

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19388

研究課題名（和文）これまでにない独創的な糸状菌ペプチド天然化合物群の開拓と新規抗生物質の探索研究

研究課題名（英文）Discovery of novel peptide natural product with anti bacterial activities

研究代表者

浅井 禎吾（Teigo, Asai）

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60572310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ペプチド性天然物は抗生物質の良い探索源であり、新しいペプチド性天然物の発見が望まれている。本研究では、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法を用いた従来とは異なる手法による天然物探索を実施した。その結果、Chaetomium属菌のゲノム上に、新規デプシペプチドをコードすると予想される生合成遺伝子クラスターを発見し、それを麹菌で異種発現することで、目的通り新規デプシペプチド天然物の獲得に成功した。本研究は、合理的に、新しいペプチド天然物の獲得を加速するものであり、医薬品開発研究を進展させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、糸状菌のゲノム情報から合理的に新しいペプチド天然物を獲得する方法を提示し、実際に、新規デプシペプチドの獲得に成功した。ペプチド天然物は抗生物質の重要な探索源であり、本研究成果は、新しい抗生物質の開発に貢献することが期待される。様々な生物のゲノム上には、膨大な数のペプチド天然物が眠っている。本研究を拡大することで、今後数多くの抗生物質シーズを開拓できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Peptide natural products are promising source for antibiotics. Therefore, discovery of novel natural peptide natural products is important for drug development. In this research, we aimed to discover novel peptide natural products based on genome mining and heterologous expression of *Aspergillus oryzae*. Genome mining enabled us to find a biosynthetic gene cluster that may code novel natural depsipeptide in a *Chaetomium* fungi. Reconstruction of the cluster in *Aspergillus oryzae* gave us a novel depsipeptide as expected. The structure of the depsipeptide was fully determined by spectral analyses and chemical conversion approach.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 抗生物質 ペプチド天然物 生合成 異種発現 ゲノムマイニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は、抗菌剤ペニシリンや抗脂血症治療薬ロバスタチンなど、様々な薬理活性を有する二次代謝物(天然物)を生産する創薬における重要な生物資源である。しかし、長い歴史の中で身近なものは探索し尽くされ、従来のように、化学構造・生物活性ともにインパクトのある新規物質を発見することが難しくなった。一方で、近年多くの糸状菌ゲノムが解読されるにつれ、既知化合物からは連想されない全く新しい二次代謝物を生産する可能性を秘めた生合成遺伝子クラスターが数多く眠っていることが明らかにされた。しかし、一般的な培養条件において、それらの大部分が転写不活性な休眠状態にあり、過去に天然物として同定されたものはごく一部である。それゆえ、糸状菌に潜在する二次代謝物生産能を活用する新規天然物の創出は、天然物化学領域における重要な課題として認識されている。

2. 研究の目的

近年、中東呼吸器症候群(MERS)、エボラウイルス病、デング熱など、新興・再興感染症の危機に人類はさらされ、さらに深在性真菌症や薬剤耐性菌の蔓延も進んでいる。これらの脅威に対抗しうる有効な治療薬は乏しく、新規医薬品開発が国家レベルの急務として求められている。これまでペニシリンを代表とする多くの抗生物質が微生物由来天然物から見出されてきた歴史を踏まえると、新しい抗生物質を開発するためには、微生物に起源を持つ独創的な新規天然物を継続して供給する必要がある。近年、多剤耐性菌に効果を示す Lysocin E (Hamamoto, H. *et al.*, *Nature Chem. Biol.* 2015, 11, 127)、Teixobactin (Ling, L. L. *et al.*, *Nature* 2015, 517, 455)、Lugdunin (Zipperer, A. *et al.*, *Nature* 2016, 533, 511) の3つの新規抗生物質の発見が報告された。これら極めて優れた成果には、微生物の非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)に由来する新奇ペプチド天然物という共通点がある。そこで本研究では、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学手法により、糸状菌の未利用 NRPS 遺伝子から新規ペプチド天然物を獲得することを目的として行った。

