

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 29 年度 博士課程進学
氏名 村井 恵一
指導教員名 葛山 智久

論文題目

新奇テルペン合成酵素の触媒する複雑環骨格形成機構に関する研究

□ 背景・目的

テルペンとは、天然に約 8 万種の多様な構造の報告例がある天然物最大のグループである。テルペン類は、テルペン合成酵素によって複雑な多環骨格と絶対立体化学が厳密に制御されて生合成される。この骨格多様性と立体制御機構のため、テルペン類は多様な生物活性を示す。例えば、リモネンの香気活性、アルテミシニンの抗寄生虫活性、タキソールの抗ガン活性など、環状構造の違いにより多様な生物活性が生み出されるため、その産業利用や創薬における潜在機能は計り知れない。しかし、細菌由来のテルペン合成酵素は酵素間の配列相同性が著しく低いこと、またそのほとんどが休眠遺伝子であるという問題点から、その解析例は少なく、現在までに約 60 種類が報告されているに過ぎない。そのため、細菌由来テルペン合成酵素遺伝子は巨大な未発掘遺伝子資源であると考えられる。本研究では、**いまだ報告例の少ない細菌由来テルペン合成酵素の大規模な発掘と、それらの詳細な環化機構の解析を目的とした。**

□ 産総研 原核生物ゲノムデータベースからのテルペン合成酵素の探索と機能解析

インハウス細菌ゲノムデータベースの全 140 株、1,242,605 個の ORF に対して、隠れマルコフ統計モデルで作成された酵素活性ドメインモデルによる検索を行なった。これによりテルペン合成酵素候補群として 341 個の ORF を得た。さらにこの中から新奇性の高い酵素を抽出するため、BLAST を利用し既知の酵素群とごく低い相同性を示す 53 個の ORF を抽出した。この 53 個の ORF の大腸菌組換え酵素を精製し、炭素数 10、15、20 の 3 種のポリプレニル 2 リン酸基質を用いて *in vitro* テルペン合成活性試験を行なった。

その結果、**33 種の新奇酵素から 34 種の主反応産物を得た。これは現在までに機能解析された細菌由来テルペン合成酵素全数の約 50%にあたる。**このうち 18 種の反応産物については、ガスクロマトグラフィーのマスマスペクトルパターンライブラリーと各反応産物のマスマスペクトルとの比較により同定することができた。そのうちの Nerol、 β -Barbatene、 γ -Maaliene、Dihydro- β -agarofuran、(+)-Bicyclogermacrene、Viridiflorol の 6

種については、細菌由来テルペン合成酵素によって初めて生産された反応産物であり、細菌由来の新奇テルペン合成酵素の発見となった。

また NMR 解析により、得られたテルペン化合物の構造を、**Pristinol**、**1-Deoxy-trefolane A** [新奇化合物]、**Versipropellanol** [新奇骨格化合物]、**6-Methyl-harbanol** [新奇天然物]、**Fusagraminene** [新奇化合物]、**(+)-Neointermedeol**、**Selina-4(14),7-diene**、**Spata-11(18),14-diene** と決定した (図 1)。さらに、X 線単結晶解析と結晶スポンジ法の利用により 5 種類のテルペン化合物の絶対立体配置を決定した。それにより、Pristinol の絶対立体配置は $2S,3R,9R$ 、1-Deoxy-trefolane A は $2S,3R,6R,7S,9S$ 、Versipropellanol は $3S,6R,7S,10S$ 、6-Methyl-harbanol は $1R,6S,7R,8S$ であることが判明した。また、NMR との併用により 1-Deoxy-trefolane A 合成酵素の微量副産物を $(2S,3R,6S,7R,10S)$ -Koraïol と決定した。これらの構造情報をもとに、各テルペン化合物の生合成機構を推定した。

