

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07994

研究課題名(和文) 抗HIV天然物ダウリクロメン酸の生物生産システム確立に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Comprehensive studies for the biotechnological production of daurichromenic acid, an anti-HIV natural product

研究代表者

田浦 太志 (Taura, Futoshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：00301341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエゾムラサキツツジが生産する抗HIV天然物ダウリクロメン酸の生合成に関与する酵素遺伝子の完全解明を検討し、その結果生合成経路を構成するポリケチド合成酵素、プレニル転移酵素及び酸化閉環酵素(ダウリクロメン酸合成酵素)の遺伝子をクローニングすることに成功し、組み換え酵素を用いたキャラクタリゼーションにより各酵素反応の生化学的性質を解明した。以上によりダウリクロメン酸の生物生産に必要な生合成遺伝子を完全解明し、また組み換え酵素の異種発現に関わる技術基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：In this project, I have attempted comprehensive understanding and elucidation of the biosynthetic genes of daurichromenic acid, a meroterpenoid with a potent anti-HIV activity isolated from a medicinal plant *Rhododendron dauricum*. I have successfully cloned genes coding for polyketide synthase, prenyltransferase, and oxidocyclase (DCA synthase) that constitute the DCA pathway. This study comprehensively identified the biosynthetic genes and established the heterologous expression system of each biosynthetic enzyme to develop the biotechnological production of daurichromenic acid.

研究分野：生薬学

キーワード：生合成 メロテルペノイド ダウリクロメン酸 バイオテクノロジー

### 1. 研究開始当初の背景

エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*, 図1) が生産するダウリクロメン酸 (daurichromenic acid, DCA) は強力な抗 HIV 活性をはじめとする特徴的な薬理活性を示すことから、医薬資源として期待が持たれている。近年本化合物の全合成研究が盛んに行われてきたが、効率的な調製法は確立していないのが現状であり、また一方、エゾムラサキツツジからの本化合物の抽出単離にも複雑な操作が必要である。このような背景から、バイオテクノロジーによる DCA の生産は魅力的であるが、これを実現するためには生合成メカニズムを解明し、生合成遺伝子を網羅的に取得する必要がある。



図1 開花期のエゾムラサキツツジ

### 2. 研究の目的

本研究では、図2に示す DCA 生合成経路の各ステップを触媒する生合成酵素、即ちポリケチド合成酵素、プレニル転移酵素および酸化閉環酵素 (DCA synthase) の遺伝子を初めてクローン化し、その構造機能および生化学的性質を明らかにすることを第一の目的とした。またこれを達成した後には、各遺伝子をセットとしてメチロトロフ酵母 (*Pichia pastoris*) に導入、発現することにより DCA 生物生産システムを構築する計画とした。

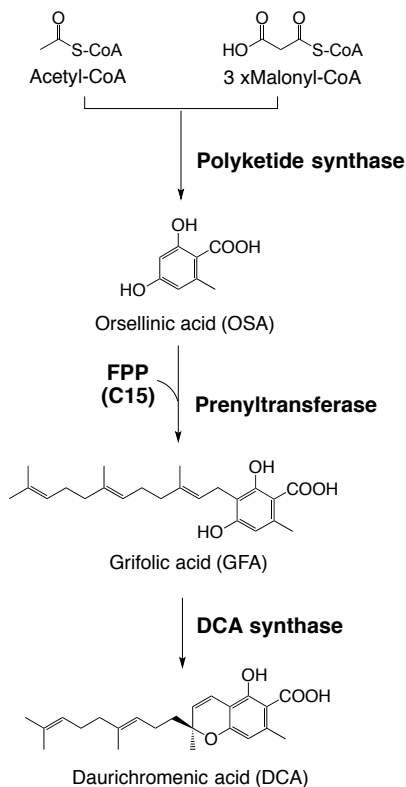


図2 DCA の生合成経路

### 3. 研究の方法

#### エゾムラサキツツジ若葉のトランスクリプトーム解析:

エゾムラサキツツジ若葉より mRNA を抽出、精製し、イルミナ社サンプル調製キットにより、cDNA ライブラリーを調製した。次いで Gemone Analyzer IIx を用いたシーケンシングによりショートリードを取得し、Rnnotator を用いたアセンブルを行い、平均鎖長 535bp の cDNA contig 71,944 種からなるトランスクリプトームデータを構築した。DCA 生合成経路を構成するポリケチド合成酵素、プレニル転移酵素および DCA synthase の候補遺伝子はトランスクリプトームデータを local DNA database とするホモロジーサーチにより行った。

#### 組み換え酵素の機能解析に基づく遺伝子同定:

ホモロジースクリーニングにより得られた各候補遺伝子は PCR 増幅の後、発現ベクターにサブクローニングした。ポリケチド合成酵素に関しては大腸菌を、またプレニル転移酵素及び DCA synthase に関しては *Pichia pastoris* を宿主として組み換え酵素を調製し、各酵素活性を確認することにより目的とする生合成酵素をコードする遺伝子を同定した。

得られた各組み換え酵素に関しては基質特異性及び反応速度などの基礎的な生化学的性質を詳細に分析した。以下、各酵素に関する研究成果の詳細を報告する。

### 4. 研究成果

#### DCA synthase の遺伝子クローニング及びキャラクタリゼーション

DCA synthase は基質 grifolic acid (GFA) のファルネシル基を立体選択的に酸化閉環することにより DCA を合成する。本研究ではエゾムラサキツツジ若葉のトランスクリプトーム解析を基盤として DCA synthase をコードする遺伝子をクローン化することに成功した。DCA synthase は大麻のカンナビノイド合成酵素に構造機能が類似した FAD 結合型オキシダーゼであるが、メロテルペノイドの生合成に関わる FAD オキシダーゼは稀であり、またファルネシル基を酸化閉環する酵素としても初めての例である。

*Pichia pastoris* をホストとして発現、精製した組換え酵素を用いたアッセイの結果、本酵素は GFA に最も高い活性を示す一方、イソプレノイド部分がゲラニル基およびゲラニルゲラニル基の GFA アナログに対しても弱いながら活性を示し、各々に対応する DCA アナログを合成することを確認した。さらに、これら DCA アナログ及びその前駆体をエゾムラサキツツジの微量成分として同定し、本植物が DCA に加え C10 および C20 のイソプレノイド部分を有するメロテルペノイドを生産することを確認した。なおジテルペン骨

格を含む diterpenodaurichromenic acid は新規化合物として同定した。

エゾムラサキツツジは有鱗片シャクナゲの一種である。我々は、DCA synthase が若葉の表面を覆う鱗片 (図 3) に局在し、細胞外 (アポプラスト) で生合成反応を触媒することを証明した。DCA は抗菌、抗カビ活性を有するため、鱗片のアポプラストという植物の最外層において生体防御に機能すると考えられる。また DCA 及び GFA は植物細胞にも毒性を示すことを確認している。このため本植物は鱗片という特殊な組織の細胞外にこれらを蓄積する生合成スタイルを選択し、自己毒性の回避と化学防御を両立したと推察される。(Plant Physiol 2017)

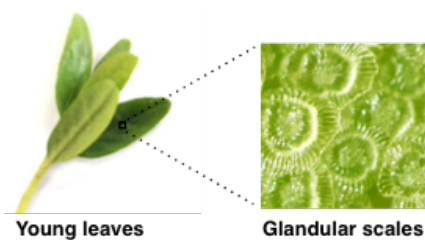


図 3 エゾムラサキツツジ若葉の鱗片

#### プレニル基転移酵素 RdPT1 の遺伝子クローニング及び生化学的性質

次いで GFA の生合成に関わる芳香族プレニル基転移酵素の同定を試みた。植物二次代謝経路のプレニル基転移酵素は多くがプラスチドに局在し、MEP 経路由来のイソプレノイドを基質とするが、一方で FPP は一般的に、細胞質のメバロン酸経路で合成される。我々はイソプレノイド経路の代謝阻害実験を行い、その結果グリフォリン酸のファルネシル基は MEP 経路に由来するという予想外の知見を得た。そこでプラスチド局在型のプレニル基転移酵素をスクリーニングし、組み換え酵素の活性を確認することにより、GFA を合成する新規プレニル基転移酵素 (RdPT1) をコードする遺伝子を同定した。

