

論文名： *Bacillus* 属細菌由来新規テルペノイド生合成経路の解析と利用

新潟大学大学院自然科学研究科 生命・食料科学専攻

氏名 上田 大次郎

---

当研究室では *Bacillus* 属細菌の生合成研究（主に新規酵素と新規化合物の探索）を行っている。その中で学位申請者は、*B. megaterium* から希少天然物の 1 種であるオノセロイド（スクアレンの両末端の環化で生合成される  $C_{30}$  のテルペノイドの総称）の合成酵素を世界で初めて発見した。さらに、その酵素を利用して、希少天然物のアンブレイン（約 1% のマッコウクジラしか生産しない腸管結石の主成分）の酵素合成に成功した（研究 1）。

また、高アルカリ性菌 *B. clausii* における生合成解析を行い、三機能性イソプレニルニリン酸合成酵素を発見した（研究 2）。

最後に *B. megaterium* と *B. subtilis* における新規天然物の探索を行ったところアセトニル基を持つノルイソプレノイド類 ( $C_5 \times n + C_3$ ) である  $C_{33}$  のファルネシルファルネシルアセトン (FFA) をバクテリアから初めて単離、同定した。また、その生合成は非酵素的にメナキノン-7 (MK-7) の開裂によって行われていることを提案した（研究 3）。

### 【研究 1：スクアレンの両端環化：オノセロイド合成酵素の同定と、龍涎香主成分 ambrein の酵素合成】

当研究室において、*B. megaterium* から二機能性テルペン環化酵素 (BmeTC) を同定していた。BmeTC は  $C_{35}$  基質から 4 環を形成するのに対し、 $C_{30}$  基質からは 2 環を形成するユニークな二機能性テルペン環化酵素として報告されていた。その中で、単環を持つ  $C_{35}$  基質を BmeTC が取り込み、反対側の非環端を環化できる事に着目した。 $C_{30}$  基質から形成される 2 環性生成物（2 環）の非環端に対しても作用すると予想した。今までの研究では、そのような活性は全く検知されていない。活性の低い本酵素のプロダクト解析を少しでも容易にするため、スクアレン基質を大過剰に与えてきたためであると考えた。つまり、スクアレンが大過剰に与えられた状況では、系内の全ての BmeTC はスクアレン消費に使われるため、その隠された活性が見逃されたのではないか。この仮説に基づき、およそ 10 倍量の BmeTC を作用させる実験を試みた。結果、新たに 2 つの生成物が見出された。一つは新規天然物であった。もう一つはシダ植物から単離報告がある天然物であった。1955 年にオノセロイドが初めて発見されて以来、その生合成経路は謎に包まれたままであったが、本研究は、オノセロイド合成酵素の初めての発見であった。龍涎香は古くから高級香料や媚薬・伝統薬として世界中で利用されてきたが、マッコウクジラの約 1% にしか見られない腸管結石を原料とする希少な物質である。商業捕鯨の禁止以降は、ますます入手困難となっている。その主成分はアンブレインであり、酸化分解して生じる 31 種類以上の揮発性物質が複合的ないい香りとなる。龍涎香の香り成分の 1 つが代用品として販売されているが、龍涎香本

## 【別紙 2】

来の複合的な香りを再現するには至っていない。龍涎香の香料としての利用や生理活性の詳細な研究のため、アンブレインの大量合成法の確立が待たれている。アンブレインの化学合成が成されているが、いずれも多段階で収率が低く産業生産には至っていない。

以前の研究室の成果として変異型スクアレン-ホペン環化酵素 (SHC) によって、スクアレンの末端に単環構造を導入できるという報告があった。この単環部分がアンブレインと全く一緒であるということ、アンブレインの二環部分がスクアレンと BmeTC の反応物と全く構造が同じということに気が付いた。また、片側が環化していても再び取り込み、鎖状部分を環化するという機能を生かせば変異型 SHC の生成物を基質とし、アンブレインが合成できると考えた。

単環を基質とし、BmeTC と酵素反応を行い、生成物を単離・構造決定したところ、期待通り、アンブレインが合成された。これはアンブレインの酵素合成の初めての成功例であった。2段階目の BmeTC の反応の収率 (4 %) が悪いが、生成物は 1 つであることから、BmeTC の活性を向上できれば、産業利用も可能であると期待している。

