

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14342

研究課題名（和文）医薬品リードとなるキノコ由来テルペン類天然物の汎用的な生産法の開発

研究課題名（英文）Heterologous production of lead compound terpene natural products from mushroom

研究代表者

劉 成偉（Liu, Chengwei）

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：60773801

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）：本研究は、キノコが生産するエリナシンを題材として、これまでに報告例のないゲノムDNA配列を利用した麹菌で異種生産を検討した。1、CRISPR/Cas9法を用いたノックイン法を適用し、高い形質転換効率を達成し、また、マーカーリサイクル法を用いて多重、多数の生合成遺伝子の同時発現が可能となった。2、エリナシン生合成に必要な遺伝子のゲノム配列を麹菌に導入した、90%のイントロンが正しく除かれた。3、エリナシン生合成遺伝子クラスター外に見出したアセチル基転移酵素遺伝子、植物由来のUDP-キシロース生合成遺伝子等計10遺伝子を二回の形質転換によって麹菌に導入し、天然物エリナシンQの生合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコ由来天然物の生合成研究においては、従来cDNA配列を用いた異種発現が検討されてきた。しかし、通常の培養条件で転写されない遺伝子のcDNA配列を得ることが困難であり、研究対象が限られていた。子嚢菌と担子菌のイントロンを比較すると、長さや認識配列が非常に似ていることから、麹菌は担子菌由来の遺伝子でも正しくスプライシング可能だと着想した。本研究では、キノコが生産する神経成長因子合成促進物質エリナシンを題材として、これまでに報告例のないゲノムDNA配列を利用した異種生産を達成した。この方法はキノコ由来天然物の汎用的な物質生産法につながると期待される。

研究成果の概要（英文）： In this study, we investigated the biosynthesis of erinacin isolated from mushrooms. 1. The CRISPR / Cas9 method that achieves high transformation efficiency. Furthermore, the marker recycling method has enabled the simultaneous expression of multiple biosynthetic genes. 2. The genomic DNA required for the synthesis of erinacine is introduced into *Aspergillus oryzae*, 90% of introns are correctly splicing. 3. We also found an acetyltransferase outside the erinacien gene cluster, and UDP-xylose synthetic genes derived from plants. A total of 10 genes were introduced into *Aspergillus oryzae*, the erinacine Q was successfully produced.

研究分野：天然物化学

キーワード：erinacine mushroom *Aspergillus oryzae* heterologous expression CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

キノコは我々の生活に密接に関わっている重要な食用資源であり、古くから健康食品として広く利用されてきた。近年では、免疫活性や抗酸化活性、抗腫瘍活性を有することから、その薬用効果にも高い関心が寄せられている。このように、キノコは人類にとって有益な機能や成分を有する重要な資源と言える。しかし、キノコは子実体形成の有無や培養条件の違いで異なる代謝物を与えるため、その代謝物の安定供給は困難である。この問題の解決には、異種宿主を用いた物質生産が有効だと考えられるため、本課題では麹菌異種発現系を利用したキノコ由来生物活性物質の異種生産を検討した。

麹菌異種発現系は、テルペンをはじめとする糸状菌代謝産物の生合成経路の解明と異種生産に活用されてきた。本課題では、これまでほとんど例のないキノコ由来の主要なジテルペンの異種生産を試みた。標的に選ぶのは神経成長因子合成促進物質エリナシンである。キノコの遺伝子は一般にイントロンが多く取り扱いが難しいが、本研究ではゲノム配列の直接導入による異種発現を検討して効率的かつ汎用的な異種発現法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど異種宿主を用いた生産例がないキノコ由来のテルペン系天然物の生合成経路の解明と汎用的異種発現法の確立を目的として研究を行った。医薬品リードなど高付加価値物質の生産を目指す。従来は目的化合物の生産条件でキノコを培養して、cDNA を調製する必要があり、生産菌細胞内で転写されていない遺伝子を対象とすることができなかった。しかし、近年のゲノム解析の結果からキノコには一株当たり 10 種以上のテルペン生合成遺伝子が存在することがわかっており、それら未開拓の遺伝子資源の利用は重要な課題である。麹菌でゲノム配列の直接導入による異種発現が可能になれば、標的遺伝子の転写の有無に依存しない天然物探索が可能になると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子の転写とスプライシング

