

令和元年6月18日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15265

研究課題名(和文)キノコ由来休眠型生合成遺伝子の発現に基づく物質生産と生合成解明

研究課題名(英文) Engineered production and biosynthesis of mushroom-derived natural products from the encrypted biosynthetic gene

研究代表者

恒松 雄太 (Tsunematsu, Yuta)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：30629697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キノコは食品としてだけでなく漢方薬や健康補助食品として用いられており、人体に対する様々な効能が示されている。本研究ではキノコ由来生物活性物質が生合成される仕組みを遺伝子・酵素・化合物レベルにて解析した。キノコ遺伝子の強制発現によって生物活性物質の量産化を達成することができた。一方、遺伝子破壊法によって獲得した新規機能性分子はキノコ自身の成長・分化に關与する化合物であることが確認され、キノコ栽培・育種に利用できるツールとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではキノコ(担子菌)への遺伝子導入や遺伝子破壊に挑戦した。これらの技術基盤を用いて生物活性物質の創製や生合成解明に向けた研究は国内外においてもほとんど認められない。それほどキノコの遺伝子操作は(特に化学者にとって)一般的で容易な技術ではないのである。異分野の研究協力者の助けを借り、失敗するリスクの高い研究内容に挑戦した。本研究にてキノコの形成・成長に關与する新規化合物Aが発見された点は特筆すべきである。今後、本新規化合物のキノコ形成に対する作用点の解明が進むことで効率的なキノコ栽培法の樹立が、さらにはマツタケなど現時点で栽培不能なキノコ種についても栽培化への道が拓かれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mushrooms are used not only as food but also as traditional natural medicines (Kampo) and health supplements, and they have been shown to have various effects on the human body. In this study, we investigated the biosynthesis of mushroom-derived bioactive substances at the gene, enzyme, and compound levels, respectively. Increased production of bioactive substances could be accomplished by overexpression of mushroom genes. On the other hand, it was confirmed that the novel functional molecule obtained by the gene disruption method is a compound involved in the growth and differentiation of the mushroom. It may be a new tool that can be used for mushroom cultivation and breeding.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 担子菌 天然物 生合成遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カビやキノコなどの菌類は、医薬品となり得る低分子有機化合物(天然物)を生産する潜在力を秘めている。例えば、抗生物質ペニシリンが青カビによって生産されることや、キノコを原材料とした漢方薬・健康補助食品が数多く市販されていることは周知の事実である。従来、薬効を示す有効成分は、天然素材から抽出されることで発見されてきた。一方、ゲノム配列情報が簡単に得られるようになった近年、天然物生合成遺伝子、すなわち「天然物の設計図」を読み取り、理解・応用することが可能になりつつある。同時に、数多くの生合成遺伝子が不活性化状態、すなわち休眠型遺伝子であることが示された。これまでに申請者らはカビ(子囊菌)由来休眠型遺伝子について遺伝子工学手法を用いて覚醒させ、新奇構造をもつ天然物の獲得に成功してきた。特に子囊菌類の生合成遺伝子については、アスペルギルス属糸状菌にて異種宿主発現が可能であることを示してきた。本法の真髄は、完全長 cDNA 配列を取得する必要なく、ゲノム DNA 配列をもとに遺伝子機能の解明・物質生産が可能となる点にある。転写不活性化休眠型遺伝子からは成熟型 mRNA および cDNA の取得が原理的に不可能であること、加えて、天然物生合成遺伝子のような巨大な遺伝子(約 5 - 25 kb)の完全長 cDNA を取得することは非常に困難である。そのため、ゲノム DNA 配列を直接用いる方法は、高い汎用性をもつため、生合成産物の大量生産、生合成酵素の機能解明などの研究で頻りに用いられている。

一方、カビと同じ菌類に属するキノコ類(担子菌)からも数多くの天然物が発見されてきた。そのゲノムを眺めてみると、多数の生合成遺伝子を見出すことができる(少なくとも 10 種以上/一種のキノコ)。しかし、その生合成遺伝子を用いて新奇天然物が獲得された報告例はこれまでにない。トランスクリプトーム解析による予備検討の結果、多くの遺伝子が休眠型であると判明した。加えて、キノコ類の生合成遺伝子はカビのそれとは異なる、特殊性の高いものが含まれている。以上を総合して、キノコ由来天然物生合成遺伝子の発現により新奇物質が発見できると着想した。一方、これまでにキノコ由来遺伝子は遠縁種であるアスペルギルス属糸状菌では発現不可能という予備検討結果を得ていた。遠縁種間においてスプライシング位置の配向性が異なることが原因と考えられている。すなわち、キノコ由来の生合成遺伝子は既存の方法では有効利用することが出来ないことが示唆された。

