

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710174
 研究課題名（和文）特異なポリシクロプロパン抗菌物質の生合成における骨格構築機構の解明
 研究課題名（英文）Biosynthetic study of unprecedented polycyclopropane antifungal substance

研究代表者
 常盤野 哲生（TOKIWANO TETSUO）
 秋田県立大学・生物資源科学部・助教
 研究者番号：50312343

研究成果の概要：

放線菌が生産する抗菌性物質 FR-900848 は他に類例のない特異なポリシクロプロパン構造を有する。この化合物が生産されるメカニズムの鍵となる中間体および骨格形成の時期について、初めて実験的証拠を得た。また、FR-900848 の生産に関与する酵素遺伝子の探索を行い、遺伝子取得に向けた基盤を構築して新奇遺伝子発見への道を開いた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	300,000	2,300,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：シクロプロパン、ポリケタイド、生合成酵素、生合成酵素遺伝子

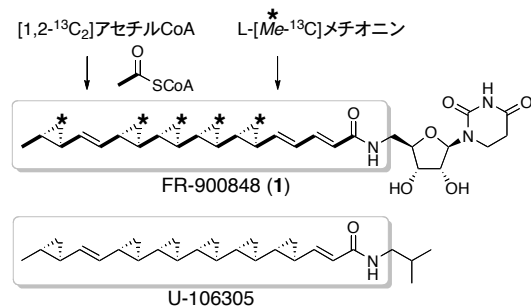
1. 研究開始当初の背景

シクロプロパン環は天然有機化合物に広く存在し、多様な薬理活性に寄与する重要な官能基である。興奮性伝達物質であるグルタミン酸受容体の拮抗薬研究に代表されるように、シクロプロパンは炭素-炭素2重結合とは異なる反応性を示し、分子の立体配座を固定することで活性を発現することが知られている。

FR-900848 (1) は放線菌 *Streptoverticillium fervens* が生産する抗菌活性物質であり、非

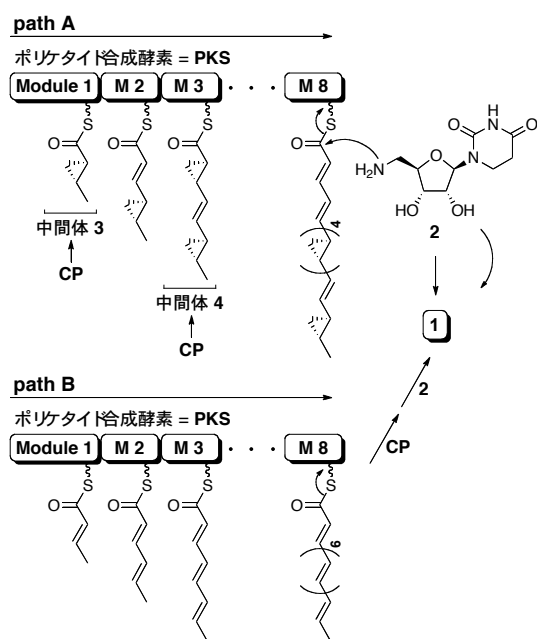
常に珍しい連続したポリシクロプロパン構造を有する (Figure 1)。1990年に藤沢薬品工業により単離・構造決定がなされ、植物病害菌に対する防除効果が報告されている。類縁化合物は U-106305 が知られているだけで、生合成研究の報告もこの1例のみである。これらの生合成酵素については全く不明であり、今後はシクロプロパン合成酵素 (CP) も含めた酵素遺伝子の探索が重要となってくる。

Figure 1



近年、本研究者は **1** の生合成起源を実験的に明らかにした。不飽和脂肪酸部位は酢酸ユニット (アセチル CoA) を 2 炭素の伸張単位として構築されるポリケタイドであり、シクロプロパンの CH₂ 炭素は L-メチオニン由来であることが判明した。従って不飽和脂肪酸部位の炭素鎖はポリケタイド合成酵素 (PKS) により構築されており、シクロプロパンの導入を含む生合成経路については Path A、Path B の 2 通りが考えられる (Scheme 1)。Path A は炭素鎖伸張に伴って段階的にシクロプロパンが導入されていき、最終的にジヒドロリジン部位 (**2**) と縮合して **1** が生合成される。Path B は炭素鎖伸張の完了後にポリエン中間体に対してシクロプロパン化反応が起こる。これらの生合成経路は以前より提唱されてきたものの、現在のところ証明はなされていない。そこで、**1** のポリシクロプロパン部位の生成機構を生合成酵素のレベルで解明するべく研究を開始した。

