

糸状菌二次代謝産物合成酵素遺伝子による物質生産系構築

東京大学大学院 薬学系研究科 天然物化学教室
淡川 孝義

1. はじめに

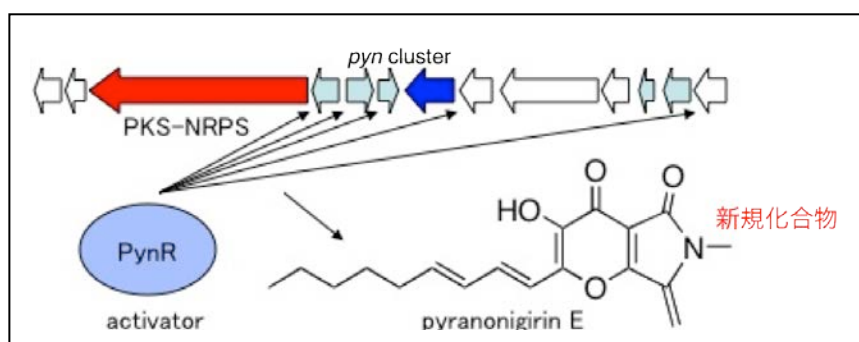
現在、天然物研究は円熟期にあり、天然より単離される新規化合物は減少の一途をたどっているため、化合物探索方法の転換が求められている。ゲノムシーケンス技術の向上により、微生物のゲノムには通常の条件では発現していない数多くの酵素遺伝子が存在することが明らかとなっている。本研究では、糸状菌ゲノム中に眠る、polyketide synthase (PKS)、non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)など二次代謝産物合成酵素をコードする遺伝子を用いて、効率よく新規化合物を産出する手法に取り組む。糸状菌のポリケタイド、非リボソーマルペプチドは、多様な構造を持つことで知られ、高脂血症治療薬であるlovastatin、免疫抑制剤であるcyclosporinなどの医学的に重要な化合物群を含む。よって、糸状菌由来PKS、NRPSの新規生成物を探索することで、医薬品資源として有用な活性を持つものが多く得られることが期待される。

2. 方法

遺伝子の発現は、遺伝子宿主での強制発現、または異種ホストでの異種発現の二通りにて行った。強制発現では、二次代謝産物合成遺伝子の正の転写因子を用いた複数の遺伝子の同時発現、またhistone deacetylase (HDAC)、DNA methyltransferase (DNAMT)阻害剤投与によるepigenetic修飾の制御、異種発現では宿主*Aspergillus oryzae*での遺伝子発現系を用いて実験を行った。

3. 結果 研究成果

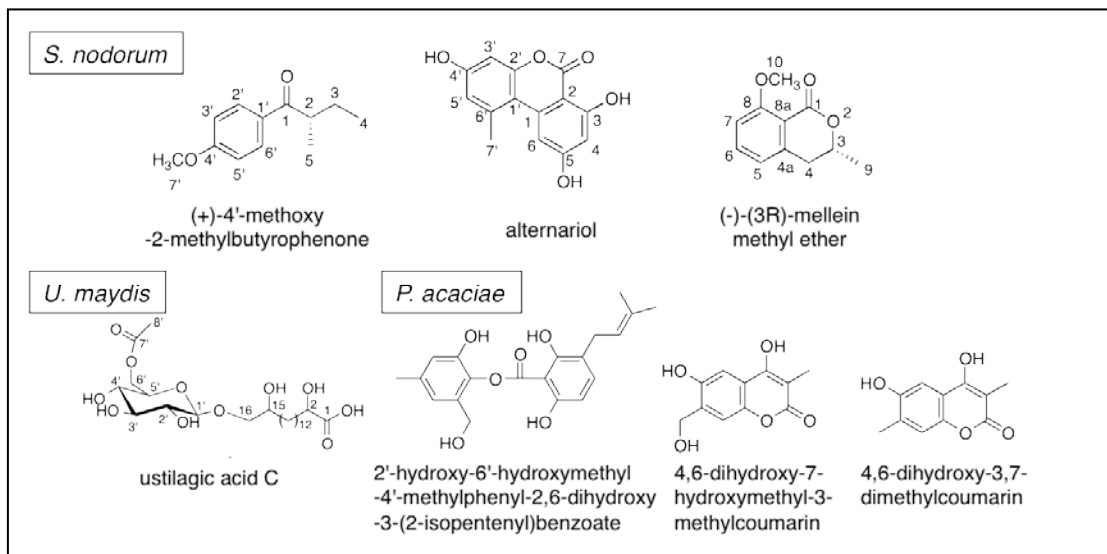
① *Aspergillus niger*由来の未発現PKS-NRPS遺伝子クラスターの覚醒による新規化合物の取得¹⁾



