

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651247

研究課題名(和文)フシコブラジジン類生合成に関する網羅的遺伝子解析と効率的物質生産システムの確立

研究課題名(英文) Comprehensive studies of genes responsible for biosynthesis of fusicoplagin diterpenoids in liverworts, and their use to development of reconstituted biosynthesis system

研究代表者

兼目 裕充 (Kenmoku, Hiromichi)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：10399438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：苔類コハネゴケより見いだした新規フシコブラジジン類は、強い動物細胞分化誘導活性等を有することから、フシコクシン/コチレニン類の作用機序の解明や構造活性相関に新たに重要な視点を与える化合物と言える。しかし、コハネゴケは成長が遅く、フシコブラジジン類の蓄積は微量であり、生産性のケモタイプが3種存在して採取が難しいことから、安定した供給方法の構築が急務である。本研究では、フシコブラジジン類の生合成酵素遺伝子群を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現解析手法を用いて、テルペン環化酵素やP450酵素等の候補遺伝子を見出すことに成功した。また、それら生合成酵素の機能解析を異種生物での発現により行った。

研究成果の概要(英文)：Novel fusicoplagins, isolated from the leafy liverwort *Plagiochila sciophila*, are diterpenoids that are potent inducers of differentiation in human myelocytic leukemia HL-60 cells. Because the fusicoplagins are a minuscule amount in the liverwort, construction of the stable supply method is a matter of great urgency. Therefore, studies aiming at the elucidation of the entire biosynthetic genes was carried out using a comprehensive transcriptome method. The predicted biosynthetic genes were discovered and the function of the diterpene cyclases was analyzed using heterologous gene expression system.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

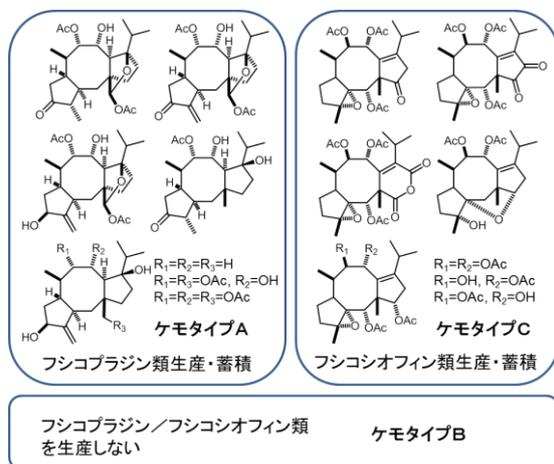
キーワード：生合成 有用物質生産 分化誘導活性 ジテルペノイド フシコッカシ 次世代シーケンサー *Plagiochila sciophila* ケモタイプ

1. 研究開始当初の背景

真菌由来のジテルペノイドであるフシコクシンおよびコチレニン (FC/CN) 類は、植物では不可逆的な気孔開口、植物休眠ホルモン (ABA) による休眠種子の休眠打破、動物においては骨髄性白血病細胞の分化誘導、神経栄養因子増強、アポトーシス誘導増強、臓器逆位化等の様々な活性を持ち、分子メカニズムに 14-3-3 タンパクの関与が立証または予想されている (Ottman *et al*, *J.Mol.Biol.* 386:913, 2009 ほか)。特に動物細胞に対して活性を持つ CN 類は生産菌が増殖能を喪失して供給が絶たれたことから、我々はこれに着目して FC/CN 様物質の探索を企図し、ABA 休眠種子の休眠打破試験等により FC/CN のアグリコンと同様のフシコクシン骨格を持つ新規フシコプラジン (FP) 類および新規フシコシオフィン (FS) 類をコハネゴケ *Plagiochila sciophila* より見いだした。FP/FS 類の中でも FS 類については骨髄性白血病細胞の分化誘導活性が強力であった。また、コハネゴケにおいて、FP/FS 類の生産・蓄積プロファイルが異なる 3 種のケモタイプが存在することを明らかにした。

2. 研究の目的

我々が苔類コハネゴケより見いだした新規 FP/FS 類類は、真核生物に普遍的に存在する 14-3-3 タンパクとシグナル伝達系タンパクとの会合を制御することで動植物に対して様々な活性を示す FC/ CN 類と類似した母骨格構造を持つ。その置換基が従来の構造活性相関と相反するにも関わらず強い動物細胞分化誘導活性等を有することから、フシコプラジン類は作用機序の解明や構造活性相関に新たに重要な視点を与える化合物と言える。しかし、コハネゴケは成長が遅く、FP/FS 類の蓄積は微量であり、生産性のケモタイプが 3 種存在して採取が難しいことから、安定した供給方法の構築が急務である。本研究は FP/FS 類の生合成酵素遺伝子を完全に解明すると共に、異種生物への遺伝子導入による生合成経路の再構築により効率的生産システムを確立することを目的として、以下の研究を計画した。



