

令和元年5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03277

研究課題名(和文)テルペン環化酵素の精密機能解析を基軸とする骨格多様化機構の解明

研究課題名(英文)Deciphering the structural diversification mechanism by terpene synthase

研究代表者

南 篤志 (Minami, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：40507191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：テルペン環化酵素は、直鎖化合物から複雑な環構造をもつ低分子化合物を一挙に構築する鍵酵素である。一つの活性部位で全ての反応が進行するため、その反応制御機構などには不明な点が多い。本研究課題では、申請者らが世界で初めてみつけたセスタテルペン環化酵素(炭素数25)の機能解析、分子系統樹解析を行うことで、環化酵素のアミノ酸配列と初発の環化機構との間には明確な関連性があることを実証し、セスキテルペン環化酵素(炭素数15)を例としてその一般性を検証した。さらに、分子系統樹解析で同じクレードに分類された環化酵素は、類似の経路を経て環化体を生成していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テルペン環化酵素によって構築される天然有機化合物の中には、医薬品や香料などとして利用されているものが多い。抗マラリア剤として利用されているアルテミシニンが代表的な例である。本研究により、分子系統樹解析を用いて標的遺伝子を選択することで構造類縁体の網羅的かつ集中的な生産が可能であることが明らかになったため、将来的には、指数関数的に増加する遺伝子情報の中から新たな医薬品シードとなる環化体を与える酵素遺伝子を論理的に探索できるようになると考えている。

研究成果の概要(英文)：Sesterterpene synthase identified from fungi are a class-I terpene synthase, which catalyzes the formation of macrocyclic rings fused with a cyclopentane moiety. The key cyclization mechanism has been extensively studied through heterologous expression, mutational analysis, and DFT calculations. The difference between cyclization mechanisms is consistent with phylogenetic analysis of those sesterterpene synthases, suggesting that phylogenetic analysis provides a useful guideline for the prediction of cyclization products. The generality of this guideline was demonstrated by functional analysis of fungal sesquiterpene synthases.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：天然物 セスタテルペン環化酵素 分子系統樹解析

1. 研究開始当初の背景

テルペノイドは炭素数5のイソプレレン単位から構成される天然有機化合物の総称であり、コンパクトな環状骨格に多数の酸素官能基を備えた特徴的な化学構造と構造多様性を反映した生物活性(抗腫瘍活性、抗マラリア活性など)を示すことが知られている。その生合成機構は「環化」と「酸化」に大別されるが、前者を担うテルペン環化酵素は不斉中心をもたない直鎖状のポリプレニル鎖から多数の不斉中心をもつ多環性骨格を一挙に構築するという点で大変興味深い。このカスケード型分子変換反応で鍵となるのが、“水素原子の移動”、“炭素骨格の変換”及び“環化”である。多くの化学者が「テルペン環化酵素がどのようにして複雑なカスケード反応を制御しているのか?」という点には興味を抱いているが、1つの活性部位(例外的に環化反応を触媒する活性部位を2つもつ環化酵素もある)で全ての反応が連続的に進行するために実験的な検証が難しく、疑問の解決には至っていない。

このような状況下、申請者らは休眠状態にある機能未知テルペン環化酵素の機能解析(=ゲノムマイニング)の過程でセスタテルペン環化酵素の同定に世界で初めて成功すると共に(*Org. Lett.* **2013**, *15*, 594-597.) “アミノ酸配列”と“初発となる環化反応で生成する環構造”には関連性があることを示唆する予備的な実験結果を得た(*J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846-11853.)。環化酵素の立体構造解析に基づいて提唱された環化仮説(*Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412)を加味すると、「セスタテルペン環化酵素は主に“初発段階での環化様式(=環構造)の制御”と“反応中間体の安定化”に寄与しているのではないか?」という新しい仮説が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

本研究課題ではテルペン環化酵素の反応制御機構に対する統一的な理解を目指して、以下の4項目を検討した。

- (1) 申請者独自の手法を用いて、複数のセスタテルペン環化酵素の機能を系統的に解析する。環化酵素のアミノ酸配列と環化生成物の構造を対応づけることで、提唱した仮説の妥当性を検証するために必要な基礎データを収集した。
- (2) “理論計算”と“部位特異的変異導入実験”から、機能解析に成功したセスタテルペン環化酵素による環化機構を解析した。
- (3) 項目1と項目2の解析結果と環化酵素の系統樹解析の結果を考慮し、“アミノ酸配列”と“初発となる環化反応で生成する中間体の環構造”との関連性を明確にした。
- (4) セスキテルペン環化酵素を題材とし、提唱した仮説の一般性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 項目1の検討：二機能性テルペン環化酵素の機能解析

