

ゲノムシャッフルによる新規二次代謝産物の探索

岡田 正弘

東京大学大学院 薬学系研究科

(現所属：神奈川大学 工学部)

目的

近年、生合成遺伝子群を導入することで "天然物" を人為的に生合成させることが実現可能となりつつあるが、生合成遺伝子群を改変することで新たな二次代謝産物 "非天然物" を創製することは困難である。その克服には詳細な解析が必要だが、そもそも根本的な基礎データが現状では足りていないため、人為的に生合成遺伝子群を覚醒させ、無作為にその遺伝子群を組み合わせることで様々な非天然物を創製することを考えた。

多くの天然物由来の医薬品が開発されてきたが、近年は新規有用天然物の発見数は減少している。この原因は、有用な未分析の天然資源の枯渇によるところが大きいと考えられるが、既知の菌を融合することで新たなソースを生み出すことができれば、ゲノムシャッフルパターンは株ごとに全く異なるため、資源が枯渇することはほぼなくなる。また、そこから有用な非天然物を発見できれば、切れの良い新規医薬品を世に送り出すことも夢ではなく、波及効果が大きい意義深い研究である。

方法および結果

まず、人為的に覚醒させる生合成酵素としては、炭素数 25 で構成されるセスタテルペンを選択した。セスタテルペンは、テルペンと呼ばれる 5 炭素単位のイソプレヌユニットから生合成される二次代謝産物において、比較的報告例が少ないが、他のテルペン類と同じように、細菌やカビ、植物などの様々な生物がセスタテルペンを生産している。麹菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 株にセスタテルペンの生合成遺伝子群を導入し、ベースとなる天然物を異種過剰発現させた。候補となる生合成遺伝子群については、別途、ゲノムマイニングにより探索した未知生合成遺伝子群のうち、ペニシリウム属 (*Penicillium*) 糸状菌由来の遺伝子群を用いた。得られた麹菌の培養物から生合成されたテルペンを精製し、HRMS 解析、NMR 解析などを用いて同定した結果、*P. verruculosum* 由来の酵素 PvPS からは新規セスタテルペンである preasperterpenoid A が得られ、*P. brasilianum* 由来の酵素 PbSS からは新規セスタテルペン sesterbrasiliatriene が得られた。¹⁾ また、*P. verruculosum* 由来の酵素 PvCPS からは copalyl diphosphate が得られた (図 1)。²⁾

なお、その他にもトリプトファンがイソプレニル化されたオリゴペプチド ComXnatto pheromone も異種発現させた (図 2)。^{3,4,5)}

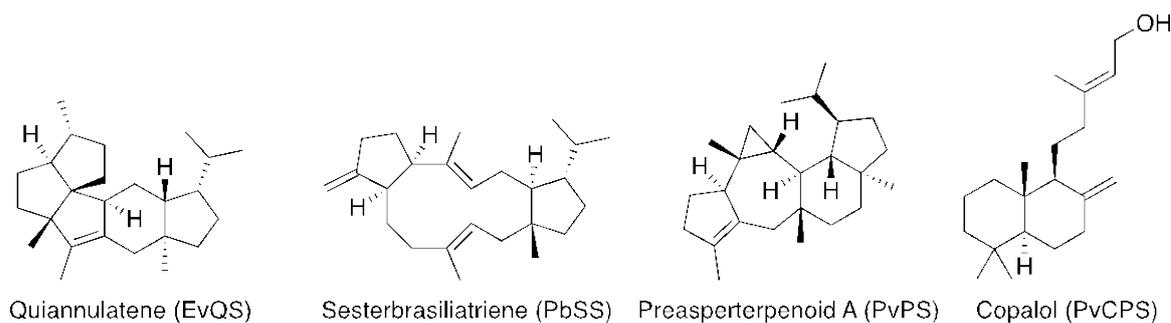


図 1. 異種発現させたテルペン類の化学構造

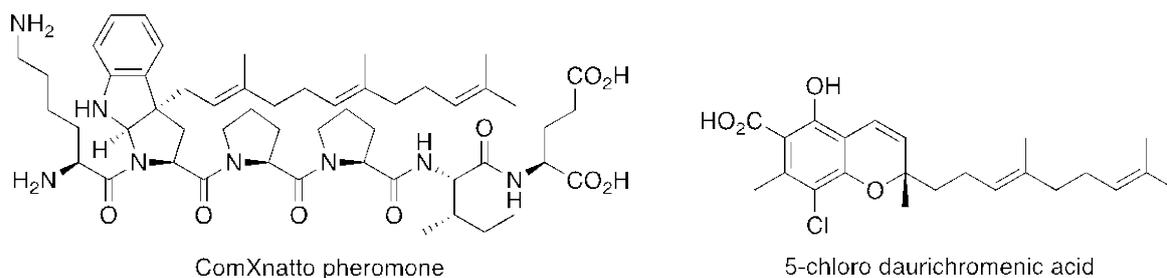


図 2. ComXnatto フェロモンとクロロダウリクロメン酸の化学構造。

続いて、糸状菌の細胞融合を用いてゲノムシャッフルによる二次代謝産物の生合成マシナリーを改変することにより、非天然物を創製することにした。まずはモデル実験として、セスタテルペン quiannulatene⁶⁾ (図 1) を生合成する麹菌 *A. oryzae* NSAR1 株と、栄養要求性株 *A. oryzae* Δ pyrG 株または *A. oryzae* Δ adeB 株を用いて細胞壁を取り除いたプロトプラストを作成後、PEG 法を用いて細胞融合を行った。なお、細胞融合に関しては、東京大学大学院農学生命科学研究科の丸山潤一先生のご協力の下、行った。得られた細胞融合推定株 5 株に対して、培養物を分析したところ、残念ながら、特に新しい二次代謝産物が得られることはなかった。また、同様の手法を用いて、ペニシリウム属 *P. islandicum* Sopp NBRC 6964 株と *P. rugulosum* Thom NBRC 6965 株を用いて細胞融合を行った結果、表現系が親株とは異なる細胞融合推定株 5 株が得られた。今後、これらの代謝産物のプロファイル分析を行う予定である。

なお、その他にもムラサキツツジ由来の強力な抗 HIV 活性を有するメロテルペノイド (+)-daurichromenic acid を糸状菌由来の前駆体生合成酵素とムラサキツツジ由来の環化酵素を組み合わせることにより異種発現させた。さらに、塩素化酵素を組み合わせることにより、(+)-daurichromenic acid より強力な抗菌活性を有する非天然物である (+)-chlorodaurichromenic acid を生合成させた (図 2)⁷⁾。

結論

糸状菌由来の未知のテルペン合成酵素を発現させることにより、新規セスタテルペンやジテルペンを人為的に生合成させることができた。さらに、異種発現させた

糸状菌を用いて細胞融合を行った。残念ながら、新しい二次代謝産物は得られなかったが、表現系が親株とは異なる融合株が得られた。

謝辞

本研究は、公益財団法人野田産業科学研究所より多大なご支援を頂いたことで遂行することができた。あらためて、ここに厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Mitsuhashi, T., Okada, M., and Abe, I. (2017) Identification of chimeric $\alpha\beta\gamma$ diterpene synthases possessing both type II terpene cyclase and prenyltransferase activities. *ChemBioChem* 18: 2104–2109.
- 2) Mitsuhashi, T., Rinkel, J., Okada, M., Abe, I., and Dickschat, J. S. (2017) Mechanistic characterization of two chimeric sesterterpene synthases from *Penicillium*. *Chem. Eur. J.* 23: 10053–10057.
- 3) Sugita, T., Okada, M., Nakashima, Y., Tian, T., and Abe, I. (2018) A tryptophan prenyltransferase with broad substrate tolerance from *Bacillus subtilis* subsp. *natto*. *ChemBioChem*, 19: 1396–1399.
- 4) 岡田正弘. (2018) 納豆のネバネバを誘導する ComX_{natto} フェロモンの同定. *日本醸造協会誌* 113: in press.
- 5) 岡田正弘, 阿部郁朗. (2017) 納豆のネバネバを引き起こす翻訳後修飾によりトリプトファン残基がイソプレニル化された修飾ペプチド. *バイオサイエンスとインダストリー (B&I)* 75: 508–511.
- 6) Okada, T., Matsuda, Y., Mitsuhashi, T., Hoshino, S., Mori, T., Nakagawa, K., Quan, Z., Qin, B., Zhang, H., Hayashi, F., Kawaide, H., and Abe, I. (2016) Genome-based discovery of an unprecedented cyclization mode in fungal sesterterpenoids biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 138: 10011–10018.
- 7) Okada, M., Saito, K., Wong, C. P., Li, C., Wang, D., Iijima, Taura, F., Kurosaki, F., Awakawa, T., and Abe, I. (2017) Combinatorial biosynthesis of (+)-daurichromenic acid and its halogenated analogue. *Org. Lett.* 19: 3183–3186.