

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16636

研究課題名(和文) インドールジテルペン生合成における構造多様性創出機構の解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and controlment of diverse structure in the biosynthesis of indole diterpene

研究代表者

劉 成偉 (Liu, Chengwei)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：60773801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌が生産する代表的なインドールテルペン系天然物シアリニンとセスペンドールに着目し、麹菌異種発現系を駆使した酵素機能解析と生物合成を行った。シアリニン生合成後期に関わる4つの遺伝子を麹菌へ導入し、生合成中間体を投与した結果、最終産物であるshearinine Dを生産することに成功した。さらに、インドール環に連結した特徴的な6/5員環の形成に関して詳細な反応機構を解明した。セスペンドール生合成遺伝子クラスターを同定し、麹菌を用いて異種生産に成功した。また、インドール環の修飾がプレニル基転移酵素(SpdE)/シトクロムP450(SpdJ)酵素のセットによって触媒されることが明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Indole terpenes are a large class of fungal natural product. In this study, we used *Aspergillus oryzae* heterologous expression system to express shearinine and sespendole biosynthetic genes. The late-stage biosynthetic pathway of the shearinine involving four enzymatic reaction was elucidated by heterologous expression in *A. oryzae*. When incubated this transformants with the corresponding intermediates, we found that shearinine D was produced. In vitro enzymatic reaction with a recombinant protein, we elucidated the key oxidative cyclization, forming a characteristic 6/5 bicyclic of shearinine by flavoprotein oxidase. Suspendole biosynthetic gene cluster were identified. The biosynthetic pathway that involves genes encoding six enzymes was elucidated through heterologous expression of spd genes in *A. oryzae*. Thereby, revealing the mechanism underlying the characteristic modification on the indole ring, catalyzed by a set of prenyltransferase (SpdE)/cytochrome P450 (SpdJ) enzymes.

研究分野：天然物化学

キーワード：biosynthesis indole diterpene Indole sesquiterpene shearinine sespendole

1. 研究開始当初の背景

インドールテルペンは、インドール環にテルペノイド骨格が連結したメロテルペノイドと呼ばれる天然物群である。ポリプレニル鎖の鎖長(炭素数 15 もしくは 20)と環化様式、酸化度が異なる 100 以上の構造類縁体が知られており、その多様性を反映する生物活性(殺虫作用、イオンチャネル阻害作用、痙攣作用など)を示すことが知られている。本化合物群には、駆虫薬として有望なノズリスポリン酸などが含まれる。2001 年に代表的なインドールジテルペンであるパキシリンの生合成遺伝子クラスターが取得されて以降、類縁のアフラトレムやロリトレムの生合成遺伝子が相次いで取得された。しかし、その多様性創出戦略の分子基盤については明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究課題ではインドールテルペンの骨格構築酵素遺伝子と修飾酵素遺伝子に着目し、麹菌異種発現系を駆使した酵素機能解析と非天然型アナログの生物合成を検討する。具体的には、シアリニン生合成における特徴的な修飾酵素遺伝子の解析、セスペンドール生合成マシナリーの再構築および修飾反応に関わる酵素遺伝子を特定と機能解析、修飾酵素遺伝子の組み合わせを変えることによる非天然型アナログの創製について検討する。

3. 研究の方法

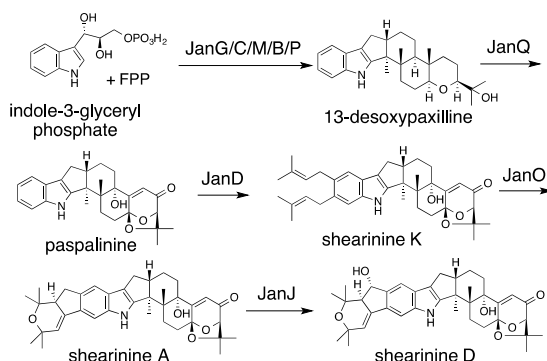
本研究では麹菌異種発現系と組換え酵素を用いた *in vitro* 解析を併用してシアリニンとセスペンドール生合成酵素遺伝子の機能を解明する。なお、セスペンドール生合成遺伝子クラスターは未同定のため、上記実験に先駆けて生産菌のドラフトゲノム解析を行う。一方、シアリニン生合成遺伝子クラスターは報告されているので、その遺伝子情報を活用して、インドール環上での構造多様化の鍵を握る修飾酵素遺伝子を特定する。具体的には、候補となる修飾酵素遺伝子の絞り込み、麹菌に対する骨格構築酵素遺伝子及び修飾酵素遺伝子の導入、形質転換体が生産した代謝産物の単離・構造決定、を行う。

