

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06715

研究課題名(和文) アルザノール生合成経路の完全解明および生物生産プラットフォームの確立

研究課題名(英文) Comprehensive elucidation of the biosynthetic pathway of arzanol to establish its microbial production platform

研究代表者

田浦 太志 (Taura, Futoshi)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：00301341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではカレープラントが生産する薬効成分アルザノールの生合成に関与する酵素遺伝子の完全解明を検討した。この結果、アルザノール前駆体の生合成反応を触媒するポリケチド合成酵素およびプレニル基転移酵素を初めて同定し、これらの酵母発現系を確立するとともに、組換え酵素を用いたキャラクタリゼーションにより各酵素反応の生化学的性質を詳細に解明することに成功した。最終ステップを触媒する酸化カップリング酵素の同定には至らなかったものの、本研究で得られた各酵素はともに *Pichia pastoris* での大量発現が可能であり、重要天然物アルザノールの微生物生産に向けた基盤整備を行うことができたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カレープラントが生産する多様な二次代謝産物の中でも、アルザノールはNF- κ Bの活性化、TNF- α の放出、prostaglandin E2の生合成をいずれも阻害することで強力な抗炎症作用を発現するほか、T細胞でのHIV-1の複製阻害およびがん細胞に対する細胞毒性など種々有用な生物活性を示すことが報告されている。本研究ではアルザノールの生合成に関与するポリケチド合成酵素およびプレニル基転移酵素を初めて同定した。得られた各酵素はともに *Pichia pastoris* での大量発現が可能であり、重要天然物アルザノールの微生物生産に向けた基盤整備を行うことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this project, I have attempted comprehensive understanding and elucidation of the biosynthetic genes of arzanol, a meroterpenoid with a potent anti-inflammatory activity isolated from a medicinal plant *Helichrysum italicum*. I have successfully cloned genes coding for a polyketide synthase named HiPKS1 and a prenyltransferase HiPT2, which are involved in arzanol biosynthetic pathway, and characterized their structural and biochemical properties. In addition, I established the heterologous expression system of each biosynthetic enzyme to develop the biotechnological production of arzanol. Although I have not identified the enzyme catalyzing the final step to synthesize arzanol, I made a considerable progress concerning arzanol biosynthesis leading to biological production of this invaluable natural product.

研究分野：生薬学

キーワード：アルザノール カレープラント 生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カレープラント (*Helichrysum italicum*、図 1) が生産するアルザノール (arzanol) は強力な抗炎症作用をはじめ、T 細胞での HIV-1 の複製阻害およびがん細胞への細胞毒性など、種々有用な生物活性を示すことが報告されており、医薬資源として期待される化合物である。しかしながら、本化合物の効率的な全合成スキームは確立していないのが現状であり、さらにカレープラントは非常に多様な芳香族化合物を含有するため、植物から本化合物を抽出単離するには複雑な操作が必要である。このような背景から、バイオテクノロジーによるアルザノールの生産は魅力的であるが、これを実現するためには生合成メカニズムを解明し、生合成酵素をコードする遺伝子を網羅的に取得する必要がある。



図 1. カレープラント (*Helichrysum italicum*)

2. 研究の目的

本研究では、図 2 に示すアルザノール生合成経路の各ステップを触媒する生合成酵素、即ちポリケチド合成酵素 (PKS)、プレニル基転移酵素 (PT) および酸化カップリング酵素の遺伝子を初めてクローン化し、その構造機能および生化学的性質を明らかにすることを第一の目的とした。またこれを達成した後は、各遺伝子をセットとしてメチロトロフ酵母 (*Pichia pastoris*) に導入、発現することにより、アルザノールの生物生産システムを構築する計画とした。なお従来、アルザノールのようなポリケチドヘテロ二量体を基本骨格とするメロテルペノイドの生合成研究は前例がなく、本研究により植物生化学の世界で新規性の高い成果が得られることが期待された。