申請者らが同定した二機能性環化酵素(NfSS:サブクレードA、AcOS:サブクレードB)のアミノ酸配列をクエリーとして、公開されているデータベースから200種以上の類縁酵素を探索した。それらを分子系統樹解析に供し、入手可能な菌株に存在しておりかつ異なるクレードに分類されたセスタテルペン環化酵素遺伝子24種を研究対象に選択した。次いで、各環化酵素遺伝子を麹菌発現用プラスミドへとクローニングした。構築した発現用プラスミドを用いて麹菌を形質転換し、各形質転換体の代謝産物をTLCとGC-MSを用いて精査した。新たな代謝産物の生産がみられた場合、単離・精製後、NMRを中心とする各種分光学的手法を用いてその化学構造を決定した。

(2) 項目2の検討：理論計算と部位特異的変異導入実験による反応機構解析

機能解析に成功した環化酵素の大部分がサブクレードAに分類されており、申請者らが同定した sesterfisherol (1) と類似した平面構造を有していた。そこで、最も複雑な環構造をもつ sesterfisherol をモデルとして、その環化機構をDFT計算を用いて推定した(共同研究)。推定した環化機構の妥当性は、NfSSの活性部位周辺に位置していると考えられた芳香族アミノ酸に対する変異導入実験により検証した。

(3) 項目4の検討：セスキテルペン環化酵素の機能解析

提唱した仮説の一般性の検証では、30種のセスキテルペン環化酵素を研究対象として選択した。項目1に示したように、各環化酵素遺伝子を麹菌発現用プラスミドへとクローニングした

後、麹菌を形質転換した。セスキテルペンは揮発性のため、生成物の分析にはヘッドスペースサンプリング法を用いた。生成物の構造は、保持指標とマススペクトルのフラグメントパターンを文献値と比較することで決めた。

