

異毛類繊毛虫 *Blepharisma japonicum* が有する自己防御物質 blepharismins の生合成開始ユニット

吉岡 康一¹, 富永 宗平¹, 櫻間 由幸², 臼杵 克之助¹, 飯尾 英夫¹
(¹大阪市立大学大学院理学研究科, ²国立米子工業高等専門学校物質工学科)

Identification of the starter units for the biosynthesis of blepharismins of the heterotrich ciliate *Blepharisma japonicum*

Koichi YOSHIOKA¹, Sohei TOMINAGA¹, Yoshiyuki URUMA², Yoshinosuke USUKI¹ and Hideo IIO¹ (¹Department of Material Science, Graduate School of Science, Osaka City University, ²Department of Materials Science, Yonago National College of Technology)

SUMMARY

The heterotrich ciliate *Blepharisma japonicum* has red pigment blepharismins (BPs). These pigments have been known to have three functions: light perception, chemical defense against predators, and protection against UV radiation. The chemical structures of BPs were shown to be polycyclic (*p*-hydroxybenzylidene) and benzodanthrone derivatives, respectively. Recently, we reported that the dibenzoperylene quinone moiety of BPs was biosynthesized via the polyketide pathway. This was discovered during our studies of ¹³C NMR assignment for BP-C by analysing 2D spectra of ¹³C-enriched samples, which were obtained by feeding experiments using ¹³C-labeled sodium acetates. As a result of these studies, we hypothesized that the starter unit of BP-C was derived from L-leucine or isovaleryl-CoA, based on its incorporation of ¹³C-labeled sodium acetate. Polyketide synthases utilize a wide assortment of starter units, such as branched-chain fatty acids and amino acids. In many cases, the nature of a starter unit provides important structural and biological features to the molecule. In this study, we identify that the starter units of biosynthesis of BPs are isovaleryl-CoA and butyryl-CoA, using HPLC and LC/ESI-MS analyses of pigments that were obtained from feeding experiments with L-leucine, sodium butyrate (in excess), and deuterium-labeled L-leucine.

[目的] プレファリズマ (*Blepharisma japonicum*) は赤色素プレファリズミン (blepharimins : BPs) を細胞表面の顆粒中に有しており、その化学構造は Figure 1 に示した通りで、BP-A ~ E の 5 種類の同属体が存在する^{1,2)}。BPs は、様々な繊毛虫に対して毒性や光毒性を示し、捕食性繊毛虫に対して防御機能を持つ。また、光受容体としても機能する。本研究では、これらの機能解明を目的として BPs の生合成研究を行った。

我々は、BP-C のジベンゾペリレンキノン部位が、酢酸を前駆体として、ポリケチド経路で生合成されることを明らかにした³⁾。また、その酢酸ユニットの取り込み様式より、生合成開始ユニットは isovaleryl-CoA であると推定された^{3,4)}。同様に、BP-A, B 及び D のエチル基は開始ユニット butyryl-CoA に由来すると推定できることから、推定生合成開始ユニット isovaleryl-CoA と butyryl-CoA の前駆体である L-ロイシンと酪酸ナトリウムの摂食実験を行い、BPs の生合成開始ユニットを探索した。

[方法] プレファリズマの I 型細胞 (R 1072 株) の培養液中に生合成開始ユニットの推定前駆体である L-ロイシンと酪酸ナトリウムをそれぞれ過剰に投与し、細胞から抽出した粗精製 BP-A ~ E の比を、HPLC で分析した。カラムは東ソーの TSKgel 120T (4.6×150

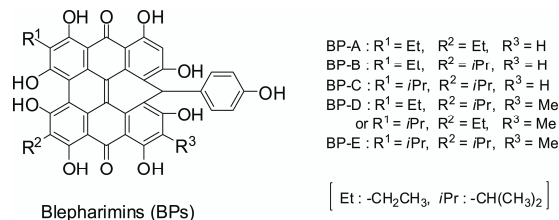


Figure 1. Structures of blepharismins A-E.

