

## 新奇トリテルペン生合成経路を発見

### 1. 発表者：

Hui Tao (東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 特任研究員)

森 貴裕 (東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 助教)

阿部 郁朗 (東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 教授)

安達 成彦 (高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 特任准教授)

千田 俊哉 (高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 教授)

Jeroen Dickschat (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Professor)

Tiangang Liu (School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Professor)

### 2. 発表のポイント：

- ◆テルペノイド化合物(注1)の生合成に関わるテルペン合成酵素(注2)の機能解析から、スクアレン(注3)に由来せずに炭素数30のトリテルペン(注4)の骨格を一挙に構築する、画期的な新奇生合成酵素を自然界から初めて発見しました。
- ◆ホモログ酵素の機能解析から、この新奇なトリテルペン生合成マシナリーがさまざまなカビに広く保存されていることを証明しました。
- ◆今後、合成生物学の手法を用いた生合成マシナリーの再設計により、天然物を超える新規機能分子の創製など、創薬研究に幅広く貢献することが期待されます。

### 3. 発表概要：

テルペノイド化合物は、知られているだけで80,000以上の分子が単離されている天然物の一群であり、生物活性を持つ化合物が数多く含まれることから、医薬品候補化合物の探索ソースとしても非常に重要な化合物群の一つです。中でも、炭素数30(C30)のトリテルペンは、微生物、植物、動物に普遍的に見いだされ、細胞膜の重要な構成成分の一つであり、生物の生理機能を調節するステロイド化合物(注5)の前駆体などが含まれます。これまでに、トリテルペンの生合成経路としては、炭素数15(C15)のファルネシル二リン酸(FPP)が2量化して生成するスクアレンを経由するものしか知られていませんでした。

今回、東京大学大学院薬学系研究科の阿部郁朗教授と森 貴裕助教、Hui Tao 特任研究員、および、高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉教授と安達成彦特任准教授、武漢大学のTiangang Liu 教授、ボン大学のJeroen Dickschat 教授らの共同研究グループは、カビ由来テルペン合成酵素の機能解析を行い、スクアレンに由来せずに、C5 イソプレン単位(注6)ジメチルアリル二リン酸(DMAPP)とイソペンテニル二リン酸(IPP)を基質として、C30トリテルペンの骨格を一挙に構築する、画期的な新奇生合成酵素を世界に先駆けて発見しました。

さらに、共同研究グループは、安定同位体(注7)を利用した酵素反応機構の精密解析や、酵素のX線結晶構造解析(注8)、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析(注9)、さらには立体構造をもとにした部位特異的変異導入により、2種類のトリテルペン合成酵素の反応機構の詳細を明らかにすることに成功しました。本成果は既存の常識を覆す新たな生合成経路と画期的な新奇酵素の発見であり、新しい分子認識化学の開拓や新たな触媒概念の確立など、学術的に大きなインパクトを与えるとともに、今後、合成生物学の手法を用いた生合成マシナリーの再設計により、天然物を超える新規機能分子の創製など、創薬研究に幅広く貢献することが期待されます。

本研究は 2022 年 6 月 1 日付で 英国科学雑誌 *Nature* (オンライン版) に掲載されました。

#### 4. 発表内容：

テルペノイド化合物は、自然界において最大の構造多様性を有する天然物の一群であり、医薬品や香料、樹脂など、さまざまな分野で活用されています。特に、生物活性を持つ化合物が数多く含まれることから、医薬品候補化合物の探索ソースとして非常に重要です。その中でも炭素数 30 (C30) のトリテルペンは、微生物、植物、動物と生物種を超えて普遍的に生体内で生産され、細胞膜の構成成分として重要なコレステロールや、種々のステロイドホルモン、胆汁酸、など生体内ステロイドの前駆体が含まれます。これまでに、トリテルペンの生合成経路としては、炭素数 5 (C5) イソプレレン単位のジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) とイソペンテニルニリン酸 (IPP) がプレニル基転移酵素により縮合して生成する、炭素数 15 (C15) のファルネシルニリン酸 (FPP) がさらに 2 量化した炭素数 30 (C30) のスクアレンを経由するものしか知られていませんでした (図 1)。

今回、共同研究グループは、一連のカビ (糸状菌) に見出した、プレニル基転移酵素とテルペン環化酵素の二つのドメイン (注 1 0) からなる新規キメラ型テルペン合成酵素 (注 1 1) の候補遺伝子の網羅的解析を目的として、酵母を宿主として異種発現 (注 1 2) したところ、二つの異なるカビ由来テルペン合成酵素 TvTS と MpMS をそれぞれ発現させた酵母において、新規トリテルペン化合物が生産されることを見出しました。そこで次に、精製した組み換え酵素を用いて試験管内で酵素反応を行い詳細に解析した結果、これらキメラ型テルペン合成酵素は、C5 単位 DMAPP と IPP を基質として、プレニル基転移酵素とテルペン環化酵素の二つのドメインによって、C30 トリテルペンの骨格を一挙に構築する画期的な新奇酵素であることが判明しました (図 1)。

さらに共同研究グループは、安定同位体で標識した基質を用いて酵素反応を行うことで、2 種類のトリテルペン合成酵素の反応機構の詳細を解明しました。また、TvTS のテルペン環化酵素ドメインの X 線結晶構造解析と MpMS の全体構造のクライオ電子顕微鏡構造解析を行い、TvTS や MpMS が C30 のヘキサプレニルニリン酸中間体を受け入れるのに十分な大きさの活性部位 (注 1 3) を有していることを明らかにしました。次に、基質との複合体モデルを作成し、その構造を基盤とした活性部位アミノ酸残基の変異導入から、ヘキサプレニルニリン酸がどのような形で活性部位に結合しているかを考察し、試験管内酵素反応の結果と合わせて詳細な環化酵素反応機構を提唱しました。加えて、立体構造モデルを利用した類似酵素探索と機能解析から、新たなトリテルペン合成酵素 CgCS を発見し、この新奇なトリテルペン生合成マシナリーがカビ類に広く保存されていることを証明しました。

本成果は既存の常識を覆す新たな生合成経路と画期的な新奇酵素の発見であり、新しい分子認識化学の開拓や新たな触媒概念の確立など、学術的に大きなインパクトを与えるとともに、今後、合成生物学の手法を用いた生合成マシナリーの再設計により、天然物を超える新規機能分子の創製など、創薬研究に幅広く貢献することが期待されます。

本研究は、文部科学省 科学研究費補助金 (JP16H06443, JP19K15703, JP20H00490, JP20KK0173, JP21K18246)、新学術領域研究 (研究領域提案型) 「生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学 (生合成リデザイン)」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS : JP20am0101071)、AMED 創薬基盤推進研究事業 生物資源利活用研究分野 (JP21ak0101164) 国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

(NEDO : JPNP20011)、科学技術振興機構 (JST) さきがけ (JPMJPR20DA) の支援を受けて行われたものです。

## 5. 発表雑誌 :

雑誌名 : *Nature*

論文題目 : Discovery of non-squalene triterpenes

著者 : Hui Tao<sup>#</sup>, Lukas Lauterbach<sup>#</sup>, Guangkai Bian<sup>#</sup>, Rong Chen<sup>#</sup>, Anwei Hou<sup>#</sup>, Takahiro Mori<sup>#</sup>, Shu Cheng, Ben Hu, Li Lu, Xin Mu, Min Li, Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Toshio Moriya, Toshiya Senda, Xinghuan Wang, Zixin Deng, Ikuro Abe<sup>\*</sup>, Jeroen S. Dickschat<sup>\*</sup>, Tiangang Liu<sup>\*</sup> (<sup>#</sup>共同筆頭著者、<sup>\*</sup>共同責任著者)

DOI 番号 : 10.1038/s41586-022-04773-3

URL : <https://www.nature.com/articles/s41586-022-04773-3>

## 6. 注意事項 :

日本時間 6 月 2 日 (木) 0 時 (英国夏時間 : 1 日 (水) 16 時) 以前の公表は禁じられています。

## 7. 用語解説 :

注 1) テルペノイド化合物 : 五炭素化合物であるイソプレン (C<sub>5</sub>) を構成単位とする一群の天然物化合物の総称であり、炭素数からモノ (C<sub>10</sub>) ・セスキ (C<sub>15</sub>) ・ジ (C<sub>20</sub>) ・トリ (C<sub>30</sub>) テルペンに分類されます。これらのテルペノイド化合物は、微生物、植物、昆虫、動物など幅広い生物種において生産されます。イソプレン単位を持つ化合物をイソプレノイドとも総称します。

注 2) テルペン合成酵素 : テルペンを生産する酵素です。本研究で用いた酵素は、プレニル基の縮合により炭素鎖を伸張する酵素と、伸長したプレニル二リン酸を環化する酵素との融合酵素であり、イソプレニル二リン酸の生成と、その環化反応を行い、テルペノイド化合物を合成します。テルペン環化酵素はその反応開始機構によって I 型と II 型に分類されます。I 型テルペン環化酵素は基質となるイソプレニル二リン酸の二リン基の脱離によって反応が開始され、連続的なカチオン転位を伴った炭素-炭素結合の形成により環化したテルペノイド化合物を生産します。

注 3) スクアレン : 分子式 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub> のトリテルペン油脂です。ヒトの体内でも生合成され、コレステロールなどの前駆体となります。化粧品や健康食品、サプリメントなどで商品化されています。

注 4) トリテルペン : 6 つのイソプレン単位から構成される炭素数 30 の化合物群のことです。スクアレンもトリテルペンの一つです。

注 5) ステロイド化合物 : ステロイド骨格と呼ばれる構造をもった化合物の総称です。コレステロール、ホルモン、胆汁酸など、生体内の機能を調節する重要な働きを持つ生理活性物質が含まれています。

注 6) イソプレン単位 : 炭素数 5 の 2-メチル-1,3-ブタジエン構造のことであり、この構造が組み合わさることでさまざまな長さのプレニル二リン酸が生成し、テルペノイド化合物の多様性が生み出されます。

注7) 安定同位体：原子番号（陽子数）が同じで質量数（陽子と中性子の数の和）が異なる元素を同位体と言います。その中で、放射線を出さず且つ半永久的に存在量も変わらずに存在する同位体を安定同位体と呼びます。

注8) X線結晶構造解析：X線結晶構造解析の手法を用いれば、タンパク質などの生体高分子の3次元構造を原子のレベルで調べることができます。酵素タンパクなどを結晶化し、散乱されたX線を観測することで、分子を構成する電子の分布を知ることができます。高エネルギー加速器研究機構の光子ファクトリー BL-1Aなどで実験しました。

注9) クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析：クライオ電子顕微鏡を使った単粒子解析という手法でもタンパク質などの生体高分子の3次元構造を原子のレベルで調べることができます。クライオ電子顕微鏡は通称クライオ電顕（CryoEM）と呼ばれ、液体窒素（-196℃）冷却下で酵素などの生体分子に電子線を照射し、試料の観察を行います。高エネルギー加速器研究機構のクライオ電顕を利用しました。

注10) ドメイン：タンパク質で、ひとまとまりの機能や構造を持つ領域のことです。

注11) キメラ型酵素：2種類の酵素が一本のペプチド鎖で繋がっている、融合タンパク質のことです。

注12) 異種発現：目的とする遺伝子を遺伝子操作や培養方法が確立した宿主（微生物や植物、昆虫細胞など）に導入し、酵素を発現させる手法です。遺伝子を導入した宿主では本来生産されない代謝物を解析することで導入した酵素遺伝子の機能を知ることができます。

注13) 活性部位：酵素が触媒反応を行う場のことです。通常、タンパク質のアミノ酸残基で構成され、この部分に基質が結合することで化学反応が触媒されます。

## 8. 添付資料：

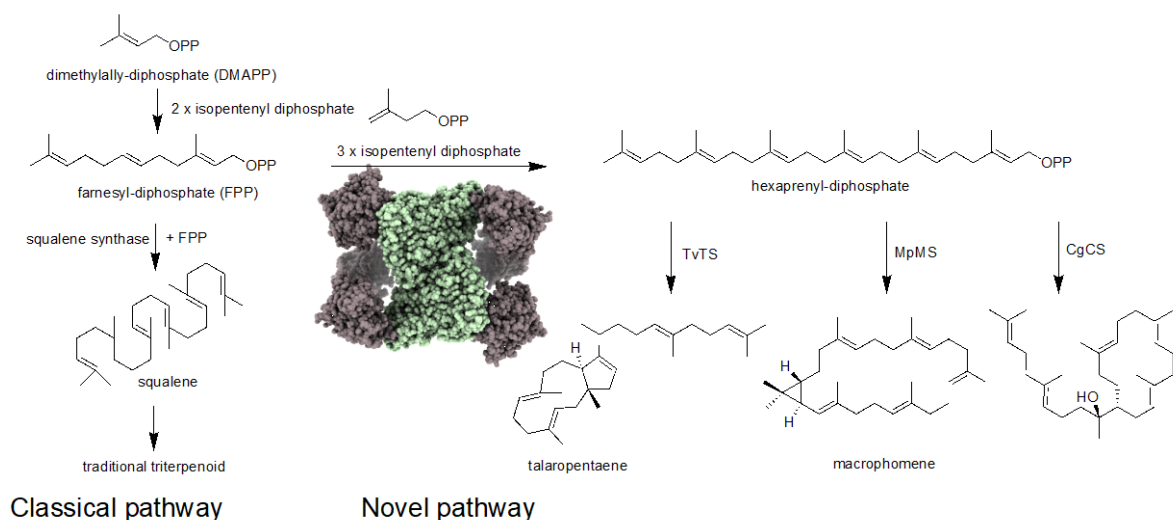


図1：新規トリテルペノイド合成酵素はヘキサプレニル二リン酸の形成とその環化反応を触媒し、トリテルペノイド化合物を生成します。