

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03045

研究課題名(和文)担子菌の代謝多様性で拓くモノ創り新戦略とセスキテルペンライブラリ

研究課題名(英文) Applications of metabolic diversity of basidiomycetes for construction of chemical library of sesquiterpenoids

研究代表者

一瀬 博文 (Ichinose, Hirofumi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00432948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、5種類の担子菌から46種のセスキテルペン合成酵素の遺伝子をクローニングし、酵母に異種発現させることで30種の酵素機能を決定した。このうち、*Pleurotus ostreatus*由来セスキテルペン合成酵素が産生する新規化合物の化学構造を決定して「Pleostene」と命名した。さらに、セスキテルペン合成酵素が産生する各種化合物に変換活性を示すシトクロムP450を同定し、自然界から単離されたことのない多種多様なセスキテルペンアルコールの合成を可能にした。一部のセスキテルペンアルコールにおいては抗がん活性が見出されるなど、ユニークな生物活性の発掘に興味を持たれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セスキテルペノイドは生物界で著しい構造多様性を示す天然物群であり、薬理活性を示す化合物も多く知られている。本研究では、担子菌に由来する様々なセスキテルペン合成酵素の機能を決定し、自然界からの獲得が困難なセスキテルペノイドの産生を可能にした。一連の研究においては新規化合物Pleosteneの発掘にも至っており、同化合物を経由して産生される各種天然物の生合成機構解明に大きく貢献する。また、セスキテルペン合成酵素とシトクロムP450を利用することで、多種多様なセスキテルペンアルコールの合成を可能にした。本研究の成果は、新たな生物活性化合物の発掘などを加速する技術基盤として活用されると期待される。

研究成果の概要(英文)：Gene identification and functional annotation of sesquiterpene synthases (STSs) from the basidiomycetous fungi were performed. Through these investigations, we isolated full-length cDNAs of 46 STSs and revealed the catalytic functions of 30 STSs using recombinant enzymes heterologously expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Notably, we discovered the unique function of an STS from *Pleurotus ostreatus* which produced a novel sesquiterpene hydrocarbon that we named pleostene. In addition, we revealed several cytochrome P450 monooxygenases that exhibit catalytic activities against sesquiterpene hydrocarbon produced by STSs. These findings provided potential techniques to synthesize novel sesquiterpene alcohols. It was also suggested that sesquiterpene alcohols produced in this study would have unique bioactivities.

研究分野：林産学

キーワード：担子菌 セスキテルペン シトクロムP450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) セスキテルペノイドは各種生物が産生する天然物であり、化学構造の多様性は天然物群の中でも著しく高い。同群には生物活性を示す化合物も多くあり、多様な構造を有するセスキテルペノイドは創薬シード化合物の宝庫として期待されている。一方、自然界に産出されるセスキテルペノイドは微量であり、その探索範囲と供給力に大きな問題を抱えている。複雑な構造のため有機合成も難しい。すなわち、自然界に眠る魅力あるセスキテルペノイドの獲得・利用には、これらの戦略的な合成を可能にするモノ創り新戦略が希求される。

(2) 各種生物の中でも、担子菌はセスキテルペノイド産生能に秀でており、担子菌がセスキテルペノイド生合成機構を著しく進化させた生物であることを意味する。その生合成においては、セスキテルペン合成酵素 (STS) による骨格分子の合成とシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) による骨格分子の修飾が重要な反応過程であると考えられるが、各々酵素の機能に関する詳細な知見は得られていない。近時、300 種類を超える担子菌のゲノム配列が解読され、大規模なポストゲノム研究を展開する情報基盤も整備された。このような背景の中、各種担子菌の STS 機能を明らかにすることで、複雑多岐にわたるセスキテルペン骨格分子の獲得が可能になると期待される。また、STS が与える骨格分子に変換活性を示す P450 を同定することで、自然界からの単離が困難な天然物の効率的合成を達成できる。また、P450 の潜在活性を利用して骨格分子を不自然に修飾することで、自然界には存在しない疑似天然化合物の獲得をも可能となる。

