

論文の内容の要旨

論文題目 糸状菌由来天然物の構造複雑化を担う分子基盤の解明

氏 名 松田 侑大

【背景・目的】

糸状菌の産生するメロテルペノイド化合物は多様かつ種々の生物活性を有する分子群であり、臨床応用された化合物や有望な創薬リード化合物も多数知られている。なかでも、3,5-dimethylorsellinic acid (DMOA) に由来する一連の化合物は、とりわけ構造多様性に富むのみならず、非常に特異な分子構造を有するものが少なくない。図1に示す化合物群は、いずれも共通前駆体である DMOA およびファルネシル二リン酸に由来するが、テルペノイド部位の環化様式や閉環後の種々の修飾反応の多様性によって、これら化合物群の構造多様性が生み出される。テルペノイド部位の多様性を生み出すテルペン環化酵素については、すでに *terretonin* ならびに *austinol* 生合成に関わる酵素が同定、機能解析されているが、その他の DMOA 由来メロテルペノイド化合物の生合成に関わるテルペン環化酵素は知られていない。その他 DMOA 由来メロテルペノイドの複雑かつ特異な構造を生み出す酵素群も、そのほとんどが未同定である。

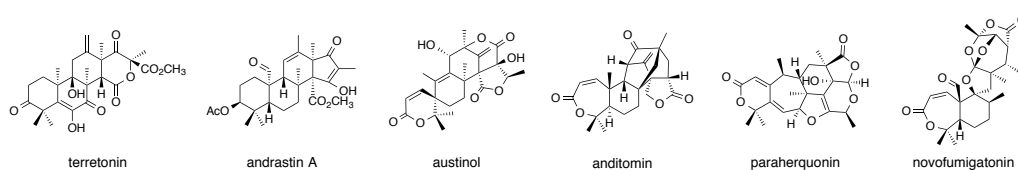


図1 代表的な DMOA 由来メロテルペノイド化合物

本研究では、DMOA 由来メロテルペノイドの構造多様性を生み出す酵素群についてさらなる知見を得るべく、新たな閉環様式を有する環化酵素に加え、閉環後の修飾反応に関わる酵素群の探索ならびに機能解析を行うこととした。

【結果・考察】

1. Andrastin A の生合成研究

Andrastin A-D (1-4) は、抗腫瘍活性を示す化合物群であり、これまでに化学合成も試みられているが、現在のところ全合成の報告例はない。したがって、andrastin 類の生合成経路の解明や、異種発現系による醗酵生産は今後の創薬研究に寄与することが期待される。

Andrastin A の生産が報告されている糸状菌種のうち、ゲノム情報が公開されている *Penicillium chrysogenum* のゲノムデータベース中に生合成遺伝子群を探索した。その結果、11 遺伝子からなる推定生合成遺伝子クラスター (*adr* クラスター) を見出した。まず、推定環化酵素 AdrI の機能解析を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* を用いて行ったところ、AdrI によって新たな閉環産物 andrastin E (7) が生じることが判明した (図 2)。

