

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 23 年度博士課程 進学
氏名 金 孝暁
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌由来新規テルペノイド合成酵素の機能解析

テルペノイドは炭素数 5 のイソプレンユニットを基本骨格に持つ化合物群である。テルペノイド合成酵素 (terpene synthase、TS) は、直鎖の二リン酸テルペノイドである geranyl diphosphate (GPP, C10) や farnesyl diphosphate (FPP, C15) を基質にして様々な化学反応を触媒する。TS の多様な反応様式がテルペノイドの多様性を豊かにしていることから TS の機能解析が盛んに行われてきた。植物や菌類などの真核生物が多種のテルペノイドを生産していることは古くから知られていたが、原核生物におけるテルペノイド、特に TS が合成する monoterpene、sesquiterpene などの揮発性テルペノイドについては研究が進んでいなかった。しかしながら近年のゲノム解析により、原核生物、特に放線菌において機能未知な TS 遺伝子が多数存在することが明らかとなり、原核生物が多様なテルペノイドを生産していることが示唆された。そこで、本研究では新規化合物や新規生合成酵素の取得を目的に、放線菌由来の機能未知 TS の機能解析を行った。

1. *Streptomyces clavuligerus* 由来 TS (SCTS) の機能解析

① TS 遺伝子のゲノムスキニング

機能解析を行う候補遺伝子として、ゲノム配列が公開されている *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 の TS 遺伝子に着目した。*S. clavuligerus* のゲノムスキニングを行った結果、12 個もの TS 遺伝子が見出された。これら TS 遺伝子は既知の TS とのアミノ酸相同性が 30%程

度しかなかったことから、新規な反応を触媒する TS であることが期待された。これら TS 遺伝子を SCTS1 (*Streptomyces clavuligerus* terpene synthase)、SCTS2、・ ・、SCTS12 と名付けた。SCTS 遺伝子群のうち、活性残基が保存されていた SCTS1、SCTS2、SCTS3、SCTS6、SCTS7、SCTS10 を研究対象として実際に解析を行った。主な解析方法として、*Streptomyces lividans* における異種発現解析や組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析を行った。

②SCTS1 の機能解析

SCTS1 発現株の培養抽出物を GC-MS で解析した結果、1 つの化合物を生産していた。標品との比較により、この化合物は monoterpene である 1,8-cineole であることが明らかになった。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析においても SCTS1 は GPP を基質として 1,8-cineole を合成した ($K_m = 169.9$ nM、 $k_{cat} = 0.079$ s⁻¹)。以上の結果から、SCTS1 は 1,8-cineole 合成酵素であることが明らかになった (図 1a)。1,8-cineole 合成酵素は植物から取得されているが、原核生物からの取得は本研究が初めてである。また、原核生物において GPP を基質とする monoterpene 合成酵素は SCTS1 が初めての例である⁽¹⁾。

③SCTS2 の機能解析

SCTS2 発現株の培養抽出物を GC-MS にて解析した結果、3 つの化合物を生産していた。1 つは標品との比較の結果、monoterpene である linalool であった。他の 2 つはその MS スペクトルから linalool 類縁体であると予想された。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析の結果、SCTS2 は GPP から linalool を ($K_m = 12.9$ μM、 $k_{cat} = 0.084$ s⁻¹)、FPP から sesquiterpene である nerolidol を ($K_m = 9.6$ μM、 $k_{cat} = 0.311$ s⁻¹) 合成する酵素であることが示された (図 1b)。linalool および nerolidol を共に合成できる酵素は植物から取得されているが、原核生物からの取得は本研究が初めてである⁽²⁾。

④SCTS7 の機能解析

SCTS7 発現株の培養抽出物を GC-MS にて解析した結果、1 つの化合物を生産していた。NMR および旋光度解析の結果、この化合物は sesquiterpene である (-)-δ-cadinene であることが明らかになった。また、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析の結果、SCTS7 は FPP を基質として(-)-δ-cadinene を合成する酵素であることが示された (図 1c)。(–)-δ-cadinene は植物から単離されているが合成酵素は今までに取得されていなかったことから、SCTS7 は初めての(-)-δ-cadinene 合成酵素であったが、後に Cane らにより英語論文が発表された⁽³⁾。

