

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01835

研究課題名（和文）糸状菌天然物生合成マシナリー再構築による汎用的物質生産

研究課題名（英文）Development of versatile synthesis for fungal natural products by reconstitution of biosynthetic machinery

研究代表者

及川 英秋（Oikawa, Hideaki）

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：00185175

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,400,000円

研究成果の概要（和文）：麹菌による異種発現系を用いて、生成物不明の近縁酵素遺伝子の網羅的発現による世界的にも珍しい物質生産を試み、約5割の確率で天然物生産が可能であることを明らかにした。また新規テルペン合成酵素の環化機構を明らかにするとともに修飾酵素の発現による既知および新規天然物の生産に成功した。本発現系が子囊菌のみならず担子菌の天然物の生産にも適用可能であることを示すとともに、世界初の子囊菌由来リボソーム依存型ペプチドの生合成機構の解明にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Using *Aspergillus oryzae* expression system, we have succeeded elucidation of enzymatic mechanism of several important natural products such as C20/C25-terpenes, ribosomal peptide and mushroom antibiotics. Especially, we proved the expression system is reliable for production of known and novel natural products (terpenoids) using uncharacterized biosynthetic gene clusters.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生合成 天然物 テルペン ペプチド 麹菌

### 1. 研究開始当初の背景

生物が生産するペニシリン、プラバスタチンなどに代表される多様な天然物を我々は臨床用の医薬品として利用してきた。糸状菌など微生物は、そのゲノム上に天然物の生合成遺伝子クラスターを多数持つことから、多数の生物活性天然物を生産しているが、同時に使用することはなく、環境に応じ複雑な制御機構により使い分けられるものと推定されている。天然物の生合成経路の解析には、生合成遺伝子クラスター上の遺伝子破壊や転写因子の過剰発現などがあるが、万能ではない上に個別に適正化しなければならない短所がある。

我々は、糸状菌天然物の生合成に必要な遺伝子数が少ないことに注目し、異種発現による物質生産法を検討してきており、方法論の検証や生合成経路の解析のほか、多数遺伝子同時導入や生合成における各反応順序の特定などで実績をあげてきた。遺伝子クラスターの異種発現法は、あらゆるタイプの糸状菌天然物がたった一つの方法論で合成できるため、世界的にも注目され利用され始めているが、多数遺伝子導入による糸状菌天然物生産を指向した研究は少ない。我々が扱っている麹菌は種々のホストの中でも導入遺伝子を忠実に発現する優れた異種発現能があり、これを用いた様々な応用展開が可能と考えた。

### 2. 研究の目的

糸状菌ゲノム上には、天然物の設計図となる生合成遺伝子が密集したクラスターが多数存在するが、その多くが休眠状態にあることが知られている。最近、我々は代表的な宿主である麹菌に糸状菌天然物の生合成遺伝子を順次導入して強制発現させることにより、生合成各段階の生成物の構造を明らかにしながら、標的天然物を生産する生合成マシナリー再構築法を開発した。この方法論の応用例として、より困難な休眠クラスターからの未知物質の生産を検討する。ここで得る知見を生かして、ゲノムデータと該遺伝子の発現解析から、注目する生命現象で作用する物質のクラスターを同定するとともに異種発現による産物の構造を決定し、その機能を解明する。

### 3. 研究の方法

公開ゲノムより選択したテルペン環化酵素遺伝子 25 種を麹菌に導入した株 (4 個/株) のミニライブラリーを作成し、新規化合物生産株を選別する。新規物質のクラスターを用いて麹菌にて生合成マシナリーを再構築 (異種発現) し、新規物質を生産する。この過程で得られた知見を基に、新規ペプチド系天然物の普遍的生合成経路の解明、キノコ由来の生物活性物質の生産を麹菌異種発現系を用いて達成する。さらに植物病原糸状菌が、その感染時特異的に発現する毒素の生合成クラスター情報を基に、その産物の生産および構造決定を行ない、病害

進行における毒素の機能解析ができるかを検討する。

### 4. 研究成果

ゲノム上の未知遺伝子クラスター網羅的に発現して天然物生産が可能かを検証するため、C20/C25 テルペン環化酵素 (TS) 遺伝子を植物病原菌を中心とした糸状菌から 25 種選び発現した。その結果、約半数の 13 種で物質生産を確認した。その中で系統樹解析で全く解析例がなかった *Neosartorya fischeri* 由来の NfSS の発現では、新規 4 環性 C25 テルペン sesterfisherol が単離された。この NfSS の同位体標識体を用いた *in vivo* 及び *in vitro* 解析により、水素転位のみで全く骨格転位を伴わない環化機構を明らかにした。これにより、初期にシクロペンタン環の形成が生じた後、様々な環化が生じる機構に C20/C25 テルペンの 2 種のタイプがあることを明らかにした。類似の 100 種を超える酵素の機能と配列相同性には相関があり、アミノ酸配列からおおよその生成物の構造が推定可能になった。NfSS と近縁の 4 種の酵素の機能解析から、類似の骨格を持ちながら環形成時に複数の立体異性体を生じる新規の環化機構であり、その触媒機構の詳細を分子軌道計算にて解析することに成功した。

*Cochliobolus* 属菌、*Colletotrichum* 属菌などの植物病原菌が感染時特異的にしか発現していないため、その構造解析が困難だった C25 テルペン生合成遺伝子クラスターを麹菌で発現させ、*ophiobolin*, *terpestacin*, *betaestacin* という既知および新規テルペン系物質の生産に成功した。また生産菌の *betaestacin* 生合成の初発酵素遺伝子破壊を行い、分生子形成能の解析にも展開した。

生産菌のゲノム解析から取得した抗生物質プロイロムチリンの生合成遺伝子クラスターを用い、合計 7 種ある遺伝子を麹菌で異種発現した。まず基質合成酵素、環化酵素遺伝子を導入した株から、プロイロムチリンの骨格を持つ中間体プレムチリンを単離した。次いで大腸菌で大量発現した酵素の N-末及び C-末ドメイン変異株を用いて、直鎖前駆体ゲラニルゲラニルニリン酸から 5-6 員環の二環性骨格中間体を経て、プレムチリンに至る環化機構を解明した。さらに 3 種の酸化酵素遺伝子の導入株が、環化中間体からムチリンを、修飾酵素遺伝子の導入株がさらなる変換 (アシル基転移/水酸化) することによりプロイロムチリンに変換されることを見出した。本成果はキノコ代謝産物に関して全経路を解明しながら異種生産を行った世界初の例となった。

キノコを除く糸状菌から初めて見つかったリボソーム依存性ペプチドであるウスチロキシニンに関して、推定した生合成経路に基づき実験を行った。前駆体ペプチド *ustA* と 3 種の予想酸化酵素 *ustQ/ustYa/ustYb* をコードする遺伝子を導入した麹菌株は、最初の単離可能な中間体 N-デメチルウスチロキ

シン F を生産した。これにより糸状菌リボソーム依存性ペプチドに特徴的な大環状エーテルは、酸化閉環により形成されることを明らかにした。ウスチロキシンのユニークな芳香環側鎖の導入機構は、予想された 3 種の組換え酵素 ustF1/F2/D を用いて機能解析を行い、非常に興味深いヘテロ原子の酸化や脱炭酸が関わる変換反応を見出した。

#### 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 22 件)

1. Theoretical Study of Sesterfisherol Biosynthesis: Computational Prediction of Key Amino Acid Residue in Terpene Synthase. Sato, H.; Narita, K.; Minami, A.; Yamazaki, M.; Wang, C.; Suemune, H.; Nagano, S.; Tomita, T.; Oikawa, H.; Uchiyama, M.; *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 査読あり, DOI: 10.1038/s41598-018-20916-x
2. Enzymatic formation of a skipped methyl-substituted octaprenyl side chain of longestin (KS-505a): Involvement of homo-IPP as a common extender unit. Ozaki, T.; Shinde, S. S.; Gao, L.; Okuizumi, R.; Liu, C.; Ogasawara, Y.; Lei, X.; Dairi, T.; Minami, A.; Oikawa, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, 査読あり, DOI: 10.1002/anie.201802116
3. Total Biosynthesis of Antiangiogenic Agent (-)-Terpestacin by Artificial Reconstitution of the Biosynthetic Machinery in *Aspergillus oryzae*. Narita, K.; Minami, A.; Ozaki, T.; Liu, C.; Kodama, M.; Oikawa, H.; *J. Org. Chem.* **2018**, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.joc.7b03220
4. Identification of novel sesterterpenes by genome mining of phytopathogenic fungi *Phoma* and *Colletotrichum* sp. Gao, L.; Narita, K.; Ozaki, T.; Kumakura, N.; Gan, P.; Minami, A.; Liu, C. W.; Lei, X. G.; Shirasu, K.; Oikawa, H.; *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 1136-1139, 査読あり, DOI:10.1016/j.tetlet.2018.02.022
5. Subcellular localization of aphidicolin biosynthetic enzymes heterologously expressed in *Aspergillus oryzae*. Ban, A.; Tanaka, M.; Fujii, R.; Minami, A.; Oikawa, H.; Shintani, T.; Gomi, K.; *Biosci. Biotech. Bioch.* **2018**, *82*, 139-147, 査読あり, DOI: 10.1080/09168451.2017.1399789
6. Biosynthetic Machinery of Diterpene Pleuromutilin Isolated from Basidiomycete Fungi. Yamane, M.; Minami, A.; Liu, C.; Ozaki, T.; Takeuchi, I.; Tsukagoshi, T.; Tokiwano, T.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Chembiochem.* **2017**, *18*, 2317-2322, 査読あり, DOI: 10.1002/cbic.201700434
7. Cyclization mechanism of phomopsene synthase: mass spectrometry based analysis of various site-specifically labeled terpenes. Shinde, S. S.; Minami, A.; Chen, Z.; Tokiwano, T.; Toyomasu, T.; Kato, N.; Sassa, T.; Oikawa, H.; *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 632-638, 査読あり, DOI: 10.1038/ja.2017.27
8. Focused Genome Mining of Structurally Related Sesterterpenes: Enzymatic Formation of Enantiomeric and Diastereomeric Products. Narita, K.; Sato, H.; Minami, A.; Kudo, K.; Gao, L.; Liu, C.; Ozaki, T.; Kodama, M.; Lei, X.; Taniguchi, T.; Monde, K.; Yamazaki, M.; Uchiyama, M.; Oikawa, H.; *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6696-6699, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.orglett.7b03418
9. Stepwise cyclopropanation on the polycyclopropanated polyketide formation in jawsamycin biosynthesis. Hiratsuka, T.; Suzuki, H.; Minami, A.; Oikawa, H.; *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1076-1079, 査読あり, DOI: 10.1039/C6OB02675C
10. Unveiling the Biosynthetic Pathway of the Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Ustiloxin B in Filamentous Fungi. Ye, Y.; Minami, A.; Igarashi, Y.; Izumikawa, M.; Umemura, M.; Nagano, N.; Machida, M.; Kawahara, T.; Shin-Ya, K.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 8072-8075, 査読あり, DOI: 10.1002/anie.201602611
11. Genome mining approach for harnessing the cryptic gene cluster in *Alternaria solani*: production of PKS-NRPS hybrid metabolite, didymellamide B. Ugai, T.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2793-2796, 査読あり, DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.05.043
12. Catalytic asymmetric synthesis of the common amino acid component in the biosynthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids. Tanifuji, R.; Oguri, H.; Koketsu, K.; Yoshinaga, Y.; Minami, A.; Oikawa, H.; *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 623-626, 査読あり, DOI: 10.1016/j.tetlet.2015.12.110
13. Multiple Oxidative Modifications in the Ophiobolin Biosynthesis: P450 Oxidations Found in Genome Mining. Narita, K.; Chiba, R.; Minami, A.; Kodama, M.; Fujii, I.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1980-1983, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.orglett.6b00552
14. Recent advances of Diels-Alderase involved in natural product biosynthesis. Minami, A.; Oikawa, H.; *J. Antibiot.* **2016**, *69*, 500-506, 査読あり, DOI:

- 10.1038/ja.2016.67.
15. Total Biosynthesis of Fungal Indole Diterpenes Using Cell Factories. Minami, A.; Liu, C. W.; Oikawa, H.; *Heterocycles*. **2016**, *92*, 397-421, 査読あり, DOI: 10.3987/REV-15-830
  16. Biosynthesis of Shearinine: Diversification of a Tandem Prenyl Moiety of Fungal Indole Diterpenes. Liu, C.; Minami, A.; Dairi, T.; Gomi, K.; Scott, B.; Oikawa, H.; *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5026-5029, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.orglett.6b02482
  17. Reconstitution of biosynthetic machinery of fungal polyketides: unexpected oxidations of biosynthetic intermediates by expression host. Fujii, R.; Ugai, T.; Ichinose, H.; Hatakeyama, M.; Kosaki, T.; Gomi, K.; Fujii, I.; Minami, A.; Oikawa, H.; *Biosci. Biotech. Bioch.* **2016**, *80*, 426-431, 査読あり, DOI: 10.1080/09168451.2015.1104234.
  18. Genome Mining for Sesterterpenes Using Bifunctional Terpene Synthases Reveals a Unified Intermediate of Di/Sesterterpenes. Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C. W.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846-11853, 査読あり, DOI: 10.1021/jacs.5b08319
  19. Heterologous expression of highly reducing polyketide synthase involved in betaenone biosynthesis. Ugai, T.; Minami, A.; Fujii, R.; Tanaka, M.; Oguri, H.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1878-1881, 査読あり, DOI: 10.1039/C4CC09512J
  20. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. Medema, M. H.; Oikawa, H.; (他142名105番目) *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 625-631, 査読あり, DOI:10.1038/nchembio.1890
  21. Reconstitution of Biosynthetic Machinery for the Synthesis of the Highly Elaborated Indole Diterpene Penitrem. Liu, C. W.; Tagami, K.; Minami, A.; Matsumoto, T.; Frisvad, J. C.; Suzuki, H.; Ishikawa, J.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, *54*, 5748-5752, 査読あり, DOI: 10.1002/anie.201502797
  22. Biosynthetic Study on Antihypercholesterolemic Agent Phomoidride: General Biogenesis of Fungal Dimeric Anhydrides. Fujii, R.; Matsu, Y.; Minami, A.; Nagamine, S.; Takeuchi, I.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5658-5661, 査読あり, DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02934
- [学会発表](計18件)
1. 尾崎 太郎, 劉 成偉, 南 篤志, 及川 英秋, Biosynthetic mechanism of fungal ribosomal peptides RiPPs, 農芸化学会 2018年度大会シンポジウム“多様なペプチド化合物を創出する微生物が備えた生合成戦略”, 2018,3.18, 名城大学天白キャンパス, 名古屋
  2. Hideaki Oikawa, Nature's strategy for synthesis of biologically active small molecule, Students Seminar of NIMS Joint Graduate Program, 2018,1.16, 物質・材料研究機構, つくば
  3. Atsushi Minami, Chengwei Liu, Taro Ozaki, Hideaki Oikawa, Construction of focused library of structurally related fungal metabolites using genome mining, The Second A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub, 2017.11.23-26, Hangzhou, China
  4. Hideaki Oikawa, Construction of Focused Library of Structurally Related Fungal Metabolites Using Genome Mining, 1st China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, 2017.10.2-3, Shanghai, China
  5. 及川 英秋, 骨格構造が類似した天然物の集中的生合成法の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会特別講演“有機合成化学を起点とするものづくり戦略”, 2017.6.9, 北海道大学, 札幌
  6. Hideaki Oikawa, Total biosynthetic study of fungal metabolites, 9th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, 2017.5.30-6.4, CA, USA
  7. 及川 英秋, ゲノム情報を用いた有用生物活性を持つ低分子化合物の汎用的酵素合成法の開発, 北大 - NIMS ジョイントシンポジウム, 2017.4.21, 北海道大学, 札幌
  8. 及川 英秋, 生物が選択した天然物合成戦略: 糸状菌天然物を中心に, 日本化学会 第97春季年会特別企画新領域研究グループシンポジウム, 2017.3.16, 慶應義塾大学, 横浜
  9. 及川 英秋, 天然物生合成マシナリーから生合成リデザインへ: 麹菌による驚異的異種発現, 生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学 新学術領域「生合成リデザイン」キックオフシンポジウム, 2016.9.10, 東京大学, 東京
  10. Hideaki Oikawa, Recent Topics for Total Biosynthesis of Fungal Natural Products, Peking University & Hokkaido University Joint Seminar on Organic Chemistry and Chemical Biology, 2016.5.26-27, Peking University, Peking, China
  11. Hideaki Oikawa, Total Biosynthesis of Microbial Natural Products, The 8th Takeda Science Foundation Symposium, 2016.1.21-22, Suita, Osaka

12. Hideaki Oikawa, Total biosynthetic study of bioactive fungal natural products: Pathway elucidation and genome mining, Biosynthesis of Natural Products, Pacifichem2015, 2015.12.15-20, Hawaii, USA
13. Hideaki Oikawa, Novel enzymatic reaction mechanism found in biosynthesis of natural products, Bioorganic Reaction Mechanisms, Pacifichem2015, 2015.12.15-20, Hawaii, USA
14. Atsushi Minami , Tomoshige Hiratsuka , Hideaki Oikawa, Study on the enzymatic construction of polycyclopropane skeleton in jawsamycin biosynthesis, Pacifichem2015, 2015.12.15-20, Hawaii, USA
15. Liu Chengwei , Koichi Tagami , Atsushi Minami , Tomoyuki Matsumoto , Hideaki Oikawa, Reconstitution of biosynthetic machinery for highly elaborated indole diterpene penitrem in *Aspergillus oryzae*, Pacifichem2015, 2015.12.15-20, Hawaii, USA
16. Ying Ye, Atsushi Minami, Katsuya Gomi, Hideaki Oikawa, Genome mining of sesterterpenes by bifunctional terpene synthase: Unified biogenesis of Sesterterpenes, 第25回イソプレノイド研究会, 2015.9.14, 東北大学, 仙台
17. 南 篤志, 劉 成偉, 田上 紘一, 松本知之, Jens Christian Frisvad, 鈴木 秀幸, 石川 淳, 五味 勝也, 及川 英秋, 麹菌異種発現系を利用したペニトレム生合成マシナリーの解明, 第57回天然有機化合物討論会, 2015.9.9-11, 神奈川県民ホール, 横浜
18. 及川 英秋, 生合成マシナリー再構築法による 糸状菌天然物の全生合成, 天然有機化合物の生合成研究—新潟ミニシンポジウム, 2015.5.22, 新潟

〔図書〕(計1件)

南 篤志, 劉 成偉, 尾崎 太郎, 及川 英秋, シーエムシー出版, 酵母菌・麹菌・乳酸菌の産業応用展開, 2018, 264 (155-161)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: テトラヒドロイソキノリン環含有化合物の製造方法

発明者: 大栗 博毅, 谷藤 涼, 及川 英秋

権利者: 北海道大学, 東京農工大学

種類: 特許

番号: T8837-1021

出願年月日: 平成 30 年 3 月 10 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 英秋 (OIKAWA, Hideaki)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 00185175

(2) 研究分担者

南 篤志 (MINAMI, Atsushi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号: 40507191