

機関番号：11501

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380064

研究課題名 (和文) 菌類特有の新奇キメラジテルペン合成酵素の特徴を活かした有用物質生産研究の基盤構築

研究課題名 (英文) Studies on diterpene-producing system based on the useful characters of unusual fungal chimera diterpene synthases.

研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU TOMONOBU)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：60272085

研究成果の概要 (和文)：糸状菌特有のキメラジテルペン合成酵素は GGDP 合成ドメインと GGDP 環化ドメインで構成され、極めて珍しい一次構造と機能を有する。本研究では、この高機能キメラ酵素の特徴を活かして、有用物質生産研究の基盤を構築することを目的とした。その中でも特に、麴菌 *Aspergillus oryzae*、いもち病菌 *Magnaporthe grisea*、青カビ *Penicillium chrysogenum* のキメラ酵素の特徴付けではそれぞれ興味深い知見を提供した。

研究成果の概要 (英文)：Unusual fungal diterpene synthases possess the GGDP synthase domain at C-terminus and GGDP cyclase domain at N-terminus. We planed to construct the diterpene producing system based on the useful characters of fungal chimera diterpene synthase family. Our research has provided interesting information by characterization of chimera enzymes from *Aspergillus oryzae*, *Magnaporthe grisea*, and *Penicillium chrysogenum*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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：生合成、ジテルペン、高機能酵素、菌類、物質生産

1. 研究開始当初の背景

ジテルペンとは炭素数 20 個のプレニル基質、ゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGDP) より生合成されるテルペンである。研究代表者らはモモ枝折病菌から N 末端に GGDP 環化ドメイン、C 末端に GGDP 合成ドメインで構成される極めて珍しい一次構造と機能を有するキメラなジテルペン合成酵素 PaFS を発見した。通常、他の生物種では、GGDP 合成酵素と GGDP 環化酵素は別々の遺伝子にコードされる。データベースによると、この

新奇な遺伝子ホモログは糸状菌全般に存在し、糸状菌固有の新たなジテルペン合成酵素遺伝子ファミリーである可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究では、上記キメラジテルペン合成酵素について、その珍しい特徴 (高機能性と糸状菌界での普遍性) を活かして有用物質生産研究の基盤を構築することを目的として以下の実験を計画した。

(1) キメラ酵素 PaFS の構造・機能解析

- (2) ジテルペン環化酵素の高機能化
- (3) 高等植物細胞におけるキメラ酵素の発現
- (4) 逆遺伝学的生理活性ジテルペンの探索

3. 研究の方法

(1) キメラ酵素 PaFS の構造・機能解析

大腸菌を宿主として組換えタンパク質を大量調製し、X線結晶構造解析により PaFS の立体構造を決定する。点変異酵素を調製し、触媒機構を解明する。

(2) ジテルペン環化酵素の高機能化

糸状菌より得られていた labdane 関連ジテルペン環化酵素と GGDP 合成酵素を連結させ触媒能を検討する。連結 cDNA を大腸菌へ組み込み、発現させた組換えタンパク質を用いて適切な基質を用いて変換実験を行う。

(3) 高等植物細胞におけるキメラ酵素の発現

高等植物細胞ではジテルペン合成に関与する GGDP の合成と環化は色素体内で行われると考えられているので、PaFS を細胞質内あるいは色素体内で機能させ、環化産物蓄積具合を比較検討する。負のコントロール実験として、PaFS の GGDP 環化ドメインのみの N390 についても同様の実験を行い、キメラ酵素の有用性を検討する。

(4) 逆遺伝学的生理活性ジテルペンの探索

他の糸状菌よりゲノム情報を駆使して PaFS ホモログを cDNA クローニングし、機能解析を行う。材料としては、二次代謝物を生産しないと考えられている麹菌 *Aspergillus oryzae*、イネの重要病害もち病の原因菌 *Magnaporthe grisea*、分生子誘導活性を有するジテルペンを生産する青カビ *Penicillium chrysogenum* を用いる。

4. 研究成果

(1) キメラ酵素 PaFS の構造・機能解析

発現ベクターに PaFS の ORF cDNA を組み込み、大腸菌体内で組換えタンパク質を発現させ、抽出・精製する。その回収量が多くなる条件について、宿主大腸菌の種類、細胞破碎方法などを検討した。しかしながら、現在までに結晶取得には至っていない。構造情報がなかったため、他の酵素とのアラインメントを参考に PaFS のホモログ PaPS (ホモプセン合成酵素。複雑な環化機構を有する) についていくつか点変異酵素を作成したものの、いずれも活性を失うか、触媒能に変化はないかという結果しか得られず、有益な情報は得られていない。

(2) ジテルペン環化酵素の高機能化

Labdane 関連ジテルペン環化酵素としては、ジベレリン生産菌イネ馬鹿苗病菌由来の

ent-kaurene 合成酵素 GfCPS/KS を材料として、その N 末端あるいは C 末端に糸状菌由来 GGDP 合成酵素を連結した組換えタンパク質を調製したが、環化活性は失われた。400 アミノ酸以下のセスキテルペン環化酵素とファルネシル 2 リン酸 (炭素数 15 個のプレニル基質) 合成酵素の連結は 2002 年に報告されているが、400 アミノ酸以下の PaFS の GGDP 環化ドメインと比較して、GfCPS/KS は 800 アミノ酸程度の高分子量なので、機能的連結がうまくいかなかったと考えられた。後述の麹菌由来の AoDSL1 の GGDP 環化ドメインに、PaFS の GGDP 合成ドメインを連結した場合は、目的酵素活性は保持されていたので、キメラ酵素間でのドメイン交換は可能であることは確認された。

(3) 高等植物細胞におけるキメラ酵素の発現

植物細胞発現用のプラスミドコンストラクトを以下のように調製した。目的遺伝子インサートとしては、PaFS とその GGDP 環化ドメインのみの N390 の全長 cDNA、さらにそれぞれに色素体移行シグナルを付加した TP-PaFS、TP-N390 の cDNA を、アグロバクテリウム感染用ベクター pGWB5 に導入した。TP については、シロイヌナズナの labdane 関連ジテルペン酵素の一種 ent-copalyl diphosphate 合成酵素の N 末端にある推定トランジットペプチド領域をコードする cDNA 断片を利用した。pGWB5 に組み込まれた遺伝子については C 末端に GFP が付加して翻訳されるので、GFP をマーカーとして細胞内局在も観察することができる。組み込む前に、PaFS の N 末端に TP を、C 末端に GFP を付加しても目的酵素活性を保持することは、大腸菌発現組換えタンパク質を用いて確認した。このプラスミドを用いて、アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナに導入し、得られた T1 世代を用いて実験を行った。まず、シロイヌナズナゲノム DNA への組み込みを PCR により検証したところ、それぞれの遺伝子の挿入は確認できた。次に植物体から抽出した mRNA を用いて RT-PCR を行い、それぞれの遺伝子からの転写物の発現も確認できた。また、植物体から抽出したタンパク質について、抗 GFP 抗体を用いた免疫ブロット染色を行ったが、全ての試料において目的長のバンドは検出できず、蛍光顕微鏡観察においても GFP 蛍光は検出できなかった。過剰発現はみられなかった。さらに GGDP 環化物であるフシコッカジエンの蓄積も検出できなかった。翻訳効率が悪かったか、異種タンパク質は分解されてしまったか、どちらかが原因と考えられた。今後は高等植物ホストをイネなど別のモデル植物へ換えて再検討する必要がある。

(4) 逆遺伝学的生理活性ジテルペンの探索

① 麹菌

麹菌は、酒、味噌、醤油など、日本では発酵製品の作成に千年以上用いられてきており、有害な二次代謝物を生産しない安全菌と認定されている。麹菌におけるジテルペン合成に関する報告はなかったものの、ゲノムにも *PaFS* ホモログ 2 種がみられたので、その特徴付けを行うことにした。まず、RT-PCR を行ったところ、2 種とも cDNA が得られたので、*AoDSL1* と *AoDSL2* と名付けた。しかしながら、*AoDSL1* は 1 塩基ナンセンス変異により C 末端側の GGDP 合成ドメインが大部分翻訳されないと推定され、*AoDSL2* は塩基置換変異により GGDP 合成ドメインの DDxxD 活性中心モチーフのアスパラギン酸がアラニンに置き換わり活性は消失していると推定された。組換え酵素を用いた変換実験により、*AoDSL1* では GGDP 合成活性はみられず、一方では GGDP を構造未知の環状ジテルペン炭化水素へ変換した。*AoDSL2* は組換え酵素が不安定でいずれの活性も検出できていない。*AoDSL1* についてはナンセンス変異をチロシンコードに戻すことで (*AoDSL1*-*413Y)、GGDP 合成活性を復活させることに成功した。

麹菌の原種である *A. flavus* は、アフラトキシン等の毒素を生産することが知られているが、ゲノム配列は *A. oryzae* に類似し、*AoDSL1* に相当する遺伝子 *AfDSL1* の配列は *AoDSL1*-*413Y とほぼ一致し、その組換え酵素は GGDP 合成活性と GGDP 環化活性を合わせもっていた。このことから、*A. oryzae* では *AoDSL1* のナンセンス変異がジテルペン合成に影響を与えている可能性が期待されたが、両菌体の内生炭化水素分析ではともに環化物は検出できず、実証はされていない。

② いもち病菌

いもち病菌 *Magnaporthe grisea* は、イネの重要病害を引き起こすことが知られているが、ジテルペン合成に関する知見は報告されていない。いもち病菌には *PaFS* ホモログは 4 種見られ、それぞれ *MgDSL1*~4 と名付けた。RT-PCR の鋳型には、菌体を液体培地で培養したものと、いもち病に罹病したイネ葉身の病斑部分を用いたが、*MgDSL1* と *MgDSL3* は両方から断片が増幅したが、*MgDSL4* については病斑由来からのみ増幅した。そこで、*MgDSL4* はイネ病害に何らかの関係がある可能性が考えられたので、特徴付けを行った。この組換え酵素は GGDP 合成活性も環化活性もみられ、GGDP を casbene 様炭化水素へ変換した。最近、茨城大学のグループにより、UV 処理してフィトアレキシン合成を高めたイネ葉身から casbene 代謝物が同定されていたので、今後、

これらの炭化水素の構造を比較する予定である。

③ 青カビ

Penicillium cyclopium から分生子誘導活性を有するジテルペン conidiogenone が同定されていた。それまでは糸状菌からは二次代謝ジテルペンしか同定されていなかったが、conidiogenone は青カビ自身の生理現象を制御するジテルペンとして注目されている。そこで、青カビの *PaFS* ホモログがその生合成に関与する可能性を検証するために、遺伝情報が豊富な *P. chrysogenum* を材料にして実験を行った。*P. chrysogenum* のゲノムには *PaFS* ホモログは 1 種しかみられなかったので、それを cDNA クローニングした (*PchDSL*)。この組換え酵素についても GGDP 合成活性と環化活性はともにみられ、GGDP を構造未知ジテルペン炭化水素へ変換した。副産物の構造とマスマフラグメントパターンから、おそらく目的仮想中間体 conidiogenone である可能性が考えられた。さらに、分生子を形成した菌体と形成していない菌体を材料に QRT-PCR を行ったところ、*PchDSL* の発現量は分生子形成菌体で著しく多く蓄積していたことも明らかになった。以上の結果から *PchDSL* は conidiogenone の生合成に関与することが強く示唆された。またゲノムにおいて *PchDSL* の近傍には P450 が 1 種みられ、それも conidiogenone の生合成に関与する可能性が考えられたので、それを組み込んだ組換え酵母を作成したので、今後機能解析を行う予定である。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 後藤麻予ら、いもち病菌のジテルペン合成酵素に関する研究、日本農芸化学会 2011 年度大会、震災の影響で登録のみ (学会は成立)
- ② 藤崎由記子ら、青カビの分生子誘導物質の生合成遺伝子に関する研究、日本農芸化学会 2011 年度大会、震災の影響で登録のみ (学会は成立)
- ③ 千葉康隆ら、糸状菌のキメラジテルペン合成酵素の植物体内発現、植物化学調節学会第 45 回大会、2010 年 11 月 2 日、神戸大学 (神戸)
- ④ Chiba, Y. et al., Functional analysis of chimera diterpene synthase in *Aspergillus oryzae*, 20th International Conference on Plant Growth Substances, 2010 年 6 月 29 日、Spain
- ⑤ 千葉康隆ら、麹菌のジテルペン合成酵素

- について、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学（東京）
- ⑥ 後藤麻予ら、イモチ病菌のジテルペン合成酵素について、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学（東京）
 - ⑦ Chiba, Y. et al., Characterization of diterpene synthase genes in *Aspergillus oryzae*, TERPNET 2009, 2009 年 5 月 26 日、東京大学（東京）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊増 知伸 (TOYOMASU TOMONOBU)
山形大学農学部准教授
研究者番号：60272085

(2) 研究分担者

塩野 義人 (SHIONO YOSHIHITO)
山形大学農学部准教授
研究者番号：80361278