

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24年 5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780104

研究課題名（和文） 抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸の生合成研究と応用

研究課題名（英文） Biosynthetic study and its application of daurichromenic acid, an anti-HIV natural product

研究代表者

田浦 太志（TAURA FUTOSHI）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：00301341

研究成果の概要（和文）：本研究では RT-PCR により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に関与するポリケタイド合成酵素および酸化閉環酵素の遺伝子をクローニングし、大腸菌および酵母で発現した組み換え酵素のキャラクタリゼーションを行うことによりこれら酵素の構造及び機能を解明した。さらにダウリクロメン酸生合成経路のプレニル基（ファルネシル基）転位酵素の遺伝子クローニングを検討した結果、EST 解析を基盤とするスクリーニングによりプロトヘムファルネシル転移酵素のホモログを含め数種の候補遺伝子を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I cloned genes encoding polyketide synthase and oxidocyclase that are involved in the biosynthetic pathway of daurichromenic acid, an anti-HIV component in *Rhododendron dauricum*, by means of RT-PCR, and characterized bacterially expressed recombinant polyketide synthase and oxidocyclase to clarify the structural and functional properties in detail. In addition, I attempted to obtain a gene for the prenyltransferase (farnesyltransferase) that synthesizes the carbon skeleton of daurichromenic acid by EST analysis, resulting in cloning of several candidate genes for the prenyltransferase. Interestingly, one of these putative prenyltransferases showed sequence similarity with a farnesyltransferase (protoheme farnesyltransferase).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産科学・生物有機化学

キーワード：生合成

1. 研究開始当初の背景

エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*) が生産するダウリクロメン酸

(daurichromenic acid) は抗アレルギー作用などの他、強力な抗 HIV 活性 (H9 細胞感染時 EC50 5.67ng/ml) を示すことが証明され

ている (Kashiwada et al, *Tetrahedron* **57**, 1559-1563, 2001)。このため、ダウリクロメン酸は医薬リード化合物として注目されてきたが、実用的な不斉合成法は報告されておらず、また、エゾムラサキツツジは本化合物と類似した化合物を多数含有するため、これを植物から単離することも困難である。従って、生合成酵素を用いたダウリクロメン酸の新規生物生産システムを確立することは、本化合物の基礎及び応用研究を推進する上で重要な課題であり、これに取り組むためにはダウリクロメン酸生合成経路の酵素遺伝子を網羅的にクローニングすることが必須の課題と考えられた。

ダウリクロメン酸の生合成研究は報告されていないが、研究代表者はダウリクロメン酸の分子構造を考慮し、①まず初めにポリケタイド合成酵素により **resorcyclic acid** の一種であるオルセリン酸 (**orsellinic acid**) が生成し、②次いでプレニル転移酵素によりファルネシル基が転位してグリフォリン酸 (**grifolic acid**) が合成され、③最後に、酸化閉環酵素がファルネシル基を酸化的に閉環してダウリクロメン酸が生合成されるという、3種の生合成酵素が関与する経路を推定した。なお興味深いことに、本経路は大麻 (*Cannabis sativa*) の活性成分カンナビノイドの生合成経路と類似しており、各反応ステップは分子進化上関連した酵素により触媒される可能性が考えられる。

カンナビノイドの生合成研究は研究代表者および欧米の数グループにより検討されており、カンナビノイド生合成経路のポリケタイド合成酵素、プレニル転移酵素および酸化閉環酵素が、各々カルコン合成酵素ファミリー、ubiA プレニル転移酵素ファミリー及び FAD 依存型オキシダーゼファミリーに属する酵素であることが明らかとなっている。

これら酵素ファミリーの既知酵素は種を超えて高い相同性を示すことから、ダウリクロメン酸生合成経路の各酵素についても、ホモロジーベースの手法により網羅的にクローニングすることが可能であると考えられた。そこで本研究では酵素ファミリーのホモロジーを利用した RT-PCR あるいは Expressed Sequence Tag (EST) 解析により各酵素遺伝子をスクリーニングすることから研究を開始することとした。

2. 研究の目的

本研究では RT-PCR 法およびエゾムラサキツツジの EST 解析を基盤として、ダウリクロメン酸の生合成に関与する三種の酵素、即ちポリケタイド合成酵素、プレニル転移酵素および酸化閉環酵素をコードする遺伝子をすべてクローニングすることを第一の目的とした。各酵素は既知酵素とホモロジーを持

つものと同様に予想したが、触媒する反応が既知酵素と異なるものであるため、それぞれについて組み換え酵素を発現し、基質特異性や活性部位の構造機能など生化学的性質を詳細に解明することを計画した。

またクローン化した各酵素遺伝子をセットとして酵母細胞などで大量発現させる事により、新たなダウリクロメン酸生物生産システムを開発することも当初の研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) RT-PCR による候補遺伝子のクローニング

