

植物由来テルペン生合成酵素遺伝子の効率的機能解析法の開発 —セスキテルペンを中心に—

原田 尚志

神戸天然物化学株式会社 バイオ創薬事業部 技術開発部
〒651-2241 神戸市西区室谷 1-1-1 KNC バイオリサーチセンター

Development of efficient functional analysis of plant terpene biosynthetic genes:
mainly of sesquiterpene biosynthetic genes

Key words: cytochrome P450; pathway engineering; sesquiterpene biosynthesis.

Hisashi Harada

Technology Development Dept., Biotechnology & Drug Discovery Div.,
KNC Laboratories Co., Ltd.

KNC Bioresearch Center, 1-1-1 Murodani, Nishi-ku, Kobe, 651-2241, Japan

1. はじめに

テルペン（テルペノイド・イソプレノイド）やフラボノイド、アルカロイド等のいわゆる二次代謝産物は、植物が生産する有機化合物の中でも特に多様性に富む化合物である。とりわけテルペン化合物は、これまでに植物を含め、動物、微生物などから約 40,000 種類が単離されており（Roberts 2007）、自然界で最も複雑な化合物集団を形成している。テルペン化合物には生理活性物質や機能性物質など、市場価値の高い化合物が数多く含まれることから、様々な分野で活用されている。例えば、クスノキから得られるモノテルペンのショウノウ（樟脳, camphor）は、古くから防虫剤、防腐剤、医薬品などとして用いられ、特に合成樹脂セルロイドの可塑剤として 20 世紀半ばまで世界の産業を支える重要な化合物であった。また、ヨモギの一種クソニンジン（*Artemisia annua*）に含まれるセスキテルペンラクトンであるアルテミシニン（artemisinin）とその誘導体は、ハマダラカが媒介する原虫性疾患である熱帯マラリアに対し、現在最も有効な治療薬の一つである（White 2008）。タキソール（taxol）は太平洋イチイ（*Taxus brevifolia*）樹皮に含まれるジテルペン化合物であり、制がん剤として卵巣がんや乳がんの治療に利用されている（Jennewein & Croteau 2001）。また、カニ、エビ、赤身魚などの海洋生物に多く含まれる赤色カロテノイドのアスタキサンチン（astaxanthin）は、優れた抗酸化特性を持つことから健康食品や化粧品、鶏卵や養殖魚の色揚げ剤などとして近年用いられている（Misawa 2009）。これら以外にも多くのテルペン化合物とその類縁体が、医薬品原料、健康食品、工業原料、香料、着色料、食品添加物、農薬などとして流通しており、産業界において非常に有用な化合物群であると言える。本稿ではテルペン最大の化合物群であるセスキテルペンに焦点を当て、大腸菌を利用したセスキテルペン化合物の生産システム、およびそれを利用した生合成関連酵素遺伝子の機能解析法の開発研究に関する話題を中心に、最近の知見を交えながら紹介する。

