

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 4 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880025

 研究課題名（和文）分野横断型アプローチによる非モデル糸状菌からの
新規二次代謝産物の獲得

 研究課題名（英文）Methodology development for acquisition of a numerous number of
new natural products from filamentous

研究代表者

中沢 威人（TAKEHITO NAKAZAWA）

静岡県立大学・大学院薬学研究科・客員共同研究員

研究者番号：80608141

研究成果の概要（和文）：

糸状菌（カビ・キノコ）由来の巨大二次代謝産物生合成遺伝子を再構築し、出芽酵母を用いて異種生産することに成功した。この中には、トリコスタチン A の処理によって、活性化する生合成遺伝子も含まれている。さらに非モデル糸状菌の複数種において、分子遺伝学実験システムを構築し、生合成クラスターを負に制御する機構を不全化させることで、休眠経路を活性化し多数の天然物を獲得した。その中には、新規化合物も含まれている。

研究成果の概要（英文）：

A number of biosynthetic genes for fungal secondary metabolites were successfully reconstructed in yeast cells, and I successfully obtained natural products biosynthesized by them through heterologous production in yeast. I also developed molecular genetics systems for biosynthetic studies in some filamentous fungi. And I obtained a number of natural products, some of which are new/novel, through disruptions of genes involved in regulation of biosynthetic genes. I then found that several secondary metabolites are involved in regulation of transcription and sexual development (formation of sexual spores) in *Chaetomium globosum*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：糸状菌・酵母・生合成・異種発現

1. 研究開始当初の背景

近年の多様な糸状菌種のゲノム解読が行われた結果、ゲノム上に膨大な数の二次代謝産物生合成遺伝子が休眠状態で存在していることが明らかとなった。そのような生合成

遺伝子を活性化することが出来れば、今までにない数の有用化合物の獲得が実現する。しかし、それを実現する汎用的かつ網羅的なアプローチは確立されていなかった。

2. 研究の目的

休眠生合成遺伝子を活性化し、それらから生合成される天然物を獲得する方法論について、ごく限られた少数の種ではなく、今まで遺伝子操作が不可能であった幅広い糸状菌に対して適応可能な手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 低分子化合物を用いてエピジェネティック状態を人為的に改変し、遺伝子組み換えを伴わない形で生合成遺伝子を転写レベルで活性化した

(2) 活性化した生合成遺伝子について、その巨大な cDNA を出芽酵母内にて再構築・高発現させた

(3) 非モデル糸状菌の分子遺伝学実験システムを構築し、膨大な数の生合成遺伝子を不活性化に関与する分子機構を不全化させた

(4) 二次代謝産物の活性について、糸状菌自身の形態形成への関わりに絞って明らかにした

4. 研究成果

(1) *Chaetomium globosum*, *Botrytis cinerea*, *Coprinopsis cinerea* において、トリコスタチン A などを添加した場合に活性化する生合成遺伝子を発見し、幾つかについては全長 cDNA を獲得した

(2) 出芽酵母において、上記生合成遺伝子を発現させ、生合成産物の異種生産する汎用システムを構築した。得られた化合物の構造決定を行った

(3) *Chaetomium globosum*, *Botrytis cinerea* において、様々な制御因子類をコードする遺伝子を破壊し、それらにおいて生合成が活性化された天然物を獲得・構造決定を行った。続いて、それらの生合成遺伝子の特定を行った。

(4) *Chaetomium globosum* において、有性胞子生産に必須な二次代謝産物 (*Chaetoglobosin* 類) および、転写レベルで他の二次代謝産物の生合成を転写レベルで制御する活性をもつもの (*aureonitol*, *chaetoviridin* 類) を発見した

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 6 件)

① Ishiuchi K., Nakazawa T., Ookuma T., Sugimoto S., Sato M., Tsunematsu Y., Ishikawa N., Noguchi H., Hotta K., Moriya H., Watanabe K. (2012) Establishing a new methodology for genome mining and

biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics. *ChemBioChem*, 13: 846-854. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201100798>

② Nakazawa T., Ishiuchi K., Praseuth A., Noguchi H., Hotta K., Watanabe K. (2012) Overexpressing transcriptional regulator in *Aspergillus oryzae* activates a silent biosynthetic pathway to produce novel polyketide. *ChemBioChem*, 13: 855-861. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200107>

③ Tsunematsu Y., Ichinoseki S., Nakazawa T., Ishikawa N., Noguchi H., Hotta K., Watanabe K. (2012) Overexpressing transcriptional regulator in *Chaetomium globosum* activates a silent biosynthetic pathway: Evaluation of shanorellin biosynthesis. *J. Antibiot.*, 65:377-380. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2012.34>

④ 中沢威人, 恒松雄太, 石川格靖, 渡辺賢二 (2012) 生合成遺伝子クラスターの高度強制発現による合成生物学が拓く有用天然物の創製, 生物工学会誌, *日本生物工学会*, 90: 289-292. https://www.sbj.or.jp/wp-content/.../9006_tokushu-1_3.pdf

⑤ Ando Y., Nakazawa T., Oka K., Nakahori K., Kamada T. (2013) *Cc.snf5*, a gene encoding a putative component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, is essential for sexual development in the agaricomycete *Coprinopsis cinerea*.

