

論文内容の要旨

氏名	おがもとしょう 岡本 尚
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第157号
学位授与の日付	平成23年3月22日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on synthesis of a novel sesquiterpene using pathway-engineered <i>Escherichia coli</i>
論文審査委員 (主査)	教授 内海 龍太郎
(副主査)	教授 重岡 成
(副主査)	教授 川崎 努

緒言

自然界には、約 40000 種類の異なった構造を持つイソプレノイドが存在する。その中でもテルペノイドは、ジテルペンであるバクリタキセルが抗がん剤、セスキテルペンであるアーテミスニンが抗マラリア薬、モノテルペンであるメントールが香料や食品添加物として利用されている。このように、テルペノイドは医薬・農業等のファインケミカルの優れたリード化合物となる。しかしながら、これら有用なテルペノイドの多くは、基本骨格となるテルペノイドの合成酵素のほかに、モノオキシゲナーゼであるシトクロム P450 や、Short-chain Dehydrogenases/Reductases (SDRs)などの修飾酵素によって修飾され様々な構造を形成し、そのため非常に人工的な合成が難しく、さらには天然には微量にしか存在していないものが多い。このことより、それらテルペノイドの生合成経路に関わる酵素を、大腸菌などの微生物に導入し、テルペノイドを大量に全合成、あるいは半合成させる代謝工学 (pathway engineering) の発展が期待されている。

これらのテルペノイドの生合成遺伝子および修飾酵素である P450 や SDR を単離し、それらを任意に組み合わせたコンビナトリーケミストリーにより、多様なテルペノイドライブラリーの作製が可能である。テルペノイドライブラリーは 21 世紀において医薬、農業のシーズとして、有用である。本研究では、ゼルンボンと呼ばれる稀有なセスキテルペンを根茎に含むハナショウガから、セスキテルペンの修飾酵素遺伝子を単離し、その機能解析を行った。さらにそれらの遺伝子を用いて大腸菌による各種セスキテルペンの合成システムの開発に成功した。

第1章 セスキテルペン修飾酵素遺伝子( $\alpha$ -フムレン-8-ヒドロキシラーゼ)のクローニングと機能解析

セスキテルペンを修飾する重要な酵素として位置づけられているのが、モノオキシゲナーゼ(一酸素添加酵素)のシトクロム P450 である。この酵素は様々なセスキテルペンの生合成において、ヒドロキシル化、エポキシ化などに関与することが期待されている。しかしながら、その機能解析の難しさから、実際にセスキテルペンを修飾する酵素として機能解析された P450 は 7 例である。本研究では、多様なセスキテルペン修飾酵素遺伝子を単離するために、ハナショウガ根茎より、セスキテルペンに特異的に働く新規 P450 遺伝子を単離し、その機能解析を行った。ハナショウガ根茎より調整した mRNA を用いて、RT-PCR、RACE-PCR の手法を用いて単離された cDNA は 513 個のアミノ酸残基をコードする 1542 bp の ORF を持ち、推定分子量は 57.8 kDa であった。本遺伝子は、配列の相同性に基づく分類によりショウガ由来の最初の P450 遺伝子で、*CYP71BA1* と命名された。次にこの *CYP71BA1* にコードしている酵素が実際に、モノオキシゲナーゼ(一酸素添加酵素)活性を示すことを証明するために、*CYP71BA1* を酵母菌 WAT11 株にて発現させて細胞膜を抽出し、 $\alpha$ -フムレンを基質として反応させると、 $\alpha$ -フムレンは 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンに変換された。*CYP71BA1* は根茎特異的に発現しており夏に発現量が増大する傾向であ

ることが明らかとなった。これらの結果より、ハナショウガ根茎において、FPP からセスキテルペン合成酵素 (ZSS1, Yu and Okamoto et. al., 2008) により合成された  $\alpha$ -フムレンは CYP71BA1 と反応して、8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンが合成されることが明らかになった。