2. 研究の目的

各種担子菌の STS と P450 遺伝子をクローニングして機能ライブラリを構築し、STS と P450 を「網羅的・非合目的・非生物学的」に組み合わせることで新奇多彩なセスキテルペノイドの合成を達成し、化合物ライブラリを完成させて生理活性化合物を発掘することを目的とした。本研究では、セスキテルペノイド合成に有用な酵素群を大規模に取り揃え、P450 の潜在活性にも期待しながら網羅的に組み合わせ、天然に有るものから無いものまで創り出して有用化合物を見出すことを独創的なコンセプトとして一連の研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 担子菌 STS の獲得・・・ゲノムデータベースが公開されている担子菌のうち、日本国内に自生する菌種を選別し、STS 候補遺伝子が多く見出された 5 種類の担子菌 (*Agaricus bisporus*, *Auriscalpium vulgare*, *Lepista nuda*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*) を供試菌に選抜した。ゲノムデータベースに見出された候補遺伝子の遺伝子長および保存性アミノ酸を精査して翻訳領域を推定し、遺伝子特異的プライマーを設計して遺伝子増幅に備えた。各種担子菌を人工培地に生育させ、mRNA を抽出して RT-PCR による遺伝子増幅を行った。

(2) 担子菌 STS の機能解明・・・STS 翻訳領域を pGYR ベクターの GAPDH プロモータ下流に連結することで酵母発現プラスミドを構築した。構築した発現プラスミドを酢酸リチウム法によって *Saccharomyces cerevisiae* に形質転換し、人工培地に生育させることで各種 STS に由来するセスキテルペン骨格分子を産生させた。酵母代謝物を GC-MS 分析に供することで STS が与えた化合物を追跡し、単離可能な生成物においては NMR および X 線結晶構造解析を加えて詳細な化学構造を決定した [1]。

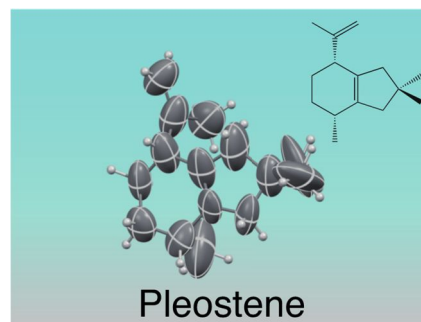
(3) *Trametes versicolor* (カワラタケ) 由来 P450 の獲得および機能発現・・・*T. versicolor* のゲノムデータベースに見出された候補遺伝子の遺伝子長および保存性アミノ酸を精査して翻訳領域を推定し、遺伝子特異的プライマーを設計して遺伝子増幅に備えた。各種担子菌を人工培地に生育させ、mRNA を抽出して RT-PCR による遺伝子増幅を行った。クローニングした P450 の完全長 cDNA を酵母発現ベクター-pGYRG に連結して異種発現システムを構築した。

(4) STS および P450 を利用した新規セスキテルペノイドの合成・・・STS を pY2G ベクターに挿入した酵母用発現プラスミドを構築し、糸状菌 P450 発現プラスミドと共に *S. cerevisiae* に形質転換して STS/P450 の共発酵母を得た。P450 には先行研究において発現プラスミドを構築した白色腐朽担子菌 *P. chrysosporium* 由来 P450 (PcCYP) 120 種 [2]、褐色腐朽担子菌 *P. placenta* 由来 P450 (PpCYP) 184 種 [3]、麹菌 *A. oryzae* 由来 P450 (AoCYP) 121 種 [4]、および本研究で獲得した *T. versicolor* 由来 P450 (TvCYP) 144 種からなる合計 569 種を利用した。STS/P450 共発酵母形を人工培地に生育させ、培養液に蓄積した代謝物を GC-MS 分析に供することで P450 依存的に生じたセスキテルペンアルコールを追跡した。また、単離可能な生成物においては NMR 分析に供して化学構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 酵素機能が異なる STS をより多く獲得することを目的として、異なる科・属に分類される *Agaricus bisporus*, *Auriscalpium vulgare*, *Lepista nuda*, *Pleurotus ostreatus* および *Trametes versicolor* を STS 遺伝子の獲得源として選定した。これらのゲノムデータベースを精査することで、5 種類の担子菌に 86 種類の STS 遺伝子を見出した。各々の担子菌が有する STS 遺伝子数は有意に異なっており、担子菌類が種分化した後も STS の多様化が進行したことを示唆している。STS 遺伝子の獲得を網羅的に実施した結果、46 種類の候補遺伝子を完全長 cDNA としてクローニングすることに成功した。さらに、30 種類の STS を *S. cerevisiae* を用いて異種発現させることに成功した。形質転換酵母が産生した代謝物を追跡したところ、各種 STS が様々なセスキテルペン骨格分子を与えることが示され、多種多様なセスキテルペン骨格分子の効率的な合成を可能にした。

一連の研究において、*P. ostreatus* (ヒラタケ) に由来する STS がユニークな生成物を産生した。当該化合物を NMR 分析および結晶スポンジ法による X 線結晶構造解析に供したところ、報告例のない新規化合物であることが明らかとなった。本研究で明らかた新規セスキテルペン骨格分子は、プレオステン (Pleostene) と命名して学術論文に報告した[1]。本結果は、担子菌類がプレオステンを出発物質として様々な天然物を与えることを示唆しており、未知天然物の獲得へ向けた発展研究を駆動する大きな成果である。



(2) 上述の研究(1)において *T. versicolor* (カワラタケ) に由来する STS が β -cadinene を与えた。Cadinene 類は担子菌に広く分布するものの、 β -cadinene 合成酵素は *T. versicolor* のみで見出された。本結果を基に、*T. versicolor* が β -cadinene を変換するユニークな P450 を有することが示唆されたことから、本研究において同菌の P450 遺伝子を準網羅的に獲得して多種多様なセスキテルペン誘導体の合成に備えた。カワラタケのゲノムデータベースを検索したところ、同菌に 188 種の P450 候補遺伝子が見出された。全ての候補遺伝子に特異的なプライマーを設計して RT-PCR による遺伝子増幅を行うことで、144 種の遺伝子を完全長 cDNA としてクローニングすることに成功した。得られた cDNA を利用して酵母による異種発現系を構築した。

(3) 本研究では、STS と P450 を「網羅的・非合目的・非生物学的」に組み合わせることで新奇多彩なセスキテルペノイドの合成を目指した。酵素機能を解明した STS のうち、 β -cadinene、 β -cadinene、 β -cuprenene または β -barbatene を主要代謝物として与える 4 種類の STS を用いて研究を実施した。各種 STS に対して 569 種の糸状菌 P450 を共発現させた形質転換酵母を作成し、セスキテルペン骨格分子が P450 によって修飾された代謝産物を追跡した。一連のスクリーニングにおいて、 β -cadinene に対して 10 種、 β -cadinene に対して 7 種、 β -cuprenene に対して 15 種、 β -barbatene に対して 4 種の P450 が変換活性を有することを明らかにした。*T. versicolor* に由来する β -cadinene 合成酵素と *T. versicolor* に由来する P450 の組み合わせによって 3 β -hydroxy- β -cadinene が生成した。3 β -hydroxy- β -cadinene はこれまでに報告されたことのないセスキテルペンアルコールであり、本研究において初めて得られた化合物である。また、本結果は *T. versicolor* による cadinene 系セスキテルペノイドの生合成を理解するうえで重要な知見である。興味深いことに、*T. versicolor* 以外の担子菌に由来する P450 においても様々な β -cadinene 誘導体を得られた。これまでのところ、*P. chrysosporium*, *P. placenta* および *A. oryzae* (本研究で利用した P450 の由来生物) において β -cadinene 合成酵素は見出されていない[5,6]。以上の結果は、各種 P450 が β -cadinene を非生理的に変換しうることを示唆しており、STS と P450 を「網羅的・非合目的・非生物学的」に組み合わせることで多種多様なセスキテルペノイドの合成が可能になることを実証した。

本研究で得られたセスキテルペノイドの生物活性を評価したところ、*A. vulgare* に由来する STS が与えるセスキテルペン骨格分子に抗がん活性が示唆された。当該骨格分子を変換する P450 の同定にも至っており、新規生理活性化合物の獲得にも繋がると期待された。

【引用文献】

- [1] Masunaga N, Kitaoka T, Ichinose H; *Microb Biotechnol*, 16,632 (2023)
- [2] Hirose H, et al; *Biochem Biophys Res Commun*, 407,118 (2011)
- [3] Ide M, Ichinose H, Wariishi H; *Arch Microbiol*, 194,243 (2012)
- [4] Nazir NHKHM, Ichinose H, Wariishi H; *Appl Environ Microbiol*, 77,3147 (2011)
- [5] Ichinose H, Kitaoka T; *Microb Biotechnol*, 11,952 (2018)
- [6] Ichinose H, Ukeba S, Kitaoka T; *Enzyme Microb Technol*, 158,110037 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Masunaga Natsuki, Kitaoka Takuya, Ichinose Hirofumi	4. 巻 16
2. 論文標題 Biocatalyst collection and heterologous expression of sesquiterpene synthases from basidiomycetous fungi: Discovery of a novel sesquiterpene hydrocarbon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Biotechnology	6. 最初と最後の頁 632 ~ 644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1751-7915.14204	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 Permana Dani, Kitaoka Takuya, Ichinose Hirofumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Conversion and synthesis of chemicals catalyzed by fungal cytochrome P450 monooxygenases: A review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.28411	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 -

1. 著者名 Hirofumi Ichinose, Shota Ukeba, Takuya Kitaoka	4. 巻 158
2. 論文標題 Latent potentials of the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium responsible for sesquiterpene metabolism: CYP5158A1 and CYP5144C8 decorate (E)- α -bisabolene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 110037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enzmictec.2022.110037	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11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄嶋菜月、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 子囊菌を宿主とした担子菌二次代謝関連遺伝子の転写と成熟mRNAの合成
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村瑞紀、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 -サンタレン変換活性を示す糸状菌シトクロムP450モノオキシゲナーゼの探索
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 陳シン、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 担子菌のセスキテルペンアルコール代謝に関わるシトクロムP450の同定
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内山優月、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 担子菌由来セスキテルペン合成酵素が産生する tremulane 型セスキテルペンアルコール
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 庄嶋菜月、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 子嚢菌を宿主とする担子菌遺伝子の転写と成熟mRNAの合成
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯貝強、北岡卓也、一瀬博文
2. 発表標題 糸状菌シトクロムP450が可能とするセスキテルペノイドの戦略的合成
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田萌、一瀬博文、北岡卓也
2. 発表標題 白色腐朽担子菌カワラタケが有するシトクロムP450の機能スクリーニング
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯貝強、北岡卓也、一瀬博文
2. 発表標題 多彩なセスキテルペノイドの合成を可能とする糸状菌シトクロムP450
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会、東京（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田萌、北岡卓也、一瀬博文
2. 発表標題 担子菌カワラタケが有するシトクロムP450の機能ライブラリ
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会、東京（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永友百合香、北岡卓也、一瀬博文
2. 発表標題 有用ジテルペノイドの獲得に向けた糸状菌シトクロムP450の機能探索
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会、東京（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増永夏輝、北岡卓也、一瀬博文
2. 発表標題 担子菌におけるセスキテルペン合成酵素の機能多様性
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会、東京（オンライン開催）
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