

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 個のポリケチド合成酵素 (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、ポリケチド化合物以外にも、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チ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。

<2007 年度の研究の当初計画>

1) 糸状菌二次代謝産物生合成遺伝子の検索

本研究において主な対象とする麹菌 *A. oryzae* などについて、引き続き PKS 遺伝子を初めとする二次代謝産物生合成遺伝子を検索する。糸状菌においては、生合成遺伝子がクラスターを構成していることから、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。

2) 生合成遺伝子のクローニングと発現系の構築

ゲノム情報から見出された PKS、NRPS、テルペン閉環酵素などについて、全長遺伝子を増幅し、組み換えを利用した Gateway 法などにより糸状菌発現ベクターに組み込み、発現プラスミドの構築をさらに進める。異種糸状菌を用いて発現させることにより、生産産物を単離・構造決定し、発現させた酵素の機能同定を展開する。

3) 生合成クラスター遺伝子の共発現による代謝産物の同定

前年度、ならびに今年度に発現、化合物が同定できた生合成初発酵素の遺伝子を含む生合成遺伝子クラスターについて、次段階以降の反応に関わると考えられる遺伝子についても、初発酵素遺伝子との共発現系を構築する。共発現により生成した代謝産物を順次同定し、最終的な二次代謝産物の同定を目指す。また、多段階に渡る二次代謝生合成反応の複数遺伝子共発現を可能とする発現ベクターの開発も並行して進める。また、*in vitro* 反応系を用いた各発現酵素の機能同定や、酵母などをホストとした効率のよい

発現系についても検討し、実験の迅速化を図る。

<2007 年度の成果>

1) 麹菌 *A. oryzae* タイプ I 型 PKS 遺伝子の機能解析

A. oryzae RIB40 株のゲノム解析から見出されたタイプ I 型 PKS 遺伝子について、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 種に分類し、RIB40 株ゲノムより数 kb から十数 kb の各 PKS 遺伝子全長を増幅し、Gateway 法を用いた糸状菌発現プラスミドの構築をほぼ完了した。これらを順次、発現用宿主である *A. oryzae* M-2-3 株に形質転換・導入している。これまでに、*Ao11* 形質転換体より、その主生産物が芳香族ノナケチドの topopyrone D とその PKS 反応副生成物である haematomone であると同定したが、これに加え、*Ao15*、*17*、*18* PKS についてその生産化合物を同定した。その結果、*Ao18* PKS は、胞子色素生合成前駆体であるナフトピロン YWA1 の合成酵素であること、*Ao15* PKS はオルセリン酸合成酵素であることが判明した。また、*Ao17* 形質転換体は、2 つの主生成物を与えたが、その単離、構造解析の結果、これらはいずれもヘプタケチドである citreoisocoumarin と alternariol であると同定した。両者は、炭素鎖長は同じであるものの閉環様式が全く異なっている。また、後者は、*Alternaria* 属糸状菌の生産するマイコトキシンとして報告されている化合物であり、現在でもその汚染が問題となっている。今回の結果から、*A. oryzae* がその生産能を潜在的に有することが確認された。

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が、その周辺遺伝子情報の検討から、本来はシクロピアゾン酸 (CPA) の生合成に関わっていたことが推定された。CPA は *Aspergillus flavus* や *A. oryzae* の一部菌株において生産が報告されているマイコトキシンである。そこで、RIB40 株の配列をもとに CPA 生産菌 *A. flavus* のゲノムデータベースを検索し、CPA 生合成に関わるとと思われる遺伝子クラスターを見出した。これを確認するため、*A. flavus* の対応する PKS/NRPS 遺伝子を上記 *Ao* PKS の発現と同様にして、*A. oryzae* で発現したところ、CPA 生合成前駆体の生産を確認した。現在、より詳細な解析を進めている。

2) ジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* の solanapyrone 生合成遺伝子クラスター

ゲノムプロジェクトは進められてはいないものの興味深い還元型ポリケチド化合物 solanapyrone を生産するジャガイモ夏疫病菌 *Alternaria solani* より、新規 PKS 遺伝子のクローニングと機能解析を進めてきたが、これまでにクローニングした 7 種の内の 1 つが、solanapyrone 生合成の PKS であることを確認することができた。まず、*Sol1* PKS の *A. oryzae* での発現により、その生産産物が solanapyrone 生合成の最初の前駆体である desmethylprosolanapyrone I であることを同定した。次いで、ゲノムウォーキングにより *sol* 生合成遺伝子クラスター 21 kb の全