Fungal Genet. Biol., 50: 82-89.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.010>

⑥ Ishiuchi, K., Nakazawa, T., Yagishita, F., Mino, T., Noguchi, H., Hotta, K., Watanabe, K. (2013) Combinatorial Generation of Complexity by Redox Enzymes in the Chaetoglobosin A Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, accepted on Apr. 24th. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ja402828w>

[学会発表] (計 23 件)

① Nakazawa T., Ishiuchi K., Hotta K., Noguchi H., Moriya H., Watanabe K. (2011) Establishing a New Methodology for Genome Mining and Biosynthesis of Natural Products Through a Fungal Molecular Genomics. *4th International Conference on Health and Longevity Sciences* (October 21, 2011, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

② Nakazawa T., Ishiuchi K., Hotta K., Noguchi H., Moriya H., Watanabe K. (2011) Establishing a New Methodology for Genome Mining and Biosynthesis of Natural Products Through a Fungal Molecular Genomics.

8th AFMC International Medical Chemistry Symposium (November, 29-December, 2, 2011, Keio Plaza Hotel Tokyo, Japan) p. 102

③ Nakazawa T., Ookuma T., Sugimoto S., Ichinoseki S., Gotanda Y., Ishikawa N., Tsunematsu Y., Ishiuchi K., Noguchi H.,

Watanabe K. (2012) Biosynthesis of Natural Products Through a Fungal Molecular Genetics. *11th European Conference on Fungal Genetics* (March 30 and 31 and April 2, 2012, Philipps-Universität Marburg, Germany) p. 243

④ Nakazawa T., Ishiuchi K., Sugimoto S., Gotanda Y., Sato M., Noguchi H., Watanabe K. (2013) Molecular genetics studies on secondary metabolism in *Chaetomium globosum* reveal involvement of aureonitol and chaetoglobosins in gene regulation and sexual reproduction. *27th Fungal Genetics Conference* (March 12-17, 2013, Asilomar conference center, CA, USA) pp. 136

⑤ 中沢威人、石内勘一郎、渡辺賢二
A. *oryzae* からの不活性型二次代謝クラスター活性化と生合成産物の構造解析
第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス
2011 年 11 月 16-17 日 東京大学弥生講堂にて
pp. 33

⑥ 中沢威人、杉本覚、五反田康孝、野口博司、渡辺賢二
二次代謝研究を指向した糸状菌 *Chaetomium globosum* の分子遺伝学実験システムの整備
日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 22-26 日 京都女子大学にて
2A06a08

⑦ 中沢威人、石内勘一郎、五反田康孝、佐藤道大、杉本覚、野口博司、渡辺賢二
有用天然物の探索および生合成遺伝子クラスターの特定を目的とした糸状菌 *Chaetomium globosum* *veA* 遺伝子破壊株の作成

日本生薬学会第59回年会 2012年9月
17-18日 かずさアークにて pp. 71

⑧ 中沢威人、石内勘一郎、杉本覚、五反田
康孝、佐藤道大、野口博司、渡辺賢二

Chaetomium globosum における天然物生合成
遺伝子研究からみえてきた特定二次代謝産
物による遺伝子発現制御および有性生殖へ
の関与

第12回糸状菌分子生物学コンファレンス
2012年11月12-13日 ウィンクあいちにて
pp. 31

⑨ 中沢威人、五反田康孝、石内勘一郎、野
口博司、渡辺賢二

糸状菌 *Chaetomium globosum* における天然物
生合成の人為的変動

第7回日本ゲノム微生物学会年会
2013年3月8-10日 長浜バイオ大学にて
pp. 57

⑩ 中沢威人、五反田康孝、石内勘一郎、野
口博司、渡辺賢二

形態形成変異を指標とした、糸状菌
Chaetomium globosum における休眠生合成遺
伝子の活性化変異株のスクリーニング

日本農芸化学会 2013年度大会
2013年3月24-28日 東北大学にて
C22p13

⑪ 中沢威人、五反田康孝、石内勘一郎、野
口博司、渡辺賢二

形態形成変異を指標とした、糸状菌
Chaetomium globosum における休眠生合成遺
伝子の活性化変異株のスクリーニング

日本薬学会第133年会 2013年3月27-30日
パシフィコ横浜にて 280-am01

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 威人 (TAKEHITO NAKAZAWA)

静岡県立大学・大学院薬学研究科

客員共同研究員 (2012年度は、特任助教)

研究者番号: 80608141

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし