

糸状菌ゲノム情報にもとづく有用二次代謝産物生合成系の検索とその発現・生産系の開発

●藤井 勲

岩手医科大学薬学部

<研究の目的と進め方>

糸状菌は、ペニシリンなどの抗生物質生産菌として、また、ヒトを含む動植物に重篤な病害をもたらす病原菌としても重要な微生物である。*Aspergillus fumigatus*、*Magnaporthe grisea* はそれぞれヒトアスペルギルス症、イネいもち病の原因菌であり、その克服を目的として全遺伝子情報の解析が進められた。また、日本の発酵産業の主役である麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム解析も完了している。興味深いことに、これら菌株には極めて多数の二次代謝産物生合成遺伝子が存在しており、例えば、*M. grisea* においては、23 個のポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子が、*A. oryzae* においては 30 個の PKS 遺伝子の存在が推定されている。しかし、そのほとんどは機能未確認である。また、ポリケタイド化合物以外にも、非リボソーム型ペプチドやテルペン類、アルカロイドなど、極めて多様な二次代謝産物の生合成遺伝子の存在が推定される。また、地球上に生息する真菌類の種は少なくとも 150 万種と見積もられており、その多様性は、植物やバクテリアを遙かに凌駕しており、しかも、そのわずか 5% が既知であることから、開拓すべき生物資源として、糸状菌は極めて重要である。そこで、本研究においては、ゲノム情報や、生合成遺伝子間の相同性にもとづき、糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子、特に我々が主な研究対象としてきたポリケイド化合物の生合成遺伝子を中心に検索し、その発現、機能同定を行うとともに、異種発現系を利用した新規有用化合物生産系の開発へと展開することを目的とする。

<2008 年度の研究の当初計画>

1) *A. oryzae* ポリケタイド合成酵素単独発現系の生産物の解析

糸状菌を宿主として α -アミラーゼプロモーターで誘導発現できる発現プラスミドを全ての *A. oryzae* PKS について作製し、形質転換体の生産化合物の解析を進める。この単独発現系の解析を終了させ、発現産物が認められるものについては生産化合物を単離・同定する。また、生産が認められないものについては、遺伝子の配列、形質転換体での mRNA の発現などを確認する。mRNA やタンパクの発現などに問題が無い場合には、2) で確立する多遺伝子同時誘導発現システムを用いて、クラスター内の他の遺伝子との共発現などを検討する。

2) 多遺伝子同時誘導発現システムの確立

PKS 反応のスターターなどに特殊な基質が必要な場合には、単独 PKS の発現では化合物の生産が認められないことが予想される。また、糸状菌においても、生合成遺伝子がクラスターを構成していることから、クラスターとしての機能を明らかにするためには多遺伝子同時誘導発現システムの確立が必要であり、*A. fumigatus* の DHN-メラニン生合成系、ジャガイモ夏疫病菌ソラナピロン生合成系をモデルとして、PKS 遺伝子とそれ以降の生合成遺伝子を順次導入した多遺伝子同時誘導発現プラスミドを構築し、宿主糸状菌に導入し、生合成系の再構成を検討する。

3) *A. oryzae* ポリケタイド生合成クラスターの機能解明

多遺伝子同時誘導発現システムの有用性が実証されれば、クラ

スター内 PKS の共発現などを試み、芳香族型、還元型、ハイブリッド型 PKS/NRPS における、それぞれの生合成中間体、最終産物の生産と同定に適用する。

4) ゲノム情報からの二次代謝産物生合成遺伝子の機能解析

ゲノムデータベースが公開されている菌株の PKS について、高度に保存された縮合酵素領域をベースに、BLAST サーチを行い、PKS 遺伝子を検索する。ヒットした配列の上流、下流を検索し、生合成遺伝子クラスターの全塩基配列情報を取得する。その中から対象とするクラスターを選択して機能解析を進める。

