



セスクアテルペン (C₃₅ テルペン) の探索と生合成に関する研究

新潟大学大学院自然科学研究科生命・食料科学専攻 准教授 佐藤 努

はじめに

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、機能性食品素材など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だされていなかったことが考えられる。筆者らは、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 (sesquaterpenes)」を命名した [sester- に倣って、四つ目 (ラテン語 *quartus*) が半分 (ラテン語 *semis*) の意味で命名]。さらに、数種の新規セスクアテルペンの発見や新型・二機能性など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

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 (2-3: 筆者らが2005年度日本農芸化学会で発表した化合物) とそれらがさらに環化したと考えられる5環性 C₃₅ テ

ルペン (6-8) 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ニ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いだ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 protein」の中からそれぞれ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、精製置換ヘプタプレニルニリン酸合成酵素 (HepS と HepT) によって酵素合成した基質 1 (図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をコードしていることを示しており、C₃₅ テルペンが直鎖状 C₃₅ 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、C₃₅ 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、機能未知タンパク質として *Bacillus* 属以外のさまざま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たいへん興味深い。また、TSは既知のテルペン環化酵素と相同性がない

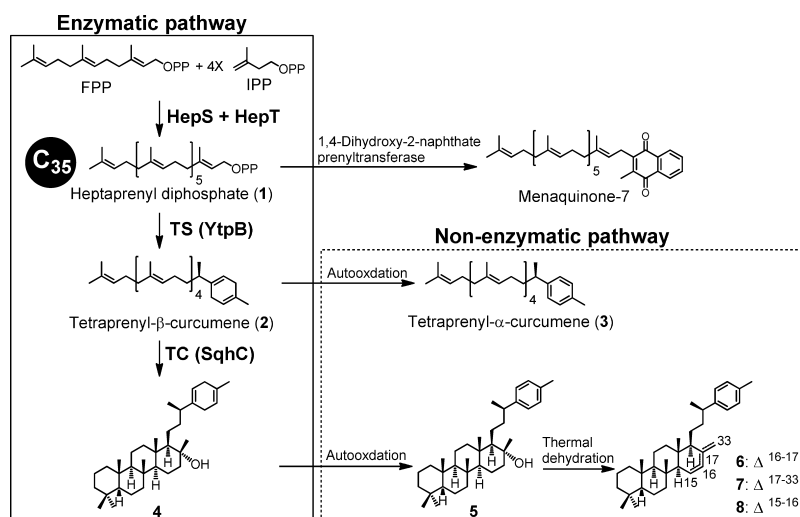


図1 枯草菌におけるセスクアテルペンの推定生合成経路

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

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: C₃₀ のスクアレン **9** 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 **4** 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。筆者らは、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 **4** を単離・構造決定した。**4** 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 **4** 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かかわらず、TC は **9** を環化しないことが報告されていた。SHC は以前から筆者らが研究している酵素であることから、TC の **9** との反応性に疑問があった。そこで、筆者らの系で再実験したところ、TC は **9** を環化して二環性トリテルペン **10** を生合成すること

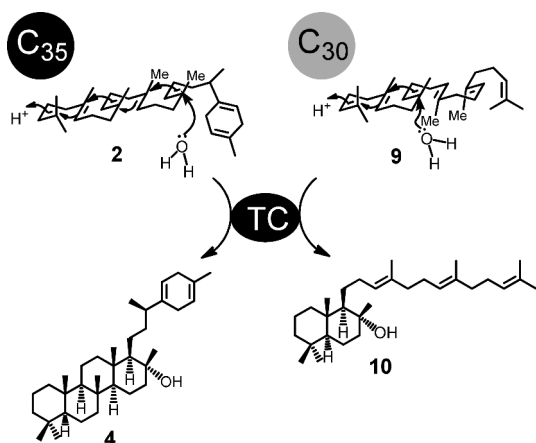


図 2 *B. megaterium* 由来の二機能性環化酵素 (TC) によるセスクアテルペンとトリテルペンの環化反応

が判明し (図 2)、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 **4**) とトリテルペン (**9** と **10**) 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 **9** と同一反応系においてインキュベートしたところ、**4** と **10** 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 **9** 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 2)、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

2008 年に、筆者らは、*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 (**11**) を単離・構造決定し、**11** が直鎖状 C₃₅ イソプレノイド (**16**) の環化を経て生成されることも無細胞抽出液系によって証明した (図 3)。その後、**11** の代謝物 (**12**) と直鎖状 C₃₅ イソプレノイドにミコール酸が結合した化合物 (**13**) も単離・構造決定した (図 3)。**12** は P450 によって **11** から生合成されることが、P450 阻害剤を用いた実験から示唆された。

