

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19069

研究課題名（和文）糸状菌シデロフォアの機能分担と化学構造多様性に関する研究

研究課題名（英文）Studies on functional and chemical diversity of siderophores produced by filamentous fungi

研究代表者

吉田 稔（Yoshida, Minoru）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：80191617

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は糸状菌 *Acremonium persicinum* の生産する2つのシデロフォアの構造進化と生理的役割を解明し、「微生物二次代謝産物の化学構造進化の謎」に迫ることを目的とした。我々は本菌のゲノム中にASP2488053とフェリクローム様シデロフォアの生合成遺伝子を見出した。sid1とsid2と命名したこれらを破壊し、sid1はASP2499053、sid2はフェリクロシンの生合成遺伝子であること、ASP2488053は鉄飢餓条件下で細胞外に分泌され、抗生物質と同時に鉄取り込みに使われるが、フェリクロシンは鉄過剰条件下で細胞内に蓄積され、鉄の貯蔵とその毒性の回避に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の共通の問題の一つが、難溶性の鉄イオンをいかにして環境中から取り込み、利用するかである。ヒトも例外ではなく、血中鉄イオンを効率的に運搬するためにトランスフェリンを生産する。一方、多くの微生物や植物は鉄イオンを保持して細胞内に取り込むためにシデロフォアと呼ばれる低分子化合物を生産して環境中に分泌する。シデロフォア型抗真菌化合物ASP2488053は鉄に強くキレートし、シデロフォア輸送体を介して標的細胞に取り込まれて殺菌効果を発揮する。鉄取り込みと競争相手を攻撃する抗生物質という異なる機能を同時に持たせた巧妙な進化の一端が明らかになった。今後、鉄イオンを介した感染治療等への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the structural evolution and physiological roles of two siderophores produced by the fungus *Acremonium persicinum*, and to address the question of "the mystery of chemical structural evolution of microbial secondary metabolites". We found two biosynthetic genes for ASP2488053 and a ferrichrome-like siderophore in the genome of this fungus. We disrupted two biosynthetic genes, designated sid1 and sid2, and found that sid1 is the gene for ASP2499053 and sid2 for ferricrocin. ASP2488053 was secreted extracellularly under iron-starved conditions to act as an antibiotic and used for iron uptake, while ferricrocin accumulated intracellularly under iron-rich conditions for iron storage and to avoid iron toxicity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：シデロフォア 生合成遺伝子 化学構造進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ASP2397 (ASP2488053 のアルミニウムキレート体) は米国での臨床第 1 相試験において高い安全性とアスペルギルス症に対する著効が認められ、実用化が期待される抗真菌抗生物質である。しかし、本化合物の作用機序は未解明であり、申請者らは現在その理解に取り組んでいる。一方、生産菌のゲノム情報を解読したところ、本菌は 2 種のフェリクローム型シデロフォアを産生することを見出した。興味深いことに、ASP2488053 の NRPS (非リボソーム型ペプチド合成酵素) の遺伝子構造と鉄応答性は、フェリクローム類縁体 X のものと異なっていた。これは、本菌が産生する ASP2488053 とフェリクローム類縁体 X がそれぞれ異なる機能を分担するように進化してきた可能性を示唆する。この現象を分子レベルで解明することは、「微生物二次代謝産物の化学構造進化の謎」という微生物学・天然物化学における根源的な課題の解を得るヒントにもなると考えられる。

