

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710213
 研究課題名（和文） 生理活性ポリエーテル化合物における骨格形成機構の全容解明と新物質創製への展開
 研究課題名（英文） Biosynthetic study of polyether skeleton; functional analysis of epoxidase and epoxide hydrolase.
 研究代表者
 南 篤志（MINAMI ATSUSHI）
 北海道大学・大学院理学研究院・助教
 研究者番号：40507191

研究成果の概要（和文）：イオノフォアポリエーテル生合成における2種類の鍵酵素（エポキシ化酵素、エポキシド加水分解酵素）の機能解析から、「生物によるポリエーテル骨格構築戦略」の一旦を化学的に解明した。本成果は、化学合成が困難なポリエーテル骨格の酵素合成を展開する上での基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Functional analysis of two enzymes, epoxidase and epoxide hydrolase, involved in ionophore polyether biosynthesis advances our understanding of the enzymatic asymmetric epoxidation and epoxide-opening cascades. These findings open the door for the enzymatic synthesis of polyether skeleton.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ポリエーテル、生合成、エポキシド加水分解酵素、エポキシ化酵素

1. 研究開始当初の背景

イオノフォアポリエーテルとは、テトラヒドロフラン（THF）やテトラヒドロピラン（THP）が複数連結したポリエーテル骨格を有する化合物の総称であり、イオノフォア活性、イオンチャネル阻害活性、抗腫瘍性など多様な生理活性を示す。その活性発現において重要なポリエーテル骨格の生合成機構は、「ポリエン-ポリエポキシド仮説」により統一的に説明されている。この仮説では、ポリケタイド合成酵素（PKS）により生合成された鎖状ポリオレフィン前駆体に対する不斉

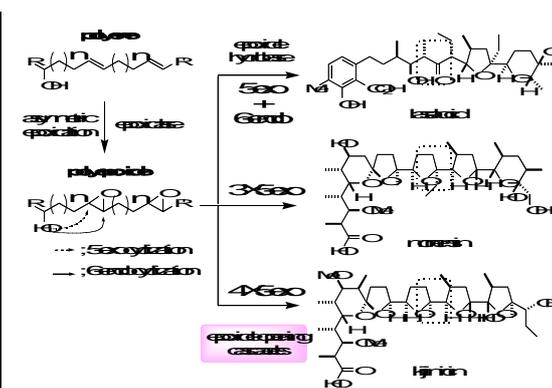


図1 イオノフォアポリエーテルの推定生合成経路

エポキシ化と続くエポキシドの開環反応によりポリエーテル骨格は構築されると提唱されている(図1)。2001年以降、代表的なイオノフォアポリエーテルであるモネンシンに加え、ナンチャンマイシン、ナイジェリシン、ラサロシド、及び類縁化合物であるテトロノマイシンの生合成遺伝子クラスターが解析され、ポリエー-ポリエポキシド仮説において重要な2種類の遺伝子(エポキシ化酵素遺伝子、エポキシド加水分解酵素遺伝子)が見いだされた。さらに、モネンシン生合成遺伝子クラスターに見いだされたエポキシ化酵素遺伝子(*monCI*)とエポキシド加水分解酵素遺伝子(*monBI*、*monBII*)の遺伝子破壊実験から、両酵素がエポキシ化とエーテル環構築に関与することが立証された(図1)。以上の結果を踏まえ、我々は「ポリエーテル骨格の生合成機構」を化学的に解明するため、両酵素の精密機能解析を開始した。

2. 研究の目的

本研究課題では、①「生物によるポリエーテル骨格構築戦略」に対する基礎的知見の拡充、②ポリエーテル化合物の酵素合成、を志向し、「立体選択的エポキシ化反応」と「連続的エポキシド開環反応」を触媒するエポキシ化酵素とエポキシド加水分解酵素の精密機能解析を行った。

3. 研究の方法

有機化学・酵素学・遺伝子工学の手法を駆使して各酵素機能を解明する。具体的には、①想定される基質及び生成物の化学合成(図2)、②部位特異的な変異の導入による各種変異体の作製、から実験に必要な基質と酵素を調製した。酵素反応生成物の解析は、生成物のLC-MS、GC-MS、NMR解析から行った。一方、生合成遺伝子クラスターの解析については、常法に従って染色体DNAを取得した後、次世代シーケンサーを使った高速シーケンス解析を外部機関に委託した。

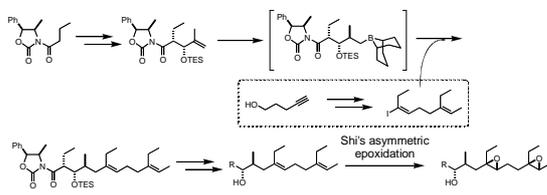


図2 基質の合成例

4. 研究成果

本研究課題で得られた成果を4つの項目に分け、以下に記載する。

(1) Lsd19によるエポキシド開環反応の反応機構解析

Lsd19による2度のエポキシド開環反応は、いずれもエポキシドに対する水酸基の求核攻撃により進行すると考えられた。これは、類似した反応を触媒するリモネンエポキシド加水分解酵素(LEH)にみられる反応機構と同一である。LEHでは一組の酸性アミノ酸残基が酸-塩基触媒残基として作用することで開環反応を触媒することから、Lsd19においても酸性アミノ酸が同様の働きをすると予想し、部位特異的な変異の導入実験を行った。構築した各種変異体を酵素反応に供したところ、N末ドメイン(Lsd19A)上の一組の酸性アミノ酸残基(D38、E65)が1回目の5-*exo*環化反応に、C末ドメイン(Lsd19B)上の一組の酸性アミノ酸残基(D170、E197)が2回目の6-*endo*環化反応における触媒残基であることがわかった。さらに、単独で発現したC末ドメインに6-*endo*環化活性があることも確認した。以上の実験から、Lsd19による2段階のエポキシド開環反応は独立した2つのドメインにより別々に触媒されることを証明した(図3; 発表論文1、学会発表3-6)。

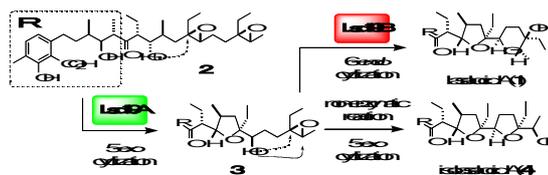


図3 Lsd19による酵素的エポキシド開環反応

(2) モネンシン生合成におけるエポキシド加水分解酵素の機能解析

①の成果により、イオノフォアポリエーテル生合成における酵素的エポキシド開環反応は、エポキシド加水分解酵素による段階的な触媒反応により進行することが推定された。このモデルが正しければ、複数回のエポキシド開環反応を各素反応に分割して解析することができるはずである。そこで、3回のエポキシド開環反応により生合成されるモネンシンに着目し、上述したモデルの妥当

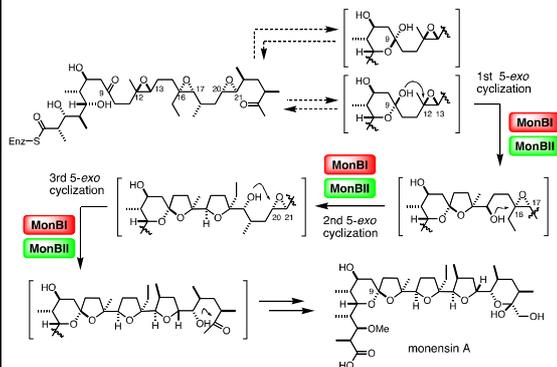


図4 モネンシン生合成における酵素的エポキシド開環反応

性について検証した (図 4)。化学合成したエポキシアルコール (推定される中間体の部分構造を有する) をエポキシド加水分解酵素 (MonBI, MonBII) による酵素反応に供したところ、モネンシン合成で予想される 5-exo 環化反応の進行が確認できた (学会発表 1、4)。本成果は、MonBI と MonBII の機能を *in vitro* で解析した初めての例であるとともに、モネンシン合成においても酵素的エポキシド開環反応が段階的に進行することを実証したものである。

(3) エポキシ化酵素の触媒能の同定

ポリエーテル骨格構築を担うエポキシ化酵素の特徴は、置換基の数、末端からの距離、2重結合周辺の官能基が大きく異なるにも関わらず、単一の酵素が立体選択的なエポキシ化を触媒している点にある。こうした特異なエポキシ化を触媒するエポキシ化酵素の機能解明のため、類縁酵素で使用実績のあるリナロールを使って酵素活性の検出を試みた。反応条件や発現用宿主を様々に検討したところ、放線菌を宿主とした *in vivo* での反応においてエポキシ化反応が進行してリナロールオキシドを生成物として与えることを見いだした (図 5 ; 学会発表 2、4)。本成果は、エポキシ化酵素の機能解析を進める上での学術的基盤になる成果であると考えている。今後、上述した実験で合成した各種基質を使ったエポキシ化反応を検討したい。