3. 研究の方法

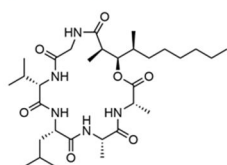
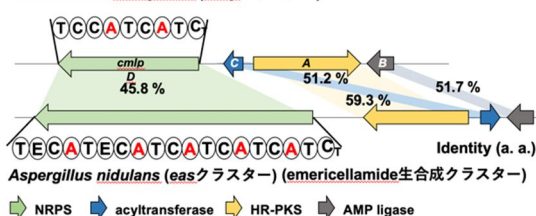
これまでに解読した植物や昆虫に内生する糸状菌のドラフトゲノム情報について、NRPS 遺伝子を指標とするゲノムマイニングを行い、NRPS を含むペプチド天然物の生合成遺伝子クラスターを探索し、NRPS 遺伝子のドメイン構造の解析と遺伝子クラスターに含まれる酵素の組み合わせから、新規ペプチド天然物をコードすると予想されるクラスターを探索した。得られた候補クラスターについて、モデル宿主である麹菌内で再構築することで、クラスターにコードされる天然物の獲得を目指した。

4. 研究成果

(1) ゲノムマイニングとバイオインフォマティクス解析による候補クラスターの選定

NRPS を指標とするゲノムマイニングの結果、ケタマカビの一種である *Chaetomium mollipilium* のゲノム上に高還元型ポリケタイド合成酵素(HR-PKS)と NRPS を含む生合成遺伝子クラスター(Cmlp クラスター)を発見した。Cmlp クラスターは HR-PKS 遺伝子(*cmlpA*)、アシル基転移酵素(AT)遺伝子(*cmlpB*)、アデニル化酵素遺伝子(*cmlpC*)および NRPS 遺伝子(*cmlpD*) から構成されており、個々の酵素のアミノ酸配列に基づく解析の結果、環状デブシペプチドである emericellamide 生合成遺伝子クラスターと相関性があることが判明し、Cmlp クラスターも環状デブシペプチドを与えることが示唆された。CmlpD のアミノ酸配列をクエリとして、公開データベースに登録されている相同クラスターを探索した結果、20 の相同遺伝子クラスターを発見した。

Chaetomium mollipilium (cmlp クラスター)



菌種	NRPSのドメイン構造
<i>Chaetomium mollipilium</i>	TCCATCATC ₇
<i>Chaetomium globosum</i>	TECATCATC ₇
<i>Stylonectria norvegica</i>	TCATCATCATC ₇
<i>Lindogomyces inqoldianus</i>	TECATCATCATC ₇
<i>Cordyceps militaris</i>	TCATECATCATEC ₇
<i>Talaromyces verruculosus</i>	TCATCATCATC ₇ T
<i>Beauveria bassiana</i>	TCATECATCATEC ₇
<i>Aspergillus nidulans</i>	TECATCATCATCATCATC ₇
<i>Aspergillus steynii</i>	TCATCATCATECATCATC ₇
<i>Acremonium chrysogenum</i>	TCATCATECATCATCATCATC ₇
<i>Fusarium venenatum</i>	TECATCATCATCATCATCATC ₇
<i>Fusarium</i> sp.	TECATCATCATCATCATCATC ₇
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	TCATECATCATCATCATCATC ₇
<i>Pharma</i> sp. F3723	TCATCATCATCATCATCATCATCATC ₇
<i>fungus</i> sp. No.11243	TCATECATCATCATCATCATCATCATCATCATCATC ₇

図1. Cmlp クラスターと emiceramide 生合成遺伝子クラスターの比較および類縁クラスターに含まれる NRPS のドメイン配列の比較
各クラスターの NRPS の A ドメインの数を指標として分類し、これまでに天然で単離されてい

るデブシペプチドの構造を考慮すると、CmlpD のように A ドメイン 2 つ、すなわちジペプチドとポリケタイドからなるデブシペプチドは報告例がなく、Cmlp クラスタが新規天然物をコードしていることが予想されたため、Cmlp クラスタを標的とした天然物探索を実施した (図 1)。