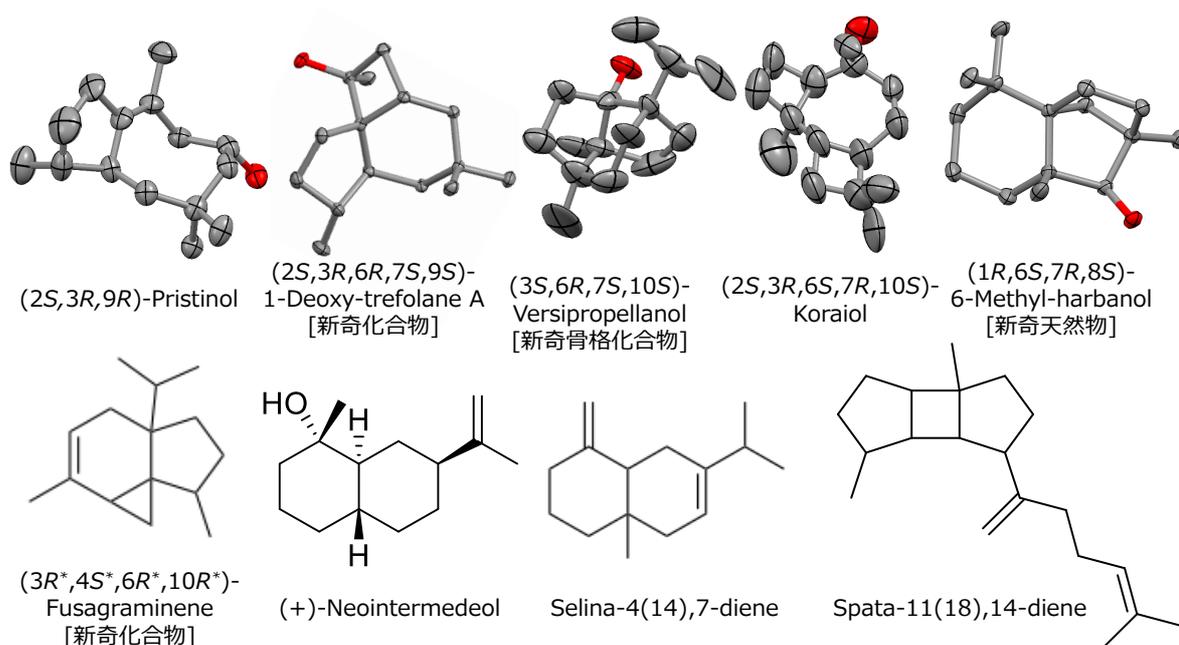


図 1 NMR および X 線単結晶・結晶スポンジ法によって構造決定したテルペン化合物

□ 安定同位体標識基質を用いた真菌由来 Trichobrasilenol の環化機構の解析

糸状菌 *Trichoderma atroviride* FKI-3849 のテルペン合成酵素 TaTC6 は、Trichobrasilenol を合成することが本研究室で明らかとされていた。Trichobrasilenol 骨格については、紅藻や担子菌から、その部分構造を持つテルペン化合物の単離報告がされていたが、その環化機構については研究が行われていなかった。またテルペン化合物に特有のイソプレン単位が保存されていないことから、1 酵素によって触媒される環化反応の過程で複数の特異な炭素 – 炭素結合の組み換えが起こることが推定された。そこでまず、同位体標識基質を用いた NMR 法により再度 Trichobrasilenol の立体構造を確認したところ、**これまでに報告されていた部分構造の骨格とは異なる立体配置をもつことが判明した。**

また基質となる FPP の全ての炭素を 1 箇所ごとに ^{13}C ラベルした FPP を合成し、TaTC6 と反応させることで、基質から反応産物への変換に伴う炭素の移動を追跡した。その結果、**6,7,8,9 位間における 2 回の炭素間結合の切断と 2 回の炭素間結合の形成を観測した。** 副生成物として African-1-ene が同定されたことから、Africanyl cation を経由し、4 回の水素の転位によって生合成される機構を推定した (図 2)。この推定環化機構を検証するため、 ^2H と ^{13}C で同時に標識した FPP を反応に用いることで、重水素転位により新たに形成される ^2H – ^{13}C 結合に由来した ^{13}C NMR スペクトルの化学シフトとカップリングを観測した。その結果、**推定した環化機構と同様にそれぞれ 9 位から 10 位、2 位から 3 位、6 位から 2 位、9 位から 6 位への重水素の ^{13}C 標識位置への転位を観測した。** これは Trichobrasilenol の環化機構を強く支持するものであり、骨格形成に伴う特異な炭素骨格組換え機構が明らかとなった。

