

真菌の潜在的生合成能力を用いた次世代物質生産法の確立

渡辺 賢二

(静岡県立大学 薬学研究科)

研究の目的

本研究では、分子遺伝学的手法が適応できない非モデル糸状菌から不活性型二次代謝産物生合成遺伝子を活性化させる方法を構築する。次に、それらの遺伝子を活用することによって、新規二次代謝産物を生合成する。その実現のために、分子遺伝学・分子生物学・天然物有機化学を含む異分野融合型の研究を行う。このような研究によって有用天然物の合成を目的としたシンセティックバイオロジーの確立に挑戦する。本研究によって最近得られた実験結果を踏まえ、まずは幅広い糸状菌種から機能未知二次代謝産物生合成遺伝子を活性化させる方法を検討する。次に、それらの cDNA の取得および異種発現を試み、化合物の *de novo* 合成を行う。続いて、得られた化合物の化学構造を決定する。

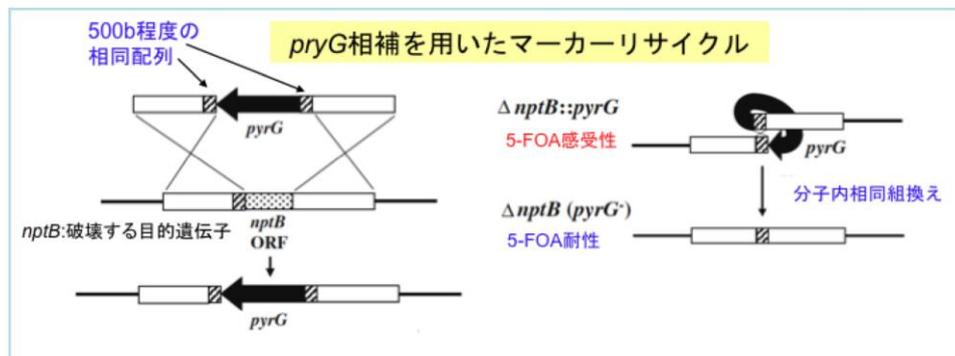
本研究目的が達成された場合、基礎研究・応用研究開発の両面に非常に大きな波及効果をもたらす可能性がある。膨大な数の新規二次代謝産物が得られることになるため、医薬品などの有用化合物を探索する新しい方法論となる。一方、実験室環境下で不活性化された二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターおよびそれらによって合成される化合物は、自然界における糸状菌の未知生命現象の制御に関わっている可能性がある。従って本研究は、糸状菌の生命現象を実験室内で人為的に制御できる化合物の発見にもつながると考えられる。例えば、糸状菌の有性生殖と二次代謝は深く関わっていることが示唆されている。そのため、*Aspergillus oryzae* をはじめとする不完全菌の有性世代の発見や、マツタケの人工栽培実現などに繋がる実験結果を生み出す可能性も含まれている。

方法

1. 高頻度で相同組換えを起こす変異体株の作製

これまでの研究によって、機能が未知であった天然物の生合成遺伝子を酵母細胞内で再構築し生合成産物を特定することを可能とする方法論を提示するに至った¹⁾。また、転写因子であると推定された遺伝子を発現することによって、遺伝子クラスターの一部を活性化することにも成功した²⁾。しかしながら上記手法では多くの場合、天然物の炭素骨格のみを生合成するにとどまるため、本来生体内で他の酵素によって修飾され誘導体へと導かれるような天然物を獲得することはできない。また、ある骨格構造を持つ化合物に関して *in silico* 解析によって修飾酵素遺伝子を的確に探し出すことは、これまでのところ困難である。様々な構造活性相関の研究結果から、炭素骨格のみよりもこのように修飾酵素によって誘導体へと変換された最終生成物の方が優れた生物活性を持つと予測される。従って、遺伝子クラスターを包括的に活性化しこれまでに獲得できなかった天然物を得る方法論が必要となった。その方法論を確立するためには、異種発現ではなく、不活性型の生合成遺伝子を持つオリジナルの糸状菌に対して直接的に分子遺伝学

的手法を用い不活性型遺伝子を活性化させることが最も効率的であると考えられる。そこで、約 60 個の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターをコードしていると推定されている糸状菌 *Chaetomium globosum*³⁾ の染色体に変異を導入することで、本菌株を簡便に遺伝子操作することができるモデル生物へと変換することを試みた。具体的には、非モデル系である本糸状菌の形質転換法を確立した後、相同組換えに関与する遺伝子 *ligD* を不活性化することによって相同組換え効率を飛躍的に向上させた。続いて、得られた変異体株 *C. globosum* の高い相同組換え能力を利用して、*pyrG* 遺伝子を不活性化した。*pyrG* がコードしている酵素は、オロト酸を UMP（ウリジン 5' - ーリン酸）に変換する活性を持つ。野生株は、ウラシル生合成経路の中間代謝物オロト酸のアナログである 5-フルオロオロト酸（5-FOA）を上記酵素活性によって 5-フルオロウリジンリン酸へ変換することができる。5-フルオロウリジンリン酸はチミン生合成酵素の強力な阻害剤であるため野生株は生育できない。しかし、*pyrG* 遺伝子破壊株は、このような変換反応を触媒することができないため 5-FOA を含む培地でも生育することができる。*pyrG* 遺伝子の両端に約 500bp ずつの同一塩基配列からなる相同組換え領域を加えカセットを構築した。次に、上記で作製した変異体株 *C. globosum* の染色体上の目的遺伝子にこのカセットを導入し破壊した。目的遺伝子の破壊が確認された後、破壊に用いられた *pyrG* 遺伝子も宿主の高い相同組換え能力によって遺伝子両端に連結された約 500bp の相同組換え領域で分子内相同組換えを起こし、染色体上から抜け落ちる。従って、何度でも繰り返し染色体を改変することができる。



2. 二次代謝産物生合成遺伝子の活性化による生産化合物の網羅的解析

上記で得られた高頻度で相同組換えを起こす変異体株を用い、ヘテロクロマチン構造の形成に関与し二次代謝産物の生合成制御因子と推定されている *laeA*、*veA* および *sptJ* の過剰発現および不活性化によって新規天然物を見出すことができると考えた。*laeA*、*veA* および *sptJ* の改変による手法では、特定の天然物を生合成する遺伝子クラスターを活性化する方法とは異なり、天然物化学として興味深い *C. globosum* にコードされた遺伝子クラスターを網羅的に活性化し、化合物生合成能力を飛躍的に高めることが期待できた。また、有望な新規化合物が得られた場合、化学構造から遺伝子クラスターを推定した後、さらに破壊することでクラスターを特定することも本変異体株によって可能となる。得られた遺伝子クラスターを用い、誘導體化および高生産化の研究も行うことができると考えられた。

結果および結論

染色体上にコードされている生合成遺伝子に変異などの導入によって、機能が失われていることを確認した。RT-PCR によって転写活性が低い生合成遺伝子を酵母宿主系によって発現させ天然物を単離することを試みた。代表的な二次代謝産物であるポリケタイド系天然物を生合成するポリケタイド合成酵素 (PKS) をコードしていると推定された遺伝子 CHGG_00542、CHGG_10128、および CC1G_05377 を発現することとした。CHGG の系統番号を持つ遺伝子群は、糸状菌である *C. globosum* のゲノム上にコードされ、一方 CC1G の系統番号を持つ遺伝子は、担子菌 (キノコ) である *Coprinopsis cinerea* のゲノム上にコードされている。これらの生合成遺伝子を酵母宿主系で発現できる発現ベクターへそれぞれ導入した。遺伝子の翻訳タンパク質は、C 末端にペプチドタグが付加される融合タンパク質として発現され、これを用いウエスタンブロッティングによって、酵母細胞内で発現することが確認された。得られた発現ベクターを用い酵母宿主系によって図 1 に示した化合物 1 - 4 の 4 種類のポリケタイド系天然物を生合成することに成功した。

そこで次に、上記で得られた高頻度で相同組換えを起こす *C. globosum* を用い本糸状菌にコードされている *laeA*、*veA* および *sptJ* を不活性化した後、得られた変異体株を培

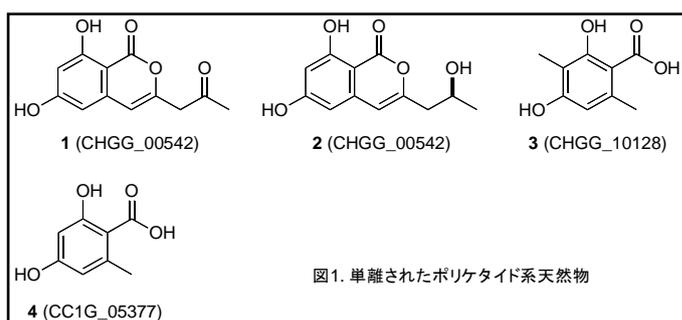


図1. 単離されたポリケタイド系天然物

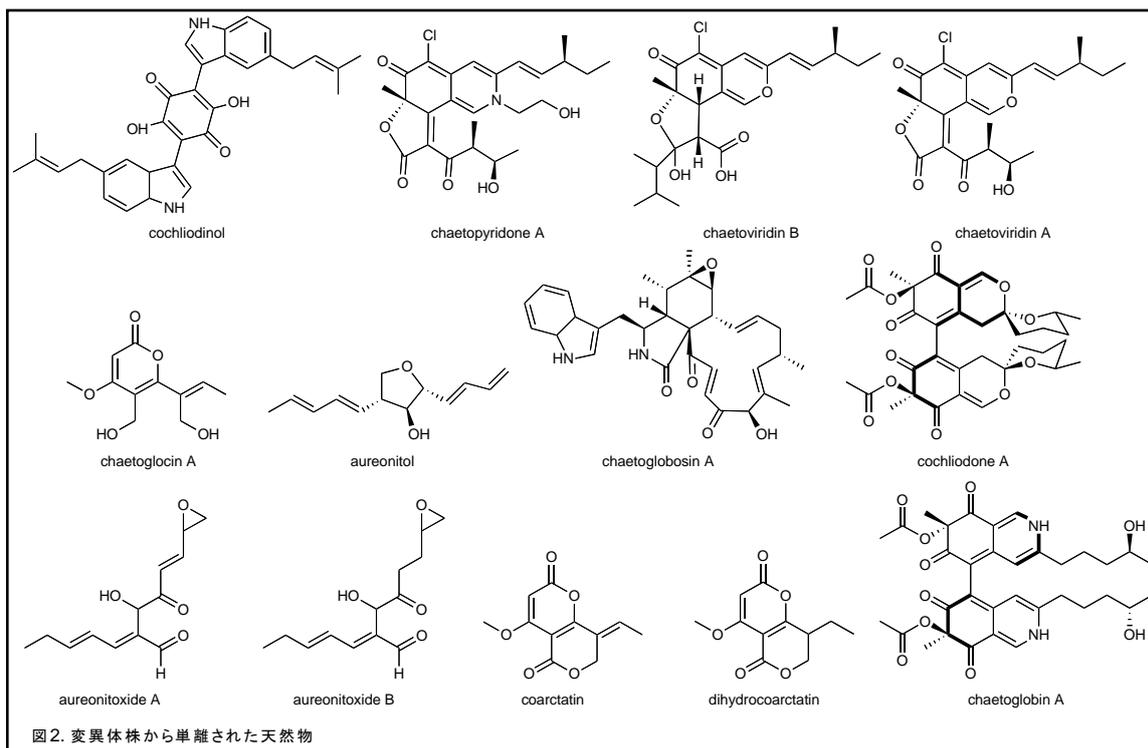


図2. 変異体株から単離された天然物

養した。変異体株と野生株の培養液抽出物を LC-MS で解析比較したところ、変異体株では図 2 に示した化合物を生合成することが明らかとなり、さらに chaetopyridone A、aureonitoxide A および B と名付けた新規化合物を単離構造決定することに成功した。

以上の結果から、生合成遺伝子およびエピジェネティック制御を自在に操ることで天然物を獲得する試みは、バイオインフォマティクスに裏付けされている点で論理的であり、これまで経験とセレンディピティに頼りがちであった伝統的な天然物獲得法に加わる、新たな天然物創出法となることが期待できる。

文献

- 1) Ishiuchi, K. *et al.* (2012) Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics. *ChemBioChem* **13**: 846-854.
- 2) Nakazawa, T. *et al.* (2012) Overexpressing transcriptional regulator in *Aspergillus oryzae* activates a silent biosynthetic pathway to produce novel polyketide. *ChemBioChem* **13**: 855-861.
- 3) Tsunematsu, Y. *et al.* (2012) Overexpressing transcriptional regulator in *Chaetomium globosum* activates a silent biosynthetic pathway: evaluation of shanorellin biosynthesis. *J. Antibiot.* **65**: 377-380.