4. 研究成果

(1) シアリニンの生合成研究

6/5 縮環構造を有するシアリニンの生合成については、共同研究者 Scott たちは遺伝子破壊実験を行い、生合成クラスターを同定したが、詳細な生合成経路の解明には至っていない。研究代表者らが以前行ったアフラトレムに関する研究結果を踏まえると、パスパリンまでの生合成経路には 6 個の遺伝子 *janGCMBPQ* が関与していると予測ができる。残る 3 個の遺伝子 *janDOJ* はインドール環の修飾に関与すると予測した。そこで、生合成後期に関わる遺伝子 *janQDOJ* を単独および

複数遺伝子を組合せて麹菌へ導入した。得られた各形質転換体に対して生合成中間体である 13-デスオキシパキシリンを投与し、JanQ がパスパリンへ変換すること、JanJ が生合成の最後に水酸基を導入することを明らかにした。また、JanDO が特徴的な 6/5 環形成に関与することも明らかにした。その内プレニル基転移酵素 JanD はパスパリンのジプレニル化反応、FAD 依存型酸化酵素 JanO が環化反応を触媒すると予測した。それらの機能をより詳細に解析するために、JanD/JanO 両酵素を大腸菌で調製し、*in vitro* で反応を解析した。はじめに JanD をパスパリンのプレニル化反応に供し、HPLC で反応産物を分析した。その結果、ジプレニル化体シアリニン K が生成した。次にパスパリンを基質として JanD/JanO の連続反応を行うと、6/5 縮環構造を有するシアリニン A が生成した。これより、FAD 依存型酸化酵素 JanO が多段階酸化反応によって 6/5 員環の形成に関与することを明らかにした。



(2) セスペンドールの生合成研究

セスペンドールは、糸状菌 *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 から単離されたインドールセスキテルペンであり、マクロファージの脂肪滴形成の阻害活性を示す。その構造的な特徴として、インドール環にエポキシアルコールを備えた C5 ユニットが置換していることが挙げられる。その構造から、セスペンドールの生合成におけるインドール環の修飾反応は、研究代表者らがこれまでに明らかにしたインドールジテルペンであるアフラトレム、ペニトレム、シアリニンにおける修飾反応とは異なることが期待された。本研究では、生合成マシナリーの再構築により修飾反応に関わる酵素遺伝子を特定するとともにその機能解析を行った。

セスペンドールの生合成遺伝子クラスターの取得

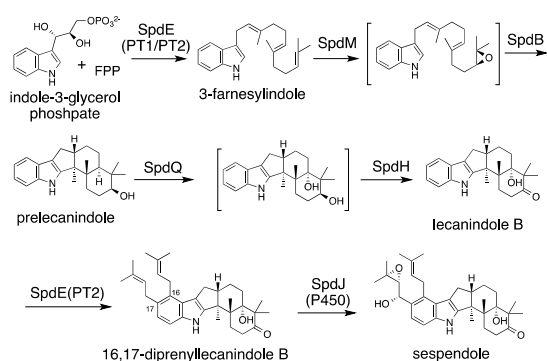
まず、生産菌 *P. terrestris* FKA-25 のドラフトゲノムシーケンスデータ解析を行った。続いて、インドールジテルペン・パキシリンの生合成遺伝子クラスターにコードされている骨格構築遺伝子を指標として 3 種の骨格構築酵素(*paxC/M/B*)と高い相同性をもつセスペンドール遺伝子クラスターを見出した。BLAST を用いて各酵素遺伝子の相同性を検索し、骨

格構築遺伝子 (*spdE/M/B*) 以外に、3 種の酸化還元酵素遺伝子 (*spdQ/H/J*) が存在することを明らかにした。

異種生産およびインドール環の修飾酵素遺伝子の機能解析

セスペンドールの酵素合成へ向け、麹菌異種発現系を用いて、各遺伝子の機能解析を行った。まず、骨格構築に関わる 3 種の遺伝子 (*spdEMB*) を麹菌へと導入することで、5 環性中間体 prelecanindole の生産を確認した。続いて、残る修飾酵素遺伝子 (*spdQHE(PT2)J*) を先の形質転換体に追加導入し、セスペンドールの生産を確認した。また、導入する遺伝子の組み合わせを変える (*spdQH*) ことで合成中間体である lecanindole B も取得した。これより、セスペンドールの酵素的完全合成を達成した、さらに、インドール環の修飾を担う酵素がプレニル基転移酵素 (SpdE)/シトクロム P450 (SpdJ) であることを明らかにした。

