

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 Discovery and Biosynthetic Investigation of Fungal Secondary Metabolites (糸状菌由来二次代謝産物の探索と生合成研究)

氏名 全 智揚

**【背景・目的】** 糸状菌は、人類初の抗生物質 penicillin G やコレステロール低下剤 lovastatin などに代表される多様な生物活性天然物の生産者であり、創薬において重要な役割を演じてきた。しかし、近年、新たな医薬品開発へのデマンドが増える一方、新規天然活性物質を見いだすことは年々困難になってきている。したがって、効率的な新規天然物探索を可能にする方法論の確立は、天然物研究における喫緊の課題である。

一方、近年のゲノムシーケンシング技術の発展に伴い、多数の生物種のゲノム情報が公開されるようになったことで、天然物の生合成遺伝子群が容易に見いだされるようになった。加えて、糸状菌を始めとする微生物のゲノム中には、これまでに単離された天然物の数から予想されるよりも多くの天然物生合成関連遺伝子を有することが知られるようになってきている。すなわち、ゲノム情報を基に研究対象となり得る生合成遺伝子群を選定する「ゲノムマイニング法」は、既知天然物の生合成研究を加速させるのみならず、新規天然物の探索にも大いに貢献するものと期待される。本研究の目的は、ゲノムマイニング法を用いて、新規生体触媒、天然物の発掘、同定を行うことである。

**【方法】** ゲノムマイニング法により見いだされた天然物生合成遺伝子の機能解析においては、糸状菌 *Aspergillus oryzae* を用いた異種発現法を主たる手段として用いた。*A. oryzae* を宿主として用いる利点としては、(1) 形質転換法が確立されていること、(2) 異種糸状菌由来の多数の遺伝子を導入できること、(3) 自身は二次代謝産物をほとんど生産せず、外来遺伝子由来の代謝産物の検出、単離が容易であること、(4) 一般的に代謝産物を高収量で得られること、の4点が挙げられる。本法を用いることで、通常休眠状態にある生合成遺伝子の機能解析や天然で微量しか産生されない化合物の大量調製も可能となる。

#### 【結果】

##### [1] Ascochlorin の生合成研究

Ascochlorin (図1) は、多種の糸状菌から単離されるメロテルペノイドであり、多様な生理活性を持ち、医薬品資源としての利用が期待される<sup>1)</sup>。また、シクロヘキサノン環を含むセスキテルペノイド部位ならびに

ハロゲン化された芳香環から構成される特徴的な化学構造を持つため、その生合成にも興味を持たれる。そこで、本研究では、ascochlorin 合成系を *A. oryzae* にて再構成することで、その生合成の全容解明を目指した。

Ascochlorin の生合成経路解明のため、その生産菌である *Fusarium* sp. NBRC100844 に対し、ドラフトゲノムシーケンシング解析を実施したところ、当該天然物の生合成を担う遺伝子クラスターを見出し、これを *asc* クラスターと命

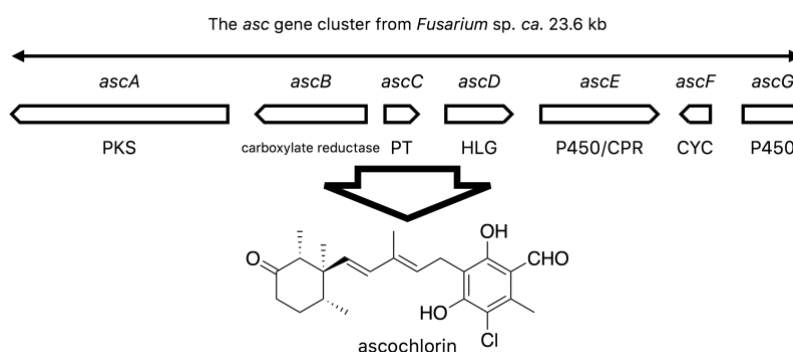


図1. Ascochlorin の生合成遺伝子クラスター

名した (図 1)。

*A. oryzae* による異種発現系を構築し、それぞれ蓄積する生成物を構造決定することで、各生合成酵素の機能解析を行い、ascochlorin の生合成の全容解明に成功した (図 2)。Ascochlorin の前駆体である LL-Z1272α は、まずシトクロム P450 オキシゲナーゼ/シトクロム P450 リダクターゼ (P450/CPR) AscE によりエポキシ化され、それから膜貫通型テルペン環化酵素 (CYC) AscF により環化され、さらにシトクロム P450 オキシゲナーゼ (P450) AscG により二重結合が生成され、最後に FAD 結合型ハロゲナーゼ (P450) AscD によりハロゲン化され、ascochlorin に変換された。

