HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	合成生物学的アプローチによる糸状菌由来セスタテルペンのゲノムマイニング［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	成田, 興司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13239号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70100
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Narita_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　成田興司

学 位 論 文 題 名

合成生物学的アプローチによる糸状菌由来セスタテルペンのゲノムマイニング

テルペンは植物や微生物の生産する主要な二次代謝産物のひとつであり、その生合成機構は骨格構築と酸化修飾の二段階に大別される。テルペノイドの骨格合成酵素の中にはプレニル基転移ドメインと環化ドメインが融合した二機能性環化酵素が存在し、2007 年に fusicoccadiene 合成酵素 PaFS が発見されて以降、そのホモログの機能解析が急速に進められてきた。しかしこれまでは、標的遺伝子は PaFS などとの相同性のみに基づいて選択されており、その生成物や反応機構をあらかじめ推定することはできなかった。また、酸化修飾を含む生合成経路の全容が解明されているジテルペン(C20)は aphidicolin などの数例が知られているのみで、セスタテルペン(C25)に関してはほとんど解明されていなかった。本学位論文では、序論にて研究背景について述べ、続く 1 章では糸状菌異種発現系を利用した新規テルペン環化体のゲノムマイニング手法を提案した。2 章では環化体の酸化修飾による生物活性天然物の異種生産を検討し、新規あるいは既知天然物を与える遺伝子クラスターの機能解析において得られた知見について議論した。以下がその概要である。

1 章では、二機能性テルペン環化酵素の系統樹解析に基づくクレード特異的なゲノムマイニングを行った。二機能性環化酵素は、その環化ドメインについて系統樹解析を行うことで複数のクレードに分類される。糸状菌 *Bipolaris maydis* および *Phoma betae* からクレード A に属する 4 種の環化酵素 BmTS1, 2, 3, Pb1 が見出され、その機能解析により 4 種の新規生成物 Bm1, Bm2, Bm3, Pb1 を取得した(Fig. 1)。これらは、同じクレード A に属する NfSS の生成物 sesterfisherol と類似の生合成経路から分岐して生じたものであると推定された。その初発の環化機構は、クレード B に属する環化酵素における機構とは異なっていたことから、環化酵素のアミノ酸配列相同性と環化機構との間には関連性があることが示された。

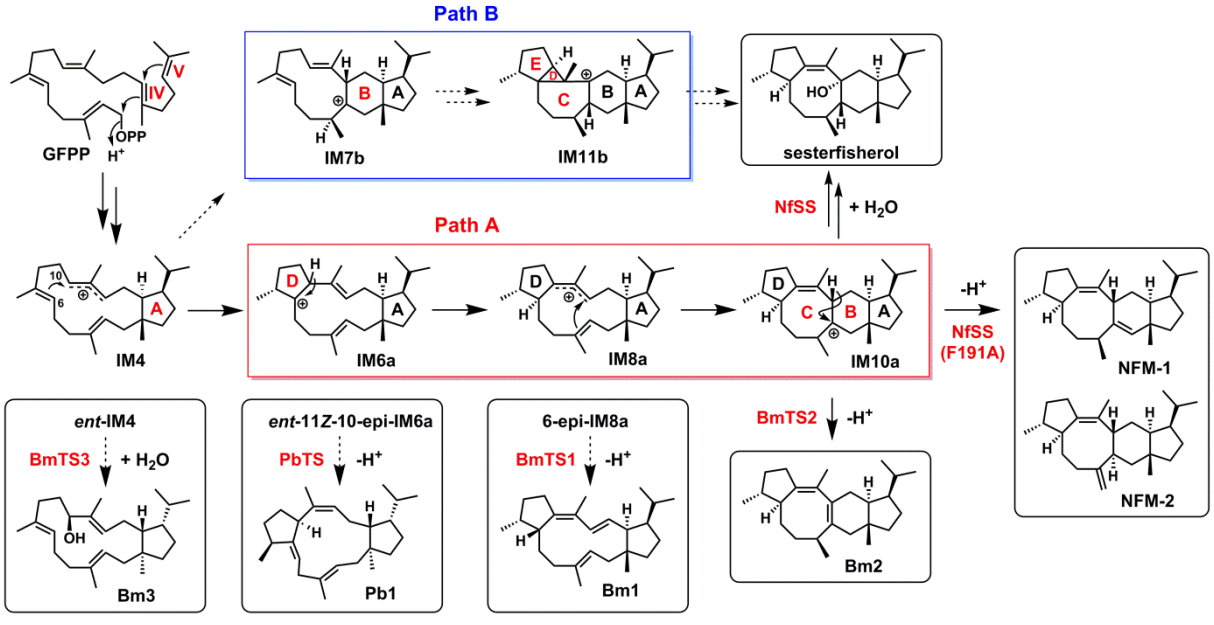


Fig. 1　クレード A に属する環化酵素が与える生成物の推定生合成経路

さらに 1 章では、NfSS に対する変異導入実験により sesterfisherol 生合成経路の同定を試みた。共同研究者である佐藤博士によって、sesterfisherol 生合成において環形成の順序が異なる 2 通りの経路(Path A, B)が計算化学的に推定された。NfSS において化合物近傍に位置すると予想された芳香族アミノ酸残基に対し変異を導入したところ、Path A から分岐したと思われる生成物 NFM-1, 2 が得られた(Fig. 1)。このことから、sesterfisherol 生合成経路の同定に成功し、セスタテルペン生合成経路および中間体の推定において計算化学的手法が有効であることが示された。これらの知見から、アミノ酸配列相同性に基づく新規テルペノイドの探索手法を提案した。本手法により、新規あるいは既知の天然物を与える可能性のある環化酵素の推定や、類似テルペン骨格の集中的合成が可能になると考えられる。さらに、計算化学的手法を組み合わせることでより精度の高い生合成経路の推定や生合成中間体の同定が可能になると考えられる。

