

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560398

研究課題名(和文)新規天然物生合成遺伝子クラスターの合理的探索法の確立と物質生産

研究課題名(英文)Development of a rational protocol searching novel biosynthetic gene clusters for natural product synthesis

研究代表者

及川 英秋(Oikawa, Hideaki)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00185175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：酸無水物二量体型構造を持つ糸状菌由来天然物の生合成遺伝子クラスター(設計図)を同定するため、zoppiellin (ZFL) およびphomoidride (PMD)を生産する二種の菌に関してゲノムのドラフトシーケンスを行った。この過程で発見したオキザロ酢酸と脂肪酸部を縮合する酵素遺伝子を手掛かりに、ZFLおよびPMDの設計図を推定した。次いで3種の標的生合成酵素遺伝子をクローニングし、全てを導入した麹菌による生産、さらに大量発現した酵素を用いてin vitroで機能解析により、酸無水物モノマーの生産に成功した。これにより2-アルキルクエン酸型代謝産物群の新規な設計図取得法が開発できた。

研究成果の概要(英文)：To identify novel type-gene clusters of natural products in fungal genome, we chose the fungal dimeric anhydrides zoppiellin and phomoidride. Draft genome sequences of two anhydride producing fungi allowed us to identify three enzyme genes that were commonly located in two individual clusters. Heterologous expression of three genes responsible for the phomoidride monomer synthesis in *Aspergillus oryzae* has successfully provided phomoidride monomer derivative. In addition, the enzymatic reactions of two recombinant enzymes gave the corresponding monomers. The anhydrides from the enzymatic reactions were identical to the synthetic monomers, thus confirming their structures. Based on these results, we have developed the method identifying novel gene cluster for the biosynthesis of alkylcitrate natural products.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生合成 天然物 ゲノム情報 物質生産 糸状菌 酸無水物

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多様な生物活性を有する天然物生合成酵素の解析が進み、ポリケチドやテルペンといった代表的な化合物群の生合成経路に関する分子レベルでの理解が進んだ。さらに最近のゲノム解析により以下のことが判ってきた、1)特定の領域に天然物生合成用遺伝子がクラスターとして存在;2)従来微生物一株あたりに生産する天然物が数個と予想されたが、実際には糸状菌の場合20-50種の生合成遺伝子クラスターがあり、多くは休眠状態にある(*Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, 3, 937; *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 379)。以上の事実は天然物の多くが取り尽くされたのではなく、培養という方法論による限界が見えただけで、生物が数億年をかけてスクリーニングしてきた生物活性天然物は、依然医薬品の供給源として有望なことを示唆している。

DNA シーケンスコストの低下(*Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26, 1135)によりゲノム解析は、個人研究者が容易に行える状況にあり、これまでに発見されていない天然物を遺伝子工学的的手法での探索する方法が視野に入りつつある。即ち天然物の構造類似性と生合成遺伝子(特に骨格合成酵素)の配列類似性に対応関係があるとすれば、既知配列と類似性のない新たな遺伝子クラスターを発見し、それらをコードする生合成酵素を用いれば天然物が生産できるはずである。休眠クラスターの発現による物質生産(ゲノマイニング)は全世界で試みられているが、申請者のような発想で挑戦している例は少ない。最近我々は、生合成酵素遺伝子すべてを糸状菌の汎用宿主に導入して、天然物を生産する方法論を開発しており、ポリケチドやテルペンの生産に十分使えるという感触を得ている(テルペン aphidicolin: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2011**, 75, 1813; ophiobolin, unpublished; ポリケチド solanapyrone: *ChemBioChem* **2010**, 11, 1245; paxilline: unpublished)。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンサーの出現で、個人レベルで微生物ゲノムを解析し、物質生産や構造多様性が創出される機構を研究できる時代が到来した。微生物ゲノムには、単離された天然物の数をはるかに上回る天然物生合成遺伝子クラスターがあり、多くの場合休眠状態にある。すなわち製薬会社が労力やコスト面から開発を諦めた天然物資源を利用した薬剤開発は可能であり、現在それを実証できるのは、大学しか無い状況にある。そこで狙った化合物の新規クラスターを合理的に探索する方法論を確立するとともに、我々が糸状菌由来天然物の生産に、その有効性を確認している麹菌発現システム

を用いた物質生産を行なう。具体的には、酸無水物モノマーの多量体構造を持つ化合物群は、多種の糸状菌から相当数得られており、その生合成経路も共通と予想される。これら化合物群の生合成遺伝子クラスターを網羅的に取得する方法論を開発し、実際に物質生産することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まず2種の酸無水物型天然物生産菌のゲノム DNA を委託解析し、両ゲノムのドラフトシーケンスを得る。次いで、今回目的とするクラスターの絞り込みには、最初に公開されている近縁のカビと生産菌のゲノムを比較、共通遺伝子を除外し、生産菌にのみ存在するユニークな遺伝子を拾う(*Cell. Mol. Life. Sci.* **2004**, 61, 1401; *Science*, **2008**, 321, 1670)。さらに生合成経路に依存しない修飾酵素遺伝子に注目し、連携研究者の石川により開発され、データベース上に公開されている 2ndFind という Web ツールを使用して、全てのクラスターの候補を選定する。その後、後者のクラスター上存在にする遺伝子の中から、目的の遺伝子を見出す。さらに今回は zopfiellin と phomoidride の2種の生産菌のゲノムデータを用いた解析を行い、両化合物の生合成に共通する酸無水物モノマー形成酵素や二量化酵素遺伝子を絞り込んで確実にクラスター候補を見出す。