## 第2章 セスキテルペン修飾酵素遺伝子(デヒドロゲナーゼ/イソメラーゼ)のクローニングと機能解析

セスキテルペンの誘導体化に必要な酵素として、ヒドロキシル基から脱水素するデヒドロゲナーゼ(SDR)の存在が知られている。植物の SDR は、様々な二次代謝産物やステロイド合成、ストレス応答に関わっていることが明らかとなっているが、P450 同様、セスキテルペンを基質とする SDR は、まだ2例しか見つかっていない。そこで、本研究ではセスキテルペンに反応する SDR を単離し、その機能を明らかにした。ハナショウガ根茎より調整した mRNA を用いて、RT-PCR と RACE-PCR の手法により 267 個のアミノ酸残基をコードする 804 bp、推定分子量 28.7 kDa の全長 cDNA が得られた。この cDNA をクローニングした発現ベクターを含む大腸菌を培養後、ヒスチジンタグ付き酵素が精製された。In vitro において、本酵素と 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンを基質として反応させた結果、ゼルンボンが合成された。本遺伝子は新規な SDR をコードしていることが判明し、ZSD1 と命名された。

次に ZSD1 の発現解析を行なった。その結果 ZSD1 は葉、莖、根茎において発現が見られ、異なる成長段階においても発現が見られた。この結果は、ZSS1 や CYP71BA1 とは全く異なり、ZSD1 がゼルンボンの合成だけに働いているのではないことが示唆された。そこで基質としてボルネオールやプレグネノロンと反応させた結果、それぞれモノテルペンであるカンファーや、ステロイドであるプロゲステロンに変換された。また、プレグネノロンを基質とした反応では異性化が起こっていた。このことから ZSD1 がテルペノイドだけでなく、ステロイドにも反応するデヒドロゲナーゼ/イソメラーゼ活性の 2 機能を持つ酵素であることが示された。さらに ZSD1 が複数の基質と反応する酵素であったことから、立体構造モデルを構築し基質結合領域を観察した。その結果、基質結合領域付近が大きく広がった構造をとっていることが明らかとなった。また変異導入と反応動力学的解析により、デヒドロゲナーゼ活性に重要な 3 つのアミノ酸残基(Ser142, Tyr155, Lys159)を決定した。

## 第3章 代謝経路改変大腸菌を用いたセスキテルペンの合成と修飾酵素を用いたセスキテルペン誘導体の合成

### 3-1)代謝経路改変大腸菌を用いたセスキテルペンの合成

これまでの研究によりハナショウガから、セスキテルペン合成酵素遺伝子(ZSS1)、および修飾酵素遺伝子(CYP71BA1, ZSS1)を単離した。次に、これらの遺伝子を用いたセスキ

テルペン合成システム構築のために、まずメバロン酸経路を導入した大腸菌と ZSS1 ( $\alpha$ -フムレン合成遺伝子)を用いた  $\alpha$ -フムレン合成法の確立を試みた。

大腸菌は自身で FPP を合成できるが、その代謝経路では合成量がわずかであることが知られている。そこで、放線菌 CL190 株よりメバロン酸経路遺伝子群に加えイソペンテニル-リン酸イソメラーゼ(*idi*) 2 型、酵母より *idi* 1 型とラットのアセトアセチル CoA リガーゼ (*Aac*)のそれぞれの遺伝子を pACYC184 ベクターに挿入し、pAC-Mev/Scd1/Aac1 を作製した。このプラスミドを大腸菌に形質転換し、ZSS1 と共発現させた結果、大腸菌 JM109 はリチウムアセト酢酸を基質として加えた培地から 958  $\mu$ g/ml の濃度で  $\alpha$ -フムレンを合成した。これは大腸菌で ZSS1 のみを発現させた場合の 13.6 倍の生産量であった。

### 3-2)代謝改変大腸菌と CYP71BA1 を用いたセスキテルペン誘導体の合成

さらに我々は本研究により得られたセスキテルペン修飾酵素遺伝子の一つ、CYP71BA1 を用いてメバロン酸経路を導入した大腸菌での  $\alpha$ -フムレンの変換を行なった。メバロン酸経路遺伝子群の4つの遺伝子、シロイヌナズナ由来の P450 還元酵素遺伝子 *ATR2* と ZSS1 を含むプラスミドを構築し、CYP71BA1 と共発現させた。その結果、大腸菌で、8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンが合成されていることが明らかとなった。これらの結果は、大腸菌において、今後さらに多くのセスキテルペン合成酵素、ならびにその修飾酵素遺伝子を組み合わせたコンビナトリーケミストリーを用い、新規なセスキテルペン合成が可能になることを示した。