2. 研究の目的

そこで本研究においては「キノコの遺伝子はキノコ宿主で発現させる」、すなわち、近縁キノコ種を宿主とした遺伝子発現による物質生産系を構築することを着想した。これまでに我々は、非モデル生物種について形質転換・遺伝子導入系を樹立してきた実績を持つ。例えば、ケタマカビの形質転換系樹立により、独自路線の天然物生合成研究を展開した。本研究ではその対象をキノコへと発展させることにより、未踏の研究領域を開拓することを目指した。

3. 研究の方法

キノコ類の生合成遺伝子を発現させるために適したキノコ宿主の選定

キノコ宿主の第一選択肢としてウシグソヒトヨタケ *Coprinopsis cinerea* を選択した。本菌は古くより分子遺伝学解析が進められたキノコのモデル生物である。加えてゲノム配列が解読済みであり、成長が比較的早く、取扱いが容易であるという利点を持つ。ヒトヨタケの形質転換・遺伝子破壊などの技術は研究協力者である京都大学農学部・中沢威人助教によって樹立された。氏の協力を得て、形質転換が申請者の研究室内においても行えることを確認する。

天然物生合成遺伝子を高発現させるプロモーター配列の取得と培養条件の最適化

キノコを形成する菌は、菌糸世代ときの子実体世代の生活環をもつ。目的酵素・天然物の大量生産を行うためには、バイオマスを多く獲得することが可能な、菌糸世代での培養が好ましいと考えた。そこで、菌糸体世代での増殖旺盛となる液体振盪培養条件を検討する。設定した培養条件にて高発現している遺伝子のプロモーター配列、すなわち高度発現プロモーターの探索を行う。具体的に、まず最適化された培養条件で得たきのこ菌糸細胞を RNA-seq 解析に供し、著しく高い発現量の遺伝子を同定する。続いて同定した遺伝子の 5'UTR 領域(プロモーター配列)を確定する。

キノコ類における休眠型遺伝子の人為的覚醒化に基づく新規天然物の発掘

[検討 1] 宿主内在性かつ機能既知遺伝子の発現

我々はヒトヨタケ由来 CC1G_05377 遺伝子(ポリケチド合成酵素)の cDNA をクローニング・機能解析し、その翻訳産物がオルセリン酸であることを報告した[*ChemBioChem* 2012, 13, 846.]. そこで、機能既知である本遺伝子をヒトヨタケ細胞自身にて強制発現させ、オルセリン酸が得られるかどうかを検証する。「内在性・かつ機能既知である遺伝子の強制発現」という成功可能性の高い本実験が達成できない限り、後の研究で成功を収めることは難しい。望む結果が得られない場合の検討項目は以下となる。i)強制発現用プロモーター配列の再検討、(ii)使用する選択マーカーの検討:薬剤耐性遺伝子、あるいは栄養要求性等、(iii)遺伝子導入法の検討:ランダムあるいは部位特異的な挿入や置換、(iv)別のキノコ宿主への変更、等を検討し、原因を究明することを計画した。

[検討 2] 宿主内在性かつ機能未知の酵素遺伝子の発現

一般に、天然物の生合成に用いられる酵素としてポリケチド合成酵素やテルペン環化酵素などが知られており、*C. cinerea* ゲノム中にはこれら酵素をコードすると推測される遺伝子が 10

種類以上含まれている。このうち、まずは既知生合成酵素と(i)相同性の高い酵素遺伝子を対象とし、既知物質、あるいはその類縁化合物の取得が効率的に行えるか否かを検証する。続いて、(ii)相同性の低い酵素遺伝子を対象として、新規天然物の獲得を目指す。後者(ii)については、前者(i)と比較して、研究の成功可能性が低いと考えられるが、仮に成功を収めた際には得られる成果は学術的に新規性が高いものと期待できる。よりリスクを低減させるための工夫として、計算機を用いた代謝産物差異解析を行う。野生株および遺伝子強制発現株の全代謝産物について、人間の目では見落としがちな小さなデータ差異でさえ同定が可能であることを確認済みである。なお、新奇物質の生産に成功した場合、生産菌の培養・抽出後、単離精製の操作を行い、NMR等の機器分析にて化学構造を決定する。

