

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23710248

研究課題名(和文) エピジェネティックな未利用生合成遺伝子発現の活性化による新規有用物質の創出

研究課題名(英文) Production of novel fungal secondary metabolites by epigenetically activating the silent biosynthetic gene clusters.

研究代表者

浅井 禎吾 (ASAI TEIGO)

東北大学・助教

研究者番号：60572310

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック制御に関わる HDAC や DNA メチル化酵素の低分子阻害剤を用いる化学的手法に関して、幅広い糸状菌の二次代謝を活性化するのに有効な条件を見出した。それを用いて、通常の培養条件では生産されない数多くの新規物質の取得に成功した。得られた化合物の構造は多様性に富んでおり、本手法がケミカルスペースの広い天然物ライブラリの拡充に有用であることを示した。また、エピジェネティック因子の一つである LaeA の過剰発現により糸状菌の二次代謝を活性化できるという知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found some effective conditions for activating fungal secondary metabolism by using epigenetic modifiers such as HDAC and DNA methyltransferase inhibitors. Using the conditions, we successfully isolated structurally diverse novel fungal secondary metabolites from cryptic biosynthetic pathways, showing the utility to enlarge chemical space composed of natural products. In addition, we obtained the evidence that over expression of LaeA, an epigenetic enzyme, in fungi is possible way to enhance their production of secondary metabolites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：生物分子化学・生物分子化学

キーワード：天然物，二次代謝物，糸状菌，二次代謝制御，エピジェネティクス，ヒストン脱アセチル化酵素，酵素阻害剤。

1. 研究開始当初の背景

糸状菌のゲノム解読が進み、数多くの二次代謝物生合成遺伝子が、通常培養では休眠状態にあることが示唆されて以降、これら休眠遺伝子の利用ならびにそれらにコードされる新規物質の取得を目指す研究が天然物化学の主流の一つになってきた。最近、ヒストンや DNA への化学修飾を介した転写制御機構であるエピジェネティック制御が、糸状菌の二次代謝物の生産制御に深く関与していることが明らかになってきた。また、ヒストンや DNA の化学修飾に関わる酵素の遺伝子

破壊や過剰発現、それらの低分子阻害剤により、糸状菌のエピジェネティクスを改変することで、様々な生合成遺伝子発現を変動させ、二次代謝を活性化できる可能性が示唆された。このように、エピジェネティック制御に着目した手法は、休眠遺伝子の発現を誘導し、従来の培養方法では取得困難な新規天然物の効率的な発見に有力な手法になりうる事が期待されるが、天然物探索に応用された例は、国内では全くなく、国外でもほとんどないという状況であった。我々は、予備実験により、数種の昆虫寄生糸状菌に対して、ヒ

ストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を添加することで、それらの二次代謝が活性化され、数種の新規化合物の取得に成功した。エピジェネティック制御に基づく手法を、幅広い糸状菌に適応可能な汎用性の高い手法へと最適化することで、多様な新規有用物質の取得につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、糸状菌に潜在する未利用生合成遺伝子をエピジェネティック (後天的) に発現させる以下の2つの方法を確立し、医薬品開発に繋がる新規有用天然物を創出することを目的とする。

- (1) DNA メチル化酵素阻害剤と HDAC 阻害剤を用いた新規物質探索法。
- (2) 糸状菌における *Aspergillus nidulans* 由来 LaeA 大量発現系を用いた新規物質探索法。

3. 研究の方法

(1) 酵素阻害剤を用いた化学的手法の開発

① 各種阻害剤の最適条件の設定
各エピジェネティックな化学修飾酵素阻害剤 (図1) の有効濃度および使用方法を検討し、二次代謝物の組成の変化を指標に最適条件を設定する。二次代謝物の変化は逆相 HPLC と TLC によって追跡する。使用方法についてはそれぞれの阻害メカニズムを考慮に入れて検討する。例えば、5-Azacytidine による DNA メチル化の阻害は複製された DNA に対するメチル化の維持を阻害することが知られており、細胞分裂毎にメチル化 DNA の割合が減少することを考慮する必要がある。また、選択性の異なる酵素阻害剤を用いることで様々な変化が期待できる。各々の最適条件を設定後、阻害剤のコンビネーションによる有効性についても検討する。

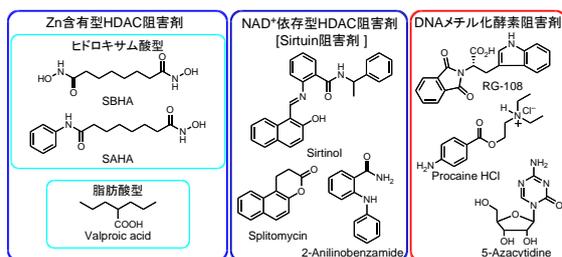


図1. エピジェネティック酵素阻害剤

② 阻害剤による二次代謝物組成の変化とエピジェネティックな化学修飾変化の関連付け

酵素阻害剤を作用させた菌のメチル化 DNA およびヒストンアセチル化の量的変化を測定し、阻害剤による二次代謝物の組成の変化とエピジェネティックな化学修飾変化を関連づける。メチル化 DNA の定量にはメチル化

