

薬用植物内生菌のゲノム情報に立脚した 新規有用化合物の探索

申請代表者 松田 侑大 東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 助教
所内共同研究者 森田 洋行 天然物化学分野 教授

【報告セミナー要旨】

【目的】

エンドファイトとは、植物の生体内に共生する微生物の総称であり、生長促進や病原体への耐性付与などにより、宿主植物に利する。薬用植物の網羅的な成分分析のためには、そのエンドファイトの代謝産物にも目を向ける必要がある。タイ産薬用植物 *Croton oblongifolius* の共生菌として知られる糸状菌 *Emericella varicolor* は、多様な二次代謝産物の生産者であり、顕著な免疫抑制活性を有する *variecolin* や細胞毒性活性物質 *ophiobolin* 類を始めとして、多数のセスタテルペノイド類の単離報告がある点で特徴的である。しかしながら、セスタテルペン合成酵素（遺伝子）の報告は、ほとんど例がなく、その立体構造解析も全くなされていない。そこで本研究では、新規有用化合物の取得を目指し、*E. varicolor* のゲノム中に存在する推定セスタテルペン合成酵素遺伝子の網羅的な機能解析ならびに当該酵素のX線結晶構造解析に着手した。

【方法・結果】

これまでに、セスタテルペン合成酵素としては、糸状菌 *Aspergillus clavatus* 由来 *ophiobolin F* 合成酵素（AcOS）の機能解析が報告されている。当研究室が保有する *E. varicolor* のドラフトゲノムシーケンス中に、AcOSホモログを探索したところ、9個の推定セスタテルペン合成遺伝子が見出された。これら遺伝子の異種発現系を糸状菌 *Aspergillus oryzae* を用いて構築し、その代謝物をGC-MSにて分析したところ、4つの遺伝子について導入遺伝子特異的な新規代謝物の生成が確認された。そこでこれらを単離精製し、各種スペクトル分析に供した結果、3種のセスタテルペン（化合物1-3）ならびに1種のジテルペン（化合物4）を得ることに成功した。これらのうち化合物1は既知天然物 *stellatic acid* と同一の炭素骨格を有していたが、他の3つの化合物はいずれも未知の新規骨格を有することが判明した。さらに、化合物1ならびに3は、テルペン合成酵素遺伝子の近傍にコードされる酸化酵素によって、いずれもカルボン酸誘導体へと変換されることが明らかとなった。このように、本研究では異種発現系構築を通じて、既知天然物 *stellatic acid* を含む6つの化合物の取得に成功した。

さらに詳細にこれらテルペン合成酵素の機能を解析すべく、精製酵素の取得を試みた。これまでに、化合物3の合成に関与する酵素を除いては、大腸菌発現系を用いた精製酵素の取得に成功しており、*in vitro* の試験においても活性を有することを確認している。現在は、これら精製酵素の結晶化に着手したところである。

【総括】

本研究では、機能未知遺伝子の異種発現という単純な手法を用いながら、種々の新規化合物の取得に成功した。今後は、テルペン合成酵素のX線結晶構造解析や反応機構解析などを通じて、本酵素群に関する新たな知見の取得を目指すとともに、酵素機能の改変による新規有用化合物の獲得なども試みたい。

■背景・目的

エンドファイトとは、植物の生体内に共生する微生物の総称であり、生長促進や病原体への耐性付与などにより、宿主植物に利することが知られる。和漢薬の活性本体となる化合物は、主としてその基原植物により合成されるが、これら基原植物のエンドファイトもまた種々の生物活性物質を生産することが報告されており、薬用植物の網羅的な成分分析のためには、その共生菌の代謝産物にも目を向ける必要がある。

他方、近年ゲノムシーケンシング技術が急速に発展したことと相俟って、多数の微生物のゲノム情報を簡便に入手することが可能となった。その結果、代謝産物とその生合成遺伝子を容易に結びつけることが可能になっただけでなく、機能未知の遺伝子群を人為的に活性化することによる新規化合物の取得なども盛んに行われるようになった。このように、ゲノム情報に立脚した天然物の探索は、新規有用物質発見のための有効な手段となりつつある。

