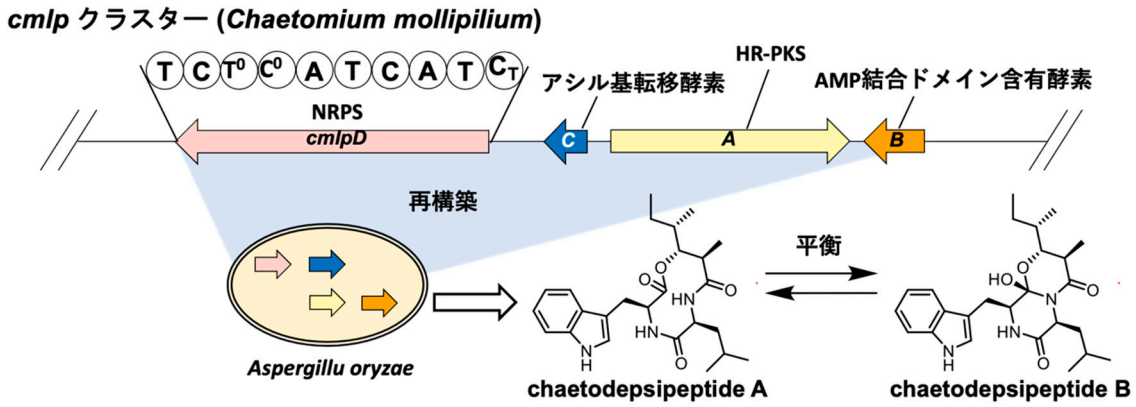
98　糸状菌ペプチド天然物のポストゲノム型探索研究	浅井　禎吾

【目的】新しい天然物の発見は、天然物化学研究の醍醐味の一つであり、また、様々な分野の発展を促す可能性を持つ重要な研究課題である。また、天然物は、これまでに、数多くの医薬品開発に貢献してきた最も魅力的な医薬資源の一つである。近年、遺伝子解読技術の進展やそれにともなう天然物生合成研究成果の蓄積により、微生物のゲノム上には、膨大な未開拓の天然物生合成に関わる遺伝子資源が存在することが明らかにされた。すなわち、遺伝子資源は、ポストゲノム時代における天然物の重要な探索資源であり、これらをいかに活用するかが、新規天然物探索の鍵となる。ペプチド天然物は、構造多様性に優れ、また、生物活性を示す化合物が多く存在する重要な天然物のグループである。また、ペプチド天然物の生合成に関わる非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）遺伝子は、糸状菌のゲノム上に豊富に存在し、また、そのほとんどがどのような天然物を生合成するか明らかにされていない、未開拓の資源である。そこで本研究では、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法により、糸状菌ゲノム情報を材料として、新規ペプチド天然物を発見することを目的として研究を行った。

【方法】独自に収集した糸状菌ゲノム情報ライブラリーに対して、NRPS 遺伝子と高還元型ポリケタイド合成酵素（HR-PKS）遺伝子の両方を有する生合成遺伝子クラスターをゲノムマイニングし、見出された生合成遺伝子クラスターをバイオインフォマティクス解析により、生合成される天然物の新規性を評価した。新規天然物をコードすると予想された遺伝子クラスターについて、モデル糸状菌である *Aspergillus oryzae* の異種発現系を用いて再構築することで、標的生合成遺伝子クラスターにコードされる天然物の単離と生合成経路の解明を行った。

【結果】NRPS 遺伝子と HR-PKS 遺伝子を指標にゲノムマイニングを行ったところ、*Chaetomium mollipilium* のゲノム上に、NRPS 遺伝子（*cmlpD*）と HR-PKS 遺伝子（*cmlpA*）に加え、AMP 結合ドメイン含有酵素遺伝子（*cmlpB*）とアシル基転移酵素（*cmlpC*）からなる、*cmlp* クラスターを見出した。バイオインフォマティクス解析の結果、emericellamide 類生合成遺伝子クラスターと相同性があり、emericellamide 類と類似の環状デプシペプチド天然物が生合成されることが予想された。さらに、類似のクラスターを探索し、それらに含まれる NRPS の A ドメインの数を比較した結果、A ドメインを 2 つ有する CmlpD と関連づけられる天然物が存在しないことから、新規天然物の生産が期待された。次に、*cmlp* クラスターを *A. oryzae* で再構築した結果、期待通り、アミノ酸 2 分子とポリケタイド鎖からなる新規環状デプシペプチド chaetodepsipeptide A が得られた。また、構造解析の結果、chaetodepsipeptide A は、天然物ではこれまで報告例のない、6/6 シクロール構造を有する chaetodepsipeptide B と平衡で存在していることを明らかとした。また、chaetodepsipeptide 類の生合成経路を明らかにし、アシル基転移酵素による新しい HR-PKS からのポリケタイド鎖の加水分解機構を発見し、NRPS の生合成に関与するドメインを特定した。

