

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06720

研究課題名(和文)糸状菌由来ジオキシゲナーゼの機能拡張による化合物の創出

研究課題名(英文)Functional analysis of a fungal dioxygenase responsible for 4-pyrone formation

研究代表者

橋元 誠 (Hashimoto, Makoto)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：80552893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Aspergillus japonicus* MF275が生産するhimeic acidの生合成研究において、推定生合成中間体であるテトラミン酸を4-ピロンに環拡張する反応を触媒すると予想されるジオキシゲナーゼを見出している。本研究では本酵素の機能解析を試みたが、基質の供給ができなかったために活性を評価するには至らなかった。そこで、モデリング解析により、重要なアミノ酸残基について計算化学的なアプローチを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テトラミン酸から4-ピロンの環拡張反応は、多くの二次代謝産物の生合成経路に含まれている。この反応の多くは、モノオキシゲナーゼやシトクロムP450のような酸化酵素が関与している。もし本反応がジオキシゲナーゼで代用できれば、モノオキシゲナーゼのような機能解析を行うための発現伴う困難が軽減される。本研究でジオキシゲナーゼによる活性の評価系が解決でき、モデリング研究などによる予測ができれば、微生物酵素を利用した4-ピロン化合物を生産させる生物合成システムの構築に展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Himeic acid is produced by the filamentous fungus *Aspergillus japonicus* MF275. We have found a dioxygenase that is expected to catalyze the reaction of ring-expanding tetramic acid, which is a presumed biosynthesis intermediate, to 4-pyrone. In this study, we tried to analyze the function of this enzyme and perform the prediction of protein-ligand docking on homology model.

Preparation of a tetramate, which is putative intermediate, was unsuccessful, probably due to poor enzyme expression of himA (PKS-NRPS) or himH (dehydrogenase) in yeast transformant. We also attempted a computational approach for important amino acid residues by modeling analysis. In HimG modeling analysis, the presence of basic amino acids (R83, K87, R241) that interact with 2-oxoglutaric acid is important for the reaction mechanism of 2-oxoglutaric acid-dependent dioxygenase. An putative tetramate intermediate was estimated to interact with H148 of HimG.

研究分野：天然物化学

キーワード：ポリケタイド 生合成 糸状菌 ジオキシゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は糸状菌*Aspergillus japonicus* MF275が生産するhimeic acidの生合成研究において、生合成遺伝子に関与する遺伝子クラスターを同定している。その生合成はHimA(PKS-NRPS)とHimH(脱水素酵素)によりテトラミン酸中間体が生成された後、HimG(ジオキシゲナーゼ)によりテトラミン酸から4-ピロンへの環拡張反応が起こり、最後にHimC(シトクロムP450)により側鎖が酸化されると予想された。ジオキシゲナーゼによる環拡張反応にはcephalosporin生合成における5員環のペナム骨格から6員環のセフェム骨格に環拡張する反応にジオキシゲナーゼ(DAOCs)が関与する例が知られている。

## 2. 研究の目的

大腸菌もしくは出芽酵母を用いたHimGの発現を行った。糸状菌*Aspergillus japonicus* MF275が生産するhimeic acidの生合成研究において、推定生合成中間体であるテトラミン酸を4-ピロンに環拡張する反応を触媒すると予想されるジオキシゲナーゼHimGを見出している(図1)。本酵素がさまざまなテトラミン酸を環拡張できるように改変(改変HimG)することで、テトラミン酸を作る酵素遺伝子と改変HimGを組み合わせた4-ピロン類縁体の生物合成システムの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

コドン最適化した人工遺伝子を使用して、HimGの発現、可溶化、精製条件を検討した。市販の大腸菌発現用プラスミドにhimGを導入し、いくつかの条件でHimGの誘導発現を試みした。

また、基質供給を行うために、himAとhimHを導入した麹菌*Aspergillus oryzae* NSAR1形質転換体の作成を試みた。*A. japonicus* MF275のゲノムDNAを鋳型にPCRで増幅後、麹菌の栄養要求マーカータグを持つプラスミドを導入した。構築したプラスミドはPEGにより導入した。さらに出芽酵母による基質供給も並行して行った。酵母プラスミドはナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)から入手し、GRC(gap-repair cloning)法によりイントロンフリーな遺伝子としてクローニングした。構築したプラスミドを用いて作成した*Saccharomyces cerevisiae* BJ5464形質転換体の代謝物を分析した。

himeic acid生合成に関与するhimAと酵母可溶化等がうまくいかない場合、酵母を用いた発現もしくは無細胞発現系に変更する。それと並行して、酵母中でHimAとHimGを共発現させて、テトラミン酸を供給する系を構築する。を適応する。本方法は酵母の相同組換え能を利用したクローニング法であり、申請者もすでに糸状菌ゲノムDNAを鋳型にエクソン領域のPCRで増幅後、断片を連結させることでイントロンフリーなPKS遺伝子のクローニングに成功している。HimFの基質が安定な場合は、*in vitro*反応による活性確認を進めるが、テトラミン酸が不安定な場合はhimAとhimG、himFを共発現させる酵母形質転換体を作製し、4-ピロン類縁体が生成するかで活性を確認する。

基質の供給と並行して、HimGおよびHimCのモデリング解析を行った。ジオキシゲナーゼであるHimGとともにシトクロムP450と相同性を持つHimCについても計算化学ソフトを利用して立体構造を予測した。

## 4. 研究成果

初めに、二次代謝産物生合成遺伝子解析ツールである2ndFindより予測されたHimG配列から人工遺伝子を作成し、大腸菌中でHisタグ融合HimGを発現させた。その結果、25°Cで誘導発現することで、可溶性のタンパク質としてHimGを得ることができた。

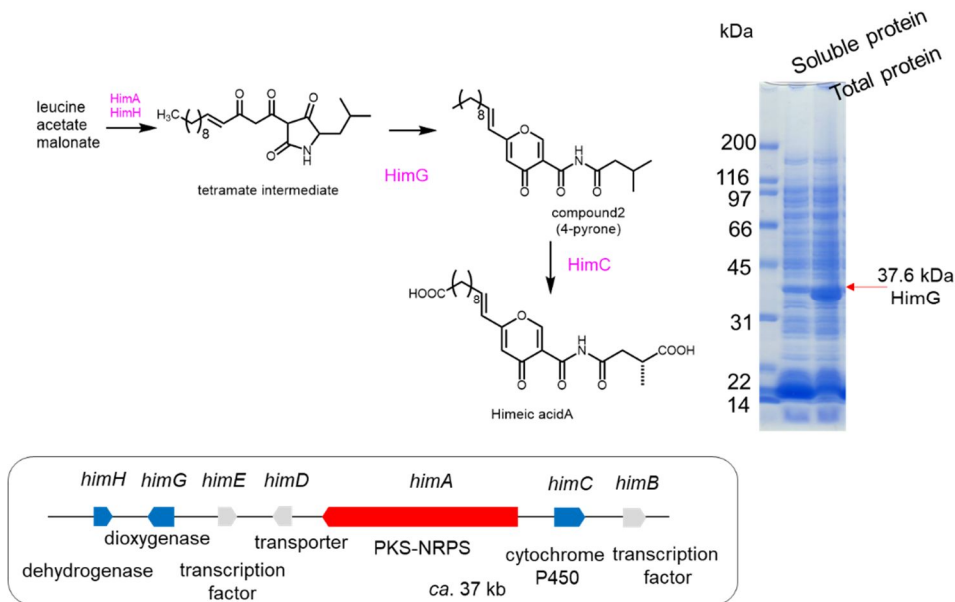


図1 himeic acidの推定生合成経路とHimGの大腸菌による発現

次に、HimGの基質となるテトラミン酸中間体の供給法を検討した。4-ピロン類縁体を生産させる宿主の検討を兼ねて、麹菌もしくは酵母にテトラミン酸中間体の生成に関与する $himA$ と $himH$ を導入し、中間体を生成するかを調べた。本実験は、長いDNA断片のクローニングを伴うことから、酵母の相同組換え能を利用した遺伝子断片の連結法(GRC法)により発現プラスミドを構築した。その後、麹菌形質転換体の培養抽出物をHPLC分析した結果、目的とするテトラミン酸中間体の検出には至らなかった。また、酵母形質転換体については30°Cで振とう培養を行い、その培養抽出物の分析をHPLCやLC-MSで行ったが、目的のテトラミン酸の生成は確認できなかった。培養温度を下げた条件でも行ったが改善は見られなかった。このことは、 $himA$ が11.5 kbと長い遺伝子のために正常に発現しなかった可能性が考えられる。麹菌の場合では、形質転換体の作製において効率を上げ、より多くの形質転換体で生産を確認する必要があると考えられた。一方、テトラミン酸が不安定である可能性も考慮して、himeic acidを生成する形質転換体の作製を試みた。 $himA$ と $himH$ に加え、酵母のコドンに最適化した $himG$ と $himC$ を導入し、その形質転換体の培養物の分析を行ったが、himeic acidの生成は確認できなかった。基質の供給に至らなかったことから、*in vitro*による評価系の確立には至らなかったが、宿主や発現プラスミドの変更によりテトラミン酸の供給が可能になれば活性評価系の構築を行う予定である。

活性評価系が構築できた場合に備えて、 $himA$ と同様な機能を持ち、pestalamideの生合成に関与する $pst1$ を $Aspergillus niger$ よりクローニングした。 $himA$ と $pst1$ は、ポリケタイド骨格は異なるが、同じアミノ酸を供給する酵素遺伝子である。そのため、 $himA$ と $pst1$ のPKS部分とNRPSが分離して組み合わせることで機能が補完することができれば、多様な化合物の創出につながる事が予想される。今後、 $pst1$ が導入された麹菌形質転換体を取得し、代謝物を分析していく予定である。

基質の供給と並行して、HimGおよびHimCのモデリング解析を行った。PDBに登録されている5Y7T

は2-オキソグルタル酸依存ジオキシゲナーゼと相同性を示し、リガンドとして基質と2-オキソグルタル酸 (2KG)、鉄イオンを含むので、HimGの鋳型配列とした。6L8Hはカロテノイドの酸化に関与するシトクロムP450であり、リガンドとして基質とプロトポルフィリンIXを含むため、HimCの鋳型配列とした。

HimGのモデリング解析では、ポケット周辺に塩基性アミノ酸が複数存在した(図2)。また、2KGと相互作用する塩基性アミノ酸(R83, K87, R241)やT190、Q145の存在が、2KG依存のジオキシゲナーゼの反応機構に重要であり、HimAとHimHにより生成が推定される中間体との相互作用が推定されるアミノ酸残基として、H148が推定された(図2b,c)。HimCのモデリング解析ではヘム鉄と相互作用するシステインC501に加えて、ヘムの側鎖カルボン酸部分と相互作用するアミノ酸としてW188, R192, N426, K428, N495, R499が推定された。推定中間体と相互作用する可能性があるアミノ酸残基としてR168, T427が推定された。

今後、基質の供給法や活性評価系の確立を進め、変異酵素の活性による4ピロン化合物の創出につながるように展開していく。

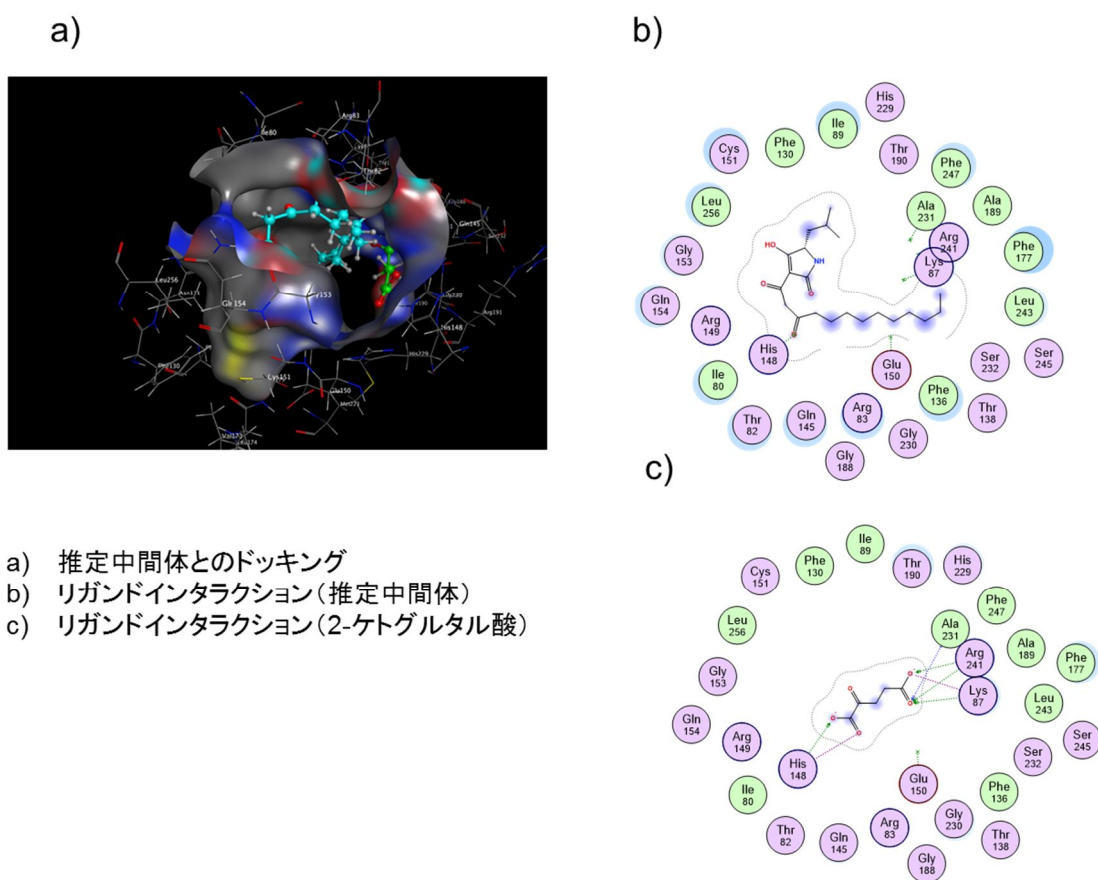


図2 HimGのモデリング解析(鋳型:5y7t)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------