

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580167

研究課題名(和文) 標識化合物を用いたダニ類由来脂肪酸エステル代謝機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the biosynthetic mechanism of fatty formates from mites by incorporation experiments with labeled compounds

研究代表者

清水 伸泰 (Shimizu, Nobuhiro)

京都学園大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：30434658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゴミコナダニの一種 *Sancassania* sp. から2種の脂肪酸ギ酸エステルを同定し、それらの生合成機構を解明する足掛かりとして同位体標識した酢酸ナトリウムの取り込み実験を行った。NMR解析の結果、2種のギ酸エステルはリノール酸とオレイン酸がそれぞれ前駆体であることが判明した。カルボニル炭素の標識パターンから、脂肪酸が脱カルボニル化されることなく1段階で酸化してギ酸エステルに変換されると推測した。この変換には、アルデヒドを基質としたBaeyer-Villiger酸化反応を触媒する新奇な酵素が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Two fatty formates were identified from the secretions of an unidentified *Sancassania* sp. (Astigmata: Acaridae). The present study aimed to elucidate the biosynthetic mechanism of the formates by incorporation experiments with  $^{13}\text{C}$  labeled sodium acetate. The results of NMR analyses revealed that linoleic acid and oleic acid are biosynthetic precursors respectively for two formates. The labeling patterns of fatty acids and formates at the carbonyl carbons suggest that aldehydes derived from fatty acids are oxidatively converted to formates in one step without loss of the carbonyl carbons. It was concluded that novel enzymes that catalyze the Baeyer-Villiger oxidation in which the aldehyde as a substrate are involved in this conversion.

研究分野：生物有機化学

キーワード：代謝機構 脂肪酸ギ酸エステル 生合成 脂質 コナダニ

## 1. 研究開始当初の背景

研究対象とする無気門亜目ダニ(以下コナダニと略す)の天然物化学的研究は進展しており、脂肪族化合物、テルペン、芳香族化合物を中心として約90化合物が、10科61種のダニから同定されている。国内外において、コナダニ類の有機化学的研究を行っているグループは当研究室を除いて皆無であり、唯一オーストリアの研究グループが近年、隠気門亜目ダニ(ササラダニ)の天然物化学的研究を開始した。

これまで後胴体部腺分泌物を分析したコナダニ類の中で、炭化水素を分泌する種群、脂肪酸エステルを分泌する種群、両方分泌する種群、どちらも分泌しない種群の4つに大別できる。炭化水素を分泌する種群の中で、(Z,Z)-6,9-ヘプタデカジエン(以下6,9-C17:2と略す)を主成分とするダニが非常に多く、生合成的に相当する前駆物質はリノール酸である。サトウダニ *Carpoglyphus lactis* を使ったモノテルペン生合成経路の研究において、同位体標識したグルコース-1-<sup>13</sup>Cを継続的に給餌したところ、6,9-C17:2が同位体でラベル化されることをGC/MSで確認した。よってサトウダニは前駆物質であるリノール酸を生合成し、6,9-C17:2に誘導していると推測した。一部の昆虫(ゴキブリ、アブラムシ、コオロギ、シロアリなどの特定種)を除いて、一般的に動物には $\omega$ -6位に二重結合を作る $\Delta^{12}$ -デサチュラーゼがないためリノール酸を生合成できない。そこでコナダニ類がリノール酸を生合成する事実を同位体標識化合物の取り込み実験で証明した。

この研究は平成22年度~23年度の科学研究費補助金、若手研究(B)の援助を受けた成果である。研究対象とするコナダニ類が一次代謝産物およびそこから誘導される二次代謝産物の生合成研究に有効であることを示しつつある。昆虫において関連する報告では、同位体標識化合物と酵素との *in vitro* にお

る変換反応を確認することで、特定化合物の生合成の証明としているものが多い。一方、本研究は、ダニ類に同位体標識化合物を摂取させ、その代謝産物のスペクトル解析から生合成機構を推測・実証するものである。本課題では、コナダニ類の主要な分泌化合物群である脂肪酸エステル、その中でも特にギ酸エステルに注目して、その生成機構の解明を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、まずダニ類に同位体標識化合物を摂取させ、代謝物である脂肪族エステルの同位体ラベル位置を全て帰属し、生合成経路を考察する。この方法は生合成研究の中で、最も直接的に動物の代謝過程を追跡することができる方法の一つと言える。特に脂肪族ギ酸エステルの生合成に関する研究は皆無であるため、その生合成前駆体や生成機構について有機化学的手法を用いて詳細に検証する。その他、新規な高級脂肪酸エステルの生合成機構についても不明な点が多く、ダニ類における一連の脂肪族エステル生合成機構の解明を目指し、その基盤となる化学的知見を集積することを目的とした。

ゴミコナダニの一種 *Sancassania* sp. “sasagawa” は、クワガタムシの飼育容器から数年前に単離して以来、当研究室において人工培地で継代飼育している。分泌腺成分を分析したところ、コナダニ特有の炭化水素類の他に、これまで報告例のない2種の脂肪族アルコールのギ酸エステルを検出した。両化合物の炭素数は17と奇数個であるが、不飽和結合の位置から炭素数18のリノール酸とオレイン酸がそれぞれの前駆物質と推定した。これまで脂肪族ギ酸エステルの生合成に関する報告は無く、生成過程におけるギ酸部分の炭素の由来および減炭機構は未解明である。さらにユリ根から単離したコナダニ *Sancassania mycophaga* からは炭素数22の不

飽和脂肪酸と炭素数 5 の飽和・不飽和アルコールからなる新規な高級脂肪酸エステル 3 成分を検出した。本化合物群もリノール酸とオレイン酸が前駆物質と推定したが、コナダニでは珍しい炭素鎖がさらに伸長した高級脂肪酸とテルペノイド基本単位であるイソブレンとの縮合物であり、その生成機構は興味深い。そこで、これまでの研究成果に照らし合わせて、まずは *Sancassania* sp. “sasagawa” に対して同位体標識化合物の取り込み実験を行い、生成機構を考察する。これら天然物学的に興味深い化合物群の生合成過程には、全く新しい酵素が関与している可能性が高い。推定した生成機構を実証するため、同位体で標識した基質を別途合成し、ダニから調製した粗酵素によるギ酸エステルへの変換反応を *in vitro* で検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 同位体標識脂肪酸の解析

ギ酸エステル 2 成分を分泌する *Sancassania* sp. “sasagawa” を用いて、同位体標識した [1-<sup>13</sup>C]-酢酸ナトリウムの取り込み実験を行った。経時的に分泌化合物の GC/MS 分析を行い、ラベル体の取り込み量をギ酸エステルのマススペクトルから推定した。十分な取り込みを確認したところで、ダニの脂質を適当な溶媒で抽出し、グリセリドを脂肪酸メチルに誘導した。各種クロマトグラフィーによりオレイン酸とリノール酸を単離した後、それぞれの <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定した。各標品の NMR スペクトルデータと比較を行いながら、同位体でラベル化された炭素原子を全て帰属した。

#### (2) 同位体標識ギ酸エステルの解析

方法 (2) で同位体標識化合物を取り込ませたダニからヘキサンを用いてギ酸エステルを抽出した。各種クロマトグラフィーで 2 種のギ酸エステルを単離・精製し、それぞれの <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定した。別途合成

した標品のスペクトルデータに照らし合わせ、同位体標識された炭素原子を帰属し、方法 (2) の結果と併せてギ酸エステルの生成機構を考察した。

#### (3) 同位体標識基質の合成と変換反応

方法 (1)、(2) の結果より、ギ酸エステル 2 種の基質をそれぞれリノイルアルデヒドとオレイルアルデヒドと推測した。そこで、同位体標識アルデヒドを別途合成して、それらを基質とした *in vitro* での変換反応を検討する計画を立てた。市販のリノール酸およびオレイン酸をメチルエステル化後、重水素化メタノールを溶媒として塩基を作用させ、プロトン交換反応を利用してカルボニル  $\alpha$  位のメチレン水素を重水素で置換した。メチルエステルを LiAlH<sub>4</sub> でアルコールに還元後、PDC 酸化でアルデヒドに誘導した。次に合成した基質を用いて変換反応を行うため、ダニから粗酵素を調製する条件を種々検討した。

### 4. 研究成果

(1) コナダニ類は炭化水素 6,9-C17:2 を体外に分泌する種が多いのが特徴であり、本化合物はこれまでシャクガ科やオサムシ科の特定種を除く生物からはほとんど見つからない。リノール酸から生合成される 6,9-C17:2 は、フェロモンや防御物質などの化合物群を効率的に体外に放出する溶媒としての役割以外に、フェロモンとして利用するダニ種も存在する。*Sancassania* sp. から 6,9-C17:2 の類縁化合物として 2 種の脂肪族ギ酸エステルを同定し、それらの生合成機構を解明する足掛かりとして同位体標識した酢酸ナトリウムの取り込み実験を行った。[1-<sup>13</sup>C]-酢酸ナトリウムを継続的に給餌したダニをヘキサンに浸漬し、2 種の脂肪族ギ酸エステルを抽出した。それぞれの化合物をカラムクロマトグラフィーで単離した後、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定し、同位体標識された炭素原子を帰属した。また取り込み実験を

行ったダニから別途、脂質を溶媒抽出し、加水分解とエステル化反応を行ってメチルエステルに誘導した。オレイン酸メチルとリノール酸メチルを単離・精製し、ギ酸エステルと同様に  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルをそれぞれ測定し、同位体標識された炭素原子を帰属した。

(2) 成果 (1) より 2 種のギ酸エステルはリノール酸とオレイン酸が前駆体となることが判明した。さらにギ酸炭素原子と脂肪酸のカルボニル炭素が共に同位体で標識されたことから、脂肪酸が脱カルボニル化されることなく 1 段階で酸化的にギ酸エステルに変換されていることが強く示唆された。すなわちアルデヒドを基質とした Baeyer-Villiger 酸化反応を触媒する新奇な酵素が関与していると推測した。主として環状ケトン راクトンに誘導する Baeyer-Villiger Monooxygenase (以下 BVMO と略す) が微生物を中心に知られており近年、グリーンケミストリーの分野で注目されている。本研究で推測したようなアルデヒドを基質として、ギ酸エステルに変換する酵素は未だ発見されていない。植物や昆虫を含む動物では BVMO の報告例さえない。

(3) 成果 (2) よりギ酸エステル 2 種の基質をそれぞれ、リノレイルアルデヒドとオレイルアルデヒドと推測できたので、同位体標識アルデヒドを別途合成した。標品のリノール酸メチルとオレイン酸メチルのそれぞれのカルボニル  $\alpha$  位に、塩基性条件下で重水素を導入した。その後、2 段階で目的のアルデヒドに高収率で誘導することができた。次に Baeyer-Villiger 酸化酵素の同定を目的として、同位体標識アルデヒドを基質とした変換反応を *in vitro* で検討するため、ダニの粗酵素を調製した。粗酵素の抽出用バッファーおよび pH を種々検討後、高速冷却・超遠心分離機を用いて細胞小器官を分画した。これにより基質を用いた変換条件 (補酵素の有無、反応時間・温度等) を検討する準備が整った。今

後、未知の Baeyer-Villiger 酸化酵素が関与するギ酸エステルの生成機構解明に向けて、タンパク質画分を用いた変換反応を詳細に検証していく予定である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Shimizu, N., Naito, M., Mori N., Kuwahara Y. *De novo* biosynthesis of linoleic acid and its conversion to the hydrocarbon (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in the astigmatid mite, *Carpoglyphus lactis*: Incorporation experiments with  $^{13}\text{C}$ -labeled glucose *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 45, 51-57 (2014). 査読有り  
DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.11.006
2. Aboshi, T., Shimizu, N., Nakajima, Y., Honda, Y., Kuwahara, Y., Amano, H., Mori N. Biosynthesis of linoleic acid in *Tyrophagus* mites (Acarina: Acaridae) *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 43, 991-996 (2013). 査読有り  
DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.08.002

[学会発表] (計 20 件)

1. Biosynthesis of linoleic acid in *Tyrophagus* mites (Acarina: Acaridae), Takako Aboshi, 14th International Congress of Acarology, July 2014, Kyoto, Japan
2. コナダニ *Sancassania* sp. “sasagawa” における脂肪族ギ酸エステルの生合成, 清水伸泰, 日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月, 明治大学
3. コナダニ類における 9,12-octadecadienoic acid の生合成, 網干貴子, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月, 東北大学
4. サトウダニ *Carpoglyphus lactis* におけるリノール酸生合成能とその代謝産物, 清水伸泰, 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月, 東北大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://archive.kyotogakuen.ac.jp/~bioorgchem/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

清水 伸泰 (SHIMIZU NOBUHIRO)

京都学園大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：30434658