

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05055

研究課題名（和文）未踏の新奇ポリケチド生合成遺伝子を標的とするポストゲノム型天然物探索

研究課題名（英文）Post-genomic natural discovery focused on unique polyketide synthase genes

研究代表者

浅井 禎吾 (Asai, Teigo)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60572310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、糸状菌のポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子に着目し、遺伝子情報の中から、ユニークなPKS遺伝子を含む遺伝子クラスターを探索し、それらを麹菌で異種発現することで、新しい構造の天然物および新しい遺伝子機能の発見を目指して研究を行なった。その結果、糸状菌の反復型PKSとして最大の反復回数を示す酵素の発見と、新しいポリエンマクロライドの発見に成功した。また、ホスココリンやホスホエタノールアミンが付加した新しい抗菌活性マクロライドの発見に成功し、また、それらを付加する酵素機能を明らかにした。本研究成果は、今後、医薬品開発に有用となる新しい天然物の発掘を加速させるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然物はこれまでに数多くの医薬品開発に貢献してきた重要な医薬資源である。しかしながら、新規天然物の発見や天然物の供給に様々な問題点があり、医薬品開発の現場から遠ざかっている。本研究成果は、新しい天然物を合理的に効率よく発見する方法を示すものであり、持続的な医薬シーズ供給を可能にするものである。また、現在治療薬が乏しい非結核生抗酸菌に対する抗菌物質の発見は、新しい治療薬の開発につながる成果であり、天然物の医薬品開発における有用性を示す結果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we carried genome mining based on the polyketide synthase (PKS) gene of filamentous fungi and explored gene or gene clusters of unprecedented PKS genes, and heterologously expressed them in *Aspergillus oryzae* to produce natural products with novel structure and biological activities. As a result, we succeeded in discovering a PKS that shows the maximum number of repetitions as a filamentous fungus iterative PKS and a new polyene macrolide. We also succeeded in discovering new antibacterial active macrolides with phoscocholine and phosphoethanolamine, and characterized the enzymes that added them to macrolide skeleton. The results of this research will accelerate the discovery of new natural products that will be useful in drug development in the future.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 生合成 二次代謝 ポリケチド 異種発現 ゲノムマイニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学構造・生物活性共に新規性の高い魅力的な天然有機化合物の発見は、合成研究や薬理活性評価研究など周辺分野の関心を集め、結果として新規医薬品開発へのモチベーションが飛躍的に高まる。最近、このようなインパクトの強い新規天然物の発見が極めて少なくなっている。一方で、創薬における重要な微生物資源である糸状菌(カビ)のゲノム上には、既知化合物からは連想されない全く新しい二次代謝物をコードする可能性を秘めた生合成遺伝子クラスターが数多く眠っている。しかし、これらは一般的な培養条件下では発現しない休眠遺伝子のため、従来の天然物探索ではこれらの産物を取得することができない。

モデル糸状菌である麹菌は、糸状菌遺伝子の異種発現の汎用宿主として確立されている。最近、標的天然物の生産に関わるすべての生合成遺伝子を麹菌で異種発現し、標的天然物を麹菌に生産させる「生物全合成」という画期的な方法論が打ち出され、「物質生産ツール」としての有用性が増している。これを利用した機能未知クラスターからの新規天然物探索「ポストゲノム型天然物探索」はほとんど実践されていないが、遺伝子資源(情報)を医薬資源(化合物)へと変換する強力な手法になり得ることから、これから取り組むべき課題として国内外で認識されている。

2. 研究の目的

糸状菌の高還元型ポリケタイド合成酵素(HR-PKS)は、一種の糸状菌のゲノム上に十数個存在する膨大な遺伝子資源であり、かつ、そのほとんどが生合成する化合物の情報がかかっていない未利用生合成遺伝子資源である。また、HR-PKSは反復型PKSであり、その炭素鎖伸長制御機構も未解明であり、生合成的にも魅力的な標的である。さらに、ユニークなドメインが一般的なHR-PKSに付与された独創的なHR-PKSも存在することから、ゲノムマッピングと異種発現を基盤とする天然物探索において、魅力的な標的である。そこで本研究では、糸状菌の未利用HR-PKS遺伝子資源に着目し、これまでにない、ユニークな天然物の獲得およびHR-PKSの発見を目的として行った。

