

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19065

研究課題名（和文）既存モチーフ配列を有さない革新的テルペン合成酵素の探索研究

研究課題名（英文）Exploratory research for innovative terpene synthases without existing motif sequences

研究代表者

葛山 智久（Kuzuyama, Tomohisa）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：30280952

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）：ある微生物が生産する複雑な環構造をもつある生物活性物質Xの生合成に関与する遺伝子を同定することに成功した。そのXの生産に中心的な役割を担うテルペン合成酵素TC2の組換え酵素の精製を試みたところ、可溶性酵素が得られた。次に、この精製した酵素に基質と考えられたGGPPとMg<sup>2+</sup>を加えてインキュベートし、反応産物を酢酸エチルで抽出、濃縮後、GC-MSで分析したところ、生物活性物質Xと同一物質であることが判明した。以上の結果より、TC2が生物活性物質Xを生合成する酵素遺伝子であることを明らかにすることができた。これは、生物活性物質Xの生合成遺伝子を同定した初めての例として重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、複雑な化学構造をもつ生物活性物質Xの基本骨格を作り上げる生合成酵素の遺伝子を同定することに成功し、この生合成遺伝子から推定されるアミノ酸配列が、既知のテルペン合成酵素とはまったく相同性を示さない新しい酵素ファミリーであることが分かった。このような酵素の発見は、人類にとって有用な活性を示す化合物Xを大量に安価に調製するための製造方法の開発につながる成果と言える。また、この新しい酵素ファミリーに属するテルペン合成酵素をゲノムデータベースからさらに発掘して機能解析を行うことで、人類がこれまで手にしたことの無い新たな有用なテルペン化合物の発見につながる点でも重要な成果と言える。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in identifying the gene involved in the biosynthesis of a certain biologically active compound X, which has a complex cyclic structure produced by a certain microorganism. We attempted to purify the recombinant enzyme TC2, a terpene synthase that plays a central role in the production of X, and obtained a soluble enzyme. Next, the purified enzyme was incubated with Mg<sup>2+</sup> and GGPP, which was considered as a substrate, and the reaction product was extracted with ethyl acetate, concentrated, and analyzed by GC-MS, which revealed that it was identical to the biologically active product X. These data indicate that TC2 is an enzyme that biosynthesizes biologically active product X. This is an important finding as this is the first report that a biosynthesis gene for biologically active product X has been identified.

研究分野：天然物化学

キーワード：テルペン 生合成 環化酵素

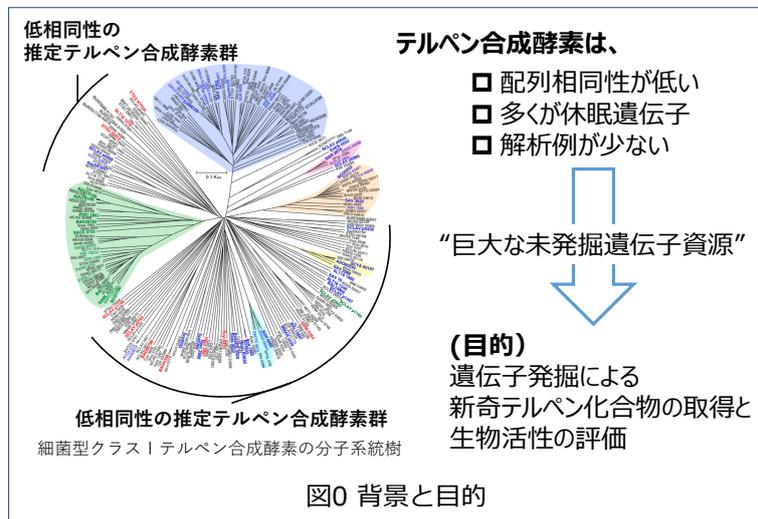
1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、我々は、ある微生物が生産する複雑な環構造をもつあるテルペン生物活性物質 X の生合成に関与する遺伝子を同定することに成功した。しかも驚くべきことに、この生合成遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、既知のテルペン合成酵素とはまったく相同性を示さない。それだけでなく、これまで解析された全てのテルペン合成酵素では例外なく存在する、酵素反応に必要な金属イオンを結合するための 2 つの短い明瞭な配列モチーフも見出すことができない。つまりこれは、既存配列とは相同性が低いために誰も気がついていないまったく新しいテルペン合成酵素の発見である。そこで、この新しい酵素ファミリーに属するテルペン合成酵素をゲノムデータベースからさらに発掘して機能解析を行うことで、新奇なテルペン化合物を発見できると着想した。

