

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510225

研究課題名（和文） 生合成の人為的制御による新規天然物の創出

研究課題名（英文） PRODUCTION OF NEW NATURAL PRODUCTS BY BIOSYNTHETIC ENGINEERING

研究代表者

渋谷 雅明 (SHIBUYA MASAOKI)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50170923

研究成果の概要（和文）：

トリテルペンの骨格は、鎖状分子オキシドスクアレンが閉環して生成する。多くのトリテルペン合成酵素が四環性、あるいは五環性の構造の生成物を与えるに対し、本研究で対象としたマーネラル合成酵素とアキレオール合成酵素の両酵素はともに一環性の生成物を与える。これらの酵素をジオキシドスクアレンが蓄積した酵母で発現させ、両端から環を巻いた新規化合物を得ることを試みたところ、アキレオール合成酵素を発現させた系で目的化合物と推定される化合物が TLC で検出された。

研究成果の概要（英文）：

Skeleton of triterpene is formed from oxidosqualene by triterpene synthase. Many triterpene synthases give tetra- or penta-cyclic products, while marneral synthase and achilleol synthase give a mono-cyclic product. In this study, these two enzymes were expressed in the yeast where di-oxidosqualene was accumulated to obtain a new natural triterpene with two separate rings which was produced by cyclization of di-oxidosqualene from both ends. TLC analysis showed that the target compound was produced by the transformed yeast with squalene epoxidase and achilleol synthase genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生合成、人為的制御、トリテルペン合成酵素、ジオキシドスクアレン、アキレオール、マーネラル

## 1. 研究開始当初の背景

天然物有機化合物（以下、天然物）は、構造多様性を有し、様々な分野で有用性が大きい。薬学において天然物は医薬品のシーズとして極めて重要である。先人たちはこれまで

多種の天然物を発見し、医薬品開発へ大きな貢献を果たしてきた。引き続き私たちは、ガンなどの難治疾患を解決するため、また、生活習慣病などの新たな疾患の治療のために新規天然物の探索を継続する必要がある。し

かし、新規天然物の発見は材料への依存度が高く、地球の資源は有限であるため、従来の手法では、天然物にどんなに構造多様性があるとしても将来にわたっての継続的な新規天然物の発見は難しい。このような閉塞的状況を打開するには、何らかの手法で天然物の構造多様性を拡大する必要がある。

天然物は生物の中で酵素反応により生合成される。近年の分子生物学の進歩により、「遺伝子を異種生物で発現させてタンパク質を得ること、遺伝子に変異を導入して、改変タンパク質を得ること」が可能になった。これらの手法を天然物研究に応用すれば、(1)特定の酵素を大量に得て、特定の天然物を酵素合成すること(2)異種発現系を天然物の大量生産系に利用すること(3)酵素機能を変えて新しい天然物を創りだすこと(4)複数の生合成酵素を組み合わせることで非天然型生合成系を再構築し、新規天然物を創りだすこと(5)機能未知の酵素遺伝子を発現させて新しい天然物を作り出すことなどが可能となる。すなわち、これらの手法により「生合成の人為的制御による天然物の構造多様性の拡大」が可能となる。

本研究ではトリテルペンを対象化合物とした。トリテルペンは、主に植物に分布し、タラキサステロールの抗発ガン活性、ベツリン酸の抗 HIV 活性、ジンセノサイド Rg3 の抗腫瘍活性など様々な生物活性をもち、医薬品のシーズとして魅力的な化合物群である。

天然のトリテルペンの構造多様性は、骨格構造による多様性、酸素官能基導入により生じる多様性、糖付加による多様性の3要素から構成され、これまで単離されてきた数以上にその潜在的構造多様性は膨大である。本研究においては、改変酵素の作成、シュード遺伝子として存在する生合成酵素遺伝子の完全型への改変、生合成酵素の非天然型組み合わせによる非天然型トリテルペンの創出などによりトリテルペンの構造多様性の人為的拡大を図ることを当初の目的とした。

