

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 17 日現在

機関番号：13101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780114
 研究課題名（和文） 新規 C₃₅テルペン環化酵素の発掘からゲノムマイニング及び非天然型創製への展開
 研究課題名（英文） Search for novel C₃₅ terpene cyclases, genome mining and biosynthesis of unnatural natural products
 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）：枯草菌に存在する新型テルペン環化酵素を発見し、C₃₅テルペンに新しい分類名「セスクアテルペン」を命名した。その後、*Bacillus clausii*に存在するホモログをゲノムマイニングし、新規非環状セスタテルペン/トリテルペン合成酵素を同定できた。*Bacillus megaterium* から二種類のテルペンを生体内で環化する初めての二機能性テルペン環化酵素も同定した。また、マイコバクテリア由来新規セスクアテルペンを単離や、非天然型テルペンの創製も行った。

研究成果の概要（英文）：We found novel terpen cyclase from *Bacillus subtilis*, and proposed that C₃₅ terpene should be called sesquaterpene. We identified a novel acyclic sesterterpene/triterpene synthase from *Bacillus clausii*. We found first bifunctional terpene cyclase which cyclizes two class of terpenes in vivo. We also performed isolation of a novel sesquaterpene from *Mycobacterium* and biosynthesis of unnatural terpenoids.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 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：テルペノイド、テルペン、イソプレノイド、生合成、酵素

1. 研究開始当初の背景

C₃₅テルペンはあまり知られておらず特別な分類名もなかった。我々はマイコバクテリアと枯草菌に存在する C₃₅テルペンの探索と生合成研究を行っていた。すでに二機能性 Z 型プレニル鎖伸長酵素を同定するなど、それらの生合成経路はユニークであることが判明しつつあった。特に、両細菌ゲノムにおいて既知のテルペン環化酵素と類似性を示す遺伝子がないことから新型テルペン環化酵素

が存在していることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、マイコバクテリアと枯草菌に存在する新型の C₃₅テルペン環化酵素を発掘する。その後、ゲノムマイニングによる新規テルペンの発見や、基質アナログとの反応や変異型酵素との反応によって非天然型テルペンを創製する。また、天然物としての C₃₅テルペンも探索する。最終的に、本研究で得

た新規・非天然型テルペンの生物活性を調べる。本研究により、テルペノイド化合物ライブラリーの拡大を行い、新しい有用物質の開発等につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 新規 C₃₅ テルペン環化酵素の発掘： 図1と図2に示した3種類のテルペン環化酵素 (Cyc1~Cyc3) の遺伝子をクローニングし、組換え酵素の *in vitro* 反応によって3種類の環化酵素の発掘を達成する。
- 2) 新規テルペンのゲノマイニング： Cyc1~Cyc3 のホモログ遺伝子をクローニングし、組換え酵素の *in vitro* 反応によって生成する新規 C₃₅ テルペンを発見する。
- 3) 天然物探索： 菌体が生産する新規 C₃₅ テルペンを単離・構造決定する。
- 4) 非天然型テルペンの創製： 1) と 2) で得られた Cyc1~Cyc3 及びそれらのホモログを用いて実験を行う。様々な基質アナログとの反応や変異型酵素との反応によって数多くの非天然型テルペンの創製を行う。
- 5) 新規・非天然型テルペンの生物活性： 1) ~ 4) で得られた新規・非天然型テルペンの生物活性を試験し、新しい有用物質の発見を目指す。

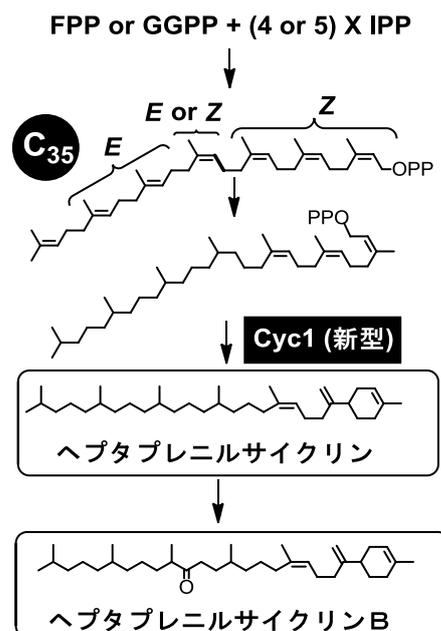


図 1

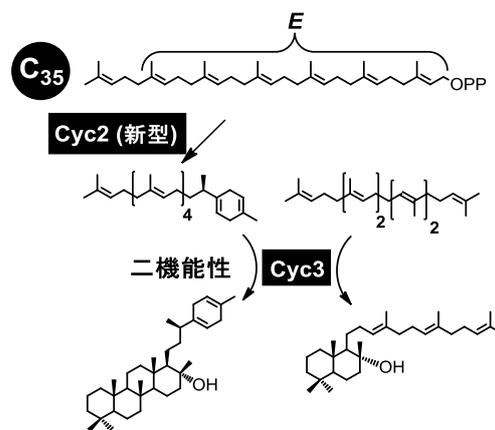


図 2

4. 研究成果

1) 新規 C₃₅ テルペン環化酵素の発掘

当初 Cyc1 遺伝子の候補と考えていたものは、*in vitro* 反応の結果、違うことが判明した。その後、スモールスケールのマイコバクテリア由来セルフリーで酵素活性を検出する手法を開発し、現在マイコバクテリアをランダム変異した後、Cyc1 欠損変異株を探索中であ