2. 研究の目的

ASP2488053 の生合成機構解明を目的として本菌のゲノムを解読したところ、ASP2488053 と化学構造が類似するが抗菌性のないフェリクローム類縁体 X の生合成遺伝子を見出した。類縁体 X も 6 つのアミノ酸より構成され、3 分子のオルニチン誘導体によって鉄を保持する非リボソームペプチドである。本研究ではまず、ASP2488053 と化学構造が類似するが抗菌性のないフェリクローム類縁体 X のそれぞれの生合成遺伝子を特定し、それらの遺伝子破壊からそれぞれのシデロフォアの機能分担をと生合成調節機構を解明する。さらに近年、シデロフォアが様々な生物活性を示し、生物間相互作用にも重要な役割を果たすことが示され始めていることから、鉄吸収、鉄貯蔵、抗生、共生等多様な機能に関わるシデロフォアの化学構造多様性が生まれる駆動力を考察することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生産調節機構と生理機能の解析：糸状菌 *A. persicinum* が持つ 2 つのシデロフォアをコードすると考えられる NRPS 遺伝子の周辺には ASP2488053 とフェリクローム類縁体 X の構成アミノ酸の産生酵素や、鉄代謝や物質輸送に関連するタンパク質をコードする遺伝子が散在していることが明らかになっている。これらの遺伝子を破壊し、シデロフォアの産生能、鉄要求性、菌体の形態やストレス感受性の変化を試験する。また、日和見感染菌 *Aspergillus fumigatus* と共培養を行い、*A. persicinum* が示す抗真菌活性を調べ、ASP2488053 とフェリクローム類縁体 X の産生能が本菌の生育・生存・他種微生物との競争に有利に働くかどうかを評価する。また、それぞれの NRPS 遺伝子は鉄の有無で発現量が劇的に増減する。両 NRPS 遺伝子の周辺遺伝子についても発現量を定量し、上述の遺伝子破壊株が示す表現型と併せて解析することで、シデロフォアの生合成や鉄代謝、細胞外分泌や細胞内貯蔵に関連する遺伝子群を同定し、そのタンパク質の機能を生化学的に解析する。これにより、それぞれのシデロフォアの機能分担を解明する。

(2) 自己耐性機構の解析：ASP2488053 は生産菌 *A. persicinum* には全く殺菌活性を全く示さない。そこで ASP-NRPS 遺伝子の周辺に位置する遺伝子のうち、鉄飢餓条件で転

写が上昇するものに着目し、それら遺伝子の破壊と異種発現により自己耐性遺伝子を同定し、ドメインの欠損や点変異の導入により、耐性獲得の分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

糸状菌 *Acremonium persicinum* のゲノムを解読し、情報解析により検出された 2 つのシデロフォアの生合成遺伝子のうち NRPS をコードするもの (*sid1* と *sid2* と命名) を破壊し、代謝物を解析することで *sid1* は ASP2499053、*sid2* はフェリクロシン (申請時には未同定の類縁体 X) の生合成遺伝子であることを明らかにした。両遺伝子の A ドメインについてアミノ酸配列を系統樹解析に供したところ、*sid2* が含む A ドメインは真菌に広く保存されるシデロフォアの A ドメインと同じクラスターを形成し、*sid1* が含む A ドメインはシデロフォア以外の NRPS のものと同じクラスターを形成した。この結果から *sid1* はフェリクローム型のシデロフォアから派生してきたものではなく、より一般的な NRPS から出現したものである可能性を示唆している。すなわち ASP2488053 の鉄キレート能はフェリクロームとは独立に収斂進化により獲得されたと推測される。

sid1 遺伝子の発現と ASP2397/ASP2488053 の産生は一般的なシデロフォアと同様に鉄が枯渇した条件でみられ、化合物は細胞外に分泌された。一方で *sid2* 遺伝子の発現とフェリクロシンの産生は鉄が多い条件で誘導され、フェリクロシンは細胞内に蓄積された。これら 2 種の化合物の生理機能を解明するために *sid1* および *sid2* の遺伝子破壊株を用いて種々の培養実験を行ったところ、ASP2397/ASP2488053 は細胞外に分泌されて他の糸状菌の生育を阻止する抗生物質として働くとともに、外から鉄を取り込む働きを持つこと、フェリクロシンは細胞内に蓄積して過剰な鉄による毒性を抑制することが明らかとなった (図 1)。

