環化酵素を鍵としたジテルペンの酵素的全合成

Enzymatic synthesis of diterpene using terpene cyclase as a key reaction

北海道大学大学院農学研究科
及川 英秋 Hideaki OIKAWA

Key words: diterpene; diterpene synthase; aphidicolin; biosynthesis; DNA polymerase inhibitor

はじめに

最近の有用二次代謝産物生合成遺伝子の解析の勢いはすさまじく、80年代半ばに最初のポリケタイド合成酵素(PKS)をコードする遺伝子がクローニングされてから微生物二次代謝産物の生合成遺伝子が染色体上にクラスターとして存在することが次々と明らかとなってきた¹⁾。これは目的の生合成遺伝子が1個同定できれば、その周辺の遺伝子を解析することにより数多く存在する必要生合成遺伝子を一挙に入手できることを意味する。ほぼ同時期にポリペプチド、テルペン、アルカロイドなどの重要な生合成遺伝子も微生物のみならず、植物から見つかってきた²⁾。最近では植物ホルモン、ジベレリンの複雑な構造はたった7~8個の酵素により作られることも判明した³⁾。

上述の遺伝子解析からわかったこととして以下のことが挙げられる。これら生合成酵素は1)比較的基質特異性が低い;2)多段階の反応を触媒するものがある;3)他の類似化合物の生合成遺伝子と入れ換えるとキメラ構造の類縁体が合成できるなど、有機化学者の当初の予想と異なる事実が明らかになってきた。

放線菌ポリケタイドにおける生合成遺伝子解析は遺伝子改変により、新規化合物が創製できるレベルまで達しつつある。これに対してもう一つの有用生理活性物質供給源であるテルペン類に関してはその生合成遺伝子解析がそれほど進んでいない。その原因の一つにPKSに匹敵する相同性の高い遺伝子が見つかっていないことが挙げられる。そこで糸状菌でも二次代謝産物生合成遺伝子がクラスター構造をとっていることが確立しつつあることを踏まえ、最近筆者らは糸状菌由来ジテルペンの生合成遺伝子を確実に同定する方法に関して検討している。これが実現すれば放線菌ポリケタイドと同様、より培養に適した異種株発現による大量生産、ランダム変異による新規化合物の創出など応用展開に道を拓くことになる。以下に筆者らが最近行ったジテルペンの酵素的全合成に関する研究について紹介する。

1. 環化酵素遺伝子のクローニング

筆者らは研究対象を選ぶのに際し、1)生合成経路が確立している;2)関与する生合成酵素が少ない;3)化学的全合成と対比可能な化合物 という点を考慮した。具体的にはアフィディコリン(1)を取り上げたが、本物質は真核細胞DNAポリメラーゼ α の特異的阻害剤として知られ、細胞生理学の分野において細胞周期同調剤として有用で市販されている。これ以外にも興味ある生物活性を示し、特異な骨格を有する点などから数多くの有機合成化学者が全合成を手がけており⁴⁾、上記の要件を満たしている。残念ながら工程数が多く合成的な供給が難しいのに対し、その生合成は図1に示すように単純である。すなわちすべてのジテルペンの出発原料であるゲラニルゲラニル二リン酸(GGDP)から、環化、3段階の水酸化を経て最終産物を与えることが筆者らおよびHansonらにより明らかにされている^{5),6)}。1の生合成的に近縁なジテルペンとして抗腫瘍性物質scopadulcic acid A、イネのファイトアレキシンoryzalexinなどが知られ、環構築に関してこれら骨格の合成にも知見が得られることが期待された(図2)。

微生物由来の環化酵素遺伝子は相同性が低く、PCRクローニングは困難とされてきたが、最近同法を用いてジベレリン生産糸状菌から*ent*-kaurene合成酵素遺伝子のクローニングに成功していた。これを参考にクローニングを試みた。植物の環化酵素遺伝子を基に設計されたプライマーを用いて1の生産菌*Phoma betae*由来のmRNAをテンプレートにRT-PCRおよびRACEを行い、既知の環化酵素遺伝子と比較的高い相同性(37%)を示すcDNAを得た⁷⁾。

2. 環化酵素の機能解析

同定された環化酵素遺伝子を発現ベクターに組み込み大腸菌で大量発現させた。精製タンパク質を用い、GGDPを基質として酵素反応を行ったところ、生成物2を与えたことから、本遺伝子産物をアフィディコラン-16 β -オール合成酵素(ACS)と同定した⁷⁾。また本反応は*ent*-kaurene合成酵素と同様に2段階反応と推定されたため、予想される

図1 アフィディコリン(1)の生合成経路

図2 アフィディコリンの生合成上近縁な化合物

中間体 *syn*-コパリルニリン酸 (3) の新規合成経路を開発した⁸⁾。合成基質を用いて酵素反応を行い、本反応は図1に示したように chair-boat の遷移状態を経由していったん3を経た後、さらに2へ環化が進むことを証明した⁷⁾。

3. 生合成遺伝子クラスターの解析

得られた環化酵素遺伝子の配列を基に染色体歩行を行ったところ、環化酵素遺伝子の upstream に GGDP 合成酵素 (GGS), 下流に2種の水酸化酵素 (P450-1, P450-2) および耐性遺伝子 (TP) が同定され、1の生合成酵素遺伝子がクラスター構造をとっていることが確認された⁹⁾ (図3)。アフィディコリンは真核細胞である生産菌にも毒性を示すはずであり、今回耐性遺伝子が見つかったことで他の糸状菌で発現する際の問題点も解決可能となった。以上の解析により1の酵素的全合成の基盤が確立できた。

今回利用した環化酵素の相同性はさほど高くなく、骨格が大きく異なるジテルペンの生合成遺伝子解析には適用できないことが予想される。ジテルペン生合成遺伝子クラスターは1のほか2種の化合物に関して知られ、これらすべてに相同性が高い GGS 遺伝子が含まれていた。このことから糸状菌ジテルペン生合成遺伝子クラスターを同定する

図3 アフィディコリンの生合成遺伝子クラスター
acs, アフィディコリン-16β-オール合成酵素遺伝子;
ggs, GGDP 合成酵素遺伝子; P450-1, P450-2, 水酸化酵素遺伝子; tp, 耐性遺伝子。

には GGS 遺伝子の PCR クローニングが有効と考えている。

4. アフィディコリン生産菌が生産するジテルペン炭化水素の構造

アフィディコリン1の生産菌 *P. betae* の菌体中には GC-MS 分析により10種以上のジテルペン炭化水素が検出された¹⁰⁾。環化酵素は鎖状の GGDP から一挙に複雑な骨格を構築するため、その触媒機構を探ることは新規骨格を合成するうえで重要な要素となるはずである。こうした重要性に鑑み、上記ジテルペンの構造を決定することにした。大量培養を行い、これら炭化水素を単離したところ、その含有量は1の0.1%以下と極めて低いことがわかった。

図 4 アフィディコリン生産菌から単離された化合物

た。予想される構造の化合物をすべて合成し、キラル GC などを利用して、これら炭化水素の構造を図 4 に示すように決定した^{10), 11)}。すべての炭化水素において、5 位および 10 位の絶対配置は **1** と同一であった。化合物 **5** は新規炭素骨格であり、betaerane と命名した。

環化酵素は複数あると予想し、ACS の場合と同様相同性に基づく PCR クローニングを用いて、環化酵素遺伝子の取得を試みたが、不成功に終わった。これは単離された炭化水素の A/B 環に関する絶対配置が同一であることと合わせ、一つの環化酵素 ACS が微量のジテルペンを副生しているとすれば説明がつくことになる。ACS は微量炭化水素をどのようにして生成するのだろうか。これは **1** のみならず図 2 に示した類縁体の生合成とも密接に関連している。ここでは詳しく紹介しないが、ACS の反応機構について基質アナログを用いた化学変換、異性化実験および分子軌道計算を用いた考察を行い、上記仮説が正しいことを突き止めた¹¹⁾。ACS がさまざまな 3 環性および 4 環性化合物を副生することを考慮すると、遺伝子の改変によりこれらを主生成物として与える酵素が調製可能であることを示唆している。

ま と め

二次代謝産物の構造が複雑になればなるほど有機合成による量的供給は困難であり、その解決策として酵素的全合成はたいへん魅力的である。各工程での精製を必要とせず、有機溶媒や副生成物を極力抑えることができ、高温高圧を必要としないことから、環境への負荷あるいはエネルギー消費の面からも優れた方法である。本方法論で重要となる生合成酵素の機能解析は、基質および生成物の取り扱い

に習熟している天然物有機化学者の参加がなければ十分に行えないのは自明である。現在では生合成遺伝子群が同定されたものの興味ある反応を触媒する酵素が特定できない、あるいは反応機構が不明である例が多い。今後この領域に多くの研究者の参加されることを期待する次第である。

- 1) J. B. Rawlings: *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 231-281 (2001).
- 2) P. M. Dewick: "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach," 2nd Ed., Wiley, Chichester, 2002.
- 3) C. A. Helliwell, P. M. Chandler, A. Poole, E. S. Dennis, and W. J. Peacock: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 2065-2070 (2001).
- 4) M. Toyota and M. Ihara: *Tetrahedron*, **55**, 5641-5679 (1999).
- 5) H. Oikawa, A. Ichihara, and S. Sakamura: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 299-300 (1989); H. Oikawa, S. Ohashi, A. Ichihara and S. Sakamura: *Tetrahedron*, **55**, 7541-7554 (1999).
- 6) M. J. Ackland, J. F. Gordon, J. R. Hanson, B. L. Yeoh, and A. H. Ratcliffe: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 1492-1493.
- 7) H. Oikawa, T. Toyomasu, H. Toshima, S. Ohashi, H. Kawaide, H. Kamiya, M. Ohtsuka, S. Shinoda, W. Mitsuhashi, and T. Sassa: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 5154-5155 (2001).
- 8) H. Toshima, H. Oikawa, H. Yada, H. Ono, T. Toyomasu, and T. Sassa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2504-2510 (2002).
- 9) 特許出願: 及川英秋, 佐々武史, 豊増知伸, "アフィディコリン生合成遺伝子クラスター", 特願 2001-188465, 平成 14 年 5 月 5 日.
- 10) H. Oikawa, H. Toshima, S. Ohashi, W. A. König, H. Kenmoku, and T. Sassa: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 2329-2332 (2001).
- 11) H. Toshima, H. Oikawa, T. Toyomasu, and T. Sassa: *Tetrahedron*, **56**, 8443-8450 (2000).
- 12) H. Oikawa, K. Nakamura, H. Toshima, T. Toyomasu, and T. Sassa: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9145-9153 (2002).