

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02835

研究課題名(和文) 遺伝子重複をキーワードとした天然物構造多様性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of structural diversification mechanism of natural product focusing on gene duplication

研究代表者

南 篤志 (Minami, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：40507191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Talaromyces islandicus* の染色体上には、40%以上の同一性(identity)を示すポリケチド合成酵素遺伝子が3種類存在していた。こうした遺伝子重複は、天然物が多様性を獲得する上で一つの鍵と考えられている。本研究課題では、見いだした生合成遺伝子を全てのクラスターに必ず存在する遺伝子(A群)、複数のクラスターに存在する遺伝子(B群)、特定のクラスターにしか存在しない遺伝子(C群)に分類し、各群の生合成酵素の機能解析を行うことで、「遺伝子の重複が構造多様性の創出に与える影響」について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然物は、生物が数十億年かけてスクリーニングした機能性分子である。低分子医薬において中心的な役割を果たしている他、タンパク質間相互作用の制御、標的タンパク質の分解誘導などの新しい概念に基づく創薬研究においてもその重要性が指摘されている。こうした多彩な生物活性は、天然物のもつ特徴的な化学構造に起因している。本研究により、その構造多様性が創出されるメカニズムの一端を解明できたため、将来的には、生物システムを模倣する形で、新たな天然物を合理的につくりだすことができるようになって考えている。

研究成果の概要(英文)： *Talaromyces islandicus* is a unique fungus that produces more than 20 numbers of anthraquinones (AQs) and their dimeric natural products, bisanthraquinones (BQs). These compounds share a 9,10-anthracenedione core derived from emodin. Two biosynthetic genes for synthesizing AQs and BQs were characterized by performing heterologous expression, biotransformation, and in vitro enzymatic reactions, providing insight into the structural diversification mechanism to synthesize structurally related AQs/BQs.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 生合成 酵素

## 1. 研究開始当初の背景

微生物や植物が生産する天然物の魅力は、人知を超えた複雑な化学構造と強力な生物活性にある。また、1980年代に天然物をつくるための遺伝子がゲノム上の特定の箇所にまとまって存在していること(生合成遺伝子群とよぶ)が明らかにされたことを契機として、「複雑な骨格が如何にして構築されているのか？」を解明する生合成研究も急速に進展してきた。今では、四大抗生物質(アミノグリコシド、マクロライド、テトラサイクリン、β-ラクタム)をはじめとして、様々な種類の天然物の生合成経路が解明されている。個々の化学反応を触媒する酵素の精密機能解析も活発に行われており、天然物特有の化学構造が構築される触媒機構も明らかにされつつある。一方、申請者の知る限りにおいて、「進化の過程で天然物はどのようにして構造多様性を獲得してきたのか？」という本質的な問いに迫る研究成果は限定的である。

こうした背景下、申請者が提案している「PKS-NRPSの共進化仮説」を裏付けるためのパイオインフォマティクス解析の過程で、糸状菌 *Talaromyces islandicus* の染色体上に40%以上の同一性(identity)を示す還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子が3種類存在していることに気づいた(TiPKS1-3)。周辺に位置する遺伝子を比較したところ、全てのクラスターに必ず存在する遺伝子(A群)、複数のクラスターに存在する遺伝子(B群)、特定のクラスターにしか存在しない遺伝子(C群)が見つかったことから、これらの遺伝子群は構造類縁体の生合成に関与することが示唆された。このように、一つの菌株が相同性の高い遺伝子のセットを3種類ももっている例は珍しく、天然物が構造多様性を獲得する上で重要とされている“遺伝子重複”の影響を検証する格好の研究対象と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、天然物が構造多様性を獲得する際の遺伝子重複の重要性などを明らかにすることを目的として、以下の3項目について検討した。

- (1) *T. islandicus* の染色体上に重複して存在する天然物生合成酵素遺伝子(A/B群)の網羅的解析
- (2) 特定のクラスターに存在する修飾酵素遺伝子(C群)の機能解析
- (3) 人為的な遺伝子重複による構造多様性の創出

## 3. 研究の方法

上述した目的を達成するため、以下に示す4つの項目(A-D)について主に検討した。

### (A) 項目(1)の検討1: 骨格構築酵素と修飾酵素の機能解析

相同性検索の結果、各クラスターに共通する骨格構築酵素はアントラキノン系天然物の共通中間体として知られているエモジンの生合成に関与する骨格構築酵素と高い相同性を示した。そこで、A群に分類される骨格構築酵素(skyG)、チオエステラーゼ(skyF)、デカルボキシラーゼ(skyH)に加えて、B群に分類される機能未知酵素(skyX)とC群に分類される cytochrome P450 (skyM) が存在するクラスター1に着目して、麹菌を宿主とした異種発現を行った。具体的には、形質転換体(AO-skyGFH、AO-skyGFHXM)を構築し、各形質転換体が生産した代謝産物の単離・構造決定を行った。

### (B) 項目(1)の検討2: クリソファノール生合成経路の解明

*T. islandicus* のもつ2つ目のクラスターに着目すると、B群に分類される修飾酵素遺伝子(chrB)が存在する。この脱水酵素をクエリーとして検索すると、chr オーソログを含む他のクラスターでは2つの還元酵素遺伝子が隣接して存在することが多いことがわかった。これを踏まえて、還元酵素遺伝子を改めて探索すると、染色体上の別の位置に2つの還元酵素遺伝子(chrK、chrC)を見いだした。これら3種の酵素の機能を解明するため、エモジンを基質とした微生物変換および組み換え酵素を用いた *in vitro* 反応を行った。

### (C) 項目(2)の検討: 二量化酵素の機能解析

項目(1)の実験過程で、C群に分類される skyM がエモジンの2量化反応に関与することが示唆された。そこで、本酵素の機能を解明するため、5種のエモジン類縁体を用いた微生物変換反応を行った。

### (D) 項目(3)の検討: *T. islandicus* の遺伝子操作法の確立

*T. islandicus* における人為的な遺伝子重複を行うためには、遺伝子操作法の確立が必要不可欠である。そこで、*T. islandicus* が生産する cyclochlorotrine の生合成遺伝子を対象として、遺伝子破壊の実験手法を確立した。

#### 4. 研究成果

##### ・項目(1)に関する研究成果

構築した形質転換体 (AO-skyGFH、AO-skyGFHXM) の生産した代謝産物を単離・構造決定したところ、AO-skyGFH ではエモジン、AO-skyGFHXM ではスカイリンの生産を確認した。以上の結果と同源性検索の結果を考慮すると、SkyGFHX によりエモジンが生産された後、SkyM がエモジンの 2 量化反応を触媒してスカイリンが生産したと考えられる (図 1)。また、この実験の過程で、エモジンやスカイリンのような色素を生産する形質転換体は寒天培地上でも特徴的な色を呈するため、スクリーニングが不要であるという新しい知見を得た。後述する実験結果を考慮すると、*T. islandicus* は生合成中間体に相当するエモジンの生合成遺伝子を重複して保持しており、その結果として、20 種類以上におよぶ類縁体を合成していることがわかった。

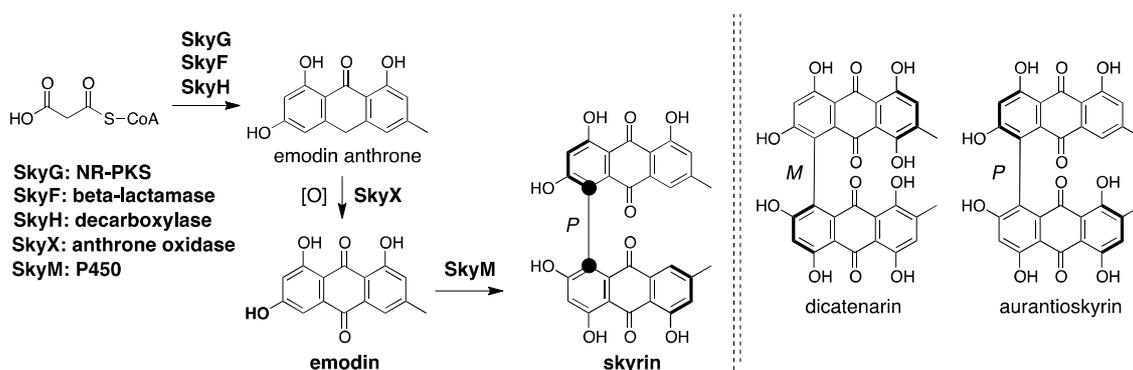


図 1 : スカイリンの生合成経路と取得した 2 量体の化学構造

また、B 群に分類された 3 種の修飾酵素がエモジンからクリソファノールへの変換反応に関与することを明らかにした。この反応では、ChrK によるキノン部分の還元、ChrC による二重結合の還元、ChrB による脱水反応が段階的に進行し、最終的にはエモジン A 環上にある 2 つの水酸基の一方が除去される。解明したメカニズムは、A/C 環の他の水酸基が除去された AQ 類縁体の生合成経路も説明できるものである。1) クリソファノールの生合成に関わる遺伝子が 2 箇所に分断して存在していたこと、2) *T. islandicus* が生合成に関連する複数の遺伝子群を保持していることを考えると、*T. islandicus* にとって AQ/BQ は重要な生物活性をもっており、そのため、水平伝播などにより獲得した AQ/BQ 生合成遺伝子を積極的に保存しているのではないかと考えられる。

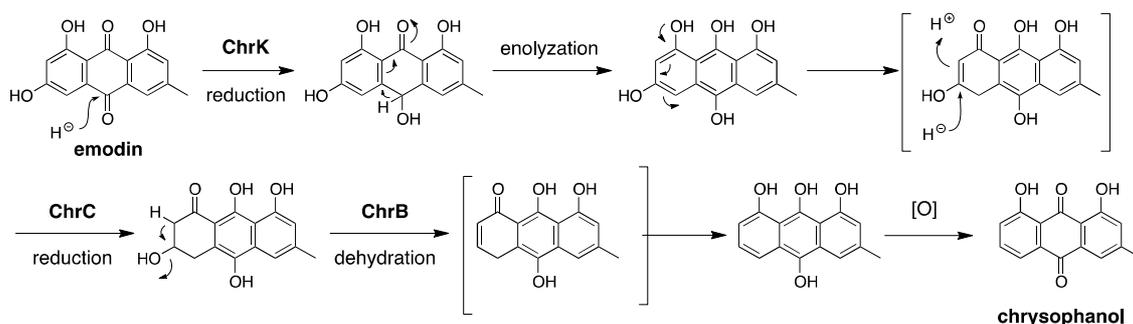


図 2 : エモジンからクリソファノールへの生合成経路

##### ・項目(2)に関する研究成果

SkyM による 2 量化反応をエモジン類縁体 (カテナリン、 $\beta$ -ヒドロキシエモジン、フィシオン、クリソファノール、イスランジン、クリサジン) を用いて検討した結果、カテナリンのみ、対応する 2 量体ジカテナリンの生成を確認した。また、エモジンとカテナリンを混合した場合には、スカイリンとジカテナリンに加えて、各モノマーユニットが連結したヘテロ 2 量体の生成を確認した。スカイリンとジカテナリンの CD スペクトルはミラーイメージになっていたことから、鏡像体の関係になっているという興味深い知見を得た。ここで単離したジカテナリンは、*T. islandicus* から単離されたジカテナリンのエナンチオマーであるため、*T. islandicus* には SkyM とは異なる 2 量化酵素が存在することが示唆された。

