

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16402

研究課題名（和文）真菌由来オレアナン型トリテルペン生合成経路の解明及び改変研究

研究課題名（英文）Identification and conversion of machinery for fungal oleanane triterpenoids biosynthesis

研究代表者

米山 達朗（Yoneyama, Tatsuro）

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：30825675

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）：本研究では、真菌の一種である担子菌類，すなわちきのこの有する多様な二次代謝産物の獲得とその生合成に関わる生合成遺伝子を用いた新たな化合物の創出を目的として，真菌類の代謝物としては珍しいオレアナン型トリテルペン類に着目し代謝物の構造解析および生合成遺伝子の探索を行なった．その結果，コルクタケ *Fuscoporia torulosa* の子実体より，2種の新規化合物を含む11種の化合物を単離するとともに，コルクタケのゲノム遺伝子ライブラリーを構築しその解析を行なった．

研究成果の学術的意義や社会的意義

古来より植物やきのこのなどの天然物は薬用資源として利用され，現在の創薬の基礎となっているが，本研究においてコルクタケより単離された新規化合物についても創薬資源や研究試薬としての発展が期待される．また，本研究で樹立された菌株の培養物を分析した結果，これまで真菌類では生合成が確認されていなかった -amyrin が検出された．これまでの通説を覆す結果が得られたことから今後さらなる遺伝子情報解析により期待される新規生合成遺伝子の発見が多様な創薬資源の獲得につながると考えられる．

研究成果の概要（英文）：This study aimed to obtain diverse secondary metabolites of basidiomycetes, a type of fungi, and to create new compounds using biosynthetic genes involved in the biosynthesis of these metabolites. We focused on oleanane-type triterpenes, which are rare as fungal metabolites, and searched for the structural analysis and biosynthetic genes of the metabolites. As the result, 11 compounds including two new compounds were isolated from the fruiting bodies of *Fuscoporia torulosa*, and a genomic gene library of *F. torulosa* was constructed and analyzed to find some candidates for biosynthetic enzymes related to the synthesis of target compounds.

研究分野：天然物資源系薬学

キーワード：コルクタケ 担子菌 オレアナン型トリテルペン 生合成遺伝子

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

真菌類であるきのこ(担子菌類)は食用・薬用資源としてこれまで多くの成分研究が行われ、主成分としてラノスタン型トリテルペン等が報告されている。しかし、我々はコルクタケ *Fuscoporia torulosa* より担子菌だけでなく菌類からの報告例の少ない、オレアナン型トリテルペン類の新規化合物を単離した。オレアナン類は植物成分としては一般的であり、多くの植物の生物活性物質として非常に有用な成分であるが、真菌類からの単離報告はほとんどない。さらに植物におけるこれら成分の生合成研究は進められる一方、真菌類におけるオレアナン類の生合成遺伝子についての研究はこれまで行われていない。そのため真菌類の生合成遺伝子について検討することでこれまでに発見された生合成遺伝子とは異なったプロファイルを有する遺伝子の発見が期待された。オレアナン型トリテルペンは β -amyrin に対する数種のシトクロム P450 (CYP) による逐次反応により生合成されると考えられている。これらオレアナン型トリテルペンの生合成に関わる酵素について生物間での遺伝子配列の比較をすることでコルクタケの有する生合成遺伝子と植物由来の遺伝子群との遺伝子の保存性などを明らかにすることにも大きな興味もたれる。

2. 研究の目的

本研究では担子菌類の有する多様な二次代謝産物の獲得とその生合成に関わる生合成遺伝子を用いた新たな化合物の創出を目的とする。真菌類の代謝物としては珍しいオレアナン型トリテルペン類に着目し二次代謝物の構造解析および生合成遺伝子の探索を行う。当研究室ではコルクタケからのオレアナン型トリテルペンの単離を報告しており、これを実験に供する事とした。このコルクタケの二次代謝産物に対するさらなる探索を行うことで本菌の有する生合成能について解析を進める。

