

ビステトラヒドロフラン環含有ポリケタイドの生物合成システムの構築

橋元 誠

岩手医科大学 薬学部

(現所属：武蔵野大学 薬学部)

研究の目的

ビステトラヒドロフラン環（以下ビスフラン環）を有する化合物は、HIV プロテアーゼ阻害活性などいくつかの有用な生理活性が報告されている。^{1, 2)} Asteltoxin (1)は糸状菌 *Emericella varicolor* などが生産するビスフラン環含有ポリケタイドであり、ATPase 阻害などの生理活性を有している。その生合成は、ポリケタイド合成酵素 (PKS) によるヘキサエン α -ピロン中間体 (2) の生成後、ポリエポキシ化、加水分解反応を経ると考えられている (図 1)³⁾。我々は、本菌のドラフトゲノムデータから 2 つの asteltoxin 生合成遺伝子クラスター候補 (Ev460 および Ev152) を見いだした (図 2A, 3A)。また、Ev460 クラスターにある PKS を麹菌中で発現させたとき、asteltoxin 生合成中間体と同じヘキサエン部分を持つ β -ケトラクトン (4) が生成されることをすでに明らかにしている (図 2B)。asteltoxin 生合成遺伝子の同定および機能解明し、その遺伝子機能を利用した立体選択的な多置換ビスフラン環化合物の形成と生理活性を持つ化合物の創出を目的として、今回、遺伝子破壊および異種発現による機能解析により、候補遺伝子の asteltoxin 生合成への関与を調べた。

方法

E. varicolor IFM42010 の遺伝子破壊株は、アグロバクテリウムを利用した相同組換え法 (ATMT 法) により作製した。pRI201-AN の T-DNA 領域にハイグロマイシン耐性マーカー (*hph*) カセットと候補遺伝子上流と下流各 2 kb を導入した破壊プラスミドを作製し、アグロバクテリウムに導入した。このアグロバクテリウムと *E. varicolor* 胞子を混合し、アセトシリンゴンを含むプレートに乗せたナイロンメンブレン上で共培養後、ハイグロマイシンとセフトキシムを含む PDA プレートにメンブレンを移し、形質転換体を選抜した。

異種発現による候補遺伝子の機能解析は、*amyB* プロモーター下に候補遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを構築後、プロトプラスチド-PEG 法により 4 重栄養要求株 *Aspergillus oryzae* NSAR1 に導入し、産生化合物を分析した。

結果

① Ev460 クラスターの解析

ATMT 法により得られた形質転換体からゲノム DNA を抽出し、候補遺伝子の欠失

を調べたところ、ターゲット遺伝子と *hph* カセットとの置換は確認できたものの、その取得効率は極めて低く、Ev460PKS 遺伝子では、得られた 45 クローンのうち、1 クローンのみであった。取得した Ev460PKS 破壊株の代謝物について HPLC 分析した結果、*asteltoxin* の生産が確認された。(図 2C) また、Ev460 クラスタにある転写調節因子遺伝子 (TF2) を破壊した形質転換体についても同様に解析を行ったが **1** を生産していたことから、Ev460 クラスタは *asteltoxin* 生合成に関与しないものと判断した。

② Ev152 クラスタの解析

Ev152 クラスタは、*asteltoxin* の構造類縁体である *aurovertin* などに見られる生合成遺伝子クラスターと類似している⁴⁾。遺伝子破壊株の作製とともに、異種発現による機能解析も同時に進めることにした。Ev152PKS を導入した *A. oryzae* 形質転換体について HPLC 分析した結果、遺伝子を導入していない形質転換体には見られない化合物の産生を確認した (図 3B)。また、LC-MS 解析により、*asteltoxin* 生合成中間体 (**2**) と予想されるヘキサエン α -ピロンと同じ分子式 ($C_{22}H_{26}O_3$) を持つ化合物の産生を確認した (図 3C)。今後、PKS 以外の遺伝子を順次導入した形質転換体についても代謝物の解析を進めていくとともに、遺伝子破壊株による解析も進めていく予定である。

結論

本研究では、ビスフラン環含有化合物の生物合成システムの構築を目指して、ビスフラン環をもつ *asteltoxin* (**1**) に着目し、生産菌 *E. varicolor* の *asteltoxin* 生合成遺伝子の同定を試みた。Ev460 クラスタにある PKS および転写調節遺伝子破壊株の解析から、当初 *asteltoxin* 生合成遺伝子クラスターと考えていた Ev460 クラスタは *asteltoxin* 生合成に関与しないことが判明した。また、相同組換え効率が低く、多くの遺伝子機能を調べるには至らなかったため、現在、*ligD* 破壊株の作製を進めている。もう一つの候補である Ev152 クラスタにある Ev152PKS の異種発現解析では、ヘキサエン α -ピロン中間体 (**2**) と思われる化合物の生成が確認できたことから、*asteltoxin* の生合成は、Ev152 クラスタにより行われ、*aurovertin* と類似の経路で生合成されることが示唆された。*aurovertin* では、フラビン酸化酵素と加水分解酵素が繰り返し基質に作用することでジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン骨格 (6-5 員環) の形成が行われることから⁴⁾、今後、Ev152 クラスタにあるフラビン酸化酵素や加水分解酵素の機能解析がビスフラン環を含む化合物の生物合成に有用な手がかりを与えられられる。

