

細菌ポリイン類の生合成におけるポリイン形成機構の謎を解く

大阪公立大学大学院 農学研究科 甲斐 建次

【略歴】

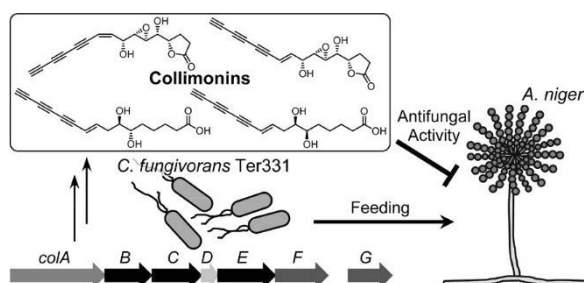
2002 年 3 月 大阪府立大学農学部応用生物化学科卒業
2007 年 5 月 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士後期課程修了
博士（農学）取得
2007 年 6 月 生物系特定産業技術研究支援センター博士研究員
2008 年 1 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 助教
2015 年 4 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 講師
2019 年 4 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 准教授
2022 年 4 月 大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻 准教授（大学統合のため）



末端から共役した炭素－炭素三重結合（ $C\equiv C$ ）を有する細菌ポリイン類は、顕著な抗真菌、抗卵菌、殺虫活性などを示す天然物である。しかし、細菌ポリイン類は一部の細菌種から、わずか 3 クラスの化合物しか発見されていなかった。細菌ポリイン類は、その構造的特徴から、乾燥や酸素、光に弱く、容易に重合反応を誘発してしまい、不溶性のポリマーへと変化して生物活性を失う。つまり、ポリイン部は高い生物活性に必須である。本研究では、30 年ぶりに新規細菌ポリインである collimonin 類と protegenin 類をそれぞれ *Collimonas fungivorans* Ter331 株と *Pseudomonas protegens* Cab57 株から単離・構造決定した。また、それぞれの化合物が col と pro 遺伝子クラスターによって生合成されることを、初発酵素遺伝子の欠損により確認した。さらに、遺伝子工学と生化学、有機化学の技術を融合し、ポリイン生合成時に生じる不安定な中間体分子と生合成経路の解明を進めた。

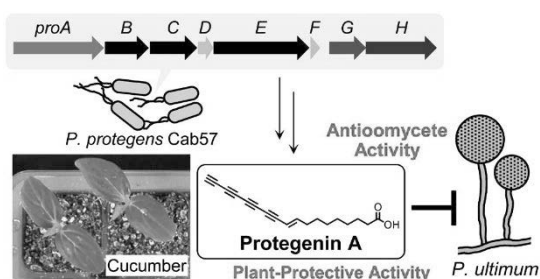
Collimonin 類の単離・構造決定と生物活性

C. fungivorans Ter331 株は、栄養制限条件下で真菌を資化して生育できるユニークなグラム陰性細菌である。Ter331 株は抗真菌性物質とキチナーゼを分泌し、それらが本現象に重要であること示唆されている。本菌が産生する細菌ポリイン類の存在が確認されていたが、非常に不安定な物質であったため単離・構造決定は不可能であると言われていた。この細菌ポリインを collimonin 類と名付け、その化学的な解明に着手することにした。培養物を酢酸エチルで抽出し、ODS カラムクロマトグラフィーで分画したところ、1 つの画分に強い抗真菌活性が観察された。この画分を HPLC で分析すると、4 種のポリイン化合物 collimonin A-D が含まれており、これらが本菌の抗真菌性に寄与することが予想された。化学的な解析の詳細は割愛するが、NMR と MS を中心とした解析により、collimonin 類の平面構造を決定し、化学合成と結晶スポンジ法（東大 藤田誠先生と共同研究）を駆使することで立体配置を決定した（右上図）。つまり、長年難攻不落であった天然物の化学構造の完全な解明を達成した。続いて、collimonin 類の *Aspergillus niger* に対する活性評価を行った。Ter331 株と *A. niger* の対峙培養を行った結果、*A. niger* の生育阻害、菌糸分岐、色素産生の誘導が確認された。Collimonin A、C、D は抗真菌活性と菌糸分岐活性を示した。Collimonin B は *A. niger* 菌糸の色素産生を誘導したが、抗真菌活性は示さなかった。また、collimonin C の飽和化合物は抗真菌活性を示さなかったことから、抗真菌活性に対する ene-triyne 部分構造の重要性が強く示唆された。



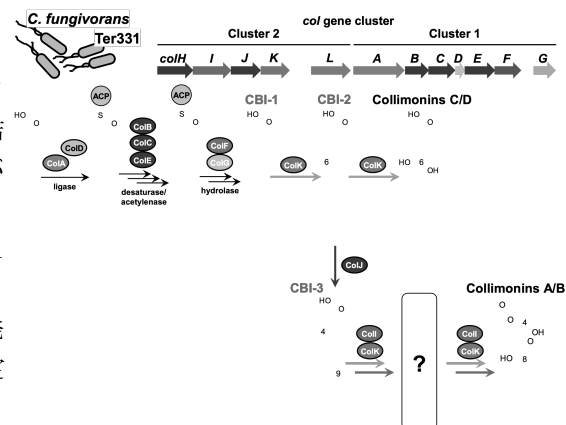
Protegenin 類の単離・構造決定と生物活性

P. protegens Cab57 株が作るポリイン類を protegenin 類、その生合成遺伝子を *pro* 遺伝子クラスターとそれぞれ名付けた。*pro* 遺伝子クラスターは、既存の細菌ポリイン類で最も単純なものであり、その構成から protegenin 類は細菌ポリイン類の基本骨格となることが予想された。これまでに本菌株で使用されてきた培養法を検討したが、protegenin 類を検出できなかった。Ter331 株で確立した培養法を適用すると、Cab57 株において protegenin A と B の産生が確認された。抽出・分析法を改善すると、既存の培養法でも protegenin C と D が見出された。これらの化合物は非常に不安定で、濃縮操作を誤ると褐色沈殿へと変化した。精製途中の乾固を回避し、逆相クロマトグラフィーを駆使して、protegenin 類を単離した。NMR と MS、誘導体化を組合わせて、それらの化学構造を決定した。Protegenin A と B には顕著な抗卵菌活性が認められた。一方、末端アルキン部が C=C、C-C となった protegenin C と D では弱い抗卵菌活性しか認められなかった。キュウリ芽生え-*Pythium ultimum* 感染系で *P. protegens* の植物保護効果を評価したところ、protegenin 産生が抗卵菌性に主因であることが分かった。以上の結果により、protegenin 類は長年見落とされてきた *P. protegens* の植物保護分子であることが示された。



Collimonin 類の生合成研究

Collimonin 類は *col* 遺伝子クラスターによって生合成されることを、初発酵素遺伝子 *colA* (fatty acyl-ACP ligase) の欠損により確認した。そこで本クラスター中に存在する酵素遺伝子を欠損し、作製した欠損株の培養物を LC/MS で解析することで、各酵素遺伝子の機能を調べることにした。なお、*C. fungivorans* Ter331 株の遺伝子欠損株作製手法は確立されていなかったため、我々のグループが世界で初めて確立させた。Cluster 1 に存在する各酵素を欠損させ、作製した欠損株の代謝プロファイルを用いて HPLC と LC/MS を用いて詳細に解析した。その結果、本クラスター中に存在する酵素群によって、C₁₆ 脂肪酸と ACP の結合、ene-triene 構造の構築、チオエステル部の加水分解が進行して、CBI-1 と名付けた生合成中間体が生成することを見出した。一方、cluster 2 に存在する遺伝子は、CBI-1 の修飾、輸送、原料となる C₁₆ 脂肪酸の供給に関わることが判明した。さらに、欠損株の共培養、遺伝子過剰発現、異種発現実験などを通して、collimonin 生合成の推定経路を世界で初めて提唱した。



今後の展望

C-C 結合を脱水素反応により C=C や C≡C 結合へと有機化学的に変換することは、現在でも不可能である。細菌ポリイン類の全合成研究も、多くが失敗に終わっている。Collimonin 類の ene-triene 部の形成には二機能性酵素 desaturase/acetylenase である ColB と ColC、desaturase である ColE が関与する。今後は、これら酵素がどのような機能分担をしているのかを明らかにしつつ、大腸菌などの異種発現系での再構築を検討して、ポリイン類の発酵生産に繋がる基盤を確立させたい。

謝辞

一緒に研究を進めてくれた学生諸氏と、日頃からサポートしてくれている家族に感謝致します。