

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14795

研究課題名(和文) 複数の遺伝子領域が関与する糸状菌二次代謝物の構造多様化機構の解明

研究課題名(英文) Cross-Pathway Biosynthesis of Fungal Natural Products

研究代表者

岸本 真治 (Kishimoto, Shinji)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：40814330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々がヒト病原性糸状菌である *Aspergillus lentulus* から発見した新規化合物レントフランとフミマイシンの生合成研究を行い、これらの化合物が反応性の高い化合物アズラクトンの一種であるフマリルアズラクトンを經由して生合成されていることを明らかにした。これまでに天然における存在が報告されていないアズラクトンの発見と、一般的には環状ペプチドを合成する非リボソームペプチド合成酵素がアズラクトンを合成していることの実験により、微生物の有する複雑な物質生産システムの一部が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アズラクトンは有機合成で生じさせることができるものの反応性が高く容易に分解してしまうため天然において生産されているとは考えられていなかった。さらに、天然物の母骨格の生合成を担っている非リボソームペプチド合成酵素がこのような高反応性の化合物を生産することも予想外のことであった。本研究で達成した発見はこれまでの天然物生合成の常識を変えるものであり、学術的な意義は大きいといえる。また、アズラクトンから二種類の骨格の異なる化合物が生合成されるという発見をもとに、人類にとって有用な新規化合物の発見や創出が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, we discovered a novel compound lentofuranine and a structurally-related substance fumimycin from pathogenic fungus *Aspergillus lentulus*. The biosynthetic genes for these two compounds were investigated by gene deletion analysis and both Alter cluster (AlterA-C) and AlsidE were found to be indispensable. Alter cluster is known to produce common aromatic ring in lentofuranine and fumimycin and thus AlsidE seems to biosynthesize the remaining part. To clarify the role of AlsidE, reaction of heterologously-expressed AlsidE was conducted in the presence of hydroquinone, an analogue of Alter cluster product, and fumimycin analogue was produced in this condition. The ultrafiltrate of AlsidE reaction could also react with hydroquinone to give fumimycin analogue, suggesting fumarylazlactone was produced by AlsidE. Careful extraction of AlsidE reaction made us to detect fumarylazlactone, a highly-reactive compound, and the same compound was found in the culture broth of *A. lentulus*.

研究分野：天然物化学

キーワード：アズラクトン NRPS *Aspergillus*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始以前に我々はヒト病原系状菌 *Aspergillus lentulus* の培養抽出液よりベンゾフラン骨格を有する新規化合物レントフランinおよびそれと似た骨格を有する化合物フミマイシンを見出した。ベンゾフラン骨格は多くの医薬品に含まれる骨格であるものの天然からの報告例が少なく、その生合成が未解明である。そこで生合成機構を明らかにするべく遺伝子破壊実験を行ったところ、異なる骨格を有する化合物テレインの生合成遺伝子 *AlterA* がレントフランinやフミマイシンの生合成に関与していることが明らかとなった。しかし、ポリケチド合成酵素遺伝子である *AlterA* 周辺にはレントフランinやフミマイシン中に存在するアラニンを導入する遺伝子が存在しなかった。微生物は一般的に同じ遺伝子領域にまとまって存在する生合成遺伝子群(生合成遺伝子クラスター)を協調的に機能させることで二次代謝物を生産するとされるが、近年その例外も見出されている。このことからレントフランinやフミマイシンにおいても別の領域に存在する遺伝子が関与することで生合成されることが示唆され、そのメカニズム解明により二次代謝物の構造多様性を生み出すメカニズムの一端が明らかになると期待された。

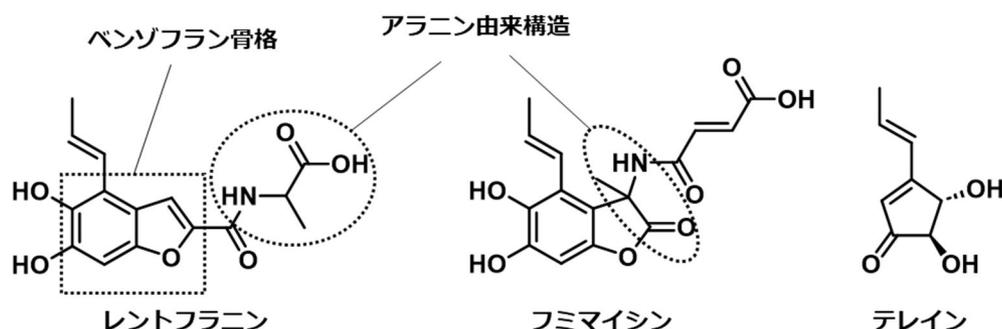


図1. ベンゾフラン骨格を有するレントフランinと同じ生合成遺伝子由来の化合物

2. 研究の目的

Aspergillus lentulus においてレントフランin、フミマイシン、テレインという三つの異なる骨格を有する化合物が同じ遺伝子産物から生産されているメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

レントフランinとフミマイシンの炭素骨格のうちテレインの生合成由来箇所を明らかにするために ^{13}C 標識酢酸ナトリウムの取り込み実験を行った。また、テレインの生合成遺伝子クラスターである *Alter* クラスターの構成遺伝子のノックアウトライブラリーを作成し、生産化合物の変化を調べた。また、この結果からフマリルアラニンの生合成遺伝子として報告されていた *AlsidE* がレントフランinやフミマイシンの生合成に関与していると予想し、*AlsidE* や周辺遺伝子をノックアウトして代謝物を調べることで *AlsidE* がレントフランinやフミマイシンの生合成遺伝子であることを明らかにした。

続いて大腸菌を宿主として *AlsidE* の組み換え酵素を調製し *in vitro* 反応により詳細な機能解析を行った。さらに生成が予想された不安定化合物フマリルアズラクトンを生合成により調製し、微生物代謝物や *AlsidE* の酵素反応溶液中に存在するかを調べた。また、変異体酵素を調製して酵素反応を行うことで酵素反応に重要なアミノ酸残基を明らかにした。

4. 研究成果

(1) レントフランinとフマリルアラニンの生合成遺伝子の特定

Alter クラスター中に含まれている化合物変換に関わる遺伝子をノックアウトしたところ、*AlterA* (PKS), *B* (DH-KR), *C* (FMO) の3つの遺伝子をノックアウトした時のみレントフランinとフミマイシンの生合成が消失することが明らかとなった。他グループの研究によりこの3つの遺伝子から生合成される化合物はヒドロキノン中間体とされており、これは ^{13}C 標識酢酸ナトリウムの取り込みが確認された骨格と一致していた。このことからレントフランin、フミマイシンとテレインとの生合成は *AlterC* が働いたのちに分岐していることが明らかとなった(図3)。続いてフミマイシンの構造からヒドロキノン中間体を除いた構造から、残りの構造がフマリルアラニン由来であると予想した。フマリルアラニンは *A. lentulus* の近縁種である *A. fumigatus* の酵素 *SidE* によって生産されることが報告されており、*A. lentulus* におけるオーソログ遺伝子である *AlsidE* をノックアウトしたところ予想通りレントフランinとフミマイシンの生産が消失し、テレインの生産に変化は見られなかった。*AlsidE* 近傍には還元酵素が存在していたがこのノックアウトでは化合物生産に変化が見られなかった。