塩基配列を決定し、このクラスターが solanapyrone 生合成に必要な各酵素をコードしていることを確認した。なかでも Diels-Alder 環化反応により solanapyrone のデカリン骨格生成を触媒する酸化酵素をコードすると予想された sol5 遺伝子を *A. oryzae* で発現させることにより、この酸化酵素 So5 が prosolanapyrone II から solanapyrone A への *exo*- 選択的な Diels-Alderase であることを確認した。現在、本酵素の精製とより詳細な特性化を進めている。

3) 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、ゲノム組み込み型であるため、導入した遺伝子の組み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。まず、*A. nidulans* のホスホパンテテイン転移酵素遺伝子 *npgA* を恒常的に発現し PKS をホロ型に活性化できる宿主酵母を作製した。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、これに PKS 遺伝子 *abl1*、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。その結果、Alb1 PKS の産物である naphthopyrone YWA1 が Arp1 によって angular 型に閉環・脱水した新規化合物を生成することを見出した。本化合物は、特異な青緑色を呈する *A. fumigatus* 胞子色素の重合前駆体であることも考えられ、更に解析を進めている。

4) 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いる。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 を同定したが、サブユニット間の相互作用をより詳細に検討するため、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 について、それぞれ変異導入実験を行った。その結果、KS、AT、ACP の変異体は活性を失うこと、KR 変異体はこれまでの報告と同様、triacetic acid lactone (TAL) を生成することをまず確認した。しかし、DH 変異体では生産物が確認されず、また、TAL を生産すると予想された DH-KR 共変異体においてもその生産は確認されなかった。この結果から、DH が中間体の脱水反応以外の機能をもつ可能性、例えば閉環に必要な *trans* 二重結合の *cis* への変換や、生成物の ACP からの release などに関与することが考えられ、現在、さらに検討中である。次いで、ここで作製した各変異体の共発現を試みたところ、KS 変異体と AT 変異体など、いずれの組み合わせにおいても 6-MSA 合成活性が再構成されることが確認された。さらに KS 変異体と KS のみ活性な多重変異体のような共発現においても 6-MSA 合成活性が再構成されることを確認し、4量体である ATX におけるサブユニット間相互作用の新たな高次構造モデルを提出した。(投稿中)

5) その他

マクロラクトン環に芳香環が融合した特徴的な炭素骨格と抗ガン作用などの活性を有する radicicol 生産菌 *Penicillium luteoaurantium* よりクローニングした新規 PKS 遺伝子、また、菌類と藻類の共生体である地衣類より初めて得られた PKS 遺伝子の発現、機能解析についても現在検討中である。

<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、生成化合物を化学的に同定していかねばならない。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する。そのため、現状では、ゲノム情報が利用できる *A. oryzae* 以外の糸状菌について、機能解析に着手するのが遅れているが、何とか研究を更に展開していきたいと考えている。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ものがあり、その原因についても、形質転換体における mRNA の安定性を含む発現レベル、ゲノムへの組み込み様式と組み込み位置、本来的に機能しない偽遺伝子である可能性などがあり、更に検討を要する。

<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、一般に糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子は遺伝子クラスターを構成しており、最終産物を生産させ、また、同定するためには、全生合成段階の遺伝子を同時に組み込み、発現させなければならない。現在、酵母を宿主として、このような多遺伝子発現による再構成系のモデルを構築しているが、糸状菌においても多遺伝子の同時誘導発現が可能な宿主—ベクターシステムを確立し、物質生産への有用性を示すことが今後の重要な課題の一つである。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0801281141

Chooi, Y.-H., Stalker, D.M., Davis, M.A., Fujii, I., Elix, J.A., Louwhoff, S.H.J.J., C. Lawrie, A.C.: Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semivivida*.

Mycological Research (In Press, Accepted Manuscript, Available online 15 September 2007)

2) 特許申請

1. 0801281233

ポリケタイドシンターゼ・ノンリボゾマーペプチドシンターゼ遺伝子

特願 2007-272465 発明者：徳岡 昌文，高橋 理，小山 泰二，藤井 勲，勢 康代