る。

枯草菌由来 Cyc2 は研究開始当初からすでに同定できていたが、つめの実験や解析が不足していた。明確な *in vitro* 反応によって、直鎖状 C₃₅ イソプレノイドの環化を経て生合成される経路を酵素・遺伝子レベルで証明でき、C₃₅テルペンに新しい分類名「セスクアテルペン」を命名した。現在、酵素的諸性質を解析中である。基質のヘプタプレニルニリン酸を共同研究によって化学合成することに成功した。

Bacillus megaterium 由来 Cyc3 をクローニングし、スクアレンとも反応する二機能性であることを明確に証明することができた (図 2)。二種類のテルペンを生体内で環化する二機能性テルペン環化酵素は初めての同定であった。

2) 新規テルペンのゲノマイニング

好アルカリ性の *Bacillus clausii* に存在する Cyc2 ホモログが新規非環状セスタテルペン/トリテルペン合成酵素であることを同定した (図 3)。したがって、Cyc2 ホモログはセスクアテルペンだけでなく様々なテルペンの合成酵素ファミリーであることが判明した。新規非環状セスタテルペンとトリテルペンは好アルカリ性の *Bacillus* に広く分布している。

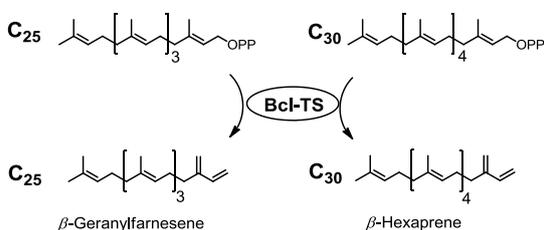


図3

3) 天然物探索

培養定常期のマイコバクテリアから見出された新規セスクアテルペンを単離・構造決定した (図 4)。マイコバクテリアのセスクアテルペンは対数増殖期までは FPP と GGPP を中間体とする経路が示唆されていたが、定常期以降は GGPP のみを経由することが判明した。また、プレニル鎖の段階的還元方向が、クロロフィルの生合成と逆であることが示唆された。

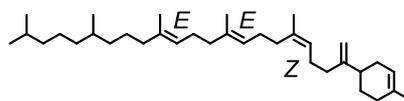


図 4

4) 非天然型テルペンの創製

Cyc3 と *B. clausii* 由来トリテルペンの反応から新規環状トリテルペンを創製できた。また、Cyc2 の部位特異的変異実験から非天然型セスクアテルペンを検出できた。現在、単離・構造決定を行っている。

5) 新規・非天然型テルペンの生物活性

現在、1) ~ 4) で得られた新規・非天然型テルペンの生物活性を試験している。

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 6 件)

- 1) Sato, T., Yoshida, S., Hoshino, H., Tanno, M., Nakajima, M., Hoshino, T., Sesquiterpenes (C₃₅ terpenes) biosynthesized via the cyclization of a linear C₃₅ isoprenoid by a tetraprenyl-β-curcumene synthase and a