ダウリクロメン酸は若葉で最も生産されているため、若葉より mRNA を抽出し、逆転写により鋳型 cDNA を調製した。次いで既知の植物ポリケタイド合成酵素、プレニル転移酵素および酸化閉環酵素の保存配列を基に設計したプライマーを用いて PCR を行い、部分長 cDNA 断片を得た。更に、各々の遺伝子について 5'RACE 及び 3'RACE を行うことで、全塩基配列を明らかにした。

(2) EST データ解析による候補遺伝子のクローニング

若葉由来の mRNA から mRNASeq システム (イルミナ社) の定める方法に従い、増幅および断片化した cDNA ライブラリーを作製した。得られたサンプルについてイルミナ社ゲノムアナライザーを用いたショットガンシーケンセスを行い、配列断片を得た。本データにつき、各種のソフトウェアを用いたアセンブルを行い、数万単位のコンティグを含む EST データを作成した。このようにして得られたデータベースに関し、カンナビノイド生合成経路の酵素をはじめとする、既知酵素を query とする BLAST 検索を行うことで、候補遺伝子の絞り込みを行った。

(3) ポリケタイド合成酵素の大腸菌での発現および機能解析

(1) の検討で得られたポリケタイド合成酵素遺伝子 2 種について発現ベクター pET24a に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) を宿主として組み換え酵素を発現し、金属キレートカラムにより精製した。得られた組み換え酵素について、オルセリン酸前駆体と推察される acetyl-CoA および malonyl-CoA をはじめ、各種 acyl-CoA を基質とするアッセイを行い、生成物を HPLC 分析することにより酵素機能を検討した。

(4) 酸化閉環酵素の酵母での発現および機能解析

(1) の検討で得られた酸化閉環酵素の候補遺伝子 3 種について発現ベクター pPICZ に組み込み、メチロトロフ酵母 X-33 を宿主として組み換え酵素を発現した。組み換え体より得られた菌体抽出液および培養上清について、グリフォリン酸を基質とするアッセイを

行い、生成物を HPLC 分析することにより、ダウリクロメン酸の合成活性を検討した。

(5) 酸化閉環酵素の酵母での発現および機能解析

(2) の EST 解析で得られたプレニル転移酵素の候補遺伝子について発現ベクター pPICZ に組み込み、メチロトロフ酵母 X-33 を宿主として組み換え酵素の発現系を確立した。

4. 研究成果

本研究ではエゾムラサキツツジが生産する抗 HIV 成分ダウリクロメン酸の生合成酵素遺伝子の網羅的解明、即ちポリケタイド合成酵素、プレニル転移酵素及び酸化閉環酵素の遺伝子クローニングを目的として各種検討を行い、以下の成果を得た。

(1) ポリケタイド合成酵素の遺伝子クローニングと機能解析

各種植物ポリケタイド合成酵素に保存されたアミノ酸配列を基にプライマーを合成して RT-PCR を行い、次いで RACE 法による遺伝子 5' 及び 3' 末端部の増幅を行う事により、PKS1 および PKS2 と称する 2 種のポリケタイド合成酵素の cDNA をクローニングした。これらのうち PKS2 は植物に普遍的に存在するカルコン合成酵素と 90% 以上のアミノ酸が一致する高いホモロジーを示したものの、興味深いことに PKS1 とカルコン合成酵素のホモロジーは 60% 以下と比較的低く、また活性部位近傍のアミノ酸に数種の変異が確認されたことから PKS1 はカルコン合成酵素から進化した新規酵素である可能性が考えられた。

そこでこれらの機能解析を行うため、PKS 遺伝子を pET24a にサブクローニングし、大腸菌で組み換え酵素を発現して His bind resin カラムで電気泳動上単一に精製した。得られた組み換え酵素について、先ずカルコン合成酵素の基質である *p*-coumaroyl-CoA および malonyl-CoA を基質とするアッセイを行ったところ、PKS2 はカルコンを合成したことから、本酵素がカルコン合成酵素であることが明確となったが、一方 PKS1 は *p*-coumaroyl-CoA を開始基質として生成物を与えないことが判明した。

次にオルセリン酸の生合成基質と推定される acetyl-CoA および malonyl-CoA を基質として酵素活性を検討したところ、PKS1 は derailment product と考えられる triketide および tetraketide pyrone とともに、オルセリン酸とその脱炭酸体であるオルシノールを合成することが確認された。オルセリン酸の生成が確認されたことから、PKS1 はダウリクロメン酸の生合成に関与するポリケタイド合成酵素である可能性が示唆されたが、酵素反応の速度論的解析を行った結果、オルセリン酸合成反応 ($k_{cat}:1.01/\text{min}$) に比し

てオルシノール合成反応 ($k_{cat}:21.8/\text{min}$) の方で明らかに反応効率が高いことが確認された。このことから、酵素反応中に生成したオルセリン酸の脱炭酸により、オルシノールが生成している可能性が考えられたが、オルセリン酸とオルシノールの生成比率は反応時間によらず一定であったことから、両化合物は独立的に合成されていることが示唆された。本酵素がダウリクロメン酸前駆体のオルセリン酸でなくオルシノールを主生成物として合成した原因についてさらに精査する必要があると考えている。