テルペン合成酵素 Y の機能は、研究開始当初、応募者だけが知り得ている実験事実であり、この情報を基に新しいテルペン合成酵素を探索する本研究課題は、探索的性質の強い芽生え期にあたる研究と言える。テルペン合成酵素 Y のように、既存配列と相同性を示さないアミノ酸配列を持った機能未知タンパク質にこそ目を向けて詳細な機能解析を行うことで、革新的な生体触媒やそれによって合成される新奇化合物を発見することができる。しかも、その遺伝子は元の生物で発現している必要はなく、大腸菌などの異種生物で強制的に発現させることで、機能解析が可能であり未知化合物を同定することができる。そして、その機能未知酵素の機能解析を起点にして新奇化合物を同定することで、有機合成研究や生理活性の研究、その作用機序の解明に向けた研究へと研究が展開していく。つまり本研究課題は、天然化合物を起点にした従来型の天然物化学研究から、機能未知酵素を起点にした研究へと天然物化学研究の方向性を大きく変革させる潜在性を有する挑戦的研究である。既存配列とは相同性を示さないアミノ酸配列からなる機能未知タンパク質の機能解析は、手がかりが圧倒的に少なくリスクを伴う研究であるが、そのような多くの研究者が手を付けることにためらう研究にこそ挑戦することで、今後、大きな成果とその展開が期待できる。

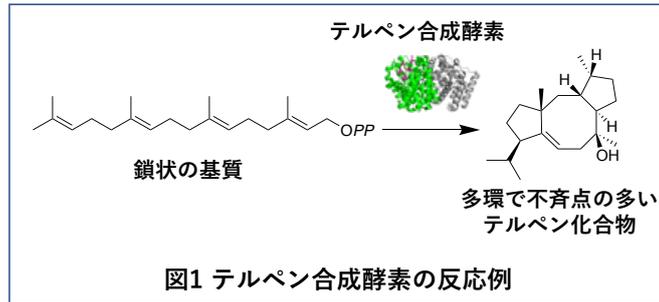
2. 研究の目的

テルペンとは、天然に約 8 万種の多様な構造の報告例がある天然物最大のグループである。テルペン類は、鎖状の基質に対してテルペン合成酵素が作用することで、複雑な多環骨格と絶対立体化学が厳密に制御されて生合成される。これまで我々は、テルペン合成酵素の発掘とその生合成機構に関する研究を推進するため、短い配列モチーフ検索も可能な隠れマルコフモデル (HMM) 法を採用し、高感度なテルペン合成酵素候補遺伝子の検出を行ってきた。さらにごく最近、我々は、驚くべきことに、既知のテルペン合成酵素とはアミノ酸配列相同性を示さず、また既知の明瞭な金属結合モチーフをもたない、まったく新しいテルペン合成酵素 Y を発見した。そこで、この発見を研究の芽として成長させるため、本研究では、その配列情報だけでなく、最近、機能同定されたテルペン合成酵素の配列情報を基に、これまで見逃されていたテルペン合成酵素を発掘するための新たな Pfam モデルを開発するとともに、新たに発掘する酵素の機能解析を行うことで、これまで誰も入手し得なかったテルペン化合物の発見を目的としている。新奇テルペン化合物の発見は、有機合成化学者や生化学者にインパクトを与えて彼らの興味を誘起することで、天然物化学研究分野のみならず生化学分野の発展に大きく貢献できる (図 0)。

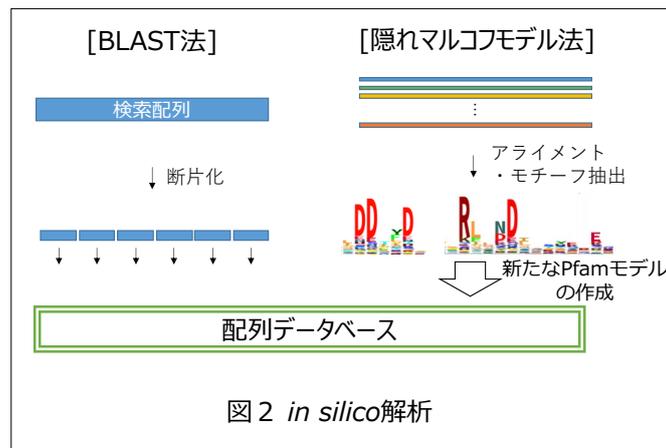


### 3. 研究の方法

テルペン合成酵素は、単独で、テルペン合成酵素マグネシウムなどの金属イオンの存在下で鎖状の基質に対して作用し、複数の炭素-炭素結合を形成し絶対立体化学を厳密に制御しながら多段階の反応を経て、複雑な多環骨格を一気に作り上げる極めて洗練された生体触媒である(図1)。



応募者はこれまでに、テルペン合成酵素 Y 遺伝子がテルペン化合物を生産する責任遺伝子であるデータを得ている。公開されているアミノ酸配列データベースには、酵素 X をクエリとした BLAST 検索において低いスコアでヒットするわずか数種の候補配列のみが存在する。そこで、まずはこの候補配列の合成 DNA を購入して、大腸菌で高発現して組換えタンパク質を調製する。タンパク質が可溶性で発現しない場合には、発現誘導条件や大腸菌宿主の変更、シャペロンの利用などを検討し、酵素活性測定に十分量の可溶性タンパク質を得る。次に、このタンパク質をテルペン合成酵素の基質候補と *in vitro* で反応させ、その反応産物を GC/MS や LC/MS 等で分析を行い、次いで反応産物を精製して NMR などで化学構造を決定する。確かにテルペン化合物であることが確認された後、新たに同定されたテルペン合成酵素の配列を利用して作成する Pfam モデルを用いて、公開されているアミノ酸配列データベースから新たにアミノ酸配列を発掘する(図2)。その後、上述のように組換えタンパク質の機能解析を行うことで、革新的なテルペン合成酵素の仲間をさらに増やし、新奇テルペン化合物を発見する。



### 4. 研究成果

テルペン合成酵素 Y (TC2) をコードする遺伝子をクローニングしたプラスミド pET-28a(+)-TC2 で大腸菌 BL21(DE3)を形質転換して、TC2 が可溶性画分として得られる培養条件を検討した。その結果、TB 培地を用いた際、誘導剤である IPTG が 10  $\mu$ M でわずかに発現、100  $\mu$ M では TC2 は大量に発現したが、ほとんど可溶画分には検出されなかった。さらに、His タグを用いて組換え TC2 を精製するため、Ni-NTA レジンカラムで精製を試みたところ、可溶性酵素として 0.3 mg 程度得られた。次に、この精製した酵素に基質と考えられた GGPP と  $Mg^{2+}$  を加えてインキュベートし、反応産物を酢酸エチルで抽出、濃縮後、GC-MS で分析したところ、TC2 を発現させた組換え菌で生産された生物活性物質 X と同一物質であることが判明した。以上の結果より、TC2 が生物活性物質 X を生合成する酵素遺伝子であることを明らかにすることができた。これは、生物活性物質 X の生合成遺伝子を同定した初めての例として重要な知見である。

加えて、酵母である *Pichia pastoris* を用いた TC2 の組換え酵素の取得も検討した。しかしながら、市販の *Pichia* Expression System を購入して TC2 の発現を試みたが、この系では TC2 の発現はまったく検出されなかった。

そこで、AlphaFold2 による構造予測を行うことにした。その結果、全体的にはテルペン合成酵素 CotB2 と似てはいるものの、CotB2 には見られないベータシートを含む構造があることが

分かった。

TC2に加えて、新たなテルペン合成酵素を見出すためのモデルを作成することを試みた。より具体的には、Pfam で用いられるテルペン合成酵素ファミリーのモデルである PF03936 では見出されないような酵素の候補を見出すため、まずバクテリア由来テルペン合成酵素に最適化したモデルの構築を行なった。近年新たに同定された酵素を含めた 110 個の既知のバクテリア由来テルペン合成酵素の配列をすべて使用してアライメントを作成し、hmmbuild プログラムにより HMM の作成を行なった。こうして得られたモデルを用いて各種データベースに登録されているバクテリアの ORF に対する hmmsearch を行なった結果、これまで見つかっていなかったテルペン合成酵素候補を収集することが可能となった。これらの中から、すでに同定されたテルペン合成酵素とは大きく異なる特性を有する酵素を見出すため、系統解析およびシーケンスシミュレーション解析を行なった。その結果、見出された 4 つのテルペン合成酵素候補について、大腸菌を用いて組換えタンパク質を調製し、GPP、FPP、GGPP の各種鎖長の基質と反応を試みた。その結果、一つの酵素については、GC/MS 分析により新たな化合物の形成を確認することができた。今回新たに作成した HMM は、新たなテルペン合成酵素を見出すためのモデルとして適しており、今後、さらに新たなテルペン合成酵素の発掘に利用できる。

その他に、海綿由来のゲノム配列とヒトのマイクロバイオーーム中のあるバクテリアのゲノム配列から、機能未知のテルペン合成酵素をコードすると予測される塩基配列を見つけることに成功した (図 3)。今後、これらの酵素の *in vitro* 解析によって、その生産する未知化合物を大量調製することで、テルペン化合物を同定する。

以上、本研究課題によって、新たなテルペン合成酵素の配列を集積することが可能になり、新たなテルペン化合物の発掘につながると期待できる。

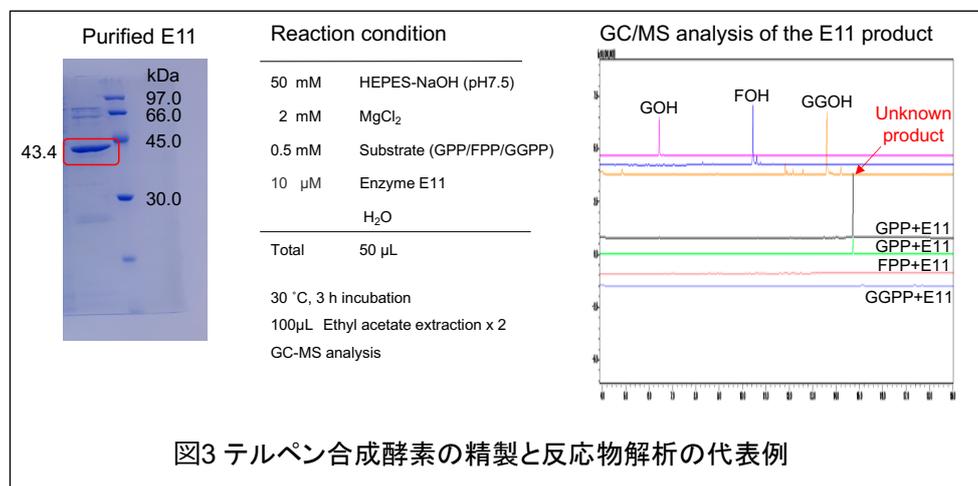


図3 テルペン合成酵素の精製と反応物解析の代表例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	浅井 禎吾  (Teigo Asai)		

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