

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02825

研究課題名（和文）糸状菌の休眠二次代謝系の覚醒物質の開発

研究課題名（英文）Development of natural inducers for producing fungal dormant secondary metabolites

研究代表者

高谷 直樹 (Takaya, Naoki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50282322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：糸状菌の多様な二次代謝産物の開発のためには、糸状菌が通常は生産しない二次代謝産物を人為的に生産させることが重要である。本研究は、糸状菌の二次代謝系遺伝子の発現を抑制するサーチュインの阻害機能を持つ化合物を探索した。糸状菌 *Aspergillus nidulans* のサーチュインアイソザイムである SirC と SirD が多くの二次代謝産物の生産を抑制することが示されたことから、これらのヒストン脱アセチル化活性を阻害する糸状菌の培養抽出物を探索した。その結果、この化合物を生産する複数の糸状菌を得ることができた。これらは、糸状菌が作る医薬品を含む生物活性物質などの多くの有用化合物の利用に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストン脱アセチル化の阻害剤の観点では、ヒト由来のサーチュイン阻害剤をカビの培養に添加することによって、いくつかの潜在的な二次代謝が生産されることが見出されている。本研究は、カビ由来のサーチュインアイソザイムの阻害剤を探索する点で、これまでとは異なるカビの二次代謝産物生産への利用のために適した阻害剤の発見につながる。また、本研究成果は、サーチュインとはタイプ異なる HAD およびメチル化や SUMO 化によるヒストン修飾を介した二次代謝産物の生合成遺伝子の発現調節の研究や、これらの修飾を制御する低分子化合物の利用の可能性を提唱するものとして重要である。

研究成果の概要（英文）：To exploit diverse secondary metabolites of filamentous fungi, artificial production of secondary metabolites that filamentous fungi do not normally produce is important. This study searched compounds that inhibit fungal sirtuins, which suppress the expression of secondary metabolic genes in filamentous fungi. The search yielded filamentous fungi producing this compound in the culture extracts. These contribute to developing many useful biologically active substances including medical and agricultural chemicals produced by the filamentous fungi.

研究分野：応用微生物学

キーワード：サーチュイン 糸状菌

### 1. 研究開始当初の背景

微生物の二次代謝産物には、医薬品を含む生物活性物質などの有用化合物が多く知られており、実用化されているものも多い。歴史的に、これらの探索対象としては、種によって多様な二次代謝産物を生産する放線菌と糸状菌(カビ)が主であった。菌類(その多くはカビである)は地球上に **100** 万種以上存在すると予想されていることから、二次代謝産物のスクリーニングには最適な微生物群であるといえる。

近年、新たに発見されるカビ由来の二次代謝産物は減少してきている一方で、カビは通常の実験室条件下では発現していない潜在的な二次代謝系を多く持つことも明らかとなっている。例えば、糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、二次代謝産物の生合成に関わると予想されるポリケチド合成酵素と非リボソームペプチド合成酵素を含む遺伝子クラスターは **50** 以上存在すると予測されている(図 1)。これらの潜在的な遺伝子クラスターを人為的に発現させること、即ち、微生物ゲノム中に眠っている未知の二次代謝系を覚醒させることができれば、これまでの数を凌ぐ多種の二次代謝産物を得ることができると期待される。

こうした背景から、カビに潜在する二次代謝系にアクセスするための技術の構築が進められつつある。その多くが難培養性である未知のカビをスクリーニング源とする、ゲノム解析によって見出される二次代謝系遺伝子クラスターをまるごと他のカビ(麹菌など)に導入し異種発現させる、遺伝子組換えによってカビの当該遺伝子プロモーターを高発現プロモーターと置き換えることで強制的に当該クラスター遺伝子を発現させるなどの手法が開発されてきたが、それぞれの手法には解決すべき問題点も多いのが現状である。