Scheme 1



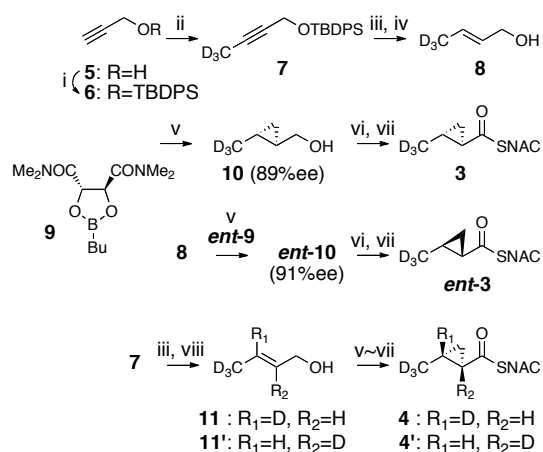
2. 研究の目的

- 1) **1** の生合成におけるシクロプロパン導入経路を実験的に明らかにする
- 2) **1** の生合成酵素遺伝子の探索

3. 研究の方法

1) 抗菌性物質 **1** の生合成中間体は、(1*R*,2*R*)-2-methyl-1-cyclopropane-carboxylic acid (Scheme 2, **3**) と予想されたので、これに相当する重水素標識アナログを合成して生産菌へ投与し、代謝生成物の解析を行った。中間体アナログは **3** および比較対象として鏡像異性体 *ent*-**3** についても合成・投与実験を行った。これらを生産菌に投与した際に、生体内で代謝された後に生合成経路に取り込まれる可能性を否定するため、分子内の 2 カ所を重水素標識した中間体アナログ (**4**) も実験に供することにした。重水素標識体の合成を種々検討し、**3**、*ent*-**3** および **4** を合成した (Scheme 2)。2-propyne-1-ol (**5**) から 4 段階で **8** を合成し、既知の方法によりシクロプロパン環を導入して **10** および *ent*-**10** とした。RuCl₃ 酸化によりカルボン酸として SNAC (*N*-acetyl cysteamine) エステル **3** および *ent*-**3** に変換した。**4** は **5** から 3 段階で得られる [4,4,4-²H₃]-2-butyne-1-ol の LiAlH₄ 還元後に重水処理して **11** を合成し、**3** と同様に SNAC エステルまで導いた。これら中間体アナログを **1** の生産菌に投与して培養し、生成した **1** の水酸基をアセチル化後に、重水素 NMR を測定した。

Scheme 2



Reagents and conditions: i) TBDPSCl, imidazole, DMF, 25 °C; ii) BuLi, CD₃OTs, THF, 25 °C; iii) HF-pyridine, THF, 25 °C; iv) LiAlH₄, NaOMe, THF, -10 °C; v) CH₂I₂, Et₂Zn, CH₂Cl₂, 0 °C; vi) RuCl₃, NaIO₄, CCl₄-H₂O-CH₃CN, 25 °C; vii) *N*-acetylcysteamine, DCC, Ph₃P, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C; viii) LiAlH₄, NaOMe, THF, -10 °C, then D₂O.

2) FR-900848 の生合成酵素遺伝子のうち、脂肪酸部位はポリケタイド合成酵素 (PKS) により生合成され、ポリエンを生成するドメインの組を基本に持つと考えられた。よって、これまで知られている放線菌の PKS 遺伝子との相同性を元に、生合成遺伝子クラスターの探索を行った。FR-900848 の生産菌からゲノム DNA を抽出し、制限酵素処理で 40kb 程度のサイズとした断片から fosmid ライブラリを作製した。異なる種間でよく保存されている PKS の KS の遺伝子配列をもとにして、degenerate PCR を行った。その結果、既知のポリエンマクロライド化合物の KS と相同性を持つ DNA 断片が得られたので、この断片をプローブにしてコロニーハイブリダイゼーションとサザンハイブリダイゼーションによるスクリーニングを経て、得られた陽性 fosmid のショットガンシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

1) 上記実験の結果、中間体アナログの標識位置に対応する化学シフトに重水素シグナルが観測され、**3** および **4** の取り込みが確認された (Figure 3)。**4** についてはシグナルの積分値の比が **4** の重水素化率を反映した結果となった。また、アナログ *ent-3* は取り込まれなかったことから、生合成酵素は鏡像異性体を明確に区別していることが示された。以上のように、生合成におけるポリケタイド伸長反応と平行してシクロプロパン環が構築される (Scheme 1, Path A) ことを初めて実験的に証明した。今後、化合物 **1** の生合成酵素遺伝子を探索するうえで重要な情報となる。

