

《日本農芸化学会功績賞》



菌類の生理活性二次代謝産物に関する生物有機化学的研究

山形大学 名誉教授 佐々武史

真菌類の生理活性二次代謝産物の研究は、わが国において、イネ馬鹿苗病菌から植物ホルモンのジベレリンが発見されたのを契機として、植物のみならず微生物さらには動物細胞に対して生理活性を示す多様な有用物質探索へと発展してきている。また、これらの中のテルペン合成研究は、1990年代以降分子生物学の進展によって、生合成酵素遺伝子の取得など新たな局面に入ってきた。筆者はこの間40年に及ぶ一貫した当該分野の研究において、ジベレリン新生産菌の発見をはじめ、植物や微生物さらにはヒト癌細胞に対し生理活性を示す多数の新規化合物の単離、構造および生合成経路の解明を行い、利用面の検討を含め多くの新知見を得た。特に代表的な菌類ジテルペノイドの生合成研究において、分子生物学的手法を駆使し、菌類のジテルペン炭素骨格形成・環化酵素遺伝子の取得に初めて成功し、菌類ジテルペノイド生合成研究に新局面を拓いた。一方、菌類の特異なジテルペン配糖体の研究から、新規癌治療薬として開発・実用化が見込まれる化合物の創製に成功した。以下に概要を述べる。

1. 菌類有用ジテルペノイドの生合成経路の解明

植物成長調節物質の探索過程で、菅平のイネ科植物より分離されたジベレリン(GA)新生産菌、小房子囊菌の

*Phaeosphaeria* sp. L487を発見した。本菌は重要なGA<sub>1</sub>を単一最終産物として代謝蓄積することを示し、その量的発酵生産法(0.2~0.3 g/L)を構築した。また、植物の主要内生活性型GAであるGA<sub>1</sub>を、GA<sub>3</sub>生産菌のイネ馬鹿苗病菌にはないGA<sub>9</sub>からGA<sub>4/20</sub>を経る植物類似の経路で生合成することを明らかにした(図1-1)。フシコクシン(FC)は植物H<sup>+</sup>-ATPアーゼを活性化する高価な生化学試薬で、イタリアのアーモンド萎凋病菌から得られていた。本菌からごく微量のFCアグリコン生合成環状中間体炭化水素 fusicocca-2,10(14)-diene(FD)とその8β-オールを分離することに成功した。それらの立体選択的の合成を含む構造解明も行い、標識中間体の取込み実験により、それまでの仮想生合成中間体の構造を訂正した。これによりFCの生合成初期経路の全容が初めて明らかになった(図1-2)。この新知見を基に、特定部位をフッ素原子で置換した合成化合物の修飾生合成中間体から、新規フッ素化FCの効率的な半合成法を開発した。この半合成には、本邦産最初のFC生産菌として見いだしたモモ枝折れ病菌を用い、生理活性を高めた高機能化FCの調製に成功した(図1-2)。エリナシン(EC)はヤマブシタケから得られるNGF合成促進活性を有する物質で、その培養菌体から一連の生合成関連化合物 cyatha-3,12-

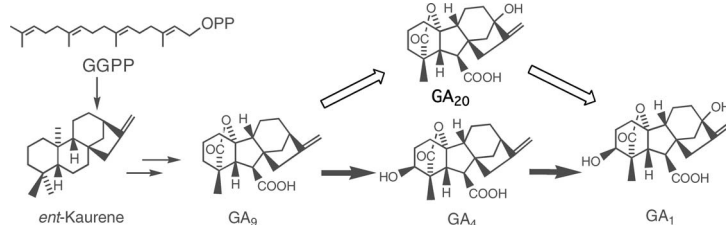


図 1-1 ジベレリン (GA) 新生産菌 *Phaeosphaeria* sp. L487 の新たな植物類似 GA<sub>1</sub> 生合成経路

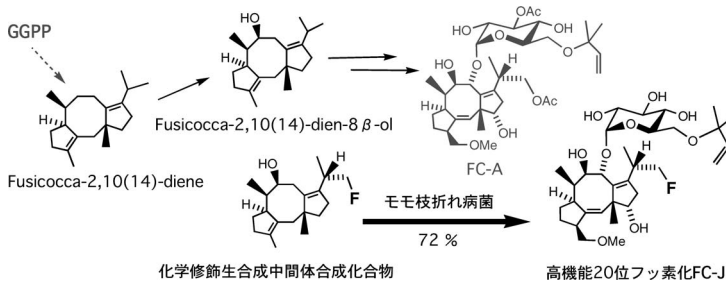


図 1-2 フシコクシン (FC) の生合成初期経路の解明と応用

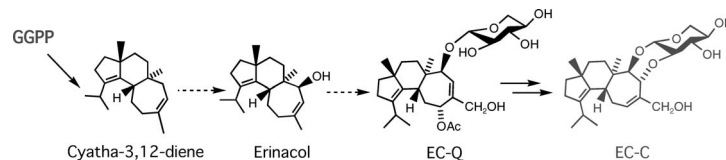


図 1-3 エリナシン (EC) の生合成中間体炭化水素と関連代謝産物の分離、および推定合成経路

diene とその 14β-オール、生合成前駆体 EC-Q などを分離し構造を決定した。これを基に GGPP から代表的な既知 EC-C に至る生合成経路の全体像を提示した (図 1-3)。

2. 代表的な菌類ゲルペンの環化酵素遺伝子の取得

菌類テルペン生合成研究に分子生物学的手法を導入することを考えた。GA 生産菌の小房子囊菌 *P. sp.* L487 とイネ馬鹿苗病菌について、*ent*-kaurene 生合成酵素遺伝子の直接的なクローニングを試み、前者において機能解析を含め世界で初めて成功した。両酵素が、鎖状の GGPP より中間体 (-)*ent*-CPP を経て一挙に四環性の *ent*-kaurene に環化・変換することを示した (以下図 2)。これは 2 種の酵素により各々触媒される植物のカウレン生合成の場合とは異なっていた。アフィジコリン (AC) は DNA ポリメラーゼ α を特異的に阻害する生化学試薬で、生合成中間体に (+)-*syn*-CPP の関与が推定され注目され

た。AC 生産テンサイ蛇眼病菌より AC の生合成環化酵素遺伝子の取得を試み、機能解析も含めて成功した。本酵素は GGPP から *syn*-CPP を経て一挙に四環性の AC 生合成中間体 aphidicolan-16β-ol を与えた。また、GGPP 生合成遺伝子を含む一連の AC 生合成遺伝子が染色体上でクラスターを形成していることを突き止め、その酵素的合成に関し興味深い知見を得た。一方、該当菌の各 GGPP 生合成遺伝子を基点とする染色体遺伝子歩行により、網羅的間接的に環化酵素遺伝子をクローニングする新たな方法を試みた。この方法により、アーモンド萎凋病菌から、(+)-CPP を経て GGPP より一挙に phyllocladan-16 α-ol を与える珍しい環化酵素を取得した。さらに、モモ枝折れ病菌から同方法により FD 生合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析に初めて成功した。驚いたことに、本酵素は C<sub>5</sub>-イソプレン基質から GGPP をイソプレン鎖伸長反応により合成し、

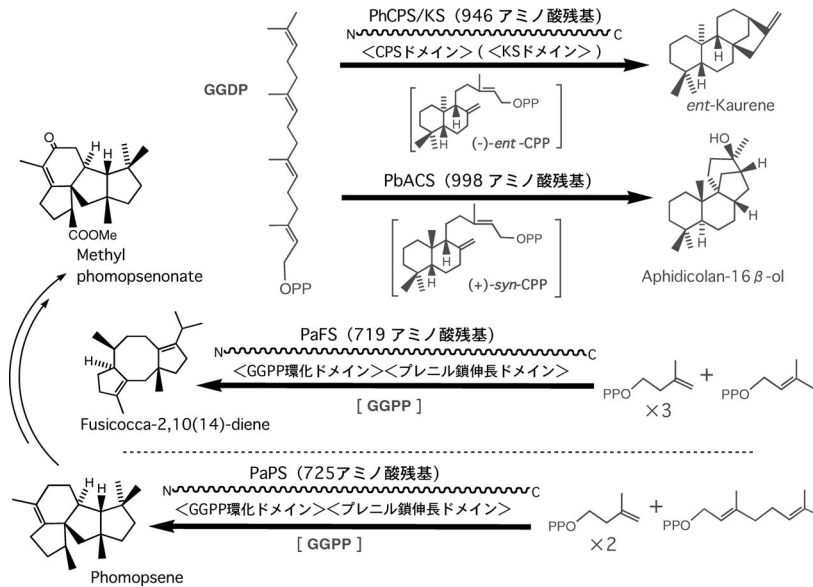


図 2 代表的な菌類ゲルペンの環化酵素遺伝子の取得、および新規二次代謝テルペンの探索例

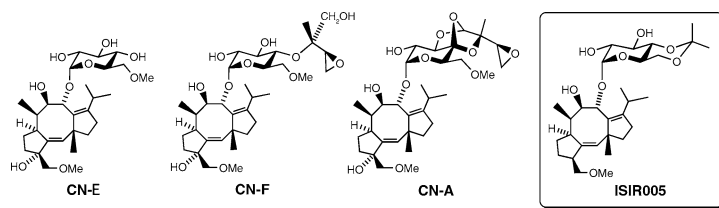


図 3-1 コチレニン (CN) A と関連化合物、および新規フシコクシン系リード化合物の構造

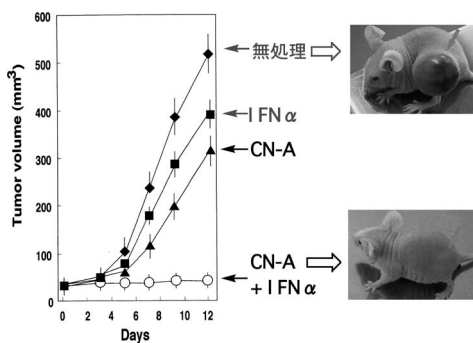


図 3-2 CN-A・インターフェロン α 併用によるヒト肺癌細胞 (PC14) 接種マウスにおける癌増殖抑制効果 (PC14 細胞のアポトーシスを誘導)

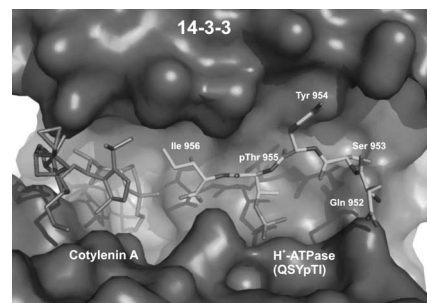


図 3-3 CN-A/14-3-3 タンパク質/植物 H<sup>+</sup>-ATPase アーゼ C 末部リン酸化ペプチドの三者会合体の結晶構造 (C. Oecking 教授よりの私信)

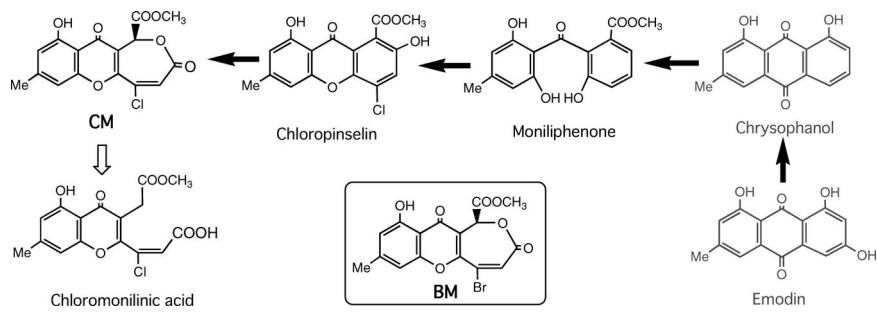


図 4-1 抗真菌物質クロロモニリン (CM) とプロモモニリン (BM) の構造, および生成と代謝分解経路

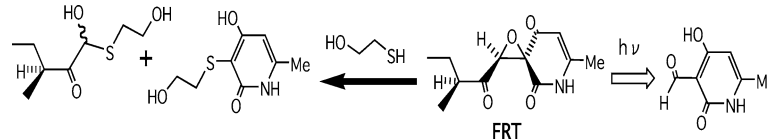


図 4-2 リング輪紋病菌の褐変誘起植物毒素 (FRT) の構造, および特異な反応と分解

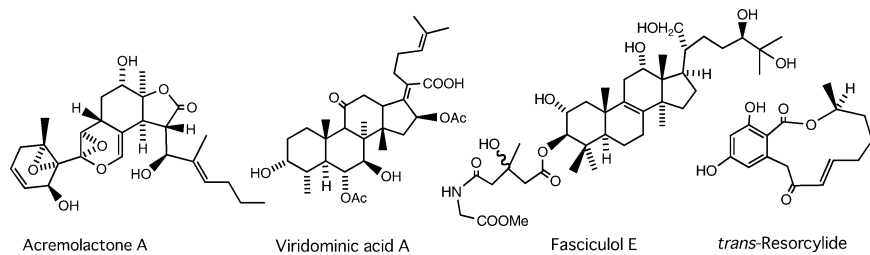


図 5 除草活性物質, および植物成長阻害活性に加え他の生理活性も有する化合物

かつこの GGDP を 5/8/5-三環性 FD に環化・変換する一連の生合成反応を触媒した。本酵素は多機能キメラジテルペン環化酵素の最初の例で, 組換え大腸菌による FD の量的調製が可能となった。また, FD 関連炭化水素の精査結果も踏まえ, GGPP から FD への環化反応機構の解明も進めた。本酵素遺伝子は興味深いことに菌類に特有と考えられることから, 菌類の高いテルペン産生能を裏づける興味深い知見となった。FD 生合成遺伝子を含む FC 生合成遺伝子クラスターの一部取得にも成功した。加えて, 本菌から 2 番目のキメラジテルペン環化酵素遺伝子の取得を基に, 新規 5/5/6/5-四環性炭化水素ホモブセンを見だし, 加えて代謝産物の新規化合物ホモブセノナートの分離にも成功している。これは新たな二次代謝テルペノイドの探索例と考えている。

### 3. 新規分化誘導物質の発見と癌治療薬の開発研究

不完全糸状菌 *Cladosporium* sp. 501-7W から, サイトカニン様活性を示す新規物質コチレニン (CN) A を分離した。微アルカリ性下特異な CN 発酵生産法を構築し, 一連の生合成関連化合物とアグリコンの分離・取得に成功した。これを基に, 複雑な構造をもつジテルペン配糖体 CN-A を含む一連の構造解明 (図 3-1) を行い, CN 類の雑草などに対する強い発芽誘起活性を明らかにした。驚くべきことに, 四半世紀を経て CN-A はヒト急性白血病細胞に対してレチノイン酸薬に匹敵する強い分化誘導活性を示すことが明らかとなった。加えて, CN-A は  $\text{INF-}\alpha$  の共存下顕著な相乗作用を示すことが判明し, 両者のより少ない薬量の併用によってヒトの肺癌細胞 (図 3-2) や卵巣癌細胞の増殖が強く抑制された。この抗癌作用はヌードマウスを用いた動物実験で確認され, 細胞における生死の制御などにかかわる重要なアダプタータンパク質 14-3-3 が関与する (図

