

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350965

研究課題名(和文) 真菌における分生子形成誘導ジテルペノイドの生合成解析と受容体探索

研究課題名(英文) Functional analysis of diterpene synthase responsible for fungal conidiation inducing and its diterpene reseptor discovery

研究代表者

兼目 裕充 (KENMOKU, Hiromichi)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：10399438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は*Penicillium cyclopium* シノニム6種およびモデル真菌 *Aspergillus nidulans* が持つ新規ジテルペン環化酵素の機能解析を行い、環化生成物が極微量で分生子形成の誘導と菌糸の増殖生長を抑制することを見出した。また、両酵素のバーチャルスクリーニングで得られた阻害剤候補について、実際に阻害剤を得ることに成功した。一方、*A. nidulans* において AnDS1 環化産物の代謝変換実験を行ったところ、モノアシルグリセロールが蓄積することが明らかとなった。この構成脂肪酸は、*Aspergillus* 属菌において Psi factor と呼ばれる胞子形成調節因子であった。

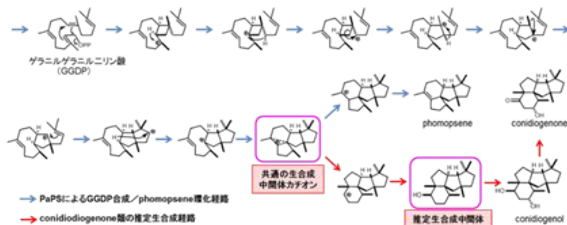
研究成果の概要(英文)：Recently, the fungus *Penicillium cyclopium* was found to produce conidiogenol and conidiogenone as self conidiation inducing-diterpenoids. This finding indicates that a novel diterpene synthase would utilize for the biosynthesis of these diterpenoids. To study the conidiation in fungi, we have identified two novel diterpene synthases (PeDS and AnDS1) from *P. cyclopium* synonym and *Aspergillus nidulans* A4. Heterologous expressed in vivo enzyme assays revealed that PeDS catalyzes the GGDP synthesis and convert into novel 3-deoxyconidiogenol, and AnDS1 catalyzes the GGDP synthesis and into novel diterpene hydrocarbon, respectively. The structures of two novel compounds were elucidated by spectral data. These compounds were revealed to have conidiation inducing activities in the submerged culture of *P. cyclopium* synonym and *A. nidulans* A4, respectively.

研究分野：天然物化学、生物分子科学

キーワード：ジテルペン 環化酵素 真菌 分生子 阻害剤 ドッキングシミュレーション *Penicillium Aspergillus*

1. 研究開始当初の背景

真菌類の生活環の多くを占める無性世代において、分生子（無性孢子）形成は伝播・拡散を行うための重要な手段であるが、その誘導メカニズムは不明な点が多く、統一的理解には未だに至っていない。とりわけ、マユハキタケ科に属する真菌類は食品製造や医農薬生産に多く用いられる。また、病原真菌やカビ毒生産菌など農業的、医学的にも重要な種を多数含むため、本属の生活環の多くを占める無性世代の精密な理解は、各方面から強く要望されている。マユハキタケ科に属するモデル真菌 *A. nidulans* において、1940年代から欧米の研究者を中心として遺伝学・分子生物学的な面からよく研究されている。Adams らは変異株を用いた研究から、Gタンパク質シグナルが分生子形成とカビ毒生産を抑制しており、未知の内生低分子活性物質の下流シグナルが Gタンパク質シグナルを止めることにより、分生孢子形成とカビ毒生産を誘導するという仮説を提案している (T.H.Adams ほか: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 1998)。しかし、*A. nidulans* 変異株を用いた分生子形成シグナル伝達系に関する研究は精力的に行われているものの、未知の内生低分子活性物質および受容体は同定されていなかった。一方、Roncal らはマユハキタケ科に属する *Penicillium cyclopium* の液体培養ろ液から、分生子形成を誘導するジテルペノイドのconiogegenol およびconiogegenonを微量分離した (T.Roncal ほか: *Tetrahedron Lett.*, 43, 2002 および *Eukariotic Cell*, 1, 2002)。我々はこのような背景のもとで、coniogegenon類の炭素骨格が既にクローニングされているジテルペン環化酵素による環化産物ホモプセンと共通の生合成中間体カチオンを経て生合成されると予測し、これらのジテルペノイドの生合成酵素類と分生子形成の関係に着目した。*P. cyclopium* シノニム6種およびモデル真菌 *A. nidulans* が持つ新規ジテルペン環化酵素オーソログ/パラログの機能解析を行い、各々の酵素 (PeDS および AnDS1) が環化生成する新規ジテルペノイド類2種が極微量でそれぞれの真菌における分生子形成の誘導と菌糸の増殖生長を抑制することを見出した。



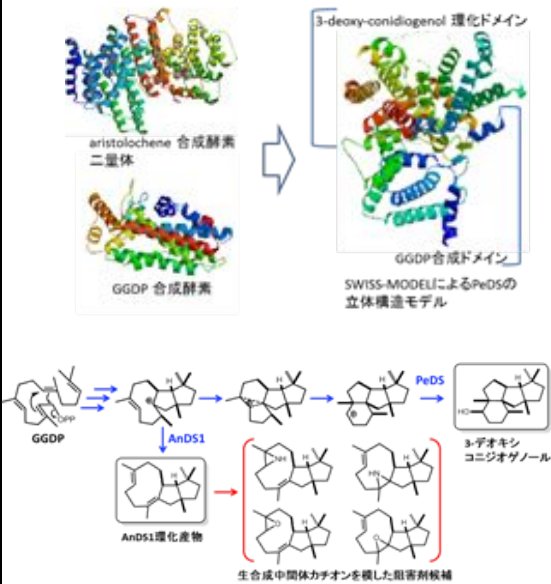
2. 研究の目的

本研究の目的は、マユハキタケ科に属する2種の真菌において、前述の新規ジテルペノイド類と分生子形成誘導の関係を解明することにあり、第一に、2種の酵素によるジテル

ペン環化メカニズムを基盤とする酵素阻害剤を探索・創生すること、第二に環化酵素以降の代謝を担う生合成酵素を明らかにすること、第三として、受容体の探索を含め既知の分生子誘導シグナル伝達系と新規ジテルペノイド類との関係を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ジテルペン環化酵素 PeDS および AnDS1 の環化メカニズムを基盤とする酵素阻害剤を探索・創生する。具体的には、両酵素のテルペン環化ドメインと相同性の高いセスキテルペン (アリストロケン) 合成酵素の X線結晶解析データを基に、SWISS-MODEL により構築した PeDS および AnDS1 の立体構造モデルと化合物構造ライブラリーを用いたバーチャルスクリーニングにより、阻害剤の候補構造を得る。さらには得られた化合物について、リコンビナント酵素を用いた阻害アッセイ、培養液浸漬条件下およびペーパーディスク法により分生子形成阻害活性の評価を行う。また、AnDS1 環化産物からの化学誘導によって、共通の生合成中間体カチオンを模した酵素阻害剤の創生を検討する。



(2) 環化酵素以降の代謝を担う生合成酵素を明らかにする。*P. cyclopium* シノニムにおいては次世代シーケンサーを用いて明らかにしたゲノム配列上で PeDS 近傍に P450 酵素遺伝子が存在することから、酵母を用いた機能解析またはノックアウト体 (KO 体) の作出により、環化産物の代謝への関与を検討する。*A. nidulans* A4 株においては、AnDS1 近傍ではないが相同性の非常に高い P450 酵素遺伝子が存在することから、同様にこれの機能解析を行う。これによって、永らく未知であった *A. nidulans* における分生子誘導因子活性本体の構造を明らかにする。一方で、機能解析等がうまく行かない場合も想定して、AnDS1 環化産物の代謝変換によって、分生子

誘導因子活性本体となる代謝産物の同定も検討する。

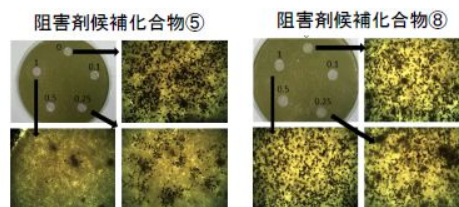
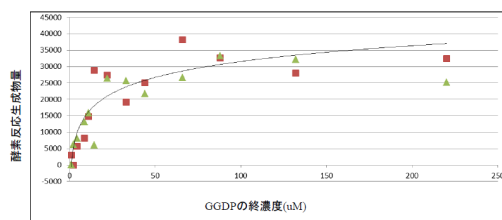
(3) 既知の分生子誘導シグナル伝達系と新規ジテルペノイド類との関係を明らかにする。PeDS および AnDS1 環化産物や代謝産物の投与、得られた阻害剤や KO 体等を用いて既知シグナル伝達系と新規ジテルペノイド類の関係を明らかにする。また、*P. cyclopium* シノニムにおけるコニジオゲノンおよび *A. nidulans* において相当する分生子誘導因子活性本体が(2)において明らかになった場合、それぞれ非特異的クロスリンクによるピオチンリンカーとのコンジュゲートを合成して、これを用いた受容体探索を試みる。

#### 4. 研究成果

##### (1) ジテルペン環化酵素 PeDS および AnDS1 の環化メカニズムを基盤とする酵素阻害剤の探索・創生

PeDS および AnDS1 両酵素のテルペン環化ドメインと相同性の高いセスキテルペン(アリストロケン)合成酵素の X 線結晶解析データを基に、SWISS-MODEL により構築した PeDS および AnDS1 の立体構造モデルと 3 万 3000 件の化合物構造ライブラリーを用いたバーチャルスクリーニングを行い、8 種の阻害剤候補化学構造を得ることができた。初年度はこれらを購入して、種々の酵素阻害アッセイおよび分生子形成阻害実験を行う予定であったが、ウクライナ紛争による国際情勢で入手ができなかったことから、新たに 60 万件の化合物構造ライブラリーを用いたバーチャルスクリーニングを行い、新たに 8 種の阻害剤候補化学構造を追加した。

得られた 16 種の阻害剤候補について、調製した AnDS1 リコンビナント酵素へのゲラニルゲラニルピリン酸 (GGDP) を基質とする環化反応阻害作用を検討すべく、酵素カイネティクスを求めた。良好な反応条件が設定できたことから、 $V_{max}/2$  となる GGDP 濃度で阻害剤候補の阻害作用を検討したところ、全般的に阻害作用が現れた。特に強い酵素阻害作用の現れた 5 種類の化合物について、固形培地上でのペーパーディスク法による分生子形成阻害実験を行ったところ、 $20 \mu\text{M}$  以下で AnDS1 リコンビナント酵素の環化反応活性をほぼ完全に阻害した阻害剤 8 は、固形培地上  $0.25 \mu\text{mol}/\text{disc}$  の濃度で *A. nidulans* の分生子胞子柄の形成を半分以上に抑えることが明らかとなった。また、 $40 \mu\text{M}$  から顕著な環化反応阻害を示す阻害剤 5 は固形培地上において濃度依存的に *A. nidulans* の分生子胞子柄の形成に抑制ことが明らかとなった。特に  $0.5 \mu\text{mol}/\text{disc}$  の濃度で分生子胞子柄の形成をほぼ完全に抑制し、AnDS1 環化産物  $50\text{nmol}/\text{disc}$  の同時添加で分生子胞子柄の形成を若干回復することから、直接の酵素阻害作用に加えて、別の作用の存在も示唆された。



一方、AnDS1 環化産物からの化学誘導によって、共通の生成中間体カチオンを模した酵素阻害剤を創生すべく、AnDS1 環化産物の組換え大腸菌による大量調製とエポキシド誘導体反応を行った。得られたエポキシド誘導体の立体異性体混合物は AnDS1 リコンビナント酵素の環化反応活性を強く阻害したことから、阻害活性本体の生成を試みたが、精製時における分解反応によって、阻害活性本体の同定には至らなかった。

##### (2) 環化酵素以降の代謝を担う生合成酵素の解明

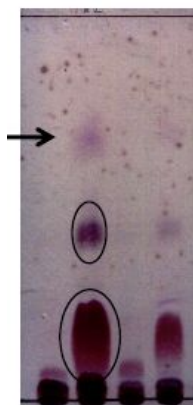
*P. cyclopium* シノニムにおいては次世代シーケンサーを用いて明らかにしたゲノム配列上で PeDS 近傍に P450 酵素遺伝子が存在することから、酵母を用いた機能解析を行った。P450 酵素遺伝子および P 450 還元酵素を発現ベクターにクローニングし、形質転換した酵母の培地に PeDS 環化産物の 3 - デオキシコニジオゲノールを添加した場合、および PeDS との共発現も検討したが、想定される酸化物であるコニジオゲノールおよびコニジオゲノンは検出されなかった。このことから当該 P 450 酵素遺伝子の KO 体の作出を試みている。

##### (3) 既知の分生子誘導シグナル伝達系と新規ジテルペノイド類との関係

*A. nidulans* においてコニジオゲノールおよびコニジオゲノンに相当する分生子誘導因子活性本体は明らかになっていない。*P. cyclopium* シノニムにおいては 3 - デオキシコニジオゲノールの代謝変換実験により、速やかにコニジオゲノールおよびコニジオゲノンへと代謝されることが明らかになったことから、AnDS1 環化産物の組換え大腸菌による大量調製および *A. nidulans* による代謝変換実験を試みた。AnDS1 環化産物は速やかに消え、AnDS1 環化産物無添加区には無い化合物が明瞭に AnDS1 環化産物添加区に現れたことから、当初はこれを代謝産物として精製を進めたところ、予想に反して得られた化合物は各種スペクトル解析の結果、モノアシルグリセロールであることが明らかとなった。このモノアシルグリセロールを構成する脂



脂肪酸は *Aspergillus* 属菌において Psi factor



① ② ③ ④

と呼ばれる孢子形成調節因子の一つであったことから、図らずも孢子形成に関わる既知シグナル伝達系との関係を繋ぐ成果が得られた。AnDS1 環化産物は速やかに消えたことから代謝は行われているものと推測されるが、代謝産物が直接に分生子形成を誘導するのではなく、Psi factor を介して誘導するメカニズムが存在していることが強く示唆される結果となった。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

兼目 裕充 (KENMOKU, Hiromichi)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：10399438

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

兼目裕充, 高橋宏暢, 江角朋之, 大久保翔, 田所真之介, 濱崎万由佳, 野路征昭, 豊田正夫, 浅川義範, 「マユハキタケ科真菌類における分生孢子形成阻害剤の探索」日本薬学会第 135 年会 (2015 年 3 月 25-28 日, 神戸市)

兼目裕充, 高橋宏暢, 田中正巳, 田所真之介, 濱崎万由佳, 江角朋之, 豊田正夫, 浅川義範, 「真菌分生孢子形成誘導因子の生合成における酵素阻害剤の探索」第 59 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (2015 年 9 月 5-7 日, 東大阪市)

田所真之介, 兼目裕充, 濱崎万由佳, 大久保翔, 田中正巳, 高橋宏暢, 江角朋之, 野路征昭, 豊田正夫, 浅川義範, 「マユハキタケ科真菌類におけるドッキングシミュレーションを用いた分生孢子形成阻害剤の探索」日本薬学会第 136 年会 (2016 年 3 月 26-29 日, 横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab23/index.htm>