5) 既知有用化合物の生合成遺伝子の探索と機能解析

ガン細胞分化誘導活性をもつラディシコール生産菌や、強い微小管重合阻害活性を示すフォモプシジン生産菌などを対象として引き続き、生合成遺伝子のクローニングを試みる。

<2008 年度の成果>

1) *A. oryzae* タイプ I 型 PKS 遺伝子の機能解析

前年度までに *A. oryzae* RIB40 株のゲノム解析から見出されたタイプ I 型 PKS 遺伝子、芳香族型 *Ao11-113* の 13 種、還元型 *Ao21-212* の 12 種、ペプチド合成酵素とのハイブリッド型 (PKS/NRPS) *Ao31-33* の 3 種について、糸状菌発現プラスミドの構築をほぼ完了し、発現用宿主である *A. oryzae* M-2-3 株に形質転換・導入、その生産化合物の同定を進めてきた。化合物生産が認められた PKS は芳香族型の一部であったため、それ以外の PKS について、再度、形質転換体の取得、ゲノムへの PKS 遺伝子の組込の確認を進めている。その結果、正常な組込が起きていない形質転換体がかなりの割合で生じていることが認められた。また、複数の PKS がゲノム上で遺伝子クラスターを構成しているものについては、その共形質転換体の取得と生産化合物の分析を進めている。

RIB40 株には全長 PKS/NRPS をコードする *Ao31-33* に加え、一部欠失のある PKS/NRPS 遺伝子が存在している。周辺遺伝子情報の検討から、その 1 つが、元々はマイコトキシンとして知られるシクロピアゾン酸 (CPA) の生合成に関わっていたことが推定された。ただし、RIB40 株は CPA を生産しない。そこで、*A. oryzae* の CPA 生産株 NBRC4177 と比較したところ、生産株では完全長の PKS/NRPS をコードする ORF を持つこと、また、CPA 生産株において、この遺伝子を破壊すると CPA 生産能が失われることから、この遺伝子が CPA 生合成に関与することを確認した。次いで、*A. oryzae* のゲノム情報をもとに CPA の生合成遺伝子クラスターを CPA 生産菌 *Aspergillus flavus* のゲノムに見出した。これを確認するため、*A. flavus* の対応する PKS/NRPS 遺伝子 *cpaA* を α -アミラーゼプロモーター下に *A. oryzae* で発現させたところ、CPA 生合成前駆体であるシクロアセトアセチルトリプトファン (cAATrp) の生産が確認された。次いで、cAATrp にプレニル側鎖を導入するプレニル転移酵素をコードすると予想した *cpaB* 遺伝子を *cpaA* と共発現させたところ、 β -CPA と推定される化合物の生産が認められ、現在、その同定を

進めている。

2) 生合成遺伝子クラスターの異種再構成

現在用いている糸状菌発現系は、PKSの機能同定においては極めて有用な発現系であるが、形質転換などに時間を要すること、ゲノム組込み型であるため、導入した遺伝子の組込み位置やコピー数の制御は困難である。そこで、酵母を宿主とした糸状菌PKSの発現系を構築し、種々の選択マーカーを利用することにより酵母内で糸状菌生合成遺伝子クラスターの再構成系の確立を進めている。再構成のターゲットとして、*A. fumigatus*のヒトへの感染要因であるDHN-メラニンの生合成系を取り上げ、PKS遺伝子 *alb1*、polyketide-shortening 酵素遺伝子 *ayg1*、hydroxynaphthalene 還元酵素 *arp2*、脱水酵素遺伝子 *arp1* を順次導入し、各反応段階の生成物の解析を行ってきた。これまでに酵母発現系で *Arp2* の機能的発現が認められず、生合成反応を進めることができなかった。そこで、イネいもち病菌 *M. grisea* のDHN-メラニンの生合成系で対応する遺伝子 *hnr* を *arp2* の代わりとして導入することを試みた。その結果、*Alb1* PKSの産物であるnaphthopyrone YWA1が順次、tetrahydroxynaphthalene、scytalone、trihydroxynaphthalene、1,8-dihydroxynaphthaleneへと変換される再構成系を酵母にて構築することができた。

A. fumigatus のDHN-メラニンの生合成系と関連して、ヒトの黒色真菌症原因菌 *Wangiella dermatitidis* のメラニンの生合成系についても検討し、*W. dermatitidis* のPKS遺伝子 *WdPKS* を *A. oryzae* で発現させ、その生成物がヘプタケタイドであるacetyl-tetrahydroxynaphthaleneであることを同定した。また、そのacetyl基は、*A. fumigatus* の *Ayg1* のhomologである *Wdyg1* により加水分解的に切断され、DHN-メラニン生合成の共通の前駆体であるtetrahydroxynaphthaleneへと変換されると考えられ、糸状菌のDHN-メラニン生合成において、PKSにより直接ペンタケタイドであるtetrahydroxynaphthaleneが生成する経路、ヘキサケタイドであるacetyl-tetrahydroxynaphthaleneを経る経路、ヘプタケタイドであるnaphthopyrone YWA1を経る経路、の少なくとも3つの異なる経路が存在することが明らかになった。

