

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19212

研究課題名(和文)担子菌に封印されたセスキテルペン合成酵素：逆進化でひもとく真機能

研究課題名(英文)Evolutionary engineering of sesquiterpene synthases from basidiomycetous fungi

研究代表者

一瀬 博文 (Ichinose, Hirofumi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00432948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「生物は不都合な酵素活性を封印しながら進化した」という仮説に基づき、現存する担子菌において活性を失ったセスキテルペン合成酵素(STS)の機能を復元することで新奇天然物の合成を試みた。各種担子菌に由来する不活性なSTS遺伝子を対象に、ゲノム配列から推定されるSTSのcDNAを人為的に調製することでSTS機能を発現させることに成功した。また、酵素活性を示さないSTSどうしの遺伝子を人為的に置換したキメラ酵素を作出したところ、強い酵素活性を発現して新規なセスキテルペンを産生することが示された。本研究で得られた化合物およびその誘導体が担子菌の生物機能に重要な役割を果たすことも考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、担子菌の進化過程で活性を喪失したと考えられるセスキテルペン合成酵素に焦点をあて、その活性を復元することで新規化合物が獲得可能となることを示した。担子菌類には非常に多くのSTS遺伝子が見出される一方で、これらの中には酵素活性を示さない分子種も多く存在する。本研究は、不活性なSTSを人為的に改変することでユニークなセスキテルペン合成活性が発現することを明らかにした例であり、本研究を基軸として様々なセスキテルペンの合成が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on our original hypothesis that organisms evolved by quenching detrimental enzyme activities, we performed to synthesize novel natural products by introducing genetic engineering into basidiomycetous sesquiterpene synthases (STSs). A series of sesquiterpene compounds was produced when putative cDNAs of STSs, whose transcription were not confirmed in nature, was prepared from genomic DNA and applied for heterologous expression in yeast. In addition, chimerization of STS genes, that could not show enzymatic activity as native form, resulted in emerging active STSs that produced novel sesquiterpenes. The compounds and their derivatives obtained in this study may play important roles in the biological functions of basidiomycetes.

研究分野：林産学・生物工学

キーワード：セスキテルペン合成酵素 担子菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セスキテルペノイドは各種生物が産生する天然物である。その化学構造は天然物群の中でも著しく高く、優れた生物活性を持つセスキテルペノイドも数多く知られている。その生合成過程において鍵を握るセスキテルペン合成酵素 (STS) は、極めて多様なセスキテルペン骨格分子を与える点でユニークである。すなわち、各々生物は STS 機能を進化・多様化させることで、様々なセスキテルペノイドの産生を可能にしている。微生物の中でも、担子菌においては数多くの STS 遺伝子がゲノムに見出され、その機能も著しく多様化していると考えられる。一方で、(i) ゲノムから転写されない、(ii) 転写されても正しく翻訳されない、(iii) 翻訳されても酵素活性を示さない担子菌 STS が多く存在することも示唆されている<sup>(1-3)</sup>。

担子菌が有する不活性な STS は、進化の過程で偶発的に機能を失ったのかだろうか。あるいは、その機能は担子菌によって合目的に不活性化されたのだろうか。ひとつの仮説として、セスキテルペノイドが様々な生物活性 (細胞毒性など) を示すことに着眼すれば、進化の過程で誤算的に生じた (有毒になってしまった) STS は、担子菌の生存戦略において必然的に退化・不活性化されたという仮説も導きだせる。本仮説に従えば、退化してガラクタとなった STS に逆進化を施せば酵素活性も復元し、時には既存の天然物を凌ぐ超強生物活性分子を与えるとも期待できる。

### 2. 研究の目的

担子菌には進化過程で機能を喪失した STS が数多く存在する。いわゆる“偽遺伝子”の機能が偶然発見された報告はあるものの、その機能を積極的に追求・利用しようとする動向は見当たらない。このような中で、「生物は不都合になった酵素活性を封印しながら進化した」という独自の仮説に基づき、現存する担子菌において活性を失ったセスキテルペン合成酵素の機能を復元することで新奇天然物の獲得を目指した。具体的には、木材腐朽担子菌に由来する STS を標的とし、(i) ゲノムから転写されない、(ii) 転写されても正しく翻訳されない、(iii) 翻訳されても酵素活性を示さない STS 群を遺伝子工学的に改変して酵素機能の人為的発現を試みた。本研究では「淘汰された = 使えない機能」という固定観念にとらわれることなく、ガラクタ遺伝子から珍奇な酵素機能が生み出されることを実証する。本挑戦が成功すれば、担子菌の STS を好例として「使えないはずの酵素が逆進化によって有用酵素に変貌する」という新たな研究概念が誕生する。

