

機関番号：32682

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710222

研究課題名 (和文) ハイブリッド型天然物の生合成再構築による構造多様性の創製

研究課題名 (英文) Reconstituted biosynthesis of hybrid type natural products

研究代表者

久城 哲夫 (KUSHIRO TETSUO)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：80373299

研究成果の概要 (和文) : 糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産するメロテルペノイド、ピリピロペン、コレステロール低下剤としての応用が期待される化合物である。本研究では、その生合成遺伝子クラスターの同定に成功し、それら生合成酵素の機能解析を異種糸状菌での発現により行った。さらに、テルペン部分の環化に関わる新規膜結合型テルペン環化酵素を見出すことに成功した。

研究成果の概要 (英文) : Pyripyropene, produced by a fungus *Aspergillus fumigatus*, is a meroterpenoid that is expected to be developed as a cholesterol lowering drug. The entire biosynthetic gene cluster was discovered and the function of each enzyme in the pathway was analyzed using fungal expression system. A completely novel terpene cyclase that is predicted to comprise of transmembrane helices was discovered for the first time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010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：天然物生合成

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：メロテルペノイド、テルペン環化酵素、糸状菌、遺伝子クラスター、ピリピロペン

## 1. 研究開始当初の背景

天然有機化合物は微生物や植物などが生産する二次代謝産物であり、分子構造の多様性からもたらされる様々な生理活性を有し、医薬品資源として大変重要な化合物群である。これら天然物の構造多様性は、生産生物における生合成過程で構築される。天然物は生合成経路により、テルペノイド、ポリケタ

イド、アルカロイド、フラボノイドなどに分類されている。なかでもテルペノイドは、分子構造の多様性において最も広範であり、これまでに 24,000 種以上もの化合物が単離・報告されている。テルペノイドの構造多様性は、主に炭素骨格生合成の過程で構築され、これにはテルペン環化酵素が関与している。テルペン環化酵素は、鎖状のイソプレノイドを基質とし、カルボカチオンを経由するカチ

オン・環化反応により、環状の骨格を単一の反応で作上げる驚異的な酵素である。この際、環化反応の立体化学や位置選択性、転位反応などが厳密に制御される。一般に、鎖状のイソプレノイド基質においては何通りもの環化様式が可能であり、これがテルペノイドの炭素骨格の多様性を産み出している。一方、自然界には複数の生合成経路が組合わさって生合成されるハイブリッド型の天然物が存在する。テルペノイドとポリケタイドのハイブリッドであるメロテルペノイドは、その代表例である。メロテルペノイドは、微生物である放線菌や糸状菌などから主に見出されており、多様な生物活性を有する。このようなメロテルペノイドにおいては、テルペノイドとポリケタイドの構造多様性を併せ持つことで、より一層の多様性を産み出すことが可能となる。メロテルペノイドの生合成に関しては、これまでに放線菌を中心に研究が進められており、ナフトルピンを始めとして数種類のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスターが明らかになっている。これらは全てポリケタイド部分に 1, 3, 6, 8-テトラヒドロキシナフタレン (THN) 誘導体を有し、これにゲラニル基などが付加して生成する。一方、糸状菌由来メロテルペノイドにおいては、ポリケタイド部分が芳香環やピロン環など多様な構造を有しており、より構造の多様性は幅広い。しかしながら、糸状菌由来メロテルペノイドの生合成遺伝子の報告例はこれまでに全くない。

## 2. 研究の目的

糸状菌由来のメロテルペノイドには、顕著なコレステロール低下作用を有するピリピロペン類や、タンパクのファルネシル化阻害作用を有するアンドラスチン類が存在し、医薬品資源として大変重要な化合物である。本研究では、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産するメロテルペノイドであるピリピロペンの生合成遺伝子のクローニングを行い、得られた生合成酵素群の機能解析を通じて複雑なメロテルペノイド化合物の構築原理を明らかにし、その生合成を再構築することで、非天然型基質と反応するなどして新規ハイブリッド型有用天然物の創製を試みた。ピリピロペンは、acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) の強力な阻害剤であり、コレステロール低下剤や動脈硬化の予防治療薬の候補として有望視されている。また、類縁体であるテリトレム類は、*A. terreus* より単離され、選択的アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を有することから、アルツハイマー病治療薬のリード化合物として注目されている。ピリピロペンとほぼ同様の炭素骨格を有するが、ピロン環に結合したピリジ

ン環がベンゼン環に置換されている点が異なる。

## 3. 研究の方法

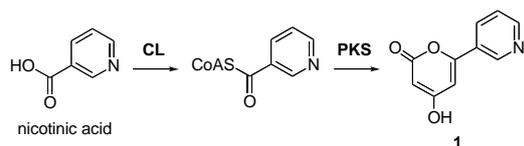
ピリピロペンの生合成は、ニコチン酸由来の構造を含むポリケタイド部分 (ピロン環) にファルネシル二リン酸 (FPP) 由来のテルペノイド部分が縮合・環化して形成された骨格が、さらに酸化、エステル化されることで構築されるものと推測されている。これら生合成の際に分子構造構築の鍵となるのは、ポリケタイド部分の生合成を担うポリケタイド合成酵素 (PKS) に加え、テルペノイド部分を縮合するプレニル基転移酵素 (PT) と環化反応を担う環化酵素である。そこで、近年明らかにされた糸状菌の全ゲノム配列を活用し *A. fumigatus* のゲノムを調べた結果、PKSおよびPT遺伝子を含む遺伝子クラスターが見出され、ここにはシトクロム P450 やフラビン要求性の酸化酵素 (FMO)、それにアセチル基転移酵素遺伝子が含まれていた。さらに、CoA ligase (CL) と思われる遺伝子も存在し、ピリピロペンに特徴的なニコチン酸由来の CoA 体の生成に関与しているのではないかと推測された。しかしながら、テルペノイド部分の環化酵素と思われる遺伝子は存在していなかった。

そこで、この遺伝子クラスターが実際にピリピロペンの生合成に関与しているかどうか、予想生合成経路に沿って、酵素の機能を各々解析することとした。各遺伝子は、ピリピロペン生産株 *A. fumigatus* F37 よりクローニングし、発現には *A. oryzae* M-2-3 株を用いた異種糸状菌発現系を用いた。本発現系においては、各遺伝子をアミラーゼプロモーター下流に配置し、CD-starch 培地で誘導培養することで、酵素反応生成物が菌体もしくは培養液中に蓄積する。

## 4. 研究成果

まず、最上流の CL (*pyr1*) と PKS (*pyr2*) の機能を解析するため、両遺伝子を *A. oryzae* M-2-3 株に組み込んだ共発現体を構築した。ニコチン酸を投与した培地にて誘導培養の後、培養液を解析したところ、導入遺伝子特異的産物の生産が確認された。大量培養の後、構造解析を行ったところ、予想産物であるピロン体

(4-hydroxy-6-(3-pyridinyl)-2H-pyran-2-one (HPP0)) 1 であると同定された。

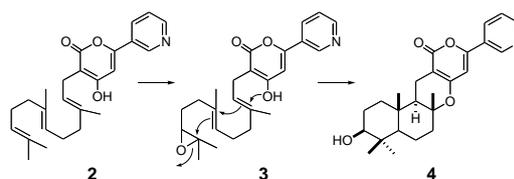


次に、ファルネシル基の転移に関するPT (*pyr6*) の機能解析を行った。CL、PKS ならびに PT の各遺伝子を組み込んだ三遺伝子共発現体を構築し、ニコチン酸を投与した培地にて誘導培養を行った。その結果、菌体中より特異的産物の生産が確認され、大量培養の後、構造解析によりピロン体にファルネシル基の付加した farnesyl-HPP0 **2** であると同定した。