(2) Cmlp クラスタの再構築と生産物の単離および同定

Cmlp クラスタがコードする天然物を獲得するために、*cmlpA-D* の全ての生合成遺伝子を麹菌で異種発現した。その結果、遺伝子導入株特異的に 2 つの化合物 **1a** および **1b** の生産が確認された (図 2)。化合物 **1a** および **1b** をそれぞれ分取後、HPLC にて分析すると、いずれも **1a** および **1b** の混合物になることから平衡混合物であることが示唆された。そのため、**1a** および **1b** を混合物として精製し、そのまま NMR 解析を行った。その結果、トリプトファン、ロイシンおよびポリケタイドからなる環状デブシペプチド **1a** の構造と、アミドの窒素原子とエステルのカルボニルの間で結合が形成されたピシクロ環を有する **1b** の構造が判明した (図 2)。いずれも新規構造であった。マーフィー法を適用することで、ロイシンは L 体であると決定した。一方で、トリプトファンに関しては、3:1 の比で L 体と D 体が混合している結果になったが、**1b** の構造では、酸性条件下でトリプトファンの α 位の立体化学が異性化する可能性が排除できないため、現在詳細な検討を行っている。ポリケタイド部に関しては、塩酸による加水分解後、酢酸エチル層に単一の化合物として得ることができ、この時点で、NMR による構造決定を行い、2 の構造を得た (図 2)。ポリケタイド 2 のメチルエステル体に関して、全てのジアステレオマーの NMR データが報告されているため、2 をメチルエステルへと誘導し、NMR データの比較により相対配置の決定を試みた。しかしながら、一般的に用いられるメチルエステル化条件が適応できず、目的のメチルエステル体は得られなかった。現在、2 のメチルエステル化体を得るために詳細な検討を行っている。絶対立体配置については現在検討中ではあるが、平面構造から Cmlp クラスタから新規環状デブシペプチドを得ることができた。

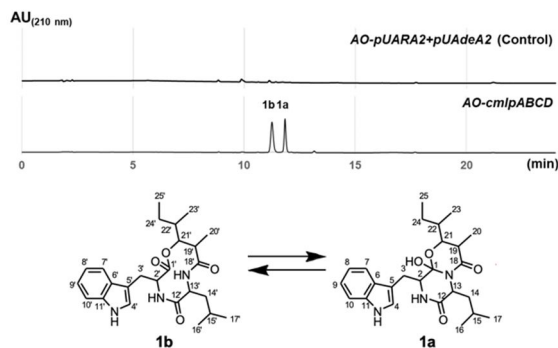


図 2. Cmlp クラスタの異種発現と新規デブシペプチドの平面構造

(3) 新規デブシペプチドの生合成に関する研究

得られた化合物 **1a** および **1b** の構造から、生合成経路を推定した (図 3)。まず、HR-PKS である CmlpA によってポリケタイド 2 の構造が生合成される。CmlpA は ACP ドメインで集結しているため、CmlpA から 2 を加水分解的に切り出す酵素が必要であるため、AT である CmlpB がその機能を担っていると推定された。次に 2 がアデニル化酵素 CmlpC によって AMP

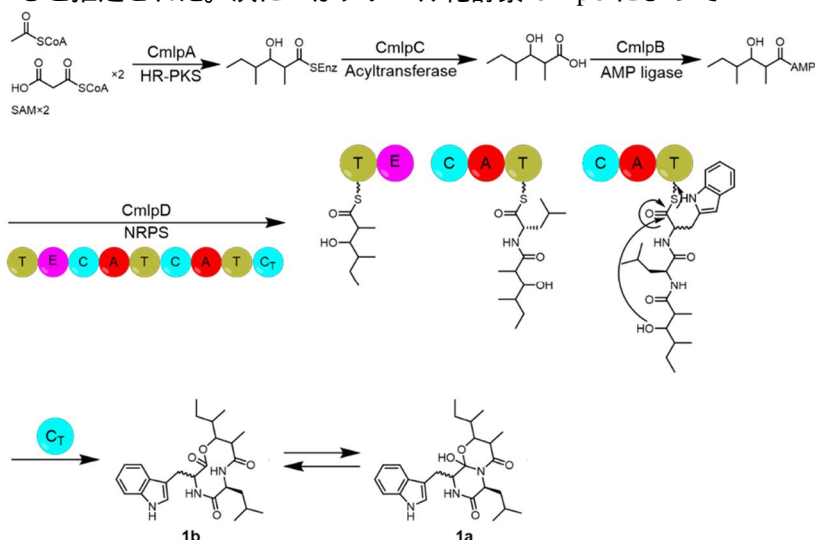


図 3. 新規デブシペプチドの推定生合成経路

化された後、NRPS である CmlpD にロードされ、ロイシン、トリプトファンと順番に伸長し、

CmlpD の C 末端に位置する Ct ドメインによって環化され、環状デブシペプチド **1a** が生合成されることが推定された。まず、AT である CmlpB がポリケチド鎖の加水分解に関わるか調査した。ポリケチド **2** は HPLC 検出試薬である 4-bromophenacyl bromide (PBPB) の誘導体 **3** として検出した。 *cmlpA* および *cmlpAB* を発現させた麹菌の培養物に対して、PBPB を反応させ、それぞれ HPLC で分析した。その結果、 *cmlpAB* を発現させた株のみで **3** が検出されたことから、予想通り、AT である CmlpB がポリケチド鎖を CmlpA から切り出すことが示された。HR-PKS からポリケチド鎖の加水分解を触媒する AT はほとんど知られておらず、HR-PKS の切り出し機構に新たな知見を与えるものである。

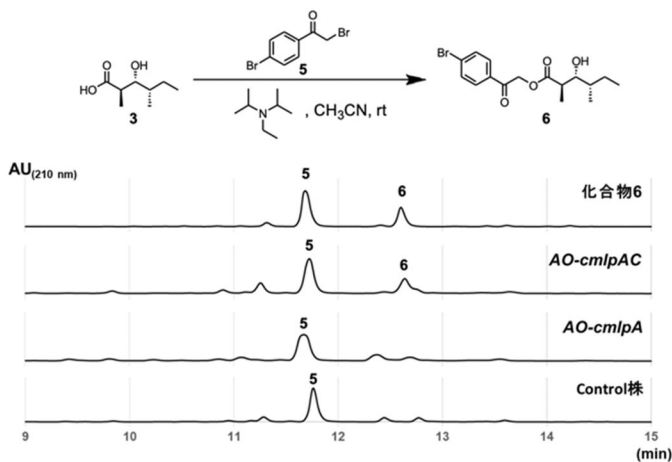


図 4. CmlpC のチオエステラーゼ活性の証明

(4) まとめ

本研究では、糸状菌の未利用 NRPS 遺伝子に着目し、新規抗生物質の発見を目的として、合成生物学的手法を取り入れた天然物探索を行なった。その結果、ケタマカビの一種である *Chaetomium mollipilium* のゲノム上に新規環状デブシペプチドをコードすると予想される Cilm クラスタを発見し、麹菌で再構築することで、新規環状デブシペプチド **1a** および **1b** の取得に成功した。また、HR-PKS からポリケチド鎖を切り出す機構についても明らかにした。本研究では、Cmlp クラスタ以外にも様々な NRPS を含むユニークな生合成遺伝子クラスターを発見し、異種発現実験に取り組んできた。化合物の取得まで至ったものは現状ではそれほど多くないものの、ゲノム情報から NRPS 遺伝子クラスターが多様な新規天然物をコードしているポテンシャルの高さが示されたため、引き続き、NRPS 遺伝子を含むクラスターの異種発現による天然物創製研究を継続することで、新たな抗生物質の取得につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kento Tsukada, Shono Shinki, Akiho Kaneko, Kazuma Murakami, Kazuhiro Irie, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi, Shingo Dan, Kumi Kawaji, Hironori Hayashi, Eiichi N. Kodama, Aki Hori, Emil Salim, Takayuki Kuraishi, Naoya Hirata, Yasunari Kanda & Teigo Asai	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fungal decalincontaining diterpenoid pyrones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15664-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yohei Morishita, Yu Aoki, Mei Ito, Daisuke Hagiwara, Kensho Torimaru, Daichi Morita, Teruo Kuroda, Hanako Fukano, Yoshihiko Hoshino, Masato Suzuki, Tohru Taniguchi, Keiji Mori, and Teigo Asai	4. 巻 22
2. 論文標題 Genome Mining-Based Discovery of Fungal Macrolides Modified by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ethanolamine Phosphate Transferase Homologues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5876-5879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c01975	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7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅井 禎吾
2. 発表標題 糸状菌ゲノム情報を活用するポストゲノム型天然物探索研究
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井 禎吾
2. 発表標題 糸状菌ゲノム情報に基づくポストゲノム型天然物探索研究
3. 学会等名 第 66 回日本放線菌学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teigo Asai
2. 発表標題 Post-genomic discovery of fungal natural products based on genome mining and heterologous expression
3. 学会等名 Cutting-edge natural product chemistry -next generation biomolecule redesign-
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅井禎吾
2. 発表標題 麹菌異種発現を基盤とする天然物探索研究
3. 学会等名 糸状菌相互応答学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teigo Asai
2. 発表標題 Discovery of natural products based on re-construction and re-designing of fungal cryptic biosynthetic gene clusters in <i>Aspergillus oryzae</i>
3. 学会等名 Japanese-German Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井禎吾
2. 発表標題 新たな医薬資源を開拓する糸状菌ポストゲノム型天然物探索研究
3. 学会等名 第139回日本薬学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間悠人、森下陽平、塚田健人、浅井禎吾
2. 発表標題 Chaetomium属菌のゲノム上にコードされた新規デブシペプチドの獲得
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------