### 3. 研究の方法

我々は、8 種類の担子菌 (*Postia placenta*<sup>(1)</sup>, *Phanerochaete chrysosporium*<sup>(2)</sup>, *Agaricus bisporus*<sup>(3)</sup>, *Auriscalpium vulgare*<sup>(3)</sup>, *Lepista nuda*<sup>(3)</sup>, *Pleurotus ostreatus*<sup>(3)</sup>, *Trametes versicolor*<sup>(3)</sup>, *Resinicium bicolor*) に由来する STS の機能解明を進めてきた。本研究では、先行研究において見出された STS のうち、(i) ゲノムから転写されない、(ii) 転写されても正しく翻訳されない、(iii) 翻訳されても酵素活性を示さない STS を対象として酵素活性の復元を試みた。

(1) 先行研究において転写が確認されていない STS 遺伝子を対象に、ゲノム配列から予想されるイントロン/エクソン領域を決定し、PCR で増幅した DNA フラグメントからイントロン領域を除去することで STS の cDNA を調製した。cDNA を酵母発現プラスミドに連結し、*Saccharomyces cerevisiae* に形質転換した。形質転換体を人工培地中で生育させ、培養フラスコの気相および培養液中に蓄積した代謝物を固相抽出によって捕集し、GC-MS 分析に供することで STS が与える化合物を追跡した。また、単離可能な生成物においては各種クロマトグラフィーを通じて精製し、NMR 分析に供して化学構造を決定した。

(2) 不完全なスプライシングによって転写産物がフレームシフトを起こす STS を対象に、RT-PCR で得られた遺伝子断片に残存するイントロン領域を PCR によって欠失させ、STS タンパク質をコードする cDNA に変換した。STS の酵素活性は上記に準じて追跡した。

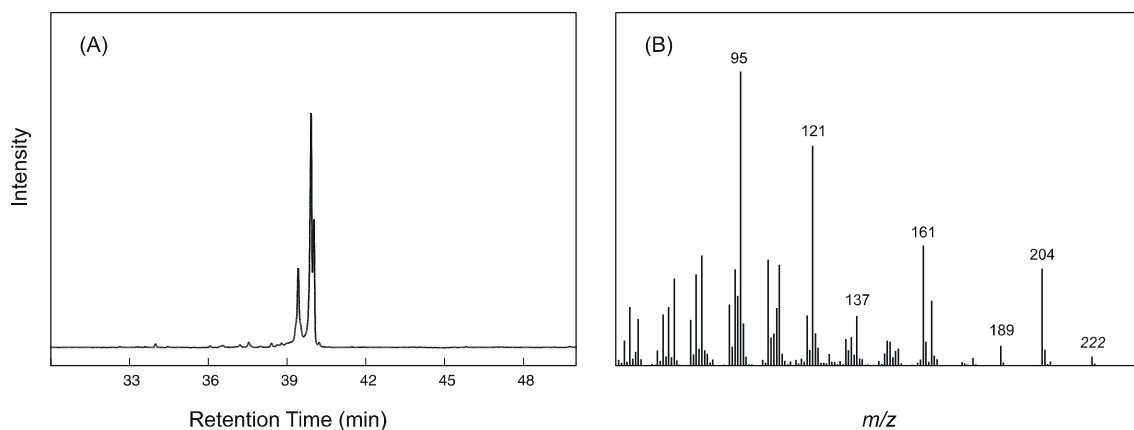
(3) 先行研究において獲得した STS 遺伝子のうち、翻訳領域を保持しているにもかかわらず、*S. cerevisiae* を利用した異種生物タンパク質発現系において活性を示さない STS を対象に、野生型 STS の配列を任意に置換したキメラ型 STS を作成した。STS に存在する二カ所の保存性配列を継ぎ目とし、各種 STS の配列をシャフリングすることでキメラ遺伝子を得た。得られたキメラ型 STS の酵素活性は上記に準じて追跡した。

#### 4. 研究成果

(1) 担子菌 *P. placenta* および *P. chrysosporium* 由来の STS に関する先行研究を通じて、転写を確認できない 7 種類の STS 遺伝子が見出されている<sup>(1,2)</sup>。本研究では、これら 7 種類の STS 遺伝子をゲノム DNA 断片として獲得し、予測されるイントロン領域を PCR によって除去して完全長 cDNA を調製した後、*S. cerevisiae* に形質転換して STS 活性を追跡した。一連の検討の結果、*P. chrysosporium* に由来する 1 種の STS において酵素活性が発現し、dauca-4(11),8-diene が産生されたこと確認した。Dauca-4(11),8-diene を与える STS は知られているものの、当該化合物およびその誘導体の生物活性に関する知見は少なく、本研究で獲得した遺伝子およびその産物を利用した有用物質合成にも興味をもたれる。一方、*P. placenta* STS の酵素活性復元には至らなかった。

