

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22241054

研究課題名（和文） 各種ポリケタイド生合成酵素による分子多様性の創出

研究課題名（英文） Generating molecular diversity by the wide range of polyketide synthases

研究代表者

野口 博司 (NOGUCHI HIROSHI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：60126141

研究成果の概要（和文）：マンゴスチンから得られたポリケタイド合成酵素はベンズイル CoA に高い親和性を示しベンゾフェノンを生合成し、同時に多様なアシル CoA を開始基質として受容し、ポリケタイドラクトンを生成した。糸状菌のメロテルペノイド生合成酵素遺伝子、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素、プレニル基転移酵素、シトクロム P450 酸化酵素を獲得し、ゲノム遺伝子を改変し発現系とした出芽酵母株にプラスミドとして導入した。するとスピロトリプロスタチン類の予想生合成中間体であるブレミナミド F、トリプロスタチン B およびデマトキシフミトレモルゲン C の産生が再現性よく確認された。

研究成果の概要（英文）：Novel type III PKS was isolated from *Garcinia mangostana* L., which contains mainly prenylated xanthenes. A key prenyltransferase involved in the biosynthesis of abundant fungal meroterpenoids derived from 3,5-dimethylorsellinic was identified. The prenylated product serves as a key intermediate in the biosynthesis of series of meroterpenoids in fungi. With *Aspergillus nidulans*, Metabolic engineering of yeast for heterologous production of tryprostatins and other compounds was developed through our engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, SCKW5. Further trial to architect comprehensive system to form secondary metabolites with *Chaetomium globosum* is under progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2011年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2012年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	32,000,000	9,600,000	41,600,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：①ゲノム ②酵素工学 ③生理活性 ④biosynthesis ⑤生合成

1. 研究開始当初の背景；

植物特有の、III型ポリケタイド合成酵素（PKSIII）であるカルコン合成酵素（CHS）ファミリーは、安息香酸誘導体、各種ピロン、スチルベン、フラボノイド、クロモン、

クルクミノイド、一部アルカロイド等、広く植物ポリフェノール全般の生合成を担っている。植物のPKSIIIは、相互に50~60%の配列相同性を有し、現在でも生成物の精密構造解析以外に機能を特定できない。放線菌から

は高等植物の PKSIII と 30%内外の配列相同性を示す PKSIII が、ナフタレン環等を生成する *rppA* を始めとして、単離されている。一方放線菌・糸状菌類の各種縮合環系生合成に関与する I, II 型 PKS は良く知られているが、高等植物における I, II 型 PKS の存在はこれまで知られていない。加え、天然物の分子多様性を人為的に拡張する生合成工学の確立に努めてきた。

2. 研究の目的

糸状菌・放線菌の I~III 型ポリケタイド生合成系を利用して、植物ポリフェノール類の生合成を考える上で未解決のアントラキノン類の生合成が果たして PKSIII によるものであるか否かを明らかにする

3. 研究の方法

III 型 PKS 酵素と相互作用するポリケタイド還元酵素 (PKR) とのこれまでに引き続き検討する。*Asp. fumigatus* および *Asp. terreus* のゲノムより、候補のメロテルペン合成系 PKS 遺伝子のクローニングを行う。その際、ゲノムデータベースに記載されている予想アミノ酸配列には誤りがある場合も多く、特に正確な開始コドンの位置については厳密な検討が必要である。PKS の機能解析には *Asp. oryzae* を用いた糸状菌異種発現系を用いる。目的の遺伝子を導入した形質転換 *Asp. oryzae* より誘導培養を行い、PKS 産物の生産を試みる。*Asp. oryzae* での機能発現がうまくいかない場合には酵母の発現系を試みる。

同時に *Asp. fumigatus* および *Asp. terreus* において、これら PKS の破壊株を作製し、ピリピロペンならびにテレトニンの生産への影響を検討する。PKS による生成物の解析から、候補遺伝子クラスターがピリピロペン・テレトニンの生合成に関与するものであるか否かが判断される。