## 結論

### 1. セスキテルペン修飾酵素遺伝子(CYP71BA1, ZSD1)の単離と機能解析

RT-PCR と RACE-PCR の手法により、ハナショウガから全長のシトクロム P450 と SDR ファミリーの cDNA を単離し、それぞれ CYP71BA1, ZSD1 と命名した。機能解析の結果、CYP71BA1 は  $\alpha$ -フムレンを 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンに変換する  $\alpha$ -フムレン-8-ヒドロキシラーゼであることがわかった。さらに ZSD1 は 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンをゼルンボンへ変換する機能を有しており、ゼルンボンだけでなくカンファー、プロゲステロンを合成する機能も有しているデヒドロゲナーゼ/イソメラーゼであることが明らかとなった。

### 2. 代謝改変大腸菌を用いたセスキテルペンの合成法と修飾酵素を用いたセスキテルペン誘導体の合成

我々は、放線菌 CL190 株由来のメバロン酸経路遺伝子群、イソペンテニル-リン酸イソメラーゼ、ラット由来のアセトアセチル CoA リガーゼの遺伝子が挿入されたプラスミドを構築し、大腸菌に形質転換した。その大腸菌において ZSS1 を共発現させた。その結果リチウムアセト酢酸を基質として効率よく  $\alpha$ -フムレンが合成された。さらに我々は、これらに CYP71BA1 遺伝子を導入し、大腸菌に 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンを合成させることに成功した。

## 論文審査結果の要旨

植物や微生物がその生物固有の産物として作り出す二次代謝産物は、医薬品のシードとなる化合物が求められている社会において最大の化合物ライブラリーとなる。中でもテルペノイドやカロテノイドを含むイソプレノイドは最も多様な化合物群であり、生理活性を有するものが数多く存在する。しかしながら、多くの製薬会社などは、その二次代謝産物の構造の複雑さから全合成が不可能であるため、またほとんどの二次代謝産物が天然には微量にしか存在していないため二次代謝産物を敬遠してきた。そこで、それら二次代謝産物の生合成経路に関わる酵素を、大腸菌などの微生物に導入し二次代謝産物を大量に全合成、あるいは半合成させる代謝工学が近年急速に発展している。1例として、抗マラリア薬のアルテミシニンと呼ばれるセスキテルペンは、大腸菌にメバロン酸経路という代謝経路遺伝子群と生合成酵素遺伝子を導入することにより半合成が成功している。これらの背景から、本研究はハナショウガ(*Zingiber zerumbet* Smith)と呼ばれる、東南アジア原産のショウガが作り出す、特徴的なセスキテルペンに着目した。ハナショウガは、ショウガ科の多年生植物で東南アジアや南太平洋周辺に広く分布している。別名シャンプージンジャーと呼ばれ、花房に含まれる乳液をシャンプーの代用品として用いている地域もある。また、ハワイでは、スパイシーな香りのする根茎を消化不良などの治療に用いているなど、民間伝承薬としての利用もされている。この植物の特徴として、根茎に他の植物種には存在しないゼルンボンと呼ばれるセスキテルペンを含有している。ゼルンボンに関する報告は年々増加しており、近年では抗癌活性も報告されている。また、同じセスキテルペンである $\alpha$ -フムレンも精油成分中14.4%と豊富に含まれている。この化合物は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性が報告されている。これらのようにハナショウガは有用なセスキテルペンを豊富に含んでいるが、植物からの抽出法では栽培時期や土地などが限定される。そこで、大腸菌は自身でセスキテルペンの前駆物質であるファルネシルピリン酸(FPP)を合成できるため、大腸菌体内でセスキテルペン合成酵素遺伝子を発現させることで、それらのFPPと反応し*in vivo*でセスキテルペンを合成させる発酵生産的な生産システムの開発が可能であると考えられる。しかしながらハナショウガはゲノム解析もされておらず、セスキテルペンの生合成遺伝子などは全く明らかとなっていない。また、大腸菌はFPPを合成するが、その合成経路(非メバロン酸経路)は詳細が明らかとなっていないが、生理的な抑制が働いており、FPPの合成量がわずかであることが知られている。本研究は、ハナショウガのセスキテルペンをモデルとし、その生合成遺伝子を単離し、放線菌由来のメバロン酸経路遺伝子群を大腸菌に導入することでハナショウガ由来のセスキテルペンの発酵生産システムを開発することを目的とした。以前の研究によりハナショウガ由来の $\alpha$ -フムレン合成酵素遺伝子が単離されていた。そこで本研究では、セスキテルペンを修飾する酵素である cytochrome P450 遺伝子と short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) 遺伝子をセスキテルペン合成酵素遺伝子と同様の手法を用いて単離した。得られた遺伝子について、cytochrome P450 については P450 還元酵素が導入された酵母、SDR については大腸菌を用いてタンパク質を発現させ、それぞれの基質と反応させ機能解析した。また、得られた P450 についてはメバロン酸経路遺伝子群、

