

論文の内容の要旨

論文題目 テルペン合成酵素に関する研究

氏名 三橋 隆章

【研究の背景・目的】

天然由来の化合物の中には、医薬品をはじめ、機能性食品、香料、工業原料として有用とされるものが数多く存在する。こうした天然由来化合物の中において、テルペノイドは、最も構造多様性に富む化合物群の一つとして知られている。

テルペノイドは生体内において、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) 及びイソペンテニルニリン酸 (IPP) から合成される。具体的には、先ず DMAPP 及び IPP が縮合し、鎖状のポリプレニルニリン酸が合成される。次に、ポリプレニルニリン酸が環化を受けることによってテルペノイドの基本的な炭素骨格が形成される。環化反応を担う酵素に応じて、様々な炭素骨格が形成されることで、テルペノイドの構造多様性が生み出される。また炭素骨格の形成後、場合により修飾酵素による変換を受け、多様性は更に拡大される。

遺伝子解析技術の発展を背景に、テルペノイドの生合成に関わる酵素をコードすると推定される遺伝子を遺伝情報中から探索することは、近年、容易になりつつある。また、実際に公開されている遺伝子データベース上にも、そのような遺伝子を数多く見出すことができる。しかし現状では、こうした遺伝子の多くは未解析のまま残されている。その一因として、酵素産物の構造決定の難しさが挙げられる。特に、テルペノイドに関しては、多数の不斉中心と環構造を持つ例が数多く知られており、構造決定は特に困難である。

しかし、複雑かつ多様な構造を創出する酵素こそ、機能解析する価値があると考え、本研究では特にテルペノイドの炭素骨格形成に関わる酵素に着目し、その機能解析を行った。

【結果・考察】

1. Cyclopiane 型ジテルペノイドの炭素骨格形成を担う酵素の同定¹

糸状菌 *Penicillium chrysogenum* MT-12 のゲノム情報を解析した際、テルペノイドの炭素骨格形成に関わると推定される遺伝子を見出した。本遺伝子に類似の遺伝子を検索したところ、他の *Penicillium* 属糸状菌のゲノム情報中にも類似性の高い遺伝子が見出された。このことから、本遺伝子がコードする酵素の機能に興味を持ち、機能解析を行った。

解析にあたっては、解析対象となる遺伝子を糸状菌 *Aspergillus oryzae* に導入する手法を用いた。導入した遺伝子が強制発現する条件にて、*A. oryzae* 形質転換体を培養後、菌体抽出物から酵素産物を精製した。

しかし、酵素産物の精製後に NMR 測定を行ったところ、シグナルのブロードニングが観測され、NMR 解析による構造決定が困難であると判明した。本化合物は油状物質であり、解析対象の結晶化を必要とする単結晶 X 線構造解析も困難であると考えられた為、結晶スポンジ法による解析を試みた。結晶スポンジ法とは、細孔性の金属錯体結晶の内部に解析対象化合物を導入することで、対象化合物を規則正しく整列させ、対象を結晶化することなく X 線結晶構造解析を行う手法である。結果、酵素産物の構造を観測することができ、構造決定に至った。

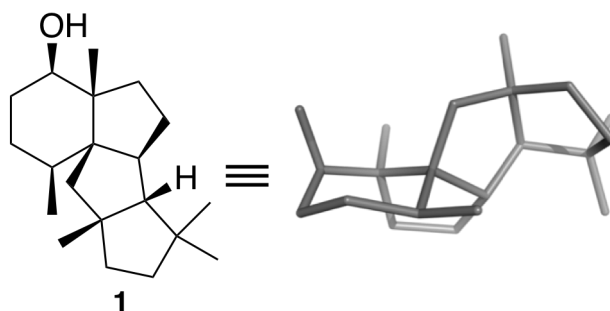


図1 化合物1の構造（左）と結晶スポンジ法によって観測された3次元構造（右）

酵素産物は 6-5-5-5 員環構造を持つ化合物1であった（図1）。1の炭素骨格は cyclopiane 型ジテルペノイドとして知られる一連の化合物に見られる炭素骨格と同一のものであった。従って、本酵素を PcCS (*Penicillium chrysogenum* Cyclopiane-type diterpene Synthase) と名付けた。また、ジテルペノイドとは、特に炭素数 20 のポリプレニルニリン酸であるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を経て生合成されるテルペノイドを指す。PcCS が GGPP から1を形成する際の反応機構を図2のように推定した。