エリナシン生合成に必要な遺伝子のゲノム配列をクローン化し、麹菌に導入した。得られた形質転換体を培養し、定法に従って Total RNA を抽出した。これを用いて、逆転写反応を行うことで cDNA を調製した。さらに cDNA をプレートとした PCR によってそれぞれの遺伝子を増幅し、遺伝子の転写を確認した。また、増幅した配列をシーケンス解析し、スプライシングを解析した。

### (2) CRISPR/Cas9 を用いた形質転換

遺伝子導入にはゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 を用いたノックイン法を適用した。4 か所の遺伝子導入箇所に対して、マーカーリサイクル法を用いて多重の形質転換を行うことで、最大 10 個の生合成遺伝子を共発現した。遺伝子導入株を培養して代謝物を分析し、生成物が確認できたものを大量スケールで培養することで、目的物を単離・構造決定した。

### (3) 組換え蛋白質を用いた試験管内反応

糖転移酵素である EriJ が触媒する反応を明らかにするために、組換え蛋白質を調製し、試験管内反応を検討した。組換え蛋白質は大腸菌を宿主として発現し、EriJ タンパク質を調製した。基質は UDP-glucose 及び UDP-xylose を糖供与体と

して、acetylcyathatriol を糖受容体として反応した。

#### 4. 研究成果

Cyathane 型ジテルペンはキノコが生産する重要な化合物であり、100 種以上の誘導体が存在する。その中でも、エリナシン (erinacines) と striatals は特徴的な化学構造と生物活性を持つことから、その薬用効果にも高い関心が寄せられている。2017 年に、Yang らはエリナシン生合成遺伝子クラスターを見出し (図 1) UbiA タイプのプレニル基転移酵素である EriG が、GGPP から環化体 2 を作ることを明らかにした。しかし、2 の生成以降のエリナシン生合成経路は明らかにされていない。本研究では生産菌のゲノム配列を用いて、麹菌を宿主とする物質生産を試みた。

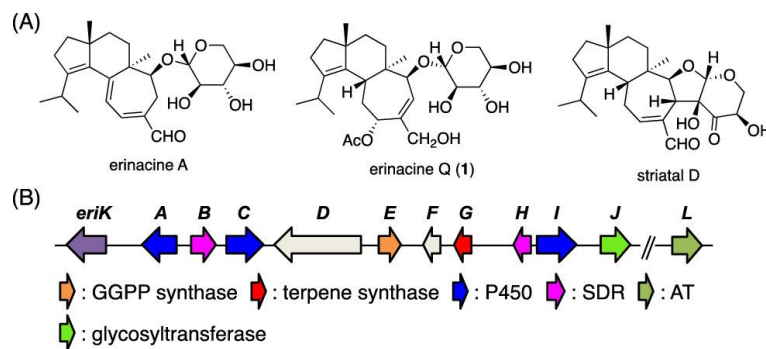


図 1 : A : エリナシン類化合物 ; B : エリナシン生合成遺伝子クラスター。

過去の研究で高収量を与えた麹菌形質転換体のゲノム解析を行い、麹菌染色体上で、外来遺伝子が導入されている部位を決定した。同定した導入位置を、外来遺伝子の高発現部位としてホットスポット (以下 HS) と呼ぶことにする。4 箇所同定した導入位置、HS201・HS401・HS601・HS801 に対して、エリナシン生合成遺伝子を導入した。

まず、遺伝子の転写とスプライシングを解析した。エリナシン生合成に必要な遺伝子のゲノム配列をクローン化し、麹菌に導入した。cDNA 合成配列シーケンスした結果、90% のイントロンが正しく除かれていることを明らかにした。残りの 10% は、PCR により簡単に修正可能である。以上の結果から、麹菌はキノコ由来遺伝子発現可能であることを示した。

形質転換には、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法を適用し、上記の HS を標的として部位特異的に相同組み換えを誘発することで、生合成遺伝子を導入した。宿主である麹菌 *ligD* 欠損株 (AO-NSPID1) の HS801 にエリナシン基本骨格を作るために必要だと考えられる *eriEG* 遺伝子を導入し、形質転換体 AO-*eriEG* を構築した。上記のゲノム編集技術の適用により、得られた形質転換体の 90% 以上で標的遺伝子の導入が確認できた。形質転換体の代謝産物を分析し、目的化合物 cyathadiene (2, 30.6 mg/L) を生産していることを明らかにした。

