

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580153

研究課題名(和文)トランスポーター様新規テルペン環化酵素の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel terpene cyclases that resemble transporter

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

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 は、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、ピリピロペンの生合成に関与するトランスポーター様の新規テルペン環化酵素の活性部位残基の同定と、*A. fumigatus* および *Fusarium graminearum* より見出された新規メロテルペノイド遺伝子クラスターの機能解析を目指し、*A. fumigatus* の新規遺伝子クラスター内の PKS が TAL を生成することを見出した。

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. Among the pyripyropene biosynthetic gene cluster, a novel terpene cyclase was identified that resembled more like a transporter. In this study, detailed analysis of its active site residue was carried out. Besides, a second meroterpenoid biosynthetic gene cluster was identified from *A. fumigatus* as well as from a fungus *Fusarium graminearum*, which causes Fusarium head blight. The PKS among the second gene cluster in *A. fumigatus* was shown to produce TAL.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学&amp;生物有機化学

キーワード：メロテルペノイド 糸状菌 テルペン環化酵素 ポリケタイド 生合成

1. 研究開始当初の背景

炭素を基本骨格とした有機化合物は我々人類の生活にとってかけがえのない貢献を果たしており、なかでも自然界由来の天然有機化合物(天然物)は我々の生活に大きく関わっている。天然物は、微生物や植物などが生産する二次代謝産物であり、多様な分子構造からもたらされる様々な生理活性を有し、医薬品、食品、化粧品や材料などとして様々な利用されている。天然物の最大の特徴であり、我々にとって最も利用価値があるのはこの分子構造の多様性であり、現代の化学工業においても天然の分子を凌駕する多様な生を作り出すのは不可能である。この分子構造の多様性は、生産生物における天然物の合成の過程、すなわち生合成の過程で構築される。天然物の生合成は、テルペノイドやポリケタイド、アルカロイドなど、いくつかの主要経路によって分類されている。なかでもテルペノイドは、最大の分子構造多様性を有し、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、主にテルペン環化酵素により構築される。テルペン環化酵素は、鎖状のイソプレノイド基質に対して、カルボカチオンを経由するカチオン- $\pi$ 環化反応により、複雑な環状の骨格を作り上げる驚異的な酵素である。この反応は一段階の反応ながら、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ており、何通りもの可能な環化様式の中から特定の環化様式のみが制御される。テルペン環化酵素は、モノテルペンからトリテルペンに至るまで存在し、分子量60~80kDa、可溶性のタンパク質であり、主に $\alpha$ -ヘリックスのみから成るテルペン合成酵素フォールドを形成している。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し、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、相乗的に多様性を産み出すことが可能となる。糸状菌の生産する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が存在し、医薬品資源として大変重要な化合物が含まれる。これまでに糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産するピリピロペンの生合成遺伝子群の同定に成功し、異種糸状菌である *A. oryzae* の発現系を用い、各生合成酵素の機能解析とピリピロペン前駆体の生産に成功し、さらに基質類縁体の投与によりピリピロペンの構造類縁体の創製に成功している。ピリピロペンの生合成は、ニコチン酸由来の CoA 体からポリケタイド経路

により生成したピロン体がファルネシル化された後、ファルネシル部分が環化して生成する。

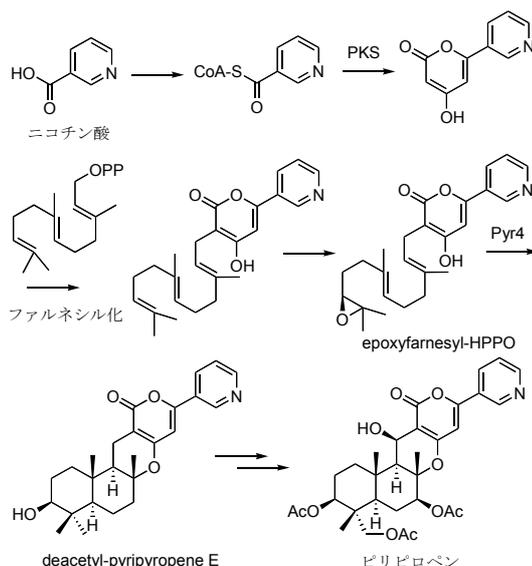


図1 ピリピロペンの生合成

このファルネシル基の環化反応を担うテルペン環化酵素 (Pyr4) が同定され、驚くべきことに既存のテルペン環化酵素とは全く類似性がなく、241 アミノ酸残基から成る大変小さなタンパク質であり、分子量は27 kDa、 $\alpha$ -ヘリックスのみから成る7回膜貫通型のタンパク質と推測された。ゲノム解析においても本酵素はトランスポーターと予測されていた。