3. 研究の方法

これまでに解読した植物や昆虫に内生する糸状菌のドラフトゲノム情報について、HR-PKS遺伝子を指標とするゲノムマッピングを行い、HR-PKSを含むユニークな生合成遺伝子クラスターを探索した。それら生合成遺伝子クラスターをモデル宿主である麹菌内で再構築することで、クラスターにコードされる天然物の獲得し、かつ、生合成システムを明らかにした。

4. 研究成果

(1) Apml クラスターの異種発現とポリエンマクロライドの獲得

これまで収集した植物や昆虫に内生する糸状菌のドラフトゲノム情報を用いて、HR-PKSを指標とするゲノムマッピングの結果、ケムシ内生糸状菌である *Arthrinium phaeospermum* のゲノム上に、HR-PKS 遺伝子 (*apmlA*) と MhcP ドメインを有するチオエステラーゼ (MhchP-TE) 遺伝子 (*apmlB*) からなるユニークな生合成遺伝子クラスターを発見した(図1)。麹菌異種発現系を用いて、*apmlA* を発現させた株と *apmlAB* を発現させた株を作製し、それぞれ代謝物の分析を行った結果、*apmlA* および *apmlB* を導入した株で、新たな化合物1および2の生産が確認された。また、*apmlA* を発現させた株に *apmlB* を追加すると、化合物1および2の生産が確認されたことから、化合物1と2はHR-PKSである *ApmlA* と MhcP-TEである *ApmlB* によって生合成されることが明らかとなった。大量培養後、化合物1と2を単離構造決定し、1は34員環構造を有する大環状ポリエンマクロライドであり、2は32員環構造を有する大環状ポリエンマクロライドであった(図1)。化合物1と2の構造から、HR-PKSである *ApmlA* は16回伸長し、ポリオール部分とポリエン部分を生合成し、MhcP-TEによりマクロラクトン環が形成されることが示唆された。*ApmlA* はこれまで報告されたHR-PKSの中で最大の伸長回数を有する反復型PKSであり、また、糸状菌ではこれまでこのようなポリエンマクロライドは報告されていないため、ユニークな天然物とHR-PKSを同時に発見できたと言える。さらに、本結果は糸状菌の脂肪族マクロライドの生合成を初めて明らかにするものであり、この結果は、多様なマクロライド天然物のゲノムマッピングを可能にする結果である。

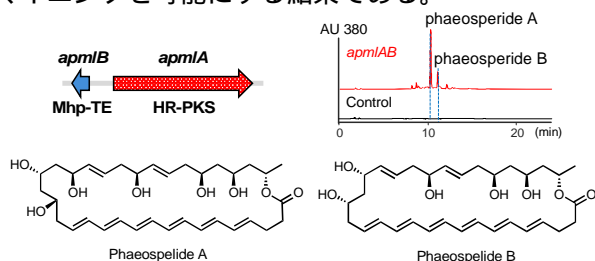


図1. Apml クラスターの異種発現

(2) Akml および Ciml クラスターの再構築と生産物の単離同定

上記の apml クラスターの結果に基づき、公開データベースを用いて、推定マクロライド生合成遺伝子を探した。その結果、150 種以上の菌のゲノム上に、200 以上の推定マクロライド生合成遺伝子クラスターを発見した。それぞれクラスター構造を解析した結果、GPI-ホスホエタノールアミン転移酵素 (GPI-ETP) と相同性を示す酵素を有する一群の生合成遺伝子クラスターを発見した (図 2)。

