

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02894

研究課題名(和文) 生合成酵素エンジニアリングと合成生物化学的アプローチによるテルペン精密酵素合成

研究課題名(英文) Biosynthetic enzyme engineering and synthetic biochemical approaches to terpene precision enzyme synthesis

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は植物がもつ複雑精緻なテルペノイドの合成の根幹となるテルペン生合成酵素の変異や機能改変によって、新たな構造や入手困難なテルペン類を生み出す人工テルペン創製酵素を作出し、有用テルペン化合物を合成生物学的なアプローチで生み出すことに挑戦した。植物由来ジテルペンの環化酵素研究では、変異導入により機能改変させたジテルペン環化酵素を人為的に作出し、さらに進化速度の遅い植物のRNAseq解析から、新規なジテルペン化合物の生合成に関与する遺伝子を取得した。シトクロムP450研究から、コケ由来のモミラクトン生合成関連遺伝子の機能解析に成功し、モミラクトンAまでの生合成経路の全容を解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テルペン類は、香料や精油成分をはじめ農学・薬学分野における生理活性物質や工学分野におけるファインケミカルまでさまざまな利用があり、我々人類をはじめ地球上の全ての生物にとって必要不可欠な化合物群として社会でも重要性が認識されている。新たなテルペン類の創製や生理活性を有する新規テルペン類の発見は、地球上での持続的な発展とともに自然保護や環境問題への解決ツールとしても期待されるべきものと考えられる。コケ類でアレロパシー活性を持つモミラクトン生合成の全容解明は、陸上では移動できない植物の生存圏確保の仕組みを理解する基盤となる。植物からの新規なテルペンの発見は、さまざまな分野での応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We challenged the creation of artificial terpene-creating enzymes that produce new structures and difficult-to-obtain terpenes by mutating or functionally modifying terpene biosynthetic enzymes. In the study of plant-derived diterpene cyclases, we artificially produced functionally modified diterpene cyclases by mutagenesis, and obtained biosynthetic genes involved in the biosynthesis of novel diterpene compounds from RNAseq analysis expressing in the leaves of the slow-evolving plants. Based on cytochrome P450 studies, we have succeeded in analyzing the functions of genes related to momilactone biosynthesis from a moss, and have elucidated the entire biosynthetic pathway up to momilactone A from syn-pimaradiene.

研究分野：天然物生合成化学・生物有機化学

キーワード：テルペン 植物生理活性物質 生合成 環化酵素 シトクロムP450 *Pichia pastoris*

1. 研究開始当初の背景

天然有機化合物の利用は人類の社会をさまざまな面から支えており、新たな生理活性物質創製は人類を含めた地球社会の発展への重要な課題である。物質創製のアプローチとして、生合成を活用した物質生産と有機合成を融合させる[半生合成-半有機合成]は、今後の医農薬等の有用物質の斬新な創出を期待させる。2019年の本研究開始当初において、本研究は植物がもつ複雑精緻なテルペノイドの合成の根幹となるテルペン生合成酵素の変異や機能改変によって、新たな構造や入手困難なテルペン類を生み出す人工テルペン創製酵素を作出し、生命科学分野における生理活性物質や有機材料分野に資する有用テルペン化合物を合成生物学的なアプローチで生み出すことを研究到達点とした。

2. 研究の目的

本研究は、主に植物由来のテルペン生合成酵素の変異や機能改変によって新たな構造や入手困難なテルペン類を生み出す人工テルペン創製酵素を作出する。また、組換え酵素の大量生産と酵素反応生成物の物質生産の双方を主眼として、酵母菌体内で[グルコース添加で誘導される組換えテルペン創製酵素の過剰発現システム]と[グルコースの資化によるテルペン原料物質の供給システム]を同時に駆動させるデュアル生産システムの基盤を構築する。さらに、進化的に緩やかに生存している起源の古い植物から有用なテルペン生合成遺伝子を探索し、生合成酵素の機能解析と構造機能相関研究を通して有用テルペンの利活用を目指す。これらの研究の遂行により、生命科学分野における生理活性物質のみならず有機材料分野に資する有用テルペン化合物を生み出すことを研究到達点とする。

3. 研究の方法

中課題を3つ設定し、以下の方法で研究を進めた。

〔1. 新ジテルペン創製酵素の作出と入手困難な化合物の合成〕

(1)植物由来カスベン合成酵素の機能改変から導く新テルペン化合物の創製 について、テルペン環化反応機構に強く関与するアミノ酸残基候補を絞り込み、合理的に考えられるようなアミノ酸残基への変異実験と機能改変酵素の活性を調べた。