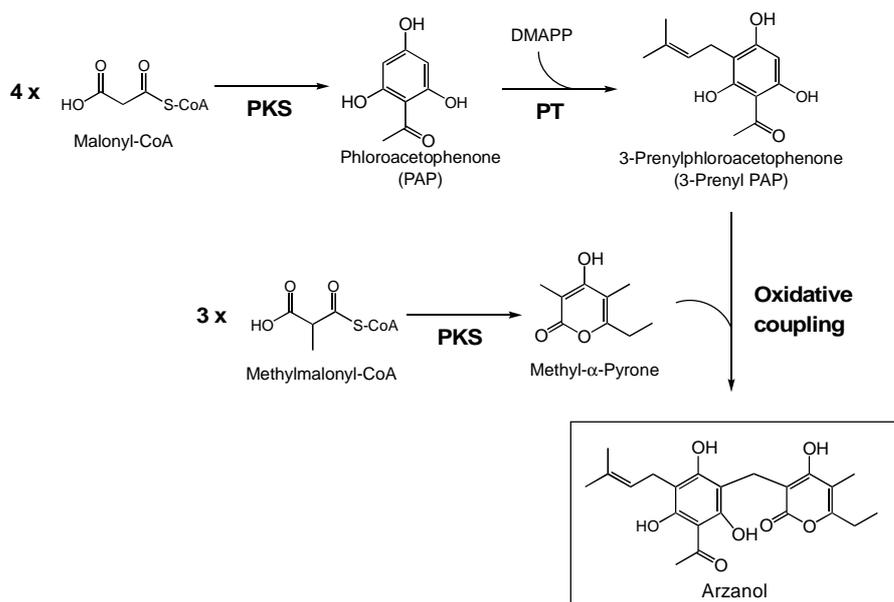


図 2. アルザノールの推定生合成経路

3. 研究の方法

カレープラント若葉のトランスクリプトーム解析:

カレープラント若葉より mRNA を抽出、精製し、イルミナ社サンプル調製キットにより、cDNA ライブラリーを調製した。次いで Genome Analyzer Iix を用いたシーケンシングによりショートリードを取得し、Trinity を用いたアセンブルを行うことで 200bp 以上の cDNA contig 216,863 種からなるトランスクリプトームデータを構築した。アルザノール生合成経路を構成する PKS、PT および酸化カップリング酵素の候補遺伝子はトランスクリプトームデータを local DNA database とする tBLASTn ホモロジーサーチにより検索した。

組み換え酵素の機能解析に基づく遺伝子同定:

ホモロジースクリーニングにより得られた各候補遺伝子は PCR 増幅の後、発現ベクターにサブクローニングした。PKS に関しては大腸菌を、また PT および酸化カップリング酵素に関しては *Pichia pastoris* を宿主として組換え酵素を調製し、各酵素活性を確認することにより目的とする生合成酵素をコードする遺伝子を同定した。

得られた各組み換え酵素に関しては基質特異性および反応速度などの基礎的な生化学的性質を詳細に分析した。以下、各酵素に関する研究成果を報告する。

4. 研究成果

PKS の遺伝子クローニングおよび組換え酵素の生化学的解析

カレープラントの各組織抽出液を HPLC 分析した結果、アルザノールは若葉で最も蓄積していることを確認した。そこで若葉由来トランスクリプトームデータのホモロジーサーチをもとに、HiPKS と称する新規 PKS をコードする cDNA をクローン化した。HiPKS は 398 アミノ酸からなり、植物 PKS においてポリケチド伸長反応に関わる触媒残基 Cys, His 及び Asn は保存されていたものの、既知植物 PKS との相同性が 60~75% と比較的ユニークな配列を有していた。HiPKS の構造的特徴を検討するため、構造機能研究が詳細に行われている *Medicago sativa* 由来カルコン合成酵素 (CHS) の結晶構造を鋳型として分子モデルを作製し、比較した結果、活性部位を構成するアミノ酸残基のうち CHS の Ser338 が HiPKS では Trp に置換しており、これにより内部ポケットの容積が大きく減少することから、本酵素は植物に普遍的に存在する CHS とは異なる触媒活性を示すものと推察した。