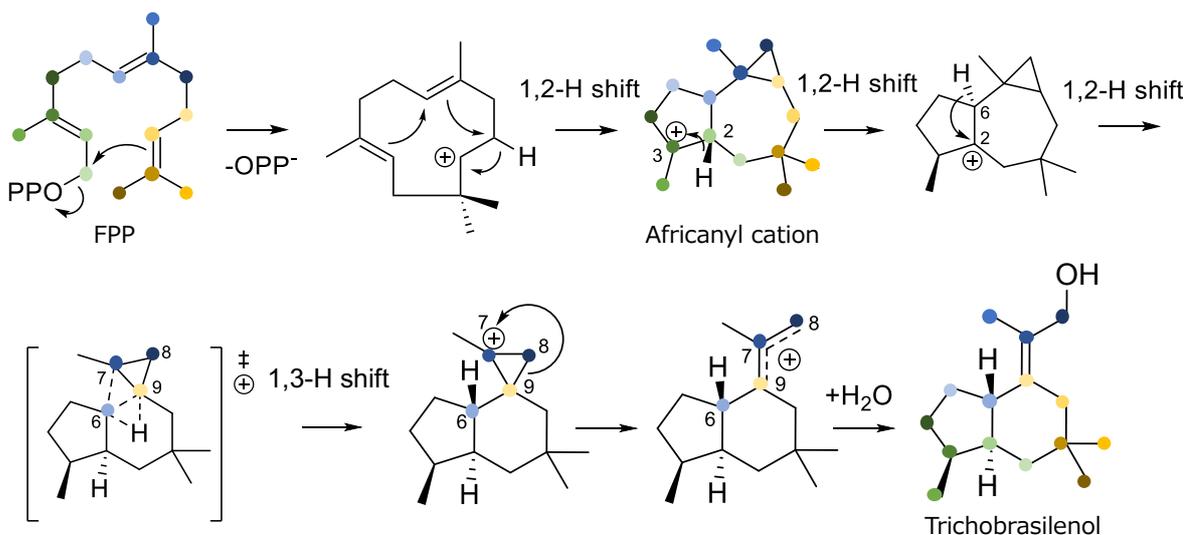


図 2 特異な炭素骨格組換えを伴う Trichobrasilenol の生成機構

□ 擬天然型合成アナログ基質を用いたテルペン環化反応

Cyclooctat-9-en-7-ol 合成酵素である CotB2 をモデルケースとして複数の合成アナログ基質での *in vitro* 反応を行ったところ、***E,Z* 異性体、フッ素化体、炭素鎖のアミド結合置換体など複数の合成アナログ基質で CotB2 による環化反応産物が観察された。**特に GGPP の 6 位をアミド結合で置換した合成アナログ基質の反応産物について NMR 構造決定を行い、その構造を **1-10、9-13 位で閉環が行われた擬天然環状テルペンアルカロイドであると決定した。**

□ 総括と展望

本研究では、データベースから隠れマルコフ統計モデルを用いて BLAST 検索ではヒットしないような相同性の低いテルペン合成酵素の発掘を試み、新奇なテルペン合成酵素を 33 種発見し、NMR と結晶スポンジ法により速やかに絶対立体配置を含めて構造決定した。さらには同位体標識基質を用いることで、炭素-炭素間の組み換えや水素移動を含む複雑な環化機構を明らかにした。

今後はゲノムデータベースを拡張してテルペン合成酵素を発掘し、その詳細な環化機構解析を行うことで、これまでに見いだされてこなかった化学反応機構の発見が期待できる。また、本研究で構築したテルペン合成酵素の探索系を発展させることで、今回ターゲットとしなかった異なるクラスのテルペン合成酵素や DNA ライブラリーの迅速な探索・解析が可能になる。さらには、合成アナログ基質とテルペン合成酵素ライブラリーを組み合わせることで、構成原子を炭素と水素のみに限らない多数の擬天然テルペン化合物を創製する方向への研究展開も可能である。

本研究はテルペン合成解析における探索から反応機構解析までの問題の全てを解決し、またテルペン合成酵素の理解を大幅に進め、より多様で複雑なテルペン骨格の創製を実現するための重要な基盤になりうる。

発表論文

Keiichi Murai, Lukas Lauterbach, Kazuya Teramoto, Zhiyang Quan, Lena Barra, Tsuyoshi Yamamoto, Kenichi Nonaka, Kazuro Shiomi, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama, Jeroen S. Dickschat, An Unusual Skeletal Rearrangement in the Biosynthesis of the Sesquiterpene Trichobrasilenol from *Trichoderma*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**: 15046 (2019).