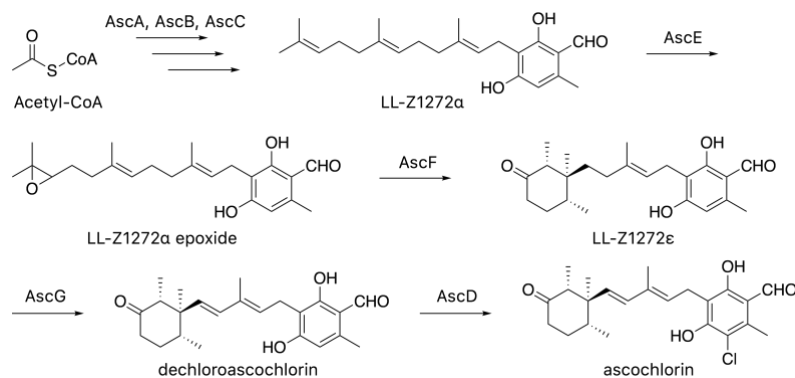


図 2. Ascochlorin の生合成反応

また、テルペン環化酵素 AscF は、今まで同定された多環性メロテルペノイドを生成する環化酵素と異なり、ascochlorin 特有な単環性産物を生成した。その反応機序を図 3 のように推定した。すなわち、末端エポキシドのプロトン化が起点となり、環化反応が進行し、生じたカチオン中間体において脱プロトン、ヒドリド、メチル基の転位が起きることによって、特徴的なシクロヘキサノン環が生成する。この AscF 特有の単環性骨格形成の制御は極めて興味深い。さらに、ascochlorin 生産能を有する *A. oryzae* 形質転換体を臭化カリウム含有最小培地で培養し、臭素化された新規 ascochlorin 類縁体を獲得することに成功した。ゆえに、ハロゲナーゼ AscD は塩素だけでなく、臭素も利用し、ハロゲン化反応を触媒することが示唆された。

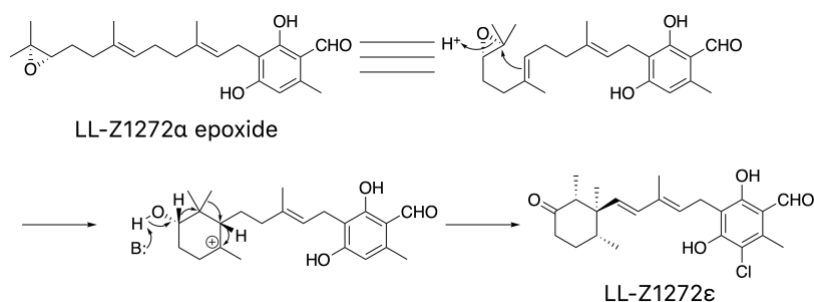


図 3. AscF の推定触媒メカニズム

## [2] 機能未知生合成遺伝子クラスターの解析による新規 andrastin A 類縁体の創出

当研究室は *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1244 株のゲノムデータベース中に Andrastin A (図 4) の生合成遺伝子クラスター (*adr* クラスター) を見出し、当該化合物の生合成の全容解明に成功している<sup>2</sup>。他方、当研究室でドラフトゲノムシーケンス解析を実施した糸状菌 *Emericella varicolor* のゲノム中に *adr* クラスターと類似した遺伝子クラスターを見出された。本遺伝子クラスターには、andrastin A 生合成に関わると推定される遺伝子

