HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	人工的機能改変を指向した糸状菌ポリケタイド系天然物の生合成に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	鵜飼, 孝大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13667号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74128
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Ugai_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　鵜飼孝大

学位論文題名

人工的機能改変を指向した糸状菌ポリケタイド系天然物の生合成に関する研究

ポリケタイド系天然物は糸状菌、バクテリア、植物などが生産する天然物の一群であり、高脂血症薬である lovastatin に代表される有用な生物活性物質を含んでいる。その構造多様性は、①多数の機能ドメインからなるポリケタイド合成酵素（PKS）によるポリケタイド鎖（PK）の構築、②修飾酵素による PK の官能基化・構造複雑化を受けることで創出されている。近年では、生合成遺伝子の異種発現による天然物生産が可能になってきているが、ポリケタイド系天然物においては、その酵素の巨大さによる取り扱いの難しさや異種発現系の汎用性が検証されていないことから研究例は限定的である。

そこで本学位論文では、1 章の序論にて研究背景について述べ、続く 2 章では麹菌異種発現系を利用した標的ポリケタイド系天然物の酵素的全合成。3 章では標的化合物を定めない機能未知遺伝子のゲノムマイニング。4 章では、複雑な生合成機構が想定されたポリケタイド系天然物の生合成についての研究。5 章では、これまで得られた知見をもとに人工的に機能を改変した非天然型の酵素を作成して機能解析を行っている。以下がその概要である。

2 章では、糸状菌由来植物毒素 betaenone の酵素的全合成を行った。先行研究で得られた情報をもとに生産菌 *Phoma betae* より *bet* 遺伝子クラスターを見出し、麹菌を利用して機能解析を行った。その結果、天然物である betaenone B の酵素的全合成を達成した。2 章を通して、麹菌が PK の炭素鎖伸長や還元の有無を厳格に制御可能であると再確認した。

3 章では、機能未知遺伝子の強制発現による天然物探索（＝ゲノムマイニング）を PKS に適用した。本手法が盛んに適用されているテルペン合成酵素に比べて、はるかに巨大な酵素である PKS を網羅的に取り扱うことは困難であり、ゲノムマイニングへの応用例は少ない。そこで、複数存在する候補遺伝子から機能を保持している可能性が高い遺伝子を絞り込んで解析を行った。その結果、海洋糸状菌由来ポリケタイド didymellamide の生合成遺伝子の発見につながり、今後の PKS を用いたゲノムマイニングにおける知見を得ることができた(図 1)。

