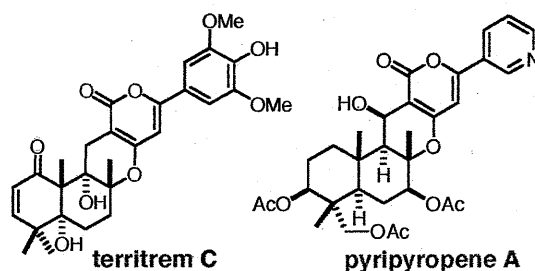


審査の結果の要旨

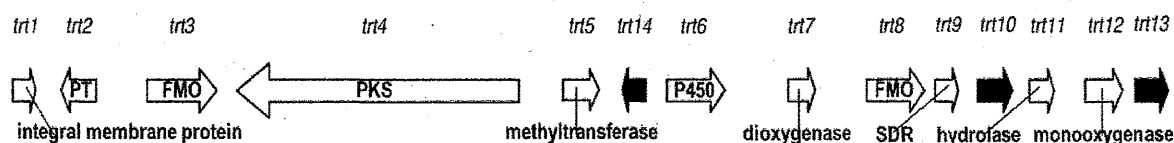
氏名 伊藤 崇 敬

メロテルペノイド化合物は、ポリケタイドとテルペノイドの構造を併せ持つ特異なハイブリッド型天然物である。*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けるゲノムプロジェクトが展開され、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。



1. Terretonin 生合成遺伝子クラスターの同定と機能解析

メロテルペノイド生合成の初期段階においては、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る。そこで 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、14 遺伝子からなる約 36 kb のクラスターを見いだした。本クラスター内の各遺伝子産物の推定機能は、目標とした territrem ではなくマイコトキシンとして知られる terretonin 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. 1)。

Fig. 1. The *trt* cluster (ca. 36 kb)

trt クラスターの terretonin 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 の機能解析を先ず行った。*trt4* 遺伝子による形質転換株が予想生合成中間体 1 を生産したことから、本クラスターが terretonin の生合成に関与することが強く示唆された (Fig. 2)。次いで、ubiquinone 生合成に関与する UbiA のホモログである PT (Trt2) の機能解析を行うため PKS、PT 共発現体を作成したところ、2 を生産したことから、本 PT は 1 にファルネシル基を付加する PT であることが確認された。続いてファルネシル基のエポキシ化に関与する FAD-dependent monooxygenase (FMO) の候補

遺伝子である *Trt8* の機能を解析するため、PKS、PT、FMO 三遺伝子共発現体を作成し、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* クラスター中でその候補を絞り込むことは困難であった。

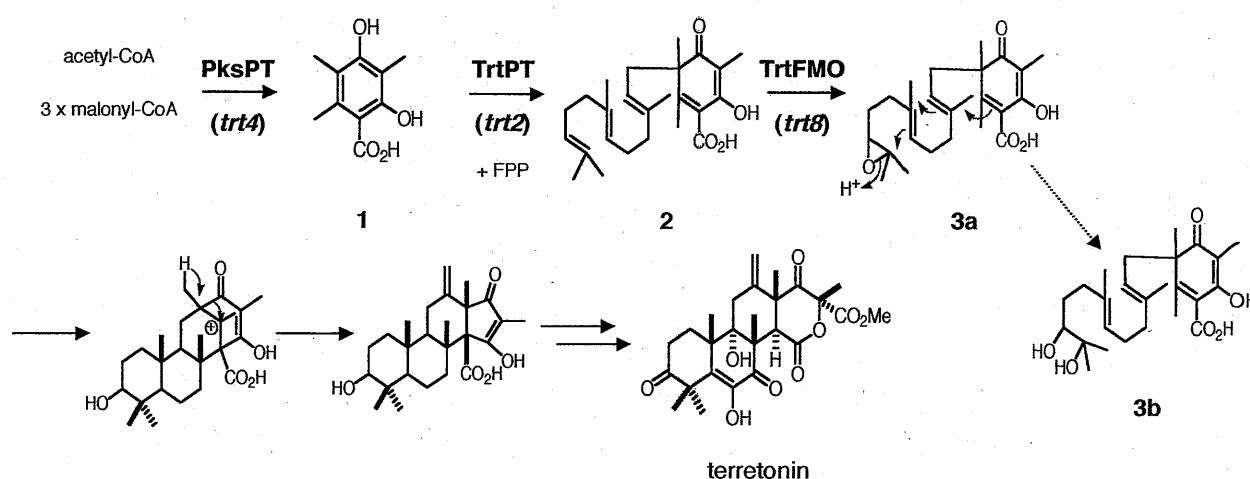


Fig. 2. Biosynthetic pathway of terretonin proposed in this study

3. *Pyripyropene A* 生合成遺伝子クラスターの同定と機能解析

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. 3)。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 クラスターの場合と同様、既知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. 4)。本クラスター内の PKS (*Pyr2*) の機能を解明するため、PKS、CL (*Pyr1*) 遺伝子共発現体を構築し、培地にニコチン酸を投与したところピロン体 **4** の生産が確認され、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。

