

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780109

研究課題名（和文） 細菌の生産する C₃₅テルペンの新型環化酵素の発掘および生理機能・生物活性の解析研究課題名（英文） Search for novel families of terpene cyclases from bacteria and analyses of physiological functions and bioactivities of C₃₅ terpenes

研究代表者

佐藤 努 (SATO TSUTOMU)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：80334655

研究成果の概要（和文）：マイコバクテリアの研究から、E型アリル基質によって C₃₅と C₅₀の生成物を作り分ける二機能性 Z型プレニル鎖伸長酵素を初めて発見した。また、2種類の新規 C₃₅テルペンを見出すことができ、その構造から Eと Zの両プレニル基を還元する酵素の存在が示唆された。一方、枯草菌の研究から、新型テルペン環化酵素と 5環性 C₃₅テルペン環化酵素を *in vitro* 酵素反応によって同定した。

研究成果の概要（英文）：A bifunctional Z-prenyltransferase that preferentially synthesizes C₃₅ or C₅₀ products was found from the study on the mycobacterial C₃₅ terpenes. The structure of two novel C₃₅ terpenes suggested that a prenyl reductase reducing both E and Z prenyl residues was responsible for the biosynthesis of C₃₅ terpenes. On the other hand, a novel family of terpene cyclases and tetraprenyl-β-curcumene cyclase from *Bacillus subtilis* could be identified by the *in vitro* enzymatic reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：テルペン、テルペン環化酵素、*Mycobacterium*、枯草菌

1. 研究開始当初の背景

既存のテルペンの分類に当てはめられない環状 C₃₅テルペンが、マイコバクテリアと枯草菌から 2008年に続々と発見された（図1と2）。それらの細菌内での機能や他生物に対する活性は殆ど不明であった。また、生合成酵素に関しても新規性が高く、新型が存在することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、新型を含めた C₃₅テルペン生合成酵素を発掘し、それを利用して新規 C₃₅テルペンの探索や生理機能・生物活性の解析を行うことを目的とする。

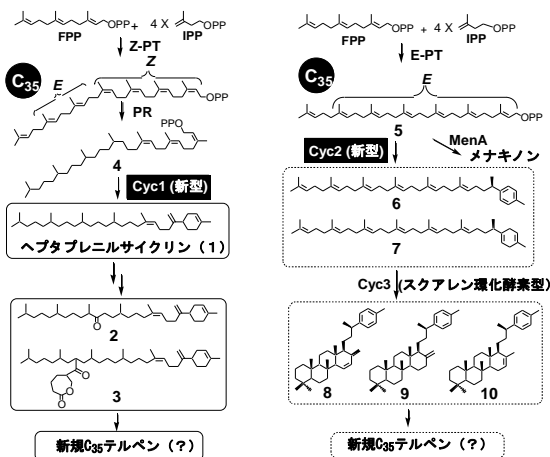


図1 *Mycobacterium*由来C₃₅テルペン推定経路 図2 枯草菌由来C₃₅テルペン推定経路

3. 研究の方法

(1) C₃₅テルペンの新規生合成酵素の取得

- ①マイコバクテリア由来のZ型プレニル鎖伸長酵素 (Z-PT) とプレニル還元酵素 (PR) の解析: 3種類のZ-PTホモログと2種類のPRホモログをpET系等によって大腸菌で発現させた後、各種想定基質と反応させてC₃₅テルペンの生合成に関与するZ-PTとPRを見つける。
- ②マイコバクテリア由来の新型C₃₅テルペン環化酵素 (Cyc1) の探索: *M. vanbaalenii* と *M. smegmatis* (1を生産しないゲノム既知のマイコバクテリア) のゲノム比較を行い、Z-PTとPRの近傍に位置する遺伝子の中で *M. vanbaalenii* にのみ存在するものをCyc1の第一候補とする。候補遺伝子を *M. smegmatis* 発現ベクターpMV261にクローニングする。*M. smegmatis* は、4までは生合成していることから (図1)、Cyc1を発現すると1を生産するようになる。もし、候補遺伝子がハズレだった場合は、*M. smegmatis* ヘランダムにショットガンクローニングし、培養した菌体の炭化水素をGC-MS分析することによって、Cyc1遺伝子を見つけ出す。
- ③枯草菌由来の新型C₃₅テルペン環化酵素 (Cyc2) の探索: 国立遺伝学研究所から枯草菌遺伝子破壊株ライブラリー (2515株の内、最初は機能未知遺伝子の256株) を分譲して頂き、菌体の炭化水素をTLC分析することでCyc2破壊株を探索する。Cyc2は、大腸菌でも発現させ、FPPとIPPからE型