プレニル基転移酵素である SpdE は 2 つのドメインから構成される。In vivo と in vitro 実験より、SpdE の C 末端 (SpdE(PT2)) ジプレニル基転移酵素と相同する部分は lecanindole B に対して、2 つのプレニル基を導入することが分かった。一方、N 末端部分 SpdE(PT1) を麹菌に導入しても、機能が発現しなかったことから、この 2 機能性プレニル基転移酵素 (SpdE) とシトクロム P450 (SpdJ) が相互作用して、セスペンドールのインドール環にエポキシアルコールを形成すると考えられた。

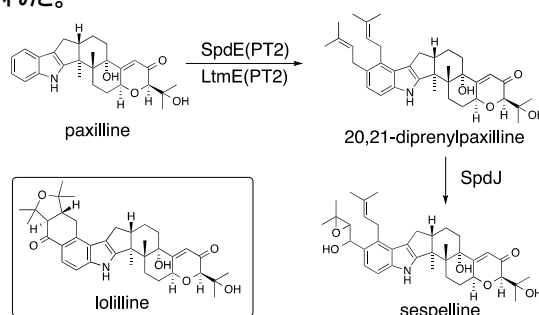


(3) 非天然型アナログの創製およびロリトレム修飾酵素遺伝子の機能解析

インドールテルペン構造多様化の鍵は主にインドール環の修飾反応となる。修飾酵素が寛容な基質特異性を示すのであれば、骨格様式が異なる基質も修飾酵素によって認識され、非天然型骨格を有するアナログ体を構築できると考えられる。

そこで、セスペンドール酵素遺伝子を含む麹菌異種発現体 (AO-*spdEMBQHE(PT2)J*) に対して、インドール環に置換基をもたないパキシリンを投与した。その結果、ジプレニル化体とその酸化生成物 (sepselline) の生産を確認した。これより、インドール環の修飾酵素であるプレニル基転移酵素 (SpdE) とシトクロム P450 (SpdJ) のセットによって非天然型アナログの創製ができた。また、ロリトレ

ム合成クラスターには、これらの酵素をコードする遺伝子 *ltmE*, *ltmJ* が存在する。In vitro 解析により、LtmE の C 末端部分 (LtmE(PT2)) はパキシリンを基質として、ジプレニル化を触媒することが分かった。一方、生産量が少なく構造決定には至らなかったが、*spdE* と *ltmJ* を組み合わせた麹菌形質転換体にパキシリンを投与すると、sepselline と同じ分子量を示す新たなピークが検出された。この情報から、*ltmE* と *ltmJ* はロリトレム合成における 5/6 員環の形成に関与することが強く示唆された。



本研究により、ロリトレムのインドール環に融合した二環式骨格の合成はペニトレム、シアリニンと異なる経路を提案することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kudo, K.; Liu, C.; Matsumoto, T.; Minami, A.; Ozaki, T.; Toshima, H.; Gomi, K.; Oikawa, H. Heterologous biosynthesis of fungal indole sesquiterpene sespindole. *Chembiochem.* **2018**, doi: 10.1002/cbic.201800187. 査読有
2. Liu, C.; Minami, A.; Dairi, T.; Gomi, K.; Scott, B.; Oikawa, H. Biosynthesis of Shearinine: Diversification of a Tandem Prenyl Moiety of Fungal Indole Diterpenes. *Org Lett.* **2016**, *18*, 5026-5029. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 工藤洸星、松本知之、劉成偉、尾崎太郎、五味勝也、南篤志、及川 英秋、糸状菌が生産するインドールセスキテルペンの合成研究 (3)、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 03 月 15 日~18 日、名城大学天白キャンパス (愛知県・名古屋市)
2. 工藤洸星、松本知之、劉成偉、尾崎太郎、五味勝也、南篤志、及川 英秋、糸状菌が生産するインドールセスキテルペンの合成研究 (2)、日本化学会 第 97

春季年会、2017年03月16日～19日、
慶應義塾大学（神奈川県・横浜市）

3. Chengwei Liu, Study on the biosynthesis of fungal indole diterpenes, *2nd US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers*, 2017年03月04日～05日、東京工業大学（東京都・目黒区）

〔図書〕（計 1 件）

書名：酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開
（分担執筆、範囲：麹菌を宿主としたカビの二次代謝化合物の生産）

南篤志、劉成偉、尾崎太郎、及川英秋、

総ページ数：264（pp: 155～161）

シーエムシー出版 2018年1月

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://barato.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

劉 成偉（LIU CHENGWEI）

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：60773801