

糸状菌二次代謝のエピジェネティック制御を利用する 多様な新規有用物質の創出

浅井 禎吾

(東北大学大学院 薬学研究科)

研究の目的

糸状菌のゲノム上には、これまで同定された化合物の数から予測されるより、遥かに多くの二次代謝物生合成遺伝子が存在することが明らかにされ、従来の培養法では、発現されないまま眠っている多数の未同定二次代謝物生合成遺伝子の存在が示唆された。これら“休眠遺伝子”を活用することができれば、医薬品開発においてリード化合物になり得る新規活性物質の探索源が飛躍的に向上することが期待される。

最近、ヒストンのアセチル化や DNA のメチル化などのエピジェネティック (後天的) な化学修飾を介したクロマチンの構造変化による遺伝子発現制御が、糸状菌の二次代謝物の生産に大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた^{1,2)}。例えば、高アセチル化状態のヒストンは転写活性型ユークロマチン構造をとり、その周辺では DNA と転写因子の接近が容易になり、遺伝子発現が上昇し、二次代謝物の生産が活性化される。一方、低アセチル化状態のヒストンでは、転写不活性型ヘテロクロマチン構造をとり、遺伝子発現並びに二次代謝物の生産が抑制される。また、DNA のメチル化も、遺伝子発現を抑制することが知られている。すなわち、糸状菌培養時に、ヒストンや DNA の化学修飾状態を人為的に巧みに制御すれば、二次代謝物生合成遺伝子の発現パターンを変動させ、従来の培養方法では取得困難な、休眠遺伝子にコードされる多様な新規天然物の取得が可能になると期待される。本研究では、遺伝子発現を抑制するエピジェネティック因子である、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) や DNA メチル化酵素の小分子阻害剤を用いて糸状菌の二次代謝を活性化し、新規活性天然物の取得を目指した。

方法

二次代謝活性化に有効な阻害剤の種類および有効濃度を検討するために、種々の酵素阻害剤添加条件にて糸状菌を培養し、培地-酢酸エチル抽出物および菌体-MeOH 抽出物を逆相 HPLC にて分析した。探索糸状菌は、昆虫寄生糸状菌や *Chaetomium* 属菌は NBRC から購入したもの、内生糸状菌は東北大学薬学部附属植物園で栽培されている植物および青葉山に棲息する昆虫から分離したものをを用いた。これらを阻害剤添加条件で培養し、二次代謝物の生産が活性化されるものを探索した。劇的な変化が確認されたものについては大量培養し、成分探索を行った。新規二次代謝物の構造は、各種スペクトル解析により決定した。発現解析およびヒストンアセチル化レベルの解析は、それぞれ RT-PCR 法およびクロマチン免疫沈降法を用いて行った。

結果

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が糸状菌二次代謝活性化剤として有効であることを見出

した。中でも、suberoyl bis-hydroxamic acid (SBHA)と NAD⁺依存型 HDAC (sirtuin) 阻害剤であるニコチンアミドが広範な糸状菌種に対して有効であることを見出した。

