

行った。しかし、糖鎖を加えたものと加えなかったものについて、顕著な差は見られなかった。現在は糖鎖以外の安定化が予想される化合物を用いた検討を進めている。

本研究奨励金の使途について

本研究奨励金は、主に、プロアントシアニジン合成するための試薬・ガラス器具、生物活性試験を行うための試

薬・器具類に使用された。備品として、タンパク質の電気泳動や光親和型リンカーのクロスリンクに使用する UV クロスリンカー (CL-1000) を購入した。これらの購入により、効率的に合成研究、および、生物活性試験を行うことが可能となり、今後プロアントシアニジンの化学生物学研究を可能とする成果を得ることができたと考えている。

新規 C₃₅ テルペン環化酵素の発掘からゲノムマイニング及び非天然型創出への展開

新潟大学大学院自然科学研究科／農学部応用生物化学科
佐藤 努

諸論

テルペノイド (イソプレノイド) は、5万種類を超える天然有機化合物群であり、ホルモン、ビタミン、薬剤、香料、機能性食品素材等として有用な生理活性物質も多い。炭素数5個のイソプレン単位によって、ヘミ (C₅)、モノ (C₁₀)、セスキ (C₁₅)、ジ (C₂₀)、セスタ (C₂₅)、トリ (C₃₀) またはテトラテルペン (C₄₀) に分類されるが、C₃₅ テルペンには長らく特別な分類名が存在しなかった。その大きな要因は、直鎖状 C₃₅ イソプレノイドの環化を経て生合成される環状 C₃₅ テルペンが最近まで見出されていなかったことが考えられる。我々は、直鎖状 C₃₅ イソプレノイドの環化を経て生合成されると予想される (既存の分類体系に属さない) 環状 C₃₅ テルペンを発見して以来 (2005年度日本農芸化学会)、*Bacillus* 属と *Mycobacterium* 属細菌に存在する C₃₅ テルペンの探索と生合成研究を精力的に行ってきた。その結果、酵素・遺伝子レベルでの生合成研究による証明に基づき C₃₅ テルペンに新しい分類名「セスクアテルペン (sesquiterpenes)」を命名した [sester- にならって、4つ目 (ラテン語 *quartus*) が半分 (ラテン語 *semis*) の意味で命名]。さらに、新規セスクアテルペンの発見や新型・二機能性等のユニークな生合成酵素の発見にも成功した。本研究成果は、天然物探索、生合成研究、生理機能・生物活性解析など、今後のテルペノイド研究の進展に貢献するものと期待される。

1. *Bacillus* 属細菌が生産するセスクアテルペンに関する研究

1-1. 新型テルペン環化酵素の初めての同定¹⁾

2008年に、ハーバード大のグループが枯草菌から単環性 C₃₅ テルペン (2: 我々が2005年度日本農芸化学会で発表

した化合物) とそれが更に環化したと考えられる5環性 C₃₅ テルペン (3, 当初は抽出操作に生じる脱水体が報告された) を枯草菌から発見した (図1)。それらの C₃₅ テルペンは直鎖状 C₃₅ イソプレノイド (1) の環化を経て生合成されることが予想されたが、単環と4環形成を触媒する2種類のテルペン環化酵素 (TS と TC) の同定が成されていなかった (図1)。枯草菌ゲノムにおいて既知の二リン酸脱離開始型テルペン環化酵素の類似遺伝子がなく、ゲノム内で関連遺伝子の周辺を探索しても候補遺伝子が見出されなかったことから、NBRP の枯草菌遺伝子破壊株ライブラリー (2514株) の中から *ts* 遺伝子候補を探すことにした。既知のテルペン環化酵素は240アミノ酸以上であるため、「functional unknown protein」と「conserved hypothetical proteins」の中から各々180と240アミノ酸以上のものを選抜し、さらに C₃₅ テルペン生産菌4種のゲノムに存在し非生産菌4種に存在しない遺伝子を選抜することで、候補遺伝子を49個に絞ることができた。この49種類の遺伝子破壊株の脂質成分をTLCとGC-MSによって分析したところ、*ytpB* 遺伝子破壊株のみが2を生産しなかった。次に、*in vitro* 酵素反応によって証明するため、大腸菌発現系から精製 YtpB を得て、精製組換えヘプタプレニル二リン酸合成酵素 (HepS と HepT) によって酵素合成した基質1とインキュベートしたところ、2の生産をGC-MSによって確認することができた。この結果は、*ytpB* 遺伝子が TS

