

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850079

研究課題名(和文) 非天然型メロテルペノイド創製を可能とする新規テルペン環化酵素の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a novel terpene cyclase that enables the creation of unnatural meroterpenoid

研究代表者

仲野 千秋 (NAKANO, CHIAKI)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：70620376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：BE-40644の生合成を担う新規テルペン環化酵素を同定するため、in vivo解析を行った。BE-40644生合成遺伝子クラスターorf8-15から推定テルペン環化酵素orf15を除きpKU1021に連結し、*Streptomyces avermitilis*に形質転換した。また、orf15の推定活性部位E44のAla変異株とプレニルトランスフェラーゼホモログorf14の欠損株を作成した。orf15欠損株からは産物が得られなかったが、E44A変異株とorf14欠損株から生成物が得られた。また、ORF15とファルネシルヒドロキノンなどの基質アナログとの酵素反応を行ったが、生成物は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：To identify the novel terpene cyclase responsible for synthesis of BE-40644, in vivo analysis of BE-40644 biosynthetic gene cluster was performed. The putative terpene cyclase orf15 was deleted from pKU1021-orf8-15 and the resultant plasmid was transformed into *Streptomyces avermitilis*. Moreover, the E44A mutant of orf15 and the deletion mutant of putative prenyltransferase orf14 were constructed. The orf15 deletion mutant gave no product. On the other hand, a new product was accumulated in the E44A mutant and the orf14 deletion mutant. Incubation of ORF15 with substrate analogues such as farnesyl hydroquinone gave no product.

研究分野：生物有機化学

キーワード：テルペン環化酵素 メロテルペノイド 生合成 放線菌 BE-40644

## 1. 研究開始当初の背景

BE-40644 (**1**) は放線菌 *Actinoplanes* sp. A40644 から単離された抗腫瘍活性、抗 HIV 活性を有するメロテルペノイドである<sup>1)</sup>。メロテルペノイドには、抗腫瘍活性やコレステロール低下作用等の有益な生理活性を示すものが多く存在することから、医薬品の有望なターゲットとなっている。**1** の生合成遺伝子クラスターは既に取得されており、その推定生合成経路が提唱されているが<sup>2)</sup>、生合成において中心的な役割を果たすテルペン環化酵素は未知のままである (図 1)。

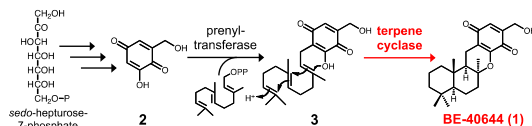


図1 BE-40644の推定生合成経路

## 2. 研究の目的

1) **1** の生合成を担うテルペン環化酵素を同定する。本テルペン環化酵素は、末端二重結合のプロトン付加により環化反応を開始すると考えられる (図 1)。これまで同定されているメロテルペノイドの環化酵素は末端のエポキシドのプロトン付加により環化反応を開始する酵素である。本研究により、**1** の生合成を担う新規テルペン環化酵素を同定することは、メロテルペノイドの生合成研究において新たな知見を与える。

2) メロテルペノイドの生合成を担うテルペン環化酵素と基質アナログとの *in vitro* 反応により、非天然型メロテルペノイドを創製した例は無い。有益な生理活性物質が多く存在するメロテルペノイドの非天然型を創製することは、新規有用物質の発見に繋がる。そこで、**1** の生合成を担うテルペン環化酵素を用いて、基質アナログとの酵素反応を行うことにより、非天然型メロテルペノイドを創製する。

## 3. 研究の方法

1) テルペン環化酵素と考えられる遺伝子を欠損または変異させた **1** の遺伝子クラスターを放線菌にて発現させる。その代謝産物を解析することにより、テルペン環化酵素を同定する。

2) 大腸菌や放線菌にて **1** の生合成を担うテルペン環化酵素を過剰発現させる。得られた酵素溶液を用いて化学合成した基質アナログとの酵素反応を行い、非天然型メロテルペノイドを創製する。

## 4. 研究成果

1) **1** の生合成は、まず 7 炭糖の sedo-heptulose-7-phosphate が環化、脱水、酸化したキノン **2** にファルネシル基 (C<sub>15</sub>) が付加することで **3** が生じる。その後、テルペン環化酵素が **3** の末端二重結合のプロトン付加により環化反応を開始することで **1** を合成すると考えられている (図 1)。図 2 の生合成遺伝子クラスター (*orf8-15*) を過剰発現させた放線菌にて **1** の生産が確認されているが<sup>2)</sup>、生合成の最終段階となるテルペン環化酵素は同定されていない。**1** の生合成遺伝子クラスターには機能未知遺伝子 ORF15 が存在する (図 2)。ORF15 は、真菌由来のメロテルペノイド pyripyropene の生合成に必須なテルペン環化酵素 Pyr4<sup>3)</sup> と弱い相同性 (identity 26%) を示し、どちらも膜タンパク質である。そのことから ORF15 は **1** の生合成を担う新規テルペン環化酵素と考えられる。

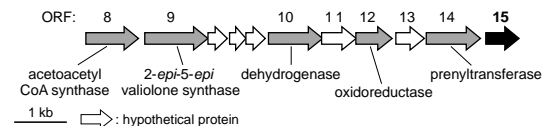


図2 BE-40644の生合成遺伝子クラスター

そこで、ORF15 の機能を同定するため、*in vivo* 解析を行った。まず、大腸菌-放線菌シャトルベクターである pWHM3 に **1** の生合成遺伝子クラスターが連結されたプラスミド pWHM3-*orf8-15* を放線菌 *Streptomyces lividans* に形質転換した。培養菌体抽出物を HPLC にて解析した結果、**1** の生産が確認できた。続いて、ORF15 の機能を解析するため、**1** の生合成遺伝子クラスターから ORF15 を除いたプラスミド pWHM3- $\Delta$ *orf15* を作成した。本プラスミドを *S. lividans* にて過剰発現させることで、**1** への環化反応が行われずに **3** が蓄積することが期待された (図 1)。pWHM3- $\Delta$ *orf15* を *S. lividans* に形質転換し、培養菌体抽出物を解析した結果、**1** は生産されなくなったが、期待された **3** などの直鎖状テルペンにキノンが付加した化合物の生産も見られなかった。

2) Pyripyropene の生合成を担うテルペン環化酵素 Pyr4 の *in vitro* 解析が行われており、E84 と D218 の変異株が環化活性を示さなかったことから、両酸性アミノ酸残基が活性部位であることが報告されている<sup>3)</sup>。Pyr4 と ORF15 のアミノ酸アライメントを作成したところ、ORF15 においてもこれらの酸性アミノ酸残基、E44 と D185 が保存されていた。このことから、**1** の生合成遺伝子クラスター内の ORF15 の E44 または D185 に変異を導入することで、環化活性が無くなり、**3** などが蓄積することが期待される。そこで、

*orf8-15* 内の ORF15 の E44 を Ala に置換した変異プラスミド pWHM3-*orf15* E44A を作成した。本プラスミドを *S. lividans* に形質転換し、培養菌体抽出物を解析したところ、特異的な代謝産物が確認できた。しかしながら、この産物は微量であったことから、構造解析には至らなかった。

3) pWHM3-*orf15* E44A/*S. lividans* の系で得られた生成物が微量であったことから、生成物量の向上を目的とし、発現系の変更を行った。強力な恒常発現プロモーター *rpsJp* を有する pKU1021 に *orf8-15* を連結したプラスミド pKU1021-*orf8-15* を構築した。*Streptomyces avermitilis* に形質転換し、培養菌体抽出物を解析したところ、**1** の生産量が pWHM3-*orf8-15*/*S. lividans* の系の 5 倍程度向上した。また、強力な発現プロモーター *PtipA* を有する pIJ6021 に生合成遺伝子クラスターを連結し、*S. lividans* に形質転換したところ、こちらの系でも **1** の生産量の増加が確認できた。

4) pKU1021-*orf8-15* から *orf15* を欠損させたプラスミド pKU1021- $\Delta$ *orf15* を構築した。本プラスミドを *S. avermitilis* に形質転換し、菌体抽出物を解析したところ、pWHM3- $\Delta$ *orf15*/*S. lividans* の系と同様に **1** は生産されなくなったが、**3** などの直鎖状テルペンにキノンが付加した化合物の生産も見られなかった。

続いて、*orf8-15* 内の ORF15 の推定活性部位 E44 と D185 を Ala に置換したプラスミド pKU1021-*orf15* E44A と pKU1021-*orf15* D185A を構築した。それぞれのプラスミドを *S. avermitilis* に形質転換し、菌体抽出物を解析した。D185A 変異株では生成物が得られなかったが、E44A 変異株において特異的な生成物を確認することができた。この生成物は pWHM3-*orf15* E44A/*S. lividans* の系にて得られた生成物と同じであると考えられる。pKU1021-*orf8-15* E44A/*S. avermitilis* の系に変更したことにより生成物量が増加したことから、この系を用いて生成物の単離、構造決定を行っていく。この代謝産物の構造を決定することで、ORF15 の機能を明らかにする。

5) *orf15* の欠損株からは、**3** のような直鎖上テルペンにキノンが付加した化合物が得られなかった。テルペン環化酵素の基質の同定および **1** の生合成経路の解明を目的とし、キノン体の単離を試みた。pKU1021-*orf8-15* からプレニルトランスフェラーゼのホモログ遺伝子である *orf14* を欠損させたプラスミド pKU1021- $\Delta$ *orf14* を構築した。本プラスミドを *S. avermitilis* にて過剰発現させることで、**2** のようなキノン体が蓄積することが期待された (図 1)。pKU1021- $\Delta$ *orf14* を *S. avermitilis* に形質転換し、培養菌体抽出物を

解析した結果、特異的な生成物を確認することができた。今後、この生成物を単離し、構造決定を行う。

6) 非天然型メロテルペノイドの創製を目的とし、ORF15 と基質アナログとの酵素反応を行った。*orf15* を pColdI および pColdTF に連結し、大腸菌にて発現させた。また、*orf15* を pIJ6021 に連結し、*S. lividans* を宿主とした発現も行った。その結果、pColdTF に連結し、大腸菌で発現させることにより、可溶性タンパク質を得ることができた。得られた ORF15 の酵素溶液と farnesyl hydroquinone などのキノン部分を改変した基質アナログとの酵素反応を行い、酵素反応抽出物を GC-MS にて解析したが、生成物は得られなかった。今回発現させた ORF15 は TF が融合した形で発現させている。そのため、ORF15 が活性型で得られなかった可能性がある。今後、TF の除去、もしくは放線菌や酵母など他の発現系で ORF15 の可溶性タンパク質を調製し、酵素反応を行うことにより、非天然型メロテルペノイドの創製に取り組んでいく。

#### <引用文献>

1) K. Torigoe, N. Wakasugi, N. Sakaizumi, T. Ikejima, H. Suzuki, K. Kojiri, and H. Suda, *J. Antibiot.*, **49**, 314-317, 1996.

2) T. Kawasaki, T. Kuzuyama, K. Furihata, N. Itoh, H. Seto, and T. Dairi, *J. Antibiot.*, **56**, 957-966, 2003.

3) T. Itoh, K. Tokunaga, Y. Matsuda, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, and T. Kushiro, *Nat. Chem.*, **2**, 858-864, 2010.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

仲野 千秋 (NAKANO, Chiaki)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：70620376