

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450149

研究課題名(和文) セスクアテルペン生合成酵素を基軸とする新規テルペノイド類創出系路の開拓

研究課題名(英文) Creation of novel terpenoids from biosynthetic study on sesquiterpene

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムマイニングおよび基質許容性解析・多機能性解析から新規テルペンの発見や非天然型テルペンの創出を達成することができた。特に、オノセロイド(スクアレンの両末端環化によって生合成されるトリテルペン)合成酵素を初めて見いだすことができた。加えて、香料や媚薬として利用される龍涎香の主成分アンブレインの酵素合成に成功した。マイコバクテリア由来の新型酵素の発掘や新規酵素の触媒機構解析も順調に進んだ。

研究成果の概要(英文)：Genome mining and analysis of multifunction of enzyme found novel terpenes. Onoceroid synthase was first identified. In addition, enzymatic synthesis of ambrein was succeeded. Search for novel type of terpene synthase from Mycobacterium and analysis of catalytic mechanism of novel enzyme were also steadily performed.

研究分野：生物有機化学

キーワード：テルペン テルペノイド イソプレノイド 生合成

## 1. 研究開始当初の背景

テルペン類は、自然界より数多く見出され、その中には興味ある生物活性と構造多様性を備えた化合物が多く含まれている。テルペン類は、イソプレン構造が連続した鎖状テルペンを共通の基質とし、酵素反応によって様々な分子へと生合成される。応募者は枯草菌のセスクアテルペン (C<sub>35</sub> テルペン) 生合成研究から、新型テルペン環化酵素を発見し、ゲノム解析による未利用生合成遺伝子資源の発掘 (ゲノムマイニング)、および基質許容性解析・多機能性解析から、新規テルペンを見出すことに成功していた。

## 2. 研究の目的

今回、枯草菌関連の研究に加えて、新たにマイコバクテリアからの新型酵素の発掘、酵素改変による非天然型テルペンの創出、新規酵素の触媒機構解明 (X 線構造解析) および鎖状テルペン基質の合成化学的供給による酵素的諸性質解析・新規テルペン合成を行う。これらを循環させることにより、新規有用テルペン類創出の新しい道筋を開拓する。

## 3. 研究の方法

新型酵素発掘からゲノムマイニング、基質許容性解析・多機能性解析および酵素改変を行い、最終的に生理活性試験から新しい有用物質を発見する。

以下の流れで研究を行う。

- (1) 新型テルペン合成酵素を発掘し、触媒機構を解明する。
- (2) 新型テルペン合成酵素ホモログのゲノムマイニングを行い、酵素が合成する新規テルペンを見出す。
- (3) テルペン生合成酵素及びそれらのホモログの基質許容性解析・多機能性解析を行い、新規・非天然型テルペンを見出す。
- (4) テルペン生合成酵素及びそれらのホモログの酵素改変を行い、希少・非天然型

テルペンを創出する。

- (5) 新規・非天然型テルペンの生理活性試験を行い、新しい有用物質を発見する。

## 4. 研究成果

- (1) *Bacillus* 属由来セスクアテルペンの生合成に寄与する新型テルペン合成酵素について、酵素化学的諸性質を解析するとともに X 線結晶構造解析を試みた。また、マイコバクテリア由来セスクアテルペンの生合成に寄与する新型テルペン合成酵素に関しては、NTG によるランダム変異株の解析を進め、セスクアテルペンを生合成しない株を見出した。
- (2) 新型テルペン合成酵素 (TS) ホモログのゲノムマイニングを行った。特に、嫌気性の好熱性酢酸生産菌 *Moorella thermoacetica* の TS ホモログから新規セスクアテルペンを検出できた。本研究により、*Bacillus* 属以外の細菌においても TS ホモログがテルペン合成酵素ファミリーとして機能していることを初めて明らかにすることができた。また、TS ホモログは他の様々な嫌気性細菌に存在しており、新規セスクアテルペンのようなテルペンの嫌気性細菌における生理機能も興味深いと考えている。
- (3) *Bacillus megaterium* 由来の tetraprenyl- $\beta$ -curcumene 環化酵素 (BmeTC) が、生体内において C<sub>30</sub> のスクアレン (3) も環化する二機能性酵素であることを明らかにした (図 1)。今回、スクアレンからの二環性生成物 (4) が、さらに BmeTC 酵素内に取り込まれて化合物 5 と 6 を生産することを新たに見出したので報告する (図 1)。5 と 6 は *B. megaterium* 菌体内に存在する天然物であった。スクアレンの両末端環化によって生合成されるトリテルペンはオノセロイドと呼ばれているが、オノセロイ