A. niger ATCC 1015株には9つのPKS-NRPS遺伝子を有するが、その全ての遺伝子クラスターの生成物は未同定である。よって、これら未知の生成物を同定することで、新規化合物、および生合成の知見が得られることが期待された。そのうちの一つのPKS-NRPS遺伝子An11g00250 (*pynA*)を含む遺伝子クラスター(*pyn*クラスターと命名)に注目した。Pynクラスターは正の転写因子である*pynR*遺伝子を含む。PynRはGAL4類似の転写因子であり、遺伝子クラスターに含まれる遺伝子全ての転写を誘導すると考えられた。また、*pyn*クラスターはflavin依存型酸化酵素 (PynB)、メチル基転移酵素(PynC)、P-450酵素

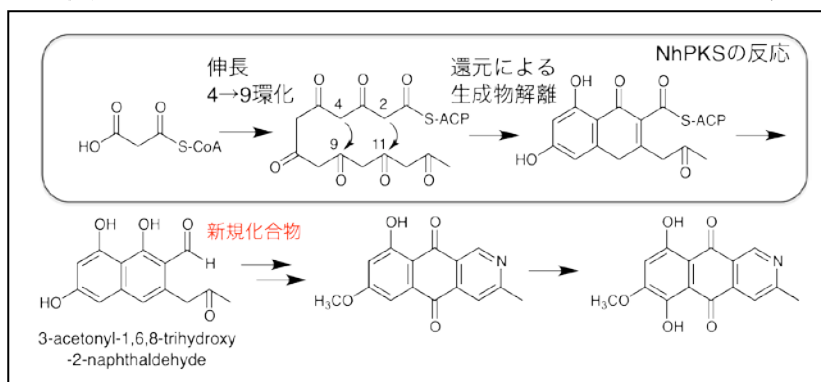
(PynD)遺伝子を含むが、以上のPKS-NRPS遺伝子と修飾酵素遺伝子の組み合わせは生成物の報告例がなく、本クラスターは新規な化合物を生産することが期待された。本研究では、*pynR*を強制発現することによって*pyn*クラスターを活性化し、その生成物を取得することを目的として研究を行った。PEG-プロトプラスト法にて*pynR*上流に*aga*プロモーターを挿入して発現ベクターを構築し、*A. niger*へと導入して形質転換体を作製した。その結果、グルコースを含まない誘導培地でPynR発現株を培養することで、コントロールにはない、新たな化合物が生産されることが確認された。この化合物を大量調製し、NMR, MS分析に供することで、新規化合物pyranonigrin Eと同定した。また、RT-PCRによってPynR依存的に*pynABCD*が転写されていることを示し、これらのpyranonigrin E生合成への関与の可能性を示した。以上より、Pyranonigrin Eが、PynAによるpolyketide-peptide形成、PynBによる脱水素反応、PynCによるメチル基転移、PynDによる水酸化によって生合成される新規生合成経路を提唱した

②糸状菌へのエピジェネティクス阻害剤投与による新規化合物生産²⁻⁴⁾



真核生物の遺伝子はヒストン、DNAの複合体であるクロマチン構造が構造変化することによって発現制御されることが知られている。そこで、糸状菌の培養液にエピジェネティクス制御化合物を投与することで、二次代謝遺伝子を活性化することで、新規化合物が得られる例が、数多く報告されている。今回、糸状菌 *Stagonospora nodorum* にHDAC阻害剤である suberoylanilide hydroxamic acid (SBHA) と nicotinamide を同時に投与することによって、通常の培養条件では検出されない (+)-4'-methoxy-(2S)-methylbutyrophenone、alternariol、(-)-(3R)-mellein methyl ether の生産を誘導することに成功した。(+)-4'-methoxy-(2S)-methylbutyrophenone は天然から初めて単離された新規化合物であった。その化学構造より、(-)-(3R)-mellein methyl ether は、PKS 遺伝子 SNOG_00477、SNOG_14927 によって合成されることを予測した。また、真菌 *Ustilago maydis* にHDAC阻害剤、SBHA、DNAMT阻害剤、5-azacytidine を同時に投与して培養することによって、新規グリコリピッドである ustilagic acid C を単離することに成功した。また、糸状菌 *Pestalotiopsis acaciae* にHDAC阻害剤、SBHA、DNAMT阻害剤、5-azacytidine を同時に投与して培養する事によって、新規化合物である 2'-hydroxy-6'-hydroxymethyl-4'-methylphenyl-2,6-dihydroxy-3-(2-isopentenyl)benzoate、4,6-dihydroxy-7-hydroxymethyl-3-methylcoumarin、4,6-dihydroxy-3,7-dimethylcoumarin を単離することに成功した。

③糸状菌 *Nectria haematococca* 由来PKS遺伝子の異種発現系の構築⁵⁾



糸状菌 *N. haematococca* は aza-anthraquinone を生産することが知られている。Aza-anthraquinone 化合物は抗腫瘍活性を持つ scorpinone、抗結核菌活性を持つ bostrycoidin 等、医薬品

として有用な化合物が多く存在する。そこで、これらの生合成経路を明らかにし、その生産系を構築することで、数多くの有用化合物を取得することを目的に、*N. haematococca* の aza-anthraquinone 生合成に関わる遺伝子の異種発現系を構築することにした。過去のラベル体投与実験より、aza-anthraquinone は polyketide が還元された aldehyde を持つ中間体より生合成されることが予想されていた。そこで、中間体を aldehyde をとして放出するための reductive (R) domain を持つ PKS を生産菌ゲノムより探索した。その結果、ただ1つ NECHADRAFT_101778 という PKS 遺伝子 (NhPKS1 と命名) が該当することが明らかとなった。この PKS 遺伝子を糸状菌 *A. oryzae* M-2-3 株にて発現し、その生成物を HPLC、NMR にて分析した。その結果、NhPKS は 3-acetyl-1,6,8-trihydroxy-2-naphthaldehyde という新規化合物を生成物として与えることが明らかとなった。この化合物の aldehyde 部に amino 基が求核攻撃することで、aza-anthraquinone 骨格が生成するものと考えられる。以上より、本研究にて aza-anthraquinone 生産系の基盤を構築することに成功した。

4. 考察 まとめ

本研究では、糸状菌の未発現遺伝子資源を複数の手法を通して、効率よく利用し、新規化合物生産に繋げることに成功した。今後、様々な糸状菌ゲノムが解読され、多数の未発現遺伝子が見出されることが予想される。結晶構造解析の技術が進展するにつれて、酵素の構造を元にしてそれらの機能改変を行うことも可能となるだろう。それらの遺伝子を組み合わせることで、人工的に分子をデザインすることが可能になる。本研究は、糸状菌生合成系を利用した分子多様性創出のための礎となる研究成果であるといえる。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Awakawa, T., Yang, X. L., Wakimoto, T., Abe, I. Pyranonigrin E: A Novel PKS-NRPS Hybrid Metabolite from *Aspergillus niger* Identified by Genome Mining. *Chembiochem* (2013) 14, 2095-2099.
- 2) Yang, X.-L., Awakawa, T., Wakimoto, T., Abe, I. Induced biosyntheses of a novel butyrophenone and two aromatic polyketides in the plant pathogen *Stagonospora nodorum*. *Nat. Prod. Bioprospect.* (2013) 3, 141-144.
- 3) Yang X., Awakawa, T., Wakimoto, T., Abe, I. Induced production of the novel glycolipid ustilagic acid C in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Tetrahedron Lett.* (2013) 55, 3655-3657.
- 4) Yang, X.-L., Awakawa, T., Wakimoto, T., Abe, I. Induced production of novel prenyldepside and coumarins in endophytic fungi *Pestalotiopsis acaciae*. *Tetrahedron Lett.* (2013) 54, 5814-5817.
- 5) Awakawa, T., Kaji, T., Wakimoto, T., Abe, I. A heptaketide naphthaldehyde produced by a polyketide synthase from *Nectria haematococca*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2012) 22, 4338-4340.