3-3) アポトーシスの誘導に基づくものと考えられ, 新しい作用機序が期待され注目されている。入手ができなくなった CN-A に代わり関連化合物 FC (分化誘導活性はない) を素材にして, 卵巣癌等の難治療固形癌の治療薬開発研究を進めた。モモ枝折れ病菌を用い, FC-A 類の大量生産法 (0.7~0.9 g/L) を構築し, 実験室で数百グラムの FC-A 結晶などを調製した。これから多数の誘導体を調製することにより, CN-A に匹敵する分化誘導活性を有する新規 FC 誘導体 (ISIR005, 図 3-1) の創製に成功した。糖側鎖に反応性エポキシドを有しないこの ISIR005 を基点に, 現在新規癌治療薬の実用化を視野に入れた研究を進めている。

### 4. 植物病原菌類の抗真菌活性物質および植物毒素の研究

オウトウ灰星病菌から強い抗真菌活性を示す新規物質クロロモニリンを分離し構造を決定した。臭素イオン添加培養でプロモモニリンを調製し, 特徴的なキサントン系七員環ラクトンの生合成と代謝分解に関し興味深い反応を見いだした (図 4-1)。また, 新抗菌性物質としてピクノフォリン, マクロフォリン類, ピレノリド類などを分離した。リング輪紋病 (図 4-2), カキ円星落葉病, オウトウ灰星病, イネいもち病などの病原糸状菌から植物毒素類を分離し構造を明らかにした。

### 5. 植物成長調節活性物質, その他の生理活性物質の研究

菌類の生産する植物成長調節活性物質として, (+)-2-(3-indolyl) propionate 系の アクレモオーキシニン, (+)-4'-hydroxy- $\gamma$ -ionylideneacetic acid, グラフィノン, ラジクロン酸類などを分離した。Acremonium 属菌株から, 市販合成除草剤に匹敵する新規除草活性物質アクレモラクトン A と関連化合物を分離し構造を決定した。また, 植物成長阻害活性に加え他の生物活性も示すピリドミニン酸類, *trans*-レゾルシド類,

ベニシリド、ファシクロールなどを分離した(図5)。この他、(+)-メントール(ハッカ成分の光学対掌体)と関連化合物を分離し、かびメントール類の生合成経路について考察した。

本研究は、主に山形大学農学部で行われたもので、三浦勇吉先生、池田道正先生、貫名 学先生、三橋 渉先生、豊増知伸先生、塩野義人先生、ならびに関係の岩手連合大学院を含む大学院修了生、学部卒業生に深く御礼申し上げます。共同研究で多大なご協力をいただいた、理化学研究所植物科学センター・神谷勇治先生、川出 洋博士(現在 東京農工大学農学部)、大阪大学産業科学研究所教授・加藤修雄先生、北海道大学理学研究院教授・及川英秋先生、島根大学医学部教授・本間良夫先生、宇都宮大学野生植物研究センター教授・米山弘一先生、理

化学研究所基幹研究所・旭 健一博士、富山県立大学生物工学研究センター准教授・大利 徹先生、茨城大学農学部准教授・戸嶋浩明先生に心から感謝いたします。また、研究にご協力をいただいた旧三菱化成総研・三川 隆博士、果樹研究所リンゴ研究拠点・兼松聡子博士、旧山形県立園芸試験場・大沼幸男氏、イタリアバリ大教授・A. Graniti 先生、ドイツチュウビンゲン大学教授・C. Oecking 先生をはじめ、多くの先生、先輩、同輩、後輩の方々に深く感謝します。最後に、本研究の入口におけるご指導とご鞭撻を賜った名古屋大学農学部教授・故 田村悌一先生、名城大学名誉教授・青木博夫先生、名古屋大学名誉教授・故 宗像 桂先生、同・丸茂晋吾先生に厚く御礼申し上げます。