感受性制限酵素もしくはメチル化依存性制限酵素を用いた手法により、またアセチル化ヒストンの変化は抗体を用いたウエスタンブロット法により測定する。

③ 新規有用物質の探索

特異な生活環を有する昆虫寄生糸状菌や植物内生糸状菌、有用物質生産菌が多く属する *Chaetomium* 属菌を中心に探索を行い、多様な新規物質の取得を目指す。

(2) LaeA 大量発現系を利用する遺伝子工学的方法の開発

① *Aspergillus nidulans* 由来 laeA 高発現ベクターの作成

A. nidulans より laeA 遺伝子を取得し、高発現用ベクターに組み込む。耐性マーカーとして、ハイグロマイシン、ピアラホス、ピリチアミンを用いる laeA 高発現ベクターをそれぞれ作成し、導入する菌株に対して最も感受性が高い薬剤の耐性マーカーを選択可能にする。

② LaeA 大量発現株の作成およびその有用性の検討

①で作成したベクターを糸状菌に PEG (ポリエチレングリコール) 法を用いて導入する。宿主のゲノム上へは相同的組み替えによりランダムに導入する。薬剤耐性を指標に形質転換株取得する。形質転換株における laeA の発現量を確認する。その後、液体培養を行い、二次代謝物生産に与える影響を調べる。はじめは、laeA と高い相同性を示す遺伝子を有していることが明らかにされている、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属などの糸状菌を用いて大量発現株を作成し、二次代謝物組成の変化を調べ、本手法の有用性を確認する。変化を顕著に示した菌株は大量培養し、新規有用物質の取得を試みる。*A. nidulans* 由来の laeA でも相同性の高さヒストンメチル化の機能を考えると、異種の糸状菌においても十分機能すると考えられ。

4. 研究成果

(1) 酵素阻害剤を用いた化学的手法の開発
本研究により、幅広い糸状菌の二次代謝を活性化するのに有効な阻害剤の種類、濃度および添加方法を見出した。現在、この条件を参考とした研究が増えている。この条件を用いて、昆虫寄生糸状菌、植物内生糸状菌、*Chaetomium* 属菌をスクリーニングした結果、構造多様な新規天然物の取得に成功した。中には、新規骨格を有するものもあり、本手法の有用性を示すことができた。図2に得られた新規構造の一部を示す。

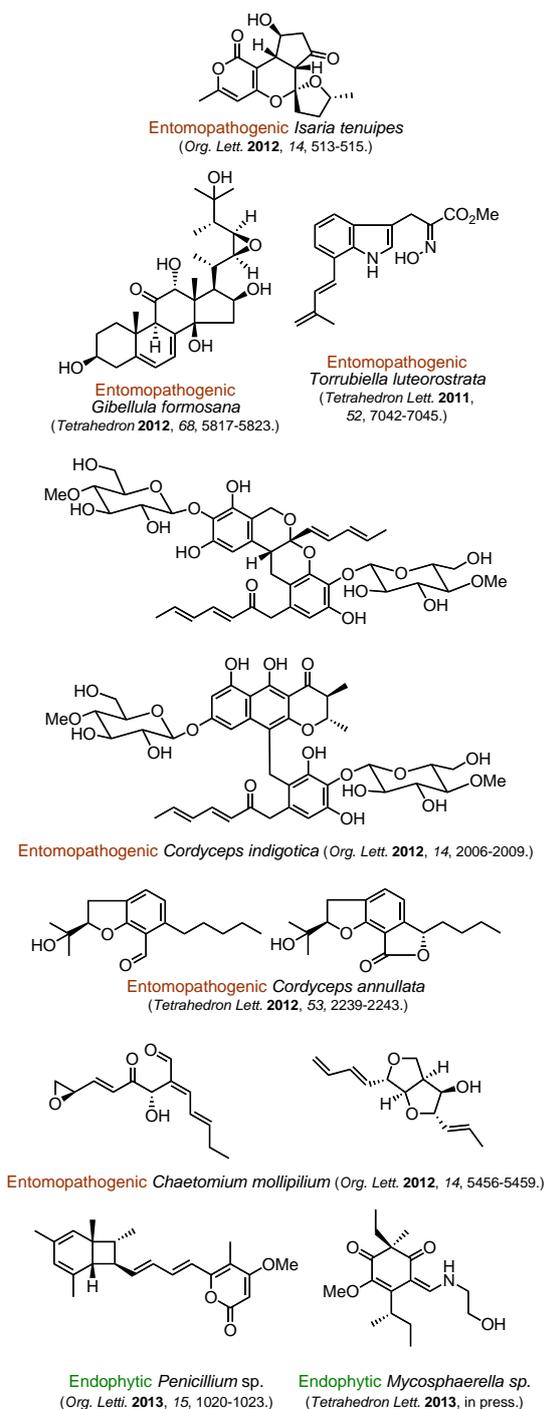


図2. 本研究により得られた新規化合物

(2) LaeA大量発現系を利用する遺伝子工学的当初の計画通り, LaeA過剰発現により糸状菌二次代謝が活性化されることは確認できたが, 新規物質の取得には至っていない。より多くの遺伝子の発現を変動させ, 新規物質の取得に繋げるために, LaeAと複合体を形成し, 二次代謝制御に関わることが示唆されている因子を共発現させるなどの検討を行う必要がある。

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 14 件)

1. T. Asai, S. Otsuki, T. Taniguchi, K. Monde, K. Yamashita, H. Sakurai, T. Ozekid, Y. Oshima, Structures and absolute configurations of short-branched fatty acid dimers from an endophytic fungus of *Aloe arborescens*. *Tetrahedron Lett.* **2013**, in press. (査読有). doi: 10.1016/j.tetlet.2013.04.063
2. T. Asai, S. Otsuki, H. Sakurai, T. K. Yamashita, T. Ozekid, Y. Oshima, Benzophenones from an Endophytic Fungus, *Graphiopsis chlorocephala*, from *Paeonia lactiflora* Cultivated in the Presence of an NAD⁺-Dependent HDAC Inhibitor. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2058-2061. (査読有). doi: 10.1021/ol400781b
3. T. Asai, D. Luo, K. Yamashita, Y. Oshima, Structures and Biomimetic Synthesis of Novel α -Pyrone Polyketides of an Endophytic *Penicillium* sp. in *Catharanthus roseus*. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1020-1023. (査読有). doi: 10.1021/ol303506t
4. Y. M. Chung, C. K. Wei, D. W. Chuang, M. E. Shazly, C. T. Hsieh, T. Asai, Y. Oshima, T. J. Hsieh, T. L. Hwang, Y. C. Wu, F. R. Chang. An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3866-3872. (査読有). doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.004
5. 浅井禎吾, 大島吉輝, 糸状菌二次代謝のエピジェネティック制御と天然物探索. *化学と生物*, **2013**, *1*, 13-21. (査読有)
6. T. Asai, S. Morita, T. Taniguchi, K. Monde, H. Sakurai, T. Ozeki, Y. Oshima. Structural Diversity of New C₁₃-Polyketides Produced by *Chaetomium mollipilium* Cultivated in the Presence of Histone Deacetylase Inhibitors. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5456-5459. (査読有). doi: 10.1021/ol302539s
7. T. Asai, Y. Nakamura, Y. Hirayama, K. Ohyama, Y. Fujimoto, Cyclic glycolipids from glandular trichome exudates of *Cerastium glomeratum*, *Phytochemistry* **2012**, *82*, 149-157. (査読有). doi: 10.1016/j.phytochem.2012.07.001
8. T. Asai, Y. M. Chung, H. Sakurai, T. Ozeki, F. R. Chang, Y. C. Wu, K. Yamashita, Y. Oshima, Highly oxidized