群に加えて、*adr* クラスター中の遺伝子とは類似性の低い遺伝子が3つ存在しており、これらがコードする酵素群によって andrastin A がさらに修飾された化合物へと変換されることが期待された。

そこで、これら3遺伝子の機能解析を行うべく、それぞれ andrastin A 生合成遺伝子群とともに糸状菌 *A. oryzae* において共発現を行い、その代謝産物を分析したところ、これら3遺伝子産物のうち、Ctr-P450 が andrastin A を既知天然物 citreohybridonol (図4) へと変換することが判明した。Ctr-P450 の酸化反応は多段階的に以下のように触媒されると予想され、その基質認識、反応制御機構は非常に興味深い。

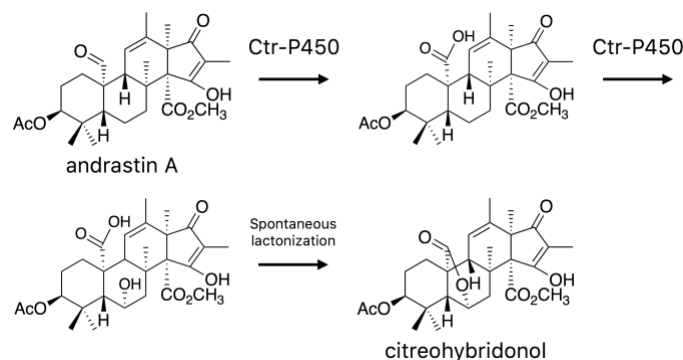


図4. Ctr-P450 の触媒反応

さらに、citreohybridonol 生合成の詳細について検討したところ、生合成過程における副生成物として、4つの新規化合物が単離された(図5)<sup>3</sup>。

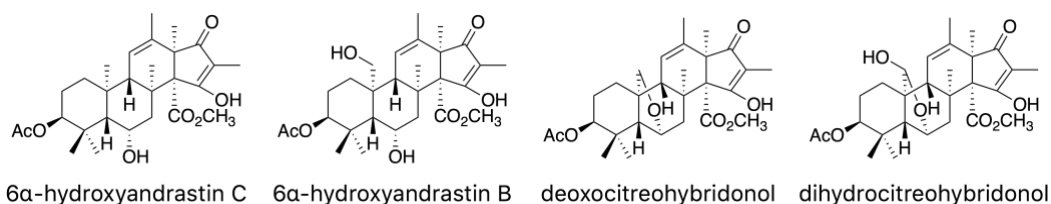


図5. Andrastin A の新規類縁体

**【総括・展望】** 本研究では、ascochlorin の生合成遺伝子クラスターを見出し、その生合成過程における全反応の解明を達成し、当該天然物生合成の全容解明に成功した。また、*E. varicolor* でゲノムマイニングを行い、機能未知生合成遺伝子クラスターを見出した。この遺伝子クラスターの機能解析を行った結果、本クラスターの最終産物が citreohybridonol であることが明らかになるとともに、4つの新規類縁体の単離に成功した。以上のように、本研究において私は、ゲノムマイニング法を用いて、既知天然物の生合成研究と新規天然物の探索を行い、この手法が天然物研究における強力なツールであることを実証した。

しかしながら、今回用いた異種発現法にも、種々の問題点が残されている。今後は、異種発現法に加え、遺伝子編集技術を利用することで、従来の異種発現では解析しにくい休眠遺伝子を強制発現し、その機能を明らかにしたいと考える。ひいては、遺伝子異種発現、遺伝子破壊、遺伝子強制発現、直接変異導入などの手法を総合的に利用することで、さらに効率的な新規天然物探索法の確立や人工代謝経路の創出などを行う予定である。

## 【文献】

- 1, Tamura, G.; Suzuki, S.; Takatsuki, A.; Ando, K.; Arima, K. *The Journal of Antibiotics* **1968**, *21*, 539.
- 2, Matsuda, Y.; Awakawa, T.; Abe, I. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8199.
- 3, Matsuda, Y.\*; Quan, Z.\*; Mitsuhashi, T.; Li, C.; Abe, I. *Organic Letters* **2016**, *18*, 296. (\*equall contribution)