文献

1) Alonso, F., Sanchez, D., Soler, T., and Yus, M. (2008) Straightforward synthesis of

- perhydrofuro [2, 3-*b*] furans through a Wacker-type reaction. *Adv. Synth. Cat.* **350**: 2118-2126.
- 2) Sridhar, P. R., Reddy, G. M., and Seshadri, K. (2012). Stereoselective synthesis of *cis*-fused perhydrofuro [2, 3-*b*] furan derivatives from sugar-derived allyl vinyl ethers. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**: 6228-6235.
- 3) Eom, K. D., Raman, J. V., Kim, H., and Cha, J. K. (2003). Total synthesis of (+)-asteltoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 5415-5421.
- 4) Mao, X. M. *et al.* (2015). Efficient biosynthesis of fungal polyketides containing the dioxabicyclo-octane ring system. *J. Am. Chem. Soc.* **137**: 11904-11907.

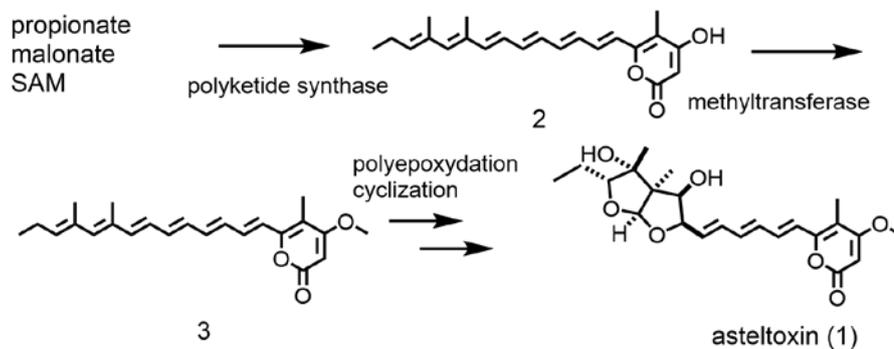


図1 asteltoxin の生合成経路

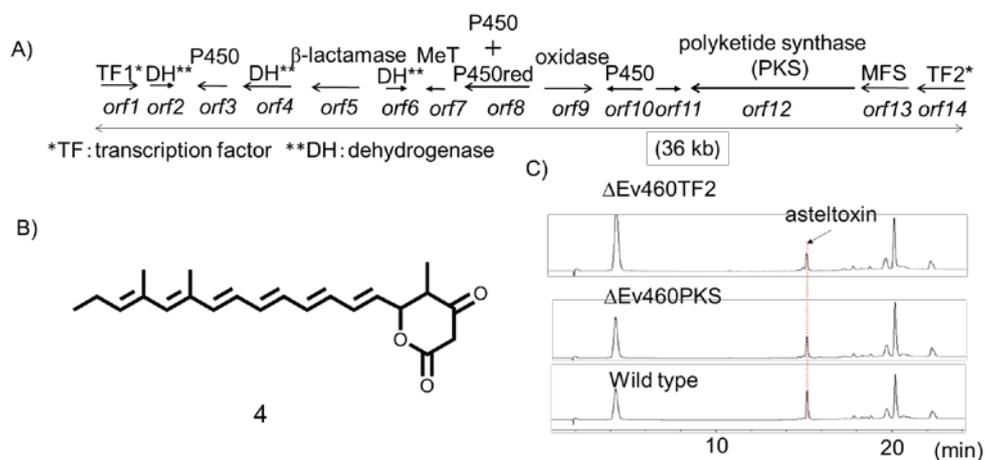


図2 Ev460 遺伝子クラスターの解析

A) Ev460 クラスター、B) Ev460PKS 産物、C) Δ Ev460 破壊株代謝物の HPLC 解析

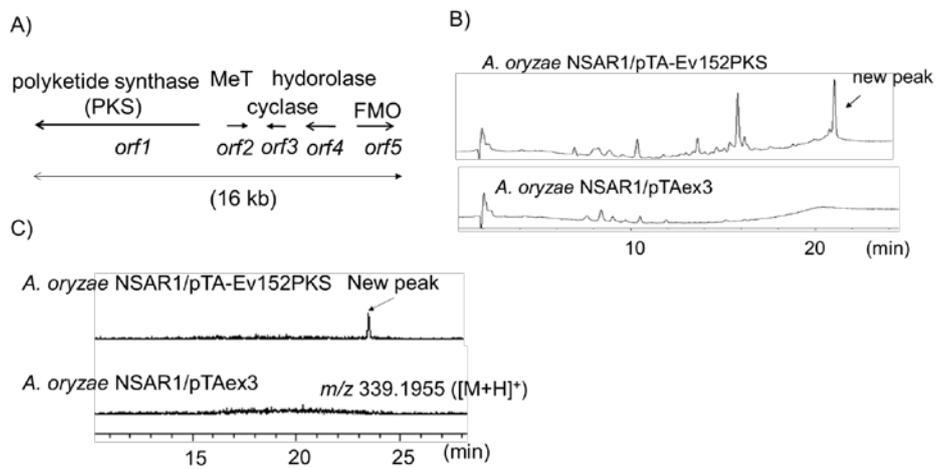


図3 Ev152 遺伝子クラスターの解析

A) Ev152 クラスター、B) *A. oryzae* 形質転換体代謝物の HPLC 解析、C) 形質転換体培養抽出物の m/z 339.1955 におけるマスクロマトグラム