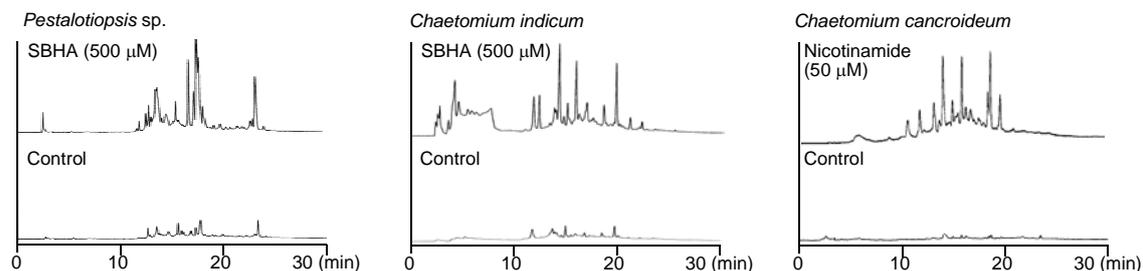


図 1. HDAC 阻害剤添加により培養した糸状菌培地の酢酸エチル抽出物の HPLC 分析

これらの条件を用いて、様々な糸状菌をスクリーニングしたところ、イチイから分離した *Pestalotiopsis* 属菌、*Chaetomium indicum*、*C. cancroideum* において、二次代謝物の生産が顕著に活性化されることを見出した (図 1)。それぞれ大量培養し、生成化合物の単離・精製を行った。その結果 *Pestalotiopsis* 属菌および *C. indicum* からは **1-9** を含む多様な新規芳香族ポリケタイド類を^{3,4)}、*C. cancroideum* からは新規分岐鎖脂肪酸族ポリケタイド **10-12** の取得に成功した (図 2)。

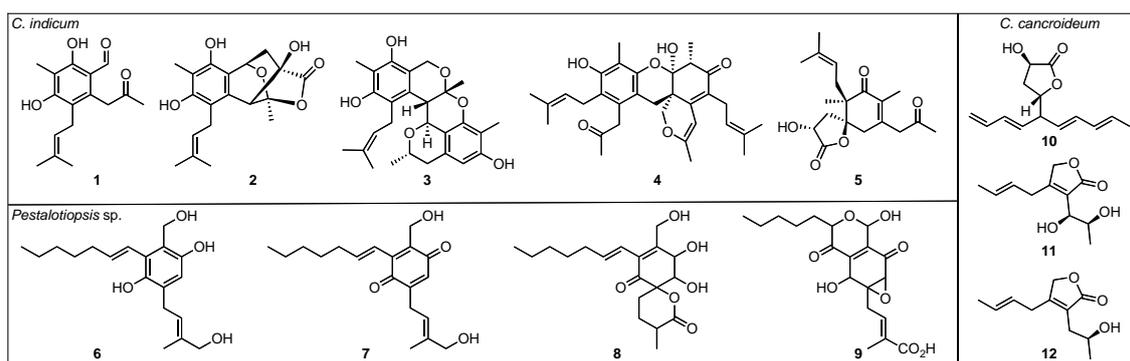


図 2. 本研究で取得した新規二次代謝物の例

また、*C. indicum* のドラフトゲノムより、**1-5** の共通中間体を生合成する非還元型ポリケタイド合成酵素 *pksCH-2* を同定し、その発現解析およびクロマチン免疫沈降法によるヒストンアセチル化レベルの解析を行った。その結果、SBHA 添加により *pksCH-2* の発現量およびその遺伝子座のアセチル化レベルの顕著な上昇が認められ、本手法が狙い通りエピジェネティック制御の人為的な変化を介したものであることが示唆された。

結論

SBHA およびニコチンアミドの 2 種のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、糸状菌二次代謝物の活性化に非常に有効であることを見出した。また、HDAC 阻害剤添加により生産が誘導される二次代謝物は、高確率で新規構造を有していたことから、本法が休眠型生合成遺伝子にコードされる新規二次代謝物の取得に有効であることが示された。今後、本法を用いて多くの糸状菌を探索することで、多種多様な新規天然物が発見されることが期待される。

文献

- 1) Schwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., Keller, N. P. (2007) Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell*. **6**: 1656-1664.
- 2) Cichewicz, R. H. (2010) Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 11-22.
- 3) Asai, T., Yamamoto, T., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Fujii, I., Gomi, K., Oshima, Y. (2013) Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. *Org. Lett.* **15**: 3346-3349.
- 4) Asai, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., Monde, K., Oshima, Y. (2013) Structures of spiroindicumides A and B, unprecedented carbon skeletal spiro lactones, and application of VCD exciton chirality method in absolute configuration determination. *Org. Lett.* **15**: 4320-4323.