

抑制トマトが選抜でき次第、実用作物への適用の可能性を検討する。

3. PAP 様遺伝子欠損シロイヌナズナを用いた解析

シロイヌナズナには多数のリン脂質脱リン酸化酵素遺伝子が存在する。そのうち、PAPとして機能することが明らかにされている遺伝子の欠損変異体 (*LPPγ*, *LPPε1*, *LPPε2*, *LPPε1ε2*, *pah1*, *pah2*, *pah1pah2*) について、種子の収集が終了した。現在、青枯病細菌およびトマト斑葉病細菌を用いて、耐病性検討を行っている。

4. PAP 遺伝子抑制植物におけるプライミングの分子機構の解析

PAP 遺伝子抑制タバコ植物、対照植物に種々の感染刺激を与えた場合の免疫応答の変化を、活性酸素の生産、PR 遺伝子の発現を指標に調べた。キチン等の PAMPs と呼ばれる細胞死を引き起こさない感染刺激を与えた場合、活性酸素の生産、PR 遺伝子発現の上昇は認められなかった。一方、過敏細胞死を誘導する非親和性細菌の感染やエリシチンタンパク質の処理では劇的な活性酸素の生産、PR 遺伝子発現上昇が認められた。

5. PAP 遺伝子抑制形質転換植物に蓄積する PA 分子の解析

PAP 遺伝子抑制タバコ植物、対照植物から全脂質画分を抽出し、LC-MSを用いた脂質分析を行った。全PA量は2倍程度の蓄積が認められるものの、病原体を感染させない状況では、個々のPA分子や個々のリン脂質含量に劇的な変化が認められないことが明らかとなった。今後は、上記③の実験で免疫誘導効果が見られた感染刺激を中心に、種々の免疫付与処理を行った植物を用いた脂質分析を行う予定である。

まとめと今後の展望

本研究の成果から、PA蓄積を介した免疫応答のプライミングに対して、強い防御を誘導するためには細胞死を伴うような強い刺激が必要である。すなわち、雑菌や日和見感染的な菌との接触では免疫が誘導されないことを示しており、病害防除の実践には極めて有効な手段を与えるものと考えられる。今後は、①プライミングに関わるPA分子の同定、②実用作物への応用の可能性、③ナス科以外の植物への展開を通して、PAを介したプライミングを利用した耐病性植物の作出や新規の防除剤への応用を検討していく必要がある。

複合型テルペンの環化酵素を利用した非天然型化合物の創製

新潟大学大学院自然科学研究科 仲野千秋

テルペン（イソプレノイド）は、炭素数5個のイソプレン単位に由来する化合物の総称であり、現在までに5万種類以上が報告されている。テルペンには、抗菌活性や抗腫瘍活性などの生理活性を持つものが数多く知られている。テルペンの生合成で中心的役割を果たす酵素は、直鎖状テルペンの環化反応を担うテルペン環化酵素であり、多様な環状骨格の構築を担う。今後、テルペン等の新規化合物を取得し、さらなる構造多様性の拡大を図るには、酵素の触媒機構の改変や基質アナログの活用などによる非天然型化合物の創製が必要となる。

非天然型化合物の創製に向けて、本研究では放線菌 *Actinoplanes* sp. A40644 から単離された抗腫瘍活性、抗HIV活性物質BE-40644 (**1**)¹⁾ の生合成系に着目した (図1)。1のような、テルペンにキノンやポリケタイドなどの非テルペン骨格が融合した複合型テルペンには、抗腫瘍活性、抗菌活性、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の生合成は、各ORFのホモロジー検索から推定された。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 (C₁₅) 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を生合成すると考えられている (図1A)。図1Bの生合成遺伝子クラスター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²⁾、生合成の最終段階となるテルペン環化酵素は未だ同定されていない。

