



Title	糸状菌由来の代表的な天然物群生合成における未解決課題の解明に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	瀧野, 純矢
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15195号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/87202">https://hdl.handle.net/2115/87202</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	TAKINO_Junya_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 瀧野 純矢

## 学位論文題名

糸状菌由来の代表的な天然物群生成における未解決課題の解明に関する研究

糸状菌は天然有機化合物の宝庫であり、有機合成化学者も注目する複雑な構造や優れた生物活性をもつ興味深い化合物を数多く生産している。こうした天然物は、一次代謝産物を原料として炭素骨格を形成する骨格構築段階と、生成した炭素骨格へ置換基を導入する修飾段階を経て生成される。前者の反応に関わる骨格構築酵素であるテルペン環化酵素やポリケタイド合成酵素は、複雑な多段階反応を厳密に制御することで単一の生成物を与える。この反応制御機構は、*in vitro* 反応、ラベル実験、計算化学的手法などで解析が進められているが、未解明な課題が残されているのが現状である。

本論文では、大腸菌・麹菌を宿主とした信頼性の高い異種発現系を利用して、糸状菌天然物の生成における未解決課題の解明に取り組んだ。1章の序論にて研究背景について述べ、続く2章では、糸状菌が生産する植物ホルモンアブシジン酸 (ABA) の生成に関与する新規テルペン環化酵素の同定と反応機構解析、3章では、糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素 (HR-PKS) の汎用的立体配置制御則の提唱を行った。以下がその概要である。

2章では、ABA 生成への関与が指摘されていたものの、既知のテルペン環化酵素とは相同性を示さない機能未知遺伝子 *bcABA3* に注目し、大腸菌・麹菌を宿主とした異種発現系を用いて機能解析を行った。その結果、*BcABA3* がファルネシル二リン酸 (FPP) から  $\alpha$ -ionylideneethane への変換を担う新しいタイプのテルペン環化酵素であることを明らかにした。さらに、*BcABA3* 発現大腸菌をつかった *in vivo* 変換系を新たに確立し、重水素標識 FPP を基質とした *in vitro* 酵素反応と組み合わせることで、疎水性分子の異性化を経由する特徴的な環化機構を明らかにした (図1)。ここで確立した *in vivo* 変換系は、疎水性中間体を経由すると提唱されている他環化酵素 (aristolochene synthase など) の解析においても有効であると期待される。また、変異実験と AlphaFold2 を用いた立体構造予測を組み合わせることで、活性部位の推定およびピロリン酸の脱離に関わる新しいモチーフの推定に成功した。