大腸菌で発現した組換え HiPKS について Ni Sepharose クロマトグラフィーによる精製を検討した結果、SDS-PAGE 上約 44kDa の単一バンドを示すまで本酵素を精製した。得られた精製酵素を用いて malonyl-CoA を基質とするアッセイを行った結果、本酵素は主生成物として phloroacetophenone (PAP) を合成した。また methylmalonyl-CoA を基質とするアッセイでは methyl- α -pyrone を合成したことから、HiPKS はアルザノールを構成する 2 種のポリケチドの両方を生合成する PKS と考えられた。なお PAP は古くからポリケチドの一種と推察されてきたが、これを合成する植物 PKS を明らかにしたのは初めてである。

また、アルザノールの微生物生産に向けた第一ステップとして、本研究で得られた *Pichia pastoris* HiPKS 発現株を用いたポリケチドの生産を検討した。この結果、本組換え体はメタノール含有培地での液体培養において、基質の供給なしに PAP を 1mg/L レベルで生成可能であるという驚くべき結果が得られた。以下に述べる通り、酸化カップリング酵素が得られていない現状ではあるが、本組換え *Pichia* はアルザノール関連化合物の微生物生産プラットフォームとして有用と考えられる。

PT の遺伝子クローニングおよび組換え酵素の生化学的性質

カレープラントのトランスクリプトームデータに対し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 AtVTE2-1 をクエリーとしてアルザノール生合成に関与する PT 候補遺伝子 (HiPT1~4) をスクリーニングした。これらの組換え酵素を *Pichia pastoris* において異種発現し、マイクロソーム画分を用いて酵素活性を確認した。PAP および DMAPP を基質とした酵素反応の結果、いずれの候補 PT を用いた場合でも 3-prenyl-PAP の生成が確認された。その中でも、HiPT2 は非常に高いジメチルアリル基転移活性を有しており、定量分析の結果、他の候補 PT と比較して 40 倍以上高い比活性が確認された。このことから、HiPT2 がアルザノール生合成に関与する PT であることが示唆された。

PAP を含む 12 種の芳香族化合物を用いた酵素反応の結果、芳香族基質に対する HiPT2 の厳密な基質特異性が明らかになり、また本酵素の基質認識にアセチル基が必要であることが示唆された。次いで炭素数 5~20 のプレニル基質を用いた酵素反応の結果、本酵素は DMAPP の他に GPP も受容し、3-geranyl-PAP を合成した。反応速度解析の結果、本酵素の DMAPP に対する触媒効率は GPP に対する値と比較して有意に高く、カレープラントにおいて本酵素が DMAPP を優先的に利用していることが推察された。なお、HiPT2 分子モデルに対するドッキングシミュレーションにおいて、GPP は HiPT2 の活性中心に結合可能であるが、PAP との反応点の距離が比較的遠位になることが示唆された。

予測されたトランジットペプチド領域を含む 52 アミノ酸残基と GFP の融合タンパク質の一過性発現をタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉で行った結果、融合タンパク質の大部分は葉緑体に輸送された。従って HiPT2 は主にプラスチドで機能し、MEP 経路由来のプレニル基質を利用することが示唆された。以上のように本研究ではアルザノール生合成経路で機能する HiPT2 を

同定し、その機能解析に成功した。

酸化カップリング酵素の探索

次いで、アルザノールを生成する酸化カップリング酵素の探索を検討した。本推定反応のように分子間メチレン架橋形成を触媒する酸化酵素は未知であるが、植物二次代謝において、酸化的な分子内メチレン架橋形成を触媒するベルベリン架橋酵素 (BBE) と類似した構造の酵素である可能性を想定し、カレープラント若葉のトランスクリプトームデータより、9 種の BBE ホモログをセレクトした。これらの cDNA 全長を PCR 増幅し、発現ベクター pPICZA に組み込んだ後、*Pichia pastoris* に導入した。得られた組換え体についてメタノールを含む培地で液体培養して組換え酵素の発現を誘導し、細胞抽出液および培養上清を用いたアッセイを行った。しかしながら、9 種の組換え体いずれを用いた場合も、アルザノールを生成する活性を見出すことができなかった。このことから、アルザノールの生合成には BBE 以外の酵素が関与すると推察した。また一方、アルザノールの生合成機構に関してはホルムアルデヒドを媒介とした非酵素反応による生成メカニズムも提唱されている (Appendino et al., J Nat Prod 70:608–612, 2007)。このような非酵素的メチレンカップリング反応はスイートクローバーにおけるジクマロール生成反応において進行することが知られており、アルザノール生合成が非酵素的に進行する可能性について検討が必要と考えている。