mm)を用い、60 % CH₃CN aq. (0.05 % TFA) を流速 1 mL/min で送液し、検出を可視光 580 nm で行った。

また、重水素標識体の[D10] L-ロイシンを用いた摂食実験から得た BPs を、LC/ESI-MS を用いて分析した。LCのカラムは野村化学の Deverosil ODS-UG 5 (2.0×150 mm)を用いた。移動相はグラジエントモードで CH₃CN/10 mM CH₃COONH₄ を用い、流速 0.2 mL/min で送液した。LCでの検出を可視光 580 nm でを行い、ESI-MS を負イオンモードで観測した。

[結果と考察] 通常の培養条件で得られた BPs の同属体の比は、A:B:C:D:E = 2:21:68:3:20 であった。L-ロイシンを過剰 (12.8 mM) に投与して培養した細胞から得られた BPs の比は、A:B:C:D:E = 2:54:364:7:91 となり、BP-C, E の比が、通常培養から得られた BPs の

比と比べると、約5倍に増加した。BP-B, Dも約2.5倍増加した。この結果から、イソプロピル基の数に応じて増加比が比例することが明らかとなり、一つの開始ユニットは isovaleryl-CoA であることが示唆された。また、酪酸ナトリウムを 12.8 mM 投与した場合、BPs の比は、A:B:C:D:E=30:38:68:10:19 であった。通常培養時の BPs と比べると、BP-A の比は10倍以上に増加し、BP-B, Dの比の増加も見られた。L-ロイシンと同様に、エチル基の数に応じて増加することが明らかになり、もう一つの開始ユニットは butyryl-CoA であることが示唆された。

重水素標識された[D10] L-ロイシンを用いた摂食実験で得られた BPs について、1分子の[D10] L-ロイシンが取り込まれた場合は 7 Da、2分子の[D10] L-ロイシンが取り込まれた場合は 14 Da の分子イオンの増加が観測されると期待できる。LC/ESI-MS 分析の結果、BP-B, D は 7 Da、BP-C, E は 7 Da と 14 Da の分子イオンの増加が観測され、それぞれの BP の有するイソプロピル基の数と一致し、isovaleryl-CoA の前駆体である L-ロイシンの取り込みが確認できた。

以上の摂食実験の結果から、BPs の生合成開始ユニットは isovaleryl-CoA、あるいは butyryl-CoA であり、その前駆体として L-ロイシンと酪酸ナトリウムが用いられていることも明らかになった。

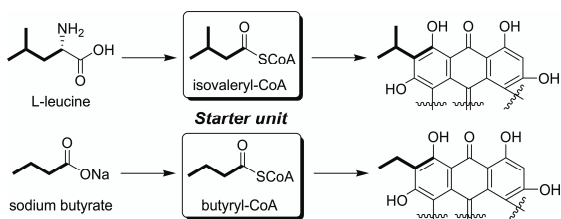


Figure 2. The starter units of blepharismins biosynthesis

【文献】

- 1) Checcucci, G.; Shoemaker, R. S.; Bini, E.; Cerny, R.; Tao, N.; Hyon, J. S.; Gioffre, D.; Ghetti, F.; Lenci, F.; Song, P. S. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5762-5763.
- 2) Maeda, M.; Naoki, H.; Matsuoka, T.; Kato, Y.; Koutsuki, H.; Utsumi, K.; Tanaka, T. (1997) *Tetrahedron Lett.*, 38, 7411-7414.
- 3) Uruma, Y.; Sakamoto, K.; Takumi, K.; Doe, M.; Usuki, Y.; Iio, H. (2007) *Tetrahedron* 63, 5548-5553.
- 4) Mahmud, T.; Bode, H.; B. Silakowski, B.; Kroppenstedt, R. M.; Xu, M.; Nordhoff, S.; Hoefle, G. Muller, R. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 32768-32774.