

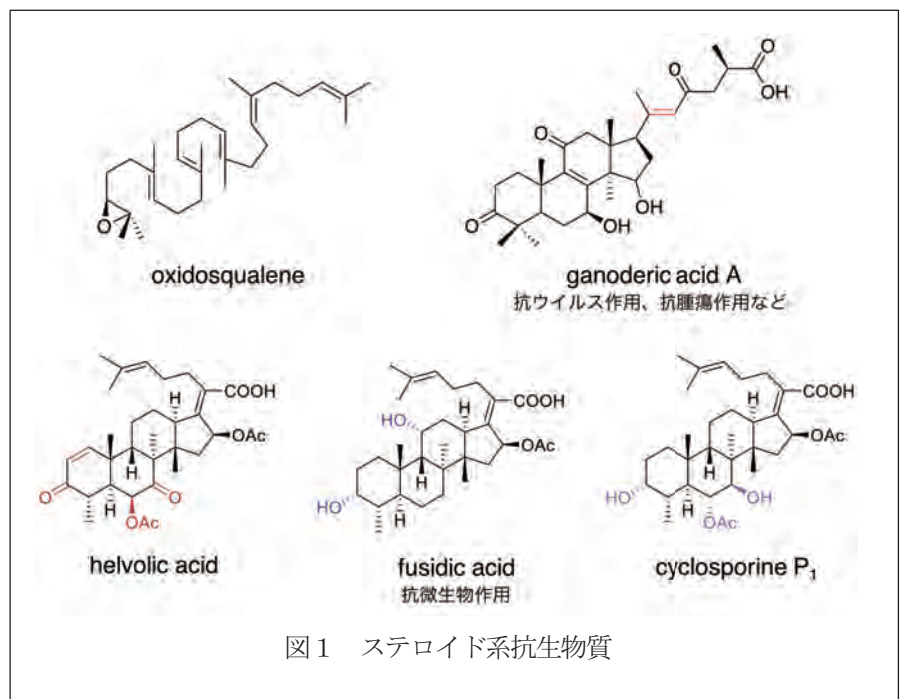
## 霊芝由来漢方成分生合成酵素の機能解析とその物質生産への応用

申請代表者	淡川 孝義	東京大学大学院薬学系研究科	講師
所外共同研究者	中村 仁美	東京大学大学院薬学系研究科	助教
所外共同研究者	尾関 雅弘	東京大学大学院薬学系研究科	大学院生
所内共同研究者	森田 洋行	資源開発研究部門天然物化学分野	教授