ゲノムに存在する 3 種類の Z 型プレニル鎖伸長酵素 (ZPT) ホモログを *in vitro* 酵素反応によって機能同定した結果、Mvan_3822 は C₁₅ と C₂₀ のアリル型基質から C₃₅ まで、C₁₀ アリル型基質から C₅₀ まで伸長する二機能性 ZPT であることが判明した (図 3)。生体内で開始のアリル型基質によって生成物鎖長を変える二機能性 ZPT は初めての発見であった。また、Mvan_1705 が新規 Z, E, E-GGPP (C₂₀) 合成酵素であることも同定できた。*In vitro* 反応実験から、Mvan_3822 はセスク

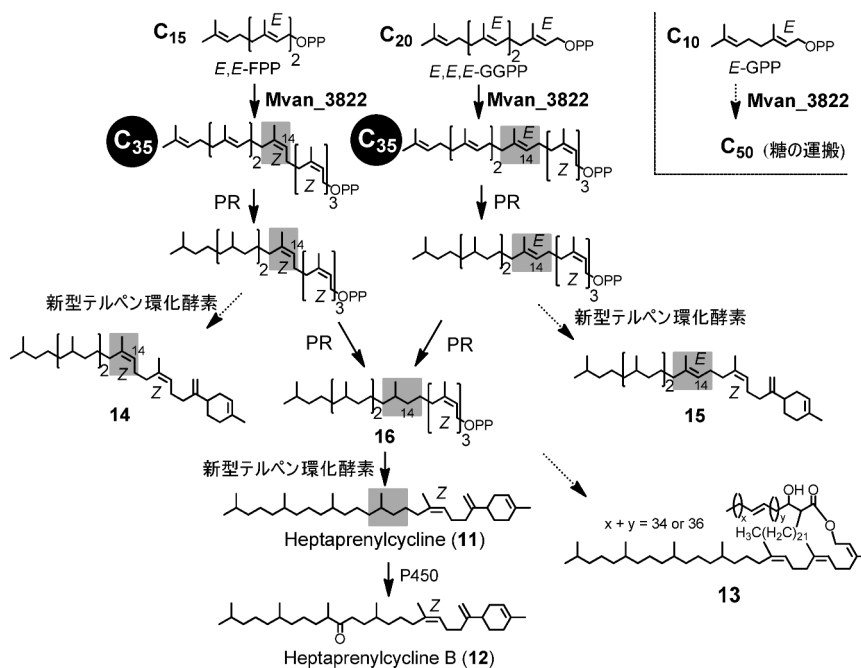


図 3 *Mycobacterium* 属細菌におけるセスクアテルペンの推定生合成経路

アテルペンの生合成において C₁₅ と C₂₀ のアリル型基質を利用可能であることが示されたが、生体内において実際に両基質を用いる二つの経路が存在するかは不明であった (図 3)。筆者らは、菌体の微量成分の探索から 14 位が還元されていない E と Z 体の化合物 (14 と 15) を約 1:1 の比率で見いだすことができた (図 3)。この構造は、二つの経路の存在を強く支持している。また、ポリプレニル鎖還元酵素 (PR) は E と Z 体の両方を還元していることが示唆され、そのような基質特異性の PR は今まで報告されていない (図 3)。さらに、*Mycobacterium* のゲノムには、枯草菌の TS のホモログがないことから、さらに別の新型テルペン環化酵素が存在している。このように、*Mycobacterium* 属細菌のセスクアテルペン生合成経路においてもユニークな酵素がまだまだ潜んでおり、今後もインパクトのある発見が成されることが期待される。

おわりに

筆者らは、天然物探索と遺伝子レベルの生合成研究を組み合わせたアプローチによって、新型や二機能性酵素を含むユニークなセスクアテルペン生合成経路の一部を明らかにすることができた。本研究はセスクアテルペンに焦点を当てて展開してきたが、他の天然物の生合成においても多くのユニークな新規経

路・酵素が潜んでいると考えられる。既知酵素の一次構造と類似性をもたない新型酵素の発掘は、容易とは言えないが、新規天然物や類似酵素の発見など多くの研究にブレークスルーを引き起こし、さらに生合成工学に用いる酵素ファミリーを増やすことにつながることから、今後の重要な課題の一つではないかと考えている。また、天然物の生合成酵素の多くは、*in vitro* 反応において基質特異性が低いことが知られていることから、生体内における酵素の多機能性についても注目して研究を進めていきたいと考えている。

本研究は、新潟大学大学院自然科学研究科生命・食料科学専攻生物有機化学研究室において行われました。研究を進めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました新潟大学大学院自然科学研究科教授・星野 力先生に心より感謝申し上げます。また、数多くの試行錯誤から本研究成果を導いてくれた新潟大学の学生諸氏、ならびに技術補佐員・中島真美氏に深く感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・星野貴行先生ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。