

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月16日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04955

研究課題名(和文) 魅力あるトリテルペノイドの戦略的合成を可能にする担子菌シトクロムP450

研究課題名(英文) Combinatorial biosynthesis of triterpenoid using fungal cytochrome P450 monooxygenases

研究代表者

一瀬 博文 (Ichinose, Hirofumi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00432948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌に由来するシトクロムP450のトリテルペン変換活性をスクリーニングし、新奇・有用なトリテルペノイドの合成を試みた。植物に由来するルペオール合成酵素またはアミリン合成酵素と糸状菌P450を共発現する遺伝子組み換え酵母を作出し、形質転換酵母に蓄積した代謝物をGC-MSによって分析することで、ルペオールおよびアミリンを変換可能な糸状菌P450を同定し、様々な植物型トリテルペノイドを産生することに成功した。また、担子菌P450が酵母の成育過程で生じるステロイド類に変換活性を有することが示され、担子菌類がP450依存的に多様なステロイドを生合成することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリテルペノイドは各種生物が産生する代謝物であり、薬理活性を示す化合物も多く知られている。一方で、自然界に産出される代謝産物の大量獲得は困難な現状であり、自然界に眠る“魅力あるトリテルペノイド”の利用には、これらを戦略的に合成する新しいバイオ技術の開発が重要な課題として残されている。本研究では、植物型トリテルペノイドの合成を可能とする糸状菌のシトクロムP450を同定した。本研究の成果は、自然界において稀少・有用なトリテルペノイドの戦略的合成を進展させるとともに、新奇な有用疑似天然物の発掘を加速すると期待される。

研究成果の概要(英文)：A functional screening of fungal cytochromes P450 for combinatorial biosynthesis of triterpenoids was conducted. To elucidate catalytic potentials of fungal P450s against plant triterpenoids, we generated recombinant yeasts that allow co-expression of fungal P450 and plant triterpene synthase. Based upon metabolic studies, we identified fungal P450s showing catalytic activities for plant triterpenoids lupeol and beta-amyrin, indicating a series of plant-like triterpenoids could be produced using fungal P450s. In addition, some basidiomycetous P450s were suggested to be capable of decorating steroid compounds appeared from steroid metabolism by yeast. These results suggested that basidiomycetes possess P450-dependent metabolic systems to generate various ergostane-type steroids.

研究分野：林産学

キーワード：シトクロムP450 トリテルペン 糸状菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トリテルペノイドは各種生物が産生する代謝物であり、薬理活性を示す化合物も多く知られている。一方で、自然界に産出されるトリテルペノイドの多くは微量成分であり、その供給力に大きな問題を抱えている。複雑な構造のため有機化学的な全合成も難易度が高い。すなわち、自然界に眠る“魅力あるトリテルペノイド”の利用には、これらを戦略的に合成する新しいバイオ技術の開発が重要な課題として残されている。生物によるトリテルペノイド合成経路では、生物種に特徴的な骨格化合物が形成された後、様々なシトクロム P450 酵素(以下 P450)による修飾反応が進行して多様な構造の天然物が産出される。すなわち P450 は、限りある種類の骨格化合物を多種多様なトリテルペノイドに導く鍵酵素の役割を果たしている。我々は、425 種類におよぶ糸状菌 P450 の遺伝子を既に保有しており、酵母を利用した異種発現技術を完成させている。糸状菌 P450 のトリテルペノイド変換活性を網羅的に探索すれば、これらを合目的に組み合わせた有用化合物生産も可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、「有用トリテルペノイドの合成を可能にする糸状菌 P450 の発掘と利用」を目的とし、下記 2 項目を達成目標に設定した。各種トリテルペノイド骨格化合物に活性を示す糸状菌 P450 を見出すことで、天然型有用トリテルペノイドの産生が達成され、自然界には産出されない疑似天然トリテルペノイドの合成も可能となり、様々な生理活性化合物の発掘・獲得が促進されると期待される。