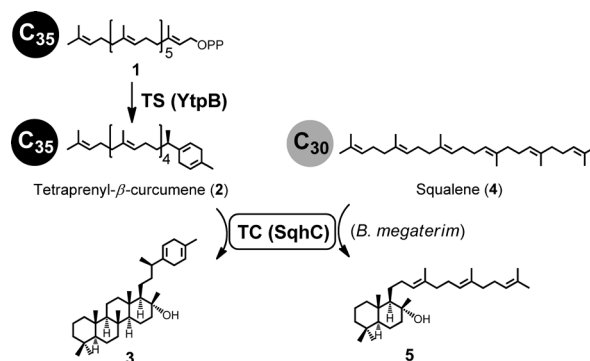


図1 *Bacillus* 属細菌におけるセスクアテルペンとトリテルペンの生合成経路

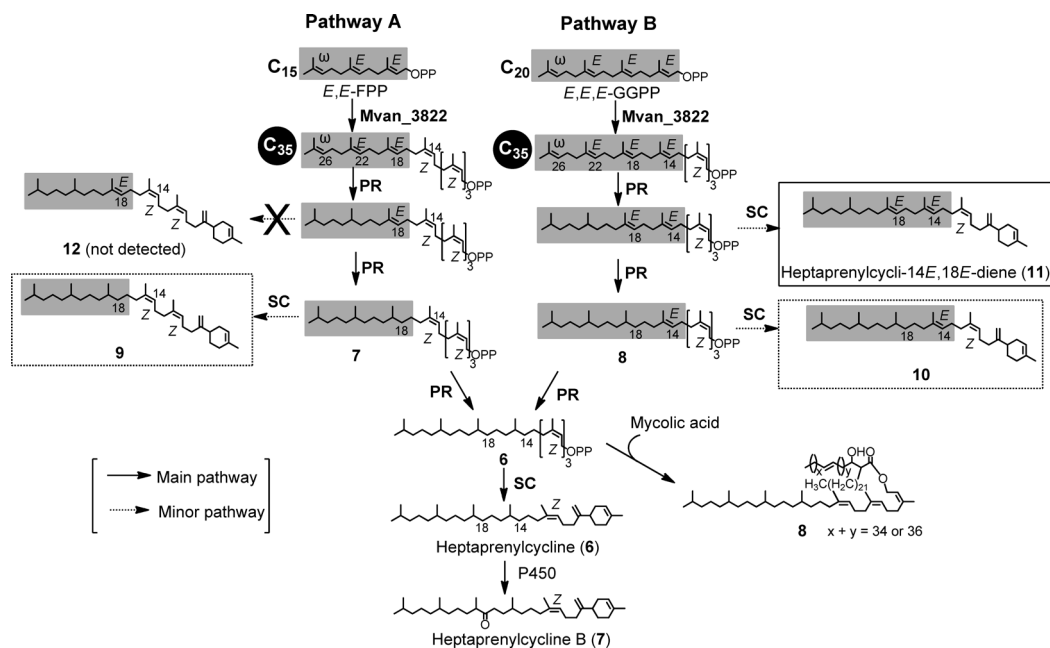


図2 *Mycobacterium* 属細菌におけるセスクアテルペンの推定生合成経路

をコードしていることを示しており、 C_{35} テルペンが直鎖状 C_{35} イソプレノイドの環化を経て生合成されることを酵素・遺伝子レベルで実証した初めての例であった。したがって、 C_{35} テルペンに新しい分類名が必要であり、「セスクアテルペン」と呼ぶことを提案した。