本研究では、タイ産薬用植物 *Croton oblongifolius* の共生菌として知られる糸状菌 *Emericella varicolor* を取り上げた (*Arch. Pharm. Res.*, 2006, **29**, 140, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 6427)。本菌は、多様な二次代謝産物の生産者であり、殊に、顕著な免疫抑制活性を有する variecolin や細胞毒性活性物質 ophiobolin 類を始めとして、多数のセスタテルペン類の単離報告がある点で特徴的である (図1) (*Chem. Pharm. Bull.*, 2000, **48**, 1436, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 6015)。テルペノイド化合物には、漢薬青蒿の artemisinin や甘草の glycyrrhizin を始め、顕著な生物活性を示すものが多く、糸状菌テルペノイドにも創薬リードとして有望視される化合物が見出されている。一方で、セスタテルペン合成酵素 (遺伝子) の報告は、ほとんど例がなく、その立体構造解析も全くなされていない。そこで本研究では、*E. varicolor* のゲノム中に存在する推定セスタテルペン合成酵素遺伝子の網羅的な機能解析、酵素の X 線結晶構造解析を通じた生合成機構の理解ならびに、構造に基づいた合理的な機能改変などにより、新規有用化合物の取得を目指した。

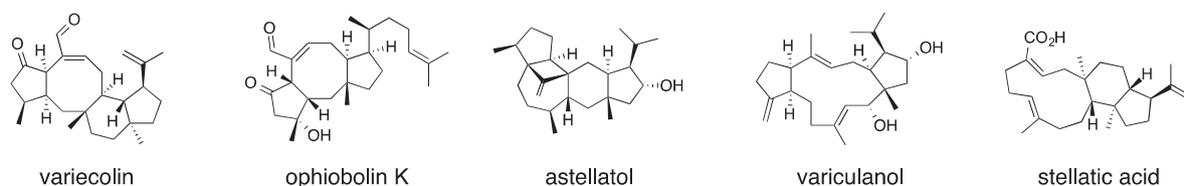


図1 *Emericella varicolor* より単離報告のあるセスタテルペノイド

■結果・考察

これまでに、セスタテルペン合成酵素としては、糸状菌 *Aspergillus clavatus* 由来 ophiobolin F 合成酵素 (AcOS) の機能解析が報告されている (*Org. Lett.*, 2013, **15**, 594)。本酵素はゲラニルファルネシル二リン酸 (GFPP) 合成活性を有するプレニル基転移酵素 (PT) ドメインと、GFPP を閉環し ophiobolin F を与えるテルペン環化酵素 (TC) ドメインを併せ持つ特異なキメラ酵素として知られる。なお、糸状菌由来のジテルペン合成酵素の一部も同様のキメラ酵素として存在することが知られている。当研究室が保有する *E. varicolor* ドラフトゲノムシーケンス中に、Local BALST を用いて AcOS ホモログを探索したところ、9 個の推定セスタテルペン生合成遺伝子が見出された。なお、これらはいずれも AcOS と同様のキメラ酵素と推定された。申請者らはこれまでに糸状菌 *Aspergillus oryzae* を宿主とした異種発現系構築による糸状菌由来二次代謝産物の生合成研究を行っ

てきた。本手法には、外来遺伝子を効率的に多数導入できるとともに、生合成中間体を大量に調製できる利点がある。本系は、本研究にも利用可能であり、異種発現系構築を研究を遂行する上での主たる手段として用いることとした。

まず、9個の推定セスタテルペン生合成遺伝子の異種発現系を糸状菌 *A. oryzae* を用いて構築し、その代謝物を GC-MS にて分析したところ、4つの遺伝子について導入遺伝子特異的な新規代謝物の生成が確認された。これらを各種カラムクロマトグラフィーにより単離精製後、各種スペクトル分析に供した。その結果、3種のセスタテルペン（化合物 1-3）ならびに1種のジテルペン（化合物 4）を得ることに成功した。これらのうち化合物 1 は既知天然物 stellatic acid（5）と同一の炭素骨格を有していたが、他の3つの化合物はいずれも、これまで未知の新規骨格を有することが判明した。