ド合成酵素の同定は初めての例である。オノセロイドは動物、高等植物、シダ植物から見出されているが、バクテリアからの発見は初めてである（5はシダ植物から単離されているが、6は新規天然物である）。本研究によって、対称および非対称構造のオノセロイドが、1つの酵素によって、片側末端が環化した中間体を経て生合成されることを初めて証明することができた。

さらに、BmeTC の新たな機能を利用して、自然界から入手困難な龍涎香（マッコウクジラ由来の高級香料）の主成分 ambrein(8)を容易に入手可能な3から、変異型スクアレン-ホペン環化酵素の触媒反応を経て、酵素合成することに成功した（図2）

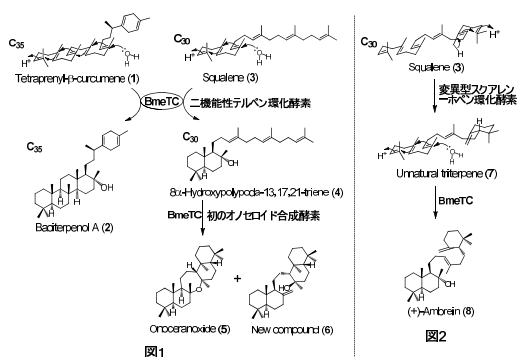


図1

図2

(4)  $\beta$ -hexaprene を基質とした TC の反応生成物は図3の2と3であった。TC は4環を形成する酵素であるが、5環まで形成する能力があることが判明した。自然界には tail-to-tail 型のトリテルペンが存在するが、今回は非天然型 head-to-tail 5環性トリテルペンを合成できた。

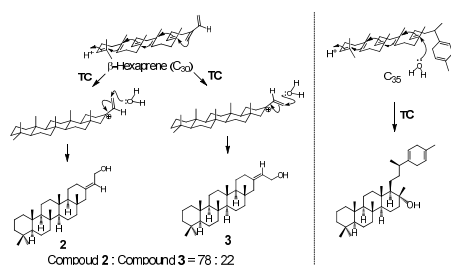


図3

(5) *Bacillus clausii* から、三機能性 E 型プレニル鎖伸長酵素 ( $C_{25}/C_{30}/C_{35}$ ) と三機能性テルペン合成酵素 ( $C_{25}/C_{30}/C_{35}$ ) を同定した。特に、本研究は、多機能性 E 型プレニル鎖伸長酵素の同定にイソプレノイド代謝物の解析が極めて重要であることを示した。

## 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) Ueda, D., Yamaga, H., Murakami, M., Totsuka, Y., Shinada, T., Sato, T.\*, Biosynthesis of sesterterpene, head-to-tail triterpene, and sesquarterpene in *Bacillus clausii*: identification of multifunctional enzymes and analysis of isoprenoid metabolites, *ChemBioChem*, 2015, 16, 1371-1377. doi: 10.1002/cbic.201500138 査読有
- 2) 上田大次郎、星野力、佐藤努\*、龍涎香の主成分アンブレインの酵素合成、*Aroma Research*, 2015, 16, 142-143. <http://www.fragrance-j.co.jp/book/b210317.html> 査読無
- 3) 上田大次郎、星野力、佐藤努\*、龍涎香の主成分アンブレインの酵素合成、*バイオサイエンスとインダストリー*, 2014, 72, 410-411. [http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/vol71\\_no3\\_1.html](http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/vol71_no3_1.html) 査読無
- 4) Ueda, D., Hoshino, T., Sato, T.\*, Cyclization of squalene from both termini: identification of an onoceroid synthase and enzymatic synthesis of ambrein, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335-18338. doi: 10.1021/ja4107226 査読有
- 5) Sato, T.\*, Yamaga, H., Kashima, S., Murata, Y., Shinada, T., Nakano, C., Hoshino, T.,

Identification of novel sesterterpene/triterpene synthase from *Bacillus clausii*, **ChemBioChem**, 2013, 14, 822-825. doi: 10.1002/cbic.201300035 査読有

