テルペン環化酵素に秘められた新規機能を発見

１．発表者：

何　　海兵（東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 博士課程３年）

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）

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

David W. Christianson　(Department of Chemistry, University of Pennsylvania, Professor)

２．発表のポイント：

◆医薬品資源として重要なテルペノイド化合物（注１）の生合成に関わるテルペン環化酵素（注２）の機能解析を行い、本酵素がこれまでに見いだされていなかった芳香環プレニル基転移活性（注３）をも併せ持つことを発見しました。

◆さまざまな生物種由来のテルペン環化酵素が同様に芳香環プレニル基転移活性を併せ持つことを確認し、見いだされた新奇な触媒機能が生物種の垣根を超えて一般的であることを証明しました。

◆今後さらに精査を重ねることで、自然環境下において酵素触媒反応（注４）がどのように収斂されてきたか、その分子進化プロセスの解明へとつなが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、自然界において最大とも言われる構造多様性を有する天然物の一群です。生物活性を持つ化合物が数多く含まれることから、薬学の観点からも非常に重要とされている化合物群の１つです。その構造多様性は主にテルペン環化酵素によってもたらされ、酵素の環化様式の違いにより基本炭素骨格（注５）の多様性が構築されます。

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、博士課程３年の何海兵大学院生、および、武漢大学の Tiangang Liu 教授、ペンシルバニア大学の David W. Christianson 教授らの共同研究グループは、カビ由来テルペン環化酵素の精密機能解析を行い、本酵素がこれまでに知られていなかった芳香環プレニル基転移活性をも併せ持つことを、世界に先駆けて見いだすことに成功しました。さらに、他の微生物や植物由来のテルペン環化酵素が、同様に芳香環プレニル基転移活性を併せ持つことを確認し、この二重性機能が同属酵素（注６）に広く保存されていることを明らかにしました。この新奇な機能は、過剰に生産されたインドール基質（注７）などの毒性を低減するための防御機構の一つであるとも推測されます。共同研究グループは、機能解析を行った２種類のテルペン環化酵素の立体構造の詳細を解明し、それに基づき変異を導入することで酵素の活性部位（注８）に位置するアミノ酸残基の役割と重要性を明らかにしました。これにより、テルペン環化酵素における二重性機能の酵素反応の分子基盤を解明し、生体内防御機構との関連を提唱しました。本成果により、これまでに多くの研究が行われてきたテルペン環化酵素が、いまだ秘められた新たな触媒機能をも併せ持っていたことが判明し、生体内酵素反応がどのように収斂されてきたか、その分子進化プロセス（注９）の解明につながることが期待されます。また、さまざまな酵素についても今後同様に触媒反応を詳細に精査することで、これまでに見つかっていない新奇な触媒機能の発見が期待されます。

本研究成果は、2020 年 8 月 7 日（金）公開の *Nature Communications* 誌にオンライン掲載されます。

４．発表内容：

テルペノイド化合物は、自然界において最も構造多様性に富んだ化合物群であり、80,000 を超える種類が単離されています。テルペノイド化合物の中には、抗マラリア薬アルテミシニン、抗がん剤タキソール、香料リモネンに代表されるように、生理活性や機能性等を有する市場価値の高い化合物が数多く含まれ、さまざまな分野で活用されています。このテルペノイド化合物の構造多様性は、最小単位であるジメチルアリル二リン酸（DMAPP）と C5 単位イソペンテニル二リン酸（IPP）を縮合する酵素の生成物特異性、生産されたイソプレニル二リン酸を受け入れ、環化反応を触媒するテルペン環化酵素の環化様式、さらには環化後の酸化酵素などによるテルペノイドの修飾反応により構築されます。これまでに多くのテルペン環化酵素の機能解析、立体構造解析が行われてきましたが、本酵素が環化反応以外に、別の新たな触媒機能を併せ持つことについては分かっていませんでした。