[候補クラスター中の PT の機能解析] 2 段階目の反応である FPP の縮合を担う PT の機能解析を行う。*Asp. fumigatus* および *A. terreus* のゲノムより、PT 遺伝子のクローニングを行う。得られた PT を、上述の PKS と同時に *Asp. oryzae* を用いて異種糸状菌での発現を行う。この時 PKS と PT の両方を同時に一つのプラスミド上に組み込んだベクターを用い *Asp. oryzae* を形質転換する場合と、PKS と PT を順次 *Asp. oryzae* に導入する手法 2 通りを検討する。

4. 研究成果

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の生産するメロ

テルペノイド、ピリピロペンの生合成遺伝子中、ポリケタイド部分がプレニル化された後にテルペノイド部分の環化を触媒する新規の 7 回膜貫通型タンパク質と予想される酵素であった。本新規テルペン環化酵素 (Pyr4) の詳細な機能解析と特異性の改変を行うための触媒残基の同定を行った。Pyr4 タンパク質を酵母において発現させ、マイクロソーム画分を調製した後、基質と反応させたところ *in vitro* にて環化生成物の検出に成功した。

そこで、本 *in vitro* の系を用いて触媒残基を同定するために変異導入実験を行った。Glu63 と Asp218 の残基が触媒残基であることが強く示唆された。さらにプレニル転移酵素である Trt2 がテレトニンのポリケタイド部分、ことにジメチルオルセリン酸 (DMOA) を起源とする全置換された芳香環部位に芳香性を失わせる形でファルネシル基を転移させメロテルペン骨格の母核形成を果たしていることが明らかになった。

さらにメチル基転移酵素遺伝子 Trt1 を新たに得て、その酵素機能を解析することにより DMOA にゆらいするメロテルペン類の生合成に関して、メチル化の過程がこの特色ある骨格形成に不可欠であることを明らかにした。*Aspergillus fumigatus* からはフマガリンの生合成機構にかかる遺伝子クラスター生合成経路、生合成経路を推定し、同様の機能を有する酵素遺伝子との配列相同性の類推から獲得した。フマガリンはテレトニン同様部分構造としてメトキシ基を有しており、その炭素骨格はポリケタイド鎖とセスキテルペンら構成されていると予想された。従って、この生合成遺伝子クラスターにはメトキシ基の導入に関与するかメチル基転移酵素および酸化酵素、PKS、セスキテルペン骨格の生合成に関与する環化酵素が含まれている。実際 *O*-メチル転移酵素遺伝子および酸化酵素等の遺伝子クラスターが第 8 染色体上に存在し、本領域がフマガリンの生合成遺伝子クラスターであると推定された。

そこで、同クラスターの推定 PKS 遺伝子 Afu8g00370 の破壊を試みた。約 1kbp の相同組換え領域とピリチアミン耐性遺伝子を含む破壊カセットをプロトプラスト PEG 法を用い *A. fumigatus* A1159 株染色体上へ導入した。破壊株の代謝産物を解析したところ、この生合成が消失したことを確認することができた。続いて、その近傍にコードされる遺伝子を全て破壊した。その中で、酸化酵素と機能予測された遺伝子の破壊株から得られた培養液を分析したところ、フマガリン生合成中間体と推定される化合物の生産を確認することがで

きた。本破壊株を大量に培養した後、目的化合物を単離し、その化学構造を明らかにしたことで、フミガリン生合成経路に関する知見が得られた。

海洋放線菌*S. lavendulae*由来サフラマイシンの生合成遺伝子群、3種のNRPS (sfmA, sfmB, sfmC)、および5種の修飾化酵素 (sfmM₂, sfmM₃, sfmD, sfmM₁, sfmO₂)を同時に異種発現させるため双方向性プロモーターを用い酵母に導入し、目的酵素タンパク群の生成を確認でき、目的抗生物質生産の効率化に向けた検討を行った。ここで生合成遺伝子が真菌あるいは放線菌由来によって物質生産の効率に影響か出るか否かを*A. terreus*の生合成遺伝子を用いて検討し、コピー数に生産高が左右されていることが判明した。現在コピー数が高くなるベクターへの組み込みを改めて実施している。同様にしてプレニル化にかかる酵素遺伝子についても酵母における発現ベクターに組み込み、タンパク発現の検討を行っている。