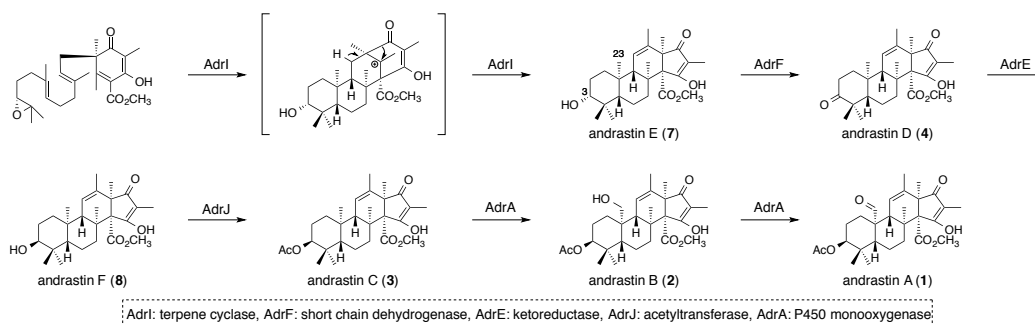


図 2 Andrastin A の生合成経路

続いて、1 に至る全生合成経路を明らかにすべく、*adr* クラスターの情報ならびに既知の類縁体 andrastin B-D の構造をもとに 1 の生合成経路を推定し、AdrI により合成された andrastin E (7) から 1 に至る生合成経路には 4 つの修飾酵素 (AdrA、AdrE、AdrF、AdrJ) が関与するものと予想した (図 2)。この経路を証明すべく、4 つの酵素を順次異種発現させた *A. oryzae* に基質となる 7 を投与し、その生成物を分析した。その結果、AdrF 単独発現株では 7 の 3 位の水酸基がケトンへと酸化された andrastin D (4) の生成が確認され、AdrF が 3 位のアルコール脱水素酵素として機能することが判明した。次いで、AdrF、AdrE 共発現株では 7 の 3 位エピマーである andrastin F (8) を検出した。したがって、AdrE は 4 の 3 位のケトン還元し、3β の水酸基を与える酵素である。さらに、この系に AdrJ を共発現させると、8 のアセチル化体 andrastin C (3) が生成したことから、AdrJ は 3β-アルコールに対するアセチル基転移酵素であることが明らかとなった。最後に、4 つの修飾酵素を発現する系からは、1 および andrastin B (2) の 2 つの生成物が得られた。よって、AdrA は 3 の 23 位のメチル基に対する二段階の酸化反応を触媒する酵素であることが判明した。以上のように、1 に至る全生合成経路を明らかにするとともに、1 の異種発現系における生産に成功した (図 2)。

2. Austinol のスピロラクトン形成機構の解明

Austinol (11) 生合成においては、preaustinoid A3 (17) が 5 つの酵素群により 11 へと変換されることが遺伝子破壊実験より示唆されているが、protoaustinoid A (12) から 17 に至る生合成

経路については不明であった。特にスピロ環形成反応を担う酵素には興味を持たれる。遺伝子破壊実験から **11** の生合成においては AusB、AusC、AusE の 3 つの酸化酵素が生合成に関与すること、また、*ausB* 破壊株において **12** が蓄積することが判明しているが、これら酵素の触媒する反応は不明であった。**17** の生合成には多段階の酸化反応が要求されることから、これら 3 つの酸化酵素が本生合成に関与していると予想し、その機能解析を行うべく *A. oryzae* にて異種発現系を構築した。その結果、AusB、AusC、AusE 共発現株が **12** を **17** ならびに preaustinoid A2 (**16**) へと変換することを見出した。さらに詳細な分析の結果、AusB 単独発現株では **12** の 5'位水酸化体 berkeleyone A (**13**) が、AusB、AusE 共発現株からは、preaustinoid A (**14**)、5-hydroxyberkeleyone A (**18**)、preaustinoid C (**19**)、および、スピロ環を有する austinoid C (**20**) が得られることが判明した。本結果より、AusC が Baeyer-Villiger 酸化を担う酵素であることに加え、AusE が多段階の酸化反応を触媒し、スピロ環形成を担う酵素であることが示唆された。さらに詳細に AusE の機能を明らかにすべく、*in vitro* の試験を行ったところ、AusE が **13** を **14**、**18**、**19**、**20** へと変換することが判明した。このように、スピロ環形成に至る一連の酸化反応が単独の酵素により触媒されることは興味深い。さらに、AusE はラクトン環を有する **16** も基質として受容し、スピロ化合物 **17** を与えたことから、AusC が **14**、**19**、**20** のうちいずれの化合物を基質として用いるのかについて疑問が生じた。AusC による Baeyer-Villiger 酸化のタイミングを決定すべく、AusC、AusE 共発現株に **13**、**14**、**19**、**20** の 4 つの化合物を投与したところ、**13** および **14** のみが **17** へと変換された。したがって、AusC は **14** を基質として preaustinoid A1 (**15**) を与える酵素であり、AusE がさらに **15** を **16** へと酸化することが示唆される。以上の結果を踏まえ、**17** に至る全生合成経路を提唱した (図 3)。

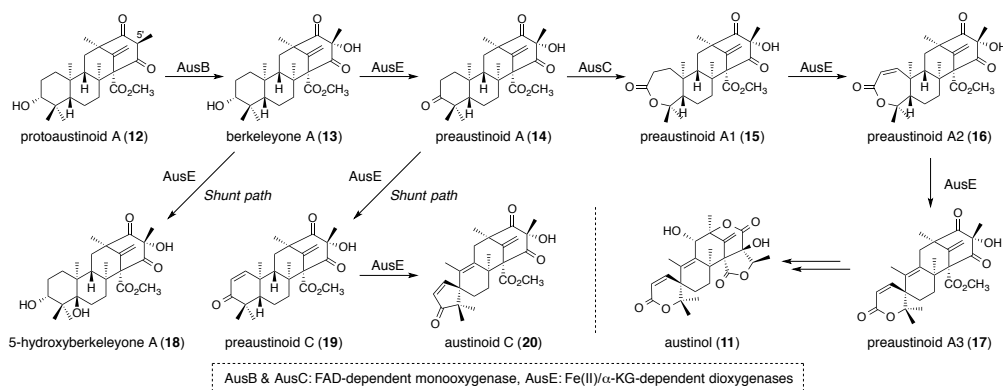


図 3 Austinol の生合成経路

3. Anditomin の生合成研究

Anditomin (**21**) ならびに andilesin A-C (**22-24**) は、特徴的な分子内架橋構造を有する化合物であり、その生成機構に興味を持たれたため anditomin 生合成遺伝子の探索ならびに生合成の全容解明を目指した。まず、anditomin 生産菌のドラフトゲノムシーケンス解析により 13 遺伝子からなる推定生合成遺伝子クラスター (*and* クラスター) を見出した。本クラスターを精査したところ、5 つの遺伝子 (*andM*, *K*, *D*, *E*, *B*) が生合成の初期段階に関与するものと予想された (図 4)。

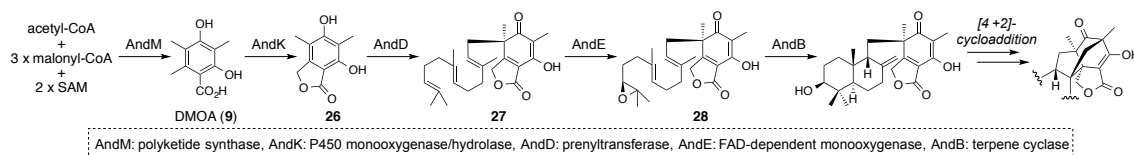


図4 予想された anditomin 生合成の初期段階

予想生合成経路を実証すべく、これら5つの遺伝子を異種糸状菌 *A. oryzae* にて発現させたところ、導入遺伝子特異的に順次、DMOA (9)、26、27 ならびに 28 のエポキシド加水分解体が得られたが、5 遺伝子導入時特異的に生成した化合物 (29) は、当初の予想に反し、五環性の分子骨格を有していた (図5)。29 が anditomin 生合成の中間体であるか否かを検討するとともに、anditomin 生合成の全容を明らかにすべく、修飾酵素遺伝子群の機能解析を行った。29 以降の生合成経路を予測することは困難であったため、種々の組み合わせの修飾酵素発現系を構築し、得られた形質転換体に 29 を投与後、その代謝物を分析することで、各修飾酵素の機能ならびに生合成経路を推定した (図5)。各生合成中間体の単離、構造決定にあたっては、化合物 29 の合成に関わる5つの遺伝子も合わせて発現する系 (6~11 遺伝子発現系) を順次構築した。その結果、andilesin C (24) に至るまでの生合成経路の再構築ならびに各中間体の単離、構造決定に成功したものの、最終産物である 21 の異種生産系を構築することはできなかった。そこで、生合成の最終段階を担うジオキシゲナーゼ AndF については、精製酵素を用いた *in vitro* の試験により、その機能を証明した。以上の結果、anditomin に至る全生合成の解明に成功した (図5)。

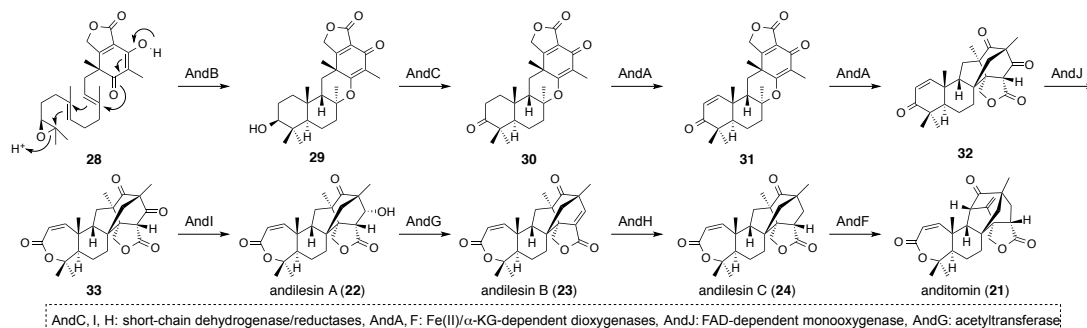


図5 Anditomin の生合成後期段階

【総括】

本研究では糸状菌の産生する DMOA 由来メロテルペノイドに着目し、生合成研究を展開した。その結果、andrastin A、austinol、anditomin の三つの化合物の全生合成経路を解明するとともに、その生合成に関与する興味深い酵素の機能解析に成功した。自然界の合成戦略はいまだに我々の想像を凌駕することも少なくはなく、引き続き特異な構造を有する化合物の生合成経路を明らかにしていくことで、さらに興味深い反応が発見されるものと期待される。今後は、引き続き新奇な反応を触媒する酵素を探索するとともに、人工的な代謝経路の創出などによる新たな創薬リードの獲得を目指したい。