

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007 -2008  
 課題番号：19780084  
 研究課題名(和文) ゲノムマイニングによる新規ポリケタイド合成酵素の探索及び物質生産系の構築  
 研究課題名(英文) Identification of Novel Polyketide synthase by genome mining approach and its application for polyketide production  
 研究代表者  
 氏名(アルファベット) 鮎 信学 (FUNA NOBUTAKA)  
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
 研究者番号 70361574

研究成果の概要：ポリケタイドは天然で最も構造多様性に富む化合物群である。本研究課題の目的は、微生物及び植物のゲノム解析により見出された機能未同定の III 型ポリケタイド合成酵素 (III 型 PKS) の網羅的機能解析である。我々は、枯草菌 *Bacillus subtilis* と粘液細菌 *Myxococcus xanthus* の III 型 PKS (それぞれ BcsA と FTP) の機能解析を行った。その結果、BcsA はアルキルパイロンの合成を触媒し、FTP はアルキルレゾシノールの合成を触媒することが明らかになった。また、イネ *Oryza sativa* の ARAS1 および ARAS2 が新規なアルキルレゾシノール合成酵素であることを明らかにした。また、ウコン *Curcuma longa* L. から feruloyl-CoA に malonyl-CoA を縮合し diketide-CoA の合成を触媒する diketide-CoA synthase (DCS)、feruloyl-CoA と DCS の産物である diketide-CoA からクルクミンの合成を触媒する curcumin synthase (CURS) を見出した。以上よりウコンにおいてクルクミンは DCS 及び CURS の二つの鍵酵素により炭素骨格が生合成されていることが明らかとなった。この発見により植物はもとよりそれ以外の生物種におけるウコンの生産が可能になる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：ポリケタイド、III 型ポリケタイド合成酵素

## 1. 研究開始当初の背景

微生物や植物は、ポリケタイド、テルペノイド、アルカロイド、非リボソームペプチドなどの多種多様な二次代謝産物を生産する。二次代謝産物はその構造多様性から多様な生物活性を持つ物が多く、人類は抗生物質、抗ガン物質などの医薬品や農薬等として多大な恩恵を受けてきた。しかしながら、限ら

れた化合物資源と限られた生物活性試験のため、新規二次代謝産物の発見数は減少の一途を辿っている。

ポストゲノム時代の天然物化学研究としてゲノムマイニングは大変興味深い。ゲノムマイニングとは、ゲノム解析により見出された遺伝子を解析することで、既知化合物の生合成遺伝子の同定や、新規酵素の発見を目指す研究である。最近、種々の放線菌のゲノム

配列が明らかになっており、二次代謝物質の生合成遺伝子が次々と同定されている。興味深いことに、ほとんどのゲノム解読株において、既知化合物の数よりも未知生合成遺伝子クラスターの数の方が多く、これらは通常の培養条件発現しない、「眠っている」遺伝子であると考えられる。ゲノマイニングはこのような遺伝子の機能解析に有効であり、従来の逆遺伝学的な手法に比べ効率がよい。

## 2. 研究の目的

ゲノム解析により見出された機能未知遺伝子の解析をゲノマイニング的な手法を用いることで、既知二次代謝化合物の生合成遺伝子の同定や新規酵素の発見の効率が飛躍的に上昇する。ポリケタイドは天然で最も構造多様性に富む化合物群である。本研究課題の目的は、微生物および植物のゲノム解析により見出された機能未同定の III 型ポリケタイド合成酵素 (III 型 PKS) の網羅的機能解析である。近年のゲノムプロジェクトの進展により、50 種以上の原核及び真核微生物から新たに III 型 PKS が発見されており、微生物 III 型 PKS の多様性は増加の一途を辿っている。一方、植物のゲノム解析も急激に進展している。イネには 30 種以上の III 型 PKS 様配列が見出されており、いずれの機能も同定されていない。以上のように、ゲノム解析により見出された機能未知の III 型 PKS は、それぞれが多様なポリケタイドを合成することが予想され、遺伝子資源として非常に興味深い。これらの触媒機能の網羅的解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) III 型 PKS のクローニング・異種発現系の構築および酵素活性の検討

III 型 PKS は約 400 アミノ酸の蛋白のホモダイマーであり、大腸菌におけるクローニング、機能的発現は容易である。そこで真核生物は cDNA ライブラリー、原核生物はクロモソームをそれぞれ調製し、これらを鑄型として PCR 法により目的遺伝子を取得した。大腸菌を宿主とした pET システムを用いヒスチジンタグ融合蛋白として発現・精製し、*in vitro* 活性を検討する。スターター基質として C2 ~ C22 の炭素鎖の飽和脂肪酸 CoA エステルを、伸長鎖基質として [2-<sup>14</sup>C] malonyl-CoA を用い反応を行い、TLC およびラジオオートグラフィーにより解析した。反応の進行が見られるものについては、LC-APCIMS を用い、標品との比較により生成物の構造を決定した。本研究課題では枯草菌 *Bacillus subtilis* の III 型 PKS、BcsA およびイネ *Oryza sativa* の III 型 PKS の機能解析を中心に行った。また、ウコン *Curcuma longa* の cDNA ライブラリーからクルクミンの

