

真菌由来新規テルペン環化酵素の発掘とテルペン化合物の生物生産

葛山 智久

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究の目的

テルペンとは、天然に約 8 万種の多様な構造の報告例がある天然物最大のグループである。テルペン類は、鎖状の基質に対してテルペン合成酵素が作用することで、複雑な多環骨格と絶対立体化学が厳密に制御されて生合成される¹。この骨格多様性と立体制御機構により、テルペン類は多様な生物活性を示す。リモネンの香気活性、アルテミシニンの抗寄生虫活性、タキソールの抗ガン活性など、その産業利用や創薬における潜在機能は計り知れない。これらのテルペンは、いわゆる「モノ取り＝化合物探索」によって発見されてきた。加えて最近では、ゲノム情報が容易に入手できるようになり、配列情報から新しい酵素を発見し、その機能解析を基に新しいテルペン化合物を発見するゲノムマイニングも行われている。しかし、微生物由来のテルペン合成酵素間の配列相同性が著しく低いこと、またその遺伝子のほとんどが発現しておらず休眠遺伝子であるという問題から、その解析例は限定的である。そのため、微生物のテルペン合成酵素遺伝子は巨大な未発掘遺伝子資源と考えられている。

本研究課題では、第一の研究対象として、真菌由来の複雑骨格を有するジテルペン A (分子式 $C_{20}H_{34}O_3$) を設定し、その生合成の鍵酵素であるテルペン環化酵素遺伝子の同定を目的とした。

また、これまでに我々は、テルペン環化酵素の発掘とその生合成機構に関する研究を推進するため、短い配列モチーフ検索も可能な隠れマルコフモデル (HMM) 法を採用し、高感度なテルペン環化酵素候補遺伝子の探索を行ってきた²。しかしながら、未だ、機能未知のテルペン環化酵素が多く存在する。そこで本研究では、新たなテルペン環化酵素を発掘するための HMM を開発するとともに、新たに発掘する酵素の機能解析を行うことで、これまで誰も入手し得なかったテルペン化合物の発見も目的とした。

方法

分子式 $C_{20}H_{34}O_3$ のジテルペン A の生合成の鍵酵素であるテルペン環化酵素遺伝子を同定するため、生産菌のゲノム DNA 配列を取得し詳細に解析する。一般に、二次代謝産物の生合成遺伝子はクラスターを形成していることが多いため、ジテルペン環化酵素の基質であるゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGPP) を供給する GGPP 合成酵素遺伝子の近傍に機能未知の酵素遺伝子が存在した場合、その機能未知酵素がジテルペン A の生産に関与する可能性がある。また、水酸化に関わるシトクロム P450 の

存在も指標にする。次に、候補遺伝子が大腸菌で発現させ、組換え酵素を調製して GGPP と反応させ、目的とするジテルペンの骨格が形成されるか調べることで、目的のテルペン環化酵素遺伝子を同定する。

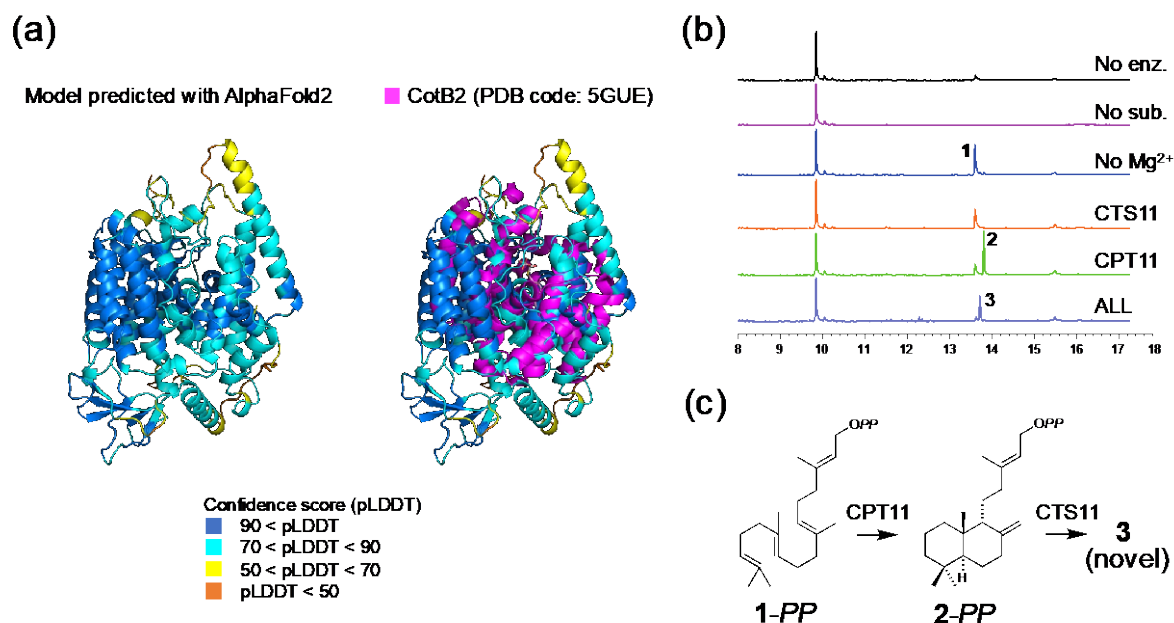
テルペン環化酵素は、単独で、マグネシウムなどの金属イオンの存在下で鎖状の基質に対して作用し、複数の炭素-炭素結合を形成し絶対立体化学を厳密に制御しながら多段階の反応を経て、複雑な多環骨格を一気に作り上げる極めて洗練された生体触媒である。この多段階の反応を触媒するために重要な配列モチーフがいくつか存在していることが分かってきていることから、最近新たに同定されたテルペン環化酵素のアミノ酸配列に見出される重要な配列モチーフを加えて、新たな HMM を作成する。次いで、公開されているアミノ酸配列データベースから、新たにテルペン環化酵素の候補のアミノ酸配列を発掘し、上述のように組換えタンパク質の機能解析を行うことで、新規なテルペン環化酵素のレパートリーをさらに増やし、新規テルペン化合物を発見する。