TS ホモログは、機能未知蛋白質として *Bacillus* 属以外の様々な細菌にも存在しており、どのようなテルペノイドを生合成しているのか大変興味深い。また、TS は既知のテルペン環化酵素と相同性がないため、今後、生化学的および構造生物学的手法によって新しい触媒機構を解明していきたいと考えている。

1-2. 二機能性テルペン環化酵素の初めての同定²⁾

ハーバード大のグループは、スクアレン-ホペン環化酵素 (SHC: C_{30} のスクアレン 4 を 5 環性トリテルペンのホペンとホパノールへ環化する酵素) の類似遺伝子 (*sqhC*) を破壊した枯草菌が 3 を生産しないことから、*SqhC* が TC であることを提案したが、*in vitro* 酵素反応による証明がなかった。我々は、大腸菌発現系から *SqhC* を含む無細胞抽出液を得て、2 と反応させた後、生成物 3 を単離・構造決定した。3 の立体化学は同定されていなかったが、決定できた (図1)。精製 *SqhC* による 2 との反応においても 3 の生産を確認でき、*SqhC* が TC であることを明確に証明することができた。

TC は SHC と一次構造が類似しているにも関わらず、TC は 4 を環化しないことが報告されていた。SHC は以前から我々が研究している酵素であることから、TC の 4 との反応性に疑問があった。そこで、我々の系で再実験した

ところ、TC は 4 を環化して二環性トリテルペン 5 を生合成することが判明し (図1)、他のグループの結果を訂正した。さらに、スクアレン合成酵素ホモログをもつ 6 種の *Bacillus* 属細菌 (枯草菌も含む) の脂質分析から、*B. megaterium* がセスクアテルペン (2 と 3) とトリテルペン (4 と 5) の両方を生産していることを明らかにした。また、大腸菌発現系によって調製した *B. megaterium* 由来組換え精製 TC を基質 2 と 4 と同一反応系においてインキュベートしたところ、3 と 5 を生成することを確認できた。これらの結果は、*B. megaterium* の TC は 2 と 4 の両方を環化する二機能性トリテルペン/セスクアテルペン環化酵素であることを示しており (図1)、生物体内で炭素数の異なる 2 種類のテルペンを天然物として生合成する二機能性テルペン環化酵素は初めての発見であった。今後、二機能性に着目するアプローチによって、生物体内で機能している新規テルペノイドを発見できると考えられる。

2. *Mycobacterium* 属細菌が生産するセスクアテルペンに関する研究³⁾

2008 年以降、我々は、*Mycobacterium* 属細菌からの天然物探索によって、ヘプタプレニルサイクリンと命名した新規環状セスクアテルペン (6) をはじめ、6 の代謝物 (7) と直鎖状 C_{35} イソプレノイドにミコール酸が結合した化合物 (8) を単離・構造決定してきている (図2)。Mvan_3822 が C_{15} と C_{20} のアリル型基質から C_{35} まで、 C_{10} アリル型基質から C_{50} まで伸長する二機能性 Z 型プレニル鎖伸長酵素であることの証明およびマイナーな代謝物 (9 と 10) の構造

から、経路 A と B の存在が判明した (図2)。以前は対数増殖期後期の菌体からセスクアテルペンを探索していたが、今回は定常期の菌体から新規セスクアテルペン (11) を見出し、単離・構造決定した。定常期の菌体からは 12 のような経路 A から生合成されたマイナー代謝物が全く検出されなかったことから、定常期においては経路 B のみを利用されるという培養時期による生合成経路の違いを明らかにすることができた。また、段階的還元反応の順番が ω 末端側から起きていることが示唆され、クロロフィル生合成ともとは異なることが示唆された。

ま と め

Bacillus 属細菌から新型テルペン環化酵素 (TS) と二機能性テルペン環化酵素 (TC) を初めて同定することができた。また、*Mycobacterium* 属細菌からは培養時期による生合成経路の違いを明らかにすることができ、今後の新型テルペン環化酵素 (SC) の発見につなげていきたいと考えている。TS のホモログからのゲノムマイニングは既に一部結果が出てきており、新規セスタテルペン (C_{25})/トリテルペン (C_{30}) 合成酵素を見出している⁴⁾。非天然型創出に

