

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750361

研究課題名(和文) ポリエーテル骨格構築酵素群の精密機能解析と分子変換反応への展開

研究課題名(英文) Functional analysis of key enzymes involved in the polyether construction and application for chemo-enzymatic synthesis of polyether natural products

研究代表者

南 篤志(MINAMI, ATSUSHI)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40507191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物は、エポキシ化酵素(EPX)とエポキシド加水分解酵素(EH)による立体選択的・位置選択的な反応を巧みに利用して、天然に存在する複雑なポリエーテル化合物を生合成している。本研究課題ではこの反応制御機構の解明に焦点をあて、代表的なポリエーテル天然物生合成に関与するEPXとEHの系統的解析、ポリエーテル化合物の酵素合成を行い、制御機構の一端を解明した。加えて、本酵素の寛容な基質特異性を利用したオキサスクアレノイドの酵素化学的合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Complex polyether natural products are constructed by epoxidations followed by cyclizations as exemplified by Cane, Celmer and Westley. Two key enzymes, epoxidase and epoxide hydrolase, are involved in the highly regioselective and stereoselective reactions. To elucidate the function of those enzymes, we conducted in vitro (or in vivo) analysis utilizing substrate analogs and figure out the regulation mechanism in part. Additionally, we achieved chemoenzymatic synthesis of oxasqualenoid by utilizing functionally characterized EPX. These findings open the door for the enzymatic synthesis of polyether skeleton.

研究分野：天然物有機化学

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

ポリエーテル<sup>1</sup>とはテトラヒドロフランやテトラヒドロピラン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(図1)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。その特異な化学構造と生物活性から様々な分野の研究者が興味をもち、全合成研究や構造活性相関研究が行われている。一方、「複雑なポリエーテル骨格を生物は如何にして構築しているのか?」という点についても古くから興味を持たれ、その生合成研究も活発に行われている。

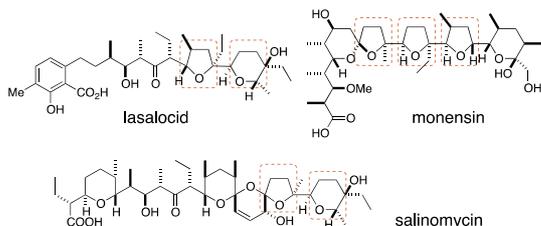


図1

このような中、申請者はポリエーテル骨格の構築において鍵反応を触媒することが予想されたエポキシ化酵素 (EPX) とエポキシド加水分解酵素 (EH) の機能解明に焦点を絞って研究を行ってきた。これまでに、「EPX によるエポキシ化反応<sup>2</sup>」と「EH によるカスケード型環化反応<sup>3</sup>」を世界に先駆けて実証するとともに、EH の基質特異性の解明や触媒機構解析、酵素-基質複合体の立体構造解析に成功してきた<sup>4</sup>(図2)。この結果から、酵素反応によるポリエーテル骨格構築戦略の特徴は、ポリエンに対する立体選択的かつ段階的なエポキシ化反応によるエーテル環部の立体化学制御、ポリエポキシドに対する位置選択的なカスケード型環化反応による環構造の制御、の2点に集約できることを明らかにした。さらに、両酵素が単純なポリオレフィンに対しても作用してポリエーテル化合物を生成物として与えることも示唆された。

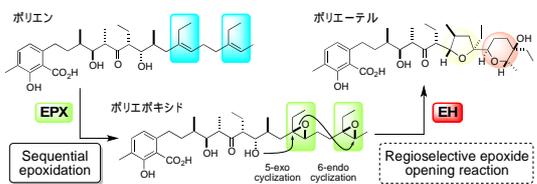


図2

以上の基礎研究の結果を受け、申請者は「EPX と EH の酵素機能を人為的に制御した上で合成化学的手法と融合すれば、様々なポリエーテル化合物を合成するための普遍的合成戦略を確立できるのではないかと」という着想を得るに至った。本研究課題では、「分子設計に基づいた天然物の酵素合成」を志向し、酵素機能の系統的解析と制御、ポリエーテル化合物の酵素合成を検討した。