- 6) Okamoto, W., **Sato, T.**\*, Enzymatic syntheses of unnatural head-to-tail pentacyclic triterpenes by tetraprenyl- $\beta$ -curcumene cyclase, **Tetrahedron Lett.**, 2013, 54, 6747-6750. doi:10.1016/j.tetlet.2013.09.135 査読有
- 7) **Sato, T.**\*, Unique biosynthesis of sesquiterpenes (C<sub>35</sub> terpenes). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 2013, 77, 1155-1159. Doi: org/10.1271/bbb.130180 査読有

[学会発表](計 23 件)

藤井友里恵・田中勇真・藤橋雅宏・三木邦夫・河合優人・中島田豊・品田哲郎・佐藤努、*Moorella thermoacetica* 由来テトラプレニル- $\beta$ -クルクメン合成酵素ホモログのゲノムマイニング、日本農芸化学会、2B022、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

奥野 琴音・上田大次郎・星野力・佐藤努、スクアレンからアンブレインへの一段階酵素合成、日本農芸化学会、2B023、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

高橋 宏忠・高橋秀長・佐藤努、納豆菌におけるテトラプレニル- $\beta$ -クルクメン環化酵素の新たな機能、日本農芸化学会、2B024、2016年3月28日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Wataru OKAMOTA, and **Tsutomu SATO**, Enzymatic syntheses of

unnatural head-to-tail pentacyclic triterpenes by sesquiterpene cyclase, Pacificchem 2015, BIOL 706, 2015年12月18日、ホノルル(ハワイ)

Daijiro UEDA, Tsutomu HOSHINO, **Tsutomu SATO**, Cyclization of squalene from both termini: identification of an onoceroid synthase and enzymatic synthesis of ambrein, Pacificchem 2015, BIOL 707, 2015年12月18日、ホノルル(ハワイ)

上田大次郎・山鹿宏彰・村上瑞気・遠塚悠輔・品田哲郎・佐藤努、*Bacillus clausii* におけるセスタテルペン、Head-to-tail トリテルペンおよびセスクアテルペンの生合成:多機能性酵素の同定とイソプレノイド代謝物の解析、第67回日本生物工学会、p. 338、2015年10月26日~10月28日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

Daijiro UEDA, Hiroaki YAMAGA, Mizuki MURAKAMI, Yusuke TOTSUKA, **Tetsuro SHINADA**, and **Tsutomu SATO**, Biosynthesis of Sesterterpenes, Head-to-Tail Triterpenes, and Sesquiterpenes in *Bacillus clausii*: Identification of Multifunctional Enzymes and Analysis of Isoprenoid Metabolites, KAAB International Symposium 2015年9月29日, P-4, 2015、新潟大学(新潟県・新潟市)

上田大次郎・山鹿宏彰・村上瑞気・遠塚悠輔・品田哲郎・佐藤努、*Bacillus clausii* におけるセスタテルペン、Head-to-tail トリテルペン、セスクアテルペンの生合成:多機能性酵素の同定とイソプレノイド代謝物の解析、第25回イソプレノイド研究

会、p. 10、2015年9月14日、東北大学（宮城県・仙台市）

上田大次郎・山鹿宏彰・村上瑞気、遠塚悠輔・品田哲郎・佐藤 努、*Bacillus clausii* におけるイソプレノイド生合成経路：多機能性 E 型プレニル鎖伸長酵素の同定とセスクアテルペン代謝物の探索、第 59 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、pp. 148-150、2015年9月6日、近畿大学（大阪府・東大阪市）

佐藤 努、セスクアテルペン環化酵素を基軸とするテルペン創出・応用経路の拡充、第 16 回酵素応用シンポジウム、pp. 8-9、2015年6月12日、天野エンザイム（愛知県・北名古屋）

Daijiro UEDA, Tsutomu HOSHINO, Tsutomu SATO, Cyclization of squalene from both termini: identification of an onoceroid synthase and enzymatic synthesis of ambrein, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia, p. 215, 2015年8月30日～2015年9月2日、徳島文理大学（徳島県・徳島市）