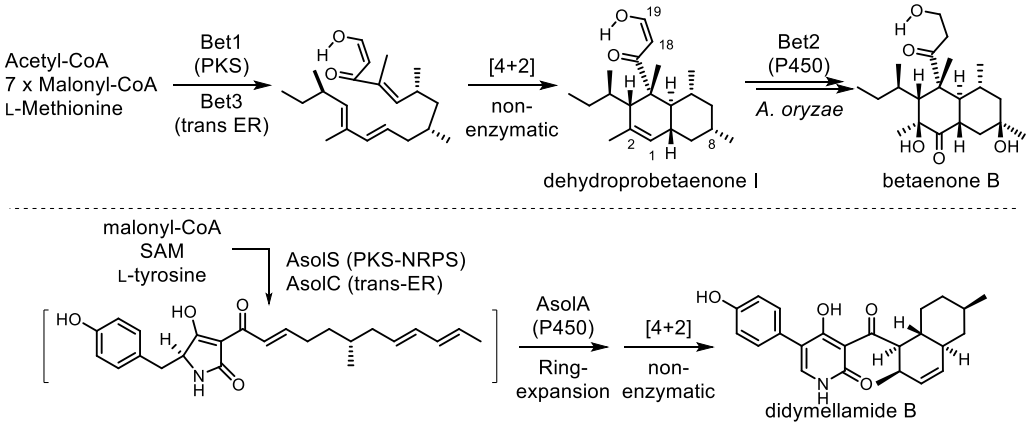


図 1. Betaenone と didymellamide の生合成経路

4 章では、2,3 章の知見をふまえて、複雑な生合成機構が想定されていたシクロペンテン骨格を共通構造として有するポリケタイド系天然物 cyclohelminthol および terrein の生合成研究を行った。2 章と同様に先行研究で得られた知見をもとにして生合成遺伝子を特定し、麹菌で異種発現を行った。Terrein の推定生合成中間体は、酸化を受けやすいヒドロキノンという不安定な構造であり、その高い反応性が生合成研究の大きな障害になっていた。そこで本研究では、terrein とは置換基が異なる類縁体 cyclohelminthol および palmaenone の生合成遺伝子の機能解析も行った結果、ヒドロキノンの置換基が変わることで、先行研究では不可能であった中間体の捕捉に成功した。さらに、類縁体の生合成遺伝子クラスター中に保存されている非常に小さなタンパク質 TerQ ホモログが 1-propenyl 基の生成に関与していることを世界で初めて明らかにするとともに、terrein に至る合理的な生合成経路を提唱した(図 2)。

5 章では、これまで得られた知見をもとに、PKS-NRPS を材料としたキメラ酵素の作成および機能解析を行った。PKS の連続した触媒反応は対応したそれぞれのドメインによって制御されているため、既知 PKS-NRPS 間でのドメイン交換によってキメラ酵素を調製し、生成物へ与える影響を調査する手法が知られている。そこで本章では生成物への影響を検出するのが比較的容易な R ドメインを対象としてキメラ酵素遺伝子を調製し、麹菌において発現させた。その結果、十分量の非天然型ポリケタイドを得ることに成功し、交換対象とした R ドメインについての理解を深めた。

以上、本学位論文では複雑な機能を有する HR-PKS 機能解析、並びに高度な生合成機構をもつ天然物の生合成研究を行い、将来的な酵素の人工的機能改変を行う上で有用な知見を得ることに成功した。

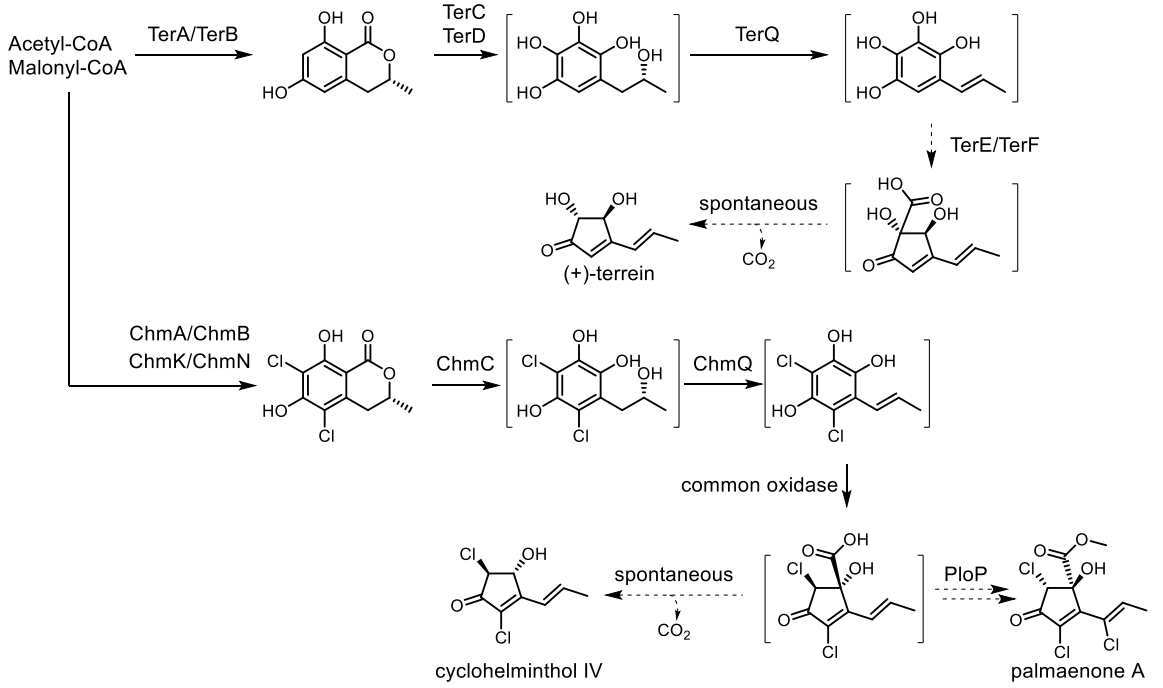


図 2. シクロペンテン骨格を有する天然物群の予想生合成経路