### 2. 研究の目的

エーテル環の数と員数が異なるポリエーテル化合物(ラサロシド、モネンシン、サリノマイシン)の生合成を担うエポキシ化酵素 (EPX) とエポキシド加水分解酵素 (EH) に着目し、酵素機能の精密解析、ポリエーテル化合物の酵素合成、を行う。具体的には、酵素機能の同定、基質特異性の検討から、EPX による立体選択的なエポキシ化反応と EH による位置選択的なカスケード型環化反応の反応制御機構を解明する。さらに、適切な部分構造を備えたポリオレフィンを設計・合成した上で数珠玉型及び縮環型ポリエーテルの酵素合成を検討する。

### 3. 研究の方法

本研究目的を達成するためには、注目する酵素の機能を精密に解析する必要がある。そこで本研究では、組替え酵素を用いた in vitro (もしくは in vivo) 解析を適用した。すなわち、想定される基質及び生成物の化学合成、標的遺伝子のクローニングおよび大腸菌での組替え酵素の調製、酵素反応および LC-MS もしくは GC-MS を用いた酵素反応生成物の分析を行った。

### 4. 研究成果

(1) EPX による立体選択的エポキシ化反応の解析

EPX の基質であるポリエンと生成物であるポリエポキシドの化学構造を考慮すると、単一の EPX によるエポキシ化反応の立体選択性はオレフィンの置換様式にのみ依存すると予想された。そこで、ラサロシド生合成遺伝子クラスター中に見いだされた EPX をモデル酵素として選択し、エポキシ化反応の立体選択性を調べた。具体的には、2重結合周辺に置換基と幾何異性を系統的に改変した化合物の合成、合成基質を使った微生物変換反応と生成したエポキシドの分析から各基質に対するエポキシ化の立体選択性を明らかにした。この結果に基づき、EPX による立体選択的エポキシ化反応を合理的に説明する基質結合モデルを提唱するに至った(図3、発表論文1)。

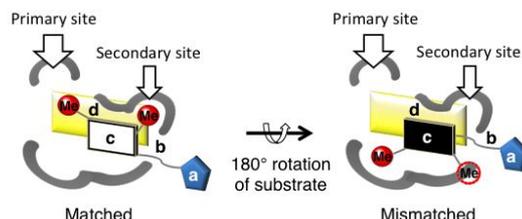


図3

(2) EH による位置選択的環化反応の解析

EH による環化反応の特徴は、環化様式の制御(5-exo vs 6-endo 環化)、タンパク質間相互作用によるカスケード型環化反応の

反応回数の制御にある。本研究課題では、サリノマイシンとモネンシンの生合成に関わる環化酵素をモデルとしてこれら2つの項目について検討した。

#### ①機能解析1～サリノマイシン～

サリノマイシンは、ビススピロアセタール構造と5員環・6員環エーテルが連結した特徴的なポリエーテル構造を有する。2012年にその生合成遺伝子クラスターが同定され、我々が機能解析に成功したEHと相同性を示す3種のEHホモログが見いだされた。これら3種のEH(のいずれか)がポリエーテル骨格構築に関与することが予想されたため、組替え酵素を用いた *in vitro* 解析を行った。化学合成したビスエポキシドを用いて酵素反応を行ったところ、目的とする5-6員環エーテルの構築が観測された。酵素反応条件を変えて検討を進めることで、SalBIIがBaldwin則に反する6-endo環化反応を触媒することを見いだした。本研究の過程で報告された2つの研究成果(SalBIIIが独立したTHP環の構築を担う、メチル基転移酵素がビス汗タール構造の構築を担う)を考慮すると、別々に存在する2種のEH(SalBI、SalBII)が5員環・6員環構築を担うと考えられた。この環化反応は、我々が世界で初めて同定したEH(Lsd19)と同様である。