ゲノムマイニングに基づく新規デプシペプチドの発見



98. 糸状菌ペプチド天然物のポストゲノム型探索研究

浅井　禎吾

東北大学 薬学研究科 分子薬科学専攻 分子解析学講座 医薬資源化学分野

Key words：天然物，糸状菌，ゲノムマイニング，生合成，合成生物学

緒　言

新しい天然物の発見は、天然物化学研究の醍醐味の一つであり、創薬研究をはじめ、さまざまな分野の発展を促す重要な研究課題である。また、天然物は、これまで数多くの医薬品開発に貢献してきた重要な医薬資源であり、現在でも、多様な新規天然物の発見は、新薬開発の可能性を秘めている。近年、ゲノム解読技術が進展し、様々な微生物のゲノム情報が解読されるにつれ、それらのゲノム上には膨大な数の天然物生合成に関わる遺伝子が存在し、そのほとんどが未開拓であることが明らかとなり、ポストゲノム時代の現代において、遺伝資源（情報）は、従来の生物資源に取って代わる可能性のある新しい天然物の魅力的な探索源として浮上してきた［1］。ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする天然物の合成生物学研究は、これら遺伝子資源を天然物へと合理的に具現化することができる。生合成研究成果に基づくゲノムマイニングは、目的天然物の生合成遺伝子クラスターを合理的に探索でき、異種発現は、標的生合成遺伝子クラスターにコードされる天然物を、中間体を含めて網羅的に創製することができ、かつ、それらの安定供給も可能にする。このように、合成生物学的手法は、従来の天然物探索のウィークポイントである、合理性と供給面を克服し、天然物の利便性を飛躍的に向上させ、天然物の産業利用を再び盛んにさせる可能性をもつ優れた手法である［2，3］。

糸状菌は、多様な化学構造や有用薬理活性天然物を数多く生産する重要な微生物資源である。また、ゲノム上に数十もの生合成遺伝子クラスターを有する、天然物生産能に最も長けた微生物種の一つである。さらに、*Aspergillus oryzae* を使用した優れた異種発現システムが確立されており、合成生物学的手法を用いた天然物探索に適した材料である。本研究では、糸状菌の遺伝子資源を材料として、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とした合成生物学的手法により、新規ペプチド天然物の獲得を目指した。

方法および結果

1. ゲノムマイニングによる *cmlp* クラスターの発見

本研究では、魅力的な構造と生物学的活性が期待される糸状菌由来のデプシペプチドもしくはリポペプチドを標的とし、高還元型ポリケタイド合成酵素（HR-PKS）遺伝子と非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）遺伝子の両方を含むクラスターを、独自に収集した糸状菌ゲノム情報ライブラリーに対するゲノムマイニングにより探索した。その結果、*Chaetomium mollipilium* のゲノム上に、HR-PKS 遺伝子（*cmlpA*）、AMP 結合ドメイン含有酵素遺伝子（*cmlpB*）、アシル基転移酵素（AT）遺伝子（*cmlpC*）、NRPS 遺伝子（*cmlpD*）からなる *cmlp* クラスターを発見した。*cmlp* クラスターの遺伝子構成は、emericellamide 類の生合成遺伝子クラスターと類似しており、また、対応する各酵素の相同性も高く、*cmlp* クラスターが環状デプシペプチドの生合成に関与することが示唆された（図 1A）［4］。次に、CmlpD をクエリとして公開データベースを検索したところ、*cmlp* クラスターと高い類似性を示す多数の生合成遺伝子クラスターが発見された。NRPS のアデニル化ドメイン（A ドメイン）の数は、一般的に、NRPS により生合成されるペプチド天然物中のアミノ酸の数と対応する。例えば、emericellamide A には 5 つのアミノ酸が含まれており、その生合成に関与する NRPS である EasA には 5 つの A ドメインが含まれている。そこで、各クラスターに含まれる NRPS ついて、A ドメインの数に基づいて分類した。その結果、A ドメインの数は、2、3、5、6、8、および 12 に分類され、それ