・項目(3)に関する研究成果

*T. islandicus* が生産する cyclochlorotine の生合成に関わる 6 つの遺伝子( cctP1, cctP2, cctO, cctR, cctQ, cctS ) を対象として遺伝子破壊実験を行うことで、生合成中間体の蓄積を観測した。これにより、*T. islandicus* における遺伝子破壊操作が適切に行えていることを確認した。さらに、蓄積された中間体を単離・構造決定すると、想定された中間体の構造異性体であるという興味深い知見を得た。

・その他の研究成果

本研究により、麹菌を宿主とした異種発現においては、細胞内という複雑系であるにも関わらず、本来の機能に応じたポリケタイド鎖を生産していることがわかった。そこで、他骨格構築酵素の機能解析を行ったところ、直鎖ポリヒドロキシポリケタイドを与える骨格構築酵素の機能解析にも成功した。

以上の結果は、原著論文 4 報、図書 1 冊、学会発表 9 件として公表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jiang Yulu, Ozaki Taro, Liu Chengwei, Igarashi Yuya, Ye Ying, Tang Shoubin, Ye Tao, Maruyama Jun-ichi, Minami Atsushi, Oikawa Hideaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Biosynthesis of Cyclochlorotine: Identification of the Genes Involved in Oxidative Transformations and Intramolecular O,N-Transacylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 2616 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c00525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukaya Mitsunori, Ozaki Taro, Minami Atsushi, Oikawa Hideaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Biosynthetic machineries of anthraquinones and bisanthraquinones in <i>Talaromyces islandicus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 435 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takino Junya, Kotani Akari, Ozaki Taro, Peng Wenquan, Yu Jie, Guo Yian, Mochizuki Susumu, Akimitsu Kazuya, Hashimoto Masaru, Ye Tao, Minami Atsushi, Oikawa Hideaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Biochemistry Guided Prediction of the Absolute Configuration of Fungal Reduced Polyketides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 23403 ~ 23411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202110658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kotani Akari, Ozaki Taro, Takino Junya, Mochizuki Susumu, Akimitsu Kazuya, Minami Atsushi, Oikawa Hideaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Heterologous expression of a polyketide synthase ACRTS2 in <i>Aspergillus oryzae</i> produces host-selective ACR toxins: coproduction of minor metabolites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 287 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷充功、水野上裕亮、尾崎太郎、劉成偉、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 糸状菌が生産するアントラキノンダイマーの生合成研究 (3)
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深谷 充功、尾崎 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 遺伝子重複をキーワードとした天然物構造多様性獲得機構の解明
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧野 純矢、小谷 明里、尾崎 太郎、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 繰り返し構造を有するポリケタイド系天然物phialotideの生合成 (1)
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧野 純矢、小谷 明里、尾崎 太郎、Jie Yu、Yian Guo、Tao Ye、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 糸状菌由来還元型ポリケタイド合成酵素の立体選択性に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小谷 明里、瀧野 純矢、尾崎 太郎、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 糸状菌由来多機能性酵素の機能制御を目指した thermolides の生合成研究-1-
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yaping Liu, Atsushi Minami, Taro Ozaki, Hideaki Oikawa
2. 発表標題 Total biosynthesis of the highly modified indole diterpene nodulisporic acids to generate structurally related analogs
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧野 純矢、小谷 明里、尾崎 太郎、Jie Yu、Yian Guo、Tao Ye、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 還元型ポリケタイド合成酵素の立体選択性
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yaping Liu, Atsushi Minami, Taro Ozaki, Hideaki Oikawa
2. 発表標題 Reconstitution of Biosynthetic Machinery for Indole-Diterpene Nodulisporic acids in <i>Aspergillus oryzae</i>
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Minami
2. 発表標題 Development of versatile heterologous expression system for synthesizing Basidiomycete natural products
3. 学会等名 Directing Biosynthesis Online
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 南篤志、尾崎太郎、及川英秋	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 77
3. 書名 月刊ファインケミカル 2020年3月号 【特集】天然物合成化学の最新動向	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------