2. 研究の目的

このような、ピリピロペンの生合成に関与するテルペン環化酵素 (Pyr4) は、全く前例を見ないものであり、タンパク質の1次、2次、3次構造が既存のテルペン環化酵素とは大きく異なっており、その触媒機構の詳細に興味を持たれた。特に、環化反応の生成物特異性を決定すると考えられる脱プロトン化を行う塩基性アミノ酸残基に注目し、変異導入による活性残基の特定を目指した。

さらに、*A. fumigatus* のゲノム配列中からは、ピリピロペンとは異なる別のメロテルペノイドと思われる生合成遺伝子クラスターが見出された。本クラスター中にはポリケタイド合成酵素 (PKS)、プレニル基転移酵素 (PT) と共に、Pyr4 と相同性のある新規テルペン環化酵素、そしてゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 (GGPS) の各遺伝子が含まれていた。一方、農業上重篤な問題を引き起こすコムギ赤カビ病の病原菌である *Fusarium graminearum* のゲノム配列中からも、興味深いメロテルペノイド生合成遺伝子クラスターが見出された。本クラスター中にも PKS、PT の他に新規テルペン環化酵素 (FgCYC) が存在していたが、FgCYC は N 末側にデヒ

ドロゲナーゼと相同性のあるタンパクを融合した新規な構造を有していた。

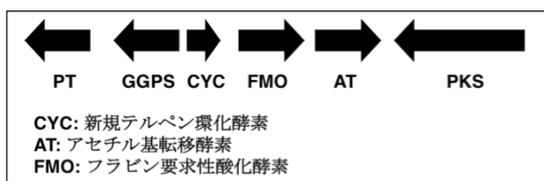


図2 *A. fumigatus* の別のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター

そこで、これらメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター中の遺伝子の機能解析を行い、様々な新規テルペン環化酵素の機能を明らかにすることで構造と機能の解明を目指した。

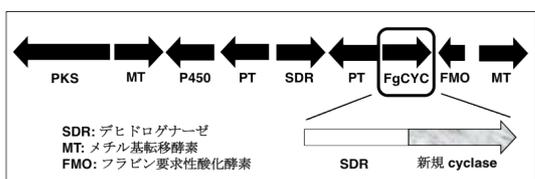


図3 *F. graminearum* の新規メロテルペノイド生合成遺伝子クラスター

### 3. 研究の方法

Pyr4 において、脱プロトン化に関わると考えられる塩基性アミノ酸残基を同定するべく、Pyr4 と類似したタンパク質間で保存された His 残基に注目した。これら残基の部位特異的変異導入を行い、活性がどのように変化するかを調べた。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。CD-starch 培地で誘導培養した後、細胞を破碎し粗酵素液を抽出した後、超遠心によりミクロソーム画分を調製した。本画分と基質である epoxyfarnesyl-HPPO を反応させ、生成物を HPLC により検出した。

さらに、*A. fumigatus* のゲノム配列中から見出された別のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター中の PKS、PT、GGPS の機能解析を行うため、各々の遺伝子を *A. fumigatus* F37 よりクローニングし発現ベクター pTAex3R に導入した。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

Pyr4 や類似の新規テルペン環化酵素において、反応終結の脱プロトン化に関わると考えられる保存された His 残基を調べたところ、His105 と His128 が該当した。これらを各々 Ala と Phe に置換した変異体を作製し、*A.*

*oryzae* の異種発現系にて機能解析を行ったところ、H105F と H128A では環化反応生成物である deacetyl-pyripyropene E が検出されず活性が消失した。しかしながら、Ala に置換した H105A と H128F では deacetyl-pyripyropene E が検出され活性を保持していた。このことから、His105 と His128 は環化活性に何らかの影響はあるものの、必須の残基ではないと推測された。