- (1) 真菌型トリテルペノイドを糸状菌 P450 で創る 糸状菌 P450 を酵母に異種発現させ、真菌型トリテルペノイドの骨格化合物(ラノステロール)を変換する分子種を発掘する。ラノステロールの異なる部位を修飾する P450 を組み合わせ、同基質への多段修飾を施して担子菌に由来する“ガノデリン酸”およびその類縁体の高効率生産を可能にする。ガノデリン酸生合成に関与する P450 は未だ同定されておらず、本項によってバイオ産業に貢献する知識発見を目指す。
- (2) 植物型トリテルペノイドを糸状菌 P450 で創る 植物型トリテルペノイドの骨格化合物を合成する酵素と糸状菌 P450 を酵母細胞内に共発現させ、多種多様な植物型トリテルペノイドを合成する。本項は、新奇・有用化合物の高効率生産を指向するばかりでなく、「植物と糸状菌の酵素を組み合わせたモノ創り」への挑戦であり、ユニークな概念に基づくバイオ技術の好例を示して様々な応用研究を推進する。

3. 研究の方法

- (1) 真菌型トリテルペノイドを糸状菌 P450 で創る 真菌型トリテルペノイドの骨格化合物であるラノステロールは酵母の成育過程で恒常的に生合成される。糸状菌 P450 を異種発現する組み換え酵母においては、ラノステロールが酸化修飾されて生じるラノスタン型トリテルペノイドが細胞内に蓄積すると考えられる。本研究では、425 種類の P450 異種発現酵母から代謝物を抽出して GC-MS 分析に供し、P450 依存的に生じる化合物を追跡した。先行研究で構築した白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 P450 (120 種)、褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* 由来 P450 (184 種)、麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来 P450 (121 種)の発現プラスミド(Hirosue et al. 2011; Ide et al. 2012; Nazir et al. 2011)を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株にエレクトロポレーション法により形質転換して種母を得た。各形質転換体を人工培地(20 mL)で 3 日間震とう培養した後(150 rpm, 28°C)、遠心分離によって菌体を回収した(Ichinose and Kitaoka, 2018)。酵母の細胞内代謝物は、菌体を 20%KOH 溶液(水:エタノール = 1:1)に懸濁させて煮沸することで細胞を破砕した後、有機溶媒(ヘキサン:酢酸エチル = 1:1)で抽出し、減圧乾固して調製した。代謝物はトリメチルシリル化剤による誘導体化を施した後、GC-MS で分析した。
- (2) 植物型トリテルペノイドを糸状菌 P450 で創る 植物型トリテルペノイドの骨格化合物に糸状菌 P450 を作用させて新奇な化合物を創出することを目的として、植物由来のルペオール合成酵素(以下 LUS)または β -アミリン合成酵素(以下 bAS)と糸状菌 P450 を共発現する組み換え酵母を作成した。得られた形質転換酵母から代謝物を抽出して GC-MS 分析に供し、ルペオールおよび β -アミリンが酸化修飾して生じる植物型トリテルペノイドを追跡した。*Glycyrrhiza uralensis*(AB663343)に由来する LUS および *Lotus japonicus*(AB181244)に由来する bAS の遺伝子はコドン最適化を施した人工遺伝子として調達し、マーカー遺伝子を *leu2* から *his4* に置換した pGYR ベクター(Ide et al. 2012)に連結して発現プラスミドを得た。LUS または bAS の異種発現および糸状菌 P450 との共発現は *S. cerevisiae* AH22 株を宿主として行い、代謝物分析は上項に準じて実施した。

4. 研究成果

- (1) 真菌型トリテルペノイドを糸状菌 P450 で創る 真菌型トリテルペノイドは、ラノステロールを前駆物質として P450 による酸化修飾が進行することで産出される。酵母はトリテルペノイド生合成能を有さないが、ラノステロールを恒常的に生合成して生体膜構成成分の前駆物質として利用する。すなわち、P450 異種発現酵母においてはラノステロール水酸化反応が進行して多様なトリテルペノイドが蓄積すると考えられる。

また、酵母細胞膜の構成成分であるエルゴステロールが糸状菌 P450 によって変換を受ければ、ユニークなステロイドが生じることも期待される。本研究では、白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium*、褐色腐朽担子菌 *P. placenta* および麹菌 *A. oryzae* に由来する P450 を異種発現する 425 種類の酵母を作出し、形質転換酵母で特異的に生じる代謝物を追跡した。

