

## 完全<sup>13</sup>C 標識メバロン酸の 調製とその応用

川出 洋 山下治之

キーワード：テルペノイド、生合成、二次代謝産物  
NMR、INADEQUATE

### はじめに

テルペノイドは、動物・昆虫・植物界におけるホルモン等の生物機能制御・生命維持に必須な化合物が知られており、その一方で医薬品(抗がん剤パクリタキセル、抗マラリア薬アルテミシニン等)、香料、樹脂等の化学工業原料として利用されているなど、人類が健康で創造的な活動をする上で必要不可欠とする化合物群でもある。

筆者らは、微生物由来のテルペノイド化合物の探索と生合成研究を行うための新しいツールを求め、炭素原子をすべて<sup>13</sup>C安定同位体元素標識したメバロン酸の調製を行った。本稿では、その調製法と標識メバロン酸の特性、ならびにこれを用いた応用研究について紹介する。

### 1. メバロン酸を発酵生産する微生物

メバロン酸は、清酒の製造過程における「火落ち」現象の原因物質「火落酸」として日本人農芸化学者によって50年前に発見されている。その後、メバロン酸を菌体外へ分泌する微生物を詳しく調べてみると、清酒製造に用いられる麹菌 *Aspergillus oryzae* だけでなく、広範な微生物類がメバロン酸を分泌する可能性

が示された。その中で、酵母菌の一種 *Saccharomycopsis fibuligera* が液体培養液中に大量のメバロン酸を分泌することが見いだされ、これを基に天然型 R-メバロン酸の発酵生産が工業的スケールで達成されている<sup>1)</sup>。

### 2. 標識メバロン酸の発酵生産

筆者らは、この *S. fibuligera* (ADK8107 株) を用い、メバロン酸発酵培地の炭素源を [U(分子内で均一に標識されている)-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] グルコース等に置換して培養を行ったところ、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] メバロン酸の高分泌生産に成功した。例えば、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] グルコースを炭素源として 10g 仕込み、培地 100mL スケールで液体培養を行い、培養後の培養濾液から酢酸エチルでメバロン酸を抽出して精製すると、350 mg の [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] メバロン酸を回収することができた<sup>2)</sup>。

得られた [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] メバロン酸を HPLC や GC-MS で分析すると、標識体と天然型メバロン酸の間に同位体効果に起因するクロマトグラフィー上の保持時間の影響はほとんどなく、比旋光度においても天然型とほぼ一致する値が得られた。*S. fibuligera* 培養時において、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] グルコースの影響と思われる生育遅延などは認められなかったことから、その物理化学的性質は天然型メバロン酸と同等と考えられる。重水素標識化合物をトレーサーに使うと、重水素による同位体効果が表れ、通常のものとは差異が生じる。化学合成された完全重水素標識メバロン酸から誘導された重水素標識カロチノイド類の物理化学的データは、天然型のものと比較するとかなり異なる<sup>3)</sup>。今回調製した完全<sup>13</sup>C 標識メバロン酸は、生物による資化性や酵素反応において同位体効果の影響を最大限低く抑えることができると考えられ、代謝研究を行う場合にも有効である。

一方、[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] メバロン酸の NMR では興味深い結果が得られた。もともと自然界には約 1% の<sup>13</sup>C 同位体が炭素には含まれており、<sup>13</sup>C NMR ではこのわずかに存在する同位体を観測している。筆者らは、これを人為的に 95% 以上の標識率で化合物を調製しているので、これらの標識化合物を測定すれば理論上 90 ~ 100 倍近い<sup>13</sup>C NMR の感度を得たことになる。実

### Preparation of fully <sup>13</sup>C labeled mevalonolactone and its applications

筆者紹介：かわいで・ひろし(KAWAIDE, Hiroshi) 東京農工大学大学院共生科学技術研究院生命農学部門(Inst. of Symbiotic Sci. and Technol., Tokyo Univ. of Agric. and Technol.) 助手 1995年岩手大学大学院連合農学研究科博士課程修了 博士(農学)

専門：天然物化学 連絡先：〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8 E-mail hkawaide@cc.tuat.ac.jp (勤務先)

やました・はるゆき(YAMASHITA, Haruyuki) (株)ADEKA 先端材料開発研究所(Advanced Materials R&D Lab., ADEKA Corp.) 主任研究員 1980年北海道大学農学部農芸化学科卒業 農学博士 専門：応用微生物 連絡先：〒116-8553 東京都荒川区東尾久7-2-34 E-mail yama@adeka.co.jp (勤務先)

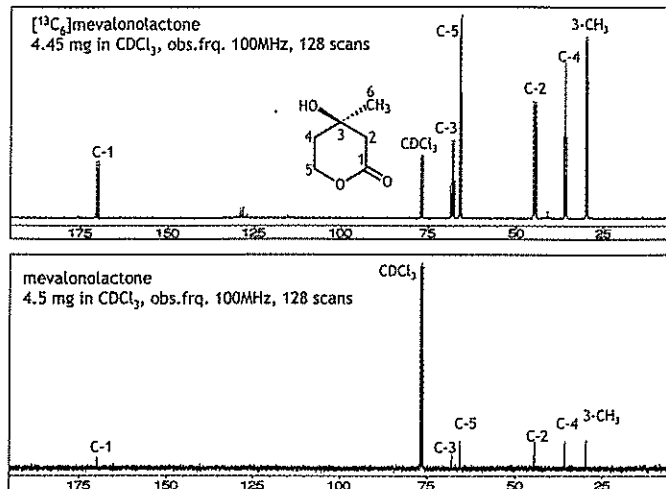


図 標識および無標識メバロン酸の<sup>13</sup>C NMR スペクトル

際にはほぼ等量のメバロン酸と[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]メバロン酸(標識率 95%)の<sup>13</sup>C NMR スペクトルを比較すると、感度の飛躍的な向上とともに C-C カップリングが観測され、化学シフトと結合定数による炭素の帰属が可能となっている(図)。

### 3. 研究用ツールとしての[U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]メバロン酸の利用

現在、標識メバロン酸を使った代謝研究について、筆者は次の 2 つの研究を進めている。

①メバロン酸を出発物質とするテルペノイド類の網羅的解析：メバロン酸は、アセチル CoA が 3 分子縮合したヒドロキシメチルグルタリル CoA(HMG-CoA) を経て合成される。HMG-CoA からメバロン酸への還元反応は哺乳動物のコレステロール代謝の律速段階として知られ、この還元酵素阻害剤はメバスタチンをはじめとする高脂血症治療薬としても開発されている。その一方で、メバスタチンの投与は菌類のメバロン酸やエルゴステロールの供給を断つことになるので、抗菌作用も知られている<sup>4)</sup>。そこで、菌類を培養するときに培地中にメバスタチンとエルゴステロールを添加し、そこで生育した菌体に標識メバロン酸を取り込ませる実験は、菌類由来のテルペノイド代謝物のメタボローム解析基盤を構築する有効なアプローチと考えている。現在筆者らの研究室では、生合成経路が未解明の菌類テルペノイド代謝物を前述のようなアプローチで進めており、HPLC と<sup>13</sup>C NMR を用いた網羅的解析による生合成研究を展開している。

②機能未知代謝酵素遺伝子類の機能解析ツール：筆者らは、標識メバロン酸を出発原料としてテルペノイ

ド化合物の共通する前駆物質・プレニル二リン酸を酵素的に合成し、完全<sup>13</sup>C 標識プレニル二リン酸の酵素的合成も行っている。現在までに、炭素数 15 個の[U-<sup>13</sup>C<sub>15</sub>]ファルネシル二リン酸の酵素的合成において、メバロン酸から 5 段階の反応に必要な 5 種の組換えタンパク質を調製し、これらに補助因子を混合した酵素カクテルを用いて mg レベルでの合成に成功している<sup>5)</sup>。テルペノイド化合物は、ファルネシル二リン酸をはじめとする多様なプレニル二リン酸からテルペノイド基本骨格を構築するのに必要な環化酵素と、炭素骨格への酸素原子導入や骨格修飾に関与する酸化酵素等の働きにより、2 万種を超える構造の多様性と多様な活性発現を持つ。テル

ペノイド生合成の大きな特徴として、タンパク質の一次配列に類似性があっても同一基質から多様で複雑精緻な酵素反応生成物が生じるので、これら酵素機能の解析では少量でも詳細な構造解析ができる手法やツールが求められる。全<sup>13</sup>C 標識体の各種テルペノイドの調製は、これらの課題を克服するツールとして有効であると考えている。<sup>1</sup>H NMR の観測から炭素骨格を解析するのではなく、炭素原子の直接 NMR 観測によって構造を解析する方法は、C-C 二次元 NMR 法(INADEQUATE 法)と組合せることにより、高感度で多くの構造情報を得ることが可能となるからである。

以上のような研究手法の紹介は、テルペノイド代謝物の探索・解析手法に斬新なアイデアと強力なツールを提供するもので、新しい天然物化学の領域へ開拓できるものと期待している。天然物資源の開拓だけでなく、ゲノム科学から提供される未利用の有用遺伝子資源の開拓にも発展させていきたい。

### 参考文献

- 1) Yamashita, H. *et al.* : The study of mevalonolactone and its applications, *Bio Industry*, 17, 53 ~ 61 (2000)
- 2) 川出 洋ほか：標識された R-メバロン酸の製造方法, 公開特許公報, 特開 2005-269982 (2005)
- 3) Eguchi T. *et al.* : Preparation of highly deuterated zeaxanthin, lycopene, and  $\beta$ -carotene from fully deuterated mevalonate using engineered *Escherichia coli*, *Tetrahedron*, 61, 2027 ~ 2035 (2005)
- 4) Chakravarti, R. *et al.* : Compactin - a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 618 ~ 624 (2004)
- 5) 湯本 勇ほか：完全 C-13 標識プレニル二リン酸の酵素的合成, 植物の化学調節, 41 巻(Supplement), 60 (2006)