

# ゲノム情報を基盤としたポリケタイド合成酵素の 探索研究と物質生産への応用

静岡県立大学 食品栄養科学部 鮎 信学



ウコンの curcumin、ブドウの resveratrol、大豆の isoflavone などは、植物由来の食品に含まれる有効成分である。いずれの化合物も抗酸化作用を示すが、curcumin は制癌作用、resveratrol は延命作用、isoflavone はエストロゲン様作用をそれぞれ示すことから注目を集めている。これらの化合物は、ポリケタイドと呼ばれる天然化合物の一群に分類される。また、植物のみが生産するため、植物ポリケタイドと呼ばれることもある。植物ポリケタイドは、主に植物から抽出することにより生産されている。地球温暖化などの環境の影響や、生産地域での人件費の推移を考えると、持続的な生産方法の確立が必要である。そこで我々は、植物ポリケタイドの微生物生産を目標に研究を開始した。微生物生産のメリットは効率やコストなどが挙げられる。しかしながら、その最大の魅力は、後述の不自然な構造をした天然化合物、いわゆる「非天然型」天然化合物の生産を可能にする点だ。

## 1. III 型ポリケタイド合成酵素

III 型ポリケタイド合成酵素 (III 型 PKS) は高等植物、原核および真核微生物に広く分布し、主に芳香族ポリケタイドの合成を触媒する。カルコン合成酵素 (CHS) 以来、スチルベン合成酵素 (STS) などが見いだされてきた。CHS は、4-coumaroyl-CoA と、3 分子の malonyl-CoA からフラボノイドの鍵中間体である naringenin chalcone の合成を触媒する。これに対し、STS は、全く同一の基質から CHS とはポリケタイド鎖中間体の閉環様式が異なるため、resveratrol を生成する。興味深いことに、CHS と STS はアミノ酸配列で約 70% と高い相同性を有するにも関わらず、異なる反応を触媒する。種々の III 型 PKS の X 線結晶構造が明らかとなっている現在では、III 型 PKS の反応は、酵素内のアミノ酸残基のわずかな差異により制御されていることが分かっている。従って、III 型 PKS の反応はアミノ酸配列のみからその反応を予測することが困難である。また、III 型 PKS は植物だけではなく、原核および真核微生物にも存在することが明らかになっている。

## 2. クルクミノイド合成酵素 (CUS) の発見

ゲノム情報に基づいた二次代謝産物の生合成研究は、ゲノムマイニングと呼ばれることがある。微生物や植物のゲノムを宝の山とみたとて、それを採鉱するという意味合いだ。イネ *Oryza sativa* には、約 30 種もの III 型 PKS 様遺伝子が存在している。しかしながら、イネからは、sakuranetin、tricin、alkylresorcinol など少数の芳香族ポリケタイドしか単離されていない。我々は、これらの III 型 PKS の大腸菌組換え酵素を用い、*in vitro* における触媒機能を網羅的に行っている。その過程で curcuminoid の合成を触媒する酵素、クルクミノイド合成酵素 (CUS) を偶然発見した。CUS は、feruloyl-CoA に malonyl-CoA を縮合し、生じたジケタイド中間体をもう一分子の feruloyl-CoA に縮合することで curcumin を合成する。一般の III 型 PKS が、1 分子のスターター基質に複数分子の malonyl-CoA を縮合することで芳香族ポリケタイドを合成することと比較すると、CUS が如何に特異な酵素であるかが分かる。curcuminoid はウコンや近縁種に特異的な二次代謝産物であり、アジア諸国では漢方薬や香辛料などと用いられてきた。近年、抗酸化作用だけではなく、制癌作用やなどを有することが明らかとなっており、注目を集めている。イネは curcuminoid を生産しないが、イネのゲノムには curcuminoid を生産する能力が潜在していることが明らかになり、このような発見がある点においてもゲノムマイニングは興味深い研究分野である。

