

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19810018

研究課題名（和文） 糸状菌Ⅲ型ポリケタイド合成酵素の機能および構造解析

研究課題名（英文） Structural and functional analysis of type III polyketide synthases from filamentous fungi

研究代表者

勢 康代（SESHIME YASUYO）

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・流動研究員

研究者番号：30453319

研究成果の概要：Ⅲ型ポリケタイド合成酵素（PKS）は、これまで、植物及び一部原核微生物に分布することが既に知られていた。今回、真核微生物について解析を進め、麹菌 *Aspergillus oryzae* のⅢ型 PKS 遺伝子 *csyA* 発現株が 3,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) を主生成物として与えることを明らかにした。さらに、*csyB* 発現株は、germicidin 様新規化合物を主生成物として与えることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	258,558	1,608,558
年度			
年度			
年度			
総 計	2,710,000	258,558	2,968,558

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：糸状菌、二次代謝産物、ポリケタイド、生合成

1. 研究開始当初の背景

二次代謝産物は、限られた数種の一次代謝産物を前駆体として生合成されるが、中でもポリケタイド合成酵素（PKS）は、アシル CoA の縮合により様々な炭素骨格を構築する。PKS は構造的・生化学的性質により I 型、II 型、Ⅲ型に分類されており、このうちⅢ型 PKS は、アシルキャリアプロテインを使わずにアシル CoA を直接の基質として反応する、1 つの活性中心のみで一連の反応（脱炭酸、縮合、閉環、芳香化など）を触媒する、という性質を持つ。また、Ⅲ型 PKS は、植物フラボノイドの基本骨格を構築するカルコン合成

酵素（CHS）を始めとするスーパーファミリーを形成しており、近年、原核微生物にもⅢ型 PKS が見出されるなど注目を集めている（*Nature*, **400**:897, 1999）。

研究代表者は、真核微生物のうち、麹菌 *Aspergillus oryzae* を含む数種の糸状菌にⅢ型 PKS 遺伝子が存在することを見出し、新たなスーパーファミリーの存在を示唆した（*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**:253, 2005 発表）。しかしながら、いずれのⅢ型 PKS 遺伝子についても直接の生成物は未同定であり、また、*A. oryzae* 以外の糸状菌の持つⅢ型 PKS の生理的な本来の酵素機能や

その構造が明らかにされた研究例はない。

2. 研究の目的

麹菌 *A. oryzae* は、古来より醗酵産業に用いられてきた我が国固有の伝統的な糸状菌であり、多くの食品にも利用されていることから、その生産する二次代謝産物およびその生合成の解明は必須である。*A. oryzae* はⅢ型 PKS 遺伝子を 4 つ (*csyA*, *csyB*, *csyC*, *csyD*) 有しており、特に、*csyA* および *csyB* は、ゲノム解読に用いられた RIB40 株において発現が認められた機能遺伝子であることから、その機能を明らかにすることは重要である。

本研究の目的は、*A. oryzae* の二次代謝産物生合成におけるⅢ型 PKS の機能を生化学的・有機化学的に解明すること、また、糸状菌Ⅲ型 PKS の基質特異性、反応機構、および活性中心部位を含む全体の構造を解明することである。さらに、他の糸状菌のⅢ型 PKS について構造・機能的特徴を解析することにより、真核・原核生物に広がるⅢ型 PKS の分化、進化などについて総合的に考察することである。

3. 研究の方法

A. oryzae RIB40 株の cDNA をテンプレートとした PCR により *csyA* または *csyB* を増幅し、*A. oryzae* 発現用ベクター pTAex3 (*argB*) へ組み込んだ。これをプロトプラスト-PEG 法により宿主 *A. oryzae* M-2-3 株に導入した。M-2-3 株は二次代謝産物の生産性が低く、またⅢ型 PKS 遺伝子を発現していないため、本機能を解析するうえで適した宿主である。

csyA 増幅プライマー：5'-cac gtg ATG GCG CCC TTA ATT CAT GGT-3', 5'-cac gtg TTA GCG CGG CCG AGC-3' (*Sma* I site)

csyB 増幅プライマー：5'-cac gtg ATG ATT GAG CCA CTA CC-3', 5'-cac gtg TCA CGC ATG AAG GTA G-3' (*Sma* I site)

形質転換体を DPY 培地で 2 日間 30℃ 培養した後、マルトースを炭素源とし 1% ポリペプトンを含む Czapek-Dox 培地で 3 日間 30℃ にて誘導培養した。

DPY 培地：2% dextrin, 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 5.5

改変 Czapek-Dox 培地：0.3% NaNO_3 , 0.2% KCl , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% maltose, 1% polypeptone; pH 5.5

導入遺伝子特異的な生成物の構造決定を行うため、塩酸処理後の培養液酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラム (3 x 50 cm, Cosmosil 75C₁₈-OPN, Nacalai Tesque, Japan) に供して目的産物を分離した。さらに HPLC による分離を行い、単離精製した後、各種 NMR スペクトルを測定した。また、この一部を LC-ESI-TOFMS に供して精密質量を測定した。*CsyA* 生成物単離条件：1% 酢酸を含む 10% アセトニトリル溶液にてシリカゲルカラムで分離した後、ODS-80TM カラム (7.8 x 300 mm, Tosoh, Japan) で単離精製した。重アセトンに溶解し、NMR 測定サンプルとした。

CsyB 生成物単離条件：0.1% ギ酸を含む 25% メタノール溶液にてシリカゲルカラムで分離した後、0.1% ギ酸を含む 50% アセトニトリル溶液にて ODS-3 JET カラム (10 x 50 mm, GL science, Japan) で単離精製した。重クロロホルムに溶解し、NMR 測定サンプルとした。

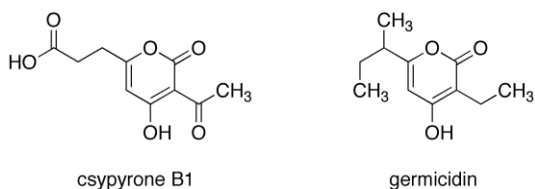
導入遺伝子特異的な生成物の生合成経路を明らかにするため、¹³C-標識酢酸を用いた生化学的実験と NMR による機器分析を行った。

4. 研究成果

(1) *A. oryzae* 由来Ⅲ型 PKS 産物の同定

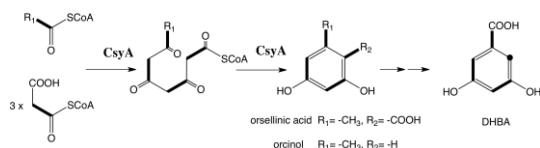
A. oryzae 発現用ベクターに *csyA* の cDNA を組み込んだプラスミドを構築し、*A. oryzae* M-2-3 株へ導入して形質転換体を取得した。培養液を酢酸エチルで抽出し、TLC、HPLC により分析を行い、培地からコントロールの形質転換体には見られない複数の化合物を検出した。大量培養を行い、オープンカラムや HPLC による単離精製を進め、各種機器分析により主生成物 3,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) を同定した。

同様に、*csyB* 発現株特異的な生成物について分析したところ、分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_6$ の germicidin 様新規化合物 3-(3-acetyl-4-hydroxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)propanoic acid (csypyrone B1) を主生成物として与えることが明らかとなった。以下に csypyrone B1 の物理化学的性質を示す。Colorless needles (CHCl_3); mp.: 135.6-136°C; UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 309 (4.45), 224 (4.43); IR (ATR) cm^{-1} : 3624 (-OH), 2923 (-COOH), 1704 (-CO-); ¹H-NMR: δ (ppm) 16.72 (4-OH), 6.00 (5-H, s), 2.83 (9-H₂, t, 7.3), 2.78 (10-H₂, t, 7.3), 2.67 (8-H₃, s); ¹³C-NMR: δ (ppm) 205.4 (C-7), 181.1 (C-4), 175.2 (C-11), 169.7 (C-6), 161.0 (C-2), 101.6 (C-5), 100.4 (C-3), 30.2 (C-8), 29.9 (C-10), 29.2 (C-9); HR-ESI-MS [$\text{M}+\text{H}$]⁺ m/z : 227.0543 (calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_6$: 227.0550).

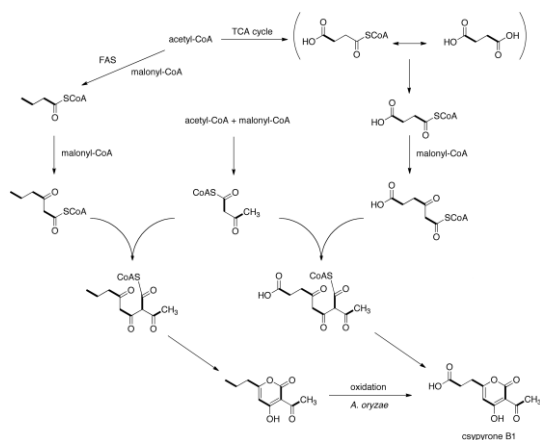


(2) III型 PKS 産物の代謝経路の解明

DHBA の生合成経路を明らかにするために、各種 ^{13}C -標識酢酸の取り込み実験を行った。[2- ^{13}C]酢酸による標識パターンから DHBA は β -ポリケトメチレン鎖に由来する酢酸単位の縮合反応によって生成することが示され、ポリケタイド化合物であることが判明した。しかしながらその構造から、DHBA は PKS の直接の生成物ではなく、オルセリン酸または 3,5-dihydroxyphenylacetic acid 等を中間体とし、酸化や脱炭酸反応を経て与えられると考えられた。[1,2- $^{13}\text{C}_2$]-酢酸の取り込み実験の結果、C1-7 のカップリングが現れたことから、予想した 2 種の経路のうち、アルドール反応による縮合を介するオルセリン酸様反応機構を経て生成することが推定された。



同様に、csypyrone B1 について ^{13}C -標識酢酸の取り込み実験を行ったところ、5 個の酢酸分子の縮合により与えられることが判明した。標識パターンの結果から、csypyrone B1 は、①サクシニル CoA と 3 分子のアセチル/マロニル CoA が縮合し、ピロン環の閉環反応によって生成する、②ブチリル CoA と 3 分子のアセチル/マロニル CoA が縮合し、ピロン環の閉環と側鎖の酸化反応を経て生成する 2 通りの経路が推定された。



(3) 糸状菌 III 型 PKS の分化・進化

本研究の遂行中、糸状菌 *Neurospora crassa* の III 型 PKS の機能解析、X 線結晶構造解析が発表された (*J. Biol. Chem.*, **282**:14476, 2007; *J. Struct. Biol.*, **162**:411, 2008)。 *N. crassa* の III 型 PKS (ORAS) は、ペンタケタイドのフェノール性脂質の合成を触媒する酵素であり、*A. oryzae* の CsyA は ORAS と同様の触媒機能を持つことが示唆された。

一方、*A. oryzae* の CsyB は、放線菌 *Streptomyces viridochromogenes* の産生する germicidin 様新規化合物 csypyrone B1 を生成することを明らかにしたが、さらに遺伝的に近縁な *Aspergillus flavus* は csyB 遺伝子を有しておらず、*A. oryzae* 特有の生成物であることが発見した。germicidin は、自身の孢子発芽を抑制する化合物であるが (*J. Antibiot.*, **46**:1126, 1993)、近年、*Streptomyces coelicolor* A3(2) の持つ III 型 PKS の 1 つ Gcs は、germicidin の合成に関与することが明らかにされている (*J. Am. Chem. Soc.*, **128**:14754, 2006)。今後、csypyrone B1 の生理学的な機能を解明することにより、本関連を明らかにしたい。

III 型 PKS 遺伝子は、*A. oryzae*、*N. crassa* 以外にも、*Fusarium graminearum*、*Magnaporthe grisea*、*Podospora anserina*、*Phenarocheate chrysosporium* などの糸状菌が持ち、ORAS と同様、あるいは異なる機能と反応制御機構を有することが予想される。今後、他の糸状菌 III 型 PKS の機能を明らかにすることにより、遺伝的進化に関する知見が得られるものと考えられる。

産業上有用な *A. oryzae* の代謝産物とその生合成経路を分子生物学的に解明する試みはこれまでになく、本研究はその先駆けとなり、得られた成果は、有用物質の高生産、または有害物質非生産株の育種に貢献できるものとする。PKS の中で、サイズが小さく最も取り扱いが簡便な III 型 PKS は、新規化合物を創出するためのツールとして大いに期待されており、本研究は、学術面だけでなく産業へも貢献すると考えている。

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 1 件)

Yasuyo Seshime, Praveen Rao Juvvadi, Katsuhiko Kitamoto, Yutaka Ebizuka, Isao Fujii. Identification of csypyrone B1 as the novel product of *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyB. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, in press

(2010) 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

勢  康代, 北本勝ひこ, 海老塚豊, 藤井勲.
麹菌 *Aspergillus oryzae* のⅢ型ポリケタイ
ド合成酵素. 第 59 回日本生物工学会, 2007
年 9 月 25 日, 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勢  康代 (SESHIME YASUYO)
国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・流動研
究員
研究者番号: 30453319

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者