2. テルペン化合物の生合成経路

天然から単離されるテルペン化合物は、複雑な構造を持つものが数多く存在するが、その生合成初期経路は驚くほどシンプルで規則的である。テルペン化合物の生合成は生物種を問わず、イソプレン骨格であるイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) とその異性体であるジメチルアリル 2 リン酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) を原料として、IPP の連続縮合によりゲラニル 2 リン酸 (GPP), ファルネシル 2 リン酸 (FPP), ゲラニルゲラニル 2 リン酸 (GGPP) 等の直鎖状イソプレノイドを生成することから始まる (Ajikumar et al. 2008)。この IPP の生合成経路には、メバロン酸を中間体とするメバロン酸経路と、メバロン酸が関与しない別の生合成ルートである非メバロン酸経路 (MEP 経路) が存在する (Harada & Misawa 2009)。メバロン酸経路は、植物、動物、酵母など真核生物の細胞質、一部の放線菌やアーキアに存在しており、MEP 経路は植物の色素体や細菌に存在している (Kuzuyama & Seto 2003)。この経路によって合成された GPP, FPP, GGPP 等を基質とし、テルペン合成 (環化) 酵素によってモノテルペン (C₁₀), セスキテルペン (C₁₅), ジテルペン (C₂₀), トリテルペン (C₃₀), カロテノイド (C₄₀, テトラテルペン) 等の様々なテルペン化合物が合成される。植物においては、モノテルペン, ジテルペン, カロテノイドが色素体で、セスキテルペンとトリテルペンが細胞質で合成される (図 1)。さらに、合成されたテルペン化合物は多くの場合、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (cytochromes P450 monooxygenase, P450) を始めとするテルペン変換酵素による修飾反応等を経ることにより、多種多様な構造と機能を持つテルペン化合物が合成されることが知られている。近年のゲノムプロジェクトの成果によると、高等植物の P450 遺伝子数は他の生物種と比べて桁違いに多く、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では 273 個、イネ (*Oryza sativa*) では 458 個もの P450 遺伝子の存在が確認されており (大村ら 2003)、多くの遺伝子が二次代謝産物の合成に関与することが報告されている。したがって植物由来テルペン化合物の種類や構造多様性は、テルペン合成 (環化) 酵素だけではなく、テルペン修飾酵素の種類と数にも依存していると考えられる。

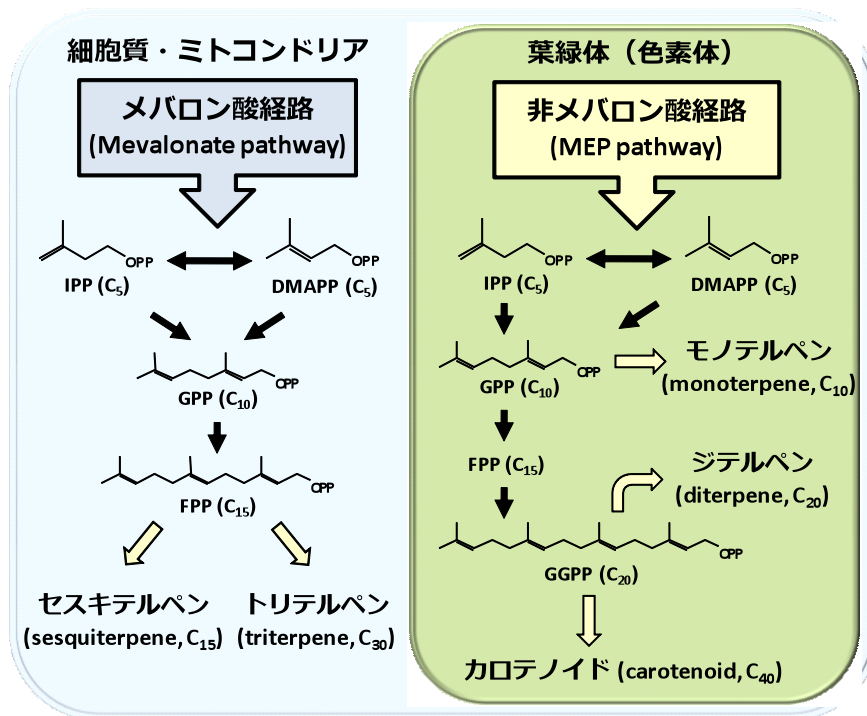


図 1 植物におけるテルペン生合成経路

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (cytochromes P450 monooxygenase, P450) を始めとするテルペン変換酵素による修飾反応等を経ることにより、多種多様な構造と機能を持つテルペン化合物が合成されることが知られている。近年のゲノムプロジェクトの成果によると、高等植物の P450 遺伝子数は他の生物種と比べて桁違いに多く、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では 273 個、イネ (*Oryza*

sativa) では 458 個もの P450 遺伝子の存在が確認されており (大村ら 2003)、多くの遺伝子が二次代謝産物の合成に関与することが報告されている。したがって植物由来テルペン化合物の種類や構造多様性は、テルペン合成 (環化) 酵素だけではなく、テルペン修飾酵素の種類と数にも依存していると考えられる。