### ■背景・目的

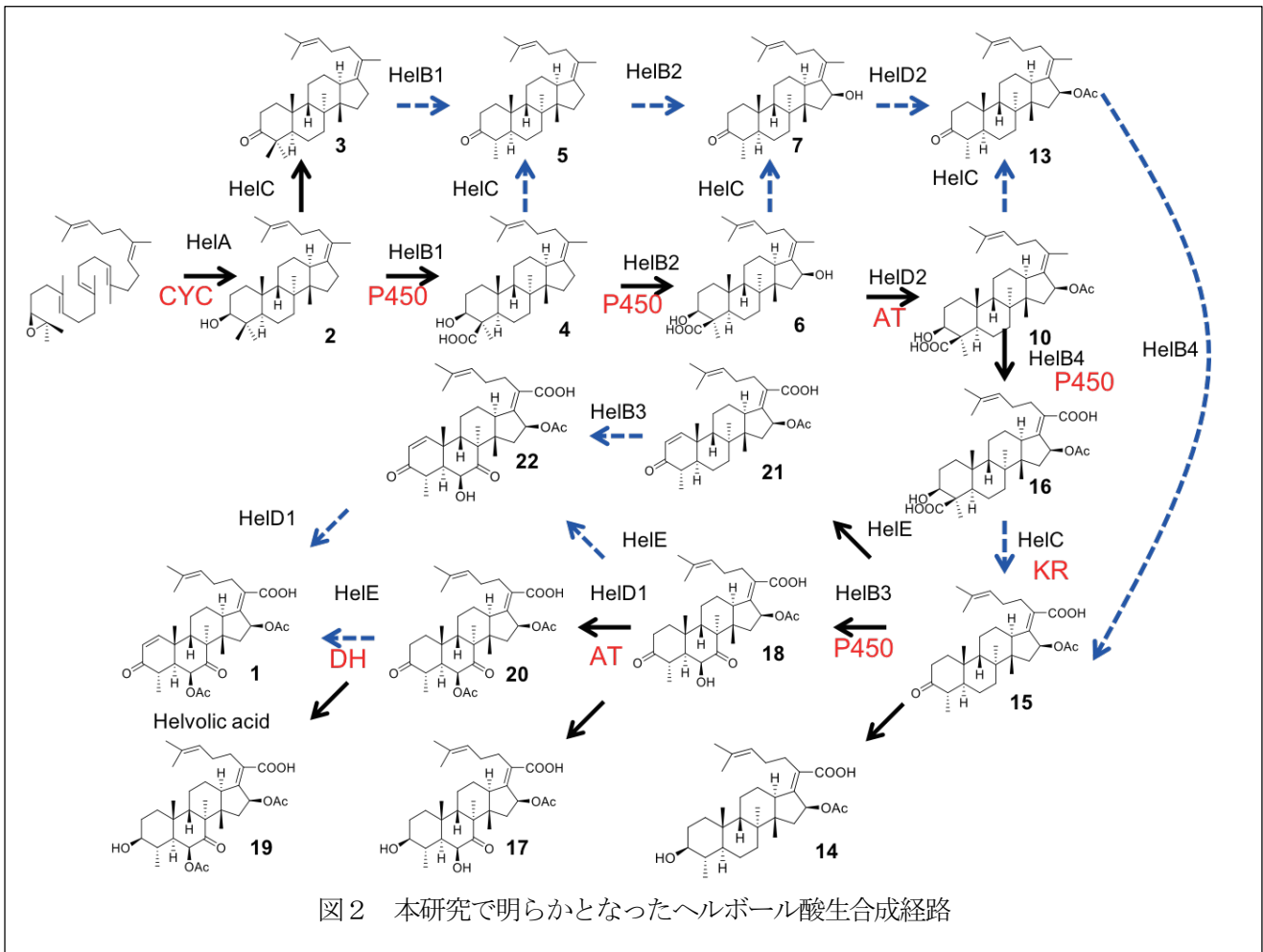
漢方薬の活性成分研究はこれまで単離、精製と言った天然物化学的な手法が主であった。しかし、これらの手法においては、検出が不可能な微量成分の同定は困難である。また、長年研究されてきた生薬から新たな成分を見出すのは容易ではなく、新たな手法が必要である。このような手法として、ゲノム情報を利用した生合成酵素の同定、およびその利用といった手段が考えられる。酵素を用いた物質生産には、*in vitro*、*in vivo* の手法が考えられるが、*in vivo* の微生物生体内で物質生産を行う場合には、酵素の精製の手間がかからないこと、微生物の代謝系を基質供給源として用いることができること、高収量の生産が期待できること、等の利点がある。よって、生合成酵素を利用して漢方成分の生合成経路を微生物生産系に構築することができれば、漢方中の有効成分の安定供給が可能となり、実用性の高い漢方成分合成プラットフォームの構築につながる。また、変異酵素の利用により、非天然型生合成経路を構築し、新規な漢方成分を合成することも可能となる。そのためには、漢方成分の生合成酵素の詳細な機能解析が不可欠である。

本研究では、細菌の翻訳系という特異な作用点を持つ真菌由来のステロイド系化合物に注目した(図1)。フジジン酸、ヘルボール酸などのステロイド系抗生物質は、その生合成経路は *oxidosqualene* からの初期の数ステップが明らかになっていたものの、その全容は謎に包まれていた。そこで、ヘルボール酸の生合成に関わる遺伝子群に注目し、それらを糸状菌宿主 *Aspergillus oryzae* で異種発現することで、オキシドスクアレンからヘルボール酸に至る生合成ステップの全てを明らかにし、それぞれの中間体を単離することで、非天然型のステロイド生産系抗生物質を取得することを目的とした。また、稀少漢方薬資源である担子菌霊芝に含まれるステロイド化合物ガノデリン酸は高度に修飾を受けたステロールであり、酸化状態の異なる数十の類縁体が存在する。その中のガノデリン酸 A、B は抗ウイルス作用、血圧降下作用、腫瘍細胞毒性作用、抗アレルギー作用、コレステロール低下作用、肝障害改善作用といった、多様な有用活性が報告されている。そこで、ガノデリン酸生合成酵素の機能解析を行い、有用ステロイド化合物の醗酵生産系を構築することについて目的とした。霊芝 *Ganoderma lucidum* のゲノム情報は近年公開され、ゲノム情報を元にして酵素遺伝子の探索を行うことが可能である(Chen, S. et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 913)。また、生合成酵素の解析を行い、その基質特異性や反応性を調べることで、酵素反応改変による天然では得られない新規ガノデリン酸生産系の構築を目指す。