1が酸化などの更なる修飾を受けた cyclopiane 型ジテルペノイドは 10 種類以上が既に知られているが、それらの前駆体と推定される1が天然から単離報告された例は、これまで無かった。

また、計算化学の手法を用い、1の配座を解析したところ、特に6員環部分においてコンフォメーションが変化しやすいことが示唆された。従って、1の NMR シグナルのブロードニングは、溶液中におけるコンフォメーション変化に起因すると推察される。

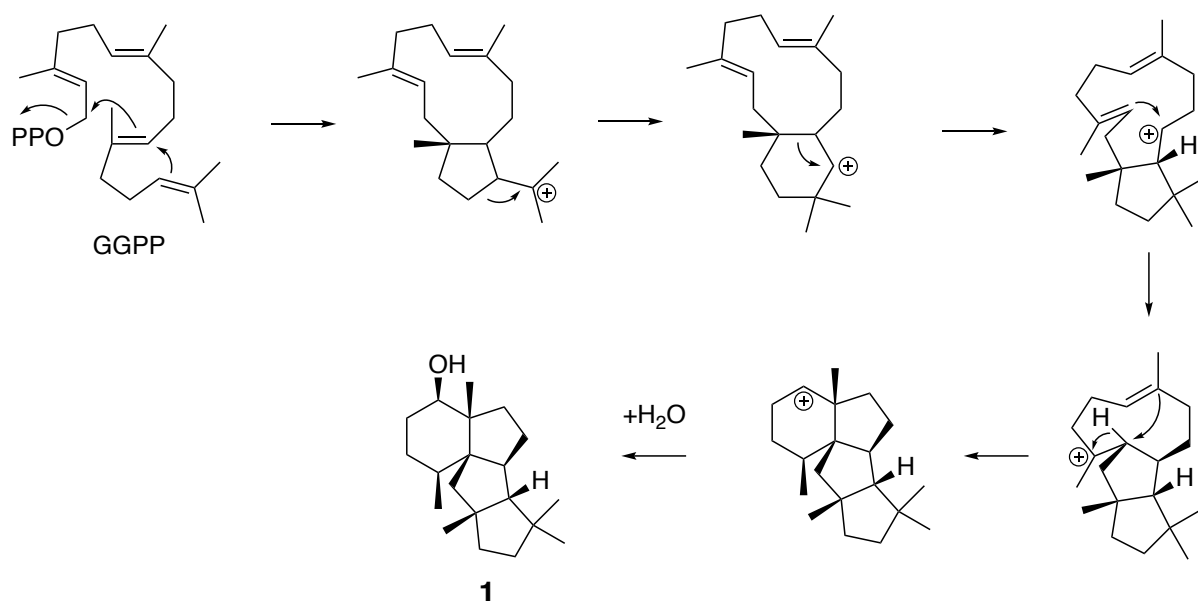


図2 化合物1が形成される際の推定反応機構

2. 新規炭素骨格を有するセスタテルペン astellifadiene (2)を合成する酵素の発見と解析²

セスタテルペノイドとは、炭素数 25 のポリプレニルニリン酸であるゲラニルファルネシルニリン酸 (GFPP) から生合成されるテルペノイドを指す。本化合物群は天然において、比較的稀なテルペノイドとして知られており、生合成についての知見も限られていた。