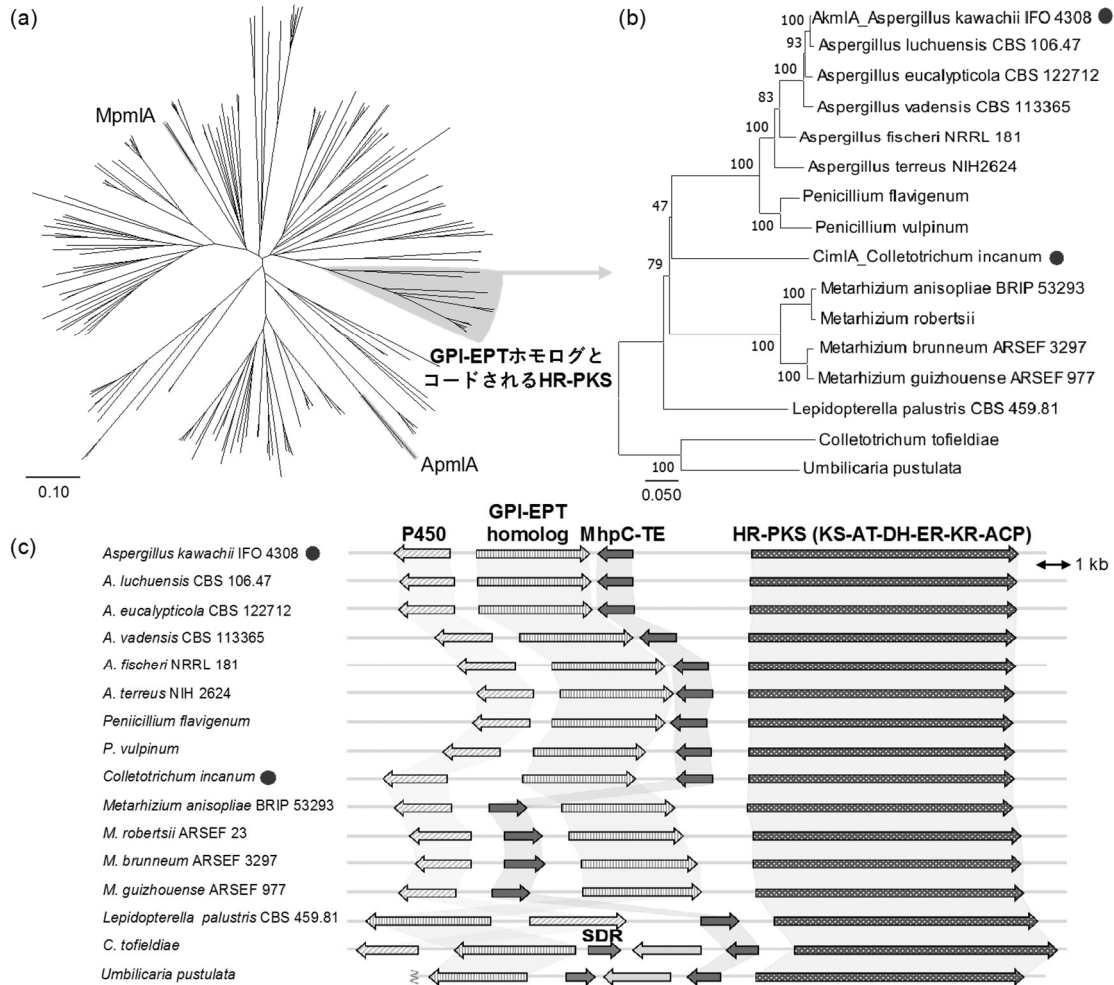


図 2. ApmlA を指標とするマクロライド推定生合成遺伝子クラスターの探索と系統樹解析および GPI-ETP ホモログを含むクラスターの発見。

GPI-EPT ホモログを含む推定マクロライド生合成遺伝子クラスターのうち、*Aspergillus kawachii* IFM 4308 の akml クラスターと *Colletotrichum incanum* MAFF 238704 の ciml クラスターについて異種発現を行なった。両クラスターは、HR-PKS 遺伝子 (akmlA, cimlA)、MhpC-TE 遺伝子 (akmlB, cimlB)、P450 遺伝子 (akmlD, cimlD) および GPI-EPT ホモログ遺伝子 (akmlC, cimlC) から構成されており、それぞれアミノ酸レベルで高い相同性を示した。これまでの研究において、HR-PKS により生合成されるポリケタイド鎖が MhpC-TE によりマクロラクトン化されることを見出している。両クラスターも同様に、HR-PKS と MhpC-TE でマクロライド骨格が形成されたのちに、P450 および GPI-EPT ホモログによる修飾が進行すると予測し発現系を構築した。akml および ciml の 2 つのクラスターを麹菌で順次再構築した結果、新規マクロライド 1-8 を得ることに成功し、また、GPI-ETP が二次代謝経路で機能する初めての例を示した (図 3)。

