2S-Dp04 糸状菌のテルペンドール生合成経路の解明と生理活性物質生産への応用

○本山 高幸, 植木 雅志, 長田 裕之
(理研・抗生物質研)
tmotoyam@riken.jp

糸状菌はゲノム中に膨大な数の二次代謝遺伝子を持ち、生理活性物質の主要なソースであるが、しばしば二次代謝産物生産の不安定性の問題が生じる。M期キネシン Eg5 は動物細胞の細胞周期進行に必須で、抗がん剤標的として注目される。我々は埼玉県秩父市の土壌から単離した糸状菌由来の化合物テルペンドール E を天然物初の Eg5 阻害剤として報告したが、生産性が安定せず、その後の解析が困難だった。今回、生合成遺伝子クラスターの操作により安定生産を可能にした結果を中心に紹介する。

(1) テルペンドール E 生合成遺伝子クラスターの解析

テルペンドール E はインドールジテルペン化合物である。インドールジテルペンは一部の糸状菌が生産し、多くはかび毒である。テルペンドール E 生産菌 *Chaunopycnis alba* RK99-F33 は、かび毒であるテルペンドール C を安定的に生産したが、テルペンドール E は一過的にしか生産しなかった。テルペンドール E 生合成遺伝子クラスター中には、P450 (TerP, TerQ, TerK)、FAD 依存モノオキシゲナーゼ (TerM)、テルペン環化酵素 (TerB)、プレニル転移酵素 (TerC, TerF) をコードすると推定される遺伝子が存在した。遺伝子破壊と基質添加実験により、テルペンドール E がインドールジテルペン生合成における共通の中間体パスパリンから TerQ による C11 水酸化により生合成される鍵中間体であることが明らかになった。TerP は C11 水酸基を持つテルペンドール E をテルペンドール類生合成に特異的な C11-C12 エポキシ構造を持つ中間体に変換するとともに、パスパリンを側路化合物に変換する酵素であることが明らかになった。terP 遺伝子破壊により、二つの反応をブロックし、テルペンドール E を大量生産することに成功した。

(2) テルペンドール E 生合成遺伝子改変による類縁化合物取得と生物活性

terP 遺伝子破壊株等から新規化合物 16 種を含む 29 種の類縁化合物を取得し、動物細胞に対する生物活性を測定したところ、3 化合物がテルペンドール E よりも強力な細胞周期阻害活性を示した。構造活性相関の結果から、TerP が除去する C12 メチル基がキネシン Eg5 阻害活性を示すために重要であることが示唆された。

(3) インドールジテルペン生合成経路の比較

インドールジテルペン化合物は、テルペンドール E を中間体として用い C11-C12 エポキシ構造を持つもの (テルペンドール C とロリトレム B) とテルペンドール E を中間体として用いず C11-C12 二重結合構造を持つもの (パキシリンとアフラトレム) の二つに分類できる。類似の化合物の生産菌は互いに進化的に近縁である。アフラトレム生産菌 (*Aspergillus flavus*) と近縁の麹菌はアフラトレム生合成遺伝子クラスターと類似の遺伝子クラスターを持つが、TerQ ホモログ遺伝子中に変異を持つ。

(4) まとめ

テルペンドール E が、テルペンドール C やロリトレム B 等のかび毒生合成の鍵となる初期中間体であるために一過的にしか生産されないことを明らかにし、テルペンドール E と類縁体の大量生産を可能にした。なお、土壌から生産菌を単離した当時、テルペンドール E を比較的大量に生産していた理由は不明である。TerP 生産量が低下するような制御を受けていた可能性が考えられる。

参考文献

- 1) Nakazawa J *et al.*, *Chem. Biol.*, 10:131-7, 2003
- 2) Motoyama T *et al.*, *Chem. Biol.*, 19:1611-9, 2012

Elucidation of the terpendole biosynthetic pathway and overproduction of terpendoles by pathway engineering

○Takayuki Motoyama, Masashi Ueki, Hiroyuki Osada
(Antibiotics Lab., RIKEN)

