

糸状菌二次代謝を活性化する小分子化合物の探索

加藤 直樹

(理化学研究所 環境資源科学研究センター)

研究の目的

近年の糸状菌ゲノム解読の進展により、糸状菌が潜在的に生産可能な二次代謝物のごく一部しか利用していないことが明らかになってきた。それら二次代謝物の生合成遺伝子群は糸状菌ゲノム中においてクラスターを形成しており、経路特異的転写因子や広域制御因子から構成される複雑な制御ネットワークにより、協調的にその発現が制御されている¹⁾。現在、ゲノム中に含まれる多数の未知二次代謝遺伝子クラスターの探索が盛んに行われており、Zn₂-Cys₆ binuclear zinc cluster ドメインを有する (C6 型) 転写活性化因子に代表される経路特異的転写因子は、エピジェネティック制御系と並んで、未知遺伝子クラスター探索を始めるにあたっての格好の標的となっている。

我々はこれまで *Aspergillus fumigatus* の生産する fumitremorgin の生合成研究を行ってきた。その生合成遺伝子 (*ftm*) クラスターは、*A. fumigatus* の 8 番染色体末端領域に存在する (図 1)。約 120 kb にわたって二次代謝関連遺伝子が集積しているその領域は、fumitremorgin に加え、pseurotin、fumagillin という 3 種類の代謝物の生合成を担っていることが明らかにされてきた²⁻⁵⁾。このように複数の遺伝子クラスターが含まれているにも関わらず、この領域に存在する C6 型転写因子遺伝子は *AFUA_8G00420* のただ一つであった。本研究では、*AFUA_8G00420* を介した二次代謝物生産制御機構の解析を行った。さらには、その解析結果に基づいた、遺伝子クラスターを活性化する小分子化合物探索系の構築に取り組み、遺伝子改変に依らない新しい二次代謝活性化技術の開発を目指した。