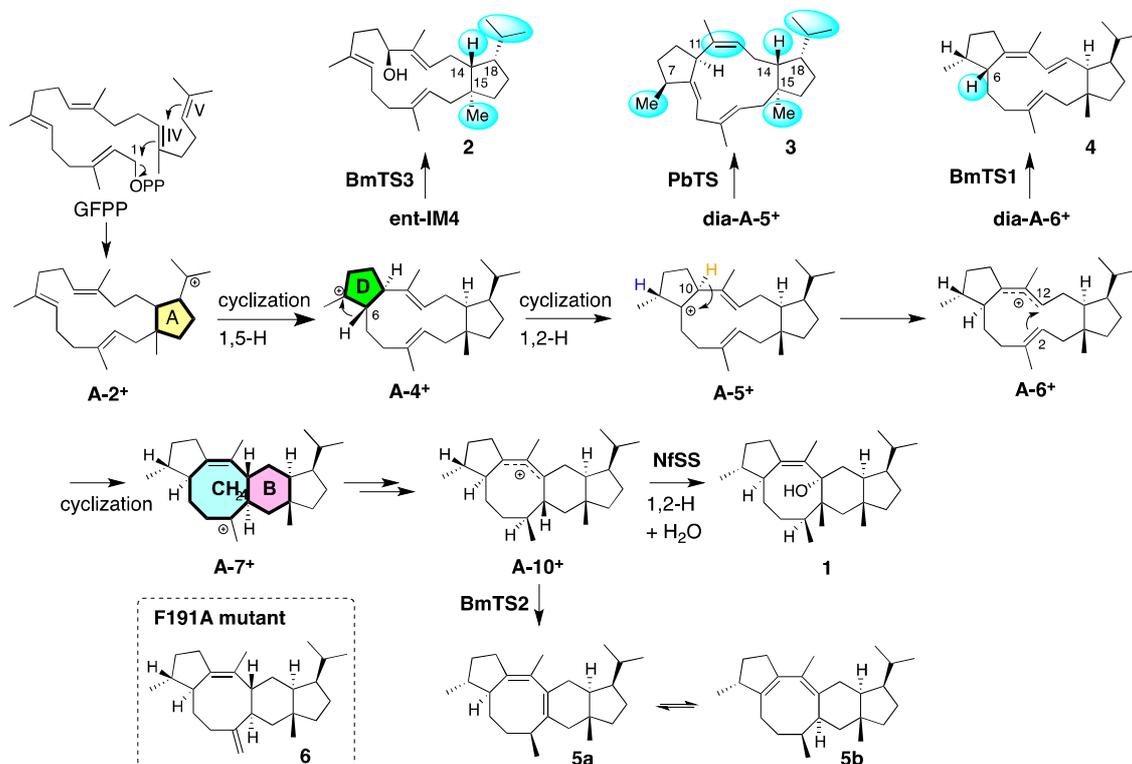
4. 研究成果

(1) 構造類縁体の単離・構造決定

検討した 24 種の二機能性テルペン環化酵素の内、8 種 (サブクレード A ; BmTS1-BmTS3 (*Bipolaris maydis*), PbTS1 (*Phoma betae*), AaTS1 (*Alternaria alternata*), CoTS2 (*Colletotrichum orbiculare*), サブクレード D : PrDS (*Penicillium roqueforti*), サブクレード E : AtTS1 (*Aspergillus terreus*)) に対応する環化体の単離・構造決定に成功した。サブクレード A に分類される環化酵素が与えた生成物は、同じくサブクレード A に分類される NfSS が与える sesterfisherol (1) と類似した平面構造をもちながらも環の数や置換基の立体化学が異なるセスタテルペン (2-5) であった。サブクレード D に分類された PrDS は、deoxyconidiogenol を与えた。サブクレード E に分類された AtTS1 は興味深い多環性骨格をもつ環化体を与えた (未発表データのため構造は控える)。一方、AaTS1 や CoTS2 はそれぞれ NfSS や PbTS1 と同じ環化体を与えた。

(2) 反応機構解析

DFT 計算から得られた環化機構のエネルギーダイアグラムをみると、基本的には室温で自発的に進行し得る反応であることがわかった。また、1 に至る過程で生成するカチオン性中間体の平面構造は取得した環化体の平面構造とよく一致していた。部位特異的変異導入実験では、想定された中間体がクエンチすることで生成した新たな環化体 (6) などが得られた。以上の結果から、テルペン環化酵素は初発の環化反応と反応停止の位置 (タイミング) を厳密に制御していることが予想された。



(3) 分子系統樹解析に基づく環化機構の推定

項目 1、2 の結果から、アミノ酸配列と初発の環化機構との間にある明確な関連性を実証するに至った。この仮説は、同時期に機能解析された他二機能性テルペン環化酵素の解析結果とも矛盾していない。また、項目 2 の結果は、同一クレードに分類されるテルペン環化酵素は、類似の経路を経て構造類縁体を構築していることを意味する。以上の結果を考慮すると、分子系統樹解析を用いて標的遺伝子を選択することで、構造類縁体の網羅的生产が可能であることが強く示唆される。

(4) 普遍的な環化仮説の提唱

30 種のセスキテルペン環化酵素 (キノコ由来) の解析の結果、セスキテルペン環化酵素においてもアミノ酸配列と初発の環化機構との間には明確な関連性があることが明らかになった。

これにより、糸状菌がもつ代表的な2種の環化酵素（セスキテルペン環化酵素、セスタテルペン環化酵素）において提唱した仮説が当てはまることがわかった。

以上の成果は、原著論文4報、総説・解説2報（日本語含む）、学会発表12件、他関連論文2報として公表した。また、本研究内容は関連する研究成果とあわせ、2020年に販売予定のComprehensive Natural Products III（Elsevier）にまとめた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計6件）

Minami, A.; Ozaki, T.; Liu, C.; Oikawa, H., Cyclopentane forming di-/sesterterpene synthases: widely distributed enzymes in bacteria, fungi and plants, *Nat. Prod. Rep.* 2018, 35, 1330-1346. 査読有

DOI: 10.1039/C8NP00026C

Narita, K.; **Minami, A.**; Ozaki, T.; Liu, C.; Kodama, M.; Oikawa, H., Total biosynthesis of antiangiogenic agent (-)-terpestacin by artificial reconstitution of the biosynthetic machinery in *Aspergillus oryzae*, *J. Org. Chem.* 2018, 83, 7042-7048. 査読有

