルと保持時間から酵素生成物を確認した。その結果、二重結合をエポキシドに酸化する酵素やエポキシドのエンド型開環酵素は発見できなかったが、

エポキシド前駆体の側鎖アルデヒド基の酸化および、ジエンヒドロキシメチル末端の脱水素反応が観測された。多くの海産環状エーテル化合物は、分子末端側鎖に不飽和アルデヒド構造を有している。これらのアルデヒド基は生合成における脱水素化によって生じると考えられ、今回観測した脱水素化反応はこうした梯子状ポリエーテル化合物の生合成に関与している可能性が示唆された。さらに条件検討を行い、この脱水素反応は、補酵素がない条件では起こらないことから、不飽和アルデヒドの生成が酵素によって触媒されていることを確認した。これらの反応は、環状エーテル化合物を生産する渦鞭毛藻酵素抽出液でのみ触媒されたことから、海産環状エーテル化合物の生合成に関与している酵素を発見した。脱水素反応は、基質がポリケチド合成酵素から解離した後に起こると予想され、生合成機構の最終段階を制御していることが示唆された。

梯子状ポリエーテル化合物イエソトキシンの AB 環部と共通構造を有するイエソトキシン AB 環エポキシ化合物を酵素反応のモデル基質として合成した。渦鞭毛藻酵素抽出液に、エポキシモデル基質を加えて、室温でインキュベーションを行った。酵素混合液に、メタノールを加えて反応を停止し、遠心分離により不溶化したタンパク質群を除去し、メタノールにより酵素反応物を抽出した。酵素反応物を LC/ESI-MS 分析を行ったところ、6 時間後に、6-エンド環化物のピークが観測され始め、21 時間後に、エポキシド基質が消失し、6-エンド環化物が主成分として変換されたことを確認した。渦鞭毛藻はゲノムサイズが大きいいため、分子生物学的手法による生合成研究が困難であったが、有機合成化学による基質合成と質量分析を利用した微量分析法、渦鞭毛藻から抽出した酵素を用いた生化学的手法を組み合わせることにより、海産環状エーテル化合物の生合成に関与すると考えられる生合成関連酵素を初めて見出すことが出来た。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

H. Nagai, M. Watanabe, S. Sato, M. Kawaguchi, Y. Y. Xiao, K. Hayashi, R. Watanabe, H. Uchida, M. Satake, *Tetrahedron*, **2019**, 75 (17), 2486-2494. 査読有

New aplysiatoxin derivatives from the Okinawan cyanobacterium *Moorea producens*
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.03.020>

M. Satake, R. Irie, Y. Hamamoto, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, V. Beuzenberg, Y. Itoh, F. Hayashi, H. Zhang, *Heterocycles*, **2018**, 96 (12) 2096-2105. 査読有

Brevisulcenal-G, -H, and -I, polycyclic ether marine toxins from the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*
DOI: 10.3987/COM-18-14014

N. Osato, H. Onoue, Y. Toma, K. Torikai, M. Ebine, M. Satake, T. Oishi, *Chem. Lett.*, **2018**, 47, 265-268. 査読有

Convergent synthesis of the WXYZ ring of maitotoxin and the HIJK ring of brevisulcenal-F
<https://doi.org/10.1246/cl.171056>

M. Satake, K. Cornelio, S. Hanashima, R. Malabed, M. Murata, N. Matsumori, H. Zhang, F. Hayashi, S. Mori, J. S. Kim, C.-H. Kim, J.-S. Lee, *J. Nat. Prod.*, **2017**, 80, 2883-2888. 査読有

Structures of the largest amphidinol homologues from the dinoflagellate *Amphidinium carterae* and structure-activity relationships
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00345

R. Irie, R. Suzuki, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, P. McNabb, V. Beuzenberg, F.

Hayashi, H. Zhang, M. Satake, *Heterocycles*, **2016**, 92, 45-54. 査読有

Brevisulcatic acids from a marine microalgae implicated in a toxic event in New Zealand.

DOI: 10.3987/COM-15-13332

〔学会発表〕(計 9件)

Xiong Weiqi・土川博史・原利明・村田道雄・佐竹真幸

アミロイドペプチドへの結合モチーフとしての各種梯子状ポリエーテル化合物の評価と相互作用についての考察

日本化学会第 99 春季年会 2019 年

T. Tanaka, K. Torikai, M. Ebine, M. Satake, T. Oishi

Synthetic study of the VWX ring system of brevisulcinal-F

日本化学会第 99 春季年会 2019 年

新井智之・鳥飼浩平・海老根真琴・佐竹真幸・大石徹

ブレビスルセナル-F の RS 環部の合成研究

日本化学会第 99 春季年会 2019 年

M. Satake, D. Naganuma

Biosynthetic enzymes related to marine polyethers in dinoflagellate extracts

The 18th international conference on harmful algae, 2018

Xiong Weiqi・原利明・土川博史・村田道雄・佐竹真幸

梯子状ポリエーテル化合物のアミロイド 凝集阻害活性および相互作用の評価

日本化学会第 98 春季年会 2018 年

田中達也、鳥飼浩平、海老根真琴、佐竹真幸、大石徹

ブレビスルセナル-F の VWX 環部の合成研究

日本化学会第 98 春季年会 2018 年

M. Satake, D. Naganuma, T. Genji

Exploration of biosynthetic enzymes of marine polyethers in dinoflagellates

The International Symposium Fisheries Science for Future Generations, 2017

原利明・黄悦・佐竹真幸・村田道雄

イエットキシンとグリコフォリンA 膜貫通部位のリン脂質膜中における相互作用

日本化学会第 96 春季年会 2016 年

K. Yamada, M. Satake, S. Fukuzawa, K. Tachibana, T. Hara, M. Murata

Interaction between transmembrane model peptides and ladder shaped polycyclic ethers (LSPs)

Pacificchem 2015 Honolulu Hawaii 2015.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。