(2) 酸化閉環酵素の遺伝子クローニングと機能解析

酸化閉環酵素に関しても同様に、FAD 依存型オキシダーゼに属する既知酵素の保存配列を基にした重複プライマーによる PCR 及び RACE 法を組み合わせて検討することで oxidocyclase 1~3 (OC1~3) と仮称する 3 種の候補遺伝子を得た。OC1~3 はいずれもカンナビノイド合成酵素など FAD 依存型オキシダーゼと 40% 程度のアミノ酸が一致し、またこれらに特徴的な FAD 結合モチーフ、さらにシグナルペプチドと推察される N 末端配列を含んでいた。

OC1~3 の機能を明らかにするため、これらの遺伝子を発現ベクター pPICZ にサブクローニングしてメチロトロフ酵母 X-33 に導入し、メタノール添加条件で培養することにより、組み換え酵素の発現を誘導した。

誘導後の菌体抽出液および培養上清について、ダウリクロメン酸の前駆物質であるグリフォリン酸を基質としてインキュベートし、反応生成物を HPLC 分析した結果、OC1 及び OC2 の培養上清に、グリフォリン酸のフェルネシル基を酸化閉環してダウリクロメン酸を合成する酵素活性の存在が確認された。これにより、OC1 および OC2 はダウリクロメン酸を合成する酸化閉環酵素であることが確認できた。即ち、研究開始当初の予想通りカンナビノイド合成酵素に類似した FAD 依存型オキシダーゼがダウリクロメン酸の生合成に関与することを証明することができた。一方、OC3 に関しては前者 2 種の酵素とアミノ酸が 85% 以上一致するにもかかわらずダウリクロメン酸の合成活性を示さなかった。このことから、本酵素に関しては、酵素活性に必須なアミノ酸残基に変異を生じているものと推察された。

(3) プレニル転移酵素の遺伝子クローニング

近年の研究から、微生物や植物に存在する所謂 ubiA ファミリーに属するプレニル転移酵素のホモログが植物二次代謝産物の生合成に関与することが報告されている。そこで本研究では初めに、既知のプレニル転移酵素に保存された配列を基に RT-PCR によるプレニル転移酵素の候補遺伝子のクローニング

を検討したが、適切と考えられるクローンを得るには至らなかった。そこで次に、エゾムラサキツツジのEST解析を基盤としてプレニル転移酵素をコードする遺伝子の探索を検討した。即ち、エゾムラサキツツジ新鮮葉からRNAを抽出し、断片化cDNAライブラリーを調製した後、次世代シーケンサーによりショットガンシーケンスを行った。得られた短鎖配列について各種ソフトウェアを用いたアセンブルを行うことで数万単位のコンテグを含むESTデータを構築し、既知植物プレニル転移酵素を要求配列とするBLAST検索により候補遺伝子を抽出した。この結果、二次代謝経路のプレニル転移酵素を含め各種の既知酵素と相同性を持つ候補遺伝子の配列を8種決定することができた。

なおダウリクロメン酸生合成経路のプレニル転移酵素はファルネシル基を転移するが、興味深いことに得られた配列のうち一種はprotoheme farnesyltransferaseと類似した配列を有していた。以上の操作により得たプレニル転移酵素遺伝子については現在メチロトロフ酵母を宿主とする発現系の確立を検討中であり、組み換え酵素の機能解析によりダウリクロメン酸の生合成に関与するプレニル転移酵素を確定できるものと考えている。

以上のように本研究ではダウリクロメン酸の生合成に関与するポリケタイド合成酵素および酸化閉環酵素の遺伝子クローニングに成功し、プレニル転移酵素の候補遺伝子を得ることができた。これらの成果は今後生合成酵素によるダウリクロメン酸生産システムを構築する上で重要なステップであると考えている。

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1件)

① Taura F., Hashimoto T., Asakawa Y. Molecular characterization of daurichromenic acid synthase from *Rhododendron dauricum*. *Planta medica*, 査読無, **77**, 2011, 1359-1359

[学会発表] (計3件)

① Taura F., Hashimoto T., Asakawa Y. Molecular characterization of daurichromenic acid synthase from *Rhododendron dauricum*, 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 平成23年9月5日、アンタルヤ (トルコ共和国)

② Taura F., Hashimoto T., Asakawa Y. Daurichromenic acid synthase from *Rhododendron dauricum* 第5回日中韓生薬学合同シンポジウム、平成22年9月24日、徳島市

③ Taura F. Alkylresorcinol-producing polyketide synthases from medicinal plants, BIT's Inaugural Symposium on Enzymes and Biocatalysis-2010, 平成22年4月23日、上海 (中華人民共和国)

[その他]

ホームページ等

<http://seigyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田浦 太志 (TAURA FUTOSHI)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：00301341