いて細胞壁の厚みと IL-12 誘導作用の相関を確認したところ、 $r=0.744$ ($p<0.006$) と高い正の相関が認められた。以上の結果から、細胞壁の厚みと IL-12 誘導作用は密接に関わっていることが示された。乳酸菌の IL-12 誘導作用には細胞壁の 3 次元構造あるいは消化酵素耐性が重要であることが報告されているが⁽⁴⁾、細胞壁の厚みも IL-12 誘導作用に重要であることが示唆された。ただし、細胞壁の厚みをどのように免疫細胞が認識しているかについてはまったく不明であり、この点については今後の検討課題である。

以上、*L. pentosus* S-PT84 株のこれまでのデータを中心に、乳酸菌の培養温度と免疫賦活能の相関について紹介した。S-PT84 株は厚い細胞壁をもっており、これが IL-12 誘導作用に反映されていること、また S-PT84 株に限らず乳酸菌の細胞壁の厚さは培養温度の調節というきわめて簡便な操作によって調節できることを示した。この知見は乳酸菌の機能を高めるのに有用であると考えている。我々現代人は、ストレス、生活習慣の乱れ、運

動不足、環境変化などに伴って免疫機能に異常を来し始めている。また、ボーダレス国際交流が進む中、SARS や新型インフルエンザなど、これまで予想しなかった新興感染症の脅威にも晒されるようになってきている。一方で、乳酸菌の免疫調節作用に関する研究は目覚ましい進歩を遂げている。これまでの食文化や先人たちの知恵を享受し、乳酸菌あるいは乳酸菌を用いた食品を毎日の食生活の中にうまく取り入れることは、ストレスの多い現代社会に住む我々にとって、日々の健康を維持する上で有用な手段になると期待している。

- 1) 上野川修一：“からだと免疫のしくみ”，日本実業出版社，1996。
- 2) 日本乳酸菌学会（編）：“乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス”，京都大学学術出版会，2010。
- 3) Y. Nonaka, T. Izumo, F. Izumi, T. Maekawa, H. Shibata, A. Nakano, A. Kishi, K. Akatani & Y. Kiso: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **145**, 249 (2008)。
- 4) K. Shida, J. Kiyoshima-Shibata, M. Nagaoka, K. Watanabe & M. Nanno: *J. Dairy Sci.*, **89**, 3306(2006)。
(井田正幸，出雲貴幸，サントリーウエルネス(株)健康科学研究所)

新規膜型テルペン環化酵素の発見 糸状菌のメロテルペノイド生合成に関与

天然物の最大の特徴はその分子構造の多様性であり、それぞれが多様な生物活性や物性を有し、医薬品や材料、またケミカルバイオロジーのツールなどとして様々な分野で利用されている。このような天然物の構造多様性は、その生合成過程によって創出され、天然物の生合成研究により多様性の起源を突き止めることができるとともに、ゲノム中に生合成に関わる酵素をコードする遺伝子を探索することによって、これまで生産が確認されていない未知の天然物の発見も可能となる。

天然物は、テルペノイド、ポリケタイド、アルカロイドなどに分類されているが、なかでもテルペノイドの分子構造は多様性に富んでいる。その多様性を生み出しているのがテルペン環化酵素である。本酵素は、鎖状のイソプレノイドを基質とし、カルボカチオンを経由するカチオン- π 環化反応により環状の炭素骨格を単一の反応でつくり上げる驚異的な酵素であり、環化反応の位置選択性や立体化学、転位反応などが厳密に制御されている。

一方、自然界には複数の生合成経路が組合わさって生

合成されるハイブリッド型の天然物が存在する。テルペノイドとポリケタイドのハイブリッドであるメロテルペノイドは、その代表例である。放線菌や糸状菌などから主に見いだされ、多様な生物活性を有するメロテルペノイドの生合成に関しては、これまでに放線菌を中心に研究が進められているが⁽¹⁾、糸状菌では生合成遺伝子は長らく不明であった。筆者らは、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* より単離され、強力なアシル CoA: コレステロールアシル基転移酵素 (ACAT) の阻害作用を有するピリピロペンの生合成に着目した。

ピリピロペンは、ファルネシル基由来のテルペン部分からなる 3 環性骨格に、ピロン環を介してピリジン環が結合した特異な構造を有するメロテルペノイドであり、強力な ACAT 阻害活性を示すことから、高コレステロール治療薬としての開発が期待されている⁽²⁾。その生合成はポリケタイド経路に始まり、ニコチン酸由来の CoA 体に 2 分子のマロニル CoA が縮合することでピロン部分が生成し、これにファルネシル基の付加、末端二重結合のエポキシ化、そしてテルペン部分の環化反応を

図1 ■ ピリピロペンの生合成経路

コバルト色はポリケタイド経路，黒はテルペノイド経路に由来する。

を経て基本炭素骨格が構築される⁽³⁾ (図1)。そこで、本生合成にはポリケタイド合成酵素 (PKS)、プレニル基転移酵素 (PT)、テルペン環化酵素が鍵酵素として働くことが予想されたため、これら酵素遺伝子を含む遺伝子クラスターを *A. fumigatus* Af293 株ゲノムデータベースより検索した。一般に、糸状菌や放線菌においては、一つの天然物の生合成に関与する複数の酵素遺伝子がゲノム上で近傍に位置し、遺伝子クラスターを形成しているため、関連する一連の生合成遺伝子が容易に同定できる利点がある。事実、*A. fumigatus* Af293 株ゲノムにも、PKS と PT、さらにシトクロム P450 やフラビン要求性の酸化酵素 (FMO)、それにアセチル基転移酵素遺伝子を含む 9 遺伝子から成る約 22 kb の遺伝子クラスターが見いだされた⁽⁴⁾。この中には CoA リガーゼ (CL) 遺伝子も存在し、ピリピロペンに特徴的なニコチニル CoA の生成に関与しているのではないかと推測されたが、テルペンの環化酵素と思われる遺伝子は存在していなかった。

次に、これらの遺伝子の機能解析を順次、予想生合成経路に沿って行なった。酵素タンパク質の発現には、*A. oryzae* M-2-3 株を宿主とした異種糸状菌発現系を用いた。各遺伝子をアミラーゼプロモーター下に配置し、デンプンを含む培地で誘導培養することで、酵素反応生成

物が菌体もしくは培養液中に蓄積する。まず、最上流の CL と PKS の両遺伝子を *A. oryzae* M-2-3 株に組み込み、ニコチン酸存在下で共発現させたところ、予想産物であるピロン体 1 の生成が確認された。ニコチニル CoA を開始基質とする PKS としては初めての報告例である。次に、これら CL、PKS とともに PT 遺伝子を共発現させたところ、ピロン体にファルネシル基が付加した 2 が生成した。さらに、ファルネシル基のエポキシ化に関与すると思われる FMO 遺伝子を共発現させたが、目的のエポキシ体 3 は確認できず、エポキシドが加水分解されたジオール体が生成していた。これは、テルペン環化酵素が存在しない状態ではエポキシドが速やかに加水分解されるものと考えられた。そこで、クラスター中のいずれかの遺伝子が新規なテルペン環化酵素であると予想し、唯一機能の推定が困難な、integral membrane protein とアノテーションされている遺伝子 (*pyr4*) に注目した。

pyr4 はアミノ酸 242 残基をコードし、7 回膜貫通型タンパク質と予想され、既存の植物や微生物由来テルペン環化酵素とは配列相同性をまったくもたず、またテルペン環化酵素に特徴的なアスパラギン酸に富むモチーフも有していない。しかし、糸状菌の特徴的な代謝産物であ

図2 ■ 安息香酸からのピリピロペン誘導体の生産

るインドールジテルペン（パキシリンなど）や、筆者らが見いだした他のメロテルペノイドの生合成遺伝子クラスター内にも同様の遺伝子が存在しており、これらが新規なテルペン環化酵素なのではないかと予想した。そこで、*pyr4* 遺伝子を上述の他の遺伝子とともに共発現させたところ、環化産物である4の生成が確認され、その旋光度は天然物由来のものと一致した。化合物4は、ピリピロペン類に共通の基本炭素骨格を有しており、その生合成を異種糸状菌において再構築することに成功した。こうして、メロテルペノイドにおいてテルペノイド部分の環化を触媒する新規テルペン環化酵素が明らかとなった⁽⁴⁾。

さらに、これらピリピロペン生合成酵素を用いて類縁体が生産できないかを検討した。出発物質としてニコチン酸の代わりに安息香酸を投与したところ、CLとPKSの共発現系において対応するピロン体5が、さらにPT、FMO、Pyr4の共発現系に反応させたところ、ピリピロペンのピリジン環がベンゼン環に置換した類縁体6が得られた⁽⁴⁾（図2）。本化合物は、*Penicillium* sp. より単離され、選択的アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を有するアリスガシンの基本炭素骨格である⁽⁵⁾。

今回見いだされた新規テルペン環化酵素 Pyr4 は、膜貫通型タンパク質と予想されることから、既存のテルペ

ン環化酵素とはまったく独立に、むしろトランスポーター様タンパク質から進化したことが予想される。Pyr4の相同タンパク質が、他の糸状菌メロテルペノイドやインドールジテルペン生合成遺伝子クラスター中にも見いだされることから、これらの生合成においても同様にテルペン部分の環化に関わっていることが強く示唆される。本酵素タンパク質の構造はまったく明らかではないが、はたしてテルペンの環化と同時に生成物の膜輸送を担っていないかどうかなど、今後の詳細な構造機能解析が待たれる。また、今回明らかになった糸状菌メロテルペノイド生合成酵素群を活用することで、新たな生物活性を有する新規メロテルペノイドの創製が期待される。

- 1) T. Kuzuyama, J. P. Noel & S. B. Richard : *Nature*, **435**, 983 (2005).
- 2) S. Ōmura, H. Tomoda, Y. K. Kim & H. Nishida : *J. Antibiot.*, **46**, 1168 (1993).
- 3) H. Tomoda, N. Tabata, Y. Nakata, H. Nishida, T. Kaneko, R. Obata, T. Sunazuka & S. Ōmura : *J. Org. Chem.*, **61**, 882 (1996).
- 4) T. Itoh, K. Tokunaga, Y. Matsuda, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka & T. Kushiro : *Nat. Chem.*, **2**, 858 (2010).
- 5) F. Kuno, K. Otoguro, K. Shiomi, Y. Iwai & S. Ōmura : *J. Antibiot.*, **49**, 742 (1996).

（伊藤崇敬^{*1}、久城哲夫^{*2}、^{*1}味の素株式会社、^{*2} 明治大学農学部）

チョコレート・ココアは発酵食品 カカオ豆の発酵を制御しておいしいチョコレートの生産が可能に

「お菓子の王様」であるチョコレートは、ココアバター結晶の独特な融解挙動のために、室温では硬くても口に入れると速やかに融けて、甘さと苦さとまろやかな香り

が広がるおいしさで人々を魅了している。またココアは、栄養満点の飲み物である。いずれも、アオギリ科の植物であるカカオの木から収穫されるカカオ豆が主要な