C₃₅プレニル鎖伸長酵素 (E-PT) によって合成した5との反応によって *in vitro* での証明も行う。

- ④枯草菌由来の5環性C₃₅テルペン環化酵素 (Cyc3) の解析: 枯草菌から6と7を単離した後、大腸菌で発現させたCyc3と反応させて証明する。

(2) 新規C₃₅テルペンの探索

- ①生合成遺伝子欠損株および遺伝子過剰発現株を用いた新規C₃₅テルペンの探索: マイコバクテリアと枯草菌の生合成遺伝子過剰発現株は、各々、pMV261とpHT01にCyc1~Cyc3を導入することで作成する。また、マイコバクテリアと枯草菌の遺伝子破壊株は、各々、pYUB854とpMUTINにCyc1~Cyc3を導入することで達成する。遺伝子過剰発現株と遺伝子欠損株の脂質成分を野生株のものとTLCやLC-MSによって比較することによって新規C₃₅テルペンを見つける。
- ②培養条件の変化によって生産される新規C₃₅テルペンの探索: マイコバクテリアと枯草菌の両者において様々な培養条件を検討し、C₃₅テルペンを見出す。新規C₃₅テルペンは、大量培養後、単離・構造決定する。
- ③枯草菌以外のバチルス由来の新規C₃₅テルペンのゲノムマイニング: 枯草菌以外の3種類のバチルスのゲノムからCyc3ホモログをクローニングし、大腸菌で発現させた後、6や7と酵素反応させることによってC₃₅テルペンを生産させる (ゲノムマイニング)。新規物質は大量に反応させて単離・構造決定する。

(3) C₃₅テルペンの生理機能と生物活性の解析

- ①マイコバクテリア由来C₃₅テルペンの生理機能の解析: 遺伝子過剰発現株と遺伝子欠損株における環境汚染物質の分解活性を測定し、野生株のものと比較する。
- ②枯草菌由来C₃₅テルペンの生理機能の解析: 様々な培養条件による定性・定量分析の結果をもとに解析を進める。
- ③C₃₅テルペンの他生物に対する生物活性試験: 抗菌活性試験は申請者自ら行うが、

それ以外の生物活性試験は外部機関で行って頂く。

4. 研究成果

(1) C₃₅テルペンの新規生合成酵素の取得

- ①マイコバクテリア由来のZ型プレニル鎖伸長酵素 (Z-PT) とプレニル還元酵素 (PR) の解析: Mvan_3822 は、GPP から C₅₀ まで伸長し、FPP と GGPP から C₃₅ まで伸長する二機能性酵素であることが判明した (図3)。また、Mvan_4662 と Mvan_1705 は各々 GPP から C₁₅ と FPP から C₂₀ を合成した。二機能性および C₂₀ を主生成物とする Z-PT は初めての発見であった。PR に関しては、発現・可溶化に問題があったため、現在、別のベクター系を検討中である。

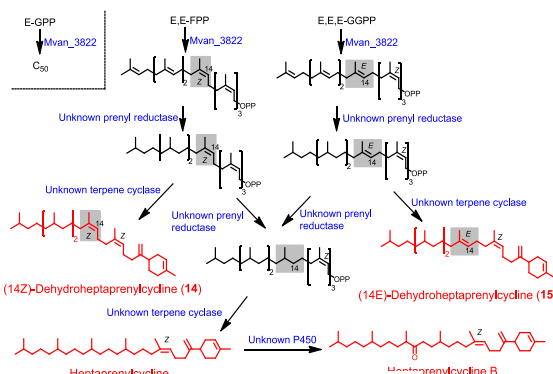


図3

- ②マイコバクテリア由来の新型 C₃₅テルペン環化酵素 (Cyc1) の探索: 2種類の候補遺伝子を pMV261 にクローニングし、*M. smegmatis* に導入したが、**1** の生産を確認することができなかった。現在、*M. smegmatis* ヘランダムにショットガンクローニングし、培養した菌体の炭化水素を GC-MS 分析している。
- ③枯草菌由来の新型 C₃₅テルペン環化 (Cyc2) の探索: 枯草菌遺伝子破壊株ライブラリーの中で**6** と **7** を生産しない株を1つ見出すことができた。その遺伝子 (*cyc2*) を大腸菌で発現させ、FPP と IPP から E 型 C₃₅プレニル鎖伸長酵素 (E-PT) によって合成した**5** との反応によって *in vitro* での証明も達成した。Cyc2 は既存のテルペン環化酵素のモチーフが存在しない新しいファミリーの酵素であり、触媒機構は完全に未知である。また、多くのバクテリアにホモログが存在している。
- ④枯草菌由来の5環性 C₃₅テルペン環化酵素 (Cyc3) の解析: 枯草菌から単離した**6** と **7** を大腸菌で発現させた Cyc3 と反応させて、生成物を単離・構造決定した。その構造は2010年に他のグループによって報告された**11** と **12** と一致していた (図4)。**11** は立体化学が不明であったが、初めて決定できた。精

製酵素を用いた実験でも、**7**→**11** および **6**→**12** を証明できた。また、Cyc3 はスクアレンと反応しないと報告されていたが、2環性トリテルペン **13** を生産することが判明した (図4)。*B. megaterium* においては、**6**-**12** とともにスクアレンと **13** を検出することができ、Cyc3 が二機能を果たしていることが示唆された。

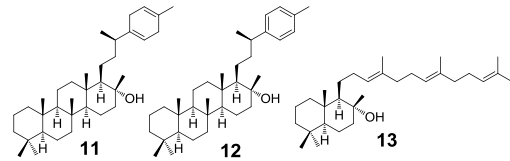


図4

(2) 新規 C₃₅テルペンの探索

- ①生合成遺伝子欠損株および遺伝子過剰発現株を用いた新規 C₃₅テルペンの探索: 枯草菌の Cyc2 破壊株を解析し、野生株よりも著しく生産が増加した化合物の存在を HPLC 解析によって確認できた。現在、単離中である。他の生合成遺伝子欠損株および遺伝子過剰発現株については、現在作製中である。
- ②培養条件の変化によって生産される新規 C₃₅テルペンの探索: マイナー成分 **14** と **15** を単離・構造決定した (図3)。このことは、C₃₅テルペンの生合成において E と Z の両プレニル基を還元する酵素が存在することを示しており、そのような基質特異性の酵素は現在知られていない (図3)。一方、マイコバクテリアが合成地にて特異的に生産する新規 C₃₅テルペンを少なくとも10種類検出することができた。現在、単離中である。
- ③枯草菌以外のバチルス由来の新規 C₃₅テルペンのゲノムマイニング: 3種類のバチルス由来の Cyc3 ホモログを大腸菌にて発現させた。1種類については発現しなかった。2種類については、発現・可溶性に問題がなく、現在酵素活性を解析中である。

(3) C₃₅テルペンの生理機能と生物活性の解析

- ①マイコバクテリア由来 C₃₅テルペンの生理機能の解析: 遺伝子過剰発現株と遺伝子欠損株を現在作製中であり、株ができ次第、環境汚染物質の分解活性を測定し、野生株のものと比較する予定である。
- ②枯草菌由来 C₃₅テルペンの生理機能の解析: 様々な培養条件を試したが、C₃₅テルペンの生産量に大きな影響を与える条件を見出すことができなかった。
- ③C₃₅テルペンの他生物に対する生物活性試験: 単離できた C₃₅テルペンに関して抗ガン活性を解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Chiaki NAKANO, Takahiro OOTSUKA, Kazutoshi TAKAYAMA, Toshiaki MITSUI, Tsutomu SATO, and Tsutomu HOSHINO, Characterization of the Rv3378c gene product, a new diterpene synthase for producing tuberculosinol and (13*R*, 5*S*)-isotuberculosinol (nosyberkol), from the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv genome., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 75-81 (2011). (査読有)
- ② Tsutomu SATO, Kazuo TAKIZAWA, Yuriko ORITO, Hanayo KUDO and Tsutomu HOSHINO, Insight into C₃₅-terpene biosyntheses by non-pathogenic *Mycobacterium* species: functional analyses of three Z-prenyltransferases and identification of dehydroheptaprenylcyclines., *ChemBioChem*, 11, 1874-1881 (2010). (査読有)
- ③ Chiaki NAKANO, Tsutomu HOSHINO, Tsutomu SATO, Tomonobu TOYOMASU, Tohru DAIRI and Takeshi SASSA, Substrate specificity of the CYC2 enzyme from *Kitasatospora griseola*: production of sclarene, biformene and novel bicyclic diterpenes by the enzymatic reactions of labdane- and halimane-type diterpene diphosphates., *Tetrahedron Lett.*, 51, 125-128 (2010). (査読有)
- ④ Tsutomu SATO, Ryosuke TAKAGI, Yuriko ORITO, Eri ONO, and Tsutomu HOSHINO, Novel compounds of octahydroheptaprenyl mycolic acyl ester and monocyclic C₃₅-terpene, heptaprenylcycline B, from nonpathogenic *Mycobacterium* species., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 147-151 (2010). (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 吉田 悟、枯草菌由来 C₃₅ テルペンの生合成：新型テルペン環化酵素のテトラプレニル-β-クルクメン合成酵素の同定、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都
- ② 星野 紘子、枯草菌由来 C₃₅ テルペンの生合成：テトラプレニル-β-クルクメン環化酵素の *in vitro* 反応による同定と基質特異性、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都
- ③ 阿部 奈緒美、豚肝ラノステロール合成酵素：オキシドスクアレン 19 位のバルクサイズが環化反応に及ぼす影響、日本農芸化

学会、2011年3月26日、京都

- ④ 山口 雄生、28-noroxidosqualene と β-アミリン合成酵素との酵素反応、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都
- ⑤ 伊藤 遼介、ミドリサンゴ由来 β-amyirin 合成酵素 F413 残基の機能解析、日本農芸化学会、2011年3月26日、京都
- ⑥ 佐藤 努、非病原性マイコバクテリアに存在するユニークな C₃₅ テルペンの生合成：Z型プレニルトランスフェラーゼの機能解析とデヒドロヘプタプレニルサイクリンの同定、第 20 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会、2010年10月9日、名古屋
- ⑦ 伊藤 遼介、イネ由来のトリテルペン環化酵素、第 52 回天然有機化合物討論会、2010年9月30日、静岡
- ⑧ 滝沢 和央、非病原性 *Mycobacterium* 属由来の C₃₅ テルペン生合成酵素の探索、日本農芸化学会、2010年3月29日、東京
- ⑨ 伊藤 遼介、ミドリサンゴ由来の β-アミリン合成酵素の酵素学的諸性質、日本農芸化学会、2010年3月29日、東京
- ⑩ 大塚 崇弘、*Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv3378c 酵素の再検討、日本農芸化学会、2010年3月29日、東京
- ⑪ 星野 力、イネ由来のトリテルペン合成酵素 AK070534 の機能解析、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京
- ⑫ 星野 力、イネ由来のシクロアルテノールおよびパルケオール合成酵素、第 53 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2009年11月8日、奈良
- ⑬ 佐藤 努、細菌由来の C₃₅ テルペンの探索と生合成研究、第 53 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2009年11月8日、奈良
- ⑭ 佐藤 努、Biosynthesis of a novel cyclic C₃₅-terpene by the cyclization of a Z-type C₃₅-polyprenyl diphosphate obtained from a nonpathogenic *Mycobacterium* species、TERPNET 2009、2009年5月26日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 努 (SATO TSUTOMU)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：80334655