らの中で、Cm3A（3 つの A ドメイン）、EasA（5 つの A ドメイン）、BllRfg_NRPS（8 つの A ドメイン）、および FrbA（12 の A ドメイン）は、それぞれ対応する環状デプシペプチド、beauveriolide I（3 つのアミノ酸）、emericellamides（5 つのアミノ酸）、Bll-rafflesfungin（8 アミノ酸）、および FR901469（12 アミノ酸）と関連づけられた（図 1B）[4〜7]。一方で、A ドメインが 2 つもしくは 6 つの NRPS は、既知天然物と対応づけることができなかった。加えて、*Chaetomium* 属菌からは、2 つのアミノ酸を含む環状デプシペプチドの報告例がないため、*cmlp* クラスターが、新規環状デプシペプチドをコードしていることが示唆された。

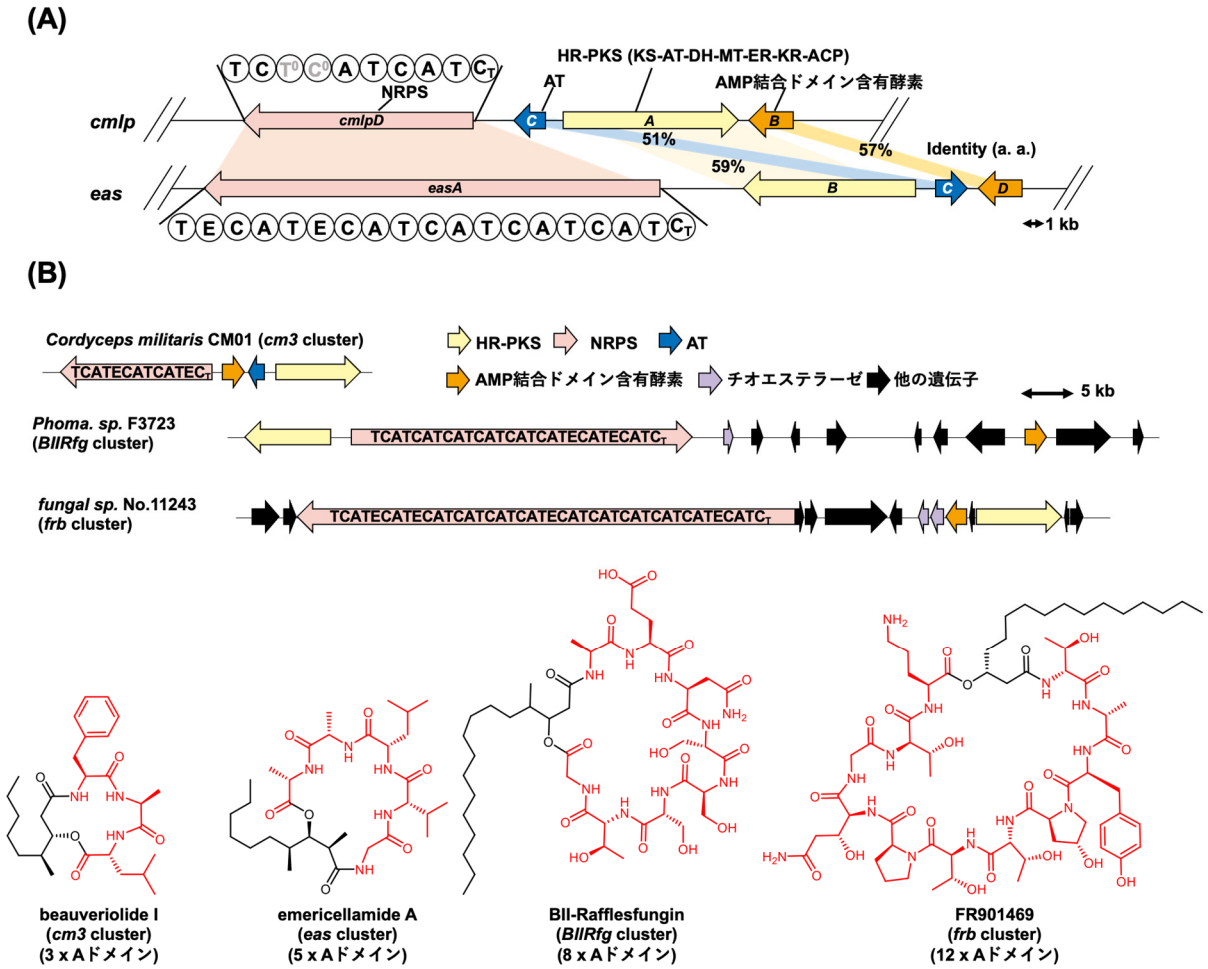


図 1. *cmlp* クラスターの解析

A) *cmlp* クラスターと emericellamide 生合成遺伝子クラスター（*eas* クラスター）の比較。

B) *cmlp* クラスターの相同クラスターのうち天然物と関連づけられているクラスターとその生産物の構造。

2. *cmlp* クラスターの異種発現と新規環状デプシペプチドの単離構造決定

バイオインフォマティクス解析の結果、*cmlp* クラスターが新規環状デプシペプチドをコードすると期待されたため、*A. oryzae* での異種発現実験を行った。各遺伝子の推定機能を考慮して、*cmlpA*、*cmlpAC*、および *cmlpABCD* を麹菌に導入した形質転換株 *AO-cmlpA* および *AO-cmlpAC*、および *AO-cmlpABCD* を構築し、それぞれの代謝物の分析を行った。その結果、*AO-cmlpA* は生成物を生成せず、*AO-cmlpAC* では（2*R*,3*R*,4*S*）-3-ヒドロキシ-2,4-ジメチルヘキサン酸（**1**）の生産が確認された（図 2）。*AO-cmlpABCD* では、LC-MS 分析において、**2a** および **2b** の 2 つの生成物が確認された（図 2）。両方の化合物は、*m*/*z* 442 $[M+H]^+$で同じ疑似分子イオンピークを示したが、脱水された疑似分子イオンピークであると想定された *m*/*z* 424 $[M-H_2O+H]^+$でのピークは **2b** のマススペクトルでのみ観察された。両ピークを分取後、再分析した結果、**2a** と **2b** が平衡状態にあることが示唆された。そこで、混合物のまま両化合物の構

造決定を行ったところ、トリプトファン、ロイシンおよび **1** が連結した 10 員環構造を有する新規環状デプシペプチド **2a** と非常にユニークなシクロールシステム（6-hydroxy-5-oxa-1,8-diazabicyclo[4.4.0]decane）構造を有する **2b** の構造を明らかにした。また、NOESY 相関の解析および Marfey 法の結果から、**2a** および **2b** の絶対配置を決定した（図 2）。これらの平衡の存在および化学構造は、**2a** と **2b** から化学的に誘導して得られた **3** と **4** の構造からも支持された。