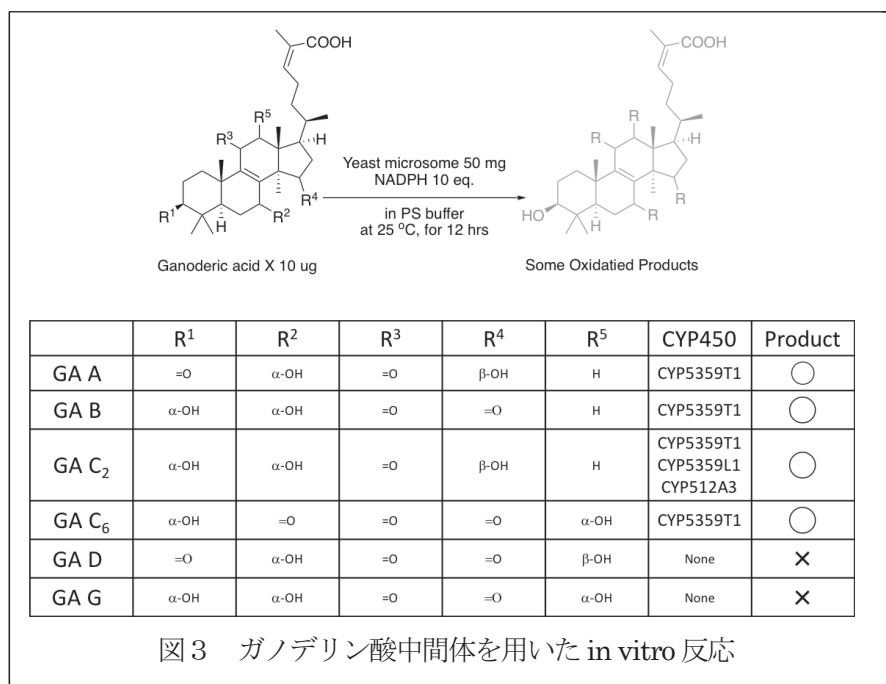


## ■結果・考察

ヘルボール酸合成はこれまで、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において、環化酵素 HelA が oxidosqualene を環化し protostadienol を与え、HelB 1 が脱メチル化へとつながるメチル基の酸化を触媒し、HelC が A 環水酸基の脱水素反応を触媒する生合成ステップが明らかになっていたが、それ以降の反応は未知であった(Mitsuguchi H, Seshime Y, Fujii I, Shibuya M, Ebizuka Y, Kushiro T. Biosynthesis of steroidal antibiotic fusidanes: Functional analysis of oxidosqualene cyclase and subsequent tailoring enzymes from *Aspergillus fumigatus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6402)。そこで HelAB1C とクラスターを形成する HelB2, HelB3, HelB4, HelD1, HelD2, HelE を全て糸状菌宿主 *A. oryzae* NSAR1 株にて異種発現することで、生合成遺伝子の同定を行い、ヘルボール酸の合成を達成した。続いて、それぞれの遺伝子を個々に発現することで、oxidosqualene より環化、4 段階の酸化、2 段階のアセチル化、二回の脱水反応を経てヘルボール酸が生合成されることを示した(図 2)。また、それぞれの中間体を単離することで、13 種の非天然型のヘルボール酸を取得することに成功した。その中には、ヘルボール酸よりも高い抗ブドウ球菌活性を持つ中間体(化合物 18, 21, 22)が存在することを明らかにし、ステロイドの A、B 環の構造が活性に寄与することを示した。さらに、その過程で、P-450 酸化酵素と還元酵素が協奏的に働くことで、4 位の脱メチル化を行う新規な生合成経路を示すことに成功した。(Biosynthesis of helvolic acid and identification of an unusual C-4-demethylation process distinct from sterol biosynthesis, Lv JM, Hu D, Gao H, Kushiro T, Awakawa T, Chen GD, Wang CX, Abe I, Yao XS, *Nat. commun.*, **2017**, *21*, 1644)。



ガノデリン酸は A から Z まで数十種類の類縁体が存在するが、その生合成に関わる酵素はどれ一つとして同定されていない。生産菌の霊芝 *Ganoderma lucidum* は菌糸体、原基体、子実体といくつかの生育段階を経るが、そのうち子実体の時に発現する P450 酸化酵素をターゲットとしてその活性を試験することを計画した。中国科学院武漢植物園 Zhang Yansheng 教授より 9 種の霊芝 P450 cDNA を分与頂き、それを *Arabidopsis* 由来の CPR 酵素(ヘムの還元、P-450 の活性維持に関与)と共に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 にてそれぞれ発現し、ガラスビーズにて酵母細胞壁を破碎、得られたタンパク質含有各分を 100000 x g 70 分で超遠心することで、P450 酵素を含むミクロソーム膜図分を取得した。このミクロソーム図分 50 mg をラノステロール、またラノステロールから  $K_2Cr_2O_7$ ,  $H_2SO_4$  を用いた酸化にて調製したラノステロンと NADPH 存在下インキュベートしたが、残念ながら生成



物と思われる酸化体のピークは LC-MS 分析において検出されなかった。そこで、市販のガノデリン酸 A,B,C<sub>2</sub>,C<sub>6</sub>,D,G を購入し、それぞれ基質として用いて、これらの反応を試験した所、P-450 CYP5144 を含むミクロソームは、ガノデリン酸 B,A,C<sub>6</sub> と反応し、それぞれ、+14, +16, +36 m/z の増加したものを与える事が、LC-MS 分析により明らかとなった(図3)。これらは分子量より、新規化合物であると予想された。現在構造決定のためにこれらの大量調製を行っている。

## ■結論

本研究では、真菌由来のステロイド抗生物質の生合成酵素を同定し、酵素を用いた物質生産への道を切り開いた。ヘルボール酸生合成においてはその全貌を明らかにし、野生型の生成物より高い活性を持つ非天然型化合物を取得した。本研究で構築した *A. oryzae* ステロイド抗生物質生産系を元に、天然物を超える活性を持つ抗生物質を迅速簡便に生合成するシステムが構築されることで、創薬研究に大きく貢献することが期待される。また、多様な薬用活性を持つガノデリン酸 A の酸化を行う酸化酵素を見出し、これによって活性ガノデリン酸の生産のための基盤を構築した。本研究を行うにあたり、富山大学和漢医薬学総合研究所より助成を頂きまして、大変感謝しております。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。