

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580159

研究課題名(和文)炭素転位反応を伴う奇異なテルペン環化酵素反応機構の解析

研究課題名(英文)Cyclization mechanism analysis of terpene cyclases involved in C-C rearrangement

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)・准教授

研究者番号：20291916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 麹菌由来ジテルペン合成酵素の反応生成物の環化機構を、基質のアイソトプマー標識体合成とNMR測定から環化反応機構を解析した。生成物の絶対立体配置の決定は、研究過程で共同研究となったグループから他属糸状菌の代謝物から同一平面化合物の単離と絶対立体配置が決定され、標品との比較により決定した。(2) ヤトロファ地上部の遺伝子発現解析を行い、公開されている情報と合わせてジテルペン生合成に関わる8つ候補遺伝子を絞り込んだ。同定したent-カウレン合成酵素以外のサンプルについて機能解析を継続している。本研究の過程で、ent-カウレン合成酵素の基質認識の緩さを見いだしたので、誌上発表した。

研究成果の概要(英文)：We performed two subjects on the theses. (1) Functional analysis using isotopomers of substrate proposed a cyclization reaction mechanism of a diterpene produced by diterpene synthase from *Aspergillus oryzae*. Absolute configuration of the diterpene was determined by direct comparison with the same diterpene metabolite produced by another fungal metabolite. (2) Eight candidate genes encoding diterpene cyclases in *Jatropha curcas* were searched from our analysis data from the next generation sequencing and database published on the web. Functional analysis of the genes are in progress. Related work was published on the *Biochemical Journal*.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 テルペノイド ジテルペン 環化酵素 NMR

## 1. 研究開始当初の背景

有機合成化学者をも魅了する複雑精緻な多環性テルペノイドの骨格形成を生合成酵素がどのような機構で骨格構築を行うのかは学術的に大変興味深く、同時に生合成酵素の機能改変から新たな生理活性を有する非天然型天然物の創製へとつながる。テルペノイドの革新的研究を進めようと、遺伝子工学・分子生物学的手法を取り入れて遺伝子組換え生合成酵素を調製し、試験管内でテルペノイド合成を可能とする技術を開発した。そして、合成原料に安定同位体標識 $^{13}\text{C}$ 化合物を用いることで生成物の構成炭素がすべて $^{13}\text{C}$ 標識された化合物を合成することが可能となった。これを展開して、酢酸を原料にして炭素数 20~19 の植物ホルモン・ジベレリンの酵素的全合成を(試験管 2 本で)達成した(Sugai et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011)。このような酵素合成と $^{13}\text{C}$ 標識化の2つの技術とさらに多次元 NMR 解析を導入して、標品との直接比較をせずに酵素生成物の構造をスペクトルデータから矛盾なく決定した(Sugai et al., *J. Biol. Chem.*, 2011)。

## 2. 研究の目的

本研究は、精密で奇異な化学構造と複雑な炭素転位反応あるいは炭素-炭素間結合形成を伴う新奇テルペン環化酵素を取得し、酵素合成・ $^{13}\text{C}$ 標識化・多次元 NMR を駆使しての酵素機能・反応機構を解析する。当該研究では、2つの課題を中心として(1)研究代表者等が麹菌ゲノムより得た chimera 型ジテルペン環化酵素から得られる新奇ジテルペン炭化水素化合物の生成機構を解明する。酵素合成によってキメラ状に $^{13}\text{C}$ 標識されたイソプレヌユニットアイソトポマーを調製し、炭素転位反応が起こるユニットおよびその反応機構を NMR 測定から解析する。(2)トウダイグサ科植物に見られる生理活性ジテルペン化合物生合成に関与する環化酵素遺伝子の機能スクリーニングを行い、tigiane 骨格形成酵素の構造と機能同定を行う。さらに、イソプレヌユニットアイソトポマー合成技術を使って、tigiane 骨格形成機

