

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 疫病菌交配ホルモン生合成機構の解明に向けた基盤研究および粘液細菌新規二次代謝産物の化学的研究

氏名 戸村 友彦

## 論文内容の要旨

### 1. 疫病菌交配ホルモン生合成機構の解明に向けた基盤研究

農作物に甚大な被害を与える疫病菌 (*Phytophthora* 属糸状菌) は、有性生殖により急速な薬剤耐性化を起こすため、その分子メカニズムの解明は疫病菌防除につながる重要な課題と言える。疫病菌の有性生殖は、2つの交配型 A1 と A2 が出会い、相手が分泌する交配ホルモン ( $\alpha 2$  と  $\alpha 1$ ) を認識することで開始される (Fig. 1)。これまでに両ホルモンの化学構造、生合成前駆体などの化学的基盤が整ったが、その作用機構や生合成機構など未解明な点が多い。本研究では、交配ホルモンの生合成機構の解明を目指した。

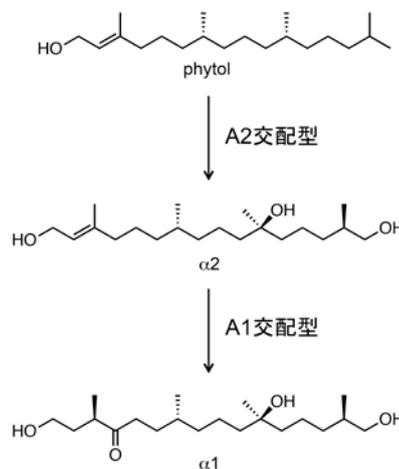


Fig. 1 交配ホルモンとその生合成

交配ホルモン生合成の反応様式から、生合成酵素はシトクローム P450 と仮定し、 $\alpha 1$  を生産する 2 種の疫病菌から粗タンパクを抽出し、シトクローム P450 の反応条件で前駆体である  $\alpha 2$  を加えて反応した。反応物を LC/MS で測定したところ、 $\alpha 2$  から  $\alpha 1$  への変換が確認され (それぞれ収率 0.2%、0.006%)、粗タンパク質に生合成酵素が含まれることを証明した。しかし、収率が極めて低いこと、A2 交配型を用いた  $\alpha 2$  生合成酵素アッセイでは  $\alpha 2$  生合成は確認されなかったことから、生化学的手法による生合成酵素の精製は困難と考え、遺伝子発現解析 (RNA-seq) により生合成酵素を探索することにした。RNA-seq 解析を行うにあたり、ゲノム情報が公開されている *P. nicotianae* と *P. capsici* についてホルモン生産量 (生合成酵素の発現) に影響を与え

る因子を種々検討した。その結果、培養日数、培地を工夫することとで RNA-seq に適した菌体サンプルを得た。最終的に 2 種 5 株の菌体から RNA を抽出し RNA-seq 解析を行った。シトクローム P450 に注目した結果、発現量比から *P. capsici* の  $\alpha 2$  生合成酵素候補 (3 つ)、*P. nicotianae* の  $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  生合成酵素候補 (それぞれ 1 つ、6 つ) を絞り込むことができた。組換えタンパク質を用いたこれら候補の機能解析や遺伝子サイレンシングが今後の課題である。

## 2. 粘液細菌新規二次代謝産物の化学的研究

希少微生物である粘液細菌は、様々な生理活性を示す二次代謝産物を生産するため、医薬品シードの探索源として注目されている。本研究では、特に培養が難しい海洋性粘液細菌の 1 種 *Enhygromyxa niigataensis* に着目し、新規二次代謝産物を探索することを目的とした。

*E. niigataensis* SNB-1 の培養液から脂溶性画分 1.9 g を得た。これをシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーおよび 2 回の ODS-HPLC で分離し、細胞毒性成分を 6.9 mg 得た。各種 NMR および MS 解析より、この成分は天然では極めて稀な decahydroacenaphthylene 骨格を有する新規ジテルペンであり、enhygromic acid (**1**) と命名した (Fig. 2)。さらに別のフラクションから、既知化合物 enhygrolide A および B の新規類縁体として deoxyenhygrolide A (**2**, 4.5 mg) および B (**3**, 17.6 mg) を得た (Fig. 2)。**1** の絶対配置は NOESY 相関、配座解析および CD スペクトル解析により、 $4S,5S,9R,10R,13S$  であると決定した。**1-3** の生物活性を評価したところ、**1** は B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性 ( $IC_{50} = 46 \mu M$ )、PC12 細胞の NGF による神経様突起伸長促進活性 (67%,  $10 \mu M$ )、*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性 ( $MIC = 8 \mu g/mL$ ) を示した。一方 **2** および **3** は、本研究で用いた生物検定では活性を示さなかった。**1** は 4 つの isoprene から成るためジテルペンであると考えられるが、近縁種 *E. salina* のゲノム情報を antiSMASH 解析したところ、ジテルペン環化酵素をコードする遺伝子はなく、セスキテルペン合成酵素である pentalenene synthase の相同配列が存在した。したがって、**1** は pentalenene の前駆体  $\alpha$ -humulene から環化とイソプレニル化を経て生合成されると推定した。

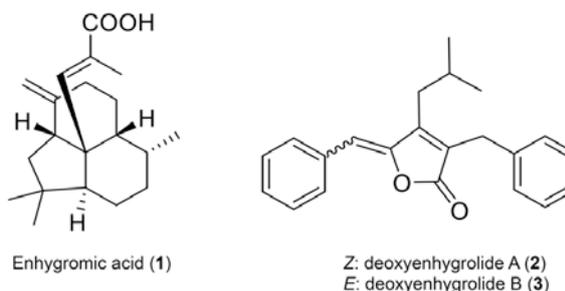


Fig. 2 **1-3** の構造