今回、共同研究グループはカビ由来の I 型新規テルペン環化酵素（注２）の機能解析を目的として、イソプレノイドを過剰に蓄える大腸菌発現システムに当該酵素を異種発現（注１０）したところ、テルペン環化産物に加え、意外なことに、複数のプレニル化されたインドール化合物が生産されていることを見いだしました（図１）。そこで、試験管内で精製した酵素に対してさまざまな芳香環を含む化合物を作用させたところ、インドール化合物に加え、ナフタレン化合物（注１１）を基質として認識し、プレニル基転移反応を触媒することが判明しました。この新たに見いだされた機能は、生体内で過剰に蓄積したイソプレノイドが示す毒性を低減するための防御機構の一つとも推測されます。I 型テルペン酵素は、これまでに解析されている芳香環プレニル基転移酵素群とはアミノ酸配列の相同性や進化的な関連性を示さず、I 型テルペン環化酵素が固有に併せ持つ新たな触媒能であることが示唆されました。そこで、異なるカビ由来の I 型テルペン環化酵素や、植物由来の I 型テルペン環化酵素に対してプレニル基転移活性の試験を行った結果、これらの酵素においてもプレニル基転移反応が進行し、この新奇な機能が生物種を超えて広く保存されていることが示されました。

さらに、共同研究グループは、複数の酵素について、酵素と基質類似化合物との複合体構造を取得し、酵素反応中において芳香環化合物がどのような形で活性部位に結合しているかを考察しました（図１）。得られた複合体構造に基づき活性部位のアミノ酸残基に対して変異を導入することで、各活性部位構成アミノ酸残基の役割と重要性を確認しました。その結果、プレニル基転移反応においては、本来の基質のイソプレン部分が結合する疎水性ポケット（注１２）に芳香環化合物が結合し、反応が進行することを明らかとしました。

本研究では、I 型テルペン環化酵素に秘められていた新たなプレニル基転移酵素としての機能を発見し、その新奇な機能の一般性を明らかにしました。本研究を通して、I 型テルペン環化酵素群の分子進化に関する科学的議論の発展が期待されます。さらに今後、同様にして、既知の酵素の反応生成物の精査を重ねることでさまざまな酵素が併せ持つ、さらなる潜在触媒能力の発見が期待されます。

本研究は、文部科学省 科学研究費補助金（JP16H06443、JP18K19139、JP19K15703、JP20H00490）、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）」、科学技術振興機構（ＪＳＴ）戦略的国際共同研究プログラム（SICORP）日本-中国共同研究第 2 回生物遺伝資源分野～植物-微生物共生

系、微生物叢の機能と制御に着目した基盤技術の創出（研究主幹：長谷部 光泰）～「植物共生菌相互作用の包括的利用による二次代謝産物の網羅的解析」の支援を受けて行われたものです。

５．発表雑誌：

雑誌名：「*Nature Communications*」

論文タイトル：Discovery of the cryptic function of terpene cyclases as aromatic prenyltransferases

著者：Haibing He, Guangkai Bian, Corey J. Herbst-Gervasoni, Takahiro Mori, Stephen A. Shinsky, Anwei Hou, Xin Mu, Minjian Huang, Shu Cheng, Zixin Deng, David W. Christianson*, Ikuro Abe*, Tiangang Liu*

DOI 番号：10.1038/s41467-020-17642-2
URL：https://doi.org/10.1038/s41467-020-17642-2

６．注意事項：

日本時間 8 月 7 日（金）午後 18 時 （イギリス時間：7 日（金）午前 10 時)以前の公表は禁じられています。

７．問い合わせ先：

＜研究に関すること＞
東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻
教授 阿部 郁朗（あべ いくろう）
Tel：03-5841-4740
E-mail： abei@mol.f.u-tokyo.ac.jp