### 【研究 2 : *Bacillus clausii* におけるイソプレノイド生合成経路: 多機能性酵素とイソプレノイド代謝の解析】

以前当研究室で枯草菌 *B. subtilis* から新型のテルペン環化酵素 (TS) を発見し、セスクアテルペン (C<sub>35</sub>) の生合成について解析した。加えて高アルカリ性菌 *B. clausii* における TS ホモログ (Bcl-TS) の機能解析を行った結果、GFPP (C<sub>25</sub>) と HexPP (head-to-tail type C<sub>30</sub>) を基質とし、脱リン酸化させ、 $\beta$ -Geranylarnesene と  $\beta$ -Hexaprene を生成した。このことにより、Bcl-TS が二機能性セスタテルペン (C<sub>25</sub>) /head-to-tail type トリテルペン (C<sub>30</sub>) 合成酵素であることを報告した。これは 2 例目のセスタテルペン合成酵素であり、初めての head-to-tail type トリテルペン合成酵素であった。しかしながら、Bcl-TS の基質である GFPP と HexPP が *B. clausii* 菌体内に存在することの証明はされていなかったため、GFPP と HexPP を生成する *E*型イソプレニル二リン酸合成酵素 (*E*-IDS) について解析を行った。*B. clausii* における *E*-IDS のホモログは二つしか存在しない。一つはホモオリゴマー型である *E*-IDS1 であり、もう一つはヘテロオリゴマー型の *E*-IDS2-S/L である。*E*-IDS1 はすべての生物でイソプレノイド生合成のスターター基質として用いられる DMAPP (C<sub>5</sub>) から FPP (C<sub>15</sub>) と GGPP (C<sub>20</sub>) を生成することが確認された。一方、*E*-IDS2-S/L は DMAPP、FPP および GGPP をアリル型基質としたときに、C<sub>25</sub>、C<sub>30</sub> および C<sub>35</sub> が生成されることが分かった。*E*-IDS の解析結果によって C<sub>35</sub> の経路が存在することが示唆されたため、*B. clausii* 菌体内におけるテルペノイドの詳細な解析を行った結果、微量成分の新規非環状セスクアテルペン炭化水素 **14** を同定した。また、GFPP, HexPP, HepPP はメナキノン (MK) の側鎖に利用されていることが知られていることから、メナキノンの生産量を分析した。GFPP が利用され、MK-5 の生成量が多いと予想していたが、予想に反し、MK-7 (側鎖が C<sub>35</sub>) が主であることが判明した (MK-5:MK-6:MK-7 = 0:9:91)。この結果は非環状テルペンの鎖長分布と大きく異なっており (C<sub>25</sub>:C<sub>30</sub>:C<sub>35</sub> = 57:39:4)、*E*-PT2-S/L の下流酵素 (Bcl-TS や未同定の新規メナキノン生合成経路の酵素) の基質特異性がイソプレノイドの生成分布に

影響を与えていることが推測された。

E-IDS1 と E-IDS2-S/L を各々、二機能性 FPP/GGPP 合成酵素と三機能性 GFPP/HexPP/HepPP 合成酵素と同一し（後者は初めての例）、Bcl-TS を三機能性テルペン合成酵素として再同一した。特に、本研究は、多機能性 E-IDS の同一にイソプレノイド代謝物の解析が極めて重要であることを示している。

以前、単機能 E-IDS として同一されているものも、酵素反応実験において複数の生成物を与えるものが多数報告されており、今後それらのイソプレノイド代謝物の解析によって多機能性 E-IDS として再同一される可能性があると考えている。本研究を通して、GFPP, HexPP, HepPP は、二種類のイソプレノイド経路（非環状テルペンとメナキノン）の中間体であり、一つの多機能性 E-PT によって生合成されていることが判明した。加えて、GFPP/HexPP と HepPP が各々非環状テルペンと MK-7 の経路の主基質となっており、経路によって主に用いられる基質の長さが異なることは非常に興味深い。

### 【研究 3 : ノルイソプレノイドの生合成 : 活性酸素による非酵素的メナキノン開裂】

*B. megaterium* におけるさらなる新規天然物を探索したところ、ノルイソプレノイド類 ( $C_5 \times n + C_3$ ) である  $C_{33}$  のファルネシルファルネシルアセトン (FFA) を天然物として初めてバクテリアから単離、同一した。

*In vitro* と *in vivo* の実験結果から、*Bacillus* において FFA は  $O_2^-$  による MK-7 の非酵素的開裂によって生合成されていることが強く示唆された。本研究は、ノルイソプレノイドの生合成経路として、 $O_2^-$  によるビタミン K 類（メナキノンやフィロキノン）の非酵素開裂反応を初めて提案したい。ビタミン K は微生物のみならず、ヒトを含めた動物や植物に広く分布しており、そして  $O_2^-$  は全ての生物で発生していると考えられるので、この経路は他の生物でも利用されている可能性があると考えている。