上田大次郎・村上瑞気・山鹿宏彰・佐藤 努、*Bacillus clausii* におけるイソプレノイド生合成経路：多機能性 E 型プレニル鎖伸長酵素の同定とセスクアテルペン代謝物の探索、日本農芸化学会、3E11p13、2015年3月28日、岡山大学（岡山県・岡山市）

岡本渉・佐藤 努、*Bacillus megaterium* 由来ファルネシルファルネシルアセトンの単離と非酵素的なメナキノンの開裂、日本農芸化学会、3E11p13、2015年3月28日、岡山大学（岡山県・岡山市）

上田大次郎・山鹿宏彰・岡本 渉・遠

塚悠輔・品田哲郎・星野 力・佐藤 努、セスクアテルペン環化酵素を基軸とするテルペン創出経路の開拓、第 56 回天然有機化合物討論会講演要旨集、pp. 103-108、2014年10月16日、高知県立県民文化ホール（高知県・高知市）

上田大次郎・星野 力・佐藤 努、龍涎香の主成分アンブレインの酵素合成、第 58 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、pp. 333-335、2014年9月21日、和歌山大学（和歌山県・和歌山市）

上田大次郎・星野 力・佐藤 努、スクアレンの両末端環化：オノセロイド合成酵素の初めての同定および龍涎香主成分 ambrein の酵素合成、第 24 回イソプレノイド研究会例会、p. 21、2014年9月21日、岡山大学（岡山県・岡山市）

上田大次郎・星野 力・佐藤 努、スクアレンの両末端環化：オノセロイド合成酵素の初めての同定および龍涎香主成分 ambrein の酵素合成、第 55 回新潟生化学懇話会、p. 62、2014年6月28日、長岡技術科学大学（新潟県・長岡市）

上田大次郎・星野 力・佐藤 努、スクアレンの両末端環化：オノセロイド合成酵素の初めての同定および龍涎香主成分 ambrein の酵素合成、酵素工学研究会、B-1、2014年4月26日4、九州大学（福岡県・福岡市）

上田大次郎・星野 力・佐藤 努、スクアレンの両末端環化：オノセロイド合成酵素の初めての同定および龍涎香主成分 ambrein の酵素合成、日本農芸化学会、講演番号：3A04a10、2014年3月29日、明治大学（神奈川県・川崎市）

Tsutomu SATO, Biosynthesis of Sesquiterpenes (C<sub>35</sub> Terpenes): Identifications of a New Terpene Cyclase and a Bifunctional Terpene Cyclase, 1<sup>st</sup> US-Japan Seminar on Biosynthesis of Natural Products For Young Researcher, p. 25, 2014年3月3日、東京工業大学(東京都)

- 21 上田大次郎・岡本 渉・山本彩乃・遠塚悠輔・品田哲郎・仲野千秋・佐藤 努、セスクアテルペン環化酵素の部位特異的変異および非天然型テルペンの創出、第57回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、pp. 369-371、2013年10月6日、埼玉大学(埼玉県・さいたま市)
- 22 山鹿宏彰・遠塚悠輔・品田哲郎・仲野千秋・佐藤 努、*Bacillus clausii*由来のE型プレニル鎖伸長酵素の機能同定による非環状テルペン生合成経路、第23回イソプレノイド研究会例会、p. 2、2013年9月14日、東京大学(東京都)
- 23 岡本 渉・山本彩乃・上田大次郎・仲野千秋・佐藤 努、セスクアテルペン生合成：テトラプレニル-β-クルクメン合成酵素の部位特異的変異およびテトラプレニル-β-クルクメン環化酵素による非天然型トリテルペンの創出、第23回イソプレノイド研究会例会、p. 3、2013年9月14日、東京大学(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：変異型テトラプレニル-β-クルクメン環化酵素及びアンブレインの製造方法  
発明者：佐藤努、奥野琴音、竹花稔彦、小池

誠治

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-042661

出願年月日：平成 28 年 03 月 04 日

国内外の別： 国内

○取得状況(計1件)

名称：アンブレインの製造方法

発明者：佐藤努、上田大次郎、星野力

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2 0 1 3 - 1 8 4 1 4 3

出願年月日：平成 2 5 年 9 月 5 日

国内外の別： 国内

〔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

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

藤橋 雅宏 (FUJIHASHI, Masahiro)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：10397581

品田 哲郎 (SHINADA, Tetsuro)

大阪市立大学・理学研究科・教授

研究者番号：30271513