生合成に關与する酵素の探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) イネ *Oryza sativa* の III 型 PKS の網羅的機能解析

イネ *Oryza sativa* のゲノムは、30 種以上の III 型ポリケタイド合成酵素様遺伝子がコードされている。我々は、これら遺伝子の網羅的な機能解析を行った。そのうちの 1 遺伝子 os07g17010 (CUS と命名) は、2 分子の 4-coumaroyl-CoA と 1 分子の malonyl-CoA からクルクミノイドを合成することが判明した。また、CUS は、ウコンの主要なクルクミノイドであるクルクミンの合成も触媒した。これまでクルクミノイドの合成を触媒する酵素の報告例は無く、本活性は非常に興味深い。本発見により、CUS を用いたクルクミンの微生物による生産などが可能になると考えられ、その応用に期待が持たれる。

イネ *Oryza sativa* はアルキルレゾルシノールと一般的に呼ばれる化合物群を生産する。植物においてアルキルレゾシノールは、病原性糸状菌等に対する防御機構のひとつとして生産される化合物である。これまでに原核微生物 *Azotobacter vinelandii*、放線菌 *Streptomyces griseus*、糸状菌 *Neurospora crassa* において III 型 PKS がその生合成酵素であることが明らかにされている。しかしながら植物においてはその生合成酵素が不明であった。

我々は、イネの III 型 PKS 様配列 os10g08620 及び os10g07040 の大腸菌組換え酵素を調製し、その触媒機能を試験したところ、いずれの酵素もアルキルレゾシノールの合成を触媒することが明らかになった。そのため、os10g08620 及び os10g07040 をそれぞれ alkylresorcylic acid synthase1 (ARAS1) 及び ARAS2 とそれぞれ命名した。微生物のアルキルレゾシノール合成酵素とは異なり、ARAS1 及び 2 はアルキルレゾシリクアシッドがその直接の生成物である点が新規である。

### (2) ウコン *Curcuma longa* におけるクルクミン生合成に關与する酵素の探索

イネ *Oryza sativa* の CUS は 2 分子の feruloyl-CoA と 1 分子の malonyl-CoA からクルクミンの合成を触媒する。我々は、この知見を基にウコン *Curcuma longa* L. から III 型 PKS 遺伝子と相同性を有する cDNA を複数種クローニングし、その機能解析を行った。

その結果、diketide CoA synthase (DCS)と命名した酵素は、feruloyl-CoAにmalonyl-CoAを縮合しdiketide-CoAの合成を触媒する新規酵素であることが判明した。また curcumin synthase (CURS)と命名した酵素は、feruloyl-CoAとDCSの産物であるdiketide-CoAからクルクミンの合成を触媒する酵素であることが判明した。イネはクルクミンを生産しないためCUSのイネにおける生理的意義は不明である。一方、ウコンはその有効成分としてクルクミンを生産し、DCS及びCURSの二つの鍵酵素により炭素骨格が生合成されていることが分かった。この発見により植物はもとよりそれ以外の生物種におけるウコンの生産が可能になる。

(3) 枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来 III 型ポリケタイド合成酵素 BcsA の過剰発現株により生産される脂溶性ポリケタイドの構造解析

枯草菌 *B. subtilis* のゲノム上の III 型 PKS、BcsA を枯草菌で過剰発現すると、組換え体はアルキルピロンを生産した。また、大腸菌組換え酵素を用いた *in vitro* 反応においても同様な結果が得られたことから BcsA はアルキルピロン合成酵素であることが明らかとなった。

(4) *Myxococcus xanthus* の CoA-independent プライミング機構

粘性細菌 *M. xanthus* において III 型 PKS は、AMP エステルを反応中間体として遊離脂肪酸を ACP 体とする Fatty acid AMP ligase (FAAL) ホモログ及びアシルキャリアープロテイン (ACP) とオペロンを形成している。そのため我々は、*M. xanthus* には脂肪酸が CoA を介さずに III 型 PKS の基質となる新規プライミング機構が存在すると考えた。*M. xanthus* の III 型 PKS、ACP、FAAL ホモログを大腸菌組換え蛋白質としての調製を行い、*in vitro* 反応を試験した。その結果、FAAL は基質となる長鎖脂肪酸を AMP エステル化し、生じた AMP エステルと ACP との間でエステル交換反応を行い脂肪酸の ACP エステルを生成することが判明した。また、この ACP エステルは III 型 PKS である FTP の基質となることが判明した。本経路の III 型 PKS のプライミング反応において CoA は関与しておらず、III 型 PKS において CoA 非依存的なプライミングが初めて発見された。