化合物 1-8 の化学構造より、それぞれの生合成経路を推定した (図 4)。まず、HR-PKS である AkmlA (CimlA) が、マロニル CoA を用いる 11 回 (10 回) の伸長反応によりポリケタイド鎖を構築する。HR-PKS の伸長過程で生じる KR ドメインによる α -ケトンの還元は、いずれも D-水酸基を与える。成熟したポリケタイド鎖は MhpC-TE である AkmlB (CimlB) のセリン残基へと受け渡されたのちに、ラクトン環形成をともなって酵素からリリースされて 24 員環マクロライド 1 (22 員環マクロライド 5) が生合成される。生成したマクロライド骨格に対して、P450 である AkmlD (CimlD) による水酸化とエポキシ化の多段階酸化反応、あるいは、GPI-EPT ホモログである AkmlC (CimlC) によるホスホエタノールアミン (ホスホコリン) の転移反応が生じることで、2 (6) および 3 (7) へとそれぞれ変換される。最終的に P450 および GPI-EPT ホモログが機能することで最終産物の 4 (8) が生合成される。GPI-EPT ホモログである AkmlC と CimlC は比較

的高い相同性を示し、かつ、類似のマクロライドを受容基質とする一方、供与基質はそれぞれホスホエタノールアミンとホスホコリンであり、一級アミンと三級アミンを識別している点は興味深い。

化合物 1-8 の非結核性抗酸菌 (NTM) に対する生物活性を評価した。非結核性抗酸菌の一種 *Mycobacterium smegmatis* JCM 5855 に中程度の抗菌活性を示すマクロライドを発見した。