(2)シトクロム P450 酵素の機能改変と酸素添加反応によるジテルペン化合物の修飾について、ジベレリン生合成酵素の一つ、*ent*-カウレン酸酸化酵素をテンプレートにして、*ent*-カウレン酸 GA₁₂の変換活性を *ent*-カウレン酸 3(OH)-*ent*-カウレン酸への機能変換を行うためのモデリング実験と活性中心解析を行った。

〔2. 酵素-テルペン化合物デュアル生産システムの構築と大量供給〕

(1)多機能型 *-springene* 創製酵素を中心に、テルペン関連物質の発酵生産を *Pichia* 酵母を使って検討した。

〔3.新規ジテルペン生合成環化酵素の探索〕

進化系統的に古い原始植物等からのテルペン合成遺伝子の探索について、ナンヨウスギ科植物の一種から成長過程の部位について次世代シーケンサ(NGS)によるRNAseq解析を行い、ユニークなテルペン生合成遺伝子を機能解析、酵素生成物の構造を解析した。

4. 研究成果

植物由来の環化酵素をモデリング解析に基づいて新機能創出を目指した。酵素生成物が変化したものを作成できたが、既知化合物(センブレン)や収量の少ないものであった。また *ent*-カウレン酸 GA₁₂ の変換 活性を *ent*-カウレン酸 3(OH)-*ent*-カウレン酸への機能変換を行うためのモデリング実験と活性変化の解析は、*Pichia* 酵母で容易に組換え酵素が生産できる *Lactuca sativa* の *ent*-カウレン酸酸化酵素をテンプレートにして実験を進めた。すでに、KA GA₁₂ への変換が起らず、GC 上で異なる保持時間を持ち、マスペクトル解析から KA に水酸基が導入されたと考えられるピークを示す変異酵素が得られている。これらの化合物については、GC-MS のデータベース (KRI インデックスやマスペクトル) を参考にしながら、化学構造の決定を進めた。KA 7(OH)-*ent*-kaurenoic acid の生成を確認した。

シトクロム P450 の機能解析ならびに生合成の再構築実験の派生実験として、ハイゴケ由来のモミラクトン生合成に関する P450 の機能解析を行い、モミラクトン A までの生合成の全容解明に寄与した。すなわち、是までに得られた RNAseq 解析情報と新たにゲノム解析によるクラスター構造情報から、CYP970A14 と CYP964A1 の 2 つがモミラクトン生合成のなかで *syn*-pimaradiene からの酸化反応に関与すると推測でき、*Pichia* 酵母系の解析系から CYP970A14 が *syn*-pimaradiene の 19 位の酸化反応に、CYP964A1 が *syn*-pimaradiene の 3 位の酸化反応にそれぞれ関与することが証明できた。*syn*-pimaradiene の 6 位の酸化反応が寄与する酵素がどちらかを決定する課題が残されているが、無細胞抽出系を用いた P450 解析系の研究例を基盤に報告者らも本解析系を構築している。

Pichia 酵母を用いたテルペン合成酵素遺伝子を導入した形質転換酵母によるテルペン合成研究では、モデル化合物に炭素数 20 の直鎖炭化水素である *-springene* を合成する酵素 (*-SGS*) 遺伝子を導入した実験に取り組んだ。*Pichia* 酵母のゲノムに生合成酵素遺伝子を導入する際に、生合成酵素の細胞内局在を変化させることでテルペン類生合成の生産が向上することが示された。生合成酵素遺伝子導入の際には、生合成遺伝子のみならず補助的な因子を考慮することで遺伝子発現から生合成酵素産物の生産量の向上が期待できる。

進化速度の遅い樹木を含む植物の二次代謝の生合成酵素遺伝子から、ジテルペン生合成に関わる生成物未知と考えられる遺伝子を複数取得した。これらの酵素機能や構造機能相関の研究が必要な状況で研究期間の終了を迎えた。今後、これらのジテルペン生合成遺伝子の機能解析と生合成酵素産物から代謝される下流の化合物群の解明へと研究を繋げる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lingfeng Mao, Hiroshi Kawaide, Toshiya Higuchi, Meihong Chen, Koji Miyamoto, Yoshiaki Hirata, Honoka Kimura, Sho Miyazaki, Miyu Teruya, Kaoru Fujiwara, Keisuke Tomita, Hisakazu Yamane, Ken-ichiro Hayashi, Hideaki Nojiri, Lei Jia, Jie Qiu, Chuyu Ye, Michael P. Timko, Longjiang Fan and Kazunori Okada	4. 巻 117
2. 論文標題 Genomic evidence for convergent evolution of gene clusters for momilactone biosynthesis in land plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceeding of the National Academy of Science in the United States of America	6. 最初と最後の頁 12472-12480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1914373117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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
研究分担者	豊増 知伸 (Toyomasu Tomonobu) (60272085)	山形大学・農学部・教授 (11501)	

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
---------	---------