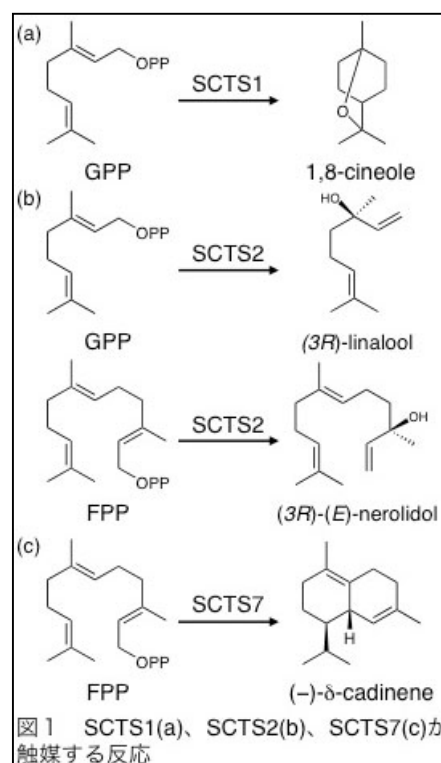


図1 SCTS1(a)、SCTS2(b)、SCTS7(c)が触媒する反応

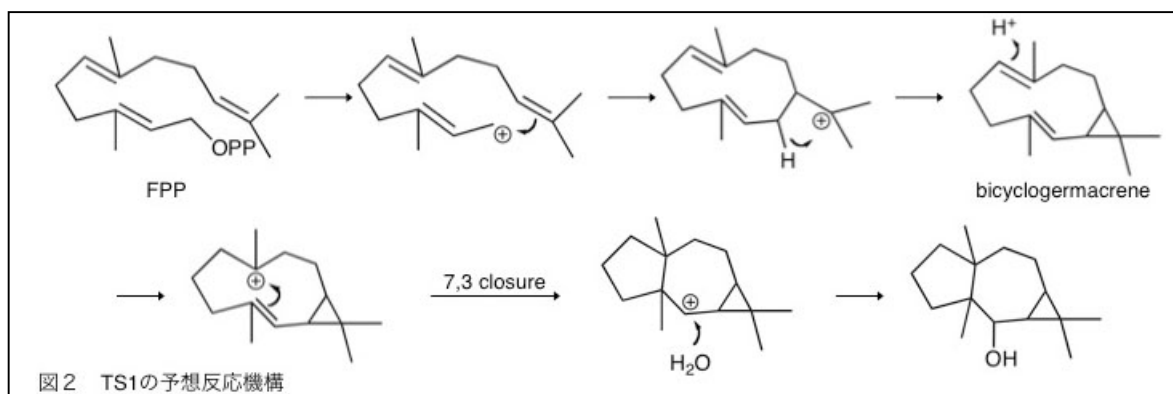
2. 産業技術総合研究所の *Streptomyces* 属由来 TS の機能解析

① TS 遺伝子のゲノムスキニング

産業技術総合研究所の新家一男研究主任により、環境中から新たに単離された放線菌のゲノム解析が行われている。これら放線菌のゲノム配列情報を利用し TS 遺伝子のゲノムスキニングを行った。5 株の *Streptomyces* 属についてゲノムスキニングを行った結果、いくつかの TS 遺伝子が見出された。そのうち、既知の TS 遺伝子と相同性が 30% 程度の 5 つの遺伝子に注目し、実際に機能解析を行った。これら TS 遺伝子をそれぞれ TS1、TS2、・・・、TS5 と名付けた。それぞれの TS 遺伝子について、*S. lividans* における異種発現実験、および組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析を行った。

② *Streptomyces* sp. RI-18 由来 TS1 の機能解析

TS1 発現株の培養抽出物を GC-MS にて解析した結果、1 つの化合物 (**1**) を生産していた。NMR 解析、X 線単結晶構造解析、旋光度解析の結果、**1** は今までに報告がない新規構造を持つ sesquiterpene であることが明らかになった。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析の結果、TS1 は FPP を基質として **1** を生産した (図 3)。組換えタンパク質を用いた速度論解析を行った結果、TS1 は $K_m = 1.087 \mu\text{M}$ 、 $k_{\text{cat}} = 0.0382 \text{ s}^{-1}$ であった。さらに、 D_2O を溶媒に用いて *in vitro* アッセイを行い、**1** の分子量の変化を観察した。その結果、合成反応の過程で水素カチオンが分子中に入ることが推測された。以上の結果と既知類似化合物の反応機構に基づいて、TS1 の反応機構を図 2 のように推測した (図 2)。以上より、TS1 は新規化合物 **1** を合成する新規な sesquiterpene 合成酵素であることが明らかになった。



