

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05836

研究課題名(和文) 糸状菌が生産する酸無水物多量体の構造多様性創出に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the biosyntheses of fungal dimeric anhydrides

研究代表者

尾崎 太郎 (Ozaki, Taro)

東北大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40709060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、糸状菌が生産する二次代謝産物のうち無水マレイン酸型モノマーの多量化により生合成される化合物群に着目し、抗真菌活性を示すゾフィエリンをはじめとする糸状菌由来酸無水物多量体の生合成経路を解析した。本研究により、各化合物に特有のユニークな化学構造が共通の骨格を持つモノマーの多量化により構築されることが明らかになった。また、酸化酵素による骨格の酸化や骨格の転位などによりさらに構造が多様化し、生物活性天然物が作られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、糸状菌が生産する生物活性物質の中でも特にユニークな化学構造を持ち、多くの部分が未解明だった酸無水物多量体の生合成経路を明らかにした点に意義がある。近年、酵素反応や生合成系を利用した物質生産が着目されているが、生合成経路を明らかにし、異種宿主内で生合成経路の再構築にも成功したことから、形質転換体の培養による化合物の持続的な供給が可能になる。また、将来的には経路の改変や再設計などにより、天然物用の構造を持つ新規物質の創製にもつながりうる重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the biosynthetic pathway of fungal dimeric anhydrides such as an antifungal agent zopfiellin were analyzed. As reported in previous studies, maleic anhydride monomers are constructed by the action of polyketide synthase, alkylcitrate synthase, alkylcitrate dehydratase. After the biogenesis of monomers, ketosteroid isomerase-like enzymes (KIs) catalyze dimerization, yielding maleic anhydride dimers. KI in each pathway catalyzes dimerization in distinct mode, showing that KIs are key enzymes for structural diversification of fungal maleic anhydrides. Non-heme iron/ α -ketoglutarate dependent dioxygenases are also involved in the late stage modifications, further diversifying the structure to furnish structures of natural products.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌が生産する二次代謝産物には、無水マレイン酸型モノマーを基本構造としてそれらが多量化した化合物が存在する。一連の酸無水物多量体には生物活性物質が多く知られており、抗高脂血症薬のリードとして期待される phomoidride B (PMD-B) や抗真菌作用を示す zopfiellin (ZFL) はその好例と言える。優れた活性とユニークな化学構造から生合成研究が国内外で進められており、研究を開始した時点では PMD-B (Fujii *et al. Org. Lett.* **2015**) や byssochlamic acid (BSA) (Williams *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**) をはじめとするいくつかの化合物の生合成遺伝子クラスターが報告されていた。各化合物に共通する無水マレイン酸型モノマーの生合成経路がすでに解明されていたが、各化合物に特有の構造を構築し、構造多様性をもたらす多量化や酸化修飾に関する研究は限定的であった。

2. 研究の目的

近年、生合成酵素による物質生産が試みられている。特異性が高い酵素反応を制御し、利用するためには、類似の代謝経路を系統的に解析し、構造多様化のメカニズムを解明することが肝要である。一連の糸状菌由来酸無水物多量体の化学構造を比較すると、多量化の様式、酸化修飾による構造変化、モノマーの種類(アルキル鎖長・酸化度)の違いにより骨格の多様性が生まれると考えられる。研究開始時点では、多量化については BSA が有する 9 員環構造の構築のみが生合成遺伝子の異種発現によって実験的に確かめられており、8 員環 (ZFL) や多環式骨格 (PMD)、直鎖構造 (cordyanhydride, CAD) の構築に関する知見は得られていなかった。酸化酵素についても、rubratoxin に関する研究が報告されているが (Bai *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**)、他の生合成経路等と比較しながら系統的に解析した例はなく限定的である。ZFL や CAD についても申請者が独自に解析を行った結果、いずれの化合物の生合成にも類似の酵素群が関与することが示唆された。本研究課題では、骨格が異なる ZFL や PMD、CAD の生合成を系統的に解析し、多量化の反応点や反応様式の制御機構を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究課題では、「2. 研究の目的」で挙げた各化合物について、異種宿主内での生合成経路の再構築、及び各生合成酵素の組換えタンパク質による酵素反応により解析を進めた。先行研究での知見から、無水マレイン酸型モノマーの生合成にはポリケチド合成酵素 (PKS)、アルキルクエン酸合成酵素 (ACS)、アルキルクエン酸脱水酵素 (ACDH)、加水分解酵素 (FSH)、が必要だと考えられる。また、モノマーの多量化にはケトステロイド異性化酵素ホモログ (KI)、ホスファチジルエタノール結合タンパク質ホモログ (PEBP)、酸化反応には非ヘム鉄・ケトグルタル酸依存性ジオキソゲナーゼ (KGD) が関与すると考えられる。そこで、各化合物についてはじめにモノマーの生合成に必要な 4 遺伝子 (PKS, ACS, ACDH, FSH) をクローニングし、異種宿主である麹菌に導入した。各形質転換体を培養してモノマーの生産を確認した後、モノマー生産株に二量化酵素遺伝子や酸化酵素遺伝子などを導入して、天然物の異種生産を試みた。また、異種発現で機能が推定できた生合成酵素については、大腸菌を宿主として組換えタンパク質を調製し、酵素反応を検討した。以下に、各化合物に関する詳細を記載する。

(1) ZFL の生合成

上記の解析の前に予備検討として、ZFL 生産菌の代謝産物を分析した。すでに知られていた ZFL 以外に微量な代謝産物を複数同定したため、これらを単離し、NMR 等の各種スペクトルを解析して、その化学構造を決定した。また、これらの化合物が ZFL に関連する化合物であると考えられたため、決定した化学構造を基に ZFL の生合成経路を推定した。異種発現については、すでにモノマー生産株が構築済みであったことから、この形質転換体を宿主として解析を進めた。モノマー生産株に二量化酵素遺伝子や酸化酵素遺伝子を導入してその生産物を解析した。

異種発現によって機能が確認できた酸化酵素について組換えタンパク質を調製し、酵素反応を検討した。また、ZFL 生産菌や形質転換体に ^{13}C 標識化合物を投与する実験を行い、得られた化合物の標識パターンを ^{13}C NMR を用いて解析することで、本酸化酵素の反応機構を考察した。

(2) PMD の生合成

PMD についても、先行研究によってモノマー生産株がすでに構築されていた。しかし、生合成に必要なと考えられる遺伝子が ZFL などと比較して多いことから、近年申請者が提案したゲノム編集を用いた麹菌異種発現法 (C. Liu *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2019**) を利用して再度モノマー生産株の構築から研究を進めた。モノマー生産株を構築後、二量化酵素遺伝子を導入し、モノマーの二量化を検討した。形質転換体の代謝産物を LC-MS 等を

用いて分析した。また、新たに生産が確認された化合物を単離し、NMR 等の各種スペクトルを解析してその化学構造を決定した。さらに酸化酵素遺伝子や生合成遺伝子クラスター中に存在する他の遺伝子を導入し、PMD の異種生産を試みた。

(3) CAD の生合成

CAD についてもモノマー生合成遺伝子をクローニングし、異種発現を行った。また、CAD 生産菌を培養し、本菌が生産する代謝産物を分析した。すでに知られていた CAD-A および CAD-B 以外に関連化合物が生産されていることが示唆されたため、これらを単離しその構造を解析した。また、二量化酵素遺伝子を発現する形質転換体を作製し、本株を用いた微生物変換実験を実施した。

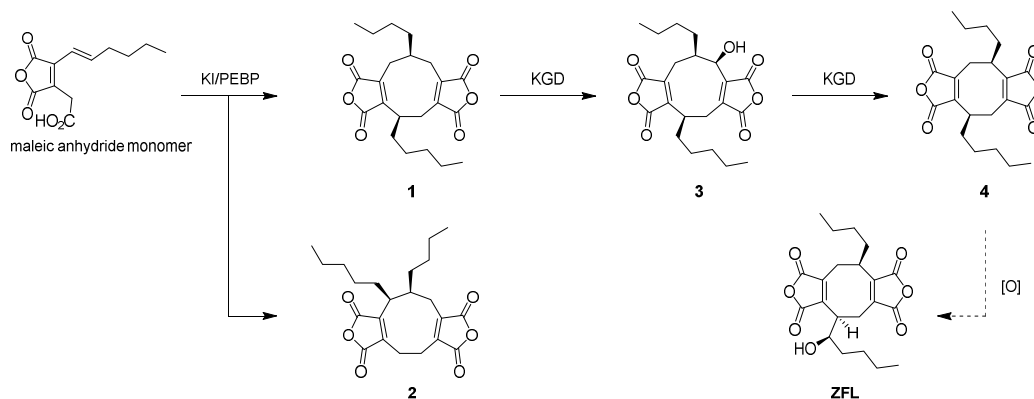
4. 研究成果

(1) ZFL の生合成

ZFL 生産菌の培養液から、ZFL 以外に新たに 4 種の関連化合物 1-4 を見出した。このうち、1, 2 はアルキル基の置換位置が異なる 2 種の 9 員環型二量体、3 は 1 の酸化体、4 は ZFL と同じ 8 員環型の二量体であった。これらの化合物の化学構造から、ZFL は 1 を中間体として、1 の酸化による 3 への変換、さらに 4 を経て生合成されると仮説を立てさらに解析を進めた。

モノマー生産株に二量化酵素遺伝子を導入したところ、新たに化合物 1, 2 が生産された。このことから ZFL の生合成においても、BCA 同様無水マレイン酸型モノマーの二量化により 9 員環型の二量体が生成することが明らかになった。BCA と異なり、アルキル基の置換位置が異なる二種の二量体が同時に得られたことから、二量化反応で想定される二種のモノマー反応様式を考察した。さらに酸化酵素遺伝子を共発現したところ、1 の酸化が進行し 3 が得られた。この時、予想外に 4 も同時に生成したことから、酸化酵素が連続的に酸化反応を触媒し、その過程で 9 員環から 8 員環への環縮小反応が進行することが示唆された。

このことをさらに詳細に明らかにするため、酸化酵素を組換えタンパク質として調製し、1 や 3 を基質として酵素反応を検討した。1 を基質とした場合には 3 と 4 が、3 を基質とした場合には 4 が生成したことから、本酸化酵素が上記の仮説通り連続的な酸化反応により ZFL 特有の 8 員環型二量体構造を構築することが支持された。また、¹³C 標識化合物の取り込み実験を行い、1 と ZFL の標識パターンを比較することで酸化反応の過程で一つの炭素原子が失われていることを見出した。この結果を基に、本酸化酵素の反応機構を考察した。以上の成果を、原著論文 1 報として報告した。



(2) PMD の生合成

ゲノム編集法を用いてモノマー生産株を構築した。先行研究 (R. Fujii *et al.* *Org. Lett.* 2015) では PMD 生産菌が有する生合成遺伝子クラスター (*phi* クラスター) と相同性を示す遺伝子クラスター (*tst* クラスター) が糸状菌 *Talaromyces stipitatus* のゲノム上に見出されていた。この *tst* クラスターにコードされているモノマー生合成酵素によっても、PMD と同じ無水マレイン酸型モノマーが構築されることが示されている。両遺伝子クラスター間で同様の遺伝子が保存されており、*tst* クラスター内のモノマー生合成遺伝子を異種発現するほうが高い生産量を与えることが報告されていたことから、本研究では *tst* クラスターが PMD 生合成遺伝子であると仮説を立て研究を進めた。モノマー生合成遺伝子の異種発現により先行研究と一致する無水マレイン酸型モノマーの生産が確認できたため、この形質転換体に二量化酵素遺伝子を導入した。得られた形質転換体の代謝産物を分析した結果、モノマーの二量化を示唆する新たな生成物を同定した。本化合物を単離し、その構造をモノマーの二量体であると決定した。さらに酸化酵素遺伝子や修飾酵素遺伝子を共発現したところ、二量体の酸化等の反応が進行し、天然物と考えられる生成物を得た。

以上の成果から、ZFL や BSA とは骨格が異なる PMD においても同様の酵素遺伝子が無水マレイン酸型モノマーの二量化や骨格の修飾に関わることを明らかにした。

(3) CAD の生合成

CAD についてもモノマー生合成遺伝子の異種発現株を構築したが、所望の無水マレイン酸型モノマーの生産は確認できなかった。一方、CAD 生産菌の代謝産物を分析した結果、CAD-A 及び CAD-B 以外に、これらの酸無水物多量体の構造を構成する二種のモノマーの生産が確認できた。ZFL や PMD と共通する構造のモノマーが生産されていたことから、各化合物の多量化には共通の反応に関わることを示唆された。

以上の研究成果から、糸状菌が生産する酸無水物多量体の生合成に類似の生合成酵素に関わることを明らかにした。本研究により、各化合物は共通の骨格を持つ無水マレイン酸型モノマーの多量化により生合成され、多量化酵素が反応様式を制御することで多様な骨格が作られることが示唆された。また、構築された二量体の酸化により構造が多様化されることを示した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tetsuya Shiina, Taro Ozaki, Yusuke Matsu, Shota Nagamine, Chengwei Liu, Masaru Hashimoto, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa	4. 巻 22
2. 論文標題 Oxidative Ring Contraction by a Multifunctional Dioxygenase Generates the Core Cycloocatadiene in the Biosynthesis of Fungal Dimeric Anhydride Zopfiellin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1997-2001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.0c00340	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 山本真太郎、尾崎太郎、劉成偉、丸山潤一、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 糸状菌由来酸無水物二量体phomoidride Bの二量化機構に関する研究
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本真太郎、尾崎太郎、劉成偉、丸山潤一、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 コレステロール生合成阻害剤 phomoidride B の生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部 / 日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江口桃香、長嶺翔太、尾崎太郎、劉成偉、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 酸無水物多量体 Cordyanhydride の生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会北海道支部 / 日本栄養・食糧学会北海道支部 合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本真太郎、尾崎太郎、劉成偉、丸山潤一、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 コレステロール生合成阻害剤phomoidride Bの生合成研究 (2)
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口桃香、長嶺翔太、尾崎太郎、劉成偉、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 酸無水物多量体Cordyanhydrideの生合成研究 (2)
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本真太郎、尾崎太郎、劉成偉、丸山潤一、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 糸状菌由来酸無水物二量体phomoidride Bの生合成研究 (2)
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 椎名 哲也・松 優佑、長嶺 翔太、尾崎 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 抗生物質zopfiellinの生合成研究 (4)
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 真太郎、尾崎 太郎、劉 成偉、丸山 潤一、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 糸状菌由来酸無水物二量体phomoidride Bの生合成研究
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎名哲也、松優佑、長嶺翔太、尾崎太郎、劉成偉、南篤志、及川英秋
2. 発表標題 抗生物質zopfiellinの生合成研究 (3)
3. 学会等名 日本農芸化学会 北海道支部第2回講演会（札幌）
4. 発表年 2019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
---------	---------