

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07103

研究課題名(和文) 内生糸状菌のゲノム情報を活用した植物由来希少有用天然物の生合成研究

研究課題名(英文) Biosynthetic study on plant-derived natural products using genomic information of the endophytic fungus

研究代表者

石内 勘一郎 (Ishiuchi, Kan'ichiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授

研究者番号：70608140

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)：本研究では、ヒカゲノカズラ科植物オニトウゲシバ由来のLycopodiumアルカロイド生産内生糸状菌Paraboeremia sp. Lsl13のku遺伝子破壊株を用い、pyrG遺伝子破壊株の作出を試みた。また、Aspergillus属糸状菌の異種発現ホストとして、A. oryzaeの pyrG株、 ligD/ pyrGおよび ligD/ argB株の作出に成功した。さらに、生合成遺伝子の異種発現において、得られた形質転換体の培養液より、pelletierineとともにLycopodiumアルカロイド様新奇化合物を発見することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lycopodiumアルカロイドは、アルツハイマー病改善薬候補であるhuperzine Aに代表される構造多様性に富んだ化合物群であり、その骨格構築に関するメカニズムは多くの研究者の興味を集めている。本研究では、生合成遺伝子の異種発現において、Lycopodiumアルカロイド様の新奇化合物を発見した。今回得られた知見は、植物由来の複雑骨格天然物を構築する同様のメカニズムを微生物が保有することをこれまで以上に強く示した。

研究成果の概要(英文)：Preparation of a pyrG gene disrupted strain from Paraboeremia sp. Lsl13, a Lycopodiaceae plant-driven endophytic fungus producing Lycopodium alkaloids, was tried, and preparation of pyrG strain, ligD/ pyrG strain, and ligD/ argB strain of Aspergillus oryzae as heterologous expression hosts has been succeeded. Furthermore, a Lycopodium alkaloid-like novel skeleton compound has been discovered from a transformant along with pelletierine.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物内生糸状菌 生合成遺伝子 異種発現 Lycopodiumアルカロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒカゲノカズラ科植物は、構造多様性に富む *Lycopodium* アルカロイドを含む。これらの化合物群は分子内で複雑環骨格を形成するため、頻繁に単離構造決定および有機化学的な全合成のターゲットとされてきたが、1881年に lycopodine が発見されて以来、約 140 年もの間、その生合成機構の詳細は解明されてこなかった。

### 2. 研究の目的

非常にユニークかつ多様な環骨格を形成する *Lycopodium* アルカロイドの生合成機構を化合物生産植物に内生する糸状菌において解明することを目指すとともに、植物内生糸状菌が生産する新規化合物の化学構造を決定する。

### 3. 研究の方法

(1) *Lycopodium* アルカロイド生産糸状菌 *Paraboeremia* sp. Lsl3 の *pyrG* 破壊株作出  
Lsl3 株のゲノムより、*pyrG* 遺伝子と高い相同性を示す PABO\_08511 を見出した。PABO\_08511 領域外の配列を PCR により増幅後、ネオマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとする *pyrG* 遺伝子破壊ベクターを構築し、Lsl3 $\Delta$ ku 株をプロトプラスト-PEG 法により形質転換した。さらに得られた形質転換体よりゲノム DNA を抽出し、PCR により遺伝子破壊の確認を行った。

(2) *Aspergillus oryzae* の栄養要求性株作出

まず、*A. oryzae* の野生株をピリチアミン耐性遺伝子を選択マーカーとした *pyrG* 遺伝子破壊ベクターを作成し、 $\Delta$ *pyrG* 株を作出した。続いて、*pyrG* 遺伝子を選択マーカーとした目的遺伝子破壊ベクターを構築後、マーカーリサイクルを利用することで、*A. oryzae* の  $\Delta$ *ligD/pyrG* 株、 $\Delta$ *ligD/argB* 株を作出した。

