

論文の内容の要旨

論文題目 「糸状菌由来メロテルペノイド化合物 の生合成研究」

氏 名 伊 藤 崇 敬

【序論】

メロテルペノイド化合物は、赤で示すポリケタイドと青で示すテルペノイドの構造を併せ持つ特異なハイブリッド型化合物である (Fig. 1)。 *Aspergillus fumigatus* より単離され、ACAT 阻害活性を有する pyripyropene や *A. terreus* より単離され、選択的アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を有する territrem に代表されるように、糸状菌からは多様な構造や生物活性をもつメロテルペノイドが数多く単離されているものの、それらの生合成遺伝子、及び生合成経路の詳細は解明されていない。近年 *Aspergillus* 属を含む糸状菌においてもゲノムプロジェクトが展開され、その大部分のゲノム配列が database で利用可能であることから、pyripyropene および territrem に着目し、その生合成に関与する遺伝子および生合成経路の同定を目的として研究を開始した。これらの化合物はその生物活性から、臨床への応用が期待される重要な化合物である上に、互いの構造がよく似ていることから、比較検討が行いやすいという利点がある。また、本研究では生合成遺伝子発現のホストとして、従来利用されてきた大腸菌や酵母ではなく、異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* を用いた。これまで糸状菌において、複数の生合成遺伝子を共発現させて生合成経路を再構成した例は報告されていないが、生産菌と近縁の生物種を利用することにより、高い物質生産能が期待出来ることから、本研究は糸状菌をホストとした有用物質生産系の構築への応用につながるものと考えられる。

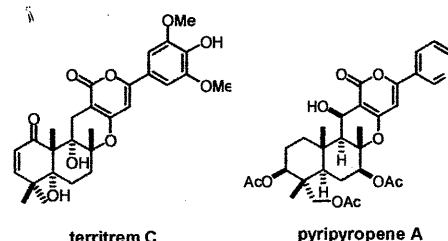


Fig. 1 Structure of territrem C and pyripyropene A

【本論】

1. Territrem 生合成遺伝子クラスターの探索

Territrem および pyripyropene については、その生産株における各種標識化合物の投与実験により、生合成経路が推定されている。一般的に、メロテルペノイド生合成の初期段階において、そ

のポリケタイド部分を合成するポリケタイド合成酵素 (PKS) および、ポリケタイドにプレニル基を縮合するプレニル基転移酵素 (PT) の二種類の酵素が関与するものと予想された。そこで

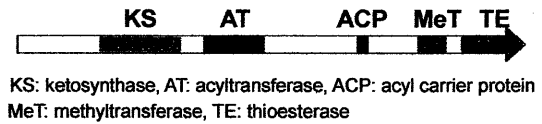


Fig. 2 Domain organization of PksTi

まず、territrem 生合成遺伝子クラスターの同定を目指し、*A. terreus* NIH2624 株ゲノムデータベースにて PKS、PT 両遺伝子を近傍に併せ持つような遺伝子クラスターを検索した結果、14 遺伝子からなる約 36 kb のクラスターが見いだされた。本クラスター中の PKS は、酢酸単位である malonyl-CoA の縮合に最低限必要な KS、AT、ACP の各ドメインに加え、MeT ドメイン、TE ドメインを有する、繰り返し型 type I PKS であり、MeT ドメインによるメチル基の転移が起こるものと予想された (Fig. 2)。しかしながら、territrem 推定生合成中間体の生成にはメチル基転移を必要とせず、本クラスターは別の化合物の生合成に関与していると考えられた。そこで、本遺伝子クラスターと生合成上矛盾のないような化合物の単離例を検索したところ、同じく *A. terreus* の生産する mycotoxin である terretinin が候補として考えられた。クラスター内の各遺伝子産物の推定機能は、既知のテルペノイド環化酵素のホモログが存在していないことを除くと、terretinin の予想生合成経路と矛盾のないものであり、本クラスターを *trt* クラスターと命名した (Fig. 3)。

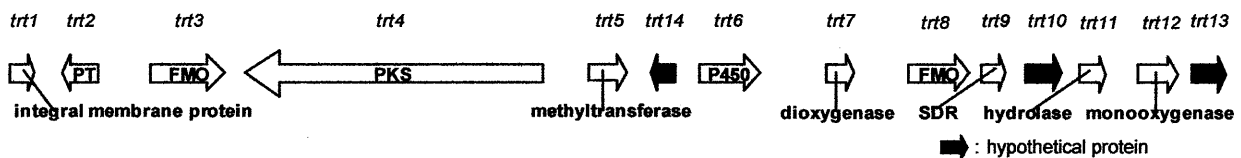


Fig. 3 The *trt* cluster (ca. 36 kb)