3) 生合成鍵酵素の機能解析

Aspergillus terreus の6-methylsalicylic acid (6-MSA) 合成酵素ATXについて、酵母発現系を構築し、その機能解析を進めてきた。これまでに、N末欠失体とC末欠失体の酵母内共発現系の解析により、2つのサブユニット間相互作用と活性保持のために必要な最小領域 Inter Domain を同定し、ATXの各活性中心ドメインである縮合酵素KS、アシル基転移酵素AT、脱水酵素DH、還元酵素KR、アシルキャリアープロテインACPへの変異導入実験を行ってきた。その中で、KRによる還元を受けて生成した還元中間体の水酸基を脱水すると考えられていたDHの変異体DHmで生成物が確認されなかったことから、DHが中間体の脱水反応以外の機能をもつ可能性、特に生成物のACPからのreleaseなどに関与する可能性について検討した。まず、ATXを大腸菌において活性型として発現させ、アフィニティーカラムに供することで精製ATXを調製する系を確立した。次いで、[2-¹⁴C] malonyl-CoAを含む基質混合液と、野生型ATXおよびDHmをそれぞれ反応させたところ、DHmタンパクのみが¹⁴C標識され、一方、野生型ATX反応溶液からは¹⁴C標識6-MSAが遊離された。この結果から、DHの反応が起こらないと6-MSAは遊離せず、中間体が酵素に結合したままになることが明らかとなった。中間体が結合したDHmの化学的加水分解反応により6-MSAが検出され、DHm結合中間体はテトラケタイドであり、ATXの反応においてDH様ドメインの関与なしにテトラケタイド中間体の形成まで反応が進行することが確認された。この結果はまた、DHが

酵素から生成物を遊離するための機能ドメインであることを示唆しており、現在さらに検討中である。

4) ゲノム情報からの二次代謝産物生合成遺伝子の機能解析

ゲノムデータベースが公開されている *A. fumigatus* や *A. terreus* などからも、ポリケタイド関連生合成遺伝子クラスターの検索と機能解析を進めている。

<国内外での成果の位置づけ>

糸状菌のゲノムプロジェクトは、現在、100以上の菌株について全世界で進められており、膨大な配列情報が蓄積されてきている。糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子、特に本研究で中心としているPKS、中でも糸状菌に見られるタイプI繰返し型PKS遺伝子については、相同性検索からPKS遺伝子であるとアノテーションすることは比較的容易ではあるが、実際の機能、PKS反応生成物を推定することは困難であり、本研究で進めているようにPKS遺伝子を発現させ、生産化合物を化学的に同定していかなければならない。世界的にもこのような観点から研究を進めているグループはほとんどない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

糸状菌のゲノム情報増大のスピードに比し、本研究で主要な研究対象としているPKSについて、発現プラスミドの構築、宿主糸状菌の形質転換、誘導培養、生産化合物の分析、単離、構造決定など、実験的に個々のPKS機能を同定するにはかなりの時間を要し、また、*A. oryzae* PKSの発現においても、形質転換体で必ずしも期待通りにPKS産物が認められないことから、その原因を確認しながら解析を進めていく必要がある。

<今後の課題>

糸状菌を宿主としてPKS遺伝子を発現させることにより、直接、化合物レベルでその機能を解析することが可能になり、また、組込んだ遺伝子も安定に維持されるなど、物質生産系としても有用であることを示してきたが、これまでPKS産物として同定できたもののほとんどはマイコトキシンもしくは病原性に関わるメラニン生合成系の化合物であったことから、今後は有用物質へと展開できるPKSも見出していきたい。また、糸状菌における生合成クラスターの多遺伝子発現を確立し、その有用性を示すことが重要な課題である。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0810091116

Wheeler, M. H., Abramczyk, D., Puckhaber, L. S. Naruse, M., Ebizuka, Y., Fujii, I., Szaniszlo, P. J.: New biosynthetic step in the melanin pathway of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*: evidence for 2-acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene as a novel precursor. *Eukaryotic Cell*, 7, 1699-1711 (2008)

2. 0810091133

Tokuoka, M., Seshime, Y., Fujii, I., Kitamoto, K., Takahashi, T., Koyama, Y.: Identification of a novel polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS) gene required for the biosynthesis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 1608-1615 (2008)

3. 0806181136

Moriguchi, T. Ebizuka, Y., Fujii, I.: Domain-domain interaction in the iterative type I polyketide synthase ATX from *Aspergillus terreus*. *ChemBioChem*, 9, 1207-1212 (2008).