実際の物質生産は、既に確立した麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた多数遺伝子同時発現システムを利用して、同定したクラスター内の遺伝子を宿主の栄養要求性を相補するマーカーを有するベクターに組み込み、順次 *Aspergillus oryzae* ASAR1 株に導入する。最初に遺伝子数が少ないと予想される zopfiellin (ZFL) について必要な遺伝子を開発して、酸無水物骨格合成を行う。次に残る二量化酵素、修飾酵素を導入して、ZFL を合成する。同様の手法で、より構造が複雑な PMD の合成を行う。最後に、近縁酵素遺伝子を公開ゲノムデータの中から見出し、どの程度の頻度で糸状菌が同様な化合物を生産しているか確認する。

zopfiellin および phomoidride B の生産菌ゲノム解析およびバイオインフォマティクスを駆使したデータ解析には2ヶ月あれば複数の候補クラスターを絞り込みは可能で、具体的な実験が開始できると予想した。また、実際に物質生産する化合物を ZFL に限定すると、その構造が単純であることから、生合成に関与する遺伝子数はさほど多くないことが想される。従ってこれまでの糸状菌代謝産物の全生合成の経験から、ZFL 生合成遺伝子をすべて発現して物質生産を行うのは一年程度かかると考え、2種の代謝産物の生産には二年間の研究期間を設定した。

#### 4. 研究成果

酸無水物構造を持つ zopfiellin (ZFL) 生産菌のゲノムのドラフトシーケンスを行い、バイオインフォマティクスによるそれらのデータ解析をした。その結果、ポリケチド合成酵素遺伝子の近傍に、縮合酵素および脱水酵素遺伝子を持つ遺伝子クラスターを一個だけ見出した。同様におよび phomoidride (PMD) 生産菌のゲノム解析から、やはり 3 種の遺伝子を持つクラスターを同定した。

zopfiellin 生合成遺伝子クラスターの機能解析を行なうべく、まず生産菌の mRNA より調製した cDNA から縮合酵素および脱水酵素遺伝子をクローニングした。本遺伝子を発現ベクターに組み込み、形質転換した大腸菌で発現させ、精製酵素を調製した。両酵素存在下、モデル基質としてアシル CoA とオキザロ酢酸を基質として反応を行なったところ、予想した酸無水物が単一の生成物として得られた。Zopfiellin 生合成遺伝子のうち、脱水酵素 Zop3 と縮合酵素 Zop11 を用いたオキザロ酢酸と中鎖アシル CoA による *in vitro* 反応の生成物の構造を確認するため、それら酸無水物の標品を合成した。側鎖が飽和した酸無水物は、アセチレンジカルボン酸ジメチルエステルへのヘキシルグリニャール試薬から調整した有機銅試薬を共役付加させた後、生じた銅エノラートをプレニルプロミドにて捕捉することで合成した。側鎖が不飽和の酸無水物は、ムコプロム酸誘導体への二回のクロスカップリングを行い合成した。酵素反応生成物と比較したところ、両者は完全に一致した。これにより縮合酵素は、アシル CoA とオキザロ酢酸を縮合させ、アルキルクエン酸型生成物を与えた後、脱水酵素がマレイン酸型生成物に変換することを見出した。

phomoidride (PMD) の生合成遺伝子クラスター上に見つかったポリケチド合成酵素 (PKS) phiA、脱水酵素 phiI、縮合酵素 phiJ の各遺伝子を麹菌に導入し、得られた三重形質転換体を培養したところ、炭素鎖 10 個の目的とする側鎖構造を有する酸無水物モノマーの脱炭酸体が単離された。これは、炭素鎖 12 個のアシル基質を PKS である PhiA が合成し、PhiJ がオキザロ酢酸との縮合、さらに PhiI が生成物の脱水反応を触媒することを示している。これを確認するため、Zopfiellin の場合と同様、大腸菌で大量発現した PhiI、PhiJ を用いた酵素反応を行い、側鎖にカルボン酸を有する酸無水物の合成に成功した。以上の実験結果から、二種の新規クラスターを同定し、その機能解析に成功した。さらに相同性に基づかない方法論でも新規クラスターが同定可能であることを示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

藤居瑠彌、南篤志、五味勝也、及川英秋、糸状菌発現系を利用した糸状菌酸無水物二量体型天然物の生合成研究、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日、日本大学船橋キャンパス、船橋  
松優佑、南篤志、及川英秋、抗生物質 Zopfiellin の生合成研究、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 30 日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋

[図書](計 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

及川 英秋 (OIKAWA, Hideaki)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：00185175

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

石川 淳 (ISHIKAWA, Jun)  
国立感染症研究所・生物活性物質部・室長  
研究者番号：40202957

南 篤志 (MINAMI, Atsushi)  
北海道大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：40507191