

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

学 位 論 文 要 約

Summary 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

論文要約：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 (図 1)。

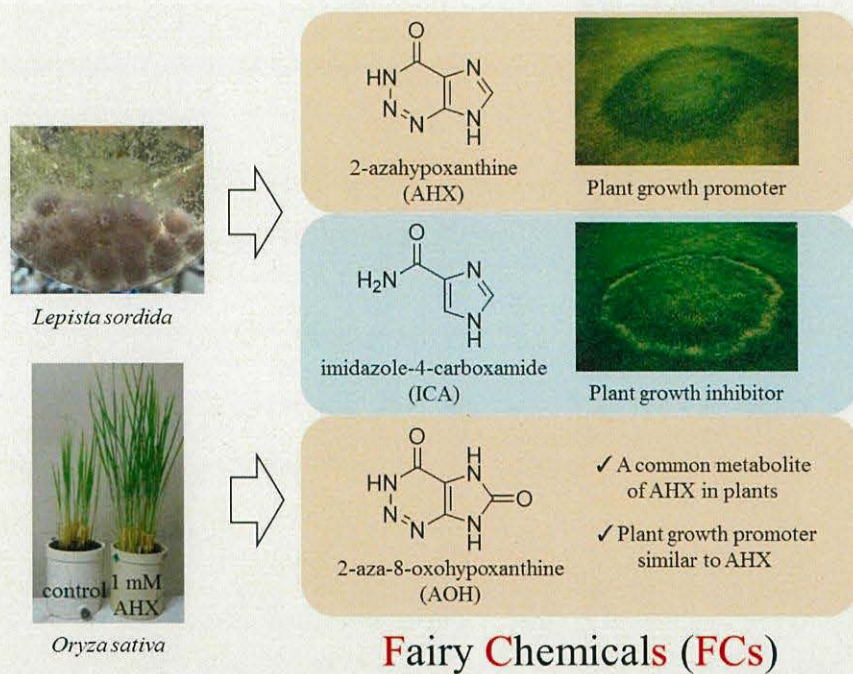


図1 コムラサキシメジ菌糸体培養濾液及び AHX を処理したイネからの FCs の発見

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 (図2)。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。

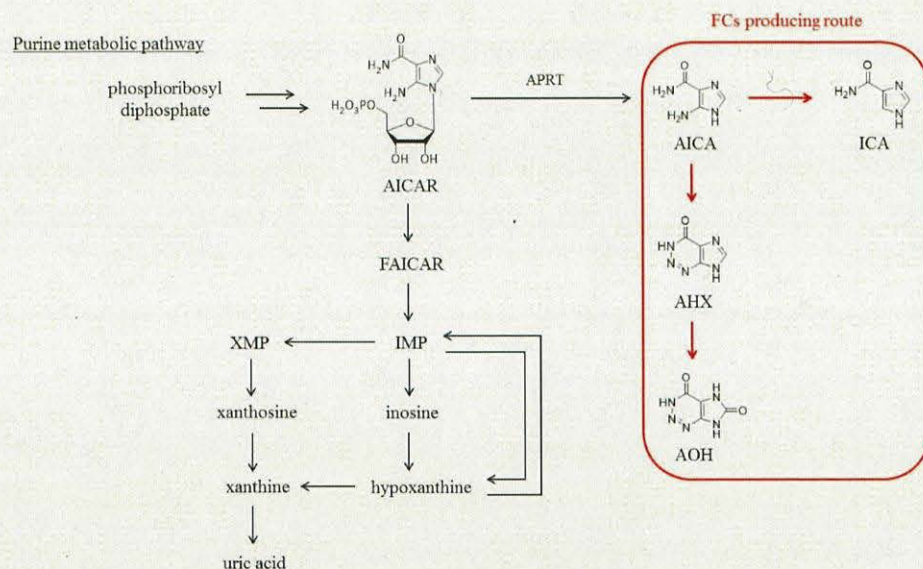


図2 FCsの生合成経路を含めたプリン代謝経路

黒色で示した経路はKEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes) から引用した. FCsの生合成経路は参考文献5,6,9及び13に記載されている. 2本の連続した同じ向きの矢印は多段階の酵素反応を表す. FAICAR, *N*-formyl-AICAR; XMP, xanthosine monophosphate.

1) キノコにおけるFCsの内生の証明

以前、11種類のキノコの子実体 {*Cortinarius caperatus* (シヨウゲンジ)、*Hypholoma sublateritium* (クリタケ)、*Tricholoma flavoviens* (キシメジ)、*Lepista sordida* (コムラサキシメジ)、*Lyophyllum connatum* (オシロイシメジ)、*Lepista nuda* (ムラサキシメジ)、*Pholiota adiposa* (ヌメリスギタケ)、*Grifola frondosa* (マイタケ)、*Flammulina velutipes* (エノキタケ)、*Lyophyllum decastes* (ハタケシメジ)、及び *Lyophyllum shimeji* (ホンシメジ)} にAHX及びAOHのいずれかが内生しているという予備的な試験が行われた。最近、当研究室はLC-MS/MSを使用した高感度且つ高効率なFCsの検出及び定量方法を開発し、この方法によって、従来は非常に低感度のためにほとんど不可能であった内因性ICAの検出が可能になった。そこで、上記の11種類のキノコの子実体及びコムラサキシメジの菌糸体をFCsの高感度検出法に従って抽出及び分画し、各溶出画分をLC-MS/MSで分析した。そ

の結果、表 1 のように多くのキノコに AHX 及び ICA が内生していることが判明し、特に、ICA は分析した全てのキノコから検出された。また、AOH はコムラサキシメジ及びムラサキシメジのみから検出された。

表 1 キノコにおける FCs の内生.

Fungal name	Family	AHX	AOH	ICA
Fruiting bodies				
<i>Cortinarius caperatus</i> (ショウゲンジ)	Cortinariaceae (フウセンタケ科)	nd	nd	d
<i>Hypholoma sublateritium</i> (クリタケ)	Strophariaceae (モエギタケ科)	d	nd	d
<i>Lyophyllum decastes</i> (ハタケシメジ)	Lyophyllaceae (シメジ科)	d	nd	d
<i>Tricholoma flavovirens</i> (キシメジ)	Tricholomataceae (キシメジ科)	d	nd	d
<i>Flammulina velutipes</i> (エノキタケ)	Physalacriaceae (タマバリタケ科)	d	nd	d
<i>Lyophyllum connatum</i> (オシロイシメジ)	Tricholomataceae (キシメジ科)	d	nd	d
<i>Lepista nuda</i> (ムラサキシメジ)	Tricholomataceae (キシメジ科)	d	d	d
<i>Grifola frondosa</i> (マイタケ)	Meripilaceae (トンビマイタケ科)	nd	nd	d
<i>Pholiota adiposa</i> (ヌメリシメジ)	Strophariaceae (モエギタケ科)	nd	nd	d
<i>Lyophyllum shimeji</i> (ホンシメジ)	Lyophyllaceae (シメジ科)	nd	nd	d
<i>Lepista sordida</i> (コムラサキシメジ)	Tricholomataceae (キシメジ科)	d	d	d
Mycelia				
<i>Lepista sordida</i> (コムラサキシメジ)	Tricholomataceae (キシメジ科)	d	d	d

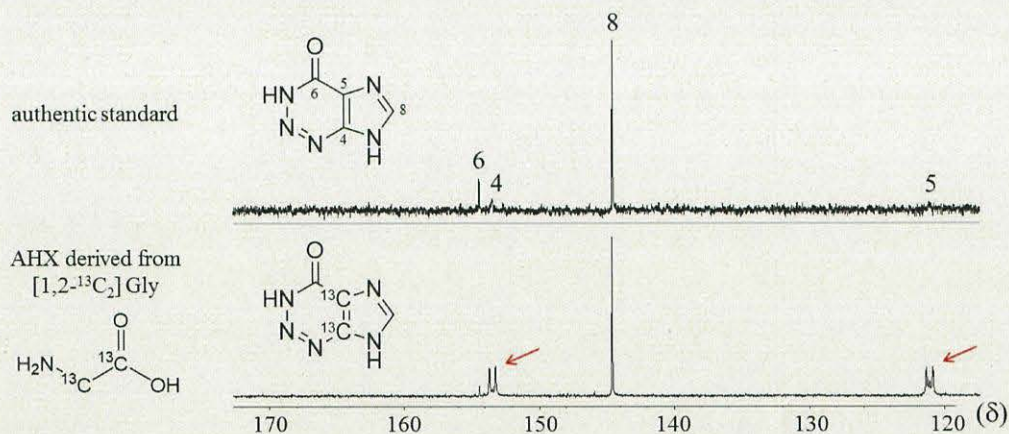
d: detected, nd: not detected.

2) 安定同位体ラベル化体の投与実験による AHX 及び ICA の生合成経路の解明

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、両化合物の 4 位及び 5 位の炭素のシグナルが他の炭素のシグナルと比較して顕著に増加し、互いにカップリングしてダブルットになったシグナルも確認された。Gly の 2 個の炭素が AHX 及び ICA のプリン様骨格の炭素として同時に取り込まれることが明らかになり、コムラサキシメジにおいても両化合物がプリン代謝経路によって生合成されることが判明した (図 3)。この結果は、LC-MS/MS でも確認した (図

4)。また、[2,5- $^{13}\text{C}_2$] 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。

A)



B)

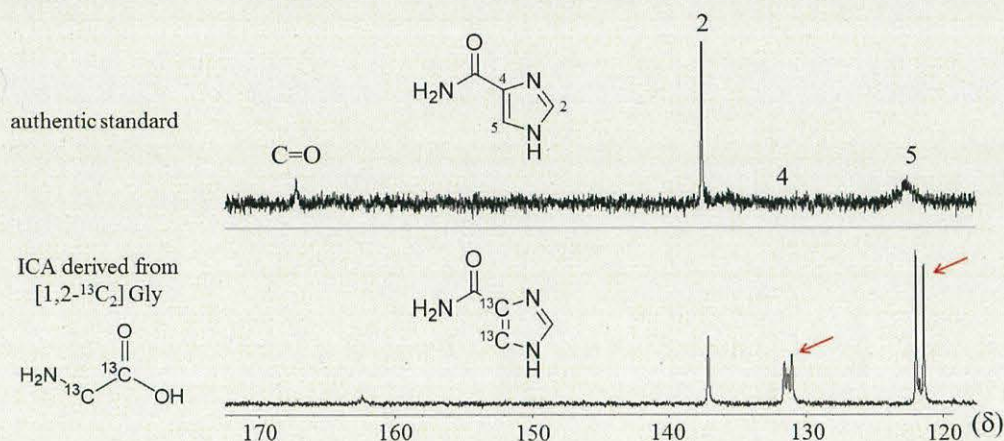
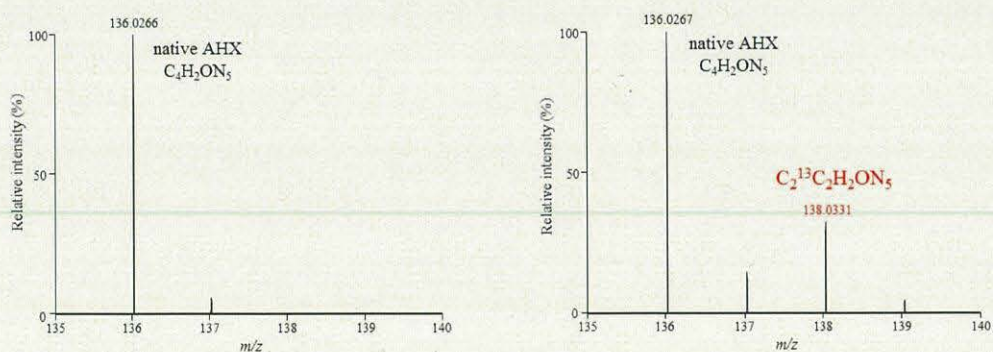


図3 (A) AHX の ^{13}C NMR スペクトル及び(B) ICA の ^{13}C NMR スペクトル (in CD_3OD)

A)