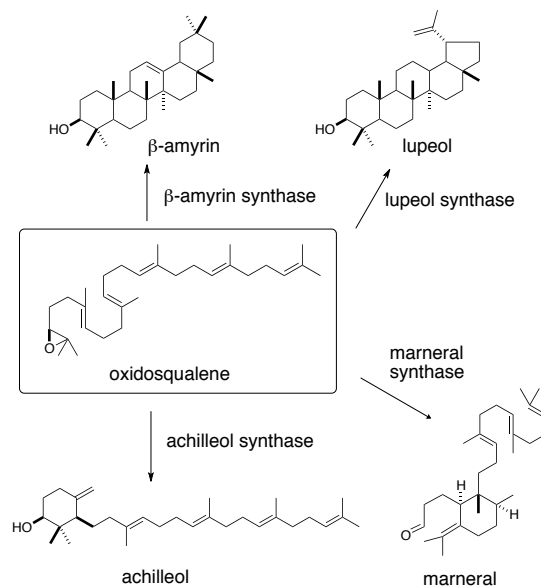
## 2. 研究の目的

本成果報告書においては、当初の目的のうち重点的に行った「生合成酵素の非天然型組み合わせによる非天然型トリテルペンの創出」について報告する。

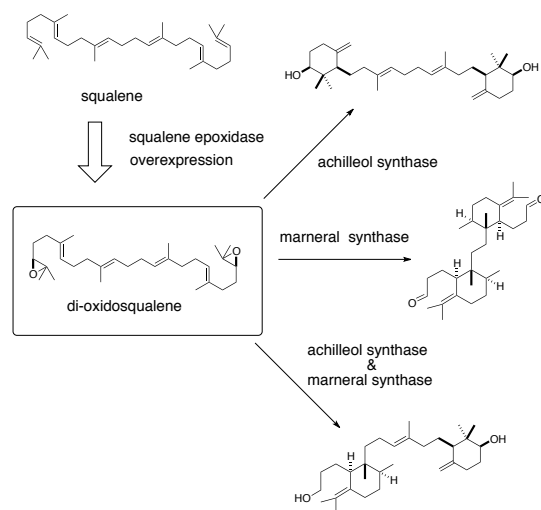
トリテルペンの骨格は、鎖状分子オキシドスクアレンが閉環して生成する。この反応を触媒する酵素は、共通の基質の名称に基づきオキシドスクアレン閉環酵素、生成物の総称に基づきトリテルペン合成酵素、あるいは特定の生成物の構造に基づきβ-アミリン合成酵素などと呼ばれている。天然に存在するトリテルペンは大部分がオレアナン骨格を有しており、この骨格はβ-アミリン合成酵素により作り出されている。このβ-アミリン

合成酵素は、1998年に本申請者により世界で初めてオタネニンジンからクローニングされた。その後、本申請者を含め複数の研究グループにより30種を超えるトリテルペン合成酵素がクローニングされている。

本研究では、それらトリテルペン合成酵素の中で、マーネラル合成酵素とアキレオール合成酵素に着目した。多くのトリテルペン合成酵素が四環性、あるいは五環性の構造の生成物を与えるに対し、本研究で対象とした両酵素はともに一環性の生成物を与える。



オキシドスクアレンは一方の末端にエポキシ基を有しており、このエポキシ基にプロトネーションすることにより酵素反応が開始される。植物の細胞内での反応では、これらの酵素の基質はオキシドスクアレンであり、生成物は一方の末端から環を巻いたものである。しかし、もしマーネラル合成酵素、あるいはアキレオール合成酵素がジオキシドスクアレンと反応し、両端から環を巻いたならば、新規天然物を作り出すことができる。



現在まで、ジオキシドスクアレンが植物の細胞内に存在することは報告されていないが、オキシステロールの生合成に見られるように動物の細胞内には、その存在が知られている。また、ラノステロール合成酵素欠損酵母株に、ジオキシドスクアレンが蓄積することが知られている。スクアレンエポキシダーゼをさらに過剰発現させれば、ジオキシドスクアレンの蓄積量が増大するはずである。そこで、スクアレンエポキシダーゼを過剰発現させたラノステロール合成酵素欠損酵母株で、マーネラル合成酵素、及びアキレオール合成酵素を発現させ、新規天然物創出を試みることにした。また、マーネラル合成酵素とアキレオール合成酵素を共発現させることにより2種の異なる環をもつトリテルペンの創出をも目指した。

### 3. 研究の方法

アキレオール合成酵素、及びマーネラル合成酵素は、それぞれセイヨウタンポポ (*Taraxacum officinale*)、及びシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のものを用いた。これらの酵素の遺伝子は既にクローニングされており、酵母発現ベクター pYES2 に組み込まれている。pYES2 を用いた発現系では発現できる外来遺伝子は1種に限定されるので、本研究では2種の外来遺伝子を発現させることができる酵母発現ベクター pESC-URA を用いることにした。また、スクアレンエポキシダーゼはデータベースの配列をもとに酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) よりクローニングすることにした。