(3) *Lycopodium* アルカロイド生合成遺伝子の異種発現

Lsl3 株のゲノム上に見出された、ornithine decarboxylase をコードする遺伝子 (PABO\_07432) および copper amine oxidase をコードする遺伝子 (PABO\_05900) 等について、出芽酵母および麹菌を宿主とする異種発現により機能解析を行った。

(4) ヒカゲノカズラ科植物およびツツジ科植物由来内生糸状菌 *Penicillium citreosulfuratum* LY111、*Penicillium* sp. VBP6 の成分探索

LY111 株のサブロー寒天培地およびポテトデキストロース寒天培地のメタノール抽出物より得た酢酸エチル可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相カラム、逆相 HPLC で分離し、単離精製した化合物を NMR 等の分光学的手法により構造解析を行った。また、VBP6 株についても、ポテトデキストロース寒天培地による培養物を同様の手法で化合物の単離構造解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) PABO\_07432 は、L-lysine および L-ornithine を cadaverine および putrescine へと変換する二機能性の脱炭酸酵素をコードする遺伝子である可能性を示した。Lysine/ornithine decarboxylase の機能を有する糸状菌由来の生合成遺伝子は、前例がない。

(2) 生合成遺伝子の異種発現において、得られた形質転換体より、*Lycopodium* アルカロイドの初期生合成中間体である pelletierine とともに *Lycopodium* アルカロイド様新奇化合物を単離し、その化学構造を相対配置まで明らかにした。この知見は、植物由来の複雑骨格天然物を構築する同様のメカニズムを微生物が保有することをこれまで以上に強く示した。

(3) *Penicillium citreosulfuratum* LY111 のサブロー寒天培地抽出物およびポテトデキストロース寒天培地より、それぞれ 1 種の新規 citreoviridinol 類縁体 (1) および 1 種の新規 raistrickindole 類縁体 (2) を 6 種の既知化合物とともに単離構造決定した。また、*Penicillium* sp. VBP6 の培養抽出物より、1 種の新規ドリマン型セスキテルペン (3) を 7 種の既知化合物 (4-10) とともに単離構造決定した。また、VBP6 より単離した化合物 (4-10) について、生物活性評価を行った結果、3 は、マウス海馬由来 HT22 細胞に対し、細胞毒性 (IC<sub>50</sub> = 7.0  $\mu$ M) を示した。また、5, 6, 7, 9, 10 は、100  $\mu$ M の濃度で SIRT3 選択的に脱アシル化を有意に促進したのに対し、2 (100  $\mu$ M) は、SIRT6 選択的に脱アシル化を促進することを見出した。さらに、6, 8, 9 (各 100  $\mu$ g/ml) は、糖化終末化合物 (AGEs) 生成阻害活性を示した。