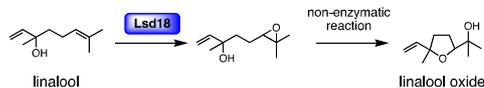


図 5 エポキシ化酵素 Lsd18 によるリナロールのエポキシ化

(4) キジマイシン生合成遺伝子クラスターの解析

ポリエーテル骨格構築の普遍性について理解するため、我々は 4 回のエポキシド開環反応により構築されるイオノフォアポリエーテルであるキジマイシンの生合成解析を開始した。常法に従い染色体 DNA を取得した後、次世代シーケンサーを使った高速シーケンス解析を行ったところ、上述したエポキシ化酵素とエポキシド加水分解酵素を含むコンティグを見いだした。このコンティグを足がかりとして PCR 法により周辺の遺伝子を解析したところ、約 60 キロ塩基対からなる生合成遺伝子クラスターの一部を取得することに成功した (図 6)。本クラスターには、キジマイシン生合成において必要だと予想される修飾酵素遺伝子の全てと 12 個のモジュールからなる予想されるポリケチド

合成酵素遺伝子の大部分が含まれていた。本解析により、エポキシドの開環反応の数に関わらず反応を触媒するエポキシド加水分解酵素は 2 つであるという大変興味深い結果を得た。今後は、成果 1 から 3 で述べた結果を踏まえて、キジマイシン生合成におけるポリエーテル骨格構築戦略を化学的に解明する。

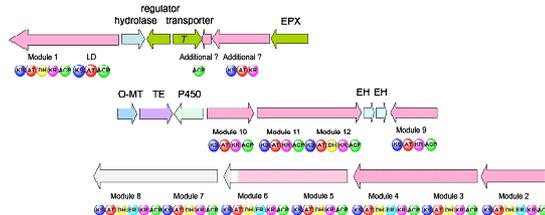


図 6 キジマイシン生合成遺伝子クラスター

以上 1 から 4 に記載したイオノフォアポリエーテル生合成における 2 種類の鍵酵素 (エポキシ化酵素、エポキシド加水分解酵素) の機能解析から、「生物によるポリエーテル骨格構築戦略」の一旦を化学的に解明することができたと考えている。将来的には本成果を踏まえ、化学合成が困難なポリエーテル骨格の酵素合成を展開したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Minami, A., Migita, A., Inada, D., Hotta, K., Watanabe, K., Oguri, H., and Oikawa, H., Enzymatic epoxide-opening cascades catalyzed by a pair of epoxide hydrolases in the ionophore polyether biosynthesis., 査読有, 13 巻, 2011, 1638-1641.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 佐藤恭平、南 篤志、大栗博毅、及川英秋、イオノフォアポリエーテル生合成における骨格構築機構 : MonBI, MonBII によるエポキシド開環反応 -第 1 報-、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 28 日、神奈川大学
- ② 島谷まゆ、南 篤志、大栗博毅、及川英秋、イオノフォアポリエーテル生合成における骨格構築機構:Lsd18 の触媒機構、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 28 日、神奈川大学
- ③ Minami, A., Migita, A., Inada, D., Watanabe, K., Oguri, H., and Oikawa, H., Detailed Mechanism of Polyether Ring Formation Catalyzed by Epoxide Hydrolase Lsd19 involved in Lasalocid A biosynthesis, PACIFICHEM 2010, 2010 年 12 月 17 日、Convention Center (ホノルル、米国)
- ④ 南 篤志、イオノフォアポリエーテル生

合成における連続的エポキシド開環反応、
若手研究者のための有機化学札幌セミナー、2010年10月27日、北海道大学

- ⑤ 南 篤志、Kim, Chu-Young、渡辺賢二、
大栗博毅、及川英秋、イオノフォアポリ
エーテル生合成における骨格構築機構：
Lsd19の触媒機構 一第2報一、日本化学
会第90春季年会、2010年3月28日、近
畿大学
- ⑥ 南 篤志、七條好宏、右田 章、松浦有
祐、稲田大樹、渡部万美、常盤野哲生、
渡辺賢二、大栗博毅、及川英秋、イオノ
フォアポリエーテル生合成における骨格
構築機構、第51回天然有機化合物討論会、
2009年10月8日、名古屋市公会堂

[その他]

ホームページ等

<http://barato.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 篤志 (ATSUSHI MINAMI)

北海道大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：40507191

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究連携者

なし