〔別紙２〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名　松田 侑大

本学位論文において松田は、糸状菌の産生するメロテルペノイド化合物に着目し、その生合成研究を行った。糸状菌メロテルペノイドは多様かつ種々の生物活性を有する分子群であり、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。それゆえ、すでにこれら分子群に対する生合成研究がなされてきているが、その生合成分子基盤は十分に理解されているとは言いがたい。本研究において松田は、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、種々のメロテルペノイド化合物の生合成酵素の探索ならびに機能解析を行い、andrastin A（第 2 章）、austinol（第 3 章）、anditomin（第 4 章）の生合成研究を報告している。

第 2 章では、抗腫瘍活性物質 andrastin A（**1**）生合成の全容を明らかにすべく、まず **1** 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。次いで、推定環化酵素 AdrI の機能解析を異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* を用いて行い、AdrI によって四環性中間体 andrastin E（**7**）が生じることを明らかにした。さらに、**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 **7** から **1** に至る生合成経路には 4 つの修飾酵素（AdrA, E, F, J）が関与するものと予想した。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、予想された全ての生合成中間体ならびに最終産物 **1** の単離に成功し、**1** に至る全生合成経路を明らかにした（図 1）。

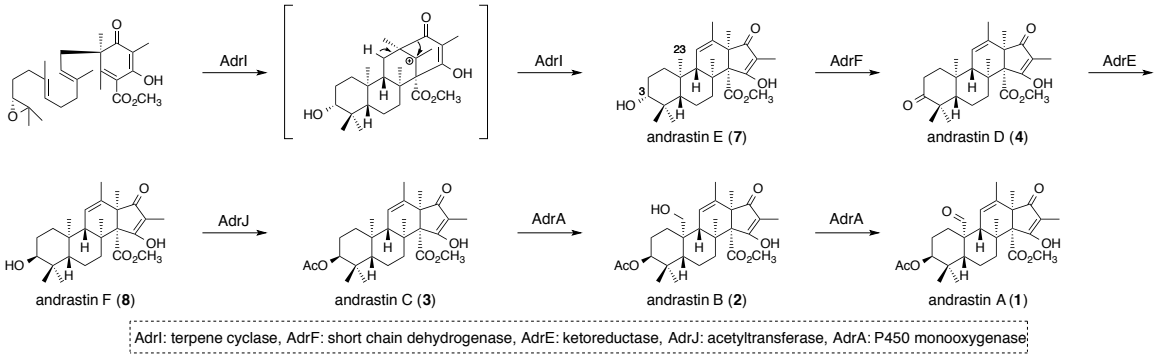

図 1　Andrastin A の生合成経路

第 3 章では、austinol（**11**）生合成に関わる 3 つの酸化酵素の機能解析を行った。Austinol の生合成は遺伝子破壊実験よりその大部分が明らかにされているが、protoaustinoid A（**12**）から preaustinoid A3（**17**）に至る生合成経路については不明であった。特に、**17** は特異なスピロ環を有しており、その形成反応を担う酵素には興味が持たれた。遺伝子破壊実験の結果に加え、**17** の生合成には多段階の酸化反応が要求されることを踏まえ、**11** の生合成においては機能未知の 3 つの酸化酵素（AusB, C, E）が生合成に関与すると予想し、その機能解析を *A. oryzae* を用いて実施した。その結果、AusB、AusC、AusE が全て存在する条件下において、**12** が **17** へと変換されることを見出した。さらに詳細な分析を行い、**12** から **17** に至る全生合成経路を解明するとともに、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を証明した（図 2）。