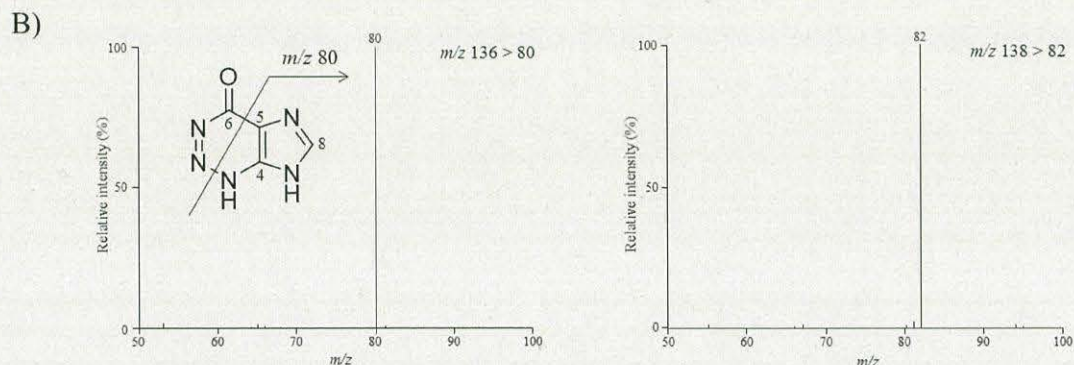


図4 AHX の (A) MS スペクトル及び (B) MS/MS スペクトル

(A) の左側が AHX 標品, 右側が $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Gly を処理したコムラサキシメジ菌糸体培養濾液から単離した AHX の MS スペクトルを表す. 赤字が $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Gly 由来の ^{13}C で標識されたシグナルを表す. (B) の左側が AHX 標品, 右側が $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Gly を処理した培養濾液から単離した AHX の 2 置換体の MS/MS スペクトルを表す. AHX はネガティブイオンモードで検出

3) AICAR と AICA 間の変換反応に関与する候補酵素 LsAPRT の機能解析

アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (adenine phosphoribosyltransferase ; APRT) は、adenine と AMP 間の変換反応を可逆的に触媒するだけではなく、adenine と比較すると基質特異性は劣るものの、hypoxanthine やプリン様骨格を有する AICA も基質として認識することができる。以前の研究で、コムラサキシメジ菌糸体への AICAR の投与実験が行われ、AICAR 処理後に AHX が培地に蓄積することが明らかになった。更に、LsAPRT 遺伝子の発現量が AICAR 処理によって増加し、コムラサキシメジ菌糸体において LsAPRT 遺伝子の転写応答と AHX の蓄積に正の相関が確認された。

LsAPRT の AHX 及び ICA の生合成への関与を詳細に検証することを目的とし、大腸菌を宿主とした LsAPRT の異種発現系を構築し、組換え LsAPRT (rLsAPRT) の機能解析を行った。その結果、rLsAPRT は AICAR から AICA の変換活性を有しており、LsAPRT 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 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。

4) AHX における 1,2,3-トリアジン骨格の形成機構の解明

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いる。コムラサキシメジ菌糸体における AICA から AHX の反応に関与する窒素源を探索するために、各種投与実験によってスクリーニングを行った結果、L-Arg から NOS によって生成する NO が窒素源であることが予想された。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、コムラサキシメジ菌糸体から 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 クラスターの中で独立したグループを形成しており、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 遺伝子の数を 8 個まで増加させたことが示唆された。

続いて、高度に発現していた LsNOS2 及び LsNOS8 遺伝子を実験菌にて過剰発現させ、rLsNOSs の NOS 活性を試験した。予想に反して、rLsNOSs 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 (NOHA) 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 酸化機構が存在することを示唆した。更に、NOHA を NO 供与体、AICA 及び AICAR を NO 受容体として使用し、rLsNOS2 の *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 AHXR が生成された。NO の半減期はおよそ数秒であり、発生した NO は速やかに NO_2^- へと自発的に酸化される。また、 NO_2^- は低 pH 条件下では NO^+ にまで分解される。rLsNOSs の機能解析の結果から、コムラサキシメジにおいて、何らかの酸化酵素によって L-Arg が NOHA へ

[illegible]

8