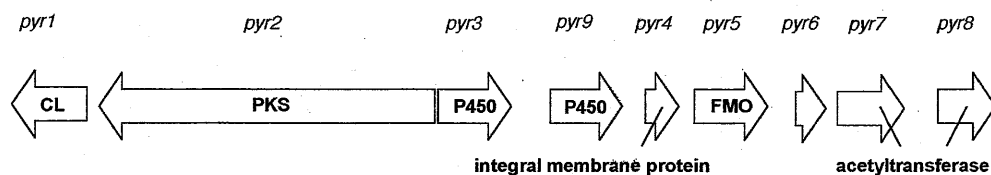


Fig. 3. The *pyr* cluster (ca. 22 kb)

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、PT、FMO 共発現体を作製し、培地に PT の基質となる **4** を投与したところ、ジヒドロキシ体 **6a** が得られた (Fig. 4)。この結果は、エポキシ体は生成しているものの、環化酵素 CYC 非存在下では

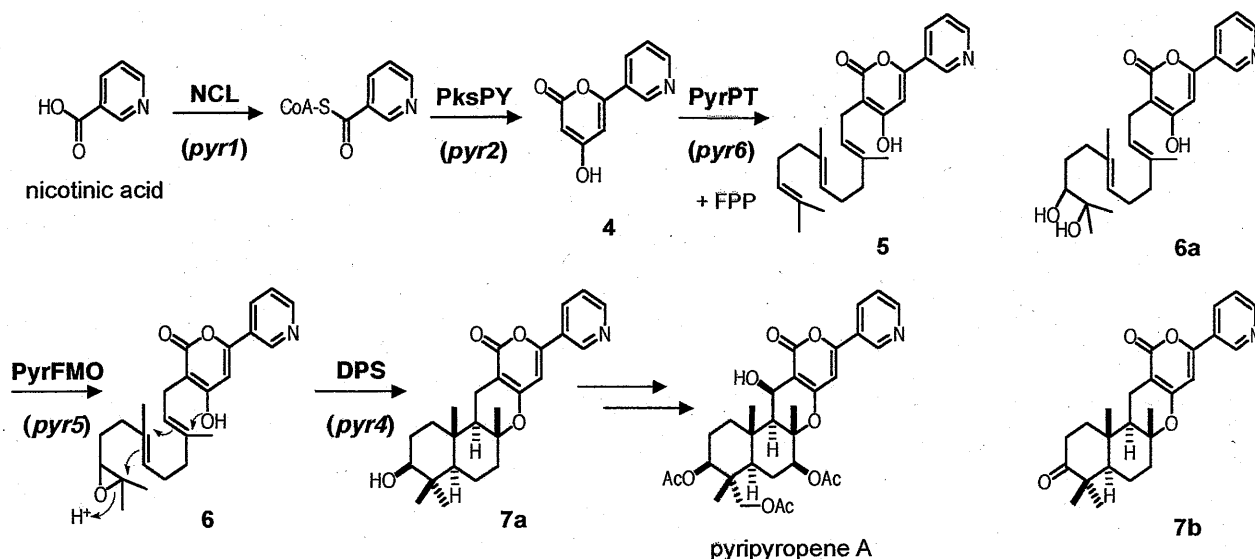


Fig. 4. Biosynthetic pathway of pyripyropene A proposed in this study

ホスト由来の酵素により加水分解されるものと予想した。

CYC 候補として、*trt*、*pyr* 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* を見出した。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、化学的に調製した 6 を *pyr4* 導入株に投与したところ 7a の生産が確認され、さらに *pyr4* 導入株のマイクロソーム画分が 6 の環化活性を示すことを *in vitro* で確認した。Pyr4 はテルペノイドの環化を触媒する新規環化酵素である。

本研究では、糸状菌を宿主とした発現系の構築により、メロテルペノイド生合成クラスターとして *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で、*pyripyropene* 類の基本骨格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構築への応用に直接つながる重要な成果である。また、本研究で見出された *Trt2*、*Pyr1*、*Pyr2*、*Pyr4* の機能は、既知生合成酵素には全くみられない新規なものである。

以上、本研究の成果は二次代謝産物の生合成研究に大きく寄与するものであり、今後の天然物化学に大きく貢献することから、博士（薬学）に値するものと認めた。