キノコ由来生合成遺伝子の異種宿主発現による物質生産系の確立

外来遺伝子の強制発現により、物質生産が認められるかを確認する。*C. cinerea*を宿主とし、まずは成功可能性が高いことが予測される近縁きのこ種(例えばヒトヨタケと同属の*Coprinopsis*属担子菌)を由来とする天然物生合成遺伝子の発現を試みる。続いて、より挑戦的な試みとして、系統的に多様な担子菌種を由来とする生合成遺伝子について検討する。以上の検討より、ヒトヨタケの異種発現宿主としての汎用性・および限界を評価する。これと並行して、本法を基盤とした、キノコ由来生物活性物質の生合成機構解明研究に着手する。

4. 研究成果

キノコ類の生合成遺伝子を発現させるために適したキノコ宿主の選定

本研究期間中において、担子菌ウシグソヒトヨタケ *C. cinerea* 形質転換系の確立に成功し、326株を用いた場合には遺伝子強制発現を、ku3-24株(非相同末端修復酵素遺伝子ku70破壊株)を用いた場合に遺伝子破壊が可能であることを確認した。特に遺伝子破壊については研究開始当初は成功する場合、失敗する場合がともに見受けられた。望みの遺伝子を高確率にて破壊できるよう、本項目の改善について種々検討した。最終的に、形質転換受容株(ku3-24株)のゲノムDNA配列を用いて遺伝子破壊カセットを作成することが重要であることを突き止めた。相同領域として設定した約1,000bpの領域のうち、菌株の違いによって生じ得るわずか10bp(1%)ほどの変異が存在する場合、遺伝子破壊(すなわち二重の相同組換え)を行うことが困難であった。

天然物生合成遺伝子を高発現させるプロモーター配列の取得と培養条件の最適化

*C. cinerea*を宿主として機能既知生合成遺伝子であるCC1G_05377および*cop6*(CC1G_03563)の強制発現を行った。前者はポリケチド合成酵素、後者はテルペン環化酵素をコードする遺伝子である。その結果、それぞれの産物であるオルセリン酸、lagopodin類の生産性が10-250倍へと増加した形質転換体の取得に成功した。なおこの段階において、強制発現におけるプロモーター配列の検討を行った。レポーター遺伝子としては*cop6*を利用し、lagopodin Bの生産量にてプロモーター活性の強度を判定した。約15のDNA配列を検討し、DED1などいくつかのプロモーターにて高い発現が認められた。ところで本研究期間中に別グループより*C. cinerea*を由来とする新規代謝産物hitoyol類、hitoyopodinの単離構造決定について報告された[*Org. Lett.* 2017, 19, 4030., *Org. Lett.* 2018, 20, 6294.]。本化合物群はlagopodin類から派生して生合成されると予測されている。実際に*cop6*強制発現株においてhitoyol Aの生産性が野生株と比較して20倍程度増加することを確認した。

そこで*cop6*がhitoyol類の生合成遺伝子である確証を得るため、*cop6*遺伝子の破壊株($\Delta cop6$)を作成した。 $\Delta cop6$ を液体培養し、その代謝産物をLC-MSにて解析したところ、lagopodin類およびhitoyol類の生産性の消失が確認され、*cop6*がその生合成遺伝子であることが証明された。本研究は担子菌由来天然物の生合成遺伝子が遺伝子破壊法にて機能解明された初めての例である。続いて我々はlagopodin類の生合成経路の解明を目指した。*cop6*遺伝子の両隣には*cox1*(CC1G_03562)および*cox2*(CC1G_03564)遺伝子が存在し、それぞれシクロムP450をコードしていた。そこでこれらの遺伝子を出芽酵母にて異種発現させ、酵素を調製した。その結果、テルペン環化酵素Cox6より生成する α -cupreneneに対し、Cox1はシクロペンタン環を酸化する酵素であること、Cox2はテトラヒドロシクロヘキサン環を酸化する酵素であることがそれぞれ明らかとなった。Cox1およびCox2を組み合わせることでlagopodin Aの推定前駆体(新規化合物)が得ることができた。本過程にて他にも4種の構造新規な生合成中間体を獲得し、各種スペクトル解析により構造決定を行った。本研究成果については*Org. Biomol. Chem.*誌に論文として報告した。なお、lagopodin Aへと至る二級水酸基の酸化、*p*-キノンの形成反応については現在、生合成酵素の特定を行っている。

キノコ類における休眠型遺伝子の人為的覚醒化に基づく新規天然物の発掘

[検討1] 宿主内在性かつ機能既知遺伝子の発現

前述のように、CC1G_05377(ポリケチド合成酵素)および*cop6*(テルペン環化酵素)を強制発現させた場合において、それぞれオルセリン酸、lagopodin類の生産性が10-250倍程度増加した形質転換体を得た。一方で形質転換の各クローンによって化合物生産性は大きく変動していた。その理由としては各クローンにおける遺伝子強制発現カセットの挿入位置、挿入コピー数などの個体差が考えられる。麹菌*Aspergillus oryzae*における異種発現系においても同様な事象が観測されている。本項目を改善し、安定的な化合物生産を達成するためには、発現カセットの挿

