

平成 21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19780085
 研究課題名（和文）マイコバクテリアの生産する新規 C35 環状テルペノイドの探索と生合成研究
 研究課題名（英文）Search and biosynthesis of novel cyclic C35-terpenes produced by *Mycobacterium*
 研究代表者
 氏 名：佐藤 努（SATO TSUTOMU）
 所 属：新潟大学・自然科学系・准教授
 研究者番号：80334655

研究成果の概要：2つの新規環状 C35 テルペンを発見した。また、環状 C35 テルペンが直鎖状 C35 イソプレノイドの環化によって生合成されることを証明した。そのような証明が成されている天然物は他に例がない。*M. chlorophenolicum* と *M. vanbaalenii* から合計 5 種類の Z 型プレニル鎖延長酵素遺伝子を見出した。*M. vanbaalenii* 由来の 2 種類は機能解析でき、各々主に C35 と C15 を生産することが判明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

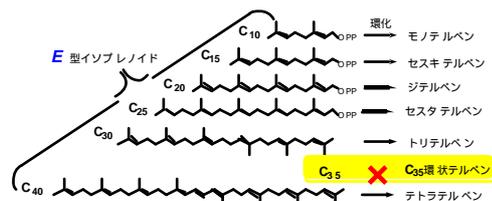
研究分野：農学

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：テルペン、イソプレノイド、テルペン環化酵素、*Mycobacterium*

1. 研究開始当初の背景

当初、*Mycobacterium* 属細菌から 1 つの新規環状 C35 テルペンを見出していた。他に C35 テルペン類は発見されておらず、また遺伝子を含めた生合成研究は殆ど成されていなかった。



当初知られていたテルペン生合成経路

2. 研究の目的

1) C35テルペンの探索を行い、新規天然物を見出す。

2) 生合成酵素の遺伝子クローニングを含めた生合成の解析を行う。

3. 研究の方法

1) GC-MS分析で新規C35テルペンを探索し、大量培養後、各種クロマトグラフィーによって単離する。NMR等によって構造決定する。

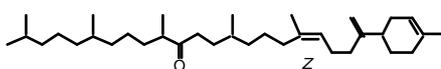
2) 直鎖状C35プレニールからニリン酸体を合成する。それを基質として *M. chlorophenolicum* の無細胞抽出液と反応させ、C35テルペンが直鎖状C35イソプレノイドの環化によって生合成されることを証明する。

3) Z型プレニール鎖延長酵素遺伝子を縮重プライマーを用いたPCRによってサブクローニングした後、ゲノムウォーキングによって周辺の上・下流の塩基配列を読み、テルペン環化酵素を始めとした他の関連生合成遺伝子を見つけ出す。

4) 見出された生合成酵素をpET系などのベクターへ導入し、発現・精製後、各種プレニールニリン酸基質と反応させることで機能解析する。

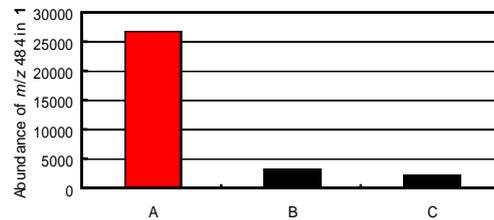
4. 研究成果

1) マイナー成分と培養定常期以降に生産されるC35テルペンを単離・構造決定した。以前見出したC35テルペンが更に代謝された構造を持つ新規化合物であった。

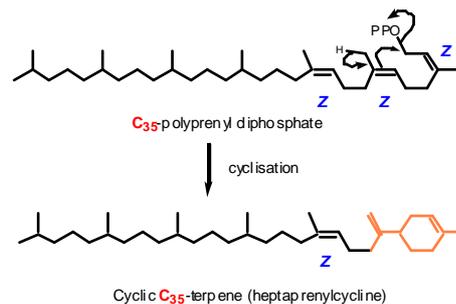


構造決定したC35テルペンの1つ

2) 直鎖状C35プレニールニリン酸を無細胞抽出液と反応させたところ、環状C35テルペンが生産された。直鎖状C35イソプレノイドの環化によって生合成されるテルペンとしては初めての例となった。