遺伝子クラスターには三つの P450 遺伝子 *eriACI* が存在する。それぞれの P450 は、化合物 2 の C11/C14/C15 位のヒドロキシ化を触媒すると予測した。各酵素の機能や反応の順序を調べるために、形質転換体 AO-*eriEGIJ*、AO-*eriEGAC*、AO-*eriEGACIJ*、AO-*eriC*、AO-*eriA* を構築した。各形質転換体の生産物の分析及び微生物変換によって、EriI が C14 のヒドロキシ化、EriC が C15 のヒドロキシ化を触媒することが分かった。EriA はシトクロム P450 還元酵素 (CPR) 或いは

short chain reductase (EriH) 存在下、C11 のヒドロキシ化を触媒することを明らかにした。

エリナシン生合成にはアセチル基転移酵素が必要である、しかし、2017 年に報告された遺伝子クラスター内には該当する酵素遺伝子が存在しない。我々は pleuromutilin 生合成クラスターにコードされるアセチル基転移酵素 Ple2 のアミノ酸配列をクエリとして、エリナシン生産菌ゲノム配列に対して相同性検索を行い、28%の相同性を示す酵素遺伝子 *eriL* を見出した。本酵素の機能解析により、EriL が *O*-アセチル化を触媒することを明らかにした。

続いて、エリナシン生合成に関わると考えられる遺伝子 *eriEGIC AHLJ* をすべて麹菌に導入した。これにより天然に存在するキシロース配糖体 erinacine Q (1) が生産されることを期待したが、目的の 1 は生産されなかった。代わりに glucose 配糖体 erinacine Q2 (12) が生産された。これは、麹菌細胞内で UDP-xylose が供給されていないためだと考えられた。そこで、植物シロイヌナズナ由来の UDP-xylose (11) 生合成遺伝子 (AtUGD3, AtUXS3) を麹菌に導入し、1 の生産を再度検討した。これにより、最終産物 1 の全生合成を達成した (図 2)。

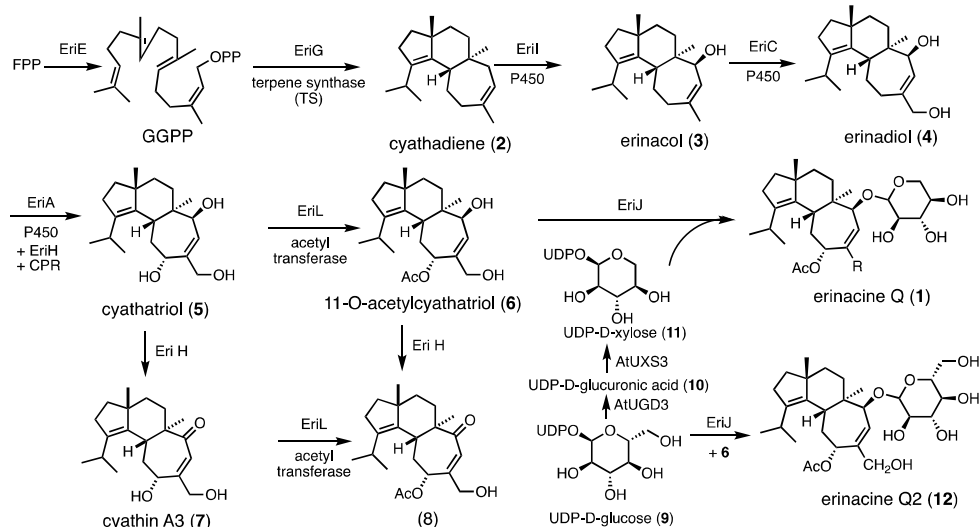


図 2 : エリナシン生合成経路

糖転移酵素である EriJ が触媒する反応を明らかにするために、組換え蛋白質を調製し、試験管内反応を検討した。9 と 10 を糖供与体として、化合物 6 を糖受容体として反応を行った。反応生成物を LC-MS で解析した結果、どちらの糖供与体を用いた場合にも反応の進行が確認できたが、9 を用いた方がより速く反応が進行したことから、9 が真の糖供与体であることが分かった (図 3)。