また、生合成遺伝子からのアプローチとしてはゲノム解析および EST ライブラリー作成を行い、オレアナン型トリテルペン類の生合成に関わる遺伝子群の探索を行うことでその生合成経路の解明を目指す。さらに、これにより得られた生合成遺伝子を組み合わせ、新規化合物を創出することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) 子実体の採集および菌株の作成：二次代謝物の探索および菌株の作成のため子実体の採集を行う。これを粉碎し有機溶媒で成分を抽出して成分探索に用いるとともに、一部の子実体を用いて遺伝子鑑別および菌株の作成を行う。
- (2) 二次代謝物の探索と菌株代謝物の分析：抽出した子実体エキスより LC/MS を用いたオレアナン型トリテルペン類の効率的な探索を行う。さらに、樹立した菌株を培養し、得られた代謝物が β -amyrin などのオレアナン型トリテルペンを含んでいるかを標品との比較により試験する。さらにそれらの成分について分析することで対象菌の生合成能力の検討を行う。
- (3) ゲノム解析：子実体より抽出したゲノム DNA を解析することでゲノムライブラリーを構築する。これについて近縁の菌類等との比較を含む解析を行い、オレアナン型トリテルペンの生合成に関与する候補遺伝子を選定する。
- (4) 候補遺伝子の機能解析：成分探索により得られた化合物の構造から生合成遺伝子機能を推定し、それに該当する遺伝子についても検索を行うことで効率的な探索を行う。またこの遺伝子情報を取得し異種発現系を利用し機能解析を行う。

4. 研究成果

採取した子実体について ITS 領域を用いた遺伝子鑑別を行い、コルクタケであることを確認した。この子実体の切片を寒天培地に静置し継代を繰り返すことで得られた単一コロニーについて再度遺伝子鑑別を行い、子実体の遺伝子と一致することを確認した。この結果より目的の菌株の樹立を達成した。この菌株について培地、培養期間や培養容器等の培養条件を種々検討した結果、イーストモルト (YM) 培地で培養した際に β -amyrin が産生されることを UHPLC/MS および GC/MS を用いた分析で確認した。同様の方法で分析した YM 培地については β -amyrin の含有は認められないことから、今回検出された β -amyrin は培養した菌株が産生したものであると考えられる。 β -amyrin の産生が確認された培養期間についてはさまざまであるが、全培養期間が 3 週間程度のときに検出が可能であった。また、UHPLC/MS 分析では β -amyrin とともに lanosterol も検出されている。

植物においてオレアナン型トリテルペン類は 2,3-oxidosqualene から 2,3-oxidosqualene 環化酵素の一種である β -amyrin 合成酵素の触媒する環化反応を介して生合成される。しかし真菌類において 2,3-oxidosqualene は lanosterol 合成酵素により菌類の生存に必須の成分である lanosterol を介

し, ergosterol へと代謝される経路のみが報告されている．そのため本研究で得られたこの結果は真菌類において β -amyrin 産生能を有する事を示した非常に珍しい研究報告である．

成分探索においては子実体より得られたエキスについて LC/MS 分析を用い, 各画分に含まれる化合物の分子量を指標に成分精製を行い, 2 種の新規化合物 (1, 2) を含む 8 種のオレアナン型トリテルペン, 2 種のルパン型トリテルペン (9, 10) および 1 種のムウロラン型セスキテルペン (11) を単離した (図 1)．エキスから β -amyrin が単離されたこと, 酸化パターンに富んだオレアナン型トリテルペン類が単離されたことから, コルクタケが当初想定していたよりも多くの水酸化反応を触媒する酵素遺伝子を有する可能性が示唆された．

採取した子実体の宿主植物は葉緑体 DNA を対象とした遺伝子鑑別, 形態学的特徴や植生情報から, プナ科植物であるスダジイであると判定した．スダジイおよびプナ科植物にはオレアナン型トリテルペンやその配糖体が含まれていることが報告されている．しかし前述した菌株の純粋培養の結果を加味すると, 単離されたオレアナン型トリテルペン類は宿主から β -amyrin を取り込み代謝しただけでなく, コルクタケ自身が産生した β -amyrin を代謝したものである可能性も示唆された．

