



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Enzyme catalysis for algal secondary metabolites : Studies on halogenated compounds from <i>Laurencia</i> spp. and cyanobacterial homotyrosine [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	凌, 正一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第16210号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95299
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	LING_Zhengyi_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 凌 正一

審査委員 主査 教授 沖野 龍文
副査 教授 野呂 真一郎
副査 准教授 梅澤 大樹
副査 教授 脇本 敏幸 (大学院薬学研究院)

学 位 論 文 題 名

Enzyme catalysis for algal secondary metabolites: Studies on halogenated compounds
from *Laurencia* spp. and cyanobacterial homotyrosine

(藻類の二次代謝における酵素反応：ソゾ類のハロゲン化合物および藍藻のホモチロシンに
関する研究)

藻類の二次代謝産物のうち紅藻のハロゲン化合物および藍藻のペプチドはとりわけ多様性が高い。これらの化合物の生合成を司る生体触媒である酵素は、産業的な応用も期待されるものであり、その性質を詳細に理解することが期待されている。申請者は特に二つの酵素群に着目した。藍藻*Microcystis aeruginosa* NIES-4285にジホモチロシンが含まれるペプチドが複数発見されたことを契機に、チロシンから2回メチレン鎖を伸長させる機構に関心をもった。これまでに藍藻におけるホモチロシンを合成する機構は明らかにされているが、2回メチレン鎖を伸長させる機構については報告がない。ホモアミノ酸を含む医薬品は多数あり、応用面でも重要な酵素である。また、紅藻におけるハロゲン化酵素であるバナジウム依存型ブロモペルオキシダーゼにも着目した。紅藻のハロゲン化合物は、環境条件の変化に応じて防御機能を示すことで知られている。医薬品候補としても有望である。また、環境に優しい船底防汚活性が見いだされてきた。これまで多くのブロモペルオキシダーゼの配列は報告されてきたが、その二次代謝における活性は曖昧なままであった。天然のハロゲン化合物と思われる化合物の生成例はあるものの、構造の同定が十分でなかった。以上、二つの酵素群の反応の解明に申請者は取り組んだ。

まず、藍藻*M. aeruginosa* NIES-4285から*MahphA, B, C, D*と名付けた酵素遺伝子を見だし、大腸菌で異種発現して得られたタンパク質を使って、チロシンやフェニルアラニンを基質として酵素反応を実施した。その結果、最初はホモチロシンあるいはホモフェニルアラニン、反応時間が長くなるにつれジホモ体、さらにはトリホモ体が生成されることを確認した。天然物としてジホモチロシンのみが見られる理由については解明には至らなかったものの、ホモロゲーションのサイクルが2回あるいは3回繰り返すことを初めて実験的に証明した。

紅藻*Laurencia nipponica* (ウラソゾ) から最初にハロゲン化合物として報告されたlaurencinの前駆体であるdeacetylalaurencinの生合成反応に取り組んだ。2種のソゾから報告されているブロモペルオキシダーゼ遺伝子*LnVBPO1, 2*, および*LsVBPO1, 2*を大腸菌で異

種発現して酵素タンパク質を調製した。これまでタンパク質の精製に時間がかかっていたところを、HisタグおよびSUMOタグを活用することで短時間精製に成功し、多数の実験を実施することが可能となった。LaurencinをはじめとするC₁₅アセトジェニンの前駆体と推定されるlaurediolを天然のlaurencinから調製し、酵素反応に供した。その結果、予想どおりdeacetylalaurencinの生産が確認され、MSのみならず二次元NMRで構造を確認し、標品との比較も行い、ソゾの生合成研究の中で酵素反応生成物のハロゲン化物として確実な同定に初めて成功した。さらに、deacetylalaurencinに対しVBPOの反応を行うと、さらにもう1回臭素化、環化が進むことが確認され、特に生成物の一つは天然物であるlaureoxanyneのデータに一致した。最近、ソゾ類のセスキテルペノイドの骨格合成については酵素合成の報告がされているものの、臭素化反応には至っておらず、本研究がソゾのハロゲン化物生合成研究の壁を打ち破ったといえる。

さらに、紅藻ソゾ類のトリテルペノイドエーテルの臭素化機構を解明するため、合成されたC₁₅エポキシドを基質としたVBPO反応にも取り組んだ。その結果、環状エーテル化合物およびhalonerolidol類似の化合物が得られた。環状エーテル化合物が得られたことは、適切な基質を選ぶことによりトリテルペノイドエーテルの酵素合成も可能であることを示唆している。また、halonerolidol類似の化合物が得られたことから、nerolidolを基質として、臭素化と共に塩素化も試みた。その結果、VBPOにより臭素化されたカチオンが生成し、非酵素的に塩素が導入されることが認められた。ソゾ類にはブロモペルオキシダーゼは存在するものの、クロロペルオキシダーゼは存在しない。しかしながら、塩素と臭素の両方を有する化合物も多数報告されている。本研究により、非酵素的な塩素化が実験的に証明された。

先行研究のVBPOの反応実験に比べて、反応条件の最適化により、上記のような生成物の収率向上に伴う構造決定が可能となった。

以上のように、申請者は、緻密な実験により藻類にユニークな生合成酵素群の解明に至り、環境に優しい生体触媒の実用化に供する重要な知見を得た。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。