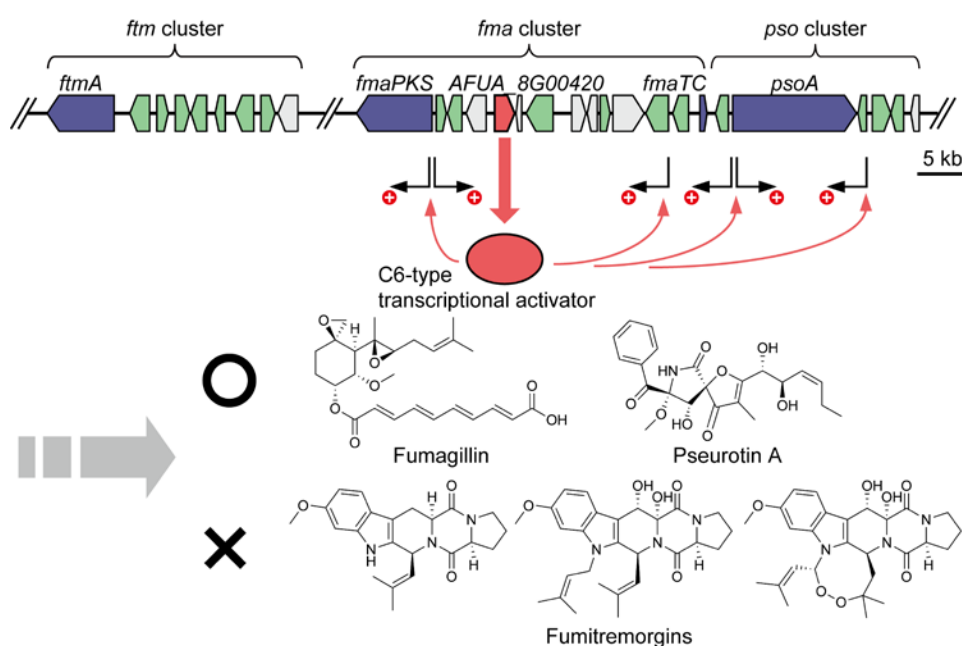


図 1 *A. fumigatus* の 8 番染色体テロメア近傍に集積する二次代謝遺伝子クラスターと唯一存在する経路

方法

AFUA_8G00420 の *A. fumigatus* の二次代謝における役割を調べるために遺伝子破壊株を作製した。遺伝子破壊はコード領域全長をハイグロマイシン耐性遺伝子と置換することで行った。得られた形質転換株を YMGS 培地、およびグルコース最少培地において 24、48 時間培養し、発現解析および代謝産物プロファイリングに供した。発現解析は RT-PCR によって行った。また、酢酸エチル抽出した培養抽出物を LC/MS 分析することで、代謝産物プロファイリングを行った。

結果

AFUA_8G00420 遺伝子破壊株 ($\Delta 420$) における当該二次代謝遺伝子の発現を親株と比較した。一見すると、本制御遺伝子は fumagillin 生合成遺伝子 (*fma*) クラスター内に存在しており、予想通り、その破壊により *fma* 遺伝子の発現低下が認められた。加えて興味深いことに、pseurotin 生合成遺伝子の発現量も同時に低下していた。一方で、*fim* 遺伝子の発現は $\Delta 420$ 株と野生株との間で大差は認められなかった。次に、 $\Delta 420$ 株における fumagillin、pseurotin、fumitremorgin の生産性について検討した。その結果、AFUA_8G00420 の破壊により fumagillin および pseurotin A の生産消失が認められた。それに対し、fumitremorgin 類の生産は遺伝子破壊株とその親株との間で大差はなかった。以上の結果は、AFUA_8G00420 が *A. fumigatus* において fumagillin および pseurotin A の生産を制御していることを示しており、遺伝子破壊株の発現プロファイリングとよく一致する結果であった。一方で、本制御遺伝子と、fumitremorgin 生合成との関係性は見出されなかった。

得られた結果を基に、小分子化合物スクリーニングのためのレポーター系構築を行った。上述の二次代謝物生合成遺伝子のうち、レポーター遺伝子と連結したプロモーター領域は、AFUA_8G00420 に依存した発現を示した *fmaAT*、および AFUA_8G00530 遺伝子に加え、AFUA_8G00420 非依存的であった *fimB* の 3 種類とした。これら生合成遺伝子のコード領域全長を、薬剤耐性マーカー遺伝子を下流に連結したレポーター遺伝子に置換することで、レポーター系を組み込んだ *A. fumigatus* 形質転換株を作製した。

結論

遺伝子破壊株の遺伝子発現および代謝産物プロファイリングから、制御遺伝子 AFUA_8G00420 が、fumagillin および pseurotin の生産制御に関与しており、その制御が主に転写レベルで起きていることを明らかにした。制御因子がクロストークして複数の経路の制御をしていること自体は他のクラスの転写因子ではしばしば見られることではあるが、ひとつの C6 型転写活性化因子が 2 つの異なる化合物の生合成経路を制御している、という現象は我々の知る限り最初の例である。今後は、そのメカニズムの詳細を探るとともに、このような特徴的な制御系を標的とした小分子化合物の探索を行いたい。現在、レポーターアッセイ系の構築をほぼ完了しており、順次、条件検討を行っているところである。完了し次第、化合物スクリーニングを実施する。

文献

- 1) Brakhage, A. A. (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* **11**: 21-32.
- 2) Li, S. M. (2011) Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* **64**: 45-49.
- 3) Kato, N., *et al.* (2009) Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **10**: 920-928.
- 4) Lin, H. C., Chooi, Y. H., Dhingra, S., Xu, W., Calvo, A. M., and Tang, Y. (2013) The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β -*trans*-bergamotene. *J Am Chem Soc* **135**: 4616-4619.
- 5) Maiya, S., Grundmann, A., Li, X., Li, S. M., and Turner, G. (2007) Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **8**: 1736-1743.