#### ②機能解析2～モネンシン～

モネンシンは、スピロアセタールに3つの5員環エーテルが連結したポリエーテル骨格を持つ。その生合成遺伝子クラスターには2種のEH(MonBI、MonBII)が存在している。ラサロシド生合成における環化反応との相違点は、別々に存在する2つのEH間の相互作用が反応制御を担っている可能性があるという点に集約される。

この複雑なカスケード型環化反応を解析するには、「実験系を如何にして単純化するか?」という点がポイントになる。そこで本研究では、前駆体の部分構造を模倣したアナログ体を用いて酵素機能の解析を行うことにした。具体的には、3回のカスケード型環化反応の内、後者2回の環化反応を解析するためのビスエポキシドアナログを設計した。

Johnson-Claisen転移、鈴木・宮浦クロスカップリング、Shi不斉エポキシ化を鍵反応として、市販のmethacroleinから13工程を経て目的とするビスエポキシドアナログを化学合成した(図4)。

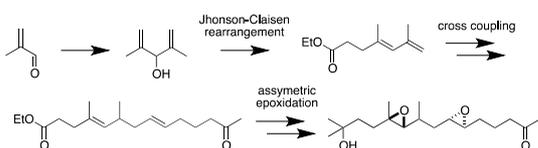


図4

次いで、合成したビスエポキシドを用いた酵素反応を検討したところ、環化反応の進行

を確認することはできた。しかしながら、用いた基質がジアステレオマー混合物であったこと、アセタール化の際にも新たな不斉中心が生じることなどの理由により、複数の基質、反応中間体(モノエーテル体、ビスエーテル体)、最終生成物が生じてしまい、反応に関与する2種類の環化酵素の機能を明確にするには至らなかった。標的アナログを不斉合成すれば、この問題を回避できると考えられる。

#### (3) オキサスクアレノイドの酵素化学的合成

天然には、オキサスクアレノイドと呼ばれるトリテルペンに由来するポリエーテル系天然物がある。そのポリエーテル骨格は、上述した天然物と同様、エポキシドを経由した環化反応によって構築されるものと考えられる。EPXの寛容な基質特異性を考慮すると、適切な分子を設計すれば本化合物の酵素化学的合成が可能であると予想された。そこで、本化合物をモデルとして、酵素化学合成の可能性を検証することにした。

オキサスクアレノイドの部分構造を模倣した基質に対してEPXを作用させたところ、エポキシ化反応と自発的な環化反応が進行して対応するポリエーテル骨格が構築された(図5)。

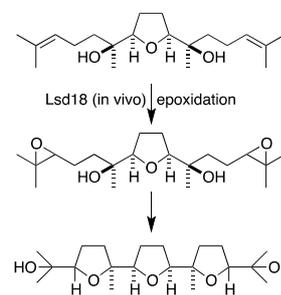


図5

ただし、生成物が2種のジアステレオマー混合物であったことから、本エポキシ化反応は立体選択的に進行していないと予想された。今後の検討により、我々が同定した酵素(EPX、EH)の物質生産に対する応用可能性が広がるものと考えている。

#### <引用文献>

1. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 165-181.
2. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12230-12231.
3. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246-7249.
4. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 562-569.
5. *Nature* **2012**, *483*, 355-358.
6. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1638-1641.

#### 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)

Suzuki, G.; Minami, A.; Shimaya, M.; Kodama, T.; Morimoto, Y.; Oguri, H.; Oikawa, H.、 Analysis of enantiofacial selective epoxidation catalyzed by flavin-containing monooxygenase Lsd18 involved in ionophore

polyether lasalocid biosynthesis.、*Chem. Lett.* 51  
巻、2014、1779-1781.、査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

南 篤志、微生物由来の生合成酵素アッセ  
ンブリーラインを活用した生物活性天然物  
の合成、日本化学会第96春季年会、日本化  
学会進歩賞受賞講演、同志社大学、2016年3  
月25日

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南 篤志 (MINAMI ATSUSHI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：40507191