次にエポキシ化に関する酸化酵素遺伝子の同定を試みた。本クラスター中には、テルペノイド部分の環化酵素と思われる遺伝子は存在しないことから、環化はエポキシ化と同時に進行するのではないかと考えた。エポキシ化酵素としては、糸状菌の生産するインドールジテルペンの生合成に関与する FMO が知られていたため、これと相同性のある遺伝子がメロテルペノイドの生合成にも関与しているのではないかと推定した。そこで、クラスター中に唯一存在している FMO (*pyr5*) 遺伝子の機能解析を行った。PT と FMO の共発現体を作製し、培地に前駆体であるピロン体 **1** を投与し誘導培養を行った。その結果、菌体中より導入遺伝子特異的な産物が確認された。構造解析を行ったところ、予想されるエポキシ体 **3** ではなく、エポキシドが加水分解されたジオール体であることが判明した。これにより、**3** は生成しているものの、環化酵素が存在していない状態ではホスト由来の酵素により、速やかに加水分解されるものと予想された。

そこで、クラスター中のいずれかの遺伝子が新規な環化酵素であると予想し、唯一機能の推定が困難な、integral membrane protein とアノテーションされている遺伝子 (*pyr4*) に注目した。本遺伝子をクローニング後、PT ならびに FMO と三遺伝子共発現体を作製し、**1** を投与した培地中で誘導培養を行った。その結果、菌体中より新たな化合物の検出が確認され、構造解析を行ったところ、環化産物である deacetylpyripyropene E **4** であることが判明した。本化合物は、ピリピロペン類に共通の基本炭素骨格を有しており、本化合物の旋光度は天然物由来のものと一致した。

さらに、epoxyfarnesyl-HPP0 を化学合成し、*in vivo* と *in vitro* にて Pyr4 と反応させたところ、deacetylpyripyropene E の生成が確認されたことから、Pyr4 が単独で機能するテルペン環化酵素であることが判明した。Pyr4 は7回膜貫通型タンパク質と予想され、既存のテルペン環化酵素とは配列相同性がないことから、全く新規の膜結合型テルペン環化酵素である。これにより、クラスター内の5遺伝子の異種糸状菌での発現機能解析により、ピリピロペンの基本炭素骨格の構築に成功した。



以上の結果より、*A. fumigatus* から見出された本遺伝子クラスターがピリピロペン生合成に関与することが明らかとなり、その生合成過程を異種糸状菌において再構築することに成功した。

## 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1件)

① T. Itoh, K. Tokunaga, Y. Matsuda, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, T. Kushiuro, Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nature Chemistry*, **2**, 858-864 (2010).

〔学会発表〕(計9件)

① Tetsuo Kushiuro, Reconstituted biosynthesis of meroterpenoid in fungi, Pacificchem 2010, 2010. 12. 16, Honolulu, Hawaii, USA

② 松田侑大、徳永欽也、藤井勲、海老塚豊、久城哲夫、阿部郁朗、糸状菌由来メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、岡山大学

③ 徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、海老塚豊、久城哲夫、阿部郁朗、糸状菌由来メロテルペノイド生合成に関わるプレニル基転移酵素の構造機能解析、日本薬学会、第130年会2010年3月28日、岡山大学

④ 徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、海老塚豊、

久城哲夫、阿部郁朗、糸状菌由来メロテルペノイド生合成遺伝子を活用した創薬へのアプローチ、第28回メディシナルケミストリーシンポジウム、2009年11月25日 東京大学

⑤松田侑大、徳永欽也、藤井勲、海老塚豊、久城哲夫、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009年11月18日、東京大学

⑥徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、海老塚豊、久城哲夫、阿部郁朗、*Aspergillus fumigatus* 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製、第9回糸状菌分子生物学コンファレンス、2009年11月18日、東京大学

⑦伊藤崇敬、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、糸状菌由来メロテルペノイド化合物 pyripyropene A の生合成研究、第51回天然有機化合物討論会、2009年10月7日 名古屋市公会堂

⑧松田侑大、徳永欽也、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成に関わる新規膜結合性テルペン環化酵素の構造機能解析、日本生薬学会第56回年会、2009年10月3日、京都薬科大学

⑨徳永欽也、伊藤崇敬、藤井勲、久城哲夫、海老塚豊、阿部郁朗、メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターを用いた非天然型新規ハイブリッド型化合物の創製、日本生薬学会第56回年会、2009年10月3日、京都薬科大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久城 哲夫 (KUSHIRO TETSUO)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：80373299