関しても、TS と TC を用いて現在進行中であり、今後近いうちに発表する予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Sato, T., Yoshida, S., Hoshino, H., Tanno, M., Nakajima, M., Hoshino, T., Sesquiterpenes (C_{15} terpenes) biosynthesized via the cyclization of a linear C_{15} isoprenoid by a tetraprenyl- β -curcumen synthase and a tetraprenyl- β -curcumen cyclase: identification of a new terpene cyclase, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9734–9737, 2011.
- 2) Sato, T., Hoshino, H., Yoshida, S., Nakajima, M., Hoshino, T., Bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase: tetraprenyl- β -curcumen cyclase is also squalene cyclase in *Bacillus megaterium*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17540–17543, 2011.
- 3) Sato, T., Ono, E., Nakajima, M., Nakano, C., Hoshino, T., Insight into the pathway for biosynthesis of sesquiterpenes in nonpathogenic *Mycobacterium* species: Identification of heptaprenylcyclase-14E, 18E-diene, *Tetrahedron Lett.*, **53**, 2522–2524, 2012.
- 4) 佐藤努, 山鹿宏彰, 鹿島将志, 中島真美, 仲野千秋, 星野力: 2012年度日本農芸化学会大会 (3A06a12)

出芽酵母の遺伝学を用いた生体膜スフィンゴ脂質の生物機能解明と応用

九州大学大学院理学研究院化学部門 谷 元洋

【目的】

スフィンゴ脂質は長鎖スフィンゴイド塩基を持つ脂質の総称で、その中でも親水性頭部を持つ複合スフィンゴ脂質は生体膜を構成する脂質として古くから知られている。近年、スフィンゴ脂質は二つの視点から注目を集めている。第一に、形質膜上のラフトと呼ばれるマイクロドメインの構成分子として機能し、細胞内外のシグナル伝達の中継地点の役割を果たしていること、第二に、分解されて産生される代謝産物 (セラミド、スフィンゴシン 1-リン酸等) が、細胞分化、増殖、アポトーシス及び細胞運動を制御する点である (文献1)。本研究では、生体膜スフィンゴ脂質の生物機能解明を目指し、以下の二つの観点から研究を行った。

1. 特定の構造を持った複合スフィンゴ脂質の生物機能解明

哺乳動物の複合スフィンゴ脂質は、親水性頭部や脂肪酸の構造の違いにより膨大な数の分子種を持つことが知られている。近年、複合スフィンゴ脂質のわずかな構造の違いが、スフィンゴ脂質の多彩な生物機能を規定する要因であ

るといわれている。しかしながら、その複雑性からその構造多様性の生物学的な意義の全貌の解明には至っていない。本研究では、分子生物学的アプローチが容易、且つ複合スフィンゴ脂質の構造バリエーションが比較的シンプルな酵母を応用して、特定の構造を持ったスフィンゴ脂質の生物機能の解明を試みた。

2. セラミドの構造と機能の相関

様々な細胞外刺激によって生成されるスフィンゴ脂質代謝産物、セラミドは細胞死を制御する脂質シグナリング分子としてはたらくことが知られているが、セラミドの分子レベルでの作用メカニズムという非常に基本的な問題が未解決である。そこで本研究では、セラミドの生理活性発揮

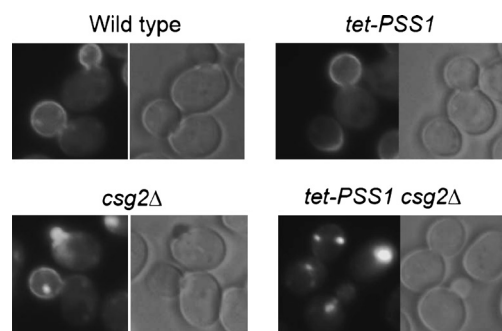


図1 野生型, *tet-PSS1*, *csg2Δ*, 及び *tet-PSS1 csg2Δ* 株における GFP 融合 Snc1 の分布