

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* を宿主に用いた新規メロテルペノイド 生合成系の構築

淡川 孝義

東京大学大学院 薬学系研究科

## 研究の目的

糸状菌メロテルペノイド(テルペン含有化合物)は、コレステロール低下剤シードである pyripyropene A や、その誘導体が免疫抑制剤として用いられる mycophenolic acid など、有用活性を持つ化合物を多く含む<sup>1,2)</sup>。その複雑な骨格は有機合成で合成するのは容易でなく、生合成反応による物質生産が期待される。糸状菌メロテルペノイド生合成系は主に、ポリケタイド合成酵素(PKS)、テルペン転移酵素(PT)、エポキシ化酸化酵素(FMO)、テルペン環化酵素(CYC)、テルペン部の酸化的再構築に関わるジオキシゲナーゼ(DOX)によって構成されるが、共通の中間体を受け入れるものの、異なる生成物を与える酵素が多い。そこで、本研究では、各生合成ステップにおいて「反応性の異なる多様な生合成酵素を発掘し、それらを組み合わせて *A. oryzae* 中で発現することで、新規メロテルペノイド生産系の創出」を目指した。

## 方法

糸状菌メロテルペノイド生合成酵素のうち、特に複雑骨格生成を担うジオキシゲナーゼ(DOX)を糸状菌ゲノムより同定することを目指して以下の研究を行った。Paraherquonin 生産菌 *Penicillium brasilianum* NBRC 6234 のゲノムシーケンスを行い、その中から新規 DOX 酵素の探索、同定を行った。既知のメロテルペノイド生合成酵素をクエリーとして相同性検索を行い、その結果、既知の DOX 酵素、AusE と 78% の相同性を持つ新規酵素(PrhA と命名)を見出した。PrhA と酸化酵素 PrhIJK を糸状菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 株にて発現し、protoaustinoid A を投与し、得られた化合物を NMR、MS 分析にて構造決定することで、PrhA の生成物を構造決定し、生合成反応の決定を行った。PrhA の特異な生合成反応を用いて、糸状菌生体内での新たな物質生産系の構築を行った。

## 結果

PrhIJK に加えて、PrhA を *A. oryzae* にて発現した結果、新たに 2 種の生成物が得られることが明らかとなった。NMR、MS 分析の結果、PrhA の 2 種の生成物を berkeleyone B, berkeleydione と構造決定した。この結果により、protoaustinoid A の 3 位の水酸基が PrhI により酸化され protoaustinoid B が生成し、PrhJ によって 5'位が水酸化され preaustinoid A が生成し、PrhK によって preaustinoid A が生成し、そこから PrhA によって berkeleyone B, berkeleydione を生じる、計 5 種のメロテルペノイド生

産系の構築に成功した<sup>3)</sup>(図1)。

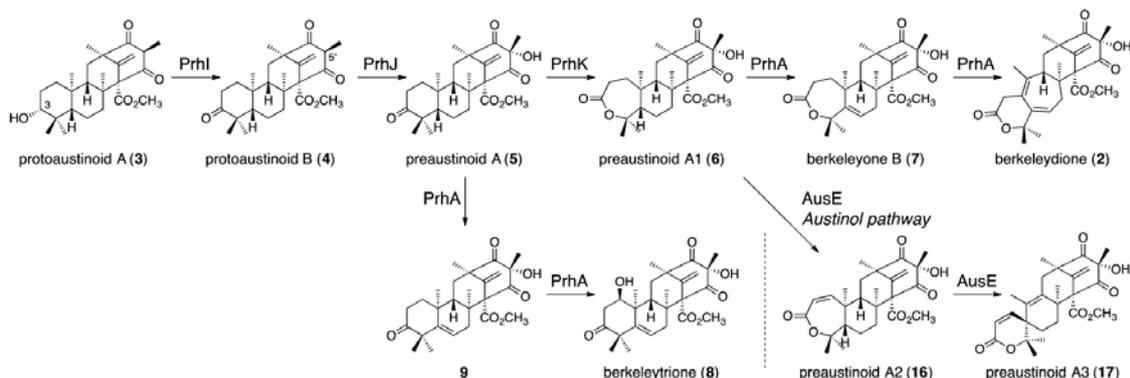


図1 Paraherquonin 生合成酵素を用いた物質生産

また、PrhA の preaustinoid A1 から、berkeleydione に至る一連の反応経路を以下のように提唱した(図2)。既知の DOX 酵素 AusE が共通の基質を受け入れ、1位の水素原子の引き抜き、スピロ環形成を触媒するのに対し、PrhA は、5位の水素原子の引き抜き、二重結合を形成、その後、1位の水素原子を引き抜き、生じたラジカルが二重結合上の  $\pi$  電子と反応して、六員環ラクトンを生じ、最終的に特徴的な 6-7 員環形成へと導くことで、berkeleydione を形成する反応を触媒することを明らかにした。現在、AusE、PrhA の反応の比較を行うべく、その結晶構造解析を行っており、その両者の基質複合体の結晶構造の取得に成功し、その解析を進めている。

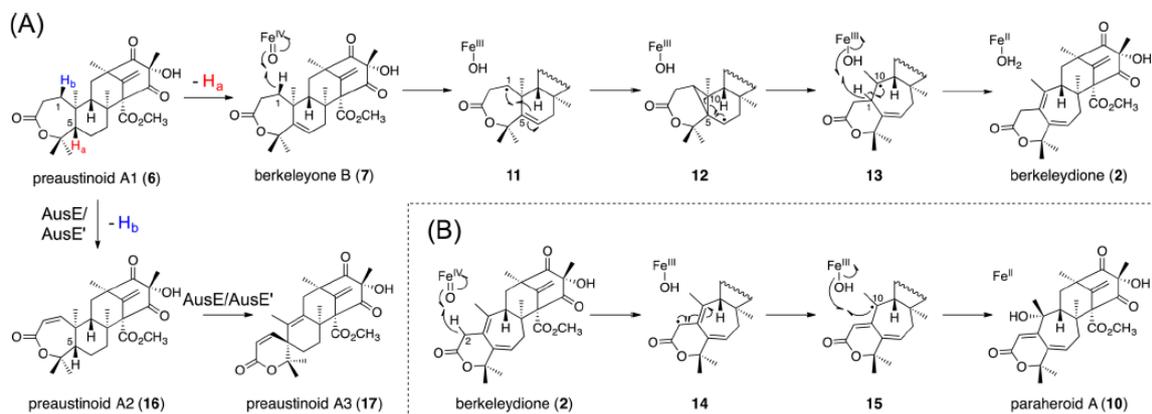


図2 PrhA の触媒する酸化反応

## 結論

Paraherquonin 生合成酵素をゲノムマイニングにより発掘し、その機能同定を行なった。これらの遺伝子を糸状菌 *A. oryzae* にて発現することで、計5種のメロテルペノイド生産系の構築に成功した。本研究を行うにあたり、(公財)野田産業科学研究

所より、多大な支援を頂き、ここに厚く御礼申し上げます。

#### 文献

- 1) Geris, R., Simpson, T. (2009) Meroterpenoids produced by fungi. *Nat. Prod. Rep.*, **26**: 1063-1094.
- 2) Matsuda, Y., Abe, I. (2016) Biosynthesis of fungal merotereonoids. *Nat. Prod. Rep.* **33**: 26-53.
- 3) Matsuda, Y. *et al.* (2016) Discovery of key dioxygenases that diverged the paraherquonin and acetoxylhydroaustin pathways in *Penicillium brasilianum*. *J. Am. Chem. Soc.* **138**: 12671-12676.