続いて、得られたテルペン炭化水素群がさらに修飾を受け、新たな化合物へと変換されるか否かを検討することとした。糸状菌を始めとする微生物においては一般に、ある天然物の生合成に関わる遺伝子群は染色体の一角所にまとまって存在する（遺伝子クラスターを形成する）ことが知られている。したがって、テルペン合成酵素遺伝子の近傍にコードされる遺伝子群を調べることによって、修飾反応に関わると予想される遺伝子を見出すことが可能である。そこで、4つのテルペン環化酵素遺伝子の近傍を精査したところ、化合物 4 の合成酵素遺伝子の近傍には修飾酵素遺伝子を見出すことはできなかったが、化合物 1 および 3 の合成酵素遺伝子の近傍にはシトクロム P450 モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子がそれぞれ1つずつ、化合物 2 の合成酵素遺伝子の近傍には2つの P450 遺伝子に加えアセチル基転移酵素遺伝子が存在することが判明した。

上記の推定修飾酵素遺伝子の機能を明らかにすべく、テルペン環化酵素遺伝子と推定修飾酵素遺伝子を共発現する系を *A. oryzae* にて構築し、その代謝物を必要に応じて誘導体化したのち、GC-MS にて分析した。その結果、化合物 1 ならびに 3 はいずれも、テルペン合成酵素遺伝子の近傍にコードされる P450 によって、カルボン酸誘導体へと変換されることが明らかとなった。一方で、化合物 2 は新たな化合物へと変換されなかった。

さらに詳細にこれらテルペン合成酵素の機能を解析すべく、精製酵素の取得を試みた。*A. oryzae* にて構築した異種発現系を誘導培養後、RNA を抽出し、逆転写 PCR 法を用いて各テルペン合成酵素遺伝子の cDNA を取得後、大腸菌発現ベクターに導入した。これまでに、化合物 3 の合成に関与する酵素を除いては、大腸菌発現系を用いた精製酵素の取得に成功しており、*in vitro* の試験においても活性を有することを確認している。加えて、PT ドメインと TC ドメインを分割したトランケート体も種々構築を進めており、分割後も活性を有するタンパク質が既に得られている。また、これら精製酵素の結晶化にも着手したところである。

■ 結論

本研究では異種発現系構築を通じて、既知天然物 stellatic acid を含む 6 つの化合物の取得に成功した（図 2）。和漢薬の基原植物や薬用植物の共生菌に新規生物活性物質を求める研究はすでになされてきたが、多くの場合、単離された菌体を純粋培養することで得られる代謝産物を研究対象としており、極微量成分や植物との共生関係下でのみ生産される化合物などは、しばしば見逃されてきたものと推察される。実際、微生物のゲノム上には通常の培養条件下では転写不活性な遺伝子群が多数存在することが知られており、これら休眠遺伝子の活性化による新規化合物の取得例が盛んに報告されている。*C. oblongifolius* 由来 *E. varicolor* についても、成分研究がなされているが、ゲノム中に見出

される二次代謝関連遺伝子群の数と比較すると、あらゆる化合物を網羅しているとは凡そ言い難い。本研究は、生合成遺伝子の異種発現を通じて新規天然物の取得を目指すことで、すでに単離報告のある stellatic acid のみならず、これまで単離されなかった化合物の獲得とその遺伝子情報の取得に成功した。すなわち、遺伝子を選定しそれを異種発現系に組み込むという非常に単純な手法が、新規天然物の獲得に有効であることを示すことができた。また今回は、テルペン化合物にのみ着目したが、本法は他の生合成遺伝子群にも適用可能であり、旧来の手法では活性化困難であった未利用遺伝子群の活用にも応用できる。

今後は、テルペン合成酵素の X 線結晶構造解析や反応機構解析などを通じて、本酵素群に関する新たな知見の取得を目指すとともに、酵素機能の改変による新規有用化合物の獲得なども試みたい。

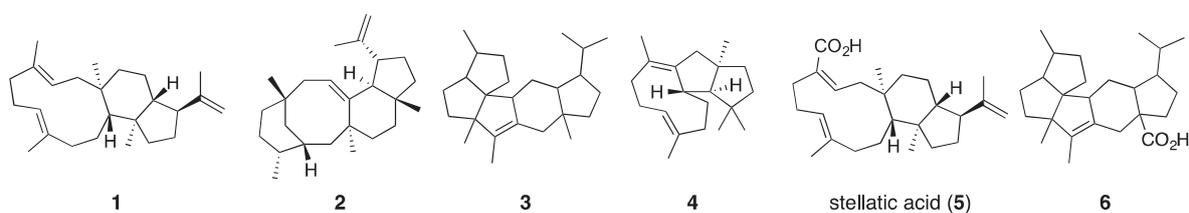


図2 本研究で得られたテルペノイド化合物