

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成27年度博士課程進学
氏名 寺本 和矢
指導教員名 西山 真

論文題目

放線菌と真菌由来のテルペン合成酵素の探索と環化機構に関する研究

序論

テルペノイドは最大の天然有機化合物群であり、多様な構造と生理活性を有することから医薬品だけでなく添加物や工業原料として様々な場面で利用されている。その生合成は、基質であるイソプレニル二リン酸の合成、テルペン環化酵素による環状骨格の形成、水酸化酵素や糖転移酵素等による修飾の各段階からなる。なかでもテルペン環化酵素が担う骨格形成反応は、単独の酵素による分子内カチオン転位反応によって複雑な多環式化合物を立体選択的に一挙に作り出すことから、テルペノイドにおける構造多様性を生み出す鍵反応であるとともに、その反応は厳密な制御下で進行すると推察される。

天然から多様な炭素骨格を持つテルペノイドが単離されている一方で、その骨格形成反応を担うテルペン合成酵素が同定されていないものも多く存在する。また、生合成酵素が同定されている場合においても、どのような環化機構で炭素骨格が構築されるのか解明されていないことが多い。多様な骨格を生み出すテルペン合成酵素を同定しそれらの環化機構を解明することは、テルペン合成酵素による反応制御機構の理解や反応生成物の理論的改変を目指す上で重要である。本研究では、6-5-6-6員環骨格を持つジテルペン化合物 wickerol A を生産することのみが知られている糸状菌 *Trichoderma atroviride* FKI-3849 から統計モデルを用いて新奇テルペン合成酵素の探索を行った。また、放線菌 *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 が生産する 5-8-5員環骨格を持つジテルペン化合物 cyclooctatin の環形成反応を担うジテルペン環化酵素 CotB2 について、その詳細な環化機構を明らかにするとともに、複雑な環化反応を触媒する構造基盤の解明を目指した。

1. *Trichoderma atroviride* FKI-3849 が有するテルペン合成酵素の探索と機能解析

T. atroviride FKI-3849 株はハワイ土壌から単離された糸状菌であり、抗インフルエンザウイルス活性を持つジテルペン化合物 wickerol A を生産することが報告されている。一般に *Trichoderma* 属糸状菌は二次代謝産物を介して他の真菌に対する他感作用を持つことが知られており、例えば *T. arundinaceum* は抗真菌活性を持つセスキテルペノイド trichothecene 類を生産する。そこで、*T. atroviride* FKI-3849 も wickerol A 以外にもテルペン生産能およびその生合成酵素を有していると考え、テルペン合成酵素の探索と機能解析を行った。

1-1. 統計モデルを用いたテルペン合成酵素の *in silico* ゲノムマイニング

T. atroviride FKI-3849 ゲノム DNA を調製し、MiSeq および PacBio によるドラフトゲノムシーケンス解析を行った。取得した 37.1 Mb の配列に対し、遺伝子予測プログラム AUGUSTUS を用いて ORF 予測を行った。テルペン合成酵素はアミノ酸配列相同性が 20%程度と低いことが知られているためこれまでに機能解析されたテルペン合成酵素のアミノ酸配列から統計モデル (隠れマルコフモデル; HMM)を作成してテルペン合成酵素の探索を行い、7 個のテルペン環化酵素と推定される配列 (TaTC1~7)を見出した。

1-2. *Aspergillus oryzae* 異種発現系を用いた *in vivo* 機能解析

糸状菌異種発現宿主 *A. oryzae* M-2-3 および発現プラスミド pUARA2 を用い、*T. atroviride* FKI-3849 ドラフトゲノム配列から見出した7つの推定テルペン合成酵素遺伝子の機能解析をおこなった。各遺伝子を導入した形質転換体を発現誘導条件で培養し、培養液抽出物の GC-MS 解析を行った。ネガティブコントロールとの比較から、*taTC1* はジテルペン合成酵素、*taTC3* はモノテルペン合成酵素、*taTC5* および *taTC6* はセスキテルペン合成酵素、*taTC7* は linalool/nerolidol 合成酵素をコードしていることが強く示唆された。