まず、スクアレンエポキシダーゼを pESC-URA に組み込み、pESC-EPOX を構築する。次に、pESC-EPOX にアキレオール合成酵素、及びマーネラル合成酵素の遺伝子を組み込む。また、これらとは独立に、アキレオール合成酵素とマーネラル合成酵素を pESC-URA に組み込む。

得られたプラスミドを、ラノステロール合成酵素欠損酵母株 GIL7 に組み込む。形質転換酵母を培養し、導入した遺伝子を発現させ、酵母細胞から生成物を抽出して生成物を単離、構造決定する。

### 4. 研究成果

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来スクアレンエポキシダーゼを PCR によりクローニングし、pESC-URA に組み込み pESC-EPOX を構築した。得られた pESC-EPOX の塩基配列を決定し、PCR による配列の誤りが生じていないことを確認した。

pYES2 に組み込まれたアキレオール合成酵素 (TRA)、及びマーネラル合成酵素遺伝子 (MFO) を鋳型に PCR を行い制限酵素サイト

を導入し、PCR 生成物を上記 pESC-EPOX に組み込んだ。得られたプラスミドの塩基配列を決定し、PCR による配列の誤りが生じていないことを確認し、それぞれ、pESC-EPOX-TRA、pESC-EPOX-MFO と命名した。同様に、TRA と MFO を pESC に組み込み、得られたプラスミドの塩基配列を決定し、PCR による配列の誤りが生じていないことを確認し pESC-MFO-TRA と命名した。

得られたプラスミドを用いてラノステロール合成酵素欠損酵母変異株 GIL77 を形質転換した。形質転換酵母を培養し、蓄積物をそれぞれ TLC で解析した。

pESC-EPOX-MFO、及び pESC-MFO-TRA で形質転換した酵母からの抽出物には、negative control と比較して顕著なスポットは検出できなかったが、pESC-EPOX-TRA で形質転換したものに、目的の化合物と思われるコントロールには見られない高極性のスポットを検出した。形質転換酵母を大量 (4L) に培養して生成物の単離を試みたが、純度の高いものを得ることが出来ず、構造決定に至っていないが、二環の化合物は一環の化合物より高極性になり、このスポットに対応する化合物は目的の二環の化合物である可能性が極めて高い。現在、培養法の検討を行っているところである。

いずれの形質転換酵母においても、目的の生成物が検出できないか、検出できても生成量は極めて少なかった。原因の一つとして、形質転換酵母細胞内に本来の基質であるオキシドスクアレンも蓄積しているため、本来の基質との反応が優先的に進行し一環の生成物のみが生成し、目的の化合物の生成が進行しなかったことが考えられる。スクアレンエポキシダーゼとトリテルペン合成酵素を同時に発現させるのではなく、スクアレンエポキシダーゼを先行して過剰発現させ、ジオキシドスクアレンが蓄積した状態で、トリテルペン合成酵素を発現させる等の改良が必要であると思われる。

### 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4件)

(1) Miki Kimura, Tetsuo Kushiro, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka and Ikuro Abe, Protostadienol Synthase from *Aspergillus fumigatus*: Functional Conversion into Lanosterol Synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 899-902 (2010).

(2) Junichi Shinozaki, Masaaki Shibuya, Yukiko Takahata, Kazuo Masuda and Yutaka Ebizuka, Molecular Evolution of Fern

Squalene Cyclases, *ChemBioChem*, **11**, 426-433 (2010).

(3) Masaaki Shibuya, Kazuya Nishimura, Nao Yasuyama and Yutaka Ebizuka, Identification and Characterization of Glycosyltransferases Involved in the Biosynthesis of Soyasaponin I in *Glycine max*, *FEBS Letters*, **584**, 2258-2264 (2010).

(4) Noriaki Fukuyama, Masaaki Shibuya and Yutaka Orihara, “Antimicrobial Polyacetylenes from *Panax ginseng* Hairy Root Culture”, *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 377-380 (2012).

〔学会発表〕(計3件)

(1) 渋谷雅明「トリテルペンの生合成研究」平成22年度日本生化学会関東支部例会、第55回新潟生化学懇話会合同研究集会、2010.5.28(長岡、新潟)

(2) 篠崎淳一、松崎勝大、中村健文、増田和夫、海老塚豊、渋谷雅明：トリテルペン合成酵素による環状セスタテルペンの合成、日本薬学会第132年会(札幌)、2012.3.29

(3) 渋谷雅明：“Biosynthesis of triterpene in higher plants” 第6回食と健康に関する新潟国際シンポジウム(新潟) 2012.10.16

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nupals.ac.jp/~pharmacog0711/Shoyaku/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渋谷 雅明 (SHIBUYA MASA AKI)

研究者番号：50170923