

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007年4月-2009年3月

課題番号:19510220

研究課題名(和文)

原核生物に見出された新規ジテルペン環化酵素の機能解析と応用

研究課題名(英文)

Studies on diterpene cyclases found in eubacteria

研究代表者

大利 徹 富山県立大学・工学部・准教授 研究者番号 70264679

研究成果の概要:

ジテルペン化合物は(炭素数 20)、香料、医薬・医薬中間体、植物ホルモンなど重要な化合物を含んでいる。これら化合物の生合成の第一段階は、環化酵素が直鎖状の基質であるゲラニルゲラニル 2 リン酸の末端オレフィンをプロトン化、または 2 リン酸を脱離することによってカルボカチオンを生成することから始まる。最終的にカルボカチオンが捕捉中性化されるまで、各環化酵素特有のカチオン中間体を経る反応が順次進行し、多種多様なイソプレノイド骨格へと導かれる。反応の第一段階が共通であるにもかかわらず、最終的に多様な骨格を持つ化合物が生成する事実は、環化酵素の特定アミノ酸残基のみが反応に関与するのではなく、酵素全体のアミノ酸残基が種々のカルボカチオン中間体の生成に関与することを示唆する。従って、これら環化酵素の構造機能相関解析を行うことにより、任意の段階でカルボカチオンが捕捉中性化された化合物の生成を制御できる可能性がある。しかし環化酵素に関しては、真核生物を材料に用いた場合、酵素調製が難しいことなどから一部の酵素を除いて殆ど解析が行われていない。

このような背景下、筆者は原核生物と真核生物起源のイソプレノイド生合成遺伝子を多数取得しており、今回、(1) お米由来の 2 つの *ent-copalyl diphosphate* 生合成酵素、(2) 原核生物の *Nocardia* 属放線菌が生産するジテルペン化合物、*brasiliocardin A* 生合成遺伝子クラスターの取得、(3) 原核生物の *Streptomyces* 属放線菌により生産されるテトラテルペン化合物 (KS-505a) 生合成遺伝子クラスターの取得とこれらの機能解析を行った。

交付額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：2401

キーワード：放線菌、ジテルペン、サイクラゼ

研究開始当初の背景

イソプレノイド環化酵素の反応機構に関しては、炭素数 30 のトリテルペン環化酵素を用いて詳細な研究が行われている。しかしながら炭素数 20 のジテルペン化合物、および炭素数 40 のテトラテルペン化合物は、これまでに取得されている遺伝子が少ないことから、トリテルペンのような詳細な解析はなされていない。ジテルペンでは、植物ホルモンであるジベレリンの生合成に関与する *ent-copalyl diphosphate* (e-CDP) 生合成酵素と *ent-kaurene* 生合成酵素の遺伝子がカビと植物から、抗がん剤として開発が進められている *taxol* の生合成中間体である *taxadiene* 生合成酵素がいちいの木から、*abietadiene* 生合成酵素がもみの木から、*aphidicolan-16 beta-ol* 生合成酵素がカビから、また、つい最近、お米の *phytoalexins* の生合成に関与するジテルペン環化酵素が相次いで同定されたが、未だに数えられる程度の取得例しかない。しかも、これらの殆どは、定性的には組換え酵素を用いて触媒する反応が明らかにされているが、詳細な酵素学的諸性質についてはジベレリン生合成酵素と *abietadiene* 生合成酵素を除くと不明なままである。さらにテトラテルペンにいたっては真核生物、原核生物を問わず全く報告例が無い。

研究の目的

このような背景下、筆者は、真核生物のお米と原核生物の放線菌から種々のジテルペンおよびテトラテルペン生合成遺伝子を

取得していることから、今回これらの機能解析を行った。

研究の方法

(1) 既得のお米由来の 2 つの *ent-copalyl diphosphate* 生合成酵素を組換え酵素として発現させ、詳細な酵素学的諸性質の違いを調べた。(2) 原核生物の *Nocardia* 属放線菌が生産するジテルペン化合物 *brasilicardin A* の生合成遺伝子を取得し遺伝子破壊を行った。(3) 原核生物の *Streptomyces* 属放線菌が生産するテトラテルペン化合物 (KS-505a) の生合成遺伝子の取得も行い、遺伝子破壊を行った。

研究成果

(1) お米は *phytohormone* である *gibberellin* と *phytoalexins* である *oryzalexin* や *phytocassane* の生合成のための 2 つの *ent-copalyl diphosphate* 生合成酵素 (各々 *OsCPS1* と *OsCPS2/OsCyc2*) を持っている。これらの酵素を組換え酵素として発現させ、酵素学的な両者の違いを詳細に検討した。その結果、至適 pH・温度、2 価金属要求性、基質である *グラニルグラニル 2 リン酸* に対する *K_m*, *V_{max}* 等はほとんど同じであったのに対し、基質阻害は *OsCPS1* が 50-60 μM で阻害を受けたのに対し、*OsCPS2/OsCyc2* は本濃度では影響を受けなかった。また環化酵素阻害剤である *Amo-1618* に対して *OsCPS1* はより強い感