今回の成分探索ではさらに, オレアナン型のみならず, ルパン型トリテルペン (9, 10) も単離された．これについては宿主から取り込み代謝したものなのか, コルクタケ自身が産生したものであるかは現在のところ不明であるが, 今後の遺伝子解析により明らかになるものと期待している．

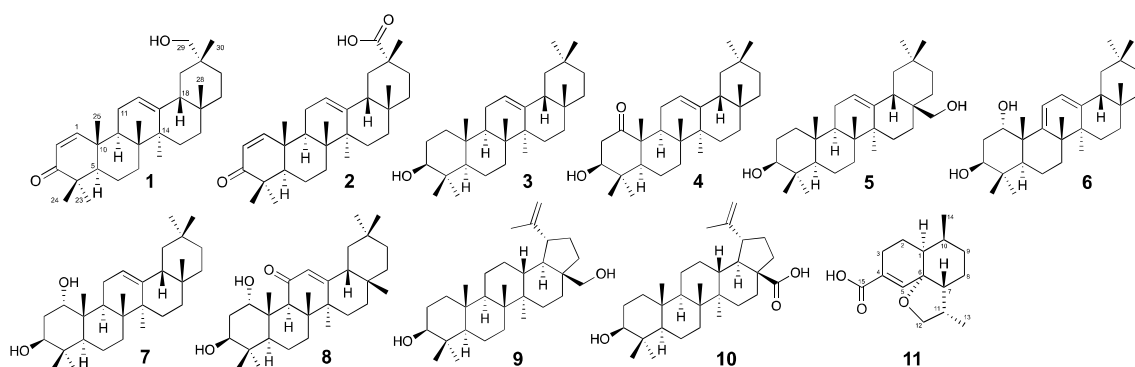


図 1. コルクタケ子実体からの単離化合物の構造式

遺伝子情報の解析についてはゲノムライブラリーの作成から着手した．採取した子実体からゲノム DNA を抽出し, シーケンシングを実施した．得られた遺伝子情報について近縁種との比較および cDNA の予想配列の作成を行い, それらの機能予測を行なった．その結果, 2,3-oxidosqualene 環化酵素の候補遺伝子を 1 つ得た．成分探索の結果, コルクタケからオレアナン型トリテルペンが単離されたことから, コルクタケは β -amyrin 合成酵素と lanosterol 合成酵素の 2 種類以上の 2,3-oxidosqualene 環化反応に関与する酵素遺伝子もしくは 2 種の酵素機能を有する遺伝子が存在すると予想していたが, 得られた配列は 1 つであった．この結果は 1 つの遺伝子配列が複数機能を有すること, またはこれまでに報告されている酵素とは全く異なるプロファイルの酵素であることを示唆している．この予想配列について培養菌株から cDNA を調整し解析を行なっているが, 現在までに酵素機能を有すると考えられる cDNA 配列は得られていない．また, オレアナン型トリテルペンの生合成に関連すると考えられる CYP 候補配列については 136 配列を得ている．今後これらについて既存の酵素との比較により系統解析を行うことでオレアナン類の生合成経路の解明を目指す．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 陳謙，奥谷麻衣，米山達朗，兼目裕充，野路征昭，梅山明美
2．発表標題 コルクタケからのオレアナン型トリテルペンの探索
3．学会等名 日本薬学会 第141年会（広島）
4．発表年 2021年

1．発表者名 奥谷麻衣，米山達朗，兼目裕充，野路征昭
2．発表標題 ルクタケにおけるオキシドスクアレン環化酵素の機能解析と -amyrinの産生
3．学会等名 日本薬学会 第142年会（名古屋）
4．発表年 2022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
---------	---------