Key words secondary metabolite, gene cluster, mycotoxin, indole-diterpene

2S-Dp05 糸状菌ゲノムに眠る生理活性物質生合成遺伝子の有効利用

○木下 浩, 仁平 卓也
(阪大・生工国際セ)
kinosita@icb.osaka-u.ac.jp

ペニシリン以来、抗生物質、抗癌剤などの様々な生理活性物質が開発されてきたが、現代でも多剤耐性菌や新型インフルエンザなど有効な治療法がない疾病が発見されていることから、新たな生理活性物質の発見が求められている。これまでの化合物探索において、発見された化合物の 70 - 90% の物質が、放線菌と糸状菌から単離されていることから、これらの菌群は生理活性物質の最も重要な探索源と認識されている。ただ、これらの菌群は条件によっては生育が遅いため、スクリーニングの際は生育のよい、限定した条件でのみ培養が行われ、その条件下で生産される化合物だけが探索対象とされてきた。このように対象を絞ってしまった結果、有用化合物単離は減少の一途をたどり、生理活性物質の探索源としては枯渇したと考えられたが、近年のゲノム解析の結果、放線菌・糸状菌のゲノム上には、これまでに同定されてきた化合物数を凌駕する数の生理活性物質生合成遺伝子群が存在することが明らかとなった。現在は、ゲノム解析の結果を踏まえ、これらの菌群を新規な生理活性物質の有望な探索源として再評価し、活用するべく新たな研究がなされている。遺伝子工学的な手法としては生合成遺伝子の発現を司る制御因子や生合成遺伝子自身の発現強化により、野生型株では検出できない化合物を生産させる試みや、菌群が保有する生産物未知の生合成遺伝子を、異種生産させることにより生産物を同定し、新たな化合物の発見に繋げるという試みが行われている。本発表においては我々がこれまでにやってきたこれらの試みについて麹菌を用いた異種生産系を中心に報告する。

麹菌 *Aspergillus oryzae* は清酒、味噌などの発酵食品生産に長く利用されてきたことから「国菌」と称されており、これまでにゲノム解析が終了している。さらに、形質転換系をはじめとして多くの遺伝子工学的ツールが整備されていること、また、これまでに他の菌由来の様々な酵素を高生産できていることから、糸状菌由来遺伝子の発現宿主として適していると考えられる。加えて、通常の培養条件下では *A. oryzae* が二次代謝によって生産する化合物は少数に止まることから、外来遺伝子由来する生産物の同定が容易であると考えられる。

1) ポリケタイド化合物シトリニン生合成遺伝子の発現

紅麹菌 *Monascus purpureus* 由来のポリケタイド化合物シトリニン生合成遺伝子の導入を試みた。しかし、形質転換体においても十分なシトリニン生産が確認されなかったため、遺伝子クラスター内に存在していた経路特異的制御因子を構成的に発現させたところ、シトリニン生産量は 400 倍にも増加した。

2) 複数のベクターによるスタチン生合成遺伝子の発現および laeA 遺伝子の導入

複数のベクターを用いて、広い領域にまたがるモノコリン K (ロバスタチン) 生合成遺伝子を *A. oryzae* に導入し、生合成系の再構築を試みた。しかし、遺伝子導入株において、モノコリン K の顕著な生産は認められなかった。異種発現系の汎用性を高めるために、幅広い二次代謝化合物の生産を制御する laeA を恒常的プロモーターの支配下に挿入後、*A. oryzae* に導入した。この laeA 導入株においてモノコリン K 生合成遺伝子導入株は、顕著なモノコリン K を生産した。

3) アステリキノン生合成

ポリケタイド化合物以外の化合物群の麹菌での異種生産を試みた。*A. nidulans* から、アステリキノン類化合物であるテレキノン A の生合成遺伝子を含む領域を、上述の laeA 導入済みの *A. oryzae* に導入した結果、テレキノン A の生産が確認された。

Utilization of unexplored gene resources form filamentous fungi

○Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira
(ICBiotech, Osaka Univ.)

Key words filamentous fungi, heterologous production, *Aspergillus oryzae*