糸状菌 *A. persicinum* は鉄飢餓条件下で ASP2488053 を産生するが、高濃度の本化合物に暴露しても増殖が阻害されることは無い。ASP2488053 は強力な抗真菌化合物であることから、生産菌は自己耐性を有していると考えられる。自己耐性の獲得機構を明らかにするため *sib1* 遺伝子の周辺遺伝子をクローニングし、感受性を示す分裂酵母に発現させて耐性獲得能を評価したところ、一つのトランスポーターを特定した。本トランスポーターは分裂酵母の ASP2488053 感受性を緩和し、試験したほかの化合物への感受性には影響しなかったことから、生産菌において ASP2499053 選択的な排出ポンプとして働いていると想定される。生産菌における本遺伝子の機能に興味もたれる。今後、遺伝子破壊株を作製し、それを用いた各種培養条件における増殖試験や遺伝子の発現制御機構、タンパク質の翻訳・局在制御の解析による機能解明が待たれる。

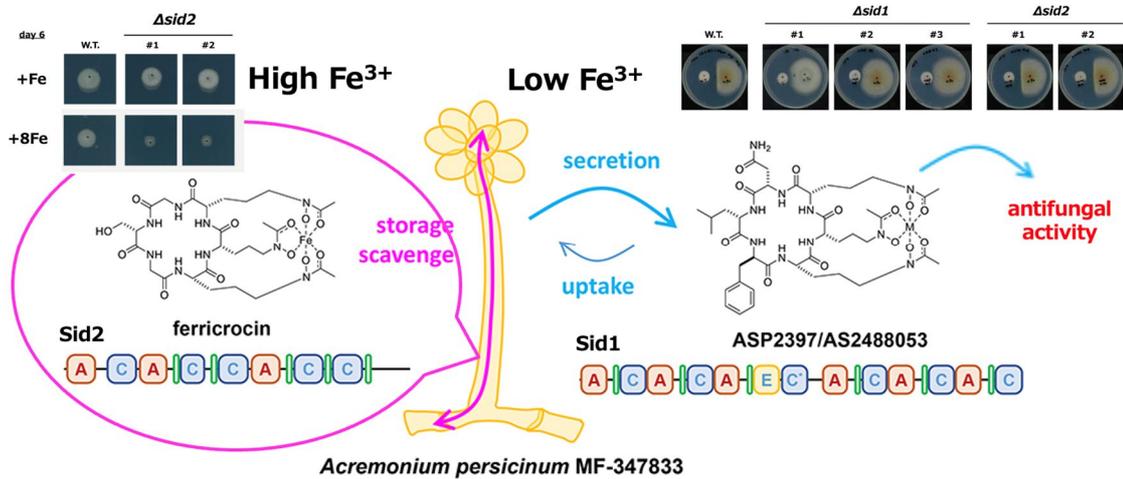


図1. 糸状菌 *Acremonium persicinum* MF-347833 による2種のフェリクローム型シデロフォアの使い分け。

本糸状菌においてフェリクロシン（左）は菌体に蓄積して鉄の貯蔵・隔離にはたらき、ASP2397/AS2488053 は多くが細胞外に分泌されて抗生物質として働く。一部は細胞に取り込まれ、鉄源として使われる。化合物の構造式の下にあるのは生合成タンパク質の模式図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Yoshiki Asai, Tomoshige Hiratsuka, Miyu Ueda, Yumi Kawamura, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka, Manabu Arioka, Shinichi Nishimura, and Minoru Yoshida.	4. 巻 17
2. 論文標題 Differential Biosynthesis and Roles of Two Ferrichrome-Type Siderophores, ASP2397/AS2488053 and Ferricrocin, in <i>Acremonium persicinum</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chem. Biol.	6. 最初と最後の頁 207 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.1c00867	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅井良樹、平塚知成、上田美祐、河村優美、西村慎一、吉田稔
2. 発表標題 糸状菌 <i>Acremonium persicinum</i> MF-347833 における2種のフェリクローム型シデロフォアの産生と生理機能
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井良樹、平塚知成、上田美祐、河村優美、浅水俊平、尾仲宏康、西村慎一、吉田稔
2. 発表標題 糸状菌 <i>Acremonium persicinum</i> MF-347833 は 2 種のフェリクローム型シデロフォアを産生する
3. 学会等名 第63回 天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021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
---------	---------