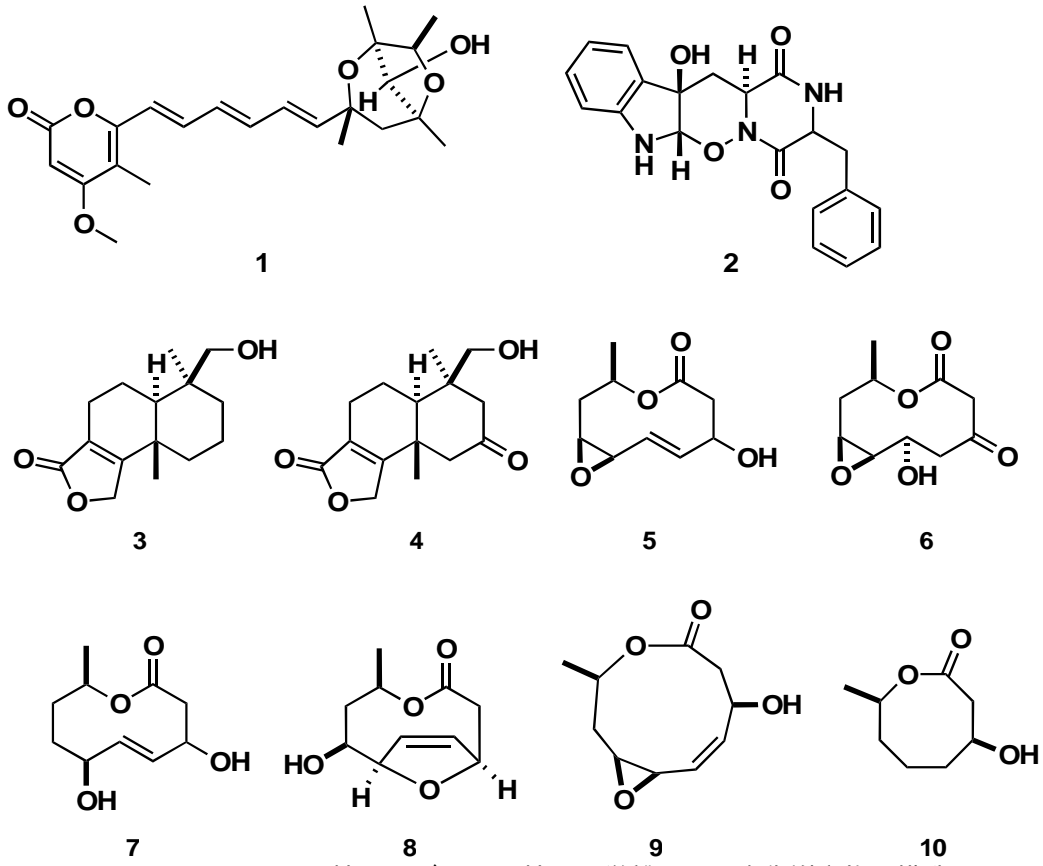


図 1. LY111 株および VBP6 株より単離した二次代謝産物の構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kan' ichiro Ishiuchi, Akiho Nagumo, Mitsuyasu Kawaguchi, Honoka Furuyashiki, Hidehiko Nakagawa, Dai Hirose	4. 巻 104
2. 論文標題 Stereochemistries of mariannamides C and D, two lipohexapeptides, isolated from <i>Mariannaea elegans</i> NBRC102301	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 1822-1835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-22-14728	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井脩斗、小川美怜、姜文平、廣瀬大、石内 勘一郎
2. 発表標題 ヒカゲノカズラ科植物由来内生糸状菌 <i>Penicillium citreosulfuratum</i> LY111より単離した新規ジケトピペラジン天然物の構造
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石井脩斗、廣瀬大、石内勘一郎
2. 発表標題 ヒカゲノカズラ科植物より分離した <i>Penicillium</i> 属糸状菌の成分研究
3. 学会等名 日本生薬学会第69回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳥凜太郎、廣瀬大、石内勘一郎
2. 発表標題 ツツジ科植物由来内生糸状菌 <i>Penicillium meridianum</i> VBP6の成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石内勘一郎, 南雲秋穂、川口充康、古屋敷帆乃花、中川秀彦、廣瀬大
2. 発表標題 糸状菌 <i>Mariannaea elegans</i> NBRC102301由来新規リポペプチドの立体化学とSIRT3活性化作用
3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井脩斗、廣瀬大、牧野 利明、石内勘一郎
2. 発表標題 ヒカゲノカズラ科植物由来内生糸状菌 <i>Penicillium citreosulfuratum</i> LY111より単離した新規化合物の構造
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南雲秋穂、廣瀬大、牧野利明、石内勘一郎
2. 発表標題 植物生息糸状菌 <i>Mariannaea elegans</i> NBRC102301 より単離した新規リポペプ チドの構造
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石内勘一郎、廣瀬大、セイエド アイシャ アンバル、小菅康弘、藤原章雄、近藤泰嗣、渡部浩平、寺坂和祥、牧野 利明
2. 発表標題 植物生息糸状菌由来新規化合物の構造と生物活性
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学生薬学分野HP  
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syg/index.html>

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			