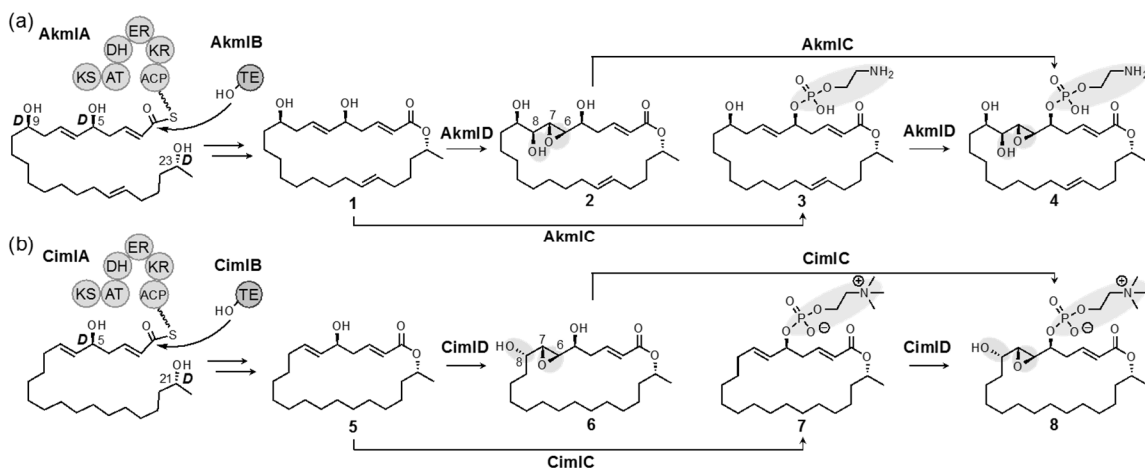


図 3. Akml および Ciml クラスターに由来する新規マクロライドの構造および推定生合成経路

(3) まとめ

糸状菌の HR-PKS 遺伝子を対象としたゲノムマイニングにより、糸状菌では最大の反復回数を有するポリエンマクロライド生合成に参与する *apmlA* を発見し、その機能を同定した。また、*ApmlA* を指標としたゲノムマイニングにより、膨大な推定マクロライド生合成遺伝子クラスターを発見した。それらについて詳細に解析した結果、GPI-ETP 相同酵素が含まれる一群のクラスターを見出し、麹菌異種発現により、ホスホエタノールアミンおよびホスホコリンが付加した新規マクロライドを発見した。今後も、ユニークな PKS を探索し、異種発現することで、新しい天然物や新しい生合成機構の発見が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Kaneko, A., Morishita, Y., Tsukada, K., Taniguchi, T., Asai, T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Post-genomic approach based discovery of alkylresorcinols from a cricket-associated fungus, <i>Penicillium soppi</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem.	6. 最初と最後の頁 5239-5243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9OB00807A	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 Morishita, Y., Zhang, H., Taniguchi, T., Mori, K., Asai, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 The discovery of fungal polyene macrolides via a postgenomic approach reveals a polyketide macrocyclization by trans-acting thioesterase in fungi.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Lett.	6. 最初と最後の頁 4788-4792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.9b01674	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 Morishita, Y., Sonohara, T., Taniguchi, T., Adachi, K., Fujita, M., Asai, T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Synthetic-biology-based discovery of fungal macrolide from <i>Macrophomina phaseolina</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem.	6. 最初と最後の頁 2813-2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0OB0051	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 Kento Tsukada, Shono Shinki, Akiho Kaneko, Kazuma Murakami, Kazuhiro Irie, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi, Shingo Dan, Kumi Kawaji, Hironori Hayashi, Eiichi N. Kodama, Aki Hori, Emil Salim, Takayuki Kuraishi, Naoya Hirata, Yasunari Kanda & Teigo Asai	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fungal decalincontaining diterpenoid pyrones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15664-4	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 Yohei Morishita, Yu Aoki, Mei Ito, Daisuke Hagiwara, Kensho Torimaru, Daichi Morita, Teruo Kuroda, Hanako Fukano, Yoshihiko Hoshino, Masato Suzuki, Tohru Taniguchi, Keiji Mori, and Teigo Asai	4. 巻 22
2. 論文標題 Genome Mining Based Discovery of Fungal Macrolides Modified by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ethanolamine Phosphate Transferase Homologues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 5876-5879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c01975	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 浅井 慎吾
2. 発表標題 糸状菌ゲノム情報を活用するポストゲノム型天然物探索研究
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井 慎吾
2. 発表標題 糸状菌ゲノム情報に基づくポストゲノム型天然物探索研究
3. 学会等名 第 66 回日本放線菌学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teigo Asai
2. 発表標題 Post-genomic discovery of fungal natural products based on genome mining and heterologous expression
3. 学会等名 Cutting-edge natural product chemistry -next generation biomolecule redesign-（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Morishita, Teigo Asai.
2. 発表標題 Genome mining and heterologous biosynthesis of fungal aliphatic macrolide natural products
3. 学会等名 3rd International Conference on Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅井禎吾
2. 発表標題 麹菌異種発現を基盤とする天然物探索研究
3. 学会等名 糸状菌相互応答学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teigo Asai
2. 発表標題 Discovery of natural products based on re-construction and re-designing of fungal cryptic biosynthetic gene clusters in <i>Aspergillus oryzae</i>
3. 学会等名 Japanese-German Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井禎吾
2. 発表標題 新たな医薬資源を開拓する糸状菌ポストゲノム型天然物探索研究
3. 学会等名 第139回日本薬学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本間悠人、森下陽平、塚田健人、浅井禎吾
2. 発表標題 Chaetomium属菌のゲノム上にコードされた新規デブシペプチドの獲得
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣川瑞樹、森下陽平、塚田健人、浅井禎吾
2. 発表標題 ゲノムマイニングと麹菌異種発現系を用いたHymeglusinの生合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第141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