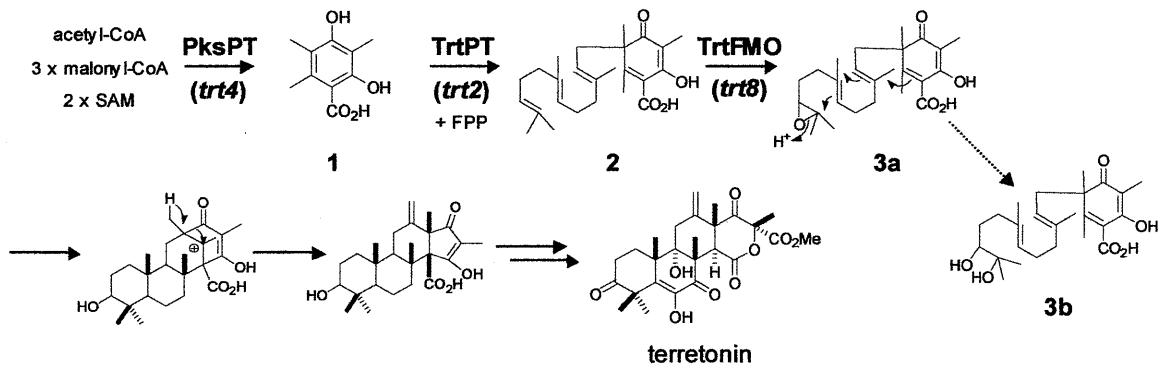


Fig. 4 Biosynthetic pathway of terretinin proposed by this study

2. Terretinin 生合成遺伝子クラスターの同定と機能解析

trt クラスターの terretinin 生合成への関与を確認するため、異種糸状菌 *A. oryzae* をホストとして、*trt4* のコードする PKS の機能解析を行った。*trt4* 遺伝子で、異種糸状菌 *A. oryzae* M-2-3 株を形質転換し、導入遺伝子特異的な生産物を単離、構造解析したところ、**1** の生産が確認された。このことから、本クラスターが terretinin の生合成に関与することが強く示唆された。

次に、Ubiquinone 生合成に関与する PT である UbiA のホモログである PT (Trt2) の機能解析を行った。PKS、PT 遺伝子共発現体を誘導培養後、PT 遺伝子特異的な生産物の分析を行ったところ、**1** にファルネシル基の付加した **2** の生産が確認された。

続いてファルネシル基のエポキシ化に関与する酸化酵素の機能解析を行った。インドールジテ

ルペン paxillin の生合成に関与する PaxM は FAD-dependent monooxygenase (FMO) であり、プレニル基のエポキシ化に関与すると推定されている。そこで、そのホモログである Trt8 の機能を解析するため、PKS、PT、FMO 三遺伝子共発現体を作製し、FMO 遺伝子特異的な生産物の分析を行ったところ、エポキシ体 **3a** 及びその加水分解産物であるジヒドロキシ体 **3b** が得られた。本クラスター中には既知のテルペノイド環化酵素のホモログが存在していないことから、Trt8 による環化産物の生産も期待されたが検出されなかった。これらの結果から FMO は環化を触媒せず、環化酵素は別に存在していることが示唆されたが、修飾酵素が多数存在する *trt* クラスターよりその候補を絞り込むことは困難であった。そこで、より生合成経路が単純であると考えられる pyripyropene A 生合成遺伝子クラスターの探索を行い、環化酵素を同定することにした。

3. Pyripyropene A 生合成遺伝子クラスターの同定と機能解析

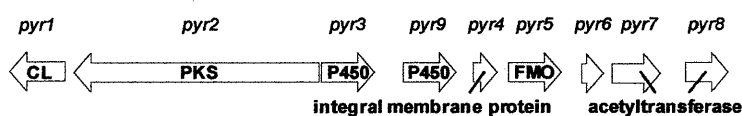


Fig. 5 The *pyr* cluster (ca. 22 kb)

