



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aspergillus oryzae異種発現系を用いた糸状菌由来二次代謝産物の全生合成研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	藤居, 瑠彌
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11921号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59001
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryuya_Fujii_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 藤居 瑠彌

学位論文題名

Aspergillus oryzae 異種発現系を用いた糸状菌由来二次代謝産物の全合成研究

近年、DNA シーケンス技術が急速に進展するとともに、バイオインフォマティクスを駆使した、微生物ゲノム上に存在する天然物合成遺伝子（クラスターとして存在）同定法が開発され、多様な構造と生物活性を有する天然物の酵素合成が可能になりつつある。本学位論文では、単一タンパクの発現で実績のある *Aspergillus oryzae* 異種発現系を利用した糸状菌天然物の全合成法の開発について述べている。本研究の背景について述べた序章に続き、第一章ではジテルペンの合成で方法論の検証を行い、第二章で二種のポリケタイドの合成を検討した後、最後に未知生合成経路の化合物に関する全合成について述べている。以下に概要を記す。

遺伝子クラスター既知（4 遺伝子）のジテルペン aphidicolin の合成を行なった。4 種のベクターを用いて原料供給酵素、骨格合成酵素、修飾酵素遺伝子を *A. oryzae* の栄養要求性 4 重変異株 NSAR1 へ順次導入し、生合成の各段階を確認しつつ、最終的に真核生物に毒性を示す物質 aphidicolin を 130 mg/kg の収量で合成することに成功した。ポリケタイド solanapyrone（4 遺伝子）も同様の手法で合成できることから、4 個以上の遺伝子導入でも用いたプロモーターが機能することが分かった。また、宿主由来の酵素が副反応を起こす場合でも、下流の酵素遺伝子の導入で抑制できた。

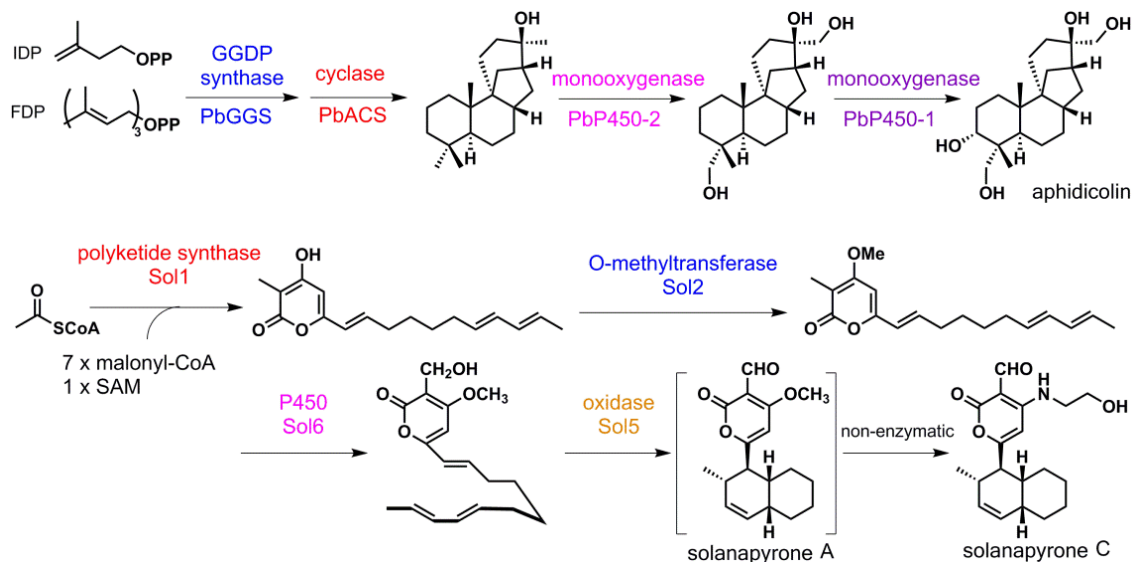


図 1. aphidicolin および solanapyrone C の生合成経路

第二章ではこのほか、生合成機構の詳細が不明な cytochalasin 系天然物について解析を行った。我々は、cytochalasin E の PKS-NRPS と ER 遺伝子を *A. oryzae* NSAR1 で異種発現し、初めて鎖状中間体アナログ **13** の単離に成功した。これにより、分子内縮合でピロリノンの形成後、[4+2]環化によって環状化合物に変換されるという仮説に実験的な証拠を示した。

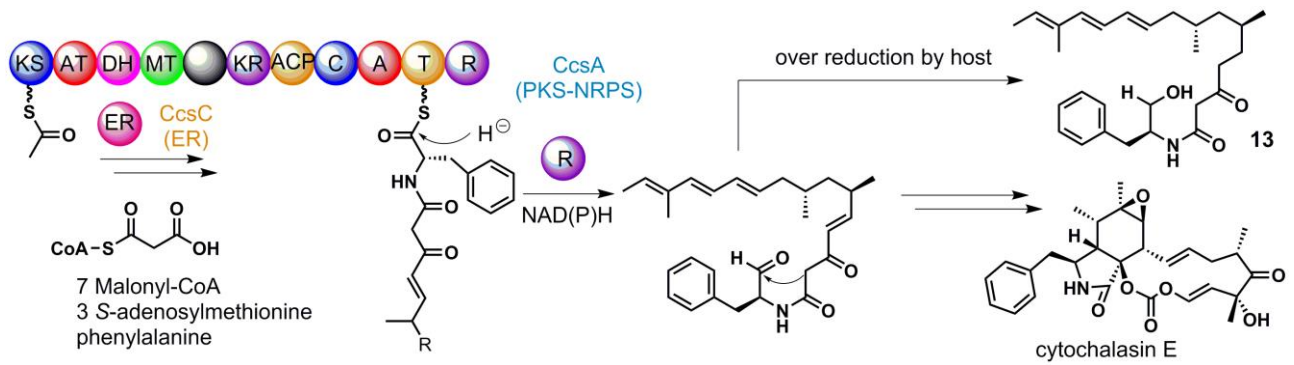


図2. cytochalasin E の推定生合成経路

次いでユニークな酸無水物二量体構造を有する **phomoidride** の全生合成を検討した。酸無水物型天然物に関して多くの生合成研究が行われ、モノマーはアルキルクエン酸を経由すると予想されていたが、その詳細および二量化に関しては未だ統一した説明はなされていなかった。PKS が触媒して生じる長鎖脂肪酸と、オキサロ酢酸を縮合するクエン酸合成酵素ホモログ(CS)、さらに脱水酵素 (MCD)からモノマーが生成する予想を基に、生産菌ゲノム DNA 解析データを探索したところ、*phiA*, *I*, *J*が見つかった。これらの遺伝子を導入した三重形質転換体を調製し、その培養抽出物から、モノマーの脱炭酸体を得たことから、この遺伝子クラスターが **phomoidride** の生合成に関与していることがわかった。*phi* 遺伝子クラスターと近縁の *tst* 遺伝子クラスターからも同一生成物を与えることを突き止め、その CS、MCD の *in vitro* 機能解析から、真のモノマー中間体の構造を突き止めた。この側鎖に不飽和結合を持つ中間体の構造から、複数の脱炭酸モノマーを想定することにより、すべての二量化反応を説明しうる普遍的仮説を提唱した。以上の結果より、*A. oryzae* 異種発現系の有用性が確認され、糸状菌天然物の汎用的供給法に途を拓いたと考えられる。

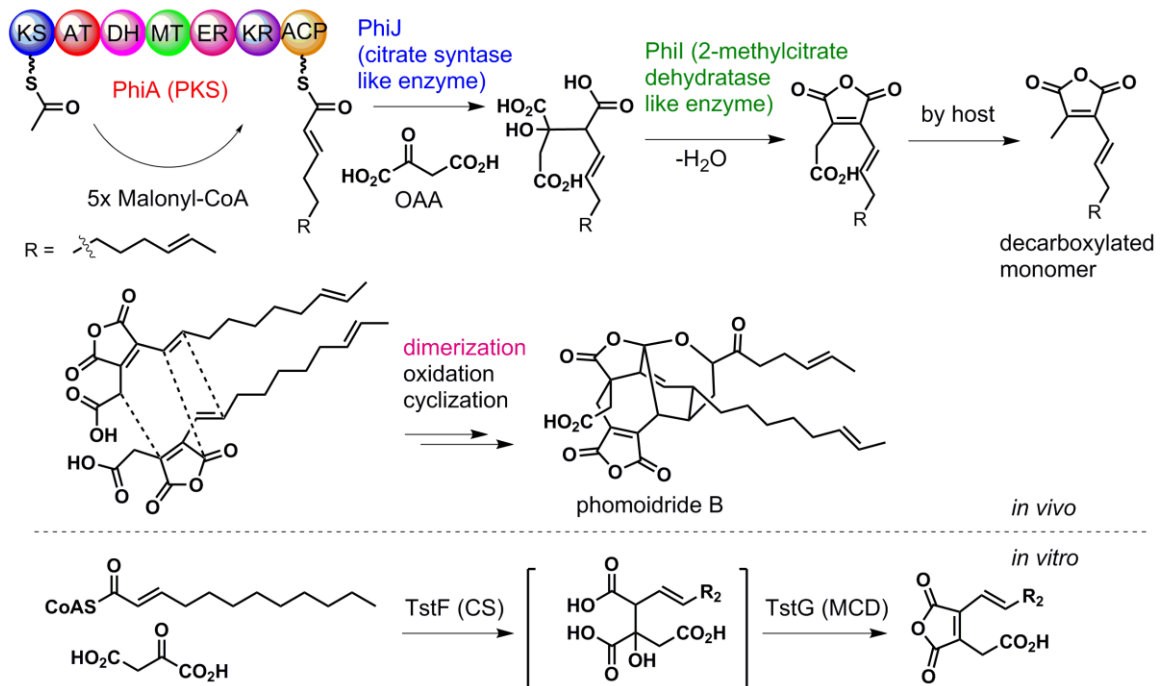


図3. phomoidride B の推定生合成経路とモノマーの生合成機構