以上のように本研究ではアルザノール生合成経路を構成する HiPKS および HiPT2 遺伝子を初めて同定し、それらの生化学的性質を詳細に解明した。これらアルザノール前駆体の生合成酵素は、いずれも *Pichia* を宿主として大量発現可能であり、アルザノール生物生産に向けた技術基盤を確立することが出来たと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taura F, Tanaya R, Sirikantaramas S	4. 巻 45
2. 論文標題 Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Asia	6. 最初と最後の頁 399-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2306/scienceasia1513-1874.2019.45.399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 田浦太志, 飯島未宇	4. 巻 77
2. 論文標題 エゾムラサキツツジの抗HIV成分ダウリクロメン酸の生合成経路解明と微生物生産	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 368-372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saeki Haruna, Hara Ryota, Takahashi Hironobu, Iijima Miu, Munakata Ryosuke, Kenmoku Hiromichi, Fuku Kazuma, Sekihara Ai, Yasuno Yoko, Shinada Tetsuro, Ueda Daijiro, Nishi Tomoyuki, Sato Tsutomu, Asakawa Yoshinori, Kurosaki Fumiya, Yazaki Kazufumi, Taura Futoshi	4. 巻 178
2. 論文標題 An Aromatic Farnesyltransferase Functions in Biosynthesis of the Anti-HIV Meroterpenoid Daurichromenic Acid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 535 ~ 551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.18.00655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tanaya R, Taura F
2. 発表標題 Biochemical characterization of CsPT4, the cannabinoid-producing aromatic prenyltransferase from Cannabis sativa
3. 学会等名 TERPNET2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚谷綾介, 田浦太志
2. 発表標題 カンナビノイド前駆体を生成する芳香族プレニル転移酵素
3. 学会等名 日本生薬学会第66年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原良太, 田浦太志
2. 発表標題 エゾムラサキツツジ由来FPP synthaseに関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋花菜, 棚谷綾介, 田浦太志
2. 発表標題 カレーブランドのアルザノール生合成に関与するプレニル基転移酵素
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林望, 棚谷綾介, 田浦太志
2. 発表標題 トキワザクラ由来olivetol synthaseの機能解析および物質生産への応用
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 棚谷綾介、田浦太志
2. 発表標題 大麻プレニル転移酵素CsPT4の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taura Futoshi、Iijima Miu、Kurosaki Fumiya
2. 発表標題 Identification and characterization of daurichromenic acid synthase from <i>Rhododendron dauricum</i>
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田浦太志、飯島未宇、矢崎一史、黒崎文也
2. 発表標題 エゾムラサキツツジが生産する抗HIV天然物ダウリクロメン酸の生合成経路
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 棚谷綾介、森田洋行、黒崎文也、田浦太志
2. 発表標題 生理活性植物メロテルペノイド生合成酵素の大量発現系の確立
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田浦太志、佐伯春奈、原良太、飯島未宇、黒崎文也
2. 発表標題 ダウリクロメン酸生成経路で機能する芳香族ファルネシル転移酵素
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川竜一、黒崎文也、田浦太志、保野陽子、品田哲郎
2. 発表標題 オオケヒラゴケが生産するピベンジルカンナビノイドの生合成研究
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島未宇、黒崎 文也、田浦 太志
2. 発表標題 抗HIV天然物ダウリクロメン酸生産系の開発に向けた基礎研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棚谷綾介、黒崎文也、 田浦太志
2. 発表標題 大麻のカンナビノイド生合成に関する新規プレニル転移酵素の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田浦太志、棚谷綾介、佐伯春奈、飯島未宇、黒崎文也、高橋宏暢
2. 発表標題 植物二次代謝経路のファルネシル転移酵素
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宇都 拓洋 (Uto Takuhiro) (90469396)	長崎国際大学・薬学部・准教授 (37303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------