③ *Streptomyces* sp. RI-77 由来 TS3 の機能解析

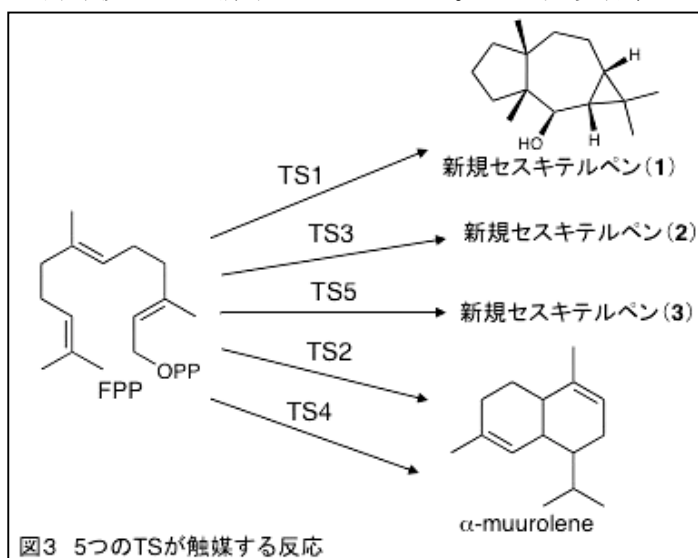
TS3 発現株の培養抽出物を GC-MS にて解析した結果、1 つの化合物 (**2**) を生産していた。**2** の MS スペクトルは既知のいずれの化合物の MS スペクトルとも一致しないことから新規な化合物であると予想された。分子量の値から **2** は水酸基を持つ sesquiterpene であると考えられた。TS3 発現株の抽出物から単離・調製し NMR 解析を試みたが、生産量が少ないこと、揮発性が高くて消失しやすいことから成功していない。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析の結果、TS3 は FPP を基質として **2** を生産することが明らかになった (図 3)。

④ *Streptomyces* sp. JE-08 由来 TS5 の機能解析

TS5 発現株の培養抽出物を GC-MS にて解析した結果、1つの化合物 (**3**) を生産していた。**3** の MS スペクトルは既知のいずれの化合物の MS スペクトルとも一致しないことから新規な化合物であると予想された。分子量の値から **3** は水酸基を持つ sesquiterpene であると考えられた。TS5 発現株の抽出物から単離・調製し NMR 解析を試みたが、分解しやすいことから成功していない。単離精製した **3** は時間が経過すると消失して代わりに caryophyllene が検出されるようになることから、**3** は caryophyllene に類似した化合物である可能性がある。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析の結果、TS5 は FPP を基質として **3** を生産することが明らかになった (図 3)。

⑤ *Streptomyces* sp. RI-77 由来 TS2、*Streptomyces* sp. JE-08 由来 TS4 の機能解析

TS2 と TS4 は相同性が 71% であり同じ酵素反応を触媒すると予想した。TS2 発現株、TS4 発現株の培養抽出物を GC-MS にて解析した結果、予想通り同様の化合物を生産した。MS スペクトルデータベースとの比較から、この化合物は α -muurolene であると考えられた。組換えタンパク質を用いた *in vitro* 解析の結果、TS2 は FPP を基質として α -muurolene を生産することが示唆された (図 3)。 α -muurolene 合成酵素は植物や菌類から取得されているが、細菌から取得された例はない。



3. 総括

本研究ではゲノムスクニングにより機能未知 TS を見出し、計 11 個の TS の機能解析を行った。その結果、SCTS1、SCTS2、SCTS7、TS2、TS4 では細菌における新規な酵素であることが明らかになった。また、全く新規な酵素として TS1 を見出す事が出来た。TS3、TS5 についても新規化合物を合成する新規酵素であると考えられる。一方で、SCTS3、SCTS6、SCTS10 は異種発現実験で生産量が少なかったことから詳細な解析を行うことができなかった。以上のように非常に高い確率でユニークな酵素が得られていることから、放線菌は生合成遺伝子資源として多いに研究意義があるという事が明らかになった。

⁽¹⁾ C. Nakano, H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1988-1991

⁽²⁾ C. Nakano, H.-K. Kim, Y. Ohnishi, *ChemBioChem* **2011**, 12, 2403-2407

⁽³⁾ Y. Hu, W. K. W. Chou, R. Hopson, D. E. Cane, *Chemistry & Biology* **2011**, 18, 32-37