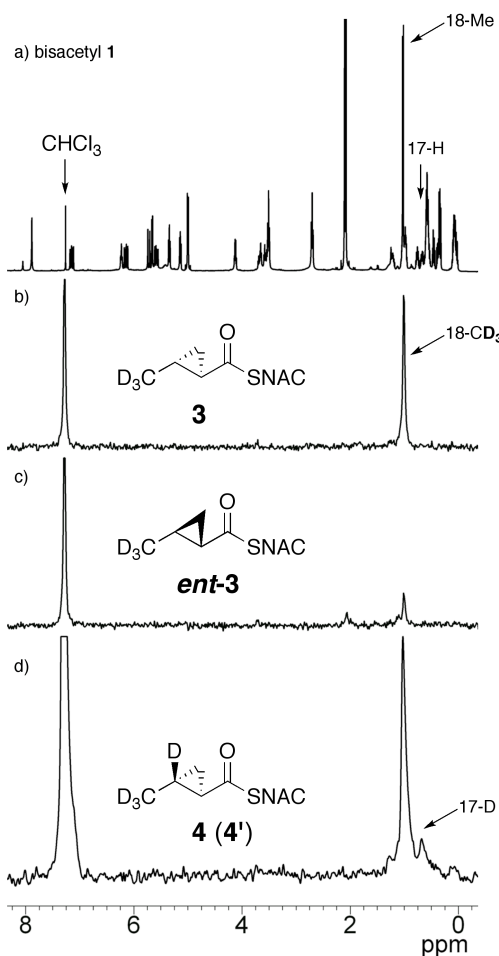
大腸菌や結核菌の細胞壁脂質成分に由来する脂肪酸に働くシクロプロパン合成酵素 (CP) は以前から知られているが、その反応は孤立炭素-炭素 2 重結合に S-アデノシルメチオニン (SAM) が求電子剤として作用するものである (Scheme 3, a)。これに対して SAM が求核剤として作用し、 α,β -不飽和チオエステル中間体を経由する反応機構 (Scheme 3, b) も提唱されていたものの、そのいずれであるかはこれまでのところ不明であった。今回の結果は後者のメカニズムを支持しており、更に、ポリケタイド合成酵素と協同的に働く新規 CP の関与を示唆している。

2) 生合成遺伝子探索の結果、放線菌 *Streptomyces natalensis* と *avermitilis* にそれぞれ由来するマクロライド Pimaricin および Filipin に類似の生合成遺伝子が得られた。それらが持つ AT ドメインの数と ER ドメインの存在は、予想する生合成遺伝子とは異

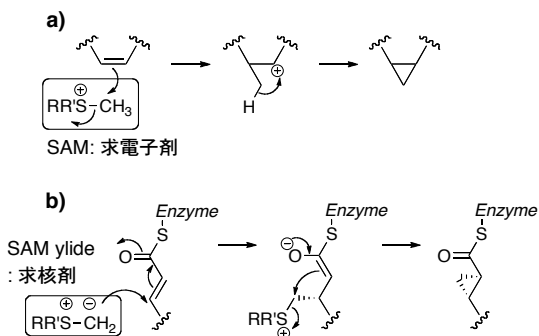
なるものであった。従って、このプローブで検出されないか感度の弱い他の fosmid 中に目的の生合成遺伝子クラスターが存在する可能性が示唆された。また、先の degenerate PCR では他に粘液細菌由来の PKS に類似する DNA 断片も得られており、今後はこれをプローブにして目的遺伝子を取得できる可能性がある。以上のように、化合物 **1** の生合成遺伝子クラスター取得に向けた基盤を構築し、新奇 PKS 遺伝子発見への道を開いた。

これまでのところ、1) で示唆されたメカニズムの反応を触媒する酵素は発見例が無い。また構造の特異性や予想生合成経路から、新規 PKS ドメインの存在が強く示唆される。有機合成化学においてポリエン化合物へ自在にシクロプロパンを導入することは困難であり、探索の目的とする酵素遺伝子は、酵素反応を利用したシクロプロパン環合成法の開発にも繋がるものである。将来的には他のポリケタイド合成酵素と組み合わせることで、新規抗生物質開発への応用も期待される。

Figure 3



Scheme 3



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 1 件)

Tetsuo Tokiwano, Hiroaki Watanabe, Takashi Seo and Hideaki Oikawa

'Unprecedented biological cyclopropanation in the biosynthesis of FR-900848'

Chemical Communications, **2008**, 6016-6018.

(査読有)

[学会発表] (計 1 件)

清尾 崇・渡辺 裕知・常盤野 哲生・南 篤志・及川 英秋

「抗真菌性抗生物質 FR-900848 生合成における特異なシクロプロパン環構築機構に関する研究」

日本化学会第 89 春季年会 (日本大学理工学部船橋キャンパス、2009 年 3 月 30 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常盤野 哲生 (TOKIWANO TETSUO)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50312343