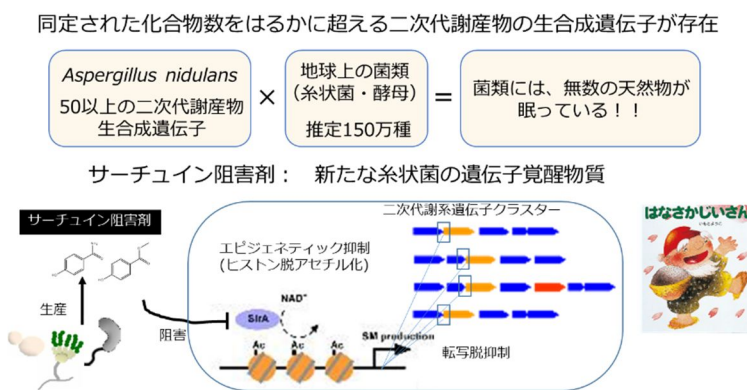


図 1 本研究の概要

### 2. 研究の目的

カビの潜在的な二次代謝系にアクセスする方法として、カビのエピジェネティック制御を活用したものが期待されている。他の真核生物と同様、カビはヒストンのアセチル化によってゲノムレベルで転写抑制を行うことが知られる。申請者はこの抑制のカギとなるカビのサーチユイン **SirA** を世界で初めて見出した (**Shimizu, M., et al., Mol. Cell. Biol., 2012**)。サーチユインはヒストン脱アセチル化酵素 (**HDA**) であり、この働きによってヒストンが脱アセチル化され、それによってヘテロクロマチンの形成と当該遺伝子の発現の抑制が引き起こされる。実際に、*A. nidulans* のサーチユイン遺伝子の遺伝子破壊株は様々な二次代謝産物の発現を誘起することが分かった (**Itoh, E., et al., J. Biol. Chem. 2017**)。一方、東北大の浅井らは、ヒト由来のサーチユイン阻害剤をいくつかのカビの培養に添加したところ、通常では見られない二次代謝産物が生産されることを見出している。これらのことは、カビのサーチユインの **HDA** 活性の阻害によって、カビの潜在的な二次代謝遺伝子を覚醒できることを示す。ヒトではなくカビ由来のサーチユインの **HDA** 活性を効率的に阻害する化合物を開発できれば、形質転換によらずに培養に振りかけるだけで任意のカビの二次代謝を覚醒できると期待でき、創薬研究や天然物多様性の科学への波及効果は大きい。

### 3. 研究の方法

#### (1) サーチユインアイソザイムの選定

*A. nidulans* の **SirA ~ SirE** の遺伝子破壊株は、相同組換えによる形質転換を用いる一般的な手法で構築した。これらを最少培地用いて培養後、培養上清を回収し **HPLC** を用いて二次代謝産物を分析した。分析条件は既報に従った。また、回収した培養後の菌体から **RNA** を分離・精製した。得られた **RNA** 画分を **RNA** シーケンシング解析に供した。同様の操作を野生型株についても行い、野生型株と遺伝子破壊株のトランスクリプトームを比較した。各アイソザイムの **cDNA** を大腸菌用の各種の発現ベクターにクローニングし、これらの組換え酵素を生産させた。最適な **cDNA** と発現ベクターの組み合わせが得られたら、組換え酵素を精製した。

#### (2) HDAC 活性の測定

組換え酵素の **NAD<sup>+</sup>** 依存的 **HDA** 活性は、**SIRT5 Deacetylase Fluorometric Assay Kit** などのヒト由来サーチユインの活性測定用のキット (**Cyclex Co. Ltd, Nagano, Japan**) を用いて測定し

た。また、アセチルヒストンに対する脱アセチル化活性は、組換え酵素と人工合成した各種のアセチル化ヒストンペプチドと  $\text{NAD}^+$  の反応液を **HPLC** 解析し、反応に伴うニコチンアミドの生産をモニターし測定した。

