

Berkeleyone 生合成再構成による新規カスパーゼ-1 阻害剤の創出

松田 侑大

東京大学大学院 薬学系研究科

(現所属：香港城市大学 化学系)

研究の目的

Berkeleydione (**1**) は、カスパーゼ-1 阻害物質として糸状菌より単離された化合物であり、強力なカスパーゼ-1 阻害剤である Ac-YVAD-CHO と同等の濃度にて、THP-1 細胞における IL-1 β 産生抑制能を有することが知られている。加えて、**1** は抗炎症活性を示す berkeleyacetal C や殺虫効果を示す dhilirolide 類を始め、種々の糸状菌由来天然物の生合成前駆体と考えられており (図 1)、**1** の生合成研究は多くの薬学的に有望な化合物の生合成過程を理解する上で有用であると期待される。本研究では、berkeleydione (**1**) の生合成経路を分子レベルで確立するとともに、酵素的な誘導体化により、活性の向上した化合物の創成を目指した。

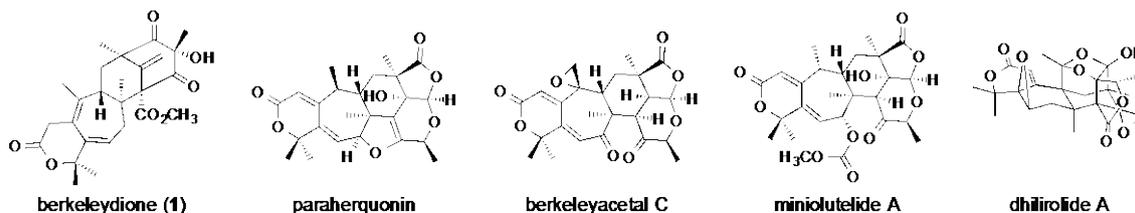


図 1. Berkeleydione (**1**) ならびにその類縁化合物の構造

方法

Penicillium brasilianum NBRC 6234 株は製品評価技術基盤機構より入手し、ドラフトゲノムシーケンス解析ならびに *prh* クラスター中の各遺伝子のクローニングのために使用した。*Aspergillus oryzae* の形質転換は文献既知の方法で行い、得られた形質転換体に由来する代謝産物は HPLC ならびに LC-MS にて分析した。導入した *prh* 遺伝子に由来する各化合物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーならびに分取 HPLC にて精製後、MS ならびに NMR 分析により構造決定を行った。

結果

まず、berkeleydione (**1**) の生合成遺伝子群を取得すべく、本化合物を生合成中間体として生成すると予想される paraherquonin (図 1) に着目した。当該化合物の生産菌である *Penicillium brasilianum* NBRC 6234 株のドラフトゲノムシーケンス解析を実施したところ、14 遺伝子からなる paraherquonin 推定生合成遺伝子群 (遺伝子クラスター) が見出され、これを *prh* クラスターと命名した。

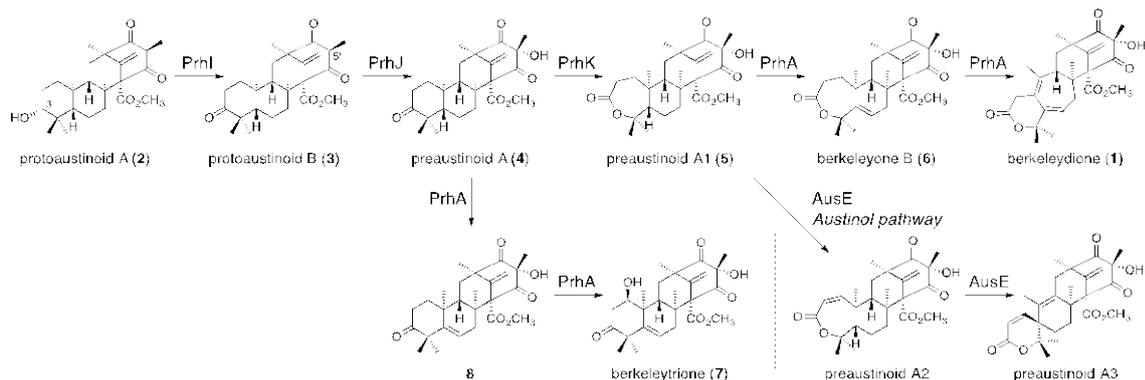


図 2. Berkeleydione (1) の生合成経路

prh クラスターの情報から paraherquonin の生合成初期段階は、我々が既に生合成研究を行った austinol のそれと同一であると考えられ、四環性中間体 protoaustinoide A (2) を生合成中間体とするものと予想された。また、*prh* クラスターは Fe(II)/ α -KG 依存型ジオキシゲナーゼ (PrhA)、短鎖型脱水素酵素/還元酵素 (SDR; PrhI)、2つの FAD 依存型モノオキシゲナーゼ (FMO; PrhJ・PrhK) を始め計 8つの推定修飾酵素をコードしている。PrhI のホモログは他のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター中にしばしば見られ、テルペン環化酵素によって与えられる環化産物の C-3 位水酸基を酸化してケトン体へと変換することが確認されている。そこで、PrhI は同様に環化中間体 2 を基質とし、C-3 位の酸化を担うことでケトン体 3 を生成するものと推定した。他方で、PrhJ と PrhK のホモログである AusB と AusC は、austinol 生合成においてそれぞれ、C-5'位の水酸化と A 環部分の Baeyer-Villiger 酸化をそれぞれ担うことから、PrhJ と PrhK も同様の変換反応に関与すると考えられた。すなわち、PrhJ によって 3 が preaustinoide A (4) へと酸化された後、PrhK が Baeyer-Villiger 酸化を触媒することで 4 を preaustinoide A1 (5) に変換すると推定した。Austinol 生合成において、5 はさらに Fe(II)/ α -KG 依存型ジオキシゲナーゼ AusE によって触媒される二段階の連続した酸化反応を経ることでスピロラクトン中間体 preaustinoide A3 へと変換される。PrhA は AusE と 78% のアミノ酸配列同一性を有するが、1 と austinol の構造の違いから AusE とは異なる活性を有すると予想された。すなわち、PrhA は AusE と同様に 5 を基質として受け入れるものの、berkeleydione (1) や 1 の前駆体 berkeleyone B (6) を特異的に産生すると期待された (図 2)。

上述の berkeleydione (1) に至るまでの推定生合成経路を証明するため、4つの酸化酵素 PrhI、PrhJ、PrhK、PrhA をコードする遺伝子群 (*prhI*、*prhJ*、*prhK*、*prhA*) をクローニングした後、*Aspergillus oryzae* NSAR1 株を宿主として各遺伝子を逐次導入することで機能解析することとした。以前の研究で構築された protoaustinoide A (2) の生産を担う 5 遺伝子が導入された *A. oryzae* NSAR1 株を誘導培養することで 2 を調製後、各々の形質転換体に基質として 2 を投与した後で誘導培養を行い、各遺伝子依存的に得られる代謝物を HPLC にて解析した。その結果、導入遺伝子特異的に、予想された全ての生合成中間体ならびに 1 の生産が確認され、1 の生合成分子基盤を解明するに至った (図 2)。

Berkeleydione (1) 生産能を有する野生株は、4 に二重結合および水酸基が導入された類縁

体 berkeleytrione (7) も同時に生産することが報告されている。PrhA によって 5 に二重結合が導入されたことから、7 は 4 が PrhK による Baeyer-Villiger 酸化を受けることなく PrhA に基質として受け入れられることで得られる副生成物であると推定した。そこで、Baeyer-Villiger 酸化酵素をコードする *prhK* 以外の 3 遺伝子を導入した系を構築したところ、*prhA* 特異的に 7 が検出された。単離構造決定を行ったところ、7 は予想した通り berkeleytrione であることが明らかとなった (図 2)。4 から 7 に至るまでの中間体を検出することはできなかったが、7 の構造を考慮すると、本化合物は化合物 8 を中間体としているものと推測される (図 2)。以上の結果から、PrhA は 4 あるいは 5 を基質として二度の連続した酸化反応を行う多機能酵素であるといえる。

結論

本研究において我々は、カスパーゼ-1 阻害物質 berkeleydione の生合成分子基盤を明らかにすることに成功した²⁾。今後は、berkeleydione を paraherquonin へと変換する酵素群の機能解析や、類縁化合物の生合成遺伝子を今回構築された系に導入することなどにより、berkeleydione の酵素的な誘導体化を図るとともに、その結果として得られた新規化合物について生物活性試験を実施することで、活性の向上した類縁体の取得や構造活性相関についての知見を得ることを目指したい。

文献

- 1) Matsuda, Y., Abe, I. (2016) Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **33**: 26-53.
Matsuda, Y. *et al.* (2016) Discovery of key dioxygenases that diverged the paraherquonin and
- 2) acetoxydehydroaustin pathways in *Penicillium brasilianum*. *J. Am. Chem. Soc.* **138**: 12671–12677.