

審査の結果の要旨

氏名 篠原 靖智

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な発酵食品の生産に広く利用される醸造用微生物である。本菌が生産する二次代謝産物およびその生産制御メカニズムに関する知見を得ることは、醸造における安全性の向上に寄与すると共に、新規有用生物活性物質および生合成酵素の同定にも繋がる可能性が期待される。これらのことから、本論文では、一部の *A. oryzae* が生産することが知られているマイコトキシン cyclopiazonic acid (CPA) の生合成遺伝子クラスターの解析および、*A. oryzae* における二次代謝産物生合成制御に関与する遺伝子の探索を行ったものである。さらに、*A. oryzae* が生産する astellolides と呼ばれるセスキテルペンラクトンのアリール酸エステル化合物の生合成遺伝子クラスターの同定およびその生合成経路の解明も行っている。本論文は序論、および4章からなる本論と総括によって構成されている。

第1章では、CPA 産生菌である *A. oryzae* NBRC4177 株を用い、CPA 生合成遺伝子クラスターの網羅的な破壊株の解析、並びに近縁種である *Aspergillus tamarii* の同クラスターの解析から、*Aspergillus* 属の共通祖先の CPA 生合成遺伝子クラスターには、CPA の生合成に関与する3遺伝子(*cpaA*、*cpaD*、*cpaO*)とともに、その修飾に関与する2つの遺伝子(*cpaH*、*cpaM*)が存在し、同クラスターは本来 speradine A を最終生合成産物としていたことを明らかにした。さらに、多くの *A. oryzae* では、*cpaM* が不活化されており、生合成中間体の中で毒性の最も低い化合物である 2-oxoCPA を最終産物とすることも明らかにしている。

第2章では、*A. oryzae* の転写因子等の破壊株ライブラリーを用いた代謝物プロファイルの解析から、CclA および SppA と呼ばれるヒストン修飾に関与する因子が *A. oryzae* において二次代謝産物の生産制御に関与すること、並びに、その制御下にある二次代謝産物の一つが殺寄生虫剤として知られる astellolide であり、astellolide 誘導体の一つ 14-deacetyl astellolide B が細胞増殖抑制活性を有することを示した。

第3章では、第2章で見出した astellolides 高生産株を用いた解析から、その生合成遺伝子クラスターの同定を試み、*astA* から *astK* と命名した11遺伝子からなる astellolide 生合

成遺伝子クラスターを明らかにした。また、NRPS をコードすると予測される *astA* の破壊株で蓄積が見られた化合物を、セスキテルペンラクトンの一種 *confertifolin* の 6 位、14 位、15 位が水酸化された新規誘導体(*trihydroxy confertifolin*)と同定している。

第 4 章では、*astellolides* の基本骨格であるドリマン型セスキテルペンの環化酵素の同定を行っている。*haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase* とアノテーションされた *AstC* は、テルペン環化酵素が保持する機能ドメインを有していたことから、同酵素が環化酵素ではないかと推測し、組換え酵素を用いた機能解析を行った。その結果、*AstC* は、脱リン酸化を伴わずに FPP を環化する新奇セスキテルペン環化酵素であり、*drimanyl pyrophosphate* の生合成に関与することを発見した。さらに、この *drimanyl pyrophosphate* の脱リン酸化には、*AstI* および *AstK* の 2 つの酵素が関与し、*drimanyl pyrophosphate* が段階的に脱リン酸化され *drim-8-ene-11-ol* が生合成されることを明らかにしている。

また、第 3 章において NRPS でありながらエステル結合を触媒する事が示唆されていた *AstA* についても組換え酵素を用いた機能解析を行い、*AstA* が推測通りにアリアル酸とセスキテルペンラクトンのエステル結合を触媒する活性を有することも明らかにしている。

本論文は、醸造用微生物である *A. oryzae* では CPA 生合成における遺伝的セーフガードとして、弱毒化した CPA を生産することを明らかにし、改めて *A. oryzae* の安全性を示した。また、*A. oryzae* の遺伝子破壊株ライブラリーにおける二次代謝プロファイルの解析から、ヒストン修飾を介して二次代謝産物生産を制御する因子を見出し、その制御下にある *astellolides* の生合成遺伝子クラスターの解析から新奇セスキテルペン生合成経路の存在を明らかにしている。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。