HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Prenyltransferases Responsible for Indole Diterpene Biosynthesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	劉, 成偉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第11481号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55396
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Liu_Chengwei_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　氏名　劉 成偉

審査担当者	主査	教授	田口 精一
	副査	教授	及川 英秋
	副査	教授	高木 睦
	副査	教授	大利 徹
	副査	准教授	田島 健次

学 位 論 文 題 名

Study on Prenyltransferases Responsible for Indole Diterpene Biosynthesis
(インドールジテルペンの生合成に関与するプレニル基転移酵素に関する研究)

現在用いられている医薬品の 7 割程度は、糸状菌、放線菌、植物などが生産する天然有機化合物や、その誘導体である。しかし近年、新たな骨格を持つリード化合物を見出す頻度は低くなってきている。したがって、既知の天然物の生合成に関与する酵素を同定し、それらを組み合わせることにより、さらに多様な天然医薬品のリード化合物を創製する手法は有用と考えられる。

糸状菌は放線菌と並ぶ生理活性物質の宝庫であり、既知生理活性物質の主要供給源であることが知られている。また、シーケンス技術の急速な発展に伴い、糸状菌ゲノム中には既知化合物から予想されるよりも遥かに多い数の生合成遺伝子群が存在することも明らかにされつつある。これらの機能解明が行われれば、さらに多様な骨格の創製に結び付けることができると考えられる。

パキシリンに代表されるインドールジテルペンは、糸状菌が生産する代表的なマイコトキシンであり、ポリプレニル鎖の鎖長（炭素数 15 もしくは 20）と環化様式、酸化度などの違いにより構造多様性が創出され、カルシュウム活性型ポタシウムチャネルの阻害活性、抗ウイルス活性、抗昆虫活性、神経毒、アポトーシイス誘導、ACAT 阻害活性など様々な生理活性を示す。

それらの生合成研究は、Scott らによるパキシリン生産菌である糸状菌 Penicillium paxilli を用いた先行研究が報告されていたが、初発反応を触媒しゲラニルゲラニルインドールを生成する PaxC の真の基質や、クラスターに存在しプレニル転移酵素と相同性を有する paxD 遺伝子の機能は未解明であった。また Aspergillus flavus が生産しパキシリン類縁体であるアフラトレムの推定生合成遺伝子クラスターも同定されているが、プレニル転移酵素と相同性を有する atmD 遺伝子の機能解明は行われていなかった。さらにジテルペン配糖体であるフシコクシン生産糸状菌 Phomopsis amygdali のドラフトゲノム中にプレニル基転移酵素様遺伝子 amyD を見出した。そこで本研究では、組換え PaxC、PaxD、AtmD および AmyD と種々のインドールジテルペン関連化合物を基質に用い詳細な解析を行った。

（1）PaxC の機能解析：これまで 2 つのグループがトレーサー実験を行い、PaxC の基質として各々 L-Trp と indole-3-glycerol phosphate (IGP) を示唆する報告をしているが真の基質は定かではない。そこで組換え PaxC 酵素を用いて解析を行った結果、IGP が基質となった。さらに indole も基質になることが解ったため、両基質を用いて kcat/Km 値を求めた結果、IGP に対しては 28.2 mM-1S-1、indole に対しては 3.6 mM-1S-1 を示したことから IGP が真の基質であると推定された。さらに、PaxC は GGDP に加え farnesyl diphosphate を IGP に付加し farnesyl indole を生成する活性も有していた。

（2）PaxD の機能解析：上記パキシリン生合成遺伝子クラスター近傍には、プレニル転移酵素と相同性を有する paxD が存在する。これまで P. paxilli からはパキシリン以上に修飾された化合物が単離されていないことから、paxD が菌体内で発現していない可能性も考えられた。そこで cDNA の

取得を試みた結果、paxC 遺伝子と同様に容易に取得できたことから、paxD も in vivo で機能していると推定された。そこで組換え酵素を用いて機能解析を試みた。パキシリンと DMAPP を基質に用いて検討した結果、パキシリンの 21,22 位が di-プレニル化された化合物が生成した。本化合物は P. paxilli の培養液中にも微量存在したことから、P. paxilli の最終産物はパキシリンではないことも解った。なお、既知のカビ由来プレニル転移酵素は mono-プレニル化する例しか報告が無く、PaxD は di-プレニル化を触媒する初めての例である。

（3）AtmD の機能解析：A. flavus は、パキシリンの類縁体である 20 位がプレニル化されたアフラトレムと 21 位がプレニル化されたβ-アフラトレムを生産し、Scott らにより生合成遺伝子クラスターも同定されている。クラスター内には、プレニル転移酵素と相同性を有する atmD 遺伝子が存在することから、AtmD は 20,21 位のプレニル化すると予想された。そこで組換え酵素を用いて機能解析を試みた。パキシリンと DMAPP を基質に用いて検討した結果、3 つの生成物が認められ、その内 2 つは予想通り 20 位と 21 位が reverse にプレニル化された化合物であった。さらに、パキシリンの生合成中間体であるパスパリンも基質となったが、21 位が normal にプレニル化された生成物と、22 位が normal にプレニル化された生成物が生成した。パキシリンとパスパリンは極めて似た構造を持つにもかかわらず、プレニル化する位置と regular/reverse の選択性が変わる結果となった。本酵素について両基質を用いた場合の kcat/Km 値を測定した結果、パキシリンに対しては 23 mM-1S-1、パスパリンに対しては 0.7 mM-1S-1 と、パキシリンが、より良い基質と推定された。本考察は、これまで A. flavus が normal にプレニル化されたインドールジテルペン類を生産する報告が無い事実からも支持された。

（4）AmyD の機能解析： ジテルペン配糖体であるフシコクシン生産糸状菌 Phomopsis amygdali のドラフトゲノム中にプレニル基転移酵素様遺伝子 amyD を見出した。そこで組換え酵素を用いて機能解析を試みた。パキシリンと DMAPP を基質に用いて検討した結果、パキシリンの 20 と 21 位をレギュラー型でプレニル化することを明らかにした。

以上の結果から、本研究では、インドールジテルペン生合成に関与するプレニル転移酵素は幅広い基質特異性と柔軟なレギュラー型/リバース型選択性を併せ持つことを明らかにした。

これを要するに，著者は，インドールジテルペン生合成についてプレニル基転移酵素の新知見を得たものであり，医薬品のリード化合物の創製に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は，北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。