既知の二次代謝系プレニル基転移酵素はいずれも DMAPP (C5) あるいは GPP (C10) に特異的であり、FPP (C15) を生理的な基質として認識するメンバーは RdPT1 が初めてである。組換え酵素を用いた解析から、RdPT1 は orsellinic acid (OSA) に特異的である一方、プレニル基質に関しては FPP のみならず、GPP や GGPP にも弱いながら活性を示すことを明らかとした。従って RdPT1 は DCA synthase とともに、C10, C15 および C20 のイソプレノイド部分を含むメロテルペノイドの生合成に機能すると考えられる。また本酵素が示すユニークな基質特異性の構造基盤について分子モデリングによる解明を検討し、本酵素は OSA の結合部位に加え、GGPP までのプレニル基質を受容可能な疎水性領域を有することを確認した。(佐伯ら、投稿中)

#### ポリケチド合成酵素の遺伝子クローニング及び OSA 生合成機構

OSA 生合成に関与する PKS の候補として、orcino synthase と称する新規酵素の cDNA をクローン化した。Orcinol synthase は acetyl-CoA をスターター基質とし OSA 脱炭酸体の orcinol を主生成物として合成した他、OSA を含む 5 種の化合物を与える multifunctional enzyme であった。また興味深いことに orcinol synthase の酵素反応に大麻由来ポリケチド環化酵素 olivetolic acid cyclase を共存させると OSA の合成が著しく促進された。以上から orcinol synthase はエゾムラサキツツジにおいて未知の cyclase と共に OSA の生合成に関与すると推察した (Front Plant Sci 2016)。

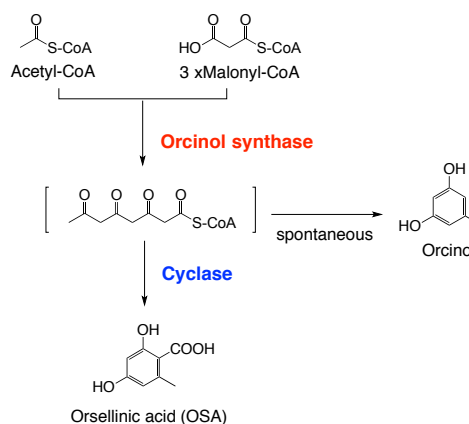


図 4 オルセリン酸の推定生合成メカニズム

#### Pichia pastoris を宿主とする DCA 生物生産の検討

Pichia pastoris は Saccharomyces cerevisiae と比較して各種異種タンパクの高発現が可能であり、生物生産の宿主として適していると考えられる。我々はこれまでにポリケチド合成酵素の orcinol synthase に加えて olivetolic acid cyclase を共発現させることにより、未発表ながら 50 mg/L レベルでの OSA 生産に成功している。また RdPT1 及び DCA synthase に関してもそれぞれ Pichia を宿主とする活性発現に成功していることから、これら遺伝子の多重導入に基づく DCA 生産が可能と考え、現在検討を行っている。

以上のように本研究では DCA 生合成経路を構成する酵素遺伝子の完全解明に成功し、いずれも Pichia を宿主として活性発現に成功したことから、DCA 生物生産に向けた技術基盤を確立することが出来た。

#### 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 7 件)

- ① Taura F, Iijima M, Kurosaki F, Daurichromenic acid and grifolic acid:

- Phytotoxic meroterpenoids that induce cell death in cell culture of their producer *Rhododendron dauricum*. *Plant Sig Behav* 査読有 13:e1422463 (2018)
- ② Iijima M, Munakata R, Takahashi H, Kenmoku H, Nakagawa R, Kodama T, Asakawa Y, Abe I, Yazaki K, Kurosaki F, Taura F. Identification and characterization of daurichromenic acid synthase active in anti-HIV biosynthesis. *Plant Physiol* 査読有 174:2213-2230 (2017)
- ③ Okada M, Saito K, Wong CP, Li C, Wang D, Iijima M, Taura F, Kurosaki F, Awakawa T, Abe I. Combinatorial biosynthesis of (+)-daurichromenic acid and its halogenated analogue. *Org Lett* 査読有 19:3183-3186 (2017)
- ④ Iijima M, Kenmoku H, Takahashi H, Lee JB, Toyota M, Asakawa Y, Kurosaki F, Taura F. Characterization of 12-oxophytodienoic acid reductases from rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*). *Nat Prod Commun* 査読有 11:1775-1782 (2016)
- ⑤ Taura F, Iijima M, Yamanaka E, Takahashi H, Kenmoku H, Saeki H, Morimoto S, Asakawa Y, Kurosaki F, Morita H. A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front Plant Sci* 査読有 7:1452 (2016)
- ⑥ Yang X, Matsui T, Kodama T, Mori T, Zhou X, Taura F, Noguchi H, Abe I, Morita H. Structural basis for olivetolic acid formation by a polyketide cyclase from *Cannabis sativa*. *FEBS J* 査読有 283:1088-1106 (2016)
- ⑦ Yang X, Matsui T, Mori T, Taura F, Noguchi H, Abe I, Morita H. Expression, purification and crystallization of a plant polyketide cyclase from *Cannabis sativa*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 査読有 71:1470-1474 (2015)
- [学会発表] (計 1 1 件)
- ① 田浦太志、生理活性植物メロテルペノイド合成酵素の立体構造解明と機能的リデザイン、新学術領域「生合成リデザイン」第 3 回公開シンポジウム、2017 年 12 月、東京
- ② 田浦太志、抗 HIV 成分を生産するエゾムラサキツツジの二次代謝、第 6 回植物二次代謝フロンティア研究会、2017 年 12 月、兵庫
- ③ 佐伯春奈、飯島未宇、黒崎文也、田浦太志、エゾムラサキツツジのダウリクロメン酸合成に関与するプレニル転移酵素、第 35 回日本植物細胞分子生物学会、2017 年 8 月、さいたま
- ④ 飯島未宇、森田洋行、黒崎文也、田浦太志、エゾムラサキツツジ由来オルセリン酸合成に関与する新規 III 型 PKS の機能解析、第 35 回日本植物細胞分子生物学会、2017 年 8 月、さいたま
- ⑤ 飯島未宇、黒崎文也、田浦太志、抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸の生合成研究、第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2016 年 10 月、千葉
- ⑥ 飯島未宇、田浦太志、兼目裕充、高橋宏暢、豊田正夫、李貞範、黒崎文也、浅川義範、エゾムラサキツツジが生産する抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸の生合成研究、第 34 回日本植物細胞分子生物学会大会、2016 年 9 月、上田
- ⑦ 飯島未宇、田浦太志、兼目裕充、高橋宏暢、豊田正夫、李貞範、黒崎文也、浅川義範、エゾムラサキツツジが生産する抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸の生合成研究、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月、横浜
- ⑧ 飯島未宇、田浦太志、兼目裕充、高橋宏暢、豊田正夫、李貞範、黒崎文也、浅川義範、エゾムラサキツツジが生産する抗 HIV 天然物ダウリクロメン酸の生合成研究、2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会、2015 年 9 月、富山
- ⑨ Taura F, Iijima M, Xie J, Takahashi H, Kenmoku H, Kurosaki F, Asakawa Y. Molecular and biochemical characterization of polyketide synthase from *Rhododendron dauricum*. The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia, August, 2015, Tokushima, Japan
- ⑩ Iijima M, Taura F, Kenmoku H, Takahashi H, Toyota M, Lee JB, Kurosaki F, Asakawa Y. Molecular and biochemical characterization of daurichromenic acid synthase from *Rhododendron dauricum*. The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia, August, 2015, Tokushima, Japan
- ⑪ Iijima M, Taura F, Kenmoku H, Takahashi H, Toyota M, Lee JB, Kurosaki F, Asakawa Y. Molecular and biochemical characterization of daurichromenic acid synthase from *Rhododendron dauricum*. *Plant Biology* 2015, July, 2015, Minnesota, USA
- [図書] (計 1 件)
- Sirikantaramas S, Taura F. Cannabinoids: Biosynthesis and biotechnological applications. Chandra S, Lata H, ElSohly M, eds. Cham: Springer; 2017 May. *Cannabis sativa* L.-Botany and biotechnology, p. 183-206.
- [その他]
- ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/laboratory/shoyaku/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田浦 太志 (TAURA, Futoshi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
准教授  
研究者番号：00301341

### (2)連携研究者

明石 智義 (AKASHI, Tomoyoshi)  
日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：80328707

### (2)連携研究者

森田 洋行 (MORITA, Hiroyuki)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授  
研究者番号：20416663