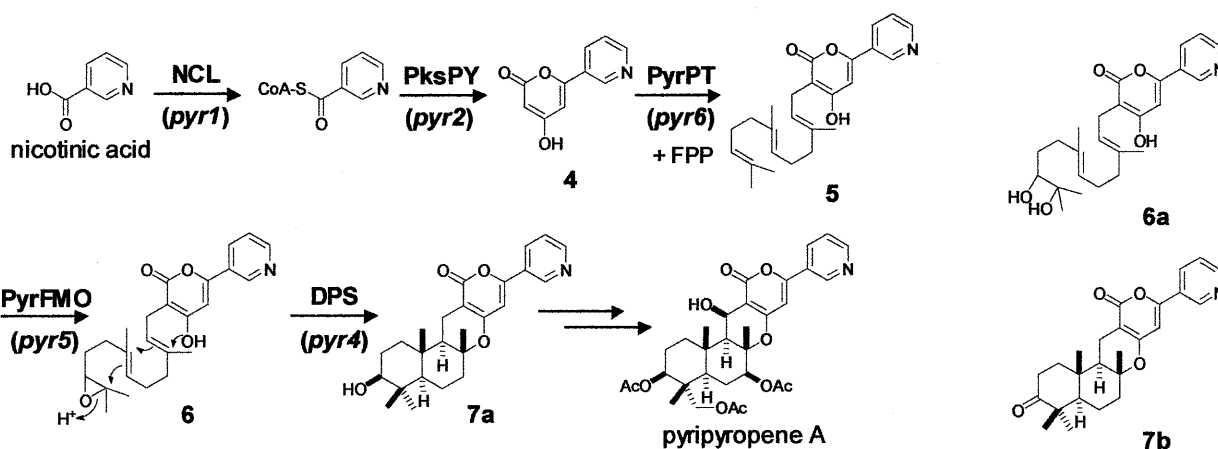


Fig. 6 Biosynthetic pathway of pyripyropene A proposed by this study

Fig. 8 Shunt products

A. fumigatus Af293 株ゲノムデータベースにて、PKS、PT 両遺伝子の共存を指標に遺伝子クラスターを検索した結果、9 遺伝子からなる約 22 kb のクラスターが見出され *pyr* クラスターと命名した (Fig. 5)。本クラスターの各遺伝子産物は、CoA ligase (CL)、PKS、PT 及び FMO などが存在し、terretonin 同様既知のテルペノイド環化酵素のホモログが存在しないことを除くと pyripyropene A の予想生合成経路とほぼ一致していた (Fig. 6)。

本クラスター内の PKS (Pyr2) は、KS、AT、ACP ドメインのみからなる繰り返し型 type I PKS であり (Fig. 7)、

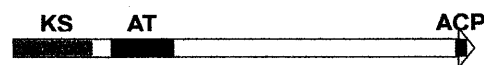


Fig. 7 Domain organization of Pyr2 (2444 aa)

ピロン体 **4** が 2 分子の malonyl-CoA の縮合のみから生じることを考えると矛盾のないものであった。そこで、本 PKS の機能を確認するため、PKS、CL (Pyr1) 遺伝子共発現体を構築した。培地にニコチン酸を投与し、導入遺伝子特異的な生産物の分析を行ったところ、ピロン体 **4**

の生産が確認された。この結果から本クラスターが pyripyropene A の生合成に関わることが強く示唆された。

次に、PT (Pyr6)の機能を解析するため、CL、PKS、PT 三遺伝子共発現体を作製し、培地にニコチン酸を投与して *pyr6* 特異的な生産物の分析を行ったところ、4 にファルネシル基が付加した 5 の生産が確認された。

続いて、FMO (Pyr5)の機能を解析するため、PT、FMO 共発現体を作製し、培地に PT の基質となる 4 を投与して *pyr5* 特異的な生産物の分析を行ったところ、エポキシ体 6 は検出出来ずジヒドロキシ体 6a が得られた (Fig. 8)。この結果から、エポキシ体は生成しているものの、CYC 非存在下ではホスト由来の酵素などにより、速やかに加水分解されるものと予想された。

両化合物どちらにおいても FMO による環化産物は検出されなかったことから、CYC は別に存在することが示唆された。そこで、両クラスターに共通して存在している遺伝子を検索したところ、integral membrane protein とアノテーションされている遺伝子 *trt1*、*pyr4* が見出された。本遺伝子のホモログはインドールジテルペンの生合成遺伝子クラスター中にも存在し、paxilline の生合成においては *pyr4* のホモログである *paxB* を含む四遺伝子が、環化産物 paspaline の生合成に必要であるということが実験的に示されていた。しかし、PaxB の機能については基質の輸送に関わる膜タンパク質として推定されているに過ぎなかった。

そこで、Pyr4 の機能を解析するため、PT、FMO、Pyr4 三遺伝子共発現体を構築した。培地に 4 を投与し、*pyr4* 特異的な生産物の分析を行ったところ、環化産物 7a 及びその酸化体である 7b の生産が確認された。また、Pyr4 が単独で CYC として機能することを証明するため、6 を合成し、*pyr4* 導入株の誘導培地中に投与したところ 7a の生産が確認された。さらに *pyr4* 導入株よりマイクロソーム画分を調製し、6 と *in vitro* の反応を行ったところ、環化活性が検出され、Pyr4 がテルペノイドの環化を触媒する新規環化酵素であることが示された。

【総括と今後の展望】

1. 糸状菌をホストとした発現系の構築により、terretonin 及び pyripyropene 生合成遺伝子クラスターの同定に成功した。さらに、糸状菌において複数の生合成遺伝子を順次導入し生合成経路を再構成することに初めて成功し、pyripyropene についてはその基本骨格 7a を作り出すことに成功した。これらの結果は、糸状菌を用いた有用物質生産系の構築への応用につながる大変重要なものである。
2. Trt2 は芳香環にプレニル基を導入するタイプの PT として、1) ベンゼン環置換メチル基の付け根にプレニル基を付加し、四級炭素を構築する、2) ファルネシル基を付加する、という点において極めて特異な PT であり、今後基質特異性を含めた更なる機能解析により、プレニル化された有用化合物の創出が期待される。
3. Pyr1、Pyr2 はニコチン酸をポリケタイド経路へと取り込む新規 CL 及び PKS であり、今後基質認識能の解明により、新たな非天然型ポリケタイドの創出への応用が期待される。
4. Pyr4 はこれまで知られているテルペノイド環化酵素とは全く異なる新規環化酵素であり、その更なる機能解析はメロテルペノイドのみならずインドールジテルペンなど他の糸状菌由来二次代謝産物の生合成研究に大きく寄与するものである。