3. 研究の方法

(1) FP/FS 類の生産性の異なるケモタイプ A-C のコハネゴケについて、次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列解析および発現解析を行い、それぞれに特異的な発現遺伝子を明らかにする。特にケモタイプ B については FP/FS 類の顕著な蓄積は見られていないことから、ケモタイプ B には発現が見られず、ケモタイプ A または C に特異的な発現遺伝子を K-means 法等のクラスター解析によって明らかにする。

(2) 相同性検索、モチーフ検索や進化系統樹解析等を用いた特徴付けによって、各ケモタイプに特異的な発現遺伝子群から、多段階の代謝に関わるそれぞれの FP/FS 類生合成酵素候補遺伝子を絞り込む。

(3) 候補遺伝子全てについて、大腸菌および酵母等を用いた機能解析を行う。従来の方法では機能解析の難しい酵素遺伝子はゼニゴケに導入して機能解析を行う。またゼニゴケにおける多段階の外來生合成遺伝子の導入方法の構築を追求して FP/FS 類の効率的生産システムを確立する。

4. 研究成果

(1) mRNA シーケンスおよび FP/FS 類生合成酵素遺伝子候補の抽出

新鮮なコハネゴケのケモタイプ A~C からそれぞれ total RNA を抽出し、所定のサンプル調製を行った。次世代シーケンサー Illumina GAIIx による 100bp 断片配列を取得後、アダプター配列などの削除と各種アセンブルソフトウェアを用いて二次アセンブルまでを行い、それぞれのケモタイプごとにスーパーコンティグを作成した。得られたスーパーコンティグは Local BLAST によってアノテーションを行なった。また、ケモタイプ A~C から得られた 100bp 断片配列をまとめてアセンブルをすることで、共通リファレンス配列を作成した。これに対して各ケモタイプごとに 100bp 断片配列のマッピングを行い、各遺伝子配列の発現量を RPKM (Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads) として算出し、K-means 法を用いたクラスター解析を行った。その結果として得られたケモタイプ B および C で発現の高いクラスターおよび各ケモタイプのみでそれぞれ発現の高いクラスターに着目し、これらのクラスターに含まれる遺伝子の特徴付けを次のように行った。

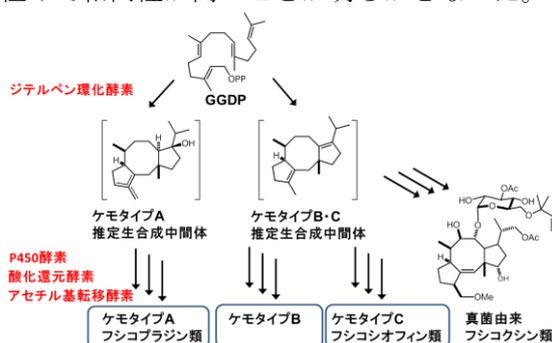
(2) FP/FS 類生合成酵素遺伝子候補の特徴付けと絞り込み (テルペン環化酵素遺伝子)

ケモタイプ B および C で発現の高いクラスターに含まれる遺伝子配列について Local BLAST によるアノテーションを行ったところ、真菌由来の fusicocca-2,10(14)-diene 合成酵素に相同性の高い遺伝子配列断片が複

数得られた。これらはアセンブルの際に塩基配列の多様性のために生じた分岐で断片化していることが視えたことから、改めてケモタイプBおよびCのスーパーコンティグから相当する遺伝子配列を検索したところ、それぞれ全長配列を得ることができた。

ケモタイプ B については研究当初において、FP/FS 類のようなフシコッカンジテルペノイドの顕著な蓄積は見られていないことから、FP/FS 類非生産型ケモタイプとしていた。前述のアノテーションの結果、真菌由来 fusicocca-2,10(14)-diene 合成酵素に相同性の高いテルペン環化酵素遺伝子がケモタイプCとケモタイプBに存在していたことから、改めてケモタイプ B 抽出物からフシコッカンジテルペノイドの精査を行ったところ、ケモタイプ B 独自の微量新規フシコッカンジテルペノイドを見出すことができた。

一方、ケモタイプAからは予想に反して、ケモタイプBやCから得られたフシコッカ合成酵素候補遺伝子と相同性の高い遺伝子配列は BLAST 検索で見出されなかった。ケモタイプAのみで発現の高いクラスターを精査したところ、セスキテルペン合成酵素遺伝子に相同性が見られる独自の遺伝子配列が見出されたことから、これを候補酵素遺伝子とした。また、その他のセスキテルペン合成酵素様遺伝子2種は全てのケモタイプ間で極めて相同性が高いことが明らかとなった。



(3) FP/FS 類生合成酵素遺伝子候補の特徴付けと絞り込み (その他の酵素遺伝子候補)

FP/FS 類の生合成において代謝を担うと予測される P450 酵素、酸素添加酵素およびアセチル基転移酵素について K-means 法で得た各クラスターから絞り込みを検討した。各酵素ファミリー内およびケモタイプ間の遺伝子配列の多様性に起因すると思われるアセンブル産物の断片化やアーティファクトが多数存在したため、この方法での遺伝子の絞り込みは断念した。これに変えて各ケモタイプ内のアセンブルで得たスーパーコンティグのアノテーションで各酵素ファミリーをコードする遺伝子配列を抽出した。他の植物や微生物で機能が明らかとなっている同族酵素と進化系統樹解析を行うことで、各酵素ファミリー内で機能解析に進める優先順位を決定した。

