

コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物の生合成に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2021-06-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 彰将 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/0000013317

(課程博士・様式7) (Doctoral qualification by coursework, Form 7)

学位論文要旨

Abstract of Doctoral Thesis

専攻：バイオサイエンス

氏名：伊藤 彰将

論文題目：コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物の生合成に関する研究

論文要旨：フェアリーリングとは、ゴルフ場や公園などでしばしば発見され、土壌中のキノコの菌糸体と植物の根の相互作用によって、植物の成長が輪状に促進ある時は逆に輪状に抑制される自然現象のことである。その後、その輪上にキノコの子実体が発生することもあり、現在までに世界中で約 60 種類の子実体を形成する大型担子菌類がフェアリーリングを形成することが報告されている。コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) は北半球温帯地域に広く生息しており、日本でも代表的なフェアリーリング形成菌の 1 種である。過去にコムラサキシメジ菌糸体の培養濾液から、シバの成長促進に関与する 2-azahypoxanthine (AHX) 及びシバの成長抑制に関与する imidazole-4-carboxamide (ICA) を発見し、両化合物がこの菌が惹き起こすフェアリーリングの原因物質であることを突き止めた。その後、AHX を処理したイネからその代謝産物として 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) が発見され、更に、AOH は AHX と同様な植物成長調節活性を示した。これら 3 種類の化合物は「フェアリー化合物」(fairy chemicals, FCs) と名付けられた。

FCs の植物における生物活性や内生は明らかにされた一方で、それらの生合成経路は不明な点が多く、特にキノコを含めた菌類における FCs の化学的研究はほとんど行われていない。植物において FCs は全ての生物に共通して存在するプリン代謝経路から生合成されることが判明し、元々キノコから発見された FCs は植物だけではなくキノコにも広く存在している可能性が考えられた。本研究では、様々なキノコにおける FCs の内生を証明すること、及び FCs の内 AHX と ICA に焦点を当て、これらが天然物として初めて単離されたコムラサキシメジ菌糸体における両化合物の生合成経路を解明することを目的とした。

当研究室によって開発された FCs の高感度検出法に従って、11 種類のキノコの抽出液における FCs の内生を確認した結果、分析した全てのキノコに FCs の内少なくとも 1 種が内生していることが判明した。また、コムラサキシメジ菌糸体においても植物と同様にプリン代謝経路によって AHX 及び ICA が生合成されるかを証明するために、プリン骨格の形成に必須のアミノ酸の 1 種である Gly の 2 個の炭素を ^{13}C で標識した $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Gly の投与実験を行った。その結果、Gly の 2 個の炭素が AHX 及び ICA のプリン様骨格の接合部の炭素と

して同時に取り込まれることが明らかになり、この菌においても両化合物がプリン代謝経路から生合成されることが判明した。更に、[2,5-¹³C₂] 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) の投与実験より、AHX 及び ICA はプリン代謝経路上の AICA を共通の前駆体として生合成されることが証明された。

過去の研究で、5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR) から AICA への変換反応には、adenine phosphoribosyltransferase (APRT) の関与が示唆されたため、大腸菌を発現用の宿主として組換え LsAPRT (rLsAPRT) を調製し、この機能解析を行った。その結果、rLsAPRT は確かに AICAR から AICA への変換活性を有しており、本酵素が AHX 及び ICA の生合成に関与していることが明らかになった。更に、rLsAPRT は ICA 及びそのリボヌクレオチド体である ICA-ribotide (ICAR) 間の変換反応を触媒し、ICA の生物活性は ICAR への代謝によって調節されている可能性が示唆された。

AHX は天然物として前例がない六員環に窒素原子が 3 個連続した 1,2,3-トリアジン骨格を有しており、その骨格形成メカニズムを検討した。コムラサキシメジ菌糸体における AICA から AHX への反応に関与する窒素源を探索するために、各種投与実験によりスクリーニングを行った結果、L-Arg から nitric oxide (NO) synthase (NOS) によって生成する NO が窒素源であることが示唆された。RNA-seq データを使用して正確な遺伝子予測を実行した結果、コムラサキシメジから 8 個の NOS 遺伝子を発見した。更に、LsNOSs のアミノ酸配列に基づいた系統発生解析では、8 個の LsNOSs は真菌型 NOSs クラスタの中で単系統のクレードを形成しており、これはコムラサキシメジが独自に NOS を進化させ、遺伝子重複によって NOS 遺伝子の数が 8 個まで増加したことを意味していた。続いて、高度に発現していた LsNOS2 遺伝子を大腸菌にて過剰発現させ、rLsNOS2 の NOS 活性を試験した。予想に反して、rLsNOS2 は L-Arg を基質として受け入れず、反応中間体である N^G-hydroxy-L-Arg のみを基質として認識した。この結果は、コムラサキシメジには未知の L-Arg の酸化機構が存在することを示唆した。最後に、N^G-hydroxy-L-Arg を NO 供与体、AICA 及び AICAR を NO 受容体として *in vitro* 酵素反応を行った結果、酵素反応後に反応液の pH を下げることによって非酵素的に AHX 及び AHX-ribotide (AHXR) が生成されることが判明した。NO の半減期はおおよそ数秒であり、発生した NO は速やかに NO₂⁻へと自発的に酸化される。更に、NO₂⁻は低 pH 条件下ではニトロソニウムイオン (NO⁺) にまで分解されることが知られている。以上の結果をまとめ、コムラサキシメジ菌糸体において何らかの酸化酵素によって L-Arg が N^G-hydroxy-L-Arg へと酸化され、LsNOSs の酵素反応によって N^G-hydroxy-L-Arg から NO₂⁻が生成し、更に、細胞内の局所的に pH が低くなった場所で NO⁺を活性種として AICA から AHX が非酵素的に産生されるという AHX の新たな生合成メカニズムを提案した。