受性を示した。

(2) 原核生物の *Nocardia* 属放線菌は、類縁の *Streptomyces* 属細菌には見られない特異的な構造を持つ二次代謝産物を生産する。中でも、千葉大学真菌医学研究所の三上 襄教授らにより取得されたジテルペン化合物 brasilicardin A は、ジテルペン骨格に芳香環、L-rhamnose とアミノ酸誘導体が付加したユニークな構造を有し、その生理活性も特異であることから医薬のリード化合物として有用である。従って、その生合成遺伝子を取得・改変する事により新規な関連化合物の生産を誘導することは大変興味深い。そこでこれまでに、brasilicardin A 生産菌である *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 株から、ジテルペン化合物の共通出発原料であるゲラニルゲラニル 2 リン酸を生合成する酵素（イソペンテニル 2 リン酸を 4 つ縮合し、炭素数 20 の直鎖状前駆体を生成する）遺伝子を取得し、その周辺領域を探索することにより、brasilicardin A 生合成遺伝子クラスターと推定される DNA 断片を取得している。今回、この中の環化酵素遺伝子を破壊することにより、これら遺伝子群が実際に brasilicardin A の生産に関与することの証明を試みた。通常、放線菌の形質転換はプロトプラスト・PEG 法で行われるが、*Nocardia brasiliensis* IFM 0406 株はプロトプラスト化が困難なため接合による遺伝子導入と相同組換えによる遺伝子破壊を行った。DNA 断片中、環化酵素遺伝子のみを thiostrepton 耐性遺伝子で置換したのち接合ベクターに導入した。接合後 thiostrepton 耐性株を取得し PCR で確認した結果、何れの耐性株も予想通り環化酵素遺伝子のみが thiostrepton 耐性遺

伝子と置換されていた。そこでこれらの破壊株を培養した結果、brasilicardin A の生産性は消失していたことから上記環化酵素遺伝子が brasilicardin A の生産に関与することを証明できた。

(3) ジテルペン化合物の生合成研究に加え、以下に述べるユニークな構造を持つテトラテルペン化合物（炭素数 40）である KS-505a の生合成遺伝子の取得も行った。原核生物である *Streptomyces* 属放線菌により生産される KS-505a (longestin) は、多環性テトラテルペン骨格にメチルグルクロン酸とスクシニル安息香酸が付加したユニークな構造を有している。その生合成機構を知る第一歩として生合成遺伝子群の取得を試みた。最初に C40 の基質を供給するオクタプレニル 2 リン酸 (OPD) 生合成酵素遺伝子を PCR で取得し、次いでその周辺領域を探索した結果、24 からなる遺伝子群を見出した。その中の OPD の環化に関与すると推定される遺伝子を破壊した結果、KS-505a の生産性を失ったことから、これら遺伝子群が実際に KS-505a の生合成に関与していると推定された。

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 3 件)

- ① Y. Hayashi, N. Matsuura, H. Toshima, N. Itoh, J. Ishikawa, Y. Mikami, and T. Dairi, Cloning of the Gene Cluster Responsible for the Biosynthesis of Brasilicardin A, a Unique Diterpenoid. *J. Antibiot.*, 61, 164-174 (2008), 査読有.

- ② Y. Hayashi, T. Toyomasu, Y. Hirose, Y. Onodera, W. Mitsuhashi, H. Yamane, T. Sassa, and T. Dairi, Comparison of the Enzymatic Properties of *ent*-Copalyl Diphosphate Synthases in the Biosynthesis of Phytoalexins and Gibberellins in Rice, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 523-530 (2008), 査読有.
- ③ Y. Hayashi, H. Onaka, N. Itoh, H. Seto, and T. Dairi, Cloning of the Gene Cluster Responsible for Biosynthesis of KS-505a (longestin), a Unique Tetraterpenoid, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 71, 3072-3081 (2007), 査読有.

[学会発表] (計8件)

- ① 池田千穂、林 豊、伊藤伸哉、大利 徹、放線菌に見出された2つのジテルペン環化酵素、*ent*-copalyl diphosphate synthase と pimara-9(11), 15-diene synthase の酵素学的諸性質、日本放線菌学会大会、尾道、平成19年5月31日
- ② T. Dairi, C. Ikeda, Y. Hayashi, N. Itoh, and H. Seto, Functional Analysis of Eubacterial *ent*-Copalyl Diphosphate Synthase and Pimara-9(11), 15-diene Synthase with Unique Primary Sequences. 14th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Newcastle, UK, August 27th, 2007
- ③ 林 豊、尾仲宏康、伊藤伸哉、瀬戸治夫、大利 徹、ユニークな多環性テトラテルペン骨格を有する KS-505a (longestin) 生合成遺伝子のクローニング、第17回ドリコールおよびイソプレノイド研究会、京都大学、平成19年9月10日
- ④ 池田千穂、林 豊、伊藤伸哉、瀬戸治夫、大利 徹、放線菌に見出されたユニークな一次構造を持つジテルペン環化酵素群の解析、第49回天然有機化合物討論会、札幌、平成19年9月19日-21日
- ⑤ 廣瀬祐子、林 豊、小野寺悠、三橋 渉、佐々武史、大利 徹、豊増知伸、イネのフィトアレキシンとジベレリン生合成に関与する *ent*-コパリル2リン酸合成酵素の酵素的性質の比較、第42回植物化学調節学会、静岡、平成19年、10月29日
- ⑥ 林 豊、尾仲宏康、伊藤伸哉、瀬戸治夫、大利 徹、多環性テトラテルペン骨格を有する KS-505a 生合成遺伝子群のクローニング、日本農芸化学会大会、名城大学、平成20年3月
- ⑦ 豊増知伸、廣瀬祐子、黒田昌治、林 豊、大利 徹、三橋 渉、松岡 信、山根久和、佐々武史、イネにおける2種の *ent*-コパリル2リン酸合成酵素、日本農芸化学会大会、名城大学、平成20年3月
- ⑧ 林 豊、松浦信康、戸嶋浩明、伊藤伸哉、石川 淳、三上 襄、大利 徹、Brasilicardin A 生合成遺伝子群の取得、平成20年度日本放線菌学会大会、山梨、平成20年7月10-11日

研究組織

(1) 研究代表者

大利 徹 富山県立大学・工学部・准教授
研究者番号 70264679