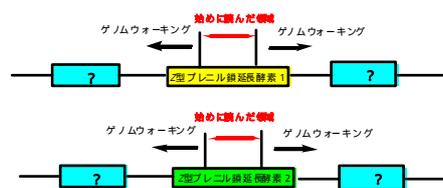


無細胞抽出液と直鎖状C35イソプレノイドの反応実験、A: C35イソプレノイドとインキュベート、B: 熱変性させた無細胞抽出液、C: 基質なし



直鎖状C35イソプレノイドの環化による生合成

3) *M. chlorophenolicum* から2種類のZ型プレニール鎖延長酵素遺伝子を見出し、ゲノムウォーキングした。しかし、上・下流からC35テルペンの生合成に関係すると考えられる遺伝子を見出すことはできなかった。また、ゲノム既知の *M. vanbaalenii* から3種類のZ型プレニール鎖延長酵素遺伝子の存在が確認された。



ゲノムウォーキングの概念図

4) *M. chlorophenolicum* 由来の Z 型プレニル基延長酵素は発現量が非常に低かったので、*M. vanbaalenii* 由来のものを機能解析した。1 つは主に C35 を生産し、1 つは主に C15 を生産し、1 つは活性を見出せなかった。

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 4 件)

- 1) Hoshino, T., Kumai, Y., Sato, T., Reviewing the polyolefin cyclization reaction of the C₃₅ polyene catalyzed by squalene-hopene cyclase. *Chem. Eur. J.* 15, 2091-2100, 2009. (査読有)
- 2) Sato, T., Kigawa, A., Takagi, R., Adachi, T. and Hoshino, T., Biosynthesis of a novel cyclic C₃₅-terpene via the cyclisation of a Z-type C₃₅-polyprenyl diphosphate obtained from a nonpathogenic *Mycobacterium* species. *Org. Biomol. Chem.*, 6, 3788-3794, 2008. (査読有)
- 3) Shinoda, K., Hasegawa, T., Sato, H., Shinozaki, M., Kuramoto, H., Takamiya, Y., Sato, T., Nikaidou, N., Watanabe, T., and Hoshino, T., Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function. *Chem. Commun.*, 4140-4142, 2007. (査読有)
- 4) Nakano, C., Motegi, A., Sato, T., Onodera, M. and Hoshino, T., Sterol biosynthesis by a prokaryote: first in vitro identification of the genes encoding squalene epoxidase and lanosterol synthase from *Methylococcus capsulatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2543-2550, 2007. (査読有)

(学会発表)(計 9 件)

- 1) 佐藤努, *Mycobacterium* 属細菌から新たに見出された 2 つの環状 C₃₅ テルペンの単離と構造決定、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、マリンメッセ福岡
- 2) 渋谷智、スクアレン合成酵素: NADPH Binding に関わるアミノ酸残基の決定、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、マリンメッセ福岡
- 3) 渡邊貴至、スクアレン環化酵素: W169 残基におけるオキシドスクアレンに対する機能解析、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、マリンメッセ福岡
- 4) 千葉彬史、ラノステロール合成酵素: C(19)-ノル-2,3-オキシドスクアレンの環化生成物、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、マリンメッセ福岡
- 5) 佐藤努、非病原性 *Mycobacterium* 属細菌から得られた新規環状 C₃₅ テルペンの Z 型 C₃₅ ポリプレニルニリン酸の環化反応による生合成、第 50 回天然有機化合物討論会、2008 年 9 月 30 日、福岡国際会議場
- 6) 佐藤努, *Mycobacterium* 属細菌の生産する環状 C₃₅ テルペンの生合成: 無細胞抽出液を用いた生合成反応の解析と遺伝子クローニング、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 29 日、名城大学
- 7) 佐藤努、植物毒素チコリン生合成酵素遺伝子の欠損変異株の取得と部分配列、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 29 日、名城大学
- 8) 橋本一平、イネ(*Oryza sativa*)由来のバルケオール合成酵素、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 29 日、名城大学
- 9) 大山拓朗、スクアレン環化酵素を用いた Hongoquercin A, B の基本骨格の合成、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 29 日、名城大学

〔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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 努 (SATO TSUTOMU)

所属 新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：80334655