(2) 担子菌 STS においては、イントロンの不完全なスプライシングによってフレームシフトを起こす転写産物が多く確認されている。本研究において、異常なスプライシングによって転写産物中に残存するイントロン領域を人為的に除去し、STS タンパク質をコードする cDNA を調製して酵素活性の有無を追跡した。先行研究で獲得したフレームシフト型遺伝子を用いて検討を進めたところ、複数の STS が酵素活性を示した。得られた生成物には、新規化合物と考えられるセスキテルペン骨格分子も含まれ、これらの化合物と担子菌の生物機能に関する相関についても興味を持たれる。

(3) cDNA としてクローニングすることに成功している *P. placenta* 由来 STS のうち、翻訳領域を保持しているにもかかわらず、*S. cerevisiae* を用いた異種生物タンパク質発現系での活性発現を確認できない STS に着目して種々のキメラ酵素を作成した。担子菌 STS は活性発現に重要な二カ所の保存性領域が存在する。本研究では、これら保存性配列を継ぎ目として任意に配列置換を施すことで配列シャッフリングを行った。PpSTS-06 および PpSTS-07 の配列を相互に置換してキメラ酵素を作出したところ、N 末端側に PpSTS-06 の配列を有し、C 末端側に PpSTS-07 の配列を有するキメラ酵素において強い酵素活性が出現した。*S. cerevisiae* に異種発現させた野生型の PpSTS-06 および PpSTS-07 は有意な酵素活性を示さず、キメラ化することによってはじめて強い酵素活性が認められた。GCMS 分析の結果、キメラ酵素が与えた化合物は分子量 222 のセスキテルペンアルコールであることが強く示唆されたものの、MS フラグメントの相同性を示す既知化合物はなく、当該化合物が新規化合物であることが強く示唆されている。以上の結果は、担子菌の進化過程で機能を喪失した STS に遺伝子工学的改変を加えることで、新たな機能を発現させることを意味しており、担子菌 STS の有効利用が促進されると期待された。



(図) PpSTS-06 と PpSTS-07 のキメラ酵素が与えた化合物  
A: 代謝物のガスクロマトグラム, B: 主代謝物の MS スペクトル

#### (参考文献)

1. Ichinose H., Kitaoka H., *Microbial Biotechnol*, **11**, 952 (2018).
2. Ichinose H., Ukeba S., Kitaoka T., *Enzyme Microbial Technol*, **158**, 110037 (2022).
3. Masunaga N., Kitaoka T., and Ichinose H., *Microbial Biotechnol*, **16**, 632 (2023).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Permana Dani, Kitaoka Takuya, Ichinose Hirofumi	4. 巻 120
2. 論文標題 Conversion and synthesis of chemicals catalyzed by fungal cytochrome P450 monooxygenases: A review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1725 ~ 1745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.28411	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 庄嶋菜月、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 子嚢菌を利用した担子菌二次代謝関連遺伝子の転写と成熟mRNAの合成
3. 学会等名 令和4年度内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 庄嶋菜月、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 子嚢菌を宿主とした担子菌二次代謝関連遺伝子の転写と成熟mRNAの合成
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ichinose Hirofumi
2. 発表標題 Application of fungal cytochrome P450s for production of natural and pseudonatural sesquiterpenoids
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics(招待講演)(国際学会)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nishimura Mizuki, Kitaoka Takuya, Ichinose Hirofumi
2. 発表標題 Application of fungal cytochrome P450 monooxygenases for production of -santalene derivatives
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics(招待講演)(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chen Chen, Kitaoka Takuya, Ichinose Hirofumi
2. 発表標題 Identification of cytochrome P450 monooxygenases involved in fungal metabolism of sesquiterpene alcohols
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics(招待講演)(国際学会)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陳シン、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 Epicubanolおよび -muurolol の代謝変換に関する担子菌シトクロムP450
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西村瑞樹、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 -サンタレン合成酵素および糸状菌シトクロムP450モノオキシゲナーゼを利用した希少セスキテルペノイドの合成
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 袁曉悦、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 担子菌Resinicium bicolorが有するセスキテルペン合成酵素の機能解明
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------