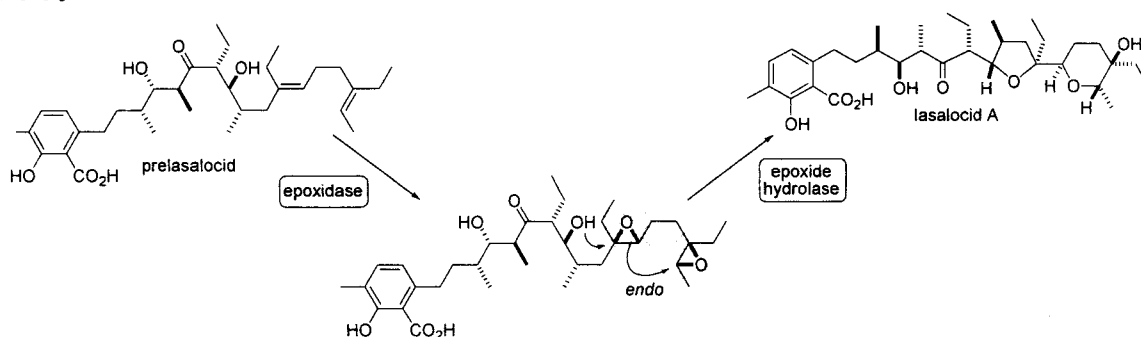


ポリエーテル系抗生物質ラサロシド合成における エーテル環構築機構に関する研究

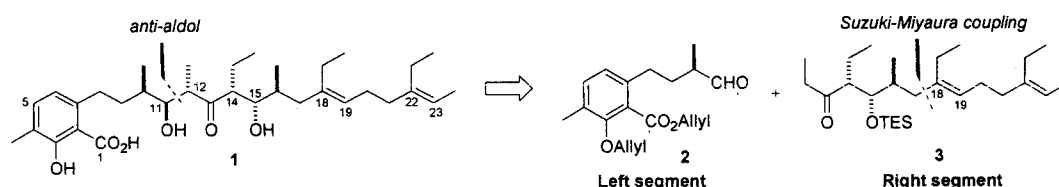
学位論文内容の要旨

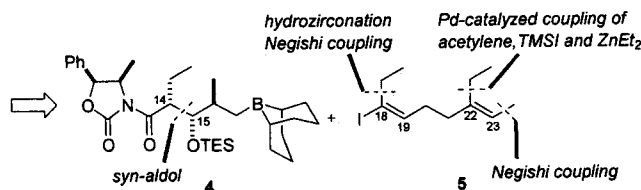
天然には抗腫瘍性、抗菌性、抗コクシジウム活性など、ユニークな生物活性を示すポリエーテル系抗生物質が多数存在する。これらポリエーテル化合物の生合成経路、特にポリエーテル環の構築機構は長年未解決の課題となっている。この機構を統一的に説明しうる仮説として、1983年にCaneらにより、ポリエン中間体がエポキシ化され、連続的な S_N2 反応によりエーテル環が構築されるという普遍性のある仮説が提唱された。しかし、四半世紀が経過した現在でもその証明がなされていない。

本研究では、ポリエーテル系化合物の中ではシンプルな構造を持つ lasalocid を研究対象として取り上げ、仮説の証明を目指した。lasalocid の構造から予測されるエーテル環化前駆体 prelasalocid の合成、またエーテル環化に関与すると推測されるエポキシ化酵素遺伝子、エポキシド加水分解酵素遺伝子の特定、および発現が研究の鍵となる。