次に、*A. fumigatus* のゲノム中に見出された第二のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスターの解析を行うべく、クラスター内に見出されたゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 (GGPS) (Afu8g02400)、ポリケタイド合成酵素 (PKS) (Afu8g02350)、プレニル基転移酵素 (PT) 遺伝子 (Afu8g02410) のクローニングと発現プラスミドの構築を行った。PKS 遺伝子 (Afu8g02350) は pTAex3R に導入し、また GGPS (Afu8g02400) および PT 遺伝子 (Afu8g02410) はピリチアミン耐性遺伝子を有する pPTR I に導入した。

まず、PKS 遺伝子のみを単独で *A. oryzae* にて発現させた。形質転換体を誘導培養後、菌体を酢酸エチルで抽出し、TLC ならびに LC-MS で分析したところ、導入遺伝子特異的な生成物が確認された。質量分析ならびに標品との比較を行ったところ、本生成物は triacetic acid lactone (TAL) であることが明らかとなった。TAL は、3 分子の malonyl-CoA が縮合後、酵素から遊離しラクトン化して生成するポリケタイド化合物である。

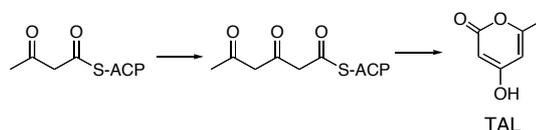


図4 TAL の生合成

本 PKS は、スターターアシルトランスフェラーゼ (SAT)、ケト合成酵素 (KS)、アシルトランスフェラーゼ (AT)、product template domain (PT)、acyl carrier protein (ACP) の各ドメインからなる糸状菌 Type I 型 PKS である。TAL を主生成物として生成する Type I 型 PKS は初めての例であり、TAL の生成機構に興味を持たれた。生成物の特異性を決定することが近年明らかになった PT ドメインにおいて、他の PKS の PT ドメインと配列の比較を行ったところ特徴的な違いがみられ、これらの残基により PT ドメイン内のポケットが著しく小さくなり、2 回の縮合しか行われず TAL を生成したものと推測された。

続いて、PKS、PT ならびに GGPS の共発現を試みた。各々の遺伝子を導入した pTAex3R 及び pPTR I ベクターを *A. oryzae* に導入し、培養菌体抽出物を HPLC にて分析したが、導入遺伝子特異的な生成物は検出されなかった。

本クラスター中の PKS が TAL を生成し、クラスター中に GGPS が存在することから、

本クラスターが生成するメロテルペノイドは TAL にゲラニルゲラニル基が付加して生成した化合物であると推測された。文献を精査したところ、*A. fumigatus* の完全世代である *Neosartorya sp.* からそのような化合物の単離報告例があった。

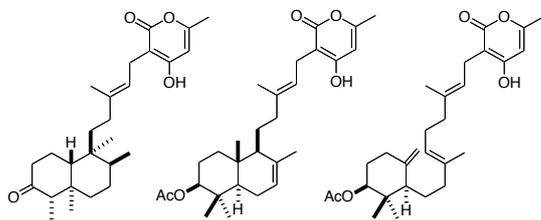


図 5 *Neosartorya sp.* より単離されたメロテルペノイドの構造

本遺伝子クラスターはおそらくこれらのメロテルペノイド化合物の生合成を担っていると考えられ、この中の新規テルペン環化酵素はゲラニルゲラニル基部分の 2 環または 1 環の環化反応を触媒しているものと推測された。Pyr4 との基質特異性そして環化反応の違いは大変興味深い。

一方、*F. graminearum* から見出された新規メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターの機能を解明するべく、クラスター内の PKS 遺伝子のクローニングと発現ベクターの構築を行った。本 PKS は、TAL を生成する *A. fumigatus* 由来 PKS とドメイン構造ならびに配列同一性が似ていたが、メチルトランスフェラーゼドメインをさらに有していた。酵素反応生成物を確認するまでは推測の域を出ないが、TAL にメチル化が起こったようなポリケタイド産物を生産するのではないかと考えられた。なお、*F. graminearum* からはそのような代謝物はこれまで単離報告例がなく、本遺伝子クラスターはこれまで未知のメロテルペノイドの生合成に関与しているのではないかと期待された。

#### 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)

T. Itoh, K. Tokunaga, E.K. Radhakrishnan, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, T. Kushiro. Identification of a key prenyltransferase involved in biosynthesis of the most abundant fungal meroterpenoids derived from 3,5-dimethylorsellinic acid. *ChemBioChem* **13**, 1132-1135 (2012). 査読有

DOI: 10.1002/cbic.201200124

[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

#### 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

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：