1-3. 組換え酵素を用いた *in vitro* 機能解析

大腸菌を用いた組換え酵素を調製するため *T. atroviride* FKI-3849 の全 RNA からテルペン合成酵素遺伝子の cDNA クローニングを試み *taTC1*, *taTC2*, *taTC3*, *taTC5* の cDNA を取得した。発現が確認できなかった *taTC4*, *taTC6*, *taTC7* は gDNA を導入した *A. oryzae* M-2-3 形質転換体の全 RNA から cDNA を取得した。各種発現条件検討を行い TaTC1, TaTC3, TaTC5, TaTC6, TaTC7 を N 末端 His-tag 付加タンパク質として精製することができた。各組換え酵素と geranyl pyrophosphate (GPP), farnesyl pyrophosphate (FPP), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)を *in vitro* で反応させ、反応産物を GC-MS で分析した。データベースとのマススペクトルの比較および NMR 測定による構造解析結果から、TaTC1 は cembrene A を生産するジテルペン合成酵素、TaTC3 は(-)-*cis*-piperitol を生産するモノテルペン合成酵素、TaTC5 は eremophilene を生産するセスキテルペン合成酵素、TaTC6 は 5(10)-brasilane-11-ol を生産するセスキテルペン合成酵素、TaTC7 は linalool/nerolidol を合成するモノテルペン/セスキテルペン合成酵素であることを明らかにした。*cis*-piperitol 合成酵素は過去に報告例がなく、また、TaTC3 は *Trichoderma* 属では初めてのモノテルペン合成酵素である。TaTC6 の生産する 5(10)-brasilane-11-ol は *Coltricia* 属担子菌由来 brasilane A のアグリコンとして報告されているが単体での報告はなく、また blasilane 型セスキテルペンの生合成酵素は初めての報告である。これらの化合物は *T. atroviride* FKI-3849 培養液中から検出されなかったことから、統計モデルを用いたゲノムマイニングとそれに続く組換え酵素を用いた機能解析は新奇テルペノイドおよび新奇テルペン合成酵素探索の有用な手段となると考える。

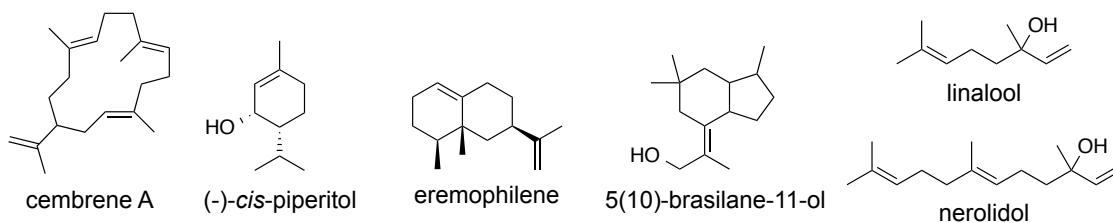


図 1 *T. atroviride* FKI-3849 由来テルペン合成酵素が生産するテルペノイド

2. ジテルペン合成酵素 CotB2 の環化反応機構の解明

CotB2 は直鎖状基質 GGPP から 5-8-5 員環骨格を持つジテルペンアルコール cyclooctat-9-en-7-ol を合成する。 $[U-^{13}C_6]$ glucose を用いた *in vivo* 取り込み実験, および重水素標識基質を用いた *in vitro* 標識実験から, CotB2 の環化反応では三環式骨格が完成したのちに 6 位から 3 位への 1,3-H shift が起こると提唱していた¹。この経路は反応中に生じる中間体構造の数が最小となる反応機構として考えたが, 1,3-H shift よりも 1,2-H shift の方が起こりやすいと考えるならば, 2 位から 3 位と 6 位から 2 位への二度の連続した 1,2-H shift が起きる経路も考えられた。そこで, 新たに重水素標識基質を合成し, CotB2 の環化反応における水素移動の完全な解明を目指した²。また, 本研究室で解明された CotB2 と基質アナログ geranylgeranyl thiopyrophosphate (GGSP) との共結晶構造の詳細な解析から得られた知見に基づき, 活性中心ポケットを形成するアミノ酸残基やその周辺に位置する残基に変異を導入した変異体酵素の機能解析を行うことで, CotB2 の環化反応カスケードにおける各アミノ酸残基の機能の解明を目指した³。

2-1. 重水素標識基質を用いた環化カスケードの解明

大阪市立大学品田教授らとの共同研究により $(2-^2H)$ GGPP, $(6-^2H)$ GGPP を合成し, 組換え CotB2 を用いた *in vitro* 反応と反応産物の精製をおこなった。 1H NMR および 2H NMR による解析により, CotB2 による反応前後で 2 位→3 位と 6 位→2 位への重水素原子の転位が確認された。この結果により CotB2 による GGPP から cyclooctat-9-en-7-ol への環化の過程で, 三環式骨格が形成したのちに 1,3-H shift ではなく 2 回の連続した 1,2-H shift が起きることを証明することができた²。

2-2. CotB2 変異酵素を用いた環化反応機構の解析

CotB2 と GGSP 共結晶構造から明らかにされた活性中心ポケットを形成する残基に変異を導入した, N103A, T106V, F107L, F149L, I181A, I181G, G182A, F185A, F185L, W186F, W186H, W186L の 12 種類の変異酵素を作製した。各変異酵素の *in vitro* 反応産物を GC-MS で分析し, cyclooctat-9-en-7-ol とは異なる反応産物を与えた場合にはその化合物の構造決定を行った。CotB2 N103A, W186L, W186H, F149L を用いた大スケール反応と分取 HPLC による精製, 各種一次元および二次元 NMR 解析により, 3,7,12-dolabellatriene, cembrene A, 3,7,18-dolabellatriene, cyclooctat-7-en-3-ol を, W186F 変異体を用いた同実験により新奇化合物である 3,7-dolabelladiene-9-ol と cyclooctat-6-en-8-ol を同定した。これらの反応産物の構造から反応が終結