3. 大腸菌を用いたテルペン化合物の効率的生産システムの開発

天然より抽出、精製して得られるテルペン化合物の量は一部の例外を除き少なく、有用なテルペン化合物を著量得ることは困難な場合が多い。化学合成は重要なテルペン化合物生産方法の一つであり、合成が比較的容易なモノテルペンやカロテノイドを中心に実用されている (Kusama et al. 2000, Jackson et al. 2008)。しかしながら化学合成法は、構造が複雑なテルペン化合物の生産には、労力やコスト面から非効率である。そのため、植物や微生物を利用した、バイオテクノロジーによるテルペン化合物の生産研究が近年盛んに行われてきた。

パスウェイエンジニアリング (pathway engineering) は、遺伝子組換えにより宿主生物の合成経路を代謝工学的に改変して目的化合物を生産する技術であり、代謝工学や合成生物学分野で注目を集めている技術の一つである (Misawa 2011)。テルペン化合物生産においては、植物、大腸菌、酵母などを中心に研究が進んでおり、特に遺伝子資源や情報が充実している大腸菌は、パスウェイエンジニアリング研究に頻繁に用いられている。大腸菌は他のバクテリアと同様、MEP 経路により IPP と DMAPP を合成しており、さらにそれに続く酵素により FPP まで合成できるが、その産生量はごく僅かである。そこで、菌体内の FPP 量増産を目的に様々な研究が行われてきた。IPP イソメラーゼ (IPP isomerase) は、IPP と DMAPP の異性化反応を両方向に触媒する酵素であるが、酵母由来 (1 型) の IPP イソメラーゼ遺伝子 (*Scidi*) を大腸菌に高発現させると、FPP の生産量が上昇することが報告されている (Kajiwara et al. 1997)。MEP 経路内の 1-デオキシ-D-キシルロース 5-リン酸 (1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP) 合成酵素遺伝子 (*dxs*)、または DXP レダクトイソメラーゼ (DXP reductoisomerase) 酵素遺伝子 (*dsr*) を高発現させた場合でも、やはり FPP の増産に効果のあることが示されている (Albrecht et al. 1999)。しかしながら、これらの遺伝子を用いた場合でも、生産量はせいぜい数倍程度増加する程度であった。

これに対し、MEP 経路のみを持つ大腸菌に異種メバロン酸資化酵素遺伝子群を導入・発現させる方法での FPP 増産も試みられている。例えば Martin ら (2003) は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来のメバロン酸資化遺伝子群と、アルテミシニンの前駆体であるセスキテルペンのアモルファジエン (amorpha diene) 合成酵素遺伝子 (*ADS*) を共発現する大腸菌を用い、D-メバロン酸ラクトン (D-mevalonolactone, MVL) 存在下で培養すると、*ADS* のみを発現するコントロール株と比較して最大 36 倍ものアモルファジエン増産効果があることを報告している。一方筆者ら (2009) は、MVL よりも構造が単純でさらに安価である、アセト酢酸リチウム塩 (Li acetoacetate, LAA) を基質として利用できる生産系を開発した。本系では、放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株由来のメバロン酸資化酵素遺伝子群 (2 型 *idi* を含む) に加え、*S. cerevisiae* 由来の 1 型 *idi* と、アセト酢酸からアセトアセチル-CoA (acetoacetyl-CoA) を合成する酵素であるラット (*Rattus norvegicus*) 由来アセト酢酸-CoA リガーゼ (acetoacetate-CoA ligase) 遺伝子 (*Aacl*) を高発現するプラスミド (pAC-Mev/*Scidi*/*Aacl*) を構築した (図 2)。これらのプラスミドとリコペン (lycopene) 産生用プラスミド (pCRT-EIB) とを共導入した大腸菌を LAA 存在下で培養すると、pCRT-EIB のみのコントロール株と比較して約 12 倍 (菌体乾重量 1 g 当たり 12.5 mg 相当) のリコペンを生産できた。さらに、pAC-Mev/*Scidi*/*Aacl* とハナショウガ (*Zingiber zerumbet*) より取得した α -フムレン (α -humulene)

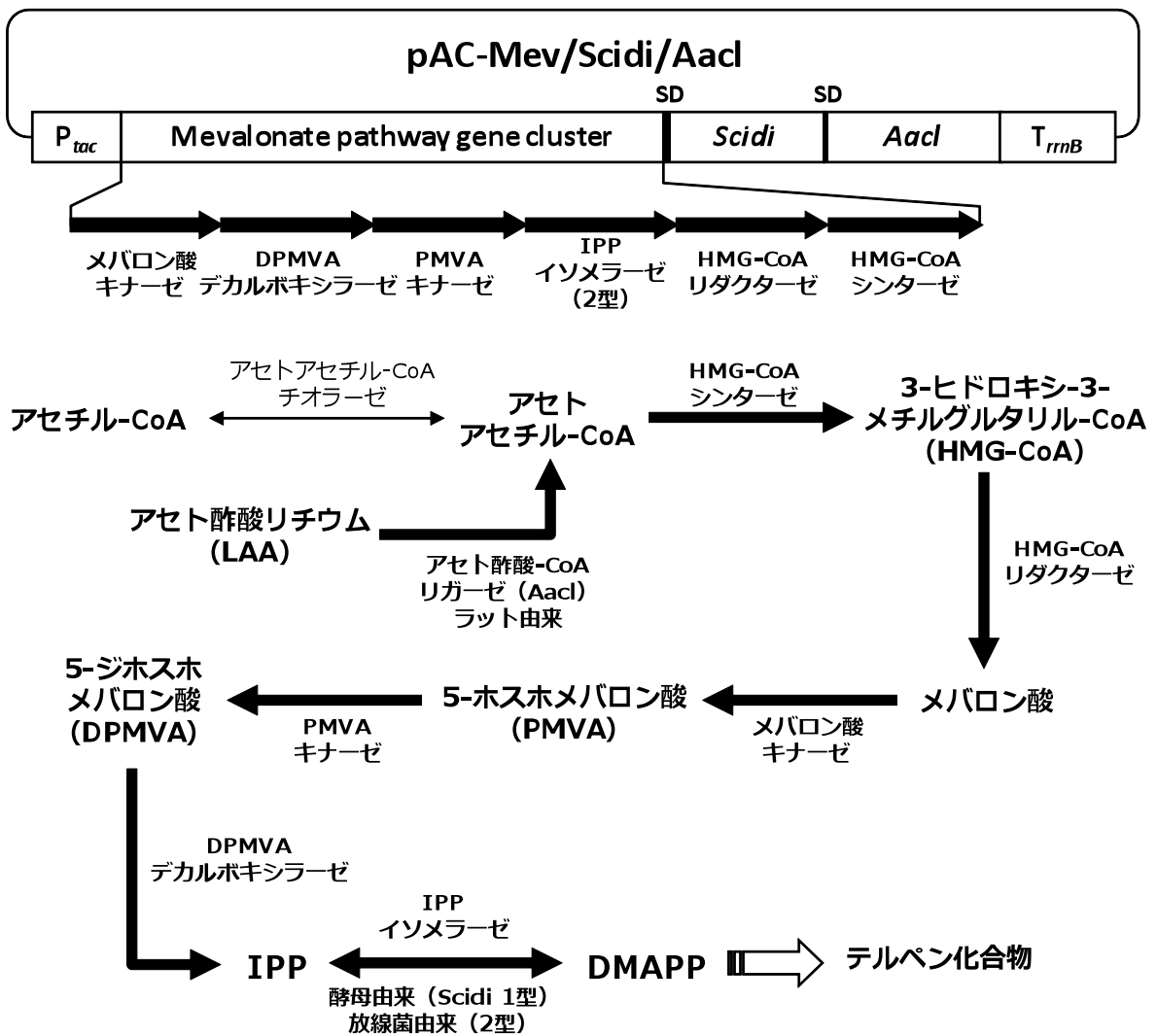


図2 プラスミド pAC-Mev/Scidi/Aacl の構造と各酵素が触媒する代謝経路マップ。太矢印は pAC-Mev/Scidi/Aacl に含まれる酵素遺伝子を示す。

合成酵素遺伝子 (ZSSI) 発現プラスミドとを共導入した場合でも同様に、MVL または LAA を基質として ZSSI のみのコントロール株の約 11 倍 (培養液 1 L 当たり 1 g 相当) の増産効果を示した。このように、外来のメバロン酸資化酵素遺伝子群を利用する方法は、大腸菌を利用したテルペン化合物生産のためのパスウェイエンジニアリング研究において、現在のところ最も強力な効果的なツールである。

4. セスキテルペン生合成酵素の機能解析

メバロン酸資化酵素遺伝子群を発現する大腸菌を用いた生産システムは、新規に取得した植物由来セスキテルペン合成 (環化) 酵素遺伝子の機能解析にも非常に有用であると思われた。そこで筆者らは、ショウガ科植物を中心に既知配列を元に degenerate PCR にて取得した複数のセスキテルペン合成 (環化) 酵素の候補遺伝子について、上述のシステムにて機能解析を行った (図3)。その結果、ハナショウガから得られた 5 個の候補遺伝子のうち、前述した ZSSI に加えて β -オイデスマール (β -eudesmol) 合成酵素遺伝子 (ZSS2) を機能同定に貢献

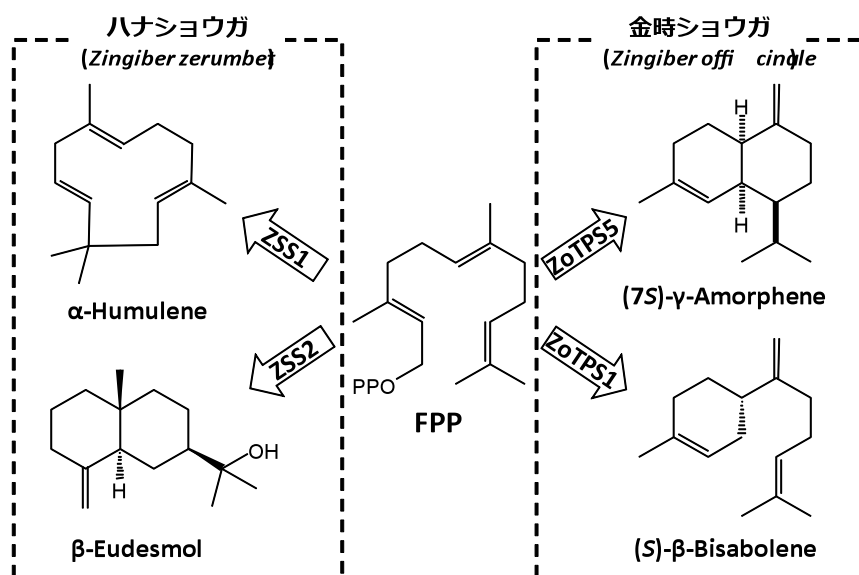


図 3 ショウガ科植物より単離・機能同定したセスキテルペン合成（環化）酵素遺伝子。矢印中に酵素名を示した。

(γ -amorphene) 合成酵素遺伝子 (ZoTPS5) の機能同定に成功した (Fujisawa et al. 2010)。さらにこの系を用い、キリンホールディングス (株) の杉村らは京都大学の矢崎らと共同で、アサ科植物でビールの原料にも用いられているホップ (*Humulus lupulus*) より、モノテルペンのリナロール (linalool) とセスキテルペンのネロリドール (nerolidol) を同時に合成する酵素遺伝子 (*HILIS/NES*) の機能同定に成功している (杉村ら 2010)。

セスキテルペン化合物の構造多様性は、合成酵素の種類以外にもそれに続く酵素、すなわちセスキテルペンの修飾反応を担う修飾酵素の多様性に起因するところが大きい。植物がつくる様々な二次代謝産物と同様に、セスキテルペンの生合成にも P450 を介した修飾反応が重要な役割を果たしている。例えば、アルテミシニンの生合成において、ADS によってアモルファジエンが合成された後、P450 である CYP71AV1 を介した 3 段階の水酸化反応を経て、中間体のアルテミシニン酸 (artemisinic acid) へと変換されることが知られている (Arsenault et al. 2008)。また、綿花 (*Gossypium arboreum*) に含まれるファイトアレキシンであるゴシポール (gossypol) の生合成においては、 δ -カジネン (δ -cadinene) が δ -カジネン合成酵素 (CAS) によって合成された後、P450 である CYP706B1 によって 8-ヒドロキシ- δ -カジネン (8-hydroxy- δ -cadinene) へと代謝される (Luo et al. 2001)。P450 の生化学的な機能解析は、目的 P450 を大腸菌、酵母、昆虫細胞などで発現、精製した酵素を用いての *in vitro* による解析手法が一般的に用いられているが、比較的不安定な膜結合型酵素であることから、取り扱いが難しい場合が多い。そこで近年では、セスキテルペン合成から P450 による変換までの一連の反応を *in vivo* での方法、すなわち大腸菌や酵母によるバイオコンバージョン (bioconversion) を利用した方法についての報告も増えている。例えば、アルテミシニン酸までの生合成経路に必要な ADS, CYP71AV1, NADPH-P450 オキシドリダクターゼ (NADPH-P450 oxidoreductase) を導入、発現させた大腸菌や酵母を用いて、培養液 1 L 当たり 100~300 mg 以上のアルテミシニン酸合成例が報告されている (Arsenault et al. 2008)。ま

した (Yu et al. 2008a & 2008b)。また、同じショウガ科植物である金時ショウガ (*Zingiber officinale*) から取得した 15 個の候補遺伝子のうち、既知遺伝子であるゲルマクレン D (germacrene D) 合成酵素遺伝子 (ZoGDS) の他に、新規遺伝子である β -ビスアボレン (β -bisabolene) 合成酵素遺伝子 (ZoTPS1) と、 γ -アモルフェン

た 8-ヒドロキシ- δ -カジネンの場合においても同様に、CAS, CYP706B1, NADPH-P450 オキシドリダクターゼを導入した大腸菌にて、培養液 1 L 当たり 100 mg 程度の 8-ヒドロキシ- δ -カジネンが得られている (Chang et al. 2007)。

最近筆者ら (2011) は、前述したセスキテルペン合成酵素遺伝子の機能解析系を改変することにより、効率的に P450 の機能解析が可能なシステムを開発した。このシステムでは、メバロン酸資化酵素遺伝子群の下流に P450 還元系酵素遺伝子を連結した発現プラスミドを作製し、これをセスキテルペン合成遺伝子および P450 遺伝子の発現プラスミドと共導入することにより、セスキテルペン合成から P450 による修飾反応までを同時に行わせることが出来る。P450 還元系酵素遺伝子として、比較的汎用性が高いシロイヌナズナ由来の NADPH-P450 オキシドリダクターゼ 2 遺伝子 (*ATR2*)、シアノバクテリア *Nostoc* sp. PCC7120 由来のフェレドキシン (ferredoxin) とフェレドキシン還元酵素 (ferredoxin reductase) 遺伝子 (*NsFER* と *NsRED*)、金時ショウガ由来の NADPH-P450 reductase 遺伝子 (*ZoRED1* または *ZoRED2*) を連結したプラスミドを作製しているが、それ以外にも各種の P450 還元酵素遺伝子が連結可能である。これまでに本システムを利用して、ハナショウガに豊富に含まれるセスキテルペンであるゼルンボン (zerumbone) の生合成中間体であり、 α -フムレンの水酸化によって生成する 8-ヒドロキシ α -フムレン (8-hydroxy α -humulene) への反応を触媒する、 α -フムレン-8-ヒドロキシラーゼ (α -humulene-8-hydroxylase) 酵素遺伝子 (*CYP71BA1*) を機能

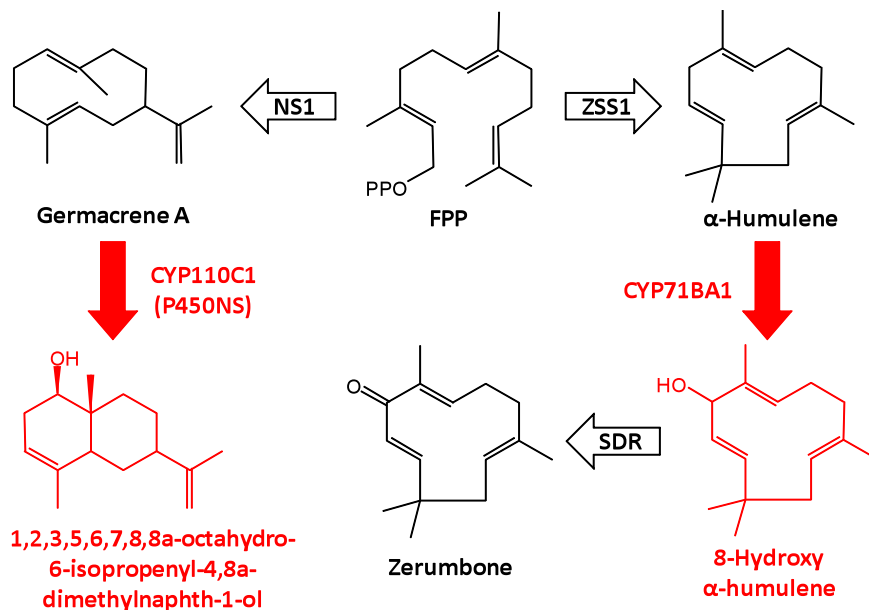


図 4 セスキテルペンの水酸化反応を行う P450 モノオキシゲナーゼの機能解析例。赤で示した部分が P450 による修飾反応を示す。

同定することができた (図 4)。同様に、これまでは収量が少ないため正確な機能同定が困難であった、*Nostoc* sp. PCC7120 由来のゲルマクレン A (germacrene A) 水酸化を行う P450 遺伝子 (*CYP110C1*, *P450NS*, Agger et al. 2008) に関しても、1 L の培養菌体からゲルマクレン A 水酸化産物の精製と構造決定を行うことで機能同定に成功している (図 4)。

5. おわりに

ここまで植物由来のセスキテルペンを中心に、大腸菌による効率的な生産システムと生合成遺伝子の機能解析法について紹介した。セスキテルペンに限ったことではないが、植物が

つくる多様なテルペン化合物の生合成関連酵素およびその遺伝子の正体が徐々に明らかになりつつあるものの、生合成経路の全容が解明されているものはまだほんの僅かである。近年、代謝産物の網羅的解析を行うメタボロミクス研究やシステムバイオロジーといった研究分野が注目を集めており、個々の代謝関連分子だけではなくそれらのネットワークを考慮した研究が試みられてきている。これら多面的なアプローチからの研究によって、今後様々なテルペン化合物の生合成経路が明らかになることを期待したい。

謝辞

本研究を進めるにあたりお世話になった、近畿大学農学部の内海 龍太郎先生、余 豊年氏、岡本 尚氏、日本女子大学家政学部の新藤 一敏先生、東京大学生物生産工学研究センターの葛山 智久先生、石川県立大学生物資源工学研究所の大山 莞爾先生、三沢 典彦先生、八反 順一郎氏、キリンホールディングス(株)フロンティア技術研究所の水谷 悟所長、梅基 直行氏、杉村 哲氏、藤澤 雅樹氏に、この場を借りて心より感謝申し上げます。

引用文献

- Agger, S.A., Lopez-Gallego, F., Hoye, T.R., Schmidt-Dannert, C. 2008. Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 190: 6084-6096.
- Ajikumar, P.K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T.H. & Stephanopoulos, G. 2008. Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol. Pharmaceutics* 5: 167-190.
- Albrecht, M., Misawa, N. & Sandmann, G. 1999. Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids β -carotene and zeaxanthin. *Biotechnol. Lett.* 21: 791-795.
- Arsenault, P.R., Wobbe, K.K., & Weathers, P.J. 2008. Recent advances in artemisinin production through heterologous expression. *Curr. Med. Chem.* 15: 2886-2896.
- Chang, M.C.Y., Eachus, R.A., Trieu, W., Ro, D.K., Keasling, J.D. 2007. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat. Chem. Biol.* 3: 274-277.
- Fujisawa, M., Harada, H., Kenmoku, H., Mizutani, S., & Misawa, N. 2010 Cloning and characterization of a novel gene that encodes (S)- β -bisabolene synthase from ginger, *Zingiber officinale*. *Planta* 232: 121-130; Erratum, 232: 131.
- Harada, H., & Misawa, N. 2009. Novel approaches and achievements in biosynthesis of functional isoprenoids in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 1021-1031.
- Harada, H., Yu, F., Okamoto, S., Kuzuyama, T., Utsumi, R. & Misawa, N. 2009. Efficient synthesis of functional isoprenoids from acetoacetate through metabolic pathway-engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 915-925.
- Harada, H., Shindo, K., Iki, K., Teraoka, A., Okamoto, S., Yu, F., Hattan, J., Utsumi, R. & Misawa, N. 2011. Efficient functional analysis system for cyanobacterial or plant cytochromes P450 involved

- in sesquiterpene biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 467-476.
- Jackson, H., Braun, C.L. & Ernst, H. 2008. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am. J. Cardiol.* 101: 50D-57D.
- Jennewein, S. & Croteau R. 2001. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 13-19.
- Kajiwar, S., Fraser, P.D., Kondo, K. & Misawa, N. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324: 421-426.
- Kusama, H., Hara, R., Kawahara, S., Nishimori, T., Kashima, H., Nakamura, N., Morihira, K. & Kuwajima, I. 2000. Enantioselective Total Synthesis of (-)-Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3811-3820.
- Kuzuyama, T. & Seto, H. 2003. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.* 20: 171-183.
- Luo, P., Wang, Y.H., Wang, G.D., Essenberg, M., & Chen, X.Y. 2001. Molecular cloning and functional identification of (+)- δ -cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 monooxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. *Plant J.* 28: 95-104.
- Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. & Keasling, J.D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21: 796-802.
- Misawa, N. 2009. Pathway engineering of plants toward astaxanthin production. *Plant Biotechnol.* 26: 93-99.
- Misawa, N. 2011. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* Epub ahead of print.
- 大村恒雄, 石村巽, 藤井義明 2003. P450 の分子生物学. 講談社サイエンティフィック. 東京
- Roberts, S.C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat. Chem. Biol.* 3: 387-395.
- 杉村哲, 鶴丸優介, 原田尚志, 三沢典彦, 矢崎一史, 梅基直行 2010. ホップ (*Humulus lupulus* L.) におけるリナロール・ネロリドール合成酵素遺伝子の同定. 日本農芸化学会大会講演要旨集 p39
- White, N.J. 2008. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 18: 330-4.
- Yu, F., Okamoto, S., Nakasone, K., Adachi, K., Matsuda, S., Harada, H., Misawa, N. & Utsumi, R. 2008a. Molecular cloning and functional characterization of α -humulene synthase, a possible key enzyme of zerumbone biosynthesis in shampoo ginger (*Zingiber zerumbet* Smith). *Planta* 227: 1291-1299.
- Yu, F., Harada, H., Yamasaki, K., Okamoto, S., Hirase, S., Tanaka, Y., Misawa, N. & Utsumi, R. 2008b. Isolation and functional characterization of a β -eudesmol synthase, a new sesquiterpene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. *FEBS Lett.* 582: 565-572.