



Title	昆虫病原性糸状菌Lecanicillium sp.が生産する抗真菌リポペプチド化合物verlamelinの生合成に関する研究
Author(s)	石堂, 圭一
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52171
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (石 堂 圭 一)

論文題名

昆虫病原性糸状菌*Lecanicillium* sp.が生産する抗真菌リポペプチド化合物verlamelinの生合成に関する研究

論文内容の要旨

1 章 背景および目的

Lecanicillium 属昆虫病原性糸状菌はアブラムシやコナジラミ等の害虫を死に至らしめること、また、うどんこ病、さび病等の植物病原菌と拮抗することから、汎用的な生物農薬としての応用が期待されている。さらに、本菌は生理活性物質の生産菌であり、生産される化合物が昆虫病原性、植物病原菌との拮抗と関連があると考えられるが、分子レベルでの二次代謝研究が行われていないことから未だその関連については不明である。

リポペプチド化合物は、脂肪酸様の直鎖アシル化合物部分とペプチド部分により構成される化合物の総称である。糸状菌におけるリポペプチド生合成についての分子生物学的研究は数例だけであるが、それらによると脂肪酸部分構造の生合成は化合物ごとに異なっているとされている。脂肪酸部分構造は、化合物が持つ生理活性に関して重要な部位であることから、生合成に関して更なる知見の蓄積が望まれる。

本研究では*Lecanicillium* 属糸状菌が生産する二次代謝物質の解析を行った結果、MAFF635047株の培養液にリポペプチド化合物verlamelinの存在が示唆されたことから、その生合成的知見を得ることを目的として研究を行った。

2 章 抗真菌リポペプチド化合物verlamelinの単離および絶対構造決定

verlamelinであると示唆された成分を含む簡易精製画分から、二つの化合物を単離し、それぞれスペクトル解析により平面構造を決定したところ、これらはverlamelinとその新規類縁体であると同定された。報告されているverlamelinの構造解析はスペクトルデータが不十分であり、構造は曖昧なままであったことから、詳細に構造解析を行った。絶対構造が明らかとなった二成分をそれぞれverlamelin A、verlamelin Bと名付けた。

3 章 *Lecanicillium* sp. HF627における形質転換系の構築

MAFF635047株における分子生物学的解析を可能とするために宿主ベクター系を構築した。さらにこの系において相同組換えによる遺伝子破壊を迅速に行うために、遺伝子の非特異的組換えに関する遺伝子が破壊された宿主株を構築した。この結果、標的遺伝子に対する相同組換えの効率が顕著に改善し、二次代謝遺伝子に対して遺伝子破壊などの逆遺伝学的なアプローチが可能となった。

4 章 verlamelin生合成遺伝子クラスターの同定

非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子を標的とした遺伝子破壊実験の結果、verlamelinの生産が欠損した株を取得することができた。このNRPS遺伝子をverlamelinのペプチド部分構造の生合成遺伝子と考え *vImS* と名付けた。*vImS* 近傍に存在する5つの遺伝子に対して遺伝子破壊実験を行った結果、脂肪酸水酸化酵素、チオエステル加水分解酵素、リガーゼをコードする遺伝子を破壊した際にverlamelinの生産が消失したことから、これらをverlamelin生合成に関する遺伝子として、それぞれ *vImA*、*vImB*、*vImC* と名付けた。verlamelinの生合成中間体である5-ヒドロキシテトラデカン酸の添加実験により、*vImA*、*vImB* がその供給に関わっていることが示され、残る *vImC* は5-ヒドロキシテトラデカン酸のNRPSへの導入に関ると推定された。これにより、verlamelinの全生合成経路が明らかとなった。

5 章 結論

本研究により、リポペプチドverlamelinの絶対構造を明らかにし、更にその新規類縁体を発見した。また、その生合成経路を解析したところ、verlamelinの脂肪酸部分構造が、他のリポペプチド合成経路では類を見ない水酸化脂肪酸として供給されることが明らかとなった。抗真菌活性を有するverlamelinの昆虫病原性、植物病原菌との拮抗活性への寄与は未だ不明であるが、本研究によりverlamelin生合成遺伝子が同定されたことから、今後、本化合物の生物学的機能が明らかになると期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (石 堂 圭 一)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	仁平 卓也
	副 査	教授	原島 俊
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	大竹 久夫
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	福井 希一
	副 査	教授	紀ノ岡 正博

論文審査の結果の要旨

本論文は昆虫病原性糸状菌 *Lecanicillium* sp. が生産する抗真菌リポペプチド化合物の生合成に関する研究を行っており、化合物の生合成経路について記述している。

Lecanicillium 属昆虫病原菌はアブラムシやコナジラミ等の害虫を死に至らしめること、また、うどんこ病、さび病等の植物病原性と拮抗することから、汎用的な生物農薬としての応用が期待されている。さらに、本菌は生理活性物質の生産菌であると考えられており、生産される化合物は昆虫病原性、または病原糸状菌との拮抗と何らかの関連があると考えられるが、分子レベルでの二次代謝研究が行われていないことから未だその関連については不明である。

リポペプチド化合物は、脂肪酸様の直鎖アシル化合物部分とペプチド部分により構成される化合物である。糸状菌においてリポペプチド生合成遺伝子を詳細に研究した例は数例しかなく、脂肪酸部分構造の生合成は化合物ごとに異なっており、化合物が持つ活性に関して重要な部位であることから、生合成に関して更なる知見の蓄積が望まれる。

本論文を要約すると以下の通りである。

1. *Lecanicillium* sp. MAFF635047 株の培養液から既知の抗真菌リポペプチド化合物 verlamelin 及び、その新規類縁体を単離し、詳細な構造解析を行った。これまでに報告されている verlamelin の構造解析はスペクトルデータが不十分であり、構造は曖昧なままであったが、本研究によりその絶対構造が明らかとなった。これにより verlamelin の脂肪酸部分構造は 5(S)-ヒドロキシテトラデカン酸であることが明確となった。
2. *Lecanicillium* sp. MAFF635047 株において、逆遺伝学的手法により verlamelin 生合成に非リボソームペプチド合成酵素、脂肪酸水酸化酵素、チオエステル加水分解酵素、リガーゼをコードする遺伝子が関わることを明らかとした。verlamelin の 5(S)-ヒドロキシテトラデカン酸残基は、脂肪酸水酸化酵素、チオエステル加水分解酵素により、一次代謝脂肪酸から供給されることがわかった。

以上のように、本論文は verlamelin 並びに新規類縁体の絶対構造及び生合成メカニズムを解析したものである。本論文により verlamelin の脂肪酸部分構造が他のリポペプチド生合成経路に類を見ない水酸化脂肪酸の形で供給されることが示されたことは、糸状菌におけるリポペプチド生合成に関する新たな知見を与えるものであるといえる。また verlamelin は植物病原菌に生育阻害活性を示す化合物であることから、本研究により得られた verlamelin 生合成遺伝子の情報は、より汎用的、効果的な微生物農薬の開発に繋がる可能性がある。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。