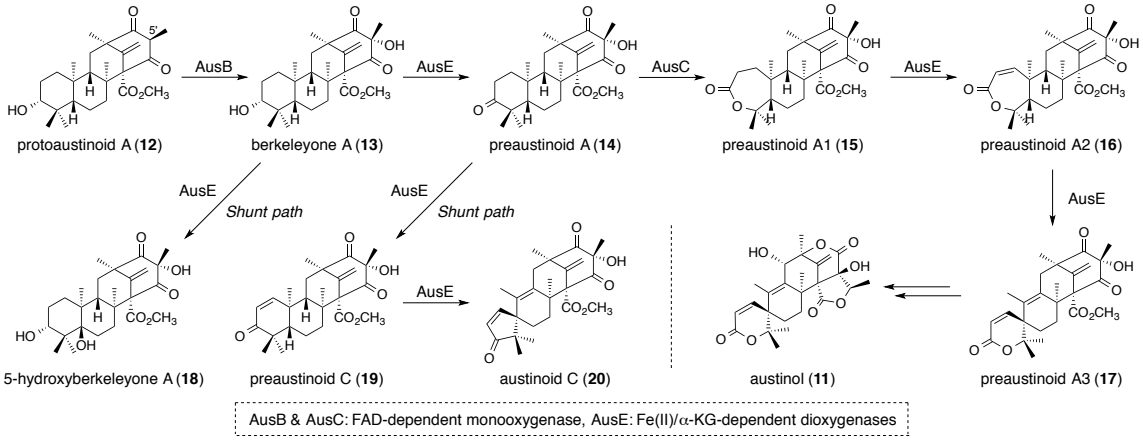

図 2　Austinol の生合成経路

第 4 章では、特異な分子内架橋構造を有する anditomin（**21**）の生合成遺伝子の同定ならびに機能解析を行い、その生合成の全容を明らかにしている。まず、anditomin 生産菌のドラフトゲノムシーケンス解析を行い、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。本クラスターのコードする 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ことから（図 3）、これら 5 つの遺伝子を異種糸状菌 *A. oryzae* にて発現させることで機能解析を実施した。その結果、5 遺伝子導入時特異的に生成した化合物（**29**）が、当初の予想に反し、五環性の分子骨格を有することを見出した。続いて、修飾酵素群の機能解析を行い、**29** が 7 つの酵素群（AndC, A, J, I, G, H, F）により最終産物である **21** へと変換されることを明らかにするとともに、AndA と命名されたジオキシゲナーゼが特異な分子内架橋構造の形成を担うことを証明している（図 4）。また本研究の過程で、**21** の直接の前駆体である andilesin C（**24**）の生合成に関わる 11 個の遺伝子を *A. oryzae* に導入し、その生合成の再構築を異種宿主で行うことにも成功している。

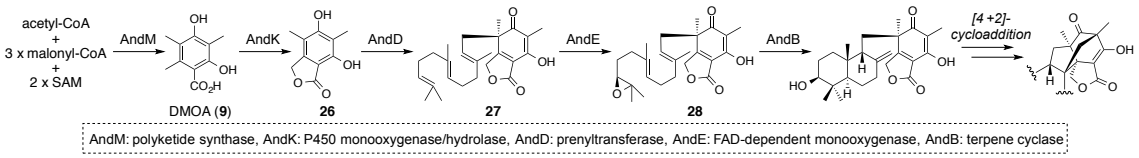

図 3　予想された anditomin 生合成の初期段階

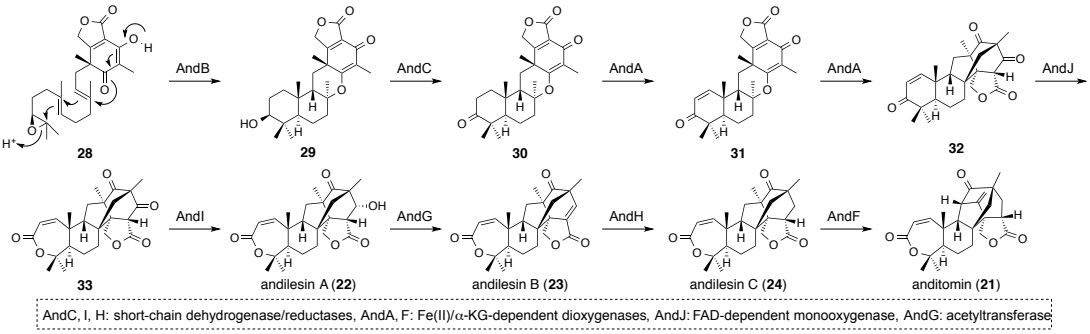

図 4　Anditomin の生合成後期段階

本研究において松田は、糸状菌の産生する DMOA 由来メロテルペノイドの生合成研究を行い、andrastin A、austinol、anditomin 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。本論文において用いられた研究手法は、糸状菌由来天然物の生合成研究に広く適用可能である。さらに、種々の生合成経路に関する知見が集積しつつあることから、今後は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などにも応用が期待される。以上、本研究の成果は、天然物の生合成研究に大きく寄与するものであり、今後の天然物化学の発展に貢献すると考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。