

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07407

研究課題名(和文) 生合成力を活用した複雑精緻な構造を有する生理活性ジテルペノイドの創製

研究課題名(英文) Biosynthetic enzymes-guided synthesis of intricate diterpenes

研究代表者

川出 洋 (Kawaide, Hiroshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20291916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：当研究課題において、強力な生理活性物質類を含むユーフォルビア科植物から生理活性ジテルペノイドに焦点を絞り、化合物の骨格構築に関与するジテルペン環化酵素遺伝子の取得と機能解析を目的とした。ハナキリン(*Euphorbia milli*)、アオサンゴ(*E. turicalli*)を研究材料として入手し、地上部について次世代シーケンサによる網羅的mRNA発現解析を行った。両植物からそれぞれ4万を超える遺伝子情報を入力し、各種解析からジテルペン環化酵素様遺伝子をハナキリンから4種、アオサンゴから3種取得した。アオサンゴからカウレン生合成酵素を同定し、ハナキリンから機能未知ジテルペン環化酵素を見出した。

研究成果の概要(英文)：Euphorbiaceae plants produce potent bioactive diterpenoid metabolites such as phorbol esters and ingenol-related compounds. To determine biosynthetic enzyme genes involved in phorbol and ingenol biosyntheses, two species (*Euphorbia milli* and *Euphorbia tirucalli*) was used as plant materials for analysis of mRNA expression by next-generation sequencer (RNAseq analysis). RNAseq analyses for screening of mRNAs encoding terpene-biosynthetic enzymes detected eleven sequences and five sequences from *E. milli* and *E. turicalli*, respectively. Based on the analyses of BLAST and HMMER searches, we isolated four genes (EmDTC-15, EmDTC-16, EmDTC-23 and EmDTC-24) and three genes (EtDTC-1, EtDTC-4 and EtDTC-5) as putative diterpene cyclase genes from *E. milli* and *E. turicalli*, respectively. As the results of functional analysis, one gene, EtDTC-1, encodes ent-kaurene synthase, and another gene, EmDTC-24 encodes an unknown diterpene cyclase that recognizes ent-copalyl diphosphate as a substrate.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ジテルペン 生合成 植物テルペノイド 環化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

テルペノイドと呼ばれる一群の天然有機化合物は、数万種類とも言われる構造多様性と動植物昆虫の各種ホルモン・抗がん活性(パクリタキセルなど)・抗マラリア活性(アルテミシニンなど)・抗菌活性(モミラクトン, ファイトカサン類など)を初めとする、極めて多彩な生理活性を有する化合物群を形成する。その一方で、テルペノイドのような複雑精緻な化学構造を有する天然生理活性物質は、有機合成による全合成が困難な場合が多く、魅力的な生理活性も有機合成化学の力が及ばないことも多い。

天然有機化合物をリード化合物として有機合成化学的な手法で開発された生理活性物質は意外なほど身近に多く存在している。上図のように、天然有機化合物を原料にした医薬品開発へと実用化されてきたものには著名なものが多い。一方、近年になって天然有機化合物の供給源を生物資源の抽出から生合成力を用いて行おうとする試みが数多くなされてきているが、特筆すべき画期的成果としては、Keaslingらによる抗マラリア薬として期待されている植物セスキテルペノイドのアルテミシニンが上げられる(Nature, 2013)。遺伝子導入酵母にアルテミシニン中間体を生産させ、数ステップの有機合成でアルテミシニンへ導く方法を報告している。

ホルボールエステル(PhorE)は、トウダイグサ(*Euphorbiaceae*)科植物の多くが生産する生理活性ジテルペノイドであり、発癌プロモーター活性を有することから生化学試薬としても市販されている。その一方で、抗癌活性、抗ウイルス活性、抗マラリア活性など、基本骨格の修飾が改変されると有用な医薬品として開発される可能性を持つ。ホルボールエステルならびに類縁化合物のインゲノール類は、それらの魅力的な生理活性のほかに、極度に歪んだ炭素骨格構造を有していることから有機合成化学者にとっては全合成研究の格好のターゲットになっている(JACS, 1989, 2002, 2003)。しかしながら、ホルボールエステルやインゲノールの生合成に関する研究報告は皆無に近く、基本骨格となる *tigliane* などは想像上の化合物として考えられているだけである。

研究代表者は、これまでテルペノイド生合成に関わる多くの酵素を大腸菌等から組換

えタンパク質として調製し、反応条件を最適化することで試験管内で酢酸分子から炭素数20のジテルペノイド類の全合成や安定同位体元素標識された化合物の合成と多次元核磁気共鳴スペクトル解析(NMR解析)から複雑精緻なテルペン構造の構造解析に取り組んできた(基盤研究C:平成18~19年, 基盤研究C:平成24年~26年)。