構を解析する。

## 3. 研究の方法

(1)イソプレヌユニットアイソトポマー(isoprene Unit Isotopomer; iUI)の合成は、無標識の各プレニルニリン酸(ジメチルアリルニリン酸, ゲラニルニリン酸, ファルネシルニリン酸)をスターター基質にして、これらに対して完全 $^{13}\text{C}_6$ 標識メバロン酸由来の標識イソペンテニルニリン酸を縮重するゲラニルゲラニルニリン酸(GGDP)合成用の酵素液を組合せて合成した。これに環化酵素を加えてジテルペンアイソトポマーを調製した。 $^{13}\text{C}$ -NMR(150MHzの共鳴周波数)測定は、完全 $^{13}\text{C}_{20}$ 標識体のスペクトルと $^{13}\text{C}_5$ 標識体、 $^{13}\text{C}_{10}$ 標識体および $^{13}\text{C}_{15}$ 標識体について次元測定を行い、スペクトルを得た。(2)ヤトロファの地上部(茎頂と葉部を含む)から全 RNA 抽出を行い、RNA 品質チェックの後に次世代シーケンサ(イルミナ社製 HiSeq)でデータの取得を行った。委託によりデータのバイオインフォマティクス処理を行った。サンプル調製した地上部で発現しているテルペン環化酵素遺伝子の絞り込みは BLAST 検索し、当該解析で網羅し切れなかった遺伝子群や遺伝子配列の確認等はヤトロファ植物の公開ゲノムデータベース(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)でカバーした。

## 4. 研究成果

本研究課題における主要な成果を記す。(1)麹菌由来ジテルペン合成酵素の反応生成物の環化機構を、基質のアイソトポマー標識体合成と NMR 測定から環化反応機構を解析した。ジテルペン類の共通の前駆物質 GGDP をイソプレヌユニット毎に標識した3種のアイソトポマー( $^{13}\text{C}_5$ GGDP,  $^{13}\text{C}_{10}$ GGDP および $^{13}\text{C}_{15}$ GGDP)を酵素合成し、完全 $^{13}\text{C}_{20}$ GGDP 体から生成する化合物の NMR スペクトルの比較から炭素転位部位を特定し、その環化メカニズムを推測することができた。

一方、ジテルペン化合物の絶対立体配置の決定は、NMR による各種測定データからで

は困難を極めた。このような状況下、中途から共同研究となった他大学グループによる他属糸状菌の二次代謝物研究から同一平面構造を有する化合物の単離がなされ、絶対立体配置も決定された。絶対構造が判明した化合物の比旋光度と麴由来のジテルペン化合物の比旋光度が同一の値を示したため、絶対立体配置も決定できた。現在、論文投稿に向けて執筆している。

(2) ヤトロファ地上部の遺伝子発現解析を次世代シーケンサ(イルミナ社製HiSeq)を行って行い、取得したRNAseqデータの解析およびウェブ上で公開されている遺伝子発現情報(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)と合わせてジテルペン生合成に関わる8つ候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子の完全長cDNAクローニングを行い、翻訳領域を大腸菌発現用ベクターに組み込み、大腸菌による異種タンパク質生産系で順次組換え酵素の生産と精製を進めた。そのうちの一つは*ent*-カウレン合成酵素(KS)と同定した。残る7つのジテルペン環化酵素候補遺伝子についても、順次機能解析を進めている。

(3) 本研究遂行の過程で、植物ホルモンの一種ジベレリンの骨格構築酵素 = *ent*-カウレン合成酵素(KS)について、陸上植物の進化すなわち非維管束植物で非種子植物のコケ類から維管束系非種子植物のシダ類および被子植物の間において基質認識能の違いを見いだした。*ent*-カウレン生合成中間体の*ent*-コパリルニリン酸(*ent*-CDP)をKSは真の基質として認識する。CDPの立体異性体(*ent*-CDPのエナンチオマーであるnormal-CDPあるいは*ent*-CDPのジアステレオマーである*syn*-CDP)を生合成するイネ植物においては、KSは*ent*-カウレン合成のために厳密な基質認識の制御下にあるが、立体異性体と競合しない被子植物のレタスでは*ent*-CDPだけでなく他の異性体も認識してジテルペン炭化水素を合成してしまうことを見いだした。非種子植物のコケ類、シダ類では、その基質認識の緩さはさらに強く、反応効率も被子植物よりも高い割合を示した。外来基質を用いた時に生成したジテルペン炭化水素(サンダラコピマラジエン)の構造は、

本研究課題の主要な手法(酵素合成法による完全<sup>13</sup>C標識化と多次元NMR測定)により、スペクトルデータの解析から矛盾なく決定できた。この成果については、*Biochem. J.* 誌に掲載された。

#### 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)

Shimane, M., Ueno, Y., Morisaki, K., Oogami, S., Natsume, M., Hayashi, K., Nozaki, H., & Kawaide, H. (2014) Molecular evolution of the substrate specificity of *ent*-kaurene synthases to adapt to gibberellin biosynthesis in land plants. *Biochemical Journal*, **462**, 539-546. (査読有)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~chemreg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川出 洋 (KAWAIDE, Hiroshi)

東京農工大学大学院農学研究院・准教授

研究者番号：20291916

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：