



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Unusual Oxidative Transformations in Fungal Natural Product Biosynthesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	蒋, 雨露
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14904号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85565
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	JIANG_Yulu_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 蔣 雨露

審査担当者	主査	教授	谷野 圭持
	副査	特任教授	及川 英秋
	副査	教授	澤村 正也
	副査	教授	大利 徹
	副査	准教授	南 篤志

学 位 論 文 題 名

Studies on Unusual Oxidative Transformations in Fungal Natural Product Biosynthesis
(糸状菌由来天然物の生合成に關与する特異な酸化変換に關する研究)

生合成における酸化変換は、天然物の構造的多様化において重要な役割を果たし、化学構造に由来する多数の生物学的活性をもたらす。過去数十年間に報告された広範な生合成研究により、基質のヒドロキシル化やエポキシ化などの単純な酸化、およびそれらの反応機構が十分に解明されてきた。しかし、生物はしばしば非常に精巧な酸化機構を採用しており、これにより骨格の転位と環化を伴う場合があることが知られる。現在、これらの異常な酸化は十分に理解されておらず、多くの場合生合成遺伝子の同定さえ確認されていない。複雑な天然物の酵素的全合成を達成するためには、それらの生合成経路、特に異常な酸化過程の解析は喫緊の問題である。この論文では、構造の多様化に大きく寄与する真菌の天然物生合成における異常な酸化過程に關する 2 つの課題に焦点を当てて研究を行った。

1 章では、一般的な酸化酵素と關連する酵素の典型的な触媒機構とその具体的な反応例について説明した。さらにこの論文では信頼性が高く効率的な CRISPR-Cas9 / *Aspergillus oryzae* 異種発現システムが重要な方法論として多用されることから、その特徴やメリットも紹介されている。このホットスポット (HS) ノックイン法により、2 章と 3 章でロリトレムとシクロクロロチンの生合成経路を効果的にモデルホストで再構成することに成功している。

2 章では、インドールジテルペン・ロリトレム B の生合成研究が実施された。合計 10 個の遺伝子が *A. oryzae* に導入され、ロリトレム B の全生合成に成功した。具体的には HS ノックイン法により、さまざまな組み合わせで生合成遺伝子を発現させ、高収率で生合成中間体を生成している。特徴的な 5/6 員環 (A / B 環) 構造の構築に、プレニルトランスフェラーゼ LtmE とシトクロム P450 LtmJ のみが関与することを考慮し、これら 2 つの酵素の機能解析は、それらのみ発現させた株を使った生物変換実験によって行われた。形質転換体 AO-ltmEJ に対し既知の IDT/IST 型基質を使用すると、LtmEJ は C-13/C-9 ヒドロキシ基を有する IDT/IST を広く受容した。この実験過程で、側鎖部分にエポキシアルコールを有する化合物を中間体として、LtmJ 触媒によるさらなる環化が進行することを見出した。この中間体の構造に基づいて、LtmJ により H 引き抜きと続く迅速なエポキシドの開環によって引き起こされる酸化環化機構が提案された。本反応機構は、密度汎関数理論計算とモデル化合物を使用した合成アプローチによって実験的に支持された。この事実は汎用的中間体であるパスパリン由来 IDT の新たな構造的多様化に、ロリトレムにおいて明らかにされた後期修飾経路が採用されたことを意味する。

3 章では、シクロクロロチンの生合成において、従来知られていなかった新規オキシダーゼ/修飾酵素がハロゲン化とヒドロキシル化に關与する新事実が得られたことを紹介している。まず遺伝子破壊実験により、非リボソーム依存ペプチド合成酵素 (NRPS) CctN が、Abu3 と Ser4 の間で通常と異なるエステル結合を含むイソシクロチンを構築することを見出した。次いで機能不明だった 3 つの CctP2 / CctO / CctR (DUF3328) タンパク質の機能を明らかにした。すなわち、CctP2 は Pro3 残基の二塩素化を触媒し、その後 CctO を介したトランスアシル化によりシクロクロロチンが得られ、続いて CctR 触媒によるヒドロキシル化により、最終生成物であるヒドロキシシクロクロロチンが得られると推定された。提唱された生合成経路は、*A. oryzae* における異種発現によって、さらに 2 つのト

ランスポーター CctQ と CctS が DUF3328 タンパク質の機能を補完するのに不可欠であることがわかった。また今回の研究に加え、リボソーム由来環状ペプチドにおけるタンパク質に関する研究を通じて、真菌 DUF3328 オキシダーゼは新しいファミリーを形成することが提案された。

これを要するに著者は、2 種の天然物生合成に関与する酸化酵素の特異な触媒機能を詳細に解析することにより、新たな多様性創出機構の解析および新規多能性酸化酵素の発見することに成功した。特に後者に関しては、糸状菌に特有に見つかる酸化酵素であり、不活性な sp³ 炭素上の変換反応であり、基礎および応用の面で触媒機構の解明は大いに期待されるものである。今後、医薬品など有用天然物の供給に対して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 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。