糸状菌 *Emericella varicolor* NBRC 32302 のゲノム情報中を検索したところ、テルペン合成酵素をコードすると推定される遺伝子を見出した為、PcCS の解析と同様に、糸状菌 *A. oryzae* に導入し、強制発現させる手法を用い、機能解析を行った。酵素産物を精製後、質量分析、NMR、結晶スポンジ法を用いて構造解析したところ、6-8-6-5 員環構造を持つ新規セスタテルペンであると判明した。そこで、酵素産物を astellifadiene (2) と名付け (図3)、2 を合成する酵素を EvAS (*Emericella varicolor* Astellifadiene Synthase) とした。更に、2 と同様の炭素骨格を持つ化合物はこれまでに報告例が無く、EvAS は新規炭素骨格を形成する酵素であった。安定同位体を用いた標識実験の結果より、GFPP から 2 が生成する機構について推定した (図3)。

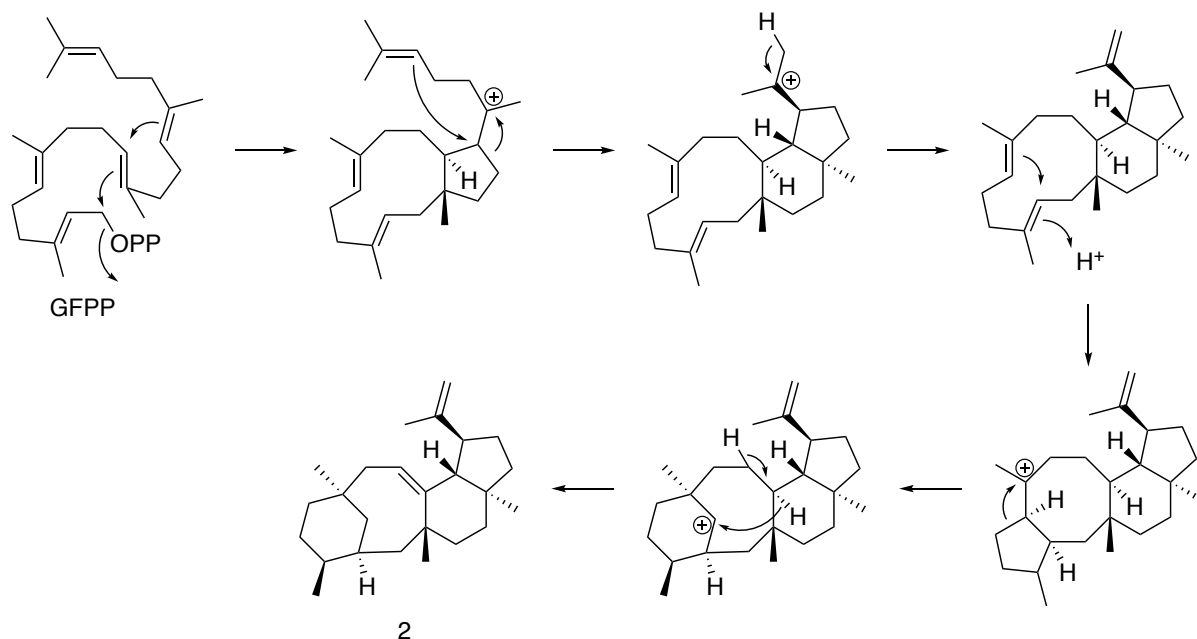


図3 化合物2の構造と2が形成される際の推定反応機構

【総括】

本研究を通じて、新規のテルペン合成酵素の機能を明らかにすることができた。また、**1** および **2** は両者ともに、天然からの単離報告が無い化合物であり、未解析酵素の機能解析を通して、新規化合物の取得も同時に目指すことができると示した。今後、更に多くのテルペン合成酵素の解析が進むことで、これら酵素が触媒する複雑な環化反応を制御するためのメカニズムが、詳細に明らかになることが期待される。

【参考文献】

1. **Mitsuhashi, T.**, Kikuchi, T., Hoshino, S., Ozeki, M., Awakawa, T., Shi, S.-P., Fujita, M., Abe, I., *Org. Lett.* 20, 5606-5609 (2018)
2. Matsuda, Y.,# **Mitsuhashi, T.**,# Lee, S.,# Hoshino, M., Mori, T., Okada, M., Zhang, H., Hayashi, F., Fujita, M., Abe, I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 5785-5788 (2016) (#co-first author)