(4) FP/FS 類生合成酵素遺伝子候補の機能解析

前述のケモタイプ A~C におけるフシコッカ骨格合成酵素遺伝子候補およびケモタイプ間で極めて相同性が高いセスキテルペン合成酵素様遺伝子2種 (合計6配列) について、大腸菌内で基質であるゲラニルゲラニル二リン酸 (GGDP) またはファルネシル二リン酸 (FDP) を供給できる系を構築し、*in vivo* 機能解析を行った。セスキテルペン合成酵素様遺伝子2種については、我々がこれまでに同様の手法で機能を明らかにしてきたゼニゴケ由来セスキテルペン合成酵素並びにヤマブシタケ由来セスキテルペン合成酵素の環化産物と一致した。一方、フシコッカ骨格合成酵素遺伝子候補については、可溶化には成功しているものの、セスキテルペンおよびジテルペン環化産物が検出されないことから、現在、それぞれのレアカドンを改変した遺伝子配列を構築して、機能解析を進めている。また、P450 酵素および酸素添加酵素の機能解析については、ケモタイプ B および C 由来環化酵素の環化産物と推定される fusicocca-2,10(14)-diene を合成する真菌由来 fusicocca-2,10(14)-diene 合成酵素を共発現する酵母を用いて機能解析を進めているところである。

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3件)

- ① Kenmoku, H., Tada, H., Oogushi, M., Esumi, T., Takahashi, T., Noji, M., Sassa, T., Toyota, M., Asakawa, Y., Seed Dormancy Breaking Diterpenoids from the Liverwort *Plagiochila sciophila* and their Differentiation Inducing Activity in Human Acute Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *Natural Product Communications*, 2014, **9**, in printing 査読有
- ② Kenmoku, H., Takeue, S., Oogushi, M., Yagi, Y., Sassa, T., Toyota, M., Asakawa, Y., Seed Dormancy Breaking Diterpenoids, Including Novel Brassicenes J and K, from Fungus *Alternaria brassicicola*, and their Necrotic/Apoptotic Activities in HL-60 Cells. *Natural Product Communications*, 2014, **9**, 351-354. 査読有
- ③ Toyota, M., Ikeda, R., Kenmoku, H., Asakawa Y. Activity-guided isolation of cytotoxic bis-benzyl constituents from *Dumortiera hirsuta*. *Journal of Oleo Science*, 2013, **62**, 105-108. 査読有, <http://dx.doi.org/10.5650/jos.62.105>]

[学会発表] (計7件)

- ① 兼目裕充, 曾我達也, 鳴原隆, 木村榮一, 佐々武史, 高橋宏暢, 野路征昭, 豊田正

夫, 浅川義範. ヤマブシタケ由来テルペン合成酵素によるジテルペン環化産物の構造解析. 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 30 日 (熊本市)

- ② 兼目裕充, 大櫛恵, 竹上沙也加, 佐々武史, 豊田正夫, 浅川義範. 糸状菌 *Alternaria brassicicola* からの 14-3-3 タンパク制御物質の探索. 第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会. 2013 年 10 月 27 日 (松山市)
- ③ 曾我達也, 兼目裕充, 嶋原隆, 木村榮一, 佐々武史, 高橋宏暢, 野路征昭, 豊田正夫, 浅川義範. ヤマブシタケ由来テルペン合成酵素遺伝子の同定解析. 第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会. 2013 年 10 月 27 日 (松山市)
- ④ 兼目裕充, 曾我達也, 嶋原隆, 木村榮一, 佐々武史, 高橋宏暢, 野路征昭, 豊田正夫, 浅川義範. ヤマブシタケ由来セスキテルペン合成酵素遺伝子群の網羅的同定解析. 第 57 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会. 2013 年 10 月 7 日 (さいたま市)
- ⑤ 兼目裕充, 曾我達也, 嶋原隆, 木村榮一, 佐々武史, 高橋宏暢, 野路征昭, 豊田正夫, 浅川義範. ヤマブシタケ由来エリナシン生合成酵素遺伝子群の網羅的同定解析. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日 (横浜市)
- ⑥ 大櫛恵, 兼目裕充, 竹上沙也加, 多田博幸, 佐々武史, 豊田正夫, 浅川義範. 14-3-3 タンパク制御物質の探索. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日 (横浜市)
- ⑦ 兼目裕充, 森本樹奈, 高橋宏暢, 江角朋之, 野路征昭, 豊田正夫, 三沢典彦, 浅川義範. ゼニゴケ油体構成テルペノイドの生合成に関わる酵素遺伝子の同定と機能解析. 第 56 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2012 年 10 月 29 日 (鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼目 裕充 (KENMOKU HIROMICHI)

徳島文理大学薬学部助教

研究者番号 : 10399438