### (3) 二次代謝系発現誘引物質の一次スクリーニング

(2) の測定法のうち、**SirC** と **SirD** の組換え酵素の **HDA** 活性を測定するために、アセチル化された **H3K9** (ヒストン **H3** の **Lysine 9** 残基、以下同様に表記) と **H3K18** 部位の脱アセチル化を指標とした。スクリーニングに用いるカビの培養液は以下のように調製した。当研究室が保有する **200** 種の糸状菌を **10 mL** のポテト・デキストロース培地を用いて培養後、培養液に酢酸エチル **10 mL** と、塩酸 **0.1 mL** を加え懸濁させた。遠心分離後に有機層を回収し、残った水槽を同様に処理した。得られた有機層を乾燥後ジメチルスルホキシド **1 mL** に溶解させたものを培養抽出物とした。

## 4. 研究成果

これまでに、唯一知られていた **SirA** の阻害剤を探索しいくつかの阻害化合物を発見したが、その後、**SirA** による二次代謝系の発現抑制活性が必ずしも高くはないことが分かってきた。そこでまず、**A. nidulans** の他の **Sir** アイソザイムを視野に入れた探索を視野にいれ研究の効率化を図った。

### (1) ターゲットとなるサーチェインアイソザイムの選定

**A. nidulans** のゲノム配列から推定される **5** 種のサーチェイン (**SirA** ~ **SirE**) は二次代謝系以外の遺伝子発現を制御することを示してきた。そこで、これらのうち、二次代謝系の発現抑制に貢献が大きいものを選抜することを目指した。具体的には、それぞれの遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、これらの培養に対して **HPLC** を用いた二次代謝産物の発現プロファイルを検討した。その結果、いずれのサーチェイン遺伝子の欠損によっても、二次代謝産物の生産量が変動することが明らかとなった。これらの遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、**SirC** と **SirD** の遺伝子破壊株では、二次代謝やその他の代謝に関わる遺伝子の発現が変動することが顕となった。また、**SirC** と **SirD** は共通の遺伝子の発現を制御していることも明らかとなった。

また、これまでにすでに調製した **SirA** に加え、**SirC**、**SirD**、**SirE** の組換え酵素を大腸菌を用いて生産することに成功した(図2)。各種アセチル化ペプチドに対する活性を測定し、**SirC** と **SirD** による **H3K9** (ヒストン **H3** の **Lysine 9** 残基、以下同様に表記)、**H3K18**、**H4K16** 部位の脱アセチル化の活性を有することが明らかとなった。

これらの結果を総合し、本研究では、**SirC** と **SirD** に着目することとした。

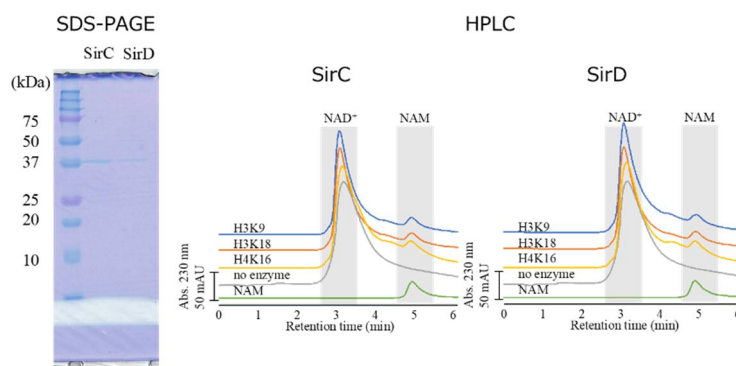


図2 組換え **SirC**、**SirD** の調製と **HDA** 活性の発見

### (2) **SirC**、**SirD** の生理的役割

**A. nidulans** でこれまでアセチル化が確認されている **H4K16**、**H3K9**、**H3K18**、**H3K56** などのアセチル化レベルをウエスタン解析による定量した。その結果、**A. nidulans** の野生株のヒストンは培養後期にかけて脱アセチル化されることが示された。また、**SirC** と **SirD** の遺伝子破壊株を用いた同様の解析の結果、**SirC** と **SirD** は、培養後期に **H3K9**、**H3K18** のアセチル化リジンを脱アセチル化することが示された。これらの成果は、引用文献 および の一部として公表した。

(1) と (2) の結果を総合して、**HDA** 活性の阻害化合物のスクリーニングに用いるサーチェインアイソザイムとして **SirC** と **SirD** は用いることとした。