＜報道に関するお問い合わせ＞
東京大学薬学部 庶務チーム
Tel：03-5841-4719
E-mail： shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課
Tel：03-5214-8404 Fax：03-5214-8432
E-mail：jstkoho@jst.go.jp

＜JST 事業に関するお問い合わせ＞
科学技術振興機構 国際部
佐藤 正樹（さとう まさき）
Tel：03-5214-7375 Fax：03-5214-7379
E-mail：jointcn@jst.go.jp

８．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ユニット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（C10）・セスキ（C15）・ジ（C20）テルペンと分類されます。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。イソプレン化合物に二リン酸が結合したイソプレニル二リン酸を含め、イソプレンユニットを持つ化合物をイソプレノイドと呼びます。

注２）テルペン環化酵素：イソプレニル二リン酸を環化し、テルペノイド化合物を生産する酵素です。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）プレニル基転移活性：イソプレニル二リン酸のプレニル部分を他の化合物に付加する活性のことです。本研究では特に、芳香環を有するインドール化合物、ナフタレン化合物に対してプレニル基を付加する反応を見いだしました。

注４）触媒反応：触媒とは、特定の化学反応の反応速度を速める物質で、自身は反応の前後で変化しないものをいいます。今回の場合は、酵素が触媒であり、行う反応を触媒反応と呼びます。

注５）炭素骨格：炭素-炭素結合で構築された天然物の基本となる部分のことです。有機化合物は、炭素骨格に官能基が結合したものです。

注６）同属酵素：同じ機能を有する酵素のことです。違う種類の生物からでも機能、立体構造が類似する酵素が多く発見されています。今回の場合は他の微生物と植物から見いだしたテルペン環化酵素について確認しました。

注７）インドール：ベンゼン環とピロール環が縮合した構造をとる有機化合物の一群です。

注８）活性部位：酵素が反応を行う場のことです。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。

注９)分子進化プロセス:酵素が自然界においてどのように進化してきたかの過程のことです。

注１０）異種発現：的の酵素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）に移し、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１１）ナフタレン：２個のベンゼン環が１辺を共有した構造を持つ化合物構造の一群です。

注１２）疎水性ポケット：活性部位の形状がポケット状であり活性部位を構成するアミノ酸残基が主に疎水性のアミノ酸残基であるということです。

９．添付資料：

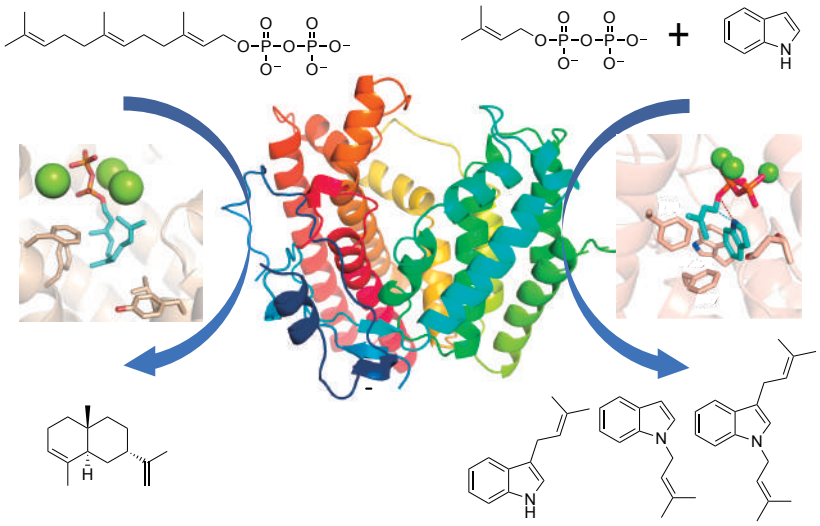

図１：テルペン環化酵素の反応と結晶構造：テルペン環化酵素はイソプレニル二リン酸の環化反応と芳香環化合物へのプレニル基転移反応を両方触媒します。