DOI: 10.1021/acs.joc.7b03220

Sato, H.; Narita, K.; **Minami, A.**; Yamazaki, M.; Wang, C.; Suemune, H.; Nagano, S.; Tomita, T.; Oikawa, H.; Uchiyama, M., Theoretical study of sesterfisherol biosynthesis: Computational prediction of key amino acid residue in terpene synthase, *Sci. Rep.* 2018, 8, 2473. 査読有

DOI: 10.1038/s41598-018-20916-x

南 篤志、尾崎太郎、劉 成偉、及川英秋、糸状菌テルペン環化酵素遺伝子のゲノムマイニングによる新規天然物の生産、バイオサイエンスとインダストリー、Vol. 76, No. 1, 20-25 (2018). 査読無

Narita, K.; Sato, H.; **Minami, A.**; Kudo, K.; Gao, L.; Liu, C.; Ozaki, T.; Kodama, M.; Lei, X.; Taniguchi, T.; Monde, K.; Yamazaki, M.; Uchiyama, M.; Oikawa, H., Focused genome mining of structurally related sesterterpenes: enzymatic formation of enantiomeric and diastereomeric products, *Org. Lett.* 2017, 19, 6696-6699. 査読有

DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03418

Shinde, S. S.; **Minami, A.**; Chen, Z.; Tokiwano, T.; Toyomasu, T.; Kato, N.; Sassa, T.; Oikawa, H., Cyclization mechanism of phomopsene synthase: mass spectrometry based analysis of various site-specifically labeled terpenes, *J. Antibiot.* 2017, 70, 632-638. 査読有

DOI: 10.1038/ja.2017.27

〔学会発表〕（計12件）

西下純平、長嶺翔太、小崎拓登、劉成偉、尾崎太郎、丸山潤一、**南 篤志**、及川英秋、担子菌がもつセスキテルペン環化酵素の網羅的解析-1-、日本化学会 第99春季年会（2019）、2019年3月

長嶺翔太、西下純平、劉成偉、尾崎太郎、丸山潤一、**南 篤志**、及川英秋、担子菌がもつセスキテルペン環化酵素の網羅的解析-2-、日本化学会 第99春季年会（2019）、2019年3月

劉 成偉、佐藤 芳郎、尾崎 太郎、呉 静、丸山 潤一、**南 篤志**、河岸 洋和、及川 英秋、キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -1-、日本農芸化学会 2019年度大会、2019年3月

西下 純平、長嶺 翔太、小崎 拓登、劉 成偉、尾崎 太郎、丸山 潤一、**南 篤志**、及川 英秋、キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -2-、日本農芸化学会 2019年度大会、2019年3月

長嶺 翔太、西下 純平、劉 成偉、尾崎 太郎、丸山 潤一、**南 篤志**、及川 英秋、キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -3-、日本農芸化学会 2019年度大会、2019年3月

Minami, A., Ozaki, T., Oikawa, H., Unique enzymes in the biosynthesis of terpenoids, 1st German-Japanese Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, 2018年9月

南 篤志、及川 英秋、麹菌異種発現系を利用した糸状菌由来二次代謝産物の生合成研究、第69回日本生物工学会大会、2017年9月

成田興司、叶英、佐藤玄、工藤洗星、高磊、**南 篤志**、谷口透、児玉基一郎、五味勝也、門出健次、内山真伸、Xiaoguang Lei、及川英秋、二機能性環化酵素遺伝子の相同性に基づく新規テルペノイドのゲノムマイニング、第59回天然有機化合物討論会、2017年9月

成田興司、工藤洗星、叶英、**南 篤志**、児玉基一郎、五味勝也、及川英秋、麹菌発現系を利

用した構造類似テルペンの網羅的ゲノムマイニング、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月

Minami A., Reconstitution of biosynthetic machinery of fungal secondary metabolites, 日本化学会第 97 春季年会、アジア国際シンポジウム、2017 年 3 月

成田興司、工藤洸星、**南 篤志**、児玉基一郎、五味勝也、及川英秋、生物活性セスタテルペノイドの異種生産によるゲノムマイニング、第 60 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 2016 年 10 月

南 篤志、酵素を使った天然物合成～セスタテルペン合成酵素に関するごく最近の知見～、第 6 回有機分子構築法 夏の勉強会、2016 年 5 月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。