

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07353

研究課題名(和文)糸状菌のsilentな遺伝子の新規覚醒法と二次代謝産物生産への利用

研究課題名(英文)A new method for wakening silent genes

研究代表者

堀内 裕之(Horiuchi, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00209280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌におけるプロテインキナーゼC(PKC)の機能は未解明な部分が多い。糸状菌 *Aspergillus nidulans*にはPKCをコードする生育に必須な遺伝子pkcAが存在する。本研究ではpkcAの二次代謝産物生産における機能を解析した。実際には、pkcAの温度感受性変異株、活性化型PkcA高生産株において、二次代謝産物の一つであるステリグマトシスチンの発現制御への関与をMAPキナーゼカスケード関連遺伝子を破壊、または高発現させることによりその関連性を検討した。また活性化型PkcA高生産株においてのみ生産される二次代謝産物一つについて、その代謝産物をコードする遺伝子クラスターを同定した。

研究成果の概要(英文)：The functions of protein kinase C (PKC) in filamentous fungi remain largely unknown. *Aspergillus nidulans* is one of the model filamentous fungus and there is a PKC-encoding gene, pkcA, in its genome. In our previous study, we showed that pkcA is essential for the growth of *A. nidulans* and that pkcA is involved in the cell wall integrity pathway and the establishment of cell polarity. In this study, to clarify the function of PkcA in the synthesis of secondary metabolites, we analyzed it using the pkcA-ts mutant in which the activity of PkcA was temperature sensitive and the R429A mutant that produces an activated form of PkcA under the control of the alcA promoter of *A. nidulans*. We identified a gene cluster that is involved in the production of a secondary metabolite using these strains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 プロテインキナーゼC 二次代謝

1. 研究開始当初の背景

セリン・スレオニンキナーゼの一種であるプロテインキナーゼC (PKC) は真核生物においては菌類から高等動物まで普遍的に存在している。菌類における PKC の機能に関する研究は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において細胞壁にストレスなどが生じた場合にその完全性を維持するためのシグナル伝達機構 (Cell wall integrity (CWI) 経路) に関する機能が詳細に研究されているが、それ以外は未解明の部分が多い。CWI 経路においては PKC の下流で MAP キナーゼのカスケード、転写因子 Rlm1p が働くことが知られている。申請者らのグループでは糸状菌 *Aspergillus nidulans* より PKC をコードする遺伝子 *pkcA* を単離し、*pkcA* が *A. nidulans* の生育に必須の遺伝子であることを初めて示した。*S. cerevisiae* の PKC をコードする遺伝子 *PKC1* は生育に必須ではないことから、糸状菌においては PKC が酵母と異なる新たな機能をも有することが示唆された。そこで申請者らのグループでは *pkcA* の機能に関して種々の解析を行い、本研究開始当初までに下図に示した機能を明らかにしていた。この過程で *pkcA* の遺伝子産物 PkcA は下流の MAP キナーゼカスケードと転写因子を介する場合、介さない場合を含めて種々の生理現象に関与していることを明らかにしていた。

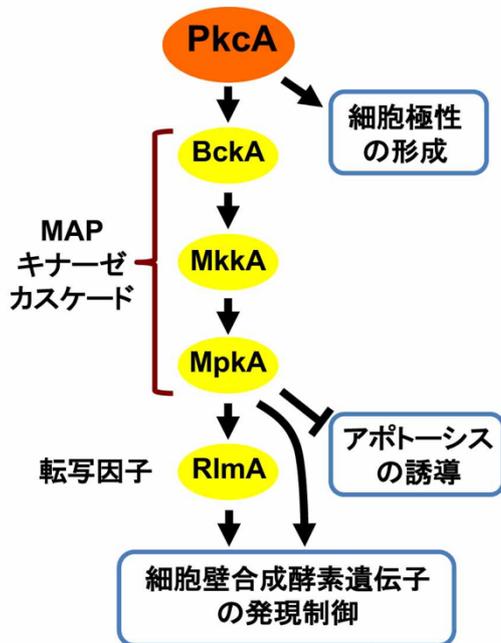


図 PkcAの機能

糸状菌の持つ特徴の一つとして二次代謝産物の生産がある。二次代謝産物には人間の生活を含めた動植物の生育にとっ

て有用な多種多様の生理活性物質が含まれる一方、アフラトキシン (AF) に代表される毒性のあるマイコトキシン等有害なものもある。これまで人類は有用な生理活性物質を生産する糸状菌を自然界から多数単離してきたが、近年では新規有用生理活性物質の発見例は以前に比べて激減しており新規スクリーニング手法の開発が急務と考えられている。一方、AFなどの有害物質に対しては、その生産阻害剤開発との関連から生産機構を分子レベルで解明することが試みられているが依然として未解明な部分が多い。

最近の種々の糸状菌を対象とした全ゲノム DNA 配列解析により、糸状菌には二次代謝産物合成に関与することが予想される遺伝子クラスターが多数存在することが示されつつある。しかし通常の培養条件ではこれら遺伝子クラスターの大部分は発現していない silent な状態であることから、これら silent な遺伝子 (クラスター) を人為的に発現させることができれば新規有用生理活性物質の生産に利用できると期待されている。そこで様々の手法が検討されているが、一度に複数の遺伝子クラスターを目覚めさせる決定的な方法がなく、現在でも“silent なまま”の状態の遺伝子クラスターが多数残されている。二次代謝産物合成にかかわる遺伝子クラスターは、その合成に特異的な酵素であるポリケチド合成酵素 (PKS)、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)、これらのハイブリッド (PKS-NRPS hybrid) をコードする遺伝子を含むことからゲノム上で比較的容易に推定できる。申請者らがこれまで研究対象として用いてきた *A. nidulans* ゲノム上には PKS、NRPS、PKS-NRPS hybrid をコードすると考えられる遺伝子が、類似の構造を持つものも含めると総計で 56 種存在し、そのうち大部分は silent な状態であった。現在まで様々な手法によりこれら遺伝子を目覚めさせることが試みられているが、このうち半分以上について産物がいまだ未解明である。*A. nidulans* の二次代謝産物としてすでに同定されているものの中にはペニシリン、AF の前駆体であるステリグマトシスチン (ST) も含まれている。

申請者らのグループでは先に述べた PkcA の機能に関する解析の過程で活性化型 PkcA を高発現できる株、*pkcA* の ts 株を作製し、これらを用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、多種の二次代謝合成関連遺伝子 (クラスター) の発現が変動していることを発見した。また ST の合成に関連する遺伝子クラスター

一を負に制御することも明らかになった。

## 2. 研究の目的

以上の結果より、本研究では二次代謝関連遺伝子群のクラスターレベルでの発現を変化させ様々な新規二次代謝産物の生産を試みることと、その分子レベルでのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)用いた菌株並びに培地

本研究で用いた *A. nidulans* の菌株を以下に示す (カッコ内に遺伝子型を示した)。

A1149 (*pyrG89 pyrA4 nkuA::argB*)、R429A-1 (*pyrG89 pyrA4*

*riboB2::riboB-alcA(p)-pkcA*(R429A)

*nkuA::argB*)、pkc-ts-2 (*pyrG89 pyrA4*

*nkuA::argB pkcA::pkcA(P959L)-riboB2*) とそれら由来の遺伝子破壊株

またプラスミドの作製等の実験には大腸菌

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  を用いた。

*A. nidulans* の培養は、培地としては MMG 最少培地に必要に応じてビタミン類、アミノ酸類、核酸類を添加したもの (Eukaryot. Cell, **8**: 945-956, 2009)、YG 完全培地にウリジン、ウラシルを添加したもの (Biosci. Biotechnol. Biochem., **79**: 321-330, 2015) を主に用いた。

*E. coli* の培地には LB 培地を用いた。必要に応じて抗生物質を添加した。

### (2)形質転換法

*A. nidulans* の形質転換はそれぞれ Biosci. Biotechnol. Biochem., **69**: 87-97, 2005 に記載された方法に従った。

### (3) RT-PCR

RT-PCR 法については Biosci. Biotechnol. Biochem. **79**:321-330, 2015 に記載された方法に従った。

### (4) 細胞抽出液の調製並びに western 解析

細胞抽出液の調製、western 解析は Biosci. Biotechnol. Biochem. **79**:321-330, 2015 に記載された方法に従った。

### (5) ST の検出

分生子を固体最少培地にプレーティングし、培養した。培養後プレートから培地をとり蒸留水の中で破碎した。クロロホルムを加え、混合後、25 度で 30 分振盪した。5 分間遠心後クロロホルム層を分取し、クロロホルムを飛ばし、クロロホルムに溶解した。このうち一部を薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開

後、TLC プレートに、塩化アルミニウムを含むエタノールを噴霧し、80 度で 10 分間静置した。これに 360 nm の紫外線をあて ST を検出した。なお TLC の展開溶媒にはトルエン：酢酸エチル：酢酸=8：1：1 で混合した溶媒を用い、コントロールとしてアセトニトリルに溶解した ST を用いた。

### (6)LC-MS/MS を用いた二次代謝産物プロファイリング

培養液を 2 倍量のアセトンを用いてアセトン抽出した。抽出液を遠心エバポレーターを用いてアセトンと水を蒸留した後、メタノールに溶解させた。遠心により、メタノールに不溶な成分を取り除いたのち、LC-MS/MS に供した。