アントラキノンを生産する薬用植物アロエ、ダイオウ、センナに絞り、I, II型PKSが存在する可能性の有無を検討した。しかし尤もらしい遺伝子群は見いだされなかった。しかし植物のPKSIIIとプレニル基転移酵素双方の資源としてキサントンのプレニル置換体が多量に含まれるオトギリソウ科マンゴスチン *Garcinia mangostana* L. pericarpsからPKSIIIとプレニル基転移酵素を単離した。このPKSIIIはベンゾイルCoAに高い親和性を示しベンゾフェノンを生合成した。同時にこれまでの多くのPKSIII同様多様なアシルCoAを開始基質として受容し、ビスノルヤンゴニン或いはポリケタイドラクトンを生合成した。

一方*Asp. fumigatus*, *A. flavus*, *A. oryzae* および*Chaetomium globosum*等の真菌から、60余に及ぶ遺伝子クラスターを検討し、7つの新規化合物の生成を見いだした。さらに遺伝子スタッキングの技法を用いこれらを酵母の発現系に組み込み、発現させた。

*A. fumigatus*より調製したゲノムDNA またはcDNAをもとに、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) (FtmA)、プレニル基転移酵素 (FtmB)、シトクロムP450 酸化酵素 (FtmE)および出芽酵母由来NADPH-シトクロムP450還元酵素(Ncp1) の各遺伝子をガラクトース誘導にて発現可能な自立複製型プラスミドへと導入した。次に*Aspergillus nidulans*由来ホスホパンテテニル基転移酵素NpgAおよびマロニル-CoA合成酵素MatBなどの遺伝子を特定の遺伝子座に導入した出芽酵母株 SCKW5を構築し発現系とした。ここに上記プ

ラスミドを導入し、代謝産物を解析したところspirotryprostatin類の生産がみられた。この系を用いスピロ環化遺伝子Afua_12060の同定に成功しtryprostatin類はAfua_12060によってインドール環の2,3位がエポキシ化され、続く加水分解あるいはセミピナコール型の転位反応が生じていることが示唆された。

*C. globosum*からは多様な遺伝子クラスターが得られた。これらを用いて各成分の生合成を検討した。Chaetoglobosin Aの生合成遺伝子はPKS-NRPS、1つのER (enoylreductase)、2つのcytochrome P450、および1つのFMO (flavin monooxygenase) をコードする合計5つの遺伝子から生合成されることが示された。9つの*C. globosum*遺伝子破壊株 $\delta cgbC$, $\delta cgbD$, $\delta cgbF$, $\delta cgbG$, $\delta cgb.G/\delta cgbH$ $\delta cgbF/\delta cgbHcgb$, $\delta cgbF/\delta cgbG$, $\delta cgbF$, $\delta cgbG/\delta cgbH$ 株を得て生合成中間体を検討した結果、*cgbC*並びに*cgbD*が鍵生合成遺伝子であることが明らかとなった。

同様に*C. globosum*から単離され、スピロアセタール構造を有しているazaphilone系天然物のcochliodone Aの生合成も検討した。ここではアセタール形成および二量体化のメカニズムに興味を持たれていたが、cochliodone Aの生合成遺伝子クラスターの探索を行った。本菌が生産するazaphilone系化合物、chaeloviridin類の予想されるPKS遺伝子を釣り針として、相同性検索を行い、予想されるPKS遺伝子を見出しそのPKS遺伝子のを手掛かりに全長35 kb からなるcochliodone A 生合成クラスターを特定した。次いで生合成クラスターにおける修飾遺伝子群の破壊実験を行った結果、4種の生合成中間体と考えられる化合物の獲得に成功した。

以上のようにこの*Chaetomium globosum* では生合成遺伝子クラスターが存在し存在し、これらの活性が巧みに計ればこれまで*C. globosum*では知られていない化合物の生産が期待される。これらを網羅的な活性化手法の開発を行った。モデル糸状菌である*Aspergillus*属をはじめとする様々な糸状菌において、天然物生合成(二次代謝)と形態形成の制御機構の間には強い関連性があることが示唆されている。そこで形態形成制御が不全化した変異体を取得することが、休眠型生合成遺伝子の活性化および新規天然物の獲得に繋がるのではないかと考えられた。実際、*C. globosum* においてLaeA・VeAなどのホモログをコードする遺伝子の破壊を行ったところ、顕著な二次代謝産物の変動が観察され、野生株からは取得できなかった天然物を多数獲得できた。同時に、これらの変異体では気中

菌糸および子のう殻形成が不全化していることが観察された。逆に、HepA・DmtBなどのホモログをコードする遺伝子破壊株では二次代謝の変動が観察されず、同時に本菌の形態形成への影響もなかった。上記の結果からは、予想通り形態形成異常と二次代謝変動という表現型が同時に発生することが示唆された。しかし一方で、肉眼レベルでの形態形成は正常だが、有性孢子形成のみが不全化した2つの遺伝子破壊株では、二次代謝が変動しないことが分かった。これは、形態形成の最終段階(最下流の現象)である減数分裂が不全化しており、それによって影響を受ける下流の分子機構が存在しないためだと考察できる。

以上より、本菌がホモタリック菌であり、かつ有性形態形成誘導が容易であるという特徴を利用して、本菌の有性孢子(単核)に対して突然変異を導入し、肉眼で判定できる形態形成異常変異体をスクリーニングすることで、効率よく新規天然物を取得できることが期待できる。現在、有性孢子を突然変異誘起剤処理し、形態形成不全変異体をスクリーニングする最適条件を検討しており、実際に得られた変異体が産生する天然物を解析している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1) K. Ishiuchi, T. Nakazawa, F. Yagishita, T. Mino, H. Noguchi, K. Hotta, K. Watanabe, Combinatorial generation of complexity by redox enzymes in the chaetoglobosin a biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 7371-7377(2013)
- 2) Y. Matsuda, T. Awakawa, T. Itoh, T. Wakimoto, T. Kushiro, I. Fujii, Y. Ebizuka, I. Abe; Terretonin biosynthesis requires methylation as essential step for cyclization, *ChemBioChem*, 13(12), 1738-1741(2012)
- 3) T. Itoh, K. Tokunaga, E.K. Radhakrishnan, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, T. Kushiro; Identification of a key prenyltransferase involved in biosynthesis of the most abundant fungal meroterpenoids derived from 3,5-dimethylorsellinic acid, *ChemBioChem*, 13(8), 1132-1135 (2012)
- 4) N. Nualkaew, H. Morita, Y. Shimokawa, K. Kinjo, T. Kushiro, W. De-Eknamkul, Y. Ebizuka, I. Abe; Benzophenone synthase from *Garcinia mangostana* L. pericarps. *Phytochemistry*, 77,60-69(2012)
- 5) J. Sun, H. Morita, G. Chen, H. Noguchi, I. Abe; Molecular cloning and characterization of copper amine oxidase from *Huperzia serrate*, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 22(18), 5784-5790, (2012)
- 6) J. Sun, T. Awakawa, H. Noguchi, I. Abe; Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L., *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 22(20), 6397-6400, (2012)
- stilbenoid production in callus cultures of
- 7) J. Chen, H. Morita, T. Wakimoto, T. Mori, H. Noguchi, I. Abe; Prenylation of a Nonaromatic Carbon of Indolylbutenone by a Fungal Indole Prenyltransferase, *Organic Letters*, 14 (12), 3080-3083, (2012)
- 8) K. Ishiuchi, T. Nakazawa, T. Ookuma, S. Sugimoto, M. Sato, Y. Tsunematsu, N. Ishikawa, H. Noguchi, K. Hotta, H. Moriya, K. Watanabe; Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics, *ChemBioChem.*, 13(6), 846-854 (2012)
- 9) T. Nakazawa, K. Ishiuchi, A. Praseuth, H. Noguchi, K. Hotta, K. Watanabe; Overexpressing transcriptional regulator in *Aspergillus oryzae* activates a silent biosynthetic pathway to produce novel polyketide, *ChemBioChem*. 13(6), 855-861, (2012)
- 10) Y. Tsunematsu, S. Ichinoseki, T. Nakazawa, N. Ishikawa, H. Noguchi, K. Hotta, K. Watanabe; Overexpressing transcriptional regulator in *Chaetomium globosum* activates a silent biosynthetic pathway: evaluation of shanorellin biosynthesis, *J. of Antibiotics*, 65(7), 377-380, (2012)
- 11) J. Chen, H. Morita, R. Kato, H. Noguchi, S. Sugio, I. Abe; Expression, purification and crystallization of an indole prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, *Acta Cryst. Section F*, 68, 355-358, (2012)
- 12) T. Saruwatari, A. P Praseuth, M. Sato, K. Torikai, H. Noguchi, K. Watanabe, A comprehensive overview on genomically directed assembly of aromatic polyketides and macrolide lactones using fungal megasynthases, *The Journal of Antibiotics*, 64, 9-17(2011)
- 13) K. Torikai, T. Saruwatari, T. Kitano, T. Sano, A. Nakane, H. Noguchi, K. Watanabe; Practical Synthesis of dopa derivative for biosynthetic production of potent antitumor natural products, Saframycins and Ecteinasidin 743, *Letters In Organic Chemistry*, 8-10, 686-689, (2011)
- 14) K. Wanibuchi, H. Morita, H. Noguchi, I. Abe; Enzymatic formation of an aromatic dodecaketide by engineered plant polyketide synthase, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21, 2083-2086 (2011)

15) H. Morita, Y. Shimmokawa, M. Tanio, R. Kato, H. Noguchi, S. Sugio, T. Kohno, I. Abe : A structure-based mechanism for benzalacetone synthase from *Rheum palmatum*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 107, 669-673 (2010)

16) T. Itoh, K. Tokunaga, Y. Matsuda, I. Fujii, I. Abe, Y. Ebizuka, T. Kushihiro ; Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases, *Nature Chemistry*, 2, 858-864 (2010),

〔学会発表〕 (計 10 件)

1) T. Nakazawa, T. Ookuma, S. Sugimoto, S. Ichinoseki, Y. Gotanda, N. Ishikawa, Y. Tsunematsu, K. Ishiuchi, H. Noguchi, K. Watanabe, Biosynthesis of natural products through a fungal molecular genetics, 2012年3月30日-4月2日 Philipps-Universität Marburg (Germany),

2) Kenji Watanabe(招待講演): Biologically active molecules from fungi, 第8回天然物合成日米セミナー(淡路), 2012年6月17-22日

3) Tetsuo Kushihiro(招待講演), A novel triterpene synthase gene from a monocot plant, Imperata cylindrical, The 8th International Conference of Natural Product Biosynthesis, 2012年6月17日~2012年6月22日, Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan

4) H. Noguchi; Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of natural products through fungal molecular genomics, International Congress on Natural Products Research, 2012年7月28日-8月1日, New York, (US)

5) K. Watanabe: 招待発表 Functional reconstitution of the saframycin biosynthetic enzymes, RCIS International Conference (Okayama), 2012年11月20-21日

6) K. Watanabe : Yeast, a more manageable non-ribosomal peptide mill for Spirotryprostatin B assembly, 11th European Conference on Fungal Genetics. Society for Industrial Microbiology, Annual meeting and exhibition 2011, Sheraton New Orleans, New Orleans (LA), 2011年7月24日

7) K. Watanabe : Yeast, a more manageable non-ribosomal peptide mill for Spirotryprostatin B assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo Convention Center、札幌、2011年9月6日

8) T. Nakazawa, K. Ishiuchi, K. Hotta, H. Noguchi, H. Moriya, K. Watanabe : Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of natural products through a fungal molecular genomics, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of

Medicinal Science", KEIO PLAZA HOTEL TOKYO (東京)、2011年11月29日

9) H. Noguchi : A chemical library by engineered plant polyketide synthase, The 1st Current Drug Development International Conference, 2010年5月7日 Phuket (Thailand)

10) J. Chen, H. Noguchi : Combinatorial biosynthesis of unnatural novel prenylated alkaloids. Abstract, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010年12月17日 Honolulu (HW US)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 博司

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号 : 60126141

(2) 研究分担者

久城 哲夫

明治大学・農学部・准教授

研究者番号 : 80373299

(3) 研究分担者

梅原 薫

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号 : 40185070

(4) 連携研究者

渡辺 賢二

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 50360938

(5) 連携研究者

飯田 滋

静岡県立大学・生活健康科学研究科・薬学

研究科・特任教授

研究者番号 : 30012777