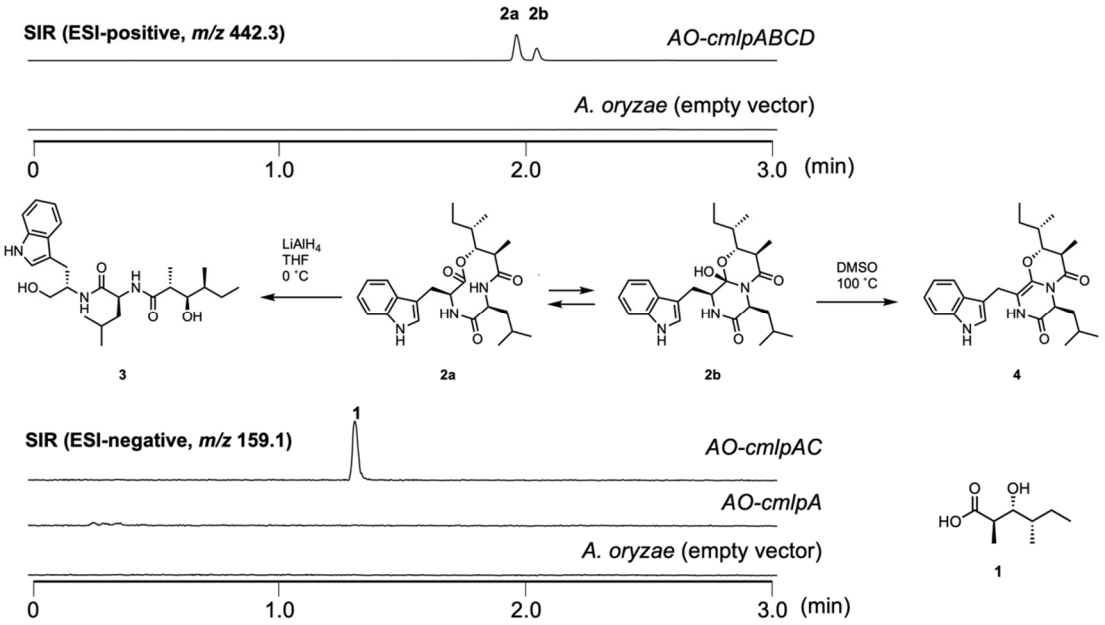


図 2. 異種発現株の代謝分析結果と生成物の化学構造および 2a／2b の誘導体化

3. 新規環状デプシペプチドの生合成経路

異種発現と生成物の構造に基づいて、デプシペプチド **2a**／**2b** の生合成経路を推定した（図 3）。まず、CmlpA（HR-PKS）によりポリケタイド鎖が生合成され、CmlpC（AT）により **1** が HR-PKS から加水分解をともなって放出される。なお、CmlpC は、HR-PKS のリリース機構に関与する AT の最初の例である。CmlpB （AMP 結合ドメイン含有酵素）による **1** の AMP 化と CmlpD（NRPS）へのロード、続く CmlpD によるペプチド伸長と環化によってデプシペプチド **2a**／**2b** が生合成されると推定した。CmlpD の変異実験により、2 番目の T ドメインと C ドメインは生合成に関与しないことも明らかにし、CmlpD の酵素活性に必要なドメインを特定した。

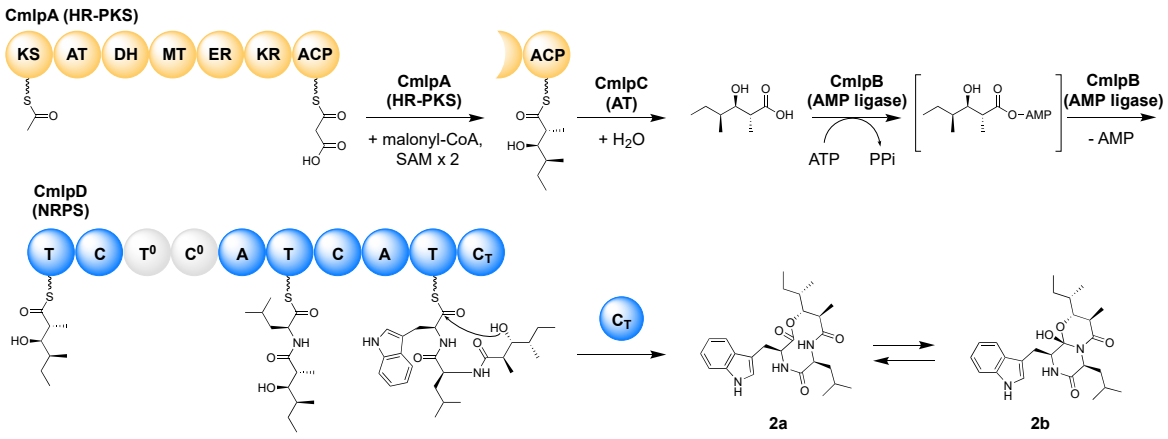


図 3. 新規環状デプシペプチドの推定生合成機構

考　察

このように今回、ゲノムマイニングとバイオインフォマティクス分析により、新しい天然物の候補生合成クラスター（*cmlp* クラスター）を見つけることができ、クラスターの異種発現により、期待通り、新規環状デプシペプチド **2a** が得られた。また、興味深いことに、デプシペプチド **2a** の 10 員