入部位をターゲティングするなどが必要があると考えられた。

[検討 2] 宿主内在性かつ機能未知の酵素遺伝子の発現

我々が着目したのは、機能未知生合成遺伝子 *cpf1* であり、BLAST 検索にて本遺伝子の翻訳産物は非リボソーム性ペプチド酵素であると予想された。またその遺伝子近傍には酸化酵素がコードされており、Cpf1 によって形成されたペプチド骨格が酸化反応により修飾されると考えた。さらに本遺伝子を含む前後約 10 kb の領域は他の十数種の担子菌類において高度に保存されていた。これは本遺伝子クラスターから生産される化合物が担子菌の生態に何らかの影響を及ぼしているとも考えることができた。一方、*C. cinerea* 由来の代謝産物としてペプチド系化合物はこれまでに報告されていない。そのため *cpf1* は休眠遺伝子であり、その産生化合物は新規物質である可能性が高いと考えた。実際に、公開された RNA-seq 解析データ[*PLoS One* 2015, 10, e0141586.]から *cpf1* の発現量 RPKM(reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) を調査すると、その値は 10 以下と、それほど高いとは言えない発現量であった。そこで *cpf1* の強制発現を行った。DED1 プロモーターの下流に *cpf1* を配置したプラスミド pKW20519 を作成した。これを *C. cinerea* 326 株に導入し、計 6 つのクローンの取得を PCR 法にて確認した。これら形質転換体を MYG 液体培地にて培養し、その代謝産物生産を経時的に確認した。しかしながら、いずれのクローンにおいても野生株である 326 株との差異は認められなかった。

キノコ由来生合成遺伝子の異種宿主発現による物質生産系の確立

ウシグソヒトヨタケと近縁種であるササクレヒトヨタケ *Coprinus comatus* および *Coprinus stercorarius* のゲノム解読を行い、AntiSMASH fungi を用いて二次代謝産物生合成遺伝子を探索した。両株とも約 15 の天然物生合成遺伝子クラスターを保有していた。現在、これらの遺伝子を *C. cinerea* 326 株に順次導入し、その代謝産物の解析を進めているところである。現在までに約 10 の遺伝子導入を行ったが、残念ながら新規化合物の生産は認められていない。今回のゲノム解析の結果ではアノテーションの精度が十分でないと考えられ、特に休眠型遺伝子の場合の遺伝子領域予測は困難であると考えられる。そのため、今後、RNA-seq を用いてイントロン配列を学習させ、遺伝子領域予測を検討する。

遺伝子破壊法によるウシグソヒトヨタケ二次代謝系の攪乱による新規天然物の獲得

上記のように、機能未知生合成遺伝子をウシグソヒトヨタケにて異種発現させる試みは、遺伝子領域の予測という観点で困難さを持ち合わせていた。遺伝子を強制発現させる際には、遺伝子領域、特に開始コドンの位置を正確に見つけ出す必要がある。そこで我々が次に取り組んだのは遺伝子破壊である。ヒトヨタケ二次代謝制御系遺伝子の破壊による二次代謝制御系の攪乱を狙った。子嚢菌においてはヒストン脱アセチル化酵素や DNA メチル化など、エピジェネティック制御因子が二次代謝に関与することが知られている。そこで我々は推定 DNA メチル化酵素 *laeA* の遺伝子破壊株を作製した。作製した $\Delta laeA$ 株を培養すると、その代謝産物パターンが変動し、新規ペプチド化合物 A の生産が確認された。本化合物の化学構造は各種スペクトルの解析および分解反応にて絶対配置を含めて決定した。続いて我々は新規ペプチド化合物 A の生合成遺伝子の特定を目指した。その化学構造から化合物 A の生合成遺伝子は先に述べた *cpf1* であると予想され、実際に *cpf1* の遺伝子破壊株($\Delta laeA\Delta cpf1$)を作製したところ化合物 A の生産性が失われていることが確認された。興味深いことに $\Delta laeA\Delta cpf1$ は野生株(ku3-24 株ならびに $\Delta laeA$ 株)と比較して菌糸成長が遅く、また子実体形成不全の表現型を示した。 $\Delta laeA\Delta cpf1$ に化合物 A を投与した系ではこの表現型は認められず、子実体形成も野生株同様に観測された。すなわち化合物 A はヒトヨタケの菌糸成長、および子実体形成に関与すると考えられた。前述したように *cpf1* を含む遺伝子クラスターは別種の担子菌においても高度に保存されている。すなわち、担子菌における菌糸成長の普遍的な分子メカニズムの一部に化合物 A が関与していることが強く示唆された。以上のように、担子菌遺伝子操作を基盤とした新規天然物導出技術を確立しつつあり、本技術の成熟とともに益々多くの新規天然物が生み出されることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Nakazawa, T., Izuno, A., Horii, M., Kodera, R., Nishimura, H., Hirayama, Y., Tsunematsu, Y., Miyazaki, Y., Awano, T., Muraguchi, H., Watanabe, K., Sakamoto, M., Takabe, K., Watanabe, T., Isagi, Y., Honda, Y. Effects of *pex1* disruption on wood lignin biodegradation, fruiting development and the utilization of carbon sources in the white-rot Agaricomycete *Pleurotus ostreatus* and non-wood decaying *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.*, 109, 7-15, 2017, doi: 10.1016/j.fgb.2017.10.002.

Tsunematsu, Y., Maeda, N., Yokoyama, M., Chankhamjon, P., Watanabe, K., Scherlach, K., Hertweck, C. Enzymatic amide-tailoring promotes retro-aldol amino acid conversion to form the antifungal agent aspirochlorine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 14051-14054, 2018. doi: 10.1002/anie.201806740

Masuya, T., Tsunematsu, Y., Hirayama, Y., Sato, M., Noguchi, H., Nakazawa, T., Watanabe, K. Biosynthesis of lagopodins in mushroom involves a complex network of oxidation reactions. *Org. Biomol. Chem.*, 17, 234-239, 2019, doi: 10.1039/C8OB02814A.

恒松 雄太, 新規疾患治療法開発のヒントは「微生物の生存戦略」に隠されている?, *ファルマシア*, 54, 458, 2018, doi: 10.14894/faruawpsj.54.5_458

〔学会発表〕(計 11 件)

榎谷貴洋, 平山裕一郎, 高西潤, 田村優依, 中沢威人, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二, 「キノコ由来天然物ラゴポジン類の生合成研究」 日本生薬学会第 65 回年会(広島)(2018)

高西潤, 榎谷貴洋, 中沢威人, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二, 「キノコ由来二次代謝産物の過剰生産系の構築」 日本生薬学会第 65 回年会(広島)(2018)

恒松雄太, 渡辺賢二, 「Dissecting and harnessing fungal biosynthetic pathway」 International Congress on Pure & Applied Chemistry Langkawi (ICPAC Langkawi) 2018(2018)

高西潤, 榎谷貴洋, 中沢威人, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二, 「*Coprinopsis* 属担子菌のレギュレータ - 遺伝子操作による化合物生産」 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2018(2018)

恒松雄太, 渡辺賢二, 「Dissecting and harnessing fungal biosynthetic pathway」 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10)(2018)

恒松雄太, 「糸状菌ゲノム情報を活用した新規天然物の探索とその生合成」 静岡大学超領域研究推進本部 第 12 回超領域研究会(2018) [招待講演]

恒松雄太, 「生合成遺伝子制御に基づく天然物創薬リバイバル」 日本薬学会第 139 年会(千葉)(2019) [招待講演]

榎谷貴洋, 平山裕一郎, 高西潤, 恒松雄太, 佐藤道大, 大高潤之介, 本山高幸, 長田裕之, 渡辺賢二, 「複雑な酸化経路を含むキノコ由来 lagopodin 類の生合成研究」 日本薬学会第 139 年会(千葉)(2019)

高西潤, 榎谷貴洋, 中沢威人, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二, 「レギュレータ - 遺伝子改変法による *Coprinopsis* 属担子菌の新規天然物生合成経路活性化」 日本薬学会第 139 年会(千葉)(2019)

榎谷貴洋, 平山裕一郎, 高西潤, 恒松雄太, 佐藤道大, 大高潤之介, 本山高幸, 長田裕之, 渡辺賢二, 「複雑な酸化経路を含むキノコ由来 lagopodin 類の生合成研究」 日本農芸化学会 2019 年度大会(東京)(2019)

高西潤, 榎谷貴洋, 中沢威人, 恒松雄太, 佐藤道大, 渡辺賢二, 「レギュレータ - 遺伝子改変法による *Coprinopsis* 属担子菌の新規天然物生合成経路活性化」 日本農芸化学会 2019 年度大会(東京)(2019)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。