

エナンチオマー及びジアステレオマーを生産する3種の *Aspergillus* 属真菌の生合成機構に関する研究

Study on biosynthetic pathways of three *Aspergillus* fungi producing enantiomers and diastereomers

(日本薬学会推薦)

代表研究者	熊本大学	塚本 佐知子	Kumamoto University	Sachiko TSUKAMOTO
協同研究者	コロラド州立大学	ロバート・ウイリアムズ	Colorado State University	Robert M. WILLIAMS
	ミシガン大学	デヴィッド・シャーマン	University of Michigan	David H. SHERMAN
	デンマーク工科大学	エン・フリスヴァード	Technical University of Denmark	Jens C. FRISVAD

We have reported the isolation of biosynthetically interesting prenylated indole alkaloids from three fungi of the genus *Aspergillus*. (-)-Notoamide B, (+)-stephacidin A, and their congeners were isolated from *A. protuberus* MF297-2, which was isolated from the mussel in the Noto Peninsula. Successively, their enantiomers, (+)-notoamide B and (-)-stephacidin A, were obtained from *A. amoenus* NRRL 356002, which was isolated from the mushroom in Hawaii. Recently, we reported the isolation of seven novel prenylated indole alkaloids, the taichunamides A-G, along with (+)-6-*epi*-stephacidin A and (+)-versicolamide B from *A. taichungensis* IBT 19404, which was isolated from the soil in Taiwan. Interestingly, stephacidin A/notoamide B and 6-*epi*-stephacidin A/versicolamide B contain a *syn*- and *anti*-bicyclo[2.2.2]diazaoctane cores, respectively, and these cores are plausibly formed through an intramolecular Diels–Alder reaction from a common precursor, notoamide S. In this study, we planed to prepare NotH, which would be responsible for the intramolecular Diels–Alder reaction using the expression vector for wheat germ cell-free protein synthesis.

研究目的

私たちは、3種の *Aspergillus* 属真菌が生産するプレニル化インドールアルカロイドの生合成機構の解明を行っている。本研究は、*A. protuberus*¹ (能登半島で採取したイガイから単離) と *A. amoenus*² (ハワイの森林で採取したキノコから単離) が互いにエナンチオマー (鏡像異性体) の関係にある (±)-notoamide B と (±)-stephacidin A (Fig. 1) をそれぞれ生成するという私たちの発見から始まった。そして、Williams 教授 (米国コロラド州立大学、有機合成化学が専門) が前駆体と考えられる ¹³C ラベル化合物を合成し、それら化合物を用いて私たちが取込み実験を行い生成物の構造を解析することにより生合成経路の大部分を確立した。そして、Sherman 教授 (米国ミシガン大学、分子生物学が専門) とは、バイオインフォマ

ティックス及び生化学的手法により、生合成過程で機能している酵素の多くを解明した^{3,4}。また、*A. taichungensis*⁵ (台湾の土壌から単離) から notoamide B と stephacidin A のジアステレオマーに相当する versicolamide B と 6-*epi*-stephacidin A (Fig. 1) を確認することができた。(±)-Notoamide B、(±)-stephacidin A、(+)-versicolamide B および(+)-6-*epi*-stephacidin A は、共通の基質である notoamide S から分子内 Diels–Alder 反応によるビシクロ環の形成を通して生成したと考えられる (Scheme 1)。したがって、3種の真菌はそれぞれ notoamide S から立体化学の異なる異性体を与える Diels–Alderase を有していると考えられる。しかし、3種の真菌において、アルカロイド生合成酵素群のアミノ酸配列は相同性が高いので、Diels–Alder 反応を触媒する酵素の構造にも大き

な違いはないと推定している。

当初、分子内 Diels–Alder 反応により stephacidin A

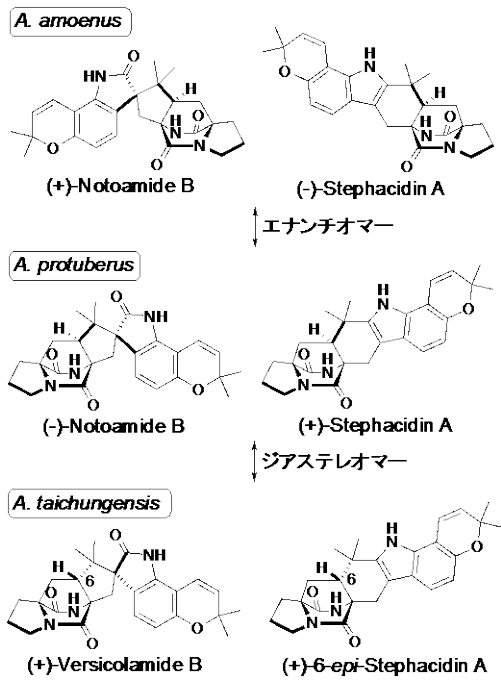
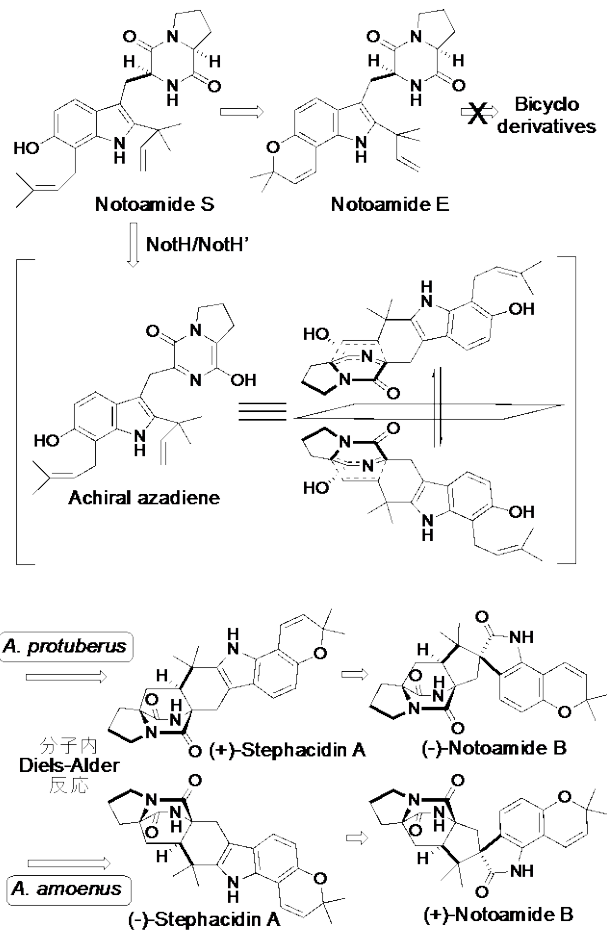


Fig. 1. Structures of prenylated indole alkaloids from three fungi of the genus *Aspergillus*.

や notoamide B のようなビスシクロ環を有する化合物の前駆体は notoamide E であると推定した (Scheme 1)。そして、合成した $[^{13}\text{C}_2]$ notoamide E を真菌培養液に添加したところ、ビスシクロ環を含まない $[^{13}\text{C}_2]$ notoamides C, D は得られたが $[^{13}\text{C}_2]$ stephacidin A や $[^{13}\text{C}_2]$ notoamide B は得られなかった⁶。そこで、 $[^{13}\text{C}_2]$ notoamide S を合成し真菌培養液に添加したところ、 $[^{13}\text{C}_2]$ stephacidin A や $[^{13}\text{C}_2]$ notoamide B が得られた⁷。一方、遺伝子クラスター解析の結果から、notoamide S から stephacidin A や notoamide B へと変換する酵素は NotH (*A. protuberus*)/NotH' (*A. amoenus*) であると考えられた (Scheme 1)³。そこで、本研究では NotH を発現させて notoamide S から stephacidin A あるいは notoamide B へと変換するかどうかを確認するため研究を行った。

研究経過

これまでに天然物の生合成に関与する Diels–Alderase として発見されたものの中には、初めに Diels–Alder 反応の基質を提供する反応を触媒し、次に Diels–Alder 反応を触媒するという2段階の触媒機構を示すものが知られている。*A. protuberus* と *A. amoenus* における notoamide 生合成酵素群 (NotA–J



Scheme 1. Possible biosynthetic pathway of notoamide B and stephacidin A from notoamide S via intramolecular Diels–Alder reaction in *A. protuberus* and *A. amoenus*.

及び NotA'–J') には、単独で Diels–Alder 反応を触媒していると考えられる酵素は存在していない³。したがって、*A. taichungensis* も含めて3種の *Aspergillus* が有する Diels–Alderase も2段階目の反応で Diels–Alder 反応を触媒していると推定した。基質 notoamide S から Diels–Alder 反応が進行するためには酸化段階を経由するので、生合成酵素群の中の5種類の酸化酵素 (NotB, NotD, NotG, NotH, NotI) のいずれかが Diels–Alder 反応に関与していると推定した。そこで、基質となる化合物をそれぞれ反応させたところ、NotH 以外はそれぞれの基質となる化合物が明らかとなったので、notoamide S から stephacidin A さらに notoamide B を与える酵素は NotH であると推定し、NotH の発現を試みた。

NotH はアミノ酸配列から膜タンパク質であると予想した。そこで、実際に酵素として機能している部分は膜に埋もれていない部分であると考え、大腸菌での発現を試みた。しかし、NotH を発現することはできなかった。そこで、遠藤弥重太教授 (愛媛大

学)により開発されたコムギ胚芽無細胞タンパク質合成技術を適用した。コムギ胚芽抽出液に NotH の mRNA を加え、さらに反応液に notoamide S を添加したが、stephacidin A や notoamide B は LCMS 分析で検出できなかった。

ところで、分子内 Diels–Alder 反応により notoamide S から生成する異性体は、遷移状態のジエンとジエノファイルの向きの組み合わせが 4 通りとなるので、その結果 4 種類の異性体が生成すると考えられる。しかし、これまで成分を調べた 3 種類の真菌 (*A. protuberus*, *A. amoenus* および *A. taichungensis*) からは、(-)-versicolamide B は全く検出されていない。そこで、それら 3 種の真菌とは系統分類学的に異なる 6 種類の *Aspergillus* 属真菌 (*A. subalbidus* IBT 14197, *A. muricatus* IBT 13866, *A. bridgeri* IBT 32371, *A. jensenii* IBT 32279, *A. creber* IBT 22308, *A. venenatus* IBT 32281) を協同研究者の Frisvad 教授から入手し (-)-versicolamide B を生成しているかどうか調べた。しかし、いずれの真菌からも (-)-versicolamide B は検出できなかった。現在も継続して系統分類学的に異なる *Aspergillus* 属真菌を用いて (-)-versicolamide B を探索している。

考察

3 種の近縁の真菌において、分子内 Diels–Alder 反応により単一の基質から異なるエナンチオマーやジアステレオマーが生成するという発見は、これまで全く知られていない。したがって、3 種の *Aspergillus* 属真菌 (*A. protuberus*, *A. amoenus* および *A. taichungensis*) の生合成機構に関する研究は、学術的に大変興味深いと考えている。そこで、本代表研究者は協同研究者らと協力して、3 種の *Aspergillus* 属真菌において機能している Diels–Alderase の構造を明らかにするため研究を進めている。3 種の *Aspergillus* 属真菌において notoamide 類の生合成に関与している遺伝子クラスターのアミノ酸配列の相性は高いので、Diels–Alderase においても基質を認識するアミノ酸がわずかに異なるだけで Diels–Alder 反応の配向が大きく異なると考えられる。本研究では、Diels–Alderase を発現させることができなかったが、今後も研究を継続し、3 種の *Aspergillus* 属真菌における反応の違いが生じる分子基盤を明らかにしたいと考えている。

参考文献

1. Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2254–2256.
2. Greshock, T. J.; Grubbs, A. W.; Jiao, P.; Wicklow, D. T.; Gloer, J. B.; Williams, R. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3573–3577.
3. Ding, Y.; de Wet, J. R.; Cavalcoli, J.; Li, S.; Greshock, T. J.; Miller, K. A.; Finefield, J. M.; Sunderhaus, J. D.; McAfoos, T. J.; Tsukamoto, S.; Williams, R. M.; Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12733–12740.
4. Li, S.; Srinivasan, K.; Tran, H.; Yu, F.; Finefield, J. M.; Sunderhaus, J. D.; McAfoos, T. J.; Tsukamoto, S.; Williams, R. M.; Sherman, D. H. *MedChemComm* **2012**, *3*, 987–996.
5. Kagiya, I.; Kato, H.; Nehira, T.; Frisvad, J. C.; Sherman, D. H.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1128–1132.
6. Tsukamoto, S.; Kato, H.; Greshock, T. J.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3834–3835.
7. Finefield, J. M.; Kato, H.; Greshock, T. J.; Sherman, D. H.; Tsukamoto, S.; Williams, R. M. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3802–3805.

研究の発表

口頭発表

1. Sachiko Tsukamoto. Fungal metabolites formed by facially specific IMDA reactions and unprecedented prenylated indole alkaloids; 8th US–Japan Symposium (21st Century Innovations in Natural Products); Honolulu (USA); 2016. 11. 14–17.
2. 杉本佳代、貞廣優作、賀儀山一平、加藤光、塚本佐知子; *Aspergillus amoenus* (NRRL35600 株) が産生する Notoamide 類縁体の構造と推定生合成経路; 第 33 回日本薬学会九州支部大会、鹿児島、2016. 12. 3–4.
3. 瀬邊桃菜、永木美夏、賀儀山一平、加藤光、塚本佐知子; *Aspergillus taichungensis* 由来の新規ジテルペンの構造解析と抗菌活性; 日本薬学会第 137 年会、仙台、2017. 3. 24–27.
4. 塚本佐知子. 海洋天然物化学の魅力. 第 54 回数理解医学研究会 数理医学セミナー、大阪、2017. 7.

- 12.
5. 甲斐愛佳、杉本佳代、加藤光、塚本佐知子；*Aspergillus amoenus* が産生する新規 notoamide 類縁体；日本生薬学会第 64 回年会、千葉、2017. 9. 9-10.
6. 甲斐 愛佳、杉本 佳代、加藤 光、塚本 佐知子；*Aspergillus amoenus* から得られた新規 notoamide 類縁体の構造と speramide A の構造訂正について；第 34 回日本薬学会九州支部大会、熊本、2017. 11. 25-26.
7. 甲斐愛佳、加藤 光、塚本 佐知子；*Aspergillus amoenus* が産生する 3-oxyindole 骨格を有する新

規インドールアルカロイドの構造と speramide A の構造訂正について；日本薬学会第 138 年会、金沢、2018. 3. 25-28.

誌上発表

1. Klas, K.; Kato, H.; Frisvad, J. C.; Yu, F.; Newmister, S.; Fraley, A.; Sherman, D. H.; Tsukamoto, S.; Williams, R. M. Structural and stereochemical diversity in prenylated indole alkaloids containing the bicyclo[2.2.2]diazaoctane ring system from marine and terrestrial fungi. *Nat. Prod. Rep.* in press.