### (7)その他の方法

一般的な分子生物学的手法、細胞生物学的手法、生化学的手法は成書に従って行った。

## 4. 研究成果

まず活性化型 PkcA を高生産できる R429A-1 株と野生型株を同様の条件で培養し、それらの培養液について LC-MS/MS により解析することによりの高発現株でのみ見られるピークを数種同定した。これらの中には新規の二次代謝産物に由来すると考えられるものが存在した。また、PkcA の高発現により発現が誘導される二次代謝産物の生産にかかわると考えられるクラスターについて、そのクラスター内の遺伝子の破壊株を作製し二次代謝産物生産への影響を検討したところ、破壊株特異的に LC-MS/MS 上で消失するピークが存在し、その対応関係が明らかとなった。

一方、*A. nidulans* が生産する二次代謝産物 ST の生産が PkcA の高発現で抑制されることが明らかになってきたため、そのメカニズムについて解析を行った。二次代謝産物の生産制御にはエピジェネティックな機構が関与していることが示唆されていることから、ヒストンの脱アセチル化にかかわる遺伝子、メチル化にかかわる遺伝子の破壊株において PkcA を高発現させその効果を検討したが、はっきりした結果を得ることが出来なかった。

これまでの研究で *A. nidulans* において PkcA は cell wall integrity (CWI)経路で働いていることが明らかになっており PkcA の下流では MAP キナーゼカスケードが機能していることが知られている。そこでこの MAP キナーゼカスケードが PkcA による ST 生産の抑制に関わるかを検討するため、MAP キナーゼキナーゼである BckA の活性化型変異体を高発現できる株を作製して ST 生産への影響を検討したところ、やはり ST 生産は強く抑制された。このことから PkcA による ST

生産の抑制は CWI 経路下流で働いている MAP キナーゼのカスケードを介していることが示唆された。

ST 生産において *AflR* という転写因子がその生産誘導に中心的に関わる正の制御因子であることが知られていることから *aflR* 遺伝子と ST 合成に直接関与する酵素をコードする *stcU* 遺伝子の発現を R429A-1 株を用いて検討したところ、ともに発現が抑制されていることが明らかとなった。さらに同様の条件下において *aflR* 遺伝子、*stcU* 遺伝子上流のクロマチン構造について検討したところ、ヌクレオソームの数が増えていることが示唆された。また、R429A-1 株を親株として *aflR* 遺伝子を高発現できる株を作製し、ST 生産について検討した。この株の ST 生産は、わずかしか回復しなかったことから R429A-1 株における ST 生産の抑制は、*aflR* 遺伝子の発現抑制以外の経路も関与していることが示唆された。

ST 生産においては CWI 経路の下流で働く MAP キナーゼ (MpkA) とは別の MAP キナーゼ (MpkB) も関与し、ST 生産を正に制御することが報告されていた。そこで *pkc-ts-2* 株において *mpkB* 遺伝子を破壊した株を作製し ST 生産への影響を検討した。その結果、*pkcA* 失活条件下でも ST 生産は強く抑制された。一方、*pkcA* 失活条件下における MpkB のリン酸化レベルについて検討したところ、野生型株と比較して変化は見られなかった。以上のことより PkcA と MpkB はそれぞれ独立に ST 生産に関与していることが示唆された。

先にも述べたように、活性化型 PkcA の高生産株において生産される二次代謝産物について、遺伝子破壊株を作製しその生産に関わる遺伝子クラスターを推定していたが、その推定した遺伝子クラスター内の他の遺伝子 3 種についてもその破壊株を作製し検討した。その結果、新たに作製した 3 種の遺伝子破壊株においては LC-MS/MS 上で目的のピークが消失しなかったことから、これらの遺伝子産物はその二次代謝産物の生産には直接には関与していないことが示唆された。また、この二次代謝産物の生産において、CWI 経路で働く MAP キナーゼのカスケードが関与しているかどうかについて R429A-1 株を親株として *bckA* 遺伝子を破壊した株を作製して検討した結果、この MAP キナーゼのカスケードも生産に関与することが示された。さらにその産物の同定を行うため、この物質について精製を試みたが、生産量が多くないことと非常に不安定であること等から、その構造を決定するために十分な量を得ることができず構造決定には至らなかった。

以上が本研究で得られた結果である。これらはまだ未発表であるが、今後順次国際誌などに投稿し公表して行く予定である。

謝辞: 本研究において LC-MS/MS を使用した実験及び二次代謝産物の精製に関連した実

験においては東京大学生物生産工学研究センターの葛山智久准教授、白石太郎助教、罗奇博士に大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

## 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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 件)

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

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀内 裕之 (HORIUCHI HIROYUKI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
教授  
研究者番号：00209280

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )