

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年10月10日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780079

研究課題名（和文） ATMT法による深在性真菌治療薬ミカファンギンの生合成機構の解明

研究課題名（英文） Identification of the biosynthetic genes for antifungal drug Micafungin by ATMT.

研究代表者

山田 雅人（YAMADA MASATO）

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：40448692

研究成果の概要（和文）： エキノカンジン群物質の1つであるFR901379を生産する糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 のアグロバクテリウム形質転換法による T-DNA 挿入変異解析と次世代シーケンスによるドラフトゲノム解析によって生合成関連遺伝子群を見いだした。しかしながら、その生合成関連遺伝子群がコードされているクラスター領域は非常に大きく、機能未知の遺伝子や酸化還元酵素の遺伝子の数が多いことなどから、FR901379 生産菌のゲノム配列情報だけでは生合成経路や反応の単純な推定は困難であった。

研究成果の概要（英文）： T-DNA insertional mutagenesis by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) and whole genomic DNA sequencing analysis with next generation sequencer for FR901379 producing fungus *Coleophoma empetri* F-11899 derived putative biosynthetic gene cluster encoding FR9013797. However, the region of gene cluster of FR901379 was so huge and containing various coding genes such as unknown function and oxidoreductases, that it was difficult to speculate the pathway for FR901379 biosynthesis without proof of each gene disruption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	900,000	270,000	1,170,000
平成22年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成23年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ミカファンギン・FR901379・*Coleophoma empetri*・ATMT・NRPS・変異解析・抗生物質

1. 研究開始当初の背景

深在性真菌症治療薬ミカファンギンは、真菌細胞壁の構成要素である1,3-β-D-グルカンの合成酵素を特異的に阻害する作用機序の薬剤であり世界中で広く使用されている。ミカファンギンは糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 株が生産するFR901379を原体とし

て製造されている。このFR901379の主骨格は6つの異形アミノ酸の環状リポペプチドからなり、構造特徴からNRPS (non-ribosomal peptide synthetase; 非リボソームペプチド生合成酵素)によって生合成されていると考えられる。FR901379は、これまで原核微生物から発見されているNRP

(non-ribosomal peptide) の構造よりも複雑で糸状菌特異的な二次代謝物質であり、その生合成機構は不明である。一方、糸状菌類の形質転換で用いられる手法の1つに ATMT (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) 法がある。ATMT 法は植物病原菌である *Agrobacterium* が植物に感染する際、自身が持つ Ti-plasmid の T-DNA 領域を植物ゲノムに挿入する機構を利用した形質転換法である。この T-DNA 領域は宿主ゲノムにランダムに挿入され、他の形質転換法と比べ簡単に大量の変異株を得ることができ、破壊された遺伝子の解析が容易な利点がある。

2. 研究の目的

本研究では *C. empetri* F-11899 株が生産する FR901379 生合成機構の解明を目的として、ATMT 法による変異株ライブラリーを構築し、FR901379 非生産株のスクリーニングによる FR901379 生合成遺伝子の単離・解析を試みた。

3. 研究の方法

FR901379 生産菌である *C. empetri* F-11899 は土壌分離株であり、これまで FR901379 の創薬を中心に研究がなされていたため、分子生物学的、遺伝学的な報告は無く、ゲノム情報も全くない。申請者らは、これまでに糸状菌 NRPS の保存部位の情報から縮重プライマーを作成し遺伝子の単離を試みたが困難であった。そこで、ゲノムにランダムに耐性遺伝子が挿入される ATMT 形質転換法を *C. empetri* に対して確立することにより、結果としてゲノムに挿入された耐性遺伝子によって本来あった遺伝子が破壊される変異株ライブラリーを構築し、FR901379 非生産株のスクリーニングによる FR901379 生合成遺伝子の単離・解析を試みた。

4. 研究成果

エキノカンジン群物質の1つである FR901379 を生産する糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 のアグロバクテリウム形質転換法による T-DNA 挿入変異解析と次世代シーケンスによるドラフトゲノム解析によって生合成関連遺伝子群を見いだした。しかしながら、その生合成関連遺伝子群がコードされているクラスター領域は非常に大きく、機能未知の遺伝子や酸化還元酵素の遺伝子の数が多いことなどから、FR901379 生産菌のゲノム配列情報だけでは生合成経路や反応の単純な推定は困難であった。また、複数の生合成遺伝子の相同組換えによる遺伝子破壊株の取得と証明を試みたが、残念ながら得ることが出来なかった。そこで、他の

エキノカンジン群物質を生産する複数の糸状菌のゲノムを次世代シーケンスにより解析し、先に見いだした FR901379 生合成関連遺伝子の塩基配列情報を基に推定される遺伝子群を見だし、それらを比較することで生合成に関わる複数の遺伝子群の絞り込みを行った。現在、相同組換えによる遺伝子破壊株が得られ易い生産菌に対して、これらの遺伝子の情報を基にエキノカンジン群物質の生合成機構の推定と証明を試みている。

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1件)

(1) Yamada M., Yawata K, Orino Y, Ueda S, Isogai Y, Taguchi G, Shimosaka M and Hashimoto S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of antifungal lipopeptide producing fungus *Coleophoma empetri* F-11899. *Current Genetics* (2009) 55, 623-630. PMID: 19876630 査読有 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=19876630>)

[学会発表] (計7件)

(1) ○中谷和也、山田雅人、織野陽介、磯貝泰弘、橋本正治 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 における2種の次世代シーケンサーを用いたゲノムアセンブル配列の比較 第11回 糸状菌分子生物学コンファレンス 2011年11月16-17日 東京大学弥生講堂 (東京)

(2) ○境井千佳子、山田雅人、織野陽介、磯貝泰弘、橋本正治 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の FR901379 非生産株の T-DNA 挿入変異箇所の解析 第11回 糸状菌分子生物学コンファレンス 2011年11月16-17日 東京大学弥生講堂 (東京)

(3) ○浅井 剛久、山田 雅人、上田 聡、磯貝 泰弘、橋本 正治 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 における異種発現のための *gpd* プロモーターの単離 2011年度 (平成23年度) 日本農芸化学会 2011年3月27日 京都女子大学 (京都)

(4) ○浅井 剛久、山田 雅人、磯貝 泰弘、橋本 正治 糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 における異種タンパク質発現用プロモーターの検討 2010年度 (平成22年度) 日本生物工学会 2010年10月29日 ワールドコンベンションセンターサミット宮崎

シーガイア（宮崎）

(5) ○**山田 雅人**、織野 陽介、境井 千佳子、磯貝 泰弘、橋本 正治 ミカファンギン原体生産糸状菌 *Coleophoma empetri* F-11899 の ATMT 変異株ライブラリーの作製と FR901379 非生産株の単離 2010 年度(平成 22 年度) 日本農芸化学会 2010 年 3 月 30 日 東京大学駒場キャンパス (東京)

(6) ○**山田雅人**、織野陽介、磯貝泰弘、橋本正治 *Coleophoma empetri* の ATMT 変異株ライブラリーの作製とミカファンギン原体合成遺伝子の単離 石川富山福井県大合同シンポジウム 2009 年 12 月 18 日 あわらおんせん越路 (福井)

(7) ○**Yamada M**, Yawata K, Hashimoto S and Shimosaka M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for genomics in an industrially important fungus. The Society for Industrial Microbiology, The Annual Meeting and Exhibition 2009, 27 July 2009, WESTIN Harbour Hotel, (Toronto, Canada).

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 雅人 (YAMADA MASATO)
富山県立大学・工学部・生物工学科・助教
研究者番号：40448692