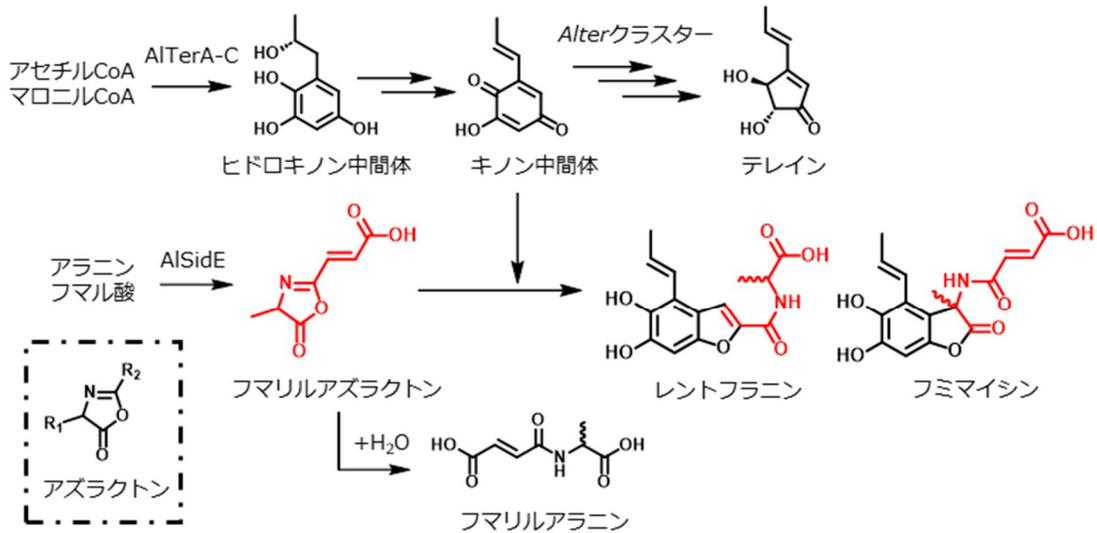


図2. レントフランニン、フミマイシン、テレインの生成経路

(2) AlSidE によるフマリルアズラクトン生成の発見

AlSidE の産物がどのようにしてフミマイシンやレントフランニンを生産するかを明らかにするべく、大腸菌を宿主として調製した AlSidE を用いて様々な条件で反応を行った。その結果、AlterA-C の生産化合物の代替としてメトキシヒドロキノンを酵素溶液に混ぜるとフミマイシン類縁体が生成されることが明らかとなった。このフミマイシン類縁体は AlSidE の反応生成物をメトキシヒドロキノンと混ぜても生成し、フマリルアラニンとメトキシヒドロキノンを混ぜるだけでは生成しなかったことから、AlSidE の真の産物がフマリルアラニンではないことが示唆された。AlSidE の末端ドメインが環化反応を触媒する CT ドメインであったことから、我々は AlSidE 真の生産物を高反応性化合物であるアズラクトンに分類されるフマリルアズラクトンであると仮定した。アズラクトンは水とも容易に反応して対応するカルボン酸を生じるため、フマリルアズラクトンが分解されたフマリルアラニンが検出されることも矛盾はない。これまでに天然でアズラクトンが生合成されているという報告がなかったため証明方法に苦慮したが、AlSidE の酵素反応物を温和な条件で濃縮して速やかに分析し、有機合成したフマリルアズラクトンと比較することで AlSidE がフマリルアズラクトンを生産していることを明らかにした。また、有機合成したフマリルアズラクトンの NMR 解析の過程でこれが通常のアズラクトンとは異なる異性化を経ることを見出し、このことからレントフランニンとフミマイシンの推定生成経路を提唱するに至った (図3)。

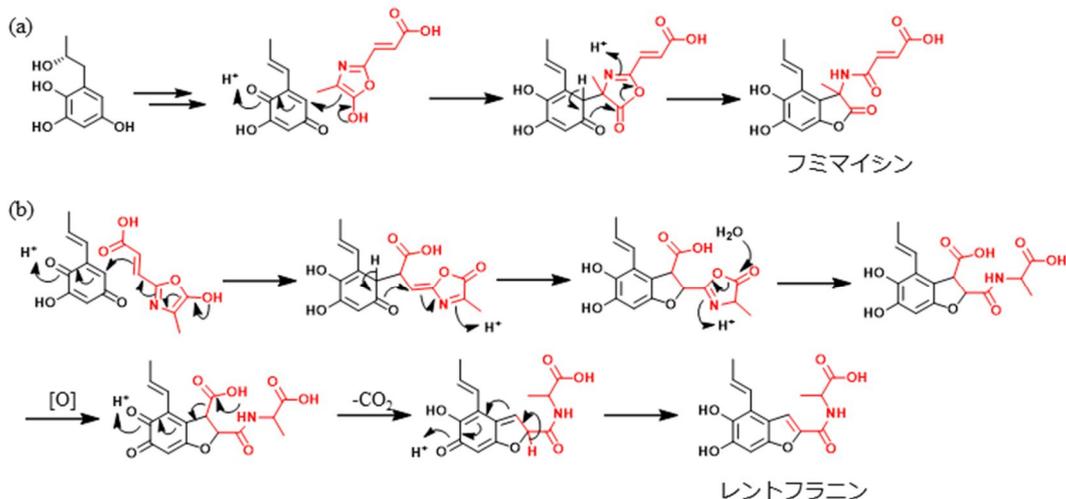


図3. (a) フミマイシンと (b) レントフランニンの推定生成機構

(3) 新規アズラクトン合成酵素の発見と機能解析

AlSidE がアズラクトンを合成することを世界で初めて明らかにすることができたが、どのようにしてこれが可能となっているか不明であった。そこで AlSidE のほかにアズラクトンを生じうる酵素を探索したところ、AlSidE と高い相同性を有する AlFtpA を見出した。これは *A. fumigatus* においてフマリルチロシンを生産することが報告されている FtpA のオーソログであり末端ドメインが環化反応を触媒する CT ドメインである。フマリルアラニンが生産物だと誤

