

担子菌由来抗腫瘍物質 melleolide の全生合成(2)

(北大院理¹⁾ ○深谷 充功¹・尾関 美衣菜¹・尾崎 太郎¹・永木 愛一郎¹・南 篤志¹・及川 英秋¹

Total biosynthesis of the basidiomycete derived antitumor substance melleolide(2) (¹*Graduate School of Science, Hokkaido University*) ○Mitsunori Fukaya,¹ Miina Ozeki,¹ Taro Ozaki,¹ Aiichiro Nagaki,¹ Atsushi Minami,¹ Hideaki Oikawa¹

Melleolide produced by basidiomycota fungi is an orselinic acid ester of protoilludane-type sesquiterpene alcohols, and its analogs are expected to be lead compounds for anticancer drugs. In our previous studies, we identified the biosynthetic gene cluster and characterized the function of several biosynthetic enzymes through heterologous expression and in vitro enzymatic reactions involving in the biosynthesis of armillyl orsellinate (**2**). In this study, we focused on the late-stage biosynthesis from **2** to 1 α -hydroxymelleolide (**3**). Heterologous expression studies as well as biotransformation experiments using **2** revealed the involvement of flavoenzyme in the biosynthesis. The function was further confirmed by in vitro enzymatic reaction using cell-free extracts to afford two different products. Details will be discussed in the presentation.

担子菌が生産する melleolide は、4-5-6 員環が縮環した protoilludane 型セスキテルペンアルコールのオルセリン酸エステルであり、その類縁体は抗癌剤のリード化合物などとして期待されている。2010 年に melleolide 生合成遺伝子クラスターが報告されているものの、生合成酵素の機能解析は断片的にしか行われておらず、その生合成経路には不明な点が多い。こうした中、我々は、コア構造を与える環化酵素の機能解析、生成した環化体 **1** に対する酸化的修飾反応を担うチトクローム P450 の機能解析などを行うことで、melleolide 生合成の鍵中間体が armillyl orsellinate (**2**)であることを以前の本会において報告した。今回、微生物変換実験、セルフリー酵素を用いた実験により、フラビン依存性酸化酵素が生合成後期の鍵酵素であることを特定した。

以前に構築した **2** 生産株は、500 mg/L という高い生産量で **2** を生産する。この特徴をいかし、**2** を基質とした微生物変換実験により、後期生合成に関与する修飾酵素の絞り込みを行った。残された修飾酵素遺伝子を様々な組み合わせで導入した形質転換体を構築して微生物変換実験を行ったところ、フラビン依存性酸化酵素が酸化を起点とした二重結合の異性化反応を触媒することを明らかにした。本酵素の機能について明らかにするため、現在、麹菌形質転換体からセルフリーを調製して in vitro 反応を検討している。また、他酵素との共発現により、1 α -hydroxymelleolide (**3**)の異種生産にも成功した。当日は、その詳細についても発表する予定である。