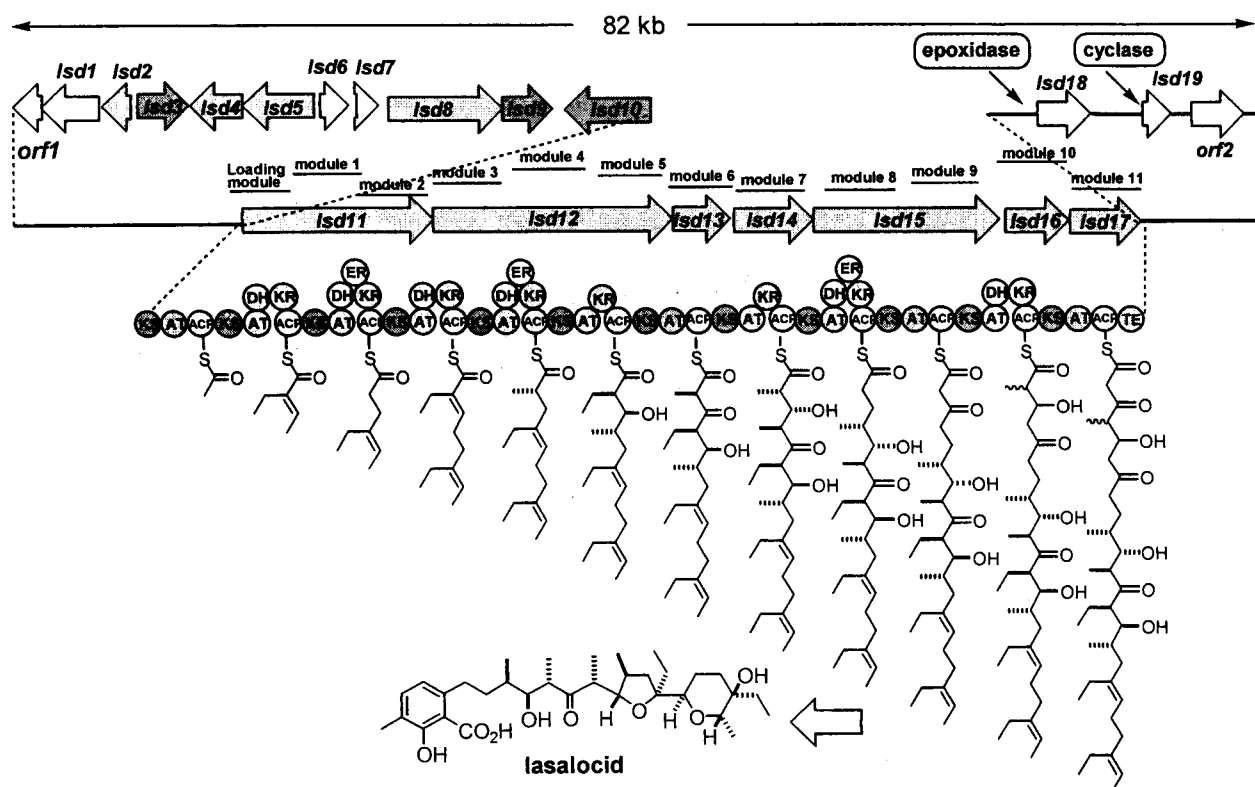
予想前駆体 prelasalocid は、下図のような3個のセグメントに分割し、それぞれを *anti*-アルドール反応、鈴木-宮浦カップリングで連結させることで、収束的に合成した。また、ポリエーテル環構築酵素の基質特異性の検討を視野に入れ、2箇所之三置換オレフィンに種々の置換基を導入可能な柔軟性の高い合成ルートを確立できた。さらに、本合成経路を用いて prelasalocid 重水素標識体を合成し、生産菌への取り込み実験を検討した。



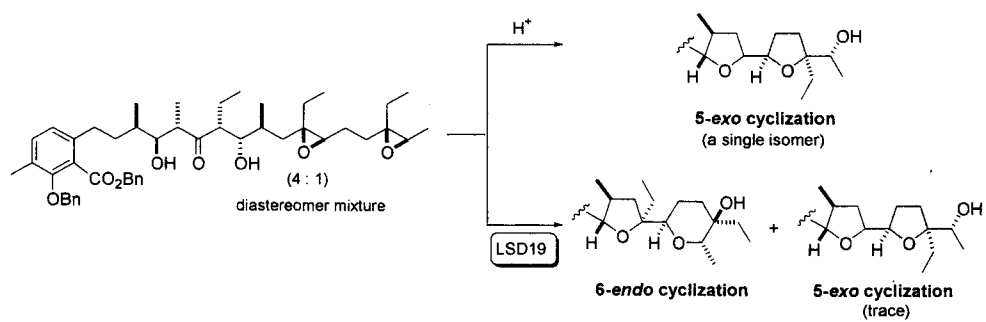


ポリエーテル環形成に関与する酵素遺伝子を特定するため、lasalocid 生産菌、*Streptomyces lasaliensis* の全ゲノム DNA から、コスミドを用いて作成したゲノムライブラリーに対し、適当なプローブを用いてスクリーニングを行い、全長 82 kb からなる lasalocid 生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。

得られた全遺伝子に関し、相同性に基づいた機能予測を行った。解析の結果、12 個のモジュールから構成される約 60 kb のポリケチド合成酵素(PKS)領域が明らかになり、そのドメイン構成から予測した prelasalocid の化学構造が、lasalocid から予測した化学構造と完全に一致することが示された。さらに PKS 周辺の染色体歩行で、他のポリエーテル系生合成遺伝子クラスターにおけるエポキシ化酵素遺伝子、エポキシド加水分解酵素遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が発見された。



本遺伝子クラスターの機能解析を目的とし、PKS 中のチオエステラーゼ(TE)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の発見、および、それぞれの予想基質との酵素反応を検討した。大量発現した TE、エポキシ化酵素では、有意な活性を検出することが困難であったが、エポキシド加水分解酵素がビスエポキシドに対しエーテル環形成を触媒することが当研究室で確認されたため、エポキシド加水分解酵素によるエーテル環構築機構について考察を行った。



学位論文審査の要旨

主 査 教 授 及 川 英 秋
副 査 教 授 澤 村 正 也
副 査 教 授 谷 野 圭 持
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 大 栗 博 毅

学 位 論 文 題 名

ポリエーテル系抗生物質ラサロシド生合成における エーテル環構築機構に関する研究

天然には抗腫瘍性、抗菌性、抗コクシジウム活性など、ユニークな生物活性を示すポリエーテル系抗生物質が多数存在する。これらポリエーテル化合物の生合成経路、特にポリエーテル環の構築機構は長年未解決の課題となっている。この機構を統一的に説明しうる仮説として、1983 年に Cane らにより、ポリエン中間体がエポキシ化され、連続的な S_N2 反応によりエーテル環が構築されるという普遍性のある仮説が提唱された。しかし、四半世紀が経過した現在でもその証明がなされていない。

本研究では、ポリエーテル系化合物の中ではシンプルな構造を持つ lasalocid を研究対象として取り上げ、仮説の証明を目指した。lasalocid の構造から予測されるエーテル環化前駆体 prelasalocid の合成、またエーテル環化に関与すると推測されるエポキシ化酵素遺伝子、エポキシド加水分解酵素遺伝子の特定、および発現が研究の鍵となる。

予想前駆体 prelasalocid は、左、中央、右という3個のセグメントに分割し、それぞれを *anti*-アルドール反応、鈴木-宮浦カップリングで連結させることで、収束的に合成した。また、ポリエーテル環構築酵素の基質特異性の検討を視野に入れ、2 箇所の三置換オレフィンに種々の置換基を導入可能な柔軟性の高い合成ルートを確認できた。さらに、本合成経路を用いて prelasalocid 重水素標識体を合成し、生産菌への取り込み実験を検討した。

ポリエーテル環形成に関与する酵素遺伝子を特定するため、lasalocid 生産菌、*Streptomyces lasaliensis* の全ゲノム DNA から、コスミドを用いて作成したゲノムライブラリーに対し、適当なプローブを用いてスクリーニングを行い、全長 82 kb からなる lasalocid 生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。得られた全遺伝子に関し、相同性に基づいた機能予測を行った。解析の結果、12 個のモジュールから構成される約 60 kb のポリケタイド合成酵素(PKS)領域が明らかになり、そのドメイン構成から予測した prelasalocid の化学構造が、lasalocid から予測した化学構造と完全に一致することが示された。さらに PKS 周辺の染色体歩行で、他のポリエーテル系生合成遺伝子クラスターにおけるエポキシ化酵素遺伝子、エポキシド加水分解酵素遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が発見された。

本遺伝子クラスターの機能解析を目的とし、PKS 中のチオエステラーゼ(TE)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の発現、および、それぞれの予想基質との酵素反応を検討した。大量発現した TE、エポキシ化酵素では、有意な活性を検出することが困難であったが、エポキシド加水分解酵素がビスエポキシドに対しエーテル環形成を触媒することが当研究室で確認されたため、エポキシド加水分解酵素によるエーテル環構築機構について考察を行った。

以上、天然に多数存在するポリエーテル化合物の骨格構築に関しては、ポリエー-ポリエポキシドを経由したポリエーテル環形成仮説は、合理的な仮説として広く受け入れられてきたが、この仮説の直接的証明は、提唱後30年以上を経過した現在でもなされていなかった。申請者は確実な証明を行うため、最も単純な構造を持つポリエーテル系抗生物質ラサロシドを研究対象とし、その仮想前駆体の合成経路を開発するとともに、生合成遺伝子群の取得に成功した。これにより大量発現した酵素で合成基質を用いた反応を行うことで、エネルギー的に不利な 6-endo 環化を触媒する酵素活性を検出され、今後最も興味深いポリエーテル環形成反応を分子レベルで解明することが可能になった。以上は天然物化学分野において非常に高く評価される成果である。

よって著者は北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。