## 3. 大腸菌における curcumin の生産

curcumin は、phenylpropanoid 経路由来の feruloyl-CoA 二分子と malonyl-CoA 一分子から生合成される。feruloyl-CoA は、4-coumarate:CoA ligase (4CL) がフェルラ酸と補酵素 A を縮合することにより生合成される。また、

malonyl-CoA は、大腸菌の一次代謝産物である。以上より、CUS および 4CL を発現させた大腸菌にフェルラ酸を投与することにより、curcumin の生産が可能であると考えられる。まず、acetyl-CoA carboxylase (ACC) をコードする AccBC と DtsR1 を高コピープラスミドベクター pRSF にクローニングし、pRSF-ACC を構築した。ACC は、acetyl-CoA から malonyl-CoA を合成する酵素であるため、pRSF-ACC を形質転換することで、大腸菌生体内の malonyl-CoA 濃度の上昇が期待できる。次に、CUS を pET に、4CL を pCDF にそれぞれクローニングし、pET-CUS および pCDF-4CL を構築した。pET-CUS、pCDF-4CL および pRSF-ACC を大腸菌 BLR 株に形質転換し、形質転換体を IPTG 誘導後、5 時間 培養し集菌した。この菌体を 25g wet cell/l となるように最少培地で再懸濁し、薬剤マーカー、IPTG、4% glucose、2.5% CaCO<sub>3</sub>、1 mM のフェルラ酸を投与することで 113 mg/l の curcumin の生産に成功した。食用米油の廃棄物である米糠ピッチはフェルラ酸を大量に含んでいる。そこで、米糠ピッチをフェルラ酸の供給源とすることで、curcumin の生産を行った。米糠ピッチ 10 g のアルカリ分解物を含む最少培地から、約 60 mg/l の curcumin が生産された。大腸菌は二次代謝を行わない微生物であり、また、本系では静止菌体による最少培地での発酵生産であるため他の代謝物が少なく、精製が容易であった。

#### 4. 大腸菌における非天然型 curcuminoid の生産

植物以外の生物種における植物ポリケタイドの生産例は少ないが、大腸菌における機能発現が可能な遺伝子の組み合わせによる結果であることを考えると、curcumin の微生物生産は驚くべき成果ではない。そこで、precursor-directed biosynthesis 法とマルチプラスミド法を組み合わせたコンビナトリアル生合成系を開発することにより、非天然型の curcuminoid の生産を行った。コンビナトリアル生合成とは、生合成経路の改変・組み合わせにより、非天然化合物を合成する手法である。

Precursor-directed biosynthesis 法を説明する。CUS の本来の基質前駆体はフェルラ酸であるが、フェルラ酸の代わりにフェルラ酸のアナログを前駆体に用いることで、アナログの構造が反映された最終産物が生産される。この方法は、基質特異性が比較的緩やかな生合成酵素や酵素群に対して用いることができる。また、前駆体アナログは本来の生合成前駆体と競合する可能性があるため、本来の生合成経路を持たない生物種を用いることが望ましい。大腸菌は phenylpropanoid 経路を持たないため、大腸菌は非天然型の生産に適した宿主である。マルチプラスミド法とは、複数のタンパク質の同時発現に複数のプラスミドベクターを用いる手法である。この方法は、複製起点および薬剤耐性マーカーの異なるプラスミドベクターが多数開発されたことにより可能となった。現在、pET、pACYC、pCDF、pRSF、pCOLA などが開発されている。前述のように、CUS、4CL、ACC はそれぞれ pET、pCDF、pRSF にクローニングされている。pET-CUS、pCDF-4CL および pRSF-ACC の大腸菌 BLR 株形質転換体に種々のアナログを投与したところ、複数の非天然型 curcuminoid の生産に成功した。

#### 5. 総括

以上のように、申請者は、無限の潜在能力を秘めている遺伝子情報を「資源」、遺伝子情報が氾濫しているデータベースを「鉱山」とそれぞれ捉え、遺伝子資源を発掘する「ゲノムマイニング」を行った。ゲノムマイニングは、「眠っている」遺伝子資源の潜在能力を「呼び起こす」手法と言え、既存の生物資源のポテンシャルを引き出すことが出来る。そして、発見された有用遺伝子を「ゲノム試薬」、微生物を「フラスコ」と見立て、ゲノム試薬をフラスコに形質転換で導入することにより物質生産系の構築を行った。従来の「もの取り」では、新規化合物を天然の生物資源に求めるため、生物資源の過剰な採取による生物の大量絶滅が起こる可能性がある。また、植物や微生物資源の枯渇により、新規な二次代謝産物の発見数は減少の一途を辿っている。ゲノムマイニングは増殖可能な既存の生物種に多様性を求めるため、このようなリスクはない。本研究では、「非天然型」天然有機化合物のライブラリーの創製を最終目標にしているが、天然有機化合物は医薬品等に利用されている実績が多く、「非天然型」天然有機化合物にも多様な生理活性が期待できる。