結果

ジテルペン A の生合成の鍵酵素であるテルペン環化酵素遺伝子を同定するため、生産菌のゲノム DNA 配列を取得して詳細に解析したところ、GGPP 合成酵素と水酸化に関わるシトクロム P450 の両方の遺伝子を含む唯一の遺伝子クラスターを同定した。その遺伝子クラスターには、機能未知の遺伝子も含まれていた。そこで次に、この機能未知遺伝子が大腸菌で発現させ、組換え酵素を調製して GGPP と反応させたところ、反応が進行することが判明した。さらに、その反応産物を GC-MS で分析したところ、ジテルペン A の炭素骨格を形成することが分かり、ジテルペン A 生合成のテルペン環化酵素遺伝子を同定することに成功した。そのテルペン環化酵素の構造を AlphaFold2 で予測したところ、これまでに決定されているテルペン環化酵素である CotB2 の構造³とは大きく異なることが判明した (図 a)。

一方で、公開されているアミノ酸配列データベースから、新たに同定された 110 個の Class I テルペン環化のアミノ酸配列を選抜し、独自の HMM を作成した。次いで、この HMM を用いて、近年増えつつあるシアノバクテリアのアミノ酸配列データベースから Class I テルペン環化酵素の候補を探索したところ、複数の機能未知酵素がヒットした。次に、互いに 30%以上の相同性を示すアミノ酸配列は除いたところ、複数の Class I テルペン環化酵素の候補が選抜された。中でも、*cts11* と名付けた Class I テルペン環化酵素候補遺伝子上流には、560 アミノ酸からなる ORF (*cpt11*) が存在していた。この ORF は、相同性検索の結果、copalyl-diphosphate (CPP) synthase と推定された。そこで、*cts11* と *cpt11* それぞれの組換えタンパク質を大腸菌で調製して精製したところ、40 kDa と 62.5 kDa の可溶性タンパク質を得ることができた。これらの組換え酵素を MgCl₂ 存在下で基質 GGPP とインキュベートしたところ、CPT11 の反応液からは *syn*-CPP (2-PP) が、CPT11 と CTS11 の両方の酵素を含む反応液か

らは未知化合物 **3** が生成した (図 b)。そこで、**3** を精製し、各種 NMR スペクトルデータを詳細に解析したところ、**3** は新規な 3 環性のジテルペン化合物であることが判明した (図 c)。



結論

ジテルペン A は、これまでに同定されていたテルペン環化酵素とは構造が大きく異なる新型のテルペン酵素によって生合成される。

新たに作成した HMM を用いてゲノムマイニングの手法で得られたジテルペン化合物は、シアノバクテリア由来の新規な 3 環性ジテルペン化合物であり、作成した HMM は新規テルペン環化酵素の発掘に有効である。今後も、この HMM を利用することで、新規なテルペン化合物が発見できると考えられる。

文献

- (1) Meguro, A. *et al.* (2015) An unusual terpene cyclization mechanism involving a carbon-carbon bond rearrangement. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54: 4353-4356.
- (2) Yamada, Y. *et al.* (2015) Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: 857-862.
- (3) Tomita, T. *et al.* (2017) Structural insights into the CotB2-catalyzed cyclization of geranylgeranyl diphosphate to the diterpene cyclooctat-9-en-7-ol. *ACS Chem. Biol.* 12: 1621-1628.