する直前に存在したカチオン中間体を推定し、どの位置に存在するカルボカチオンが不安定であったのかを推測した。カルボカチオンの位置と共結晶構造における各アミノ酸残基の配置を詳細に解析することで、各アミノ酸残基が反応中間体のどの位置のカルボカチオンの安定化に寄与するのかを明らかにした³。

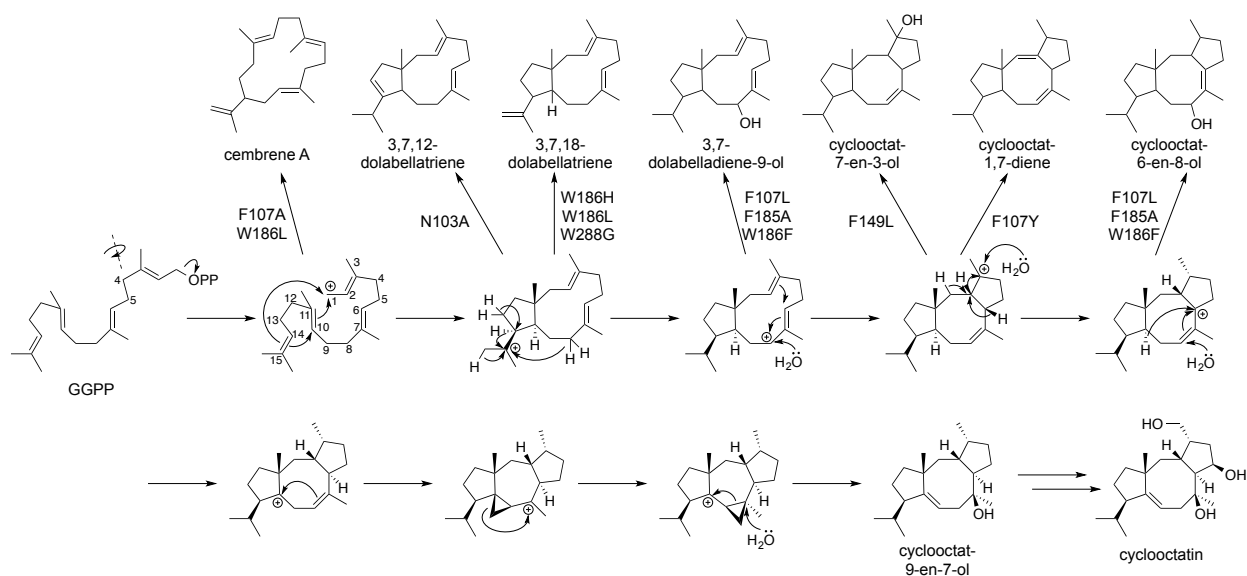


図 2 CotB2 および変異酵素の反応産物とその環化機構

総括

本研究では改良した統計モデルを用いることで推定テルペン合成酵素を見出し、精製酵素を用いた解析により2個の新奇テルペン合成酵素、*cis*-piperitol 合成酵素および5(10)-brasilane-11-ol 合成酵素を含む5つのテルペン合成酵素を同定した。また、テルペン合成酵素の環化機構を解明する上で、本研究で行った安定同位体標識基質を用いたトレーサー実験は強力なツールとなることを示した。また、変異酵素実験結果を酵素の構造情報と組み合わせることで、どのようにカチオン中間体の安定化に寄与するかの洞察を得た。複雑な環状骨格を形成するテルペン環化酵素を新たに発見し、それらの環化反応機構を詳細に解析していくことで、新奇な生体触媒の設計や化合物の創出などに貢献することができると考えている。

発表論文

- (1) Meguro A., Motoyoshi Y., Teramoto K., Ueda S., Totsuka Y., Ando Y., Tomita T., Kim S., Y., Kimura T., Igarashi M., Sawa R., Shinada T., Nishiyama M., Kuzuyama T., *Angew., Chemie Int., Ed.*, **2015**, 54 (14), 4353–4356.
- (2) Sato H., Teramoto K., Masumoto Y., Tezuka N., Sakai K., Ueda S., Totsuka Y., Shinada T., Nishiyama M., Wang C., Kuzuyama T., Uchiyama M., *Sci., Rep.*, **2015**, 5, 18471.
- (3) Tomita T., Kim S., Y., Teramoto K., Meguro A., Ozaki T., Yoshida A., Motoyoshi Y., Mori N., Ishigami K., Watanabe H., Nishiyama M., Kuzuyama T., *ACS Chem., Biol.*, **2017**, 12 (6), 1621–1628.