- tetraprenyl- β -curcumene cyclase: identification of a new terpene cyclase, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737, 2011. 査読有, doi: 10.1021/ja203779h.
- 2) Sato, T., Hoshino, H., Yoshida, S., Nakajima, M., Hoshino, T., Bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase: tetraprenyl- β -curcumene cyclase is also squalene cyclase in *Bacillus megaterium*, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 17540-17543, 2011. 査読有, doi: 10.1021/ja2060319.
- 3) Ito, R., Mori, K., Hashimoto, I., Nakano, C., Sato, T., Hoshino, T., Triterpene cyclases from *Oryza sativa* L.: cycloartenol, parkeol and achilleol B synthases, *Org. Lett.*, 13, 2678-2681, 2011. 査読有, doi: 10.1021/ol200777d.
- 4) Sato, T., Ono, E., Nakajima, M., Nakano, C., Hoshino, T., Insight into the pathway for biosynthesis of sesquiterpenes in nonpathogenic *Mycobacterium* species: Identification of heptaprenylcyclin-14E, 18E-diene, *Tetrahedron Lett.*, 53, 2522-2524, 2012. 査読有, doi:10.1016/j.tetlet.2012.03.019.
- 5) T. Sato, H. Yamaga, S. Kashima, Y. Murata, T. Shinada, C. Nakano, and T. Hoshino, Identification of novel sesterterpene/triterpene synthase from *Bacillus clausii*, *Chembiochem*, 14, 822-825 (2013). 査読有, doi:10.1002/cbic.201300035.
- 6) T. Sato, Unique Biosynthesis of Sesquiterpenes (C₃₅ Terpenes), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press. 査読有
- 7) 佐藤努, ユニークなセスクアテルペン (C₃₅ テルペン) 生合成経路: 今までに類のない新
型と二機能性テルペン環化酵素の同定、化学と生物、50 巻、622-623 (2012). 査読有
[学会発表] (計 17 件)
- 1) "細菌由来の sesquiterpenes (C₃₅ テルペン): ユニークな生合成酵素の同定と新規天然物探索", 佐藤努, 星野 紘子, 吉田 悟, 滝沢 和央, 折戸 悠梨子, 高木 亮輔, 丹野 瑞樹, 工藤 はなよ, 小野恵梨, 中島 真美, 星野 力, 第 5 3 回天然有機化合物討論会, 2011 年 9 月 28 日, 大阪国際交流センター
- 2) "セスクアテルペン (C₃₅ テルペン): 新型テルペン環化酵素の同定", 佐藤努, 吉田 悟, 星野 紘子, 丹野 瑞樹, 中島 真美, 星野 力, 第 5 5 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2011 年 11 月 20 日, 筑波大学
- 3) "*Bacillus* 属由来の sesquiterpenes (C₃₅ テルペン): 新型テルペン環化酵素と二機能性テルペン環化酵素の同定", 佐藤努, 吉田 悟, 星野 紘子, 丹野 瑞樹, 中島 真美, 星野 力, 第 2 1 回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会, 2011 年 11 月 4 日, 島根大学
- 4) "メタゲノム由来モジュールライブラリーを用いた非天然型ペプチドの創出", 佐藤努, 科学研究費補助金新学術領域研究生合成マシナリー第 3 回公開シンポジウム, 2011 年 12 月 3 日, 東京大学
- 5) "好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌由来の新規非環状セスタ・トリテルペンおよび新規テルペン合成酵素の同定", 佐藤努, 山鹿 宏彰, 鹿島 将志, 中島 真美, 仲野 千秋, 星野力, 日本農芸化学会, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学
- 6) "セスクアテルペン (C₃₅ テルペン) の探索と生合成に関する研究", 佐藤努, 日本農芸化学会, 2012 年 3 月 24 日, ウェスティン

都ホテル京都

- 7) "Biosynthesis of sesquiterpenes (C35 terpenes): identifications of a new terpene cyclase and a bifunctional terpene cyclase", Tsutomu Sato, The International Conference of Natural Product Biosynthesis, 2012年6月19日, 淡路夢舞台
- 8) "新規非環状セスタテルペン・トリテルペンおよび2つの新規二機能性酵素によって触媒される head-to-tail 生合成", 佐藤 努, 山鹿 宏彰, 仲野 千秋, 星野 力, 第22回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会, 2012年9月29日, 新潟大学
- 9) "新規非環状セスタテルペン、トリテルペンおよび新規二機能性テルペン合成酵素の同定", 佐藤 努・山鹿宏彰・仲野千秋・星野 力, 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2012年10月28日, 鹿児島大学
- 10) "*Mycobacterium* 属細菌由来セスクアテルペン生合成経路の解析", 佐藤 努・小野恵梨・尾崎真夢・仲野千秋・星野 力, 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2012年10月28日, 鹿児島大学
- 11) "メタゲノム由来モジュールライブラリーを用いた非天然型ペプチド創出", 佐藤 努, 山之内健太, 若林 広恵, 橋本昌征, 内山拓, 兼目裕充, 浅川義範, 白川隆, 仲野千秋, 星野力, 日本農芸化学会関東支部会, 2012年10月27日, 新潟薬科大学
- 12) "セスクアテルペン (C35 テルペン) の探索と生合成に関する研究", 佐藤努, 日本農芸化学会関東支部会, 2012年10月28日, 新潟薬科大学
- 13) "メタゲノム由来モジュールライブラリーを用いた非天然型ペプチドの創出", 佐藤努, 科学研究費補助金新学術領域研究生

合成マシナリー第4回公開シンポジウム, 2012年12月7日, 東京大学

- 14) "三機能性セスタテルペン/トリテルペン/セスクアテルペン合成酵素の同定及び環状・非環状構造の決定に関するアミノ酸残基の探索", 佐藤 努, 小坂明彩香, 山本彩乃, 山鹿宏彰, 村田悠輔, 品田哲郎, 仲野 千秋, 星野 力, 日本農芸化学会, 2013年3月25日, 東北大学
- 15) "テトラプレニル- β -クルクメン環化酵素のさらなる能力の解析", 佐藤 努, 上田大次郎, 岡本 渉, 仲野千秋, 星野 力, 日本農芸化学会, 2013年3月27日, 東北大学
- 16) "植物毒素チコリン生合成遺伝子の全塩基配列の決定", 佐藤 努, 山之内健太, 若林広恵, 橋本昌征, 兼目裕充, 浅川義範, 白川 隆, 仲野千秋, 星野 力, 日本農芸化学会, 2013年3月27日, 東北大学
- 17) "細菌由来の新型および多機能性テルペン合成酵素の探索", 佐藤努, 日本農芸化学会, 2013年3月27日, 東北大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~satot/index.html>

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