- ergosterols and isariotin analogs from an entomopathogenic fungus, *Gibellula formosana*, cultivated in the presence of epigenetic modifying agents. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 5817-5823. (査読有). doi: 10.1016/j.tet.2012.05.020
9. T. Asai, Y. Hirayama, Y. Fujimoto, Epi- α -bisabolol 6-deoxy- β -D-gulopyranoside from the glandular trichome exudate of *Brillantaisia owariensis*. *Phytochemistry Lett.* **2012**, *5*, 376-378. (査読有) doi: 10.1016/j.phytol.2012.03.006
 10. T. Asai, T. Yamamoto, Y. Oshima, Aromatic Polyketide Production in *Cordyceps indigotica*, an Entomopathogenic Fungus, Induced by Exposure to a Histone Deacetylase Inhibitor. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2006-2009. (査読有). doi: 10.1021/ol3
 11. T. Asai, D. Luo, Y. Obara, T. Taniguchi, K. Monde, K. Yamashita, Y. Oshima, Dihydrobenzofurans as cannabinoid receptor ligands from *Cordyceps annullata*, an entomopathogenic fungus cultivated in the presence of an HDAC inhibitor. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2239-2243. (査読有) doi: 10.1016/j.tetlet.2012.02.088
 12. T. Asai, Y. M. Chung, H. Sakurai, T. Ozeki, F. R. Chang, K. Yamashita, Y. Oshima, Tenuipyronone, a Novel Skeletal Polyketide from the Entomopathogenic Fungus, *Isaria tenuipes*, Cultivated in the Presence of Epigenetic Modifiers. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 513-515. (査読有) doi: 10.1021/ol203097b
 13. T. Asai, T. Yamamoto, Y. M. Chung, F. R. Chang, Y. C. Wu, K. Yamashita, Y. Oshima, Aromatic polyketide glycosides from an entomopathogenic fungus, *Cordyceps indigotica*. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 277-280. (査読有). doi: 10.1016/j.tetlet.2011.10.013
 14. T. Asai, T. Yamamoto, Y. Oshima, Histone deacetylase inhibitor induced the production of three novel prenylated tryptophan analogs in the entomopathogenic fungus, *Torrubiella luteostrata*. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 7042-7045. (査読有). doi: 10.1016/j.tetlet.2011.10.020
- [学会発表] (計 12 件)
1. 山本崇史, 浅井禎吾, 谷口透, 門出健次, 山下幸和, 大島吉輝. “HDAC 阻害剤を用いた多様な糸状菌ポリケチド類の創出—*Chaetomium indicum* 由来スピロラクトン型新規ポリケチド類の単離構造決定”日本薬学会第 133 回春季年会, 横浜, 2013 年 3 月 28 日, 横浜.
 2. 森田峻太郎, 浅井禎吾, 谷口透, 門出健次, 櫻井博章, 尾関智二, 山下幸和, 大島吉輝. “糸状菌二次代謝を活性化する NAD⁺依存型 HDAC 阻害剤の探索とそれを用いた新規天然物の創出, 日本薬学会第 133 回春季年会, 2013 年 3 月 28 日, 横浜.
 3. 浅井 禎吾, 山本 崇史, 森田 峻太郎, 白田 直樹, 大島 吉輝. “エピジェネティクスを制御する化学修飾酵素阻害剤を用いた多様な糸状菌ポリケチドの創生”第 54 回天然有機化合物討論会, 2012 年 9 月 19 日, 東京.
 4. 白田直樹, 浅井禎吾, 大島吉輝. “*Chaetomium indicum* が生産する新規ポリケチドの生成遺伝子の同定および HDAC 阻害剤を用いた発現制御に関する研究”第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日, 青森.
 5. 森田峻太郎, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝. “NAD⁺依存型 HDAC 阻害剤を用いた新規ポリケチドの創出”第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日, 青森.
 6. 浅井禎吾, Chung Yu-Ming, 櫻井博章, 尾関智二, 山下幸和, 大島吉輝. “エピジェネティック制御を利用した新規有用物質の探索; 昆虫寄生糸状菌 *Isaria tenuipes* 由来新規四環式ポリケチド tenuipyronone の単離構造決”日本薬学会第 132 回春季年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌.
 7. 山本崇史, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝. “HDAC 阻害剤を用いた昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps indigotica* および植物内生糸状菌 *Chaetomium indicum* 由来新規芳香属ポリケチドの創出”日本薬学会第 132 回春季年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌.
 8. 羅丹, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝. “エピジェネティック制御を利用した新規有用物質の探索; 昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps annullata* の生産する新規ジヒドロベンゾフラン類の構造と CB 受容体アゴニスト活性”日本薬学会第 132 回春季年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌.
 9. 羅丹, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝. “HDAC 阻害剤を利用した昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps annullata* 由来新規ジヒドロベンゾフラン類の単離構造決定”第 50 回日本薬学会東北支部大会, 2011 年 10 月 30 日, 仙台.
 10. 山本崇史, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝. “エピジェネティックな酵素阻害剤を利用した昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps indigotica* 由来新規芳香族ポリケチド類の単離構造決定”第 50 回日本薬学会東北

支部大会, 2011 年 10 月 30 日, 仙台.

11. 浅井禎吾, 山本崇史, Chung Yu-Ming, 羅丹, 森田峻太郎, 白田直樹, 山下幸和, 大島吉輝. “エビジェネティック制御に基づく新規二次代謝物の創出”第 53 回天然有機化合物討論会, 2011 年 9 月 27 日, 大阪.
12. 浅井禎吾, 山本崇史, 鐘ユーミン, 森田峻太郎, 羅丹, 山下幸和, 大島吉輝. “低分子阻害剤を用いたエビジェネティック制御に基づく糸状菌由来新規二次代謝物の探索” 第 9 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2011 年 5 月 12 日, 東京.

[その他]

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 禎吾 (ASAI TEIGO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号 : 60572310