解されていた SidE と同様に真の生産物はアズラクトンと予想された。そこでこれを大腸菌にて発現させて機能解析を行った。AlSidE と比較すると大腸菌での発現量が低く直接アズラクトンを検出することはできなかったものの、メトキシヒドロキノンを添加した際に新たなフミマイシン類縁体が生じたこと、生成するフマリルチロシンがラセミ体であることから真の生産物がアズラクトンであることを確認することができた。また、AlSidE と AlFtpA の配列を比較して保存されている領域に変異を導入することで CT ドメイン中の His 残基が重要な働きを担うことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Kishimoto Shinji, Minami Ayumi, Aoki Yoshimitsu, Matsubara Yuya, Watanabe Shogo, Watanabe Kenji | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 Reactive Azlactone Intermediate Drives Fungal Secondary Metabolite Cross-Pathway Generation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society | 6. 最初と最後の頁 3221 ~ 3228 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c13188 | 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 Kishimoto Shinji, Matsubara Yuya, Watanabe Kenji | 4. 巻 144 |
| 2. 論文標題 Alkaloid Biosynthetic Enzyme Generates Diastereomeric Pair via Two Distinct Mechanisms | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society | 6. 最初と最後の頁 5485 ~ 5493 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c13621 | 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 Okamoto Takumi, Kishimoto Shinji, Watanabe Kenji | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Isolation of Natural Prodrug-Like Metabolite by Simulating Human Prodrug Activation in Filamentous Fungus | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 304 ~ 308 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-01099 | 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 Kishimoto Shinji | 4. 巻 78 |
| 2. 論文標題 Non-enzymatic reactions in biogenesis of fungal natural products | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines | 6. 最初と最後の頁 467 ~ 473 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-024-01797-z | 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 岸本真治、渡辺賢二 | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 ヒト病原性アスペルギルスの特異な二次代謝 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ | 6. 最初と最後の頁 723-726 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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29件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木亮大、永井拓実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus lentulus</i> 由来の新規天然物 <i>lentoclavine</i> の生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第144年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 田村翼、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 真菌由来ニトリル基含有化合物auranthineの生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第144年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木亮大、永井拓実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus lentulus</i> 由来の新規天然物 <i>lentoclavine</i> の生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 田村翼、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 真菌由来ニトリル基含有化合物auranthineの生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 長澤研穂、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 Aspergillus carbonariusの生産する新規化合物の探索、単離、構造決定 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第69回年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 永井拓実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌 Aspergillus lentulus 由来の新規天然物lentoclavineの生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第69回年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 長澤研穂、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 Aspergillus carbonariusの生産する新規セスキテルペンの単離および構造決定 |
| 3. 学会等名 第24回天然薬物の開発と応用シンポジウム |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 永井拓実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌 <i>Aspergillus lentulus</i> 由来の新規天然物 <i>lentoclavine</i> の生合成研究 |
| 3. 学会等名 第24回天然薬物の開発と応用シンポジウム |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 岸本真治、南歩実、松原有也、竹島実加、渡邊正悟、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌二次代謝における隠されたアズラクトン形成の発見 |
| 3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------|
| 1. 発表者名 岸本真治 |
| 2. 発表標題 病原性糸状菌由来新規二次代謝物の探索と生合成機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 青木義光、南歩実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 アズラクトン合成酵素の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 松原有也、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 Lentopeptin A, B の生合成経路におけるジアステレオマー形成機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 南歩実、岸本真治、渡邊正悟、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 アズラクトンを経由する糸状菌二次代謝産物の生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 青木義光、南歩実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 アズラクトン合成酵素の機能解析 |
| 3. 学会等名 第9回食品薬学シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 松原有也、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌Aspergillus lentulus由来新規天然物Lentopeptinの発見とそのジアステレオマー形成機構解析 |
| 3. 学会等名 第9回食品薬学シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 南歩実、岸本真治、渡邊正悟、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 アズラクトン形成を経由する糸状菌二次代謝産物の生合成研究 |
| 3. 学会等名 第9回食品薬学シンポジウム |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 青木義光、南歩実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 アズラクトン合成酵素の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会大143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 青木義光、南歩実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 アズラクトン合成酵素の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|----------------------------------------|
| 1. 発表者名 岸本真治 |
| 2. 発表標題 二次代謝における酵素反応と非酵素反応 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会 若手シンポジウム(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 南歩実、渡邊正悟、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 ベンゾフラン骨格を有する糸状菌由来天然物fumimycinおよびlentofuranineの生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 松原有也、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌Aspergillus lentulus由来新規化合物lentopeptin A, Bの生合成機構 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 南歩実、渡邊正悟、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 ベンゾフラン骨格を有する糸状菌由来天然物fumimycinおよびlentofuranineの生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 松原有也、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌Aspergillus lentulus由来新規化合物lentopeptin A, Bの生合成機構 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 永井拓実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 病原性アスペルギルス属真菌が産生する免疫抑制化合物sphingofungin類の生合成機構の解明 |
| 3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 南歩実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 ベンゾフラン骨格を有する糸状菌由来天然物fumimycinおよびlentofuranineの生合成研究 |
| 3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 松原有也、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 糸状菌Aspergillus lentulusの生産する新規天然物lentopeptin類の単離、構造決定および生合成 |
| 3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 永井拓実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 Aspergillus属糸状菌が産生する免疫抑制化合物sphingofungin類の生合成機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------------|
| 1. 発表者名 南歩実、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 特異なベンゾフラン骨格を有する糸状菌由来天然物の生合成研究 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 松原有也、岸本真治、渡辺賢二 |
| 2. 発表標題 Aspergillus lentulusの生産する新規天然物lentopeptin A,Bの構造決定と生合成解析 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|