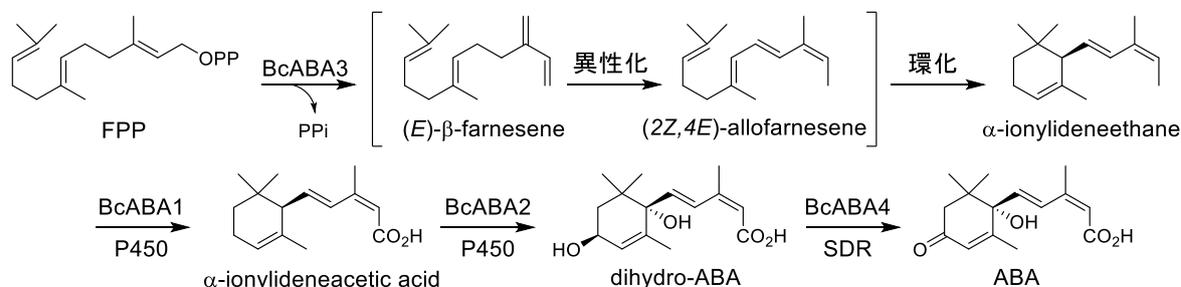


図1. 糸状菌における ABA 生成経路

3章では、糸状菌由来 HR-PKS の立体配置制御機構の解明を行った。HR-PKS は、脂肪酸合成酵素 (FAS) と類似したドメインで構成されるモジュラー型巨大酵素である。FAS が触媒する炭素鎖伸長反応との相違点は、任意のドメインがスキップされるため、ポリケタイド鎖の伸長過程で導入された置換基が保持されたポリケタイド鎖を構築する点である。多くの研究者は、この反応制御に関わるプログラミング機構を解明すべく、独自の視点で研究を進めているが、一方で、各ドメインが触媒する反応の立体選択性については研究例が限定的であり、統一的な議論ができる状況に至っていなかった。この状況を打開するため、本研究では、ポリヒドロキシポリケタイド (**3-1**, **3-2**, **3-3**) の生合成に関与する 3 種の HR-PKS に注目し、当研究室で開発を進めてきた麹菌異種発現系を用いた機能解析を行った (図 2-A)。HR-PKS 産物の絶対立体配置を決めることで、機能解析に成功した 3 種の HR-PKS に共通する立体配置制御則を見出した (図 2-B)。さらに、1) 既知天然物の構造の確認、2) KR ドメインのモチーフ解析、3) 分子系統解析などから、提唱した立体配置制御則が糸状菌由来 HR-PKS に共通する特徴であることを指摘することに成功した。制御則に反する構造が報告されていた thermolide については、DFT 計算に基づく化学シフト予測とモデル化合物の合成から、制御則に従った構造の妥当性を支持する実験結果を得た。以上の知見により、糸状菌由来 HR-PKS における汎用的立体配置制御則を提唱した。本規則は、糸状菌が生産するポリケタイド系天然物の絶対立体配置の予測や、報告されている天然物の構造妥当性の検証などに有効であると考えられる。また、制御則に反する機能をもつ HR-PKS も存在するが、それらは HR-PKS の分子系統解析において、特定のクレードに分類されることも明らかにした。

以上、本学位論文では、信頼性のある発現系を用いることで、機能未知遺伝子や巨大酵素の異種発現を迅速に行い、ABA 生合成に関与する新しいタイプのテルペン環化酵素の同定、糸状菌由来ポリケタイド合成酵素に共通する立体配置制御則の提唱に成功した。ここで得られた知見は、有用物質生産や酵素機能の人為的な改変を行う上で有用な知見である。

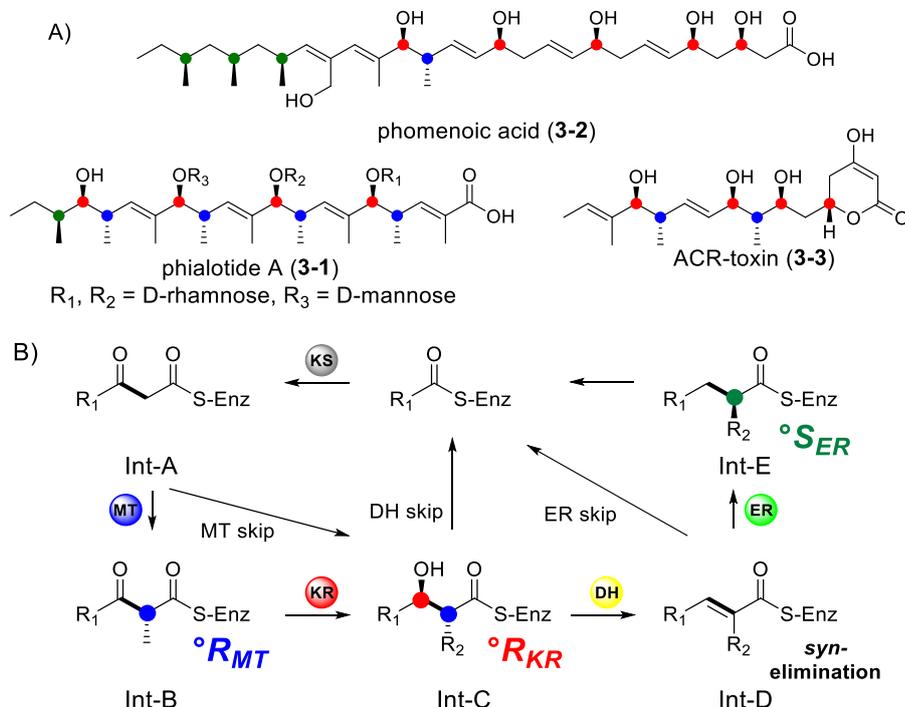


図 2. 糸状菌 HR-PKS における立体配置制御則; A) 研究標的としたポリヒドロキシポリケタイドの化学構造、B) HR-PKS の触媒反応および、反応生成物となる中間体の絶対立体配置 (KS: ketosynthase, MT: methyltransferase, KR: ketoreductase, DH: dehydratase, ER: enoylreductase)