(5) I 型脂肪酸合成酵素と III 型ポリケタイド合成酵素間の新規な基質の受け渡し機構の解明

我々は以前、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* から phenolic lipid の生合成に関与する *ars* オペロン (*arsABCD*) を発見した。*ArsB* 及び *ArsC* は III 型ポリケタイド合成酵素

であり、phenolic lipid のフェノール部位合成を触媒する。今回、*ArsA* 及び *ArsD* が、phenolic lipid の脂質部位の合成を触媒する新規な I 型脂肪酸合成酵素であることが明らかとなった。*ArsA* 及び *ArsD* は malonyl-CoA から炭素鎖長 22、24、26 の脂肪酸を合成する。この反応の生成物は *ArsA* に共有結合しているが、反応に *ArsB* または *ArsC* を加えると生成物は *ArsB* または *ArsC* に受け渡されそれらの基質となる。I 型脂肪酸合成酵素から III 型ポリケタイド合成酵素への基質の受け渡しの報告例は無く、本機構を利用した新規ポリケタイドの合成などの応用が期待される。

## 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 6 件)

Nakano, C., Ozawa, H., Akanuma, G., Funa, N., and Horinouchi, S.

Biosynthesis of aliphatic polyketides by type III polyketide synthase and methyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* PMID 19465653 (2009). 査読あり

Katsuyama, Y., Kita, T., Funa, N., and Horinouchi, S. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. *J. Biol. Chem.* **284**, 11160-11170 (2009). 査読あり

Funabashi, M., Funa, N., and Horinouchi, S. Phenolic Lipids Synthesized by Type III Polyketide Synthase Confer Penicillin Resistance on *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* **283**, 13983-13991 (2008). 査読あり

Miyana, A., Funa, N., Awakawa, T., and Horinouchi, S. Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 871-876 (2008). 査読あり

Katsuyama, Y., Matsuzawa, M., Funa, N., and Horinouchi, S. *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*.

*J. Biol. Chem.* **282**, 37702-37709 (2007). 査読あり  
Funa, N., Awakawa, T., and Horinouchi, S. Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **282**, 14476-14481 (2007). 査読あり

[学会発表](計9件)

「イネ *Oryza sativa* の III 型ポリケタイド合成酵素の網羅的解析」鮎 信学、松沢 未来、勝山 陽平、堀之内 未治、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡

「枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来 III 型ポリケタイド合成酵素 BcsA の過剰発現株により生産される脂溶性ポリケタイドの構造解析」仲野 千秋、赤沼 元気、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡

「ウコン由来の III 型ポリケタイド合成酵素によるクルクミンの生合成」勝山 陽平、喜多 智子、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡

「Alkylresorcylic acid を合成するイネ由来 III 型ポリケタイド合成酵素の機能解析」松沢 未来、勝山 陽平、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡

「*Mycococcus xanthus* 由来の III 型ポリケタイド合成酵素の fatty acyl AMP ligase 依存的 priming 機構」林 貴之、北村 裕太、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月、福岡

「*Aspergillus terreus* 由来 I 型ポリケタイド合成酵素による emodin 合成」淡川 孝義、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月、名古屋

「クルクミノイド合成を司るイネ由来 III 型ポリケタイド合成酵素の発見」松沢 未来、勝山 陽平、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月、名古屋

「イネ由来のクルクミノイド合成酵素 (CUS) の機能解析」勝山 陽平、松沢 未来、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月、名古屋

「脂溶性ポリケタイド生合成における I 型脂肪酸合成酵素から III 型ポリケタイド合成酵素への基質の受け渡し」宮永 顕正、鮎 信学、堀之内 未治、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月、名古屋

[産業財産権]  
出願状況(計2件)

名称:クルクミノイド合成酵素およびクルクミン製造方法

発明者:堀之内 未治、鮎 信学

権利者:ハウス食品株式会社、堀之内 未治、鮎 信学

種類:特許権(発明)

番号:特願 2009-47032

出願年月日:2009年2月27日

国内外の別:国内

名称:イネ *Oryza sativa* 由来のタイプ III ポリケタイド合成酵素によるクルクミノイドの生産

発明者:堀之内 未治、鮎 信学

権利者:国立大学法人、東京大学

種類:特許権(発明)

番号:特開 2008-228686

出願年月日:2007年3月22日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎 信学 (FUNA NOBUTAKA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 70361574

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。