2 章では、二機能性環化酵素の与える環化体の酸化修飾により生物活性天然物の異種生産を試みた(Fig. 2)。*B. maydis* のゲノム上において BmTS3 の周辺遺伝子を探索したところ、複数の酸化酵素遺伝子が見出されたことから、これらを麹菌内で共発現させた。その結果、既知の抗腫瘍性天然物 terpestacin およびその生合成中間体の取得に成功した。同様に、*P. betae* から見出された酸化酵素遺伝子と PbTS の共発現により新規天然物 betaestacin II が得られた。また、糸状菌 *Aspergillus clavatus* から見出された ophiobolin 類縁化合物の生合成遺伝子について機能解析を行い、4 種の新規化合物 **1**, **2**, **3**, **4** を単離した。一方、ophiobolin 生産菌からもこれと類似の遺伝子クラスターが見出され、その機能解析により既知天然物である ophiobolin C が得られた。これにより、麹菌を宿主とした環化酵素遺伝子と酸化酵素遺伝子との共発現手法は既知および新規天然物の生産において有用であることが示された。本手法を 1 章で提案した環化体の探索手法と組み合わせることで、新規生物活性天然物の網羅的合成が可能になるのではないかと考えられる。

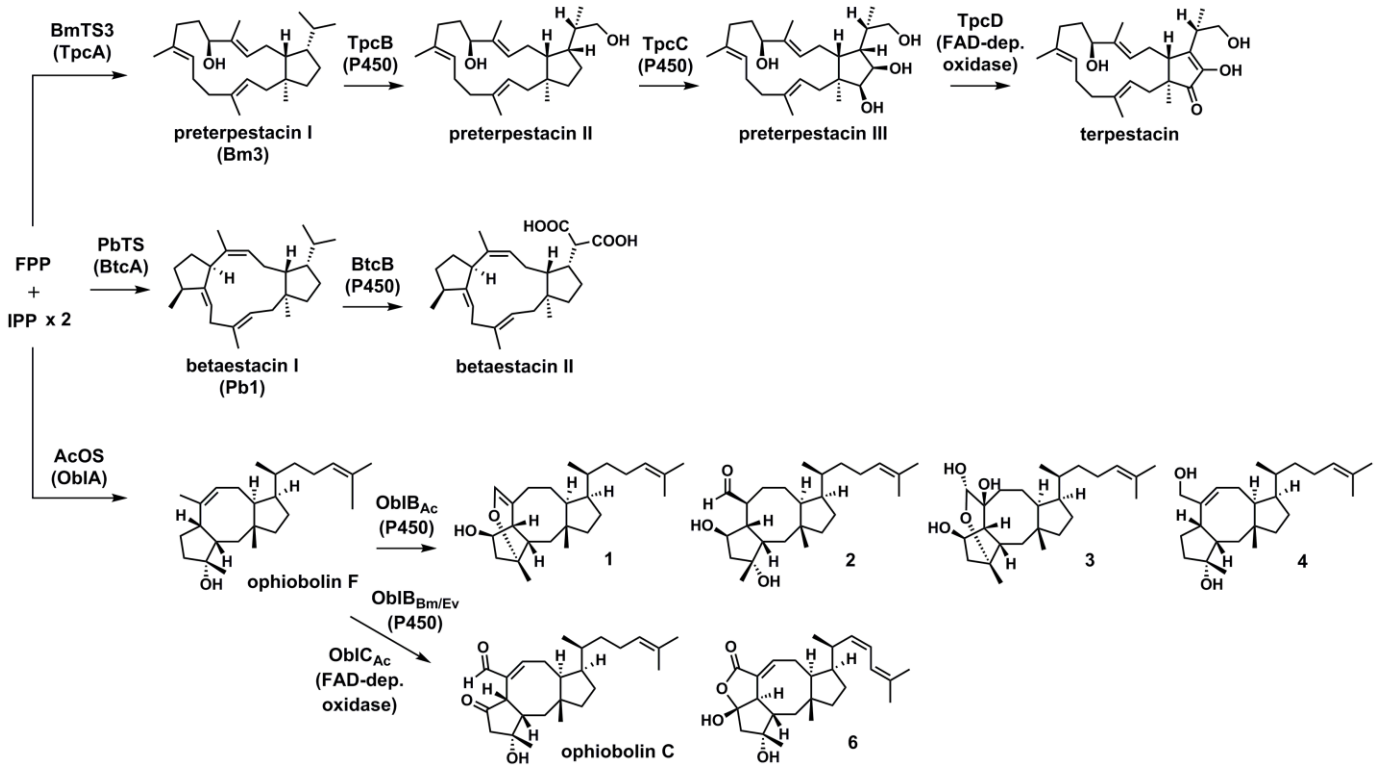


Fig. 2　環化体の酸化修飾による天然物生合成