## 2. 研究の目的

本研究はPhorEを生産する入手可能なユーフォルビア科植物(*Euphorbia milli*:和名ハナキリンおよび*E. tirucalli*:和名アオサングまたはミルクブッシュ)からRNAseqデータとタンパク質配列情報を整理し、PhorE基本骨格を構築する生合成酵素を含むジテルペン環化酵素遺伝子の取得と酵素機能の解析に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の2つに焦点を当てて研究を実施した。

(1)次世代シーケンサによる遺伝子発現解析(RNAseq)と(2)テルペン環化酵素の*in silico*スクリーニング

(2)組換え酵素生産と酵素機能解析  
以下に、各項目について説明する。

### (1) RNAseq と *in silico* スクリーニングについて

ユーフォルビア科植物の中でPhorE生産に関して論文記載の文献があり、なおかつ容易に入手できる植物としてハナキリン(*Euphorbia milli*)とアオサング(*E. tirucalli*)を購入した。当初、研究計画に記載したハズ(*Croton tyglum*)や*Euphorbia amygdaloides*は入手が容易でなかったため実験に供試しなかった。

入手した*E. milli*と*E. tirucalli*植物を温室内(26℃)で栽培した系頂部を含む伸長過程の茎葉部から全RNAを抽出した。バイオアナライザーで抽出した各RNAの純度検定を行い、定法に従い次世代シーケンサ(pair-end法)で解析を行った。得られたデータからRaw Read数として8千万以上を確認し、トリミング処理、*de novo*アセンブリ処理、ORF予測、予測アミノ酸配列への翻訳処理をおこなった。その結果、双方のサンプルよりそれぞれ4万程度の配列を取得した。

BLAST 法と HMMER による活性部位などのモチーフ相溶性解析より、テルペン生合成に関わる遺伝子を *E. milli* から約 11 配列、*E. tirucalli* からは約 5 配列の情報を得た。

#### (2) 組換え酵素生産と酵素機能解析

(2) - *E. milli* のテルペン環化酵素について。

約 11 の配列からジテルペン生合成に関与すると考えられる環化酵素の絞り込みを行った。植物におけるジテルペン炭化水素の生合成は葉緑体に局在する環化酵素によって触媒される。約 11 の配列から細胞内局在予測解析等を行い、葉緑体に移行すると予測されたジテルペン環化酵素遺伝子配列は 4 種類に絞られた。

(2) - *E. turicalli* のテルペン環化酵素について。

*E. milli* と同様、葉緑体局在のための移行配列をもとに 5 配列を調べ、このうち 3 種類がジテルペン環化酵素遺伝子と考えられた。

そこで、(1) で候補に挙げた遺伝子および (2) - (2) - から絞られた遺伝子については、いずれも PCR による完全長 cDNA の取得を試みた。PCR で増幅が観られない遺伝子は地上部での発現や弱いなどの問題が考えられたので、今回は実験の対象から除くことにした。完全長 cDNA が得られない (RACE 実験がうまく行かないもの) 候補遺伝子については、葉緑体移行シグナルと予想された部分を truncate されたタンパク質翻訳領域にターゲットを絞った遺伝子クローニングを行った。これらは、大腸菌による組換えタンパク質生産を試み、組換えタンパク質発現用ベクター (pQE 系、pCold 系、pGEX 系) と大腸菌宿主株との適合をチェックしながら組換え酵素の生産と精製に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

研究方法 (2) - に関して、*E. milli* から得られた 4 種類のジテルペン環化酵素遺伝子 (EmDTC-15, EmDTC-16, EmDTC-23, EmDTC-24) の大腸菌による生産を試みた結果、EmDTC-15, EmDTC-16 および EmDTC-23 酵素は組換え酵素の生産性に再現性が得られず、宿主ベクター系の再構築を今後検討することになった。EmDTC-24 酵素に関しては His-tagged 酵素として大腸菌生産がうまく行き、酵素機能を調べた。*ent*-copalyl diphosphate を基質にした時、GC-MS 分析上で構造既知のジテルペン炭化水素と一致しないマススペクトルが得られた。そこで、完全 <sup>13</sup>C 標識メバロン酸を出発原料にして完全 <sup>13</sup>C 標識化した構造未知ジテルペンを酵素的に合成し、<sup>13</sup>C を主たる観測核種にした多次元

NMR 測定し構造解析を行っている。

次に、研究方法 (2) - に関して *E. turicalli* から得られた 3 種類のジテルペン環化酵素 (EtDTC-1, EtDTC-4, EtDTC-5) の大腸菌による生産を試みた結果、EtDTC-4 と EtDTC-5 酵素は組換え酵素の生産性に再現性が得られず、宿主ベクター系の再構築を今後検討することになった。EtDTC-1 は、組換え酵素の生産が大腸菌で可能であり、機能解析の結果 *ent*-カウレン合成酵素と判明した

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
<http://web.tuat.ac.jp/~chemreg/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川出 洋 (KAWAIDE, Hiroshi)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20291916

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
なし( )