### (3) 二次代謝系発現誘引物質のスクリーニング

**SirC** と **SirD** の組換え酵素の **HDA** 活性をハイスループットで測定する系を検討した。哺乳類のサーチェインの阻害剤の探索のために各社から蛍光色素の放出によって **96** 穴プレートを用いて多検体処理可能なキットが市販されている。この数種の中から **SirC** と **SirD** による **H3K9** と **H3K18** 部位の脱アセチル化の測定に適したものとして、**SIRT5 Deacetylase Fluorometric Assay Kit** を選抜した。反応時間、使用するカビ培養抽出液等を検討し、スクリーニング条件を最適化した。得られた系を用いて、**SirC** および **SirD** の活性の阻害を指標に、**200** 種のカビの培養抽出物をスクリーニングした。その結果、**SirC** または **SirD** 活性を **50%** 以上阻害するものをそれぞれ **30** 種ずつ、計 **52** 種のカビの培養抽出物を取得した。**SirC** について **30** 種のうち **11** 種

が、**SirD** について **30** 種のうち **12** 種が **50%**以上の **HDA** 活性を阻害した。

#### (4) 二次代謝系発現誘引物質の二次スクリーニング

**SirA** の阻害化合物のスクリーニングにおいては **HDA** 活性の阻害とは無関係に蛍光が減少する擬陽性の培養抽出物が得られていた。そこで、得られた候補化合物の反応液を **HPLC** に供し、**HDA** 反応産物であるニコチンアミド (**NAM**) の生成を指標に阻害化合物をさらに選抜した。また、候補化合物について、培養のスケールアップにより候補化合物を含む抽出物を大量調製した。これらの検討により、**SirC** と **SiD** の活性阻害が強いものをそれぞれ **12** 種選抜した。これらのうち **10** 種は **SirC** と **SirD** の両方に共通していた。

#### (5) 新規カビ **HDA** 活性の阻害剤の構造

(4)の中で最も活性阻害のレベルが高い *Rhizoglyphus* **rufulum** **JCM14423** の培養抽出物を **HPLC** を用いて分画した。得られた画分の **SirC** と **SirD** の阻害活性を定量した結果、阻害活性を有する画分を **HPLC** 上で単一のピークとして得ることができた。この化合物の構造決定に向けて、現在も精製条件の検討を続けているところである。*R. rufulum* については子囊菌の一種であり腐生菌類と近縁であることが予想されているものの、生産する物質についての詳細な研究は行われていない。今後、*R. rufulum* から得られた阻害物質を特定、糸状菌に添加することでこれまでに発現していなかった潜在的な二次代謝遺伝子の活性化が期待される。今後、この阻害物質を特定することで糸状菌に汎用的な二次代謝活性化剤の開発につながるかもしれない。

#### <引用文献>

梶尾俊介、高谷直樹：アスペルギルスのエピジェネティックな代謝制御、アレルギーの臨床、**10** 巻、**33** ~ **37** 頁、**2019** 年

梶尾俊介、高谷直樹：カビのエピジェネティクスと環境適応、アレルギーの臨床、**12** 月臨時増刊号、**59** ~ **63** 頁、**2019** 年

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 榎尾俊介, 高谷直樹	4. 巻 10
2. 論文標題 アスペルギルスのエビジェネティックな代謝制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 33~37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 榎尾俊介, 高谷直樹	4. 巻 12月臨時増刊号
2. 論文標題 カビのエビジェネティクスと環境適応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 59~63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保 友汰; 小田倉 里佳; 榎尾 俊介; 高谷 直樹
2. 発表標題 Aspergillus nidulans のsirtuin 阻害剤の探索
3. 学会等名 第 20 回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保友汰, 小田倉里佳, 榎尾俊介, 高谷直樹
2. 発表標題 糸状菌Aspergillus nidulansのsirtuinアイソザイムの機能解析
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高谷直樹
2. 発表標題 生体分子種の拡大のためのカピ休眠遺伝子の誘発と未培養微生物の分離技術
3. 学会等名 日本化学会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------