そこで本研究は、まず、1の生合成を担う新規テルペン

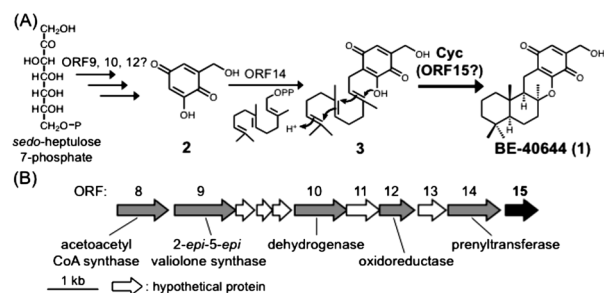
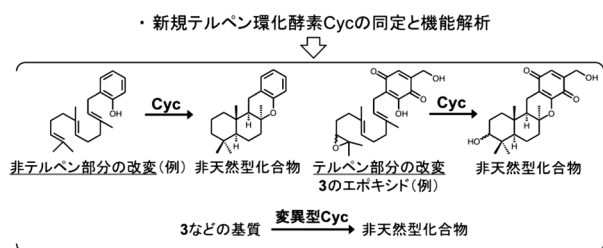


図1 BE-40644 の生合成経路 (A) および生合成遺伝子クラスター (B)。



環化酵素（以下Cycと表記）を取得する。その後、取得したCycを用いて、キノン部分またはテルペン部分を改変した基質アナログとの酵素反応や、触媒活性を改変した変異型酵素を活用することで、非天然型の複合型テルペンを創製することを計画している（図2）。今回、*in vivo*解析によるCycの探索、および非天然型化合物の創製へ向けたCycの取得と基質アナログの化学合成について報告する。

1. BE-40644の生合成を担う新規テルペン環化酵素Cycの探索

1の生合成遺伝子クラスターには機能未知遺伝子ORF15が存在している（図1B）。この遺伝子産物は、真菌が産生する複合型テルペン pyripyropene の生合成に必須なテルペン環化酵素Pyr4（エポキシドのプロトン付加により環化反応を開始する）³⁾と弱い相同性（identity 26%）を有し、どちらも膜タンパク質である。このことから、ORF15が1の生合成を担う新規テルペン環化酵素Cycと予想した。この仮説を検証するため、ORF15の*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（図1B）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、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-*orf8-14*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。pWHM3-*orf8-14*を*S. lividans*に形質転換体し、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。そこで、キノンにファルネシル基を付加するプレニルトランスフェラーゼであるORF14を除いたpWHM3-*orf8-13*を構築した。本プラスミドの形質転換体からキノン(2)の生産が期待されたが、2などの

キノン体の生産は見られなかった。代謝産物が見られなかった原因の一つとして、ORF8-14の発現に問題がある可能性が考えられた。

pyripyropeneの環化反応を担うPyr4の*in vitro*解析において、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³⁾。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、BE-40644生合成遺伝子クラスター中の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が蓄積することが期待される。そこで、ORF15のE44をAに置換したpWHM3-*orf8-15E44A*を作成し、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。現在、これらの産物の単離、構造解析を行っている。これらの産物の構造を解析することで、ORF15の機能を明らかにしたいと考えている。

2. 基質アナログを用いた非天然型化合物の創製

テルペン部分または非テルペン部分を改変した基質アナログをCycの基質として酵素反応を行うことにより、非天然型化合物を創製することを計画している。まず、Cycと考えられるORF15の発現に取り組んだ。ORF15を様々なベクターに連結し、大腸菌や放線菌にて過剰発現させた結果、可溶性タンパク質を得ることに成功した。また、キノン部分を改変した数種類の基質アナログを共同研究により化学合成したので、ORF15との酵素反応を行い、非天然型化合物の創製に取り組んでいきたいと考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご援助を頂きました農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

また、BE-40644の生合成遺伝子クラスターを分譲して頂きました、北海道大学 大学院総合化学研究院の大利徹教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Torigoe, K., Wakasugi, N., Sakaizumi, N., Ikejima, T., Suzuki, H., Kojiri, K., and Suda, H., *J. Antibiot.*, **49**, 314-317 (1996).
- 2) Kawasaki, T., Kuzuyama, T., Furihata, K., Itoh, N., Seto, H., and Dai, T., *J. Antibiot.*, **56**, 957-966 (2003).
- 3) Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y., and Kushiro, T., *Nat. Chem.*, **2**, 858-864 (2010).