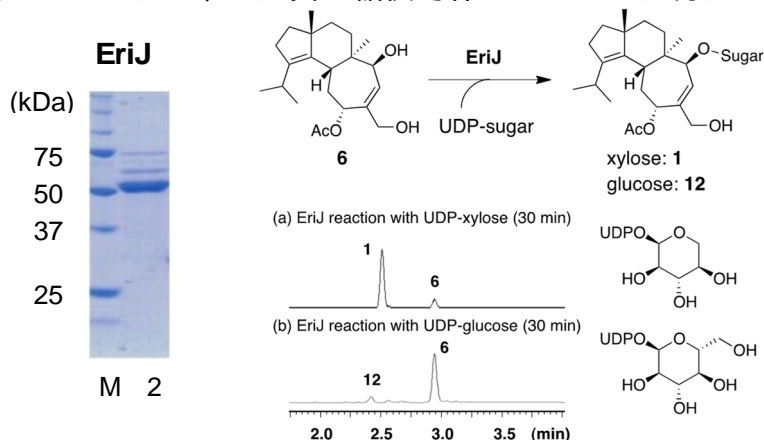


図 3 : EriJ の酵素反応解析

本研究は、麹菌で外来遺伝子高発現部位 HS を同定した。また、遺伝子導入にゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 を用いたノックイン法を適用することで、高い形質転換効率を達成した。エリナシン生合成に必要な遺伝子のゲノム配列をクローン化し、麹菌に導入した。遺伝子の転写とスプライシングを解析し、90%のイントロンが正しく除かれていることを明らかにした。残りの 10%は、PCR により簡単に修正可能である。以上の結果から、麹菌はキノコ由来遺伝子発現可能であることを示した。最後に、エリナシンの生合成遺伝子や、遺伝子クラスター外に見出したアセチル基転移酵素遺伝子、植物由来の UDP-キシロース生合成遺伝子等計 10 遺伝子を二回の形質転換によって麹菌に導入し、天然物 1 の生合成を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Chengwei, Minami Atsushi, Ozaki Taro, Wu Jing, Kawagishi Hirokazu, Maruyama Jun-ichi, Oikawa Hideaki	4. 巻 141
2. 論文標題 Efficient Reconstitution of Basidiomycota Diterpene Erinacine Gene Cluster in Ascomycota Host <i>Aspergillus oryzae</i> Based on Genomic DNA Sequences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 15519 ~ 15523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b08935	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 Nagamine Shota, Liu Chengwei, Nishishita Jumpei, Kozaki Takuto, Sogahata Kaho, Sato Yoshio, Minami Atsushi, Ozaki Taro, Schmidt-Dannert Claudia, Maruyama Jun-ichi, Oikawa Hideaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Ascomycete <i>Aspergillus oryzae</i> Is an Efficient Expression Host for Production of Basidiomycete Terpenes by Using Genomic DNA Sequences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00409-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00409-19	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長嶺翔太、南篤志、劉成偉、尾崎太郎、及川 英秋
2. 発表標題 異種発現系を用いた担子菌由来メレオライド類の生合成研究 (2)
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2019年夏季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 劉 成偉、佐藤 芳郎、尾崎 太郎、呉 静、丸山 潤一、南 篤志、河岸 洋和、及川 英秋
2. 発表標題 キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な 生産法の開発 -1-
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西下 純平、長嶺 翔太、小崎 拓登、劉 成偉、尾崎 太郎、丸山 潤一、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -2-
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長嶺 翔太、西下 純平、劉 成偉、尾崎 太郎、丸山 潤一、南 篤志、及川 英秋
2. 発表標題 キノコ由来テルペン系天然物の汎用的な生産法の開発 -3-
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西下純平・長嶺翔太・小崎拓登・劉 成偉・尾崎太郎・丸山潤一・南 篤志・及川英秋
2. 発表標題 担子菌がもつセスキテルペン環化酵素の網羅的解析-1-
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長嶺翔太・西下純平・劉 成偉・尾崎太郎・丸山潤一・南 篤志・及川英秋
2. 発表標題 担子菌がもつセスキテルペン環化酵素の網羅的解析-2-
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----