セスキテルペン合成酵素遺伝子、P450 還元酵素遺伝子を大腸菌を用いて発現させ、*in vivo*で P450 により水酸化されたセスキテルペンの合成を行った。また、これらの各遺伝子においてリアルタイム PCR を用いて様々な状態の遺伝子発現解析を行った。さらに、メバロン酸経路遺伝子群を導入した大腸菌において、得られたセスキテルペン合成酵素遺伝子を発現させ、*in vivo*でセスキテルペンを生産させた。まず、 $\alpha$ -フムレンとゼルンボンの構造に類似性が見られることから生合成経路を予測し cytochrome P450 と short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) の単離を行った。その結果、全長の P450 と SDR の cDNA を得ることができ、それぞれ *CYP71BA1*、*ZSD1* と命名した。それらの機能解析の結果、*CYP71BA1* は  $\alpha$ -フムレンから 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンを、*ZSD1* はそれをゼルンボンへ変換する機能を有していることが明らかとなった。また、ハナショウガの各組織において遺伝子発現解析を行った結果、*ZSS1*、*CYP71BA1* は根茎で特異的に発現しているが、*ZSD1* は全ての組織で発現が見られた。季節特異的な発現解析の結果、*ZSD1* の発現は、年間を通じて根茎中のゼルンボン含有量の変化とよく一致しており、この結果は、ゼルンボンが FPP から  $\alpha$ -humulene、8-hydroxy- $\alpha$ -humulene を経て、*ZSD1* により合成されていることを強く示唆した。次に放線菌由来のメバロン酸経路遺伝子群 8 種を挿入したプラスミドを構築し、大腸菌に形質転換し *ZSS1* と共発現させた。その結果、大腸菌内で  $\alpha$ -フムレンが約 1 mg/ml で生産されることが明らかとなった。これは、*ZSS1* のみで発現させた場合の約 10 倍の生産量であった。この生産システムを用いることで、今後様々なテルペノイドが、合成酵素の遺伝子さえあれば大量生産可能となることが考えられる。次に我々は、さらに、*CYP71BA1* においては 4 種のメバロン酸経路遺伝子群と P450 レダクターゼ、および *ZSS1* と大腸菌内で共発現させた。その結果、大腸菌体内で 8-ヒドロキシ- $\alpha$ -フムレンの生成が確認された。このことより、メバロン酸経路遺伝子群を導入した大腸菌を用いたゼルンボンの大量合成が可能であることが示唆された。現在、医薬品スクリーニングのためのシード化合物として天然物が再び注目を集めている。本研究の特色は、難化学合成天然物の生合成経路を明らかとし、それを代謝工学を用いて微生物で発酵生産させる技術である。中でも、最大の化合物群であるイソプレノイド、特にセスキテルペンは抗マラリア薬や香料原料など商業的に有用なものが多く、ハナショウガという亜熱帯産の植物にのみ存在する貴重なセスキテルペンであるゼルンボンに着目した本研究は、非常に独創的であるといえる。

よって本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認められる。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成 23 年 2 月 9 日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。