人工培地で培養した形質転換酵母を遠心分離で集菌し、アルカリ条件下で煮沸して菌体破碎を加え、ヘキサン/酢酸エチルで代謝物を抽出して GC-MS 分析に供することで各々形質転換体に蓄積する化合物を追跡した。酵母内在性のラノステロールおよびエルゴステロールの高感度検出を指標として分析条件を最適化した後、形質転換酵母の代謝物を GC-MS によって分析したところ、*P. chrysosporium* の P450 を発現する 4 種類の形質転換体において P450 依存的な代謝物の蓄積が確認された。GC-MS 分析における保持時間および MS フラグメンテーションパターンの比較により、P450 反応によって 2 種類の特異的化合物が蓄積したと考えられ、該化合物はエルゴステロールが修飾を受けて生じたステロイド様化合物であることが強く示唆された。本結果は、細胞膜構成成分とは異なるエルゴスタン型ステロイドが担子菌 P450 の作用によって生じることを示唆している。同定された P450 は担子菌類に広く分布する CYP512 ファミリーに分類され、様々な担子菌が多様なエルゴスタン型ステロイドを生合成していることも推察される。本成果は担子菌ステロイド代謝機構の理解に有益な知見を与えるとともに、稀少・有用なステロイド類の合成にも応用展開が期待される。一方、ラノステロールが酸化修飾を受けて生じるガノデリン酸様化合物はいずれの形質転換酵母からも見出されず、ラノステロール変換活性を有する P450 の同定には至らなかった。酵母細胞内に蓄積するラノステロール量が十分ではない可能性もあり、宿主細胞のラノステロール生合成経路を活性化するなど、更なる検討も必要である。

(2) 植物型トリテルペノイドを糸状菌 P450 で創る

植物型トリテルペノイドは、スクアレンが酸化されて生じるオキシドスクアレンが各種トリテルペン合成酵素による環化反応を受けて基本骨格が生成する。酵母は内在性代謝機構としてオキシドスクアレンの生合成機構を有していることから、環化酵素の導入により植物型トリテルペン骨格分子を酵母に産生させることができる。本研究では、ルペオールおよび β -アミリンから誘導されるトリテルペノイドの獲得を目指し、コドン最適化を施した LUS 遺伝子及び bAS 遺伝子を人工遺伝子として合成し、発現プラスミドに連結して *S. cerevisiae* AH22 株に形質転換した。発現プラスミドは糸状菌 P450 との共発現を可能にするため、pGYR プラスミドにコードされたマーカー遺伝子を *leu2* から *his4* に置換して独自に作成した。人工培地で成育させた酵母から抽出した代謝物を GC-MS によって分析したところ、外来 LUS 遺伝子によるルペオールの蓄積および bAS 遺伝子による β -アミリンの蓄積が確認され、構築した発現プラスミドが効率的に機能することが示された。続いて、ルペオール産生酵母および β -アミリン産生酵母に 425 種類の糸状菌 P450 発現プラスミドを形質転換し、植物由来のテルペン環化酵素と糸状菌由来の P450 を共発現する 850 種類の形質転換酵母を作出した。得られた形質転換酵母を人工培地で成育させ、酵母から抽出した代謝物を GC-MS に供することで P450 反応依存的に生じたトリテルペノイドを追跡した。代謝物分析の結果、ルペオールおよび β -アミリンに対して変換活性を有する糸状菌 P450 が同定され (Table 1)、新奇な構造のトリテルペノイドが生じたことも示唆された。また、担子菌に由来する CYP512 ファミリーが植物型トリテルペノイドの変換に優れることも明らかになった。糸状菌はルペオール及び β -アミリンなどの植物型トリテルペノイドを生合成しないことから、糸状菌 P450 が該化合物に変換活性を示したことは興味深い知見であり、様々な植物型トリテルペノイド合成の有用ツールとして期待される。本研究の成果は、糸状菌 P450 の潜在活性を活用すれば新規トリテルペノイドの産生が可能になることを示すと共に、生物種の壁を超えた生合成マシナリーの構築が天然物合成の新戦略となることを意味している。

Table 1 ルペオールおよび β -アミリンの変換活性を有する担子菌 P450

P450 の由来生物	ルペオール	β -アミリン
<i>P. chrysosporium</i>	CYP512G2	CYP512G2
	CYP512E1	
	CYP5136A1	
<i>P. placenta</i>	CYP512P2	CYP512P2

< 引用文献 >

- Hirosue S., Tazaki M., et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 407, 118-123, (2011).
 Ide M., Ichinose H., Wariishi H., *Arch Microbiol*, 194, 243-253, (2012).
 Nazir KHMNH., Ichinose H., Wariishi H., *Appl Environ Microbiol*, 77, 3147-3150, (2011).
 Ichinose H., Kitaoka T., *Microbial Biotechnol*, 11, 952-965, (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Jianqiao Wang, Haruka Ohno, Yuuri Ide, Hirofumi Ichinose, Toshio Mori, Hirokazu Kawagishi, Hirofumi Hirai, Identification of the cytochrome P450 involved in the degradation of neonicotinoid insecticide acetamiprid in *Phanerochaete chrysosporium*, Journal of Hazardous Materials, Vol 371, pp 494-498, DOI; 10.1016/j.jhazmat.2019.03.042, 2019年(査読有)

Hirofumi Ichinose, Takuya Kitaoka, Insight into metabolic diversity of the brown-rot basidiomycete *Postia placenta* responsible for sesquiterpene biosynthesis: semi-comprehensive screening of cytochrome P450 monooxygenase involved in protoilludene metabolism, Microbial Biotechnology, Vol 11, pp 952-965, DOI; 10.1111/1751-7915.13304, 2018年(査読有)

Kiyota Sakai, Fumiko Matsuzaki, Lisa Wise, Yu Sakai, Sadanari Jindou, Hirofumi Ichinose, Naoki Takaya, Masashi Kato, Hiroyuki Wariishi, Motoyuki Shimizu, Biochemical characterization of CYP505D6, a self-sufficient cytochrome P450 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, Vol 84, e01091-18, DOI; 10.1128/AEM.01091-18, 2018年(査読有)

Hatakeyama Mayumi, Kitaoka Takuya, Ichinose Hirofumi, Impacts of amino acid substitutions in fungal cytochrome P450 monooxygenase (CYP57B3) on the effective production of 3'-hydroxygenistein, FEMS Microbiology Letters, Vol 364, fnx107, DOI; 10.1093/femsle/fnx107, 2017年(査読有)

〔学会発表〕(計14件)

大園昂貴, 一瀬博文, 北岡卓也, 糸状菌シトクロム P450 の潜在機能を活用したトリテルペノイド合成, 第69回日本木材学会大会, 2019年

木村紘也, 一瀬博文, 北岡卓也, 褐色腐朽担子菌 *Postia placenta* におけるプロトイルデン型セスキテルペノイドの生合成機構, 第69回日本木材学会大会, 2019年

大園昂貴, 笠場将太, 北岡卓也, 一瀬博文, 糸状菌シトクロム P450 の機能多様性とテルペノイドのコンビナトリアル生合成, 第70回日本生物工学会大会, 2018年

一瀬博文, Identification of cytochrome P450 monooxygenases responsible for terpene biosynthesis by basidiomycetes, The 14th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2018年

笠場将太, 一瀬博文, 北岡卓也, 出芽酵母を宿主とした担子菌型セスキテルペノイドのコンビナトリアル生合成, 第68回日本木材学会大会, 2018年

一瀬博文, 笠場将太, Studies on terpene synthases and cytochrome P450 monooxygenases of basidiomycetes, 20th International conference on cytochrome P450, biochemistry, biophysics and biotechnology, 2017年

笠場将太, 一瀬博文, 北岡卓也, 木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有するセスキテルペン合成酵素の多様性, 第67回日本木材学会大会, 2017年

熊丸さち, 一瀬博文, 北岡卓也, 担子菌シトクロム P450 の異種発現が及ぼす酵母の代謝物変動, 第67回日本木材学会大会, 2017年

笠場将太, 北岡卓也, 一瀬博文, Diversity of sesquiterpene synthase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community, 2016年

笠場将太, 北岡卓也, 一瀬博文, 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が有するセスキテルペン合成酵素の同定および機能解析, 第68回日本生物工学会大会, 2016年

畠山真由美, 野北昂志, 北岡卓也, 一瀬博文, シトクロム P450 BM3 と補酵素再生系の近接配置による酵素反応, 第68回日本生物工学会大会, 2016年

畠山真由美, 北岡卓也, 一瀬博文, Heterologous expression and functionalization of fungal cytochromes P450 (CYP5136A1 and CYP5136A3) in *Escherichia coli*, 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2016年

一瀬博文, Functionalization of fungal cytochrome P450 in *Escherichia coli*, 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 2016年

畠山真由美, 北岡卓也, 一瀬博文, 担子菌由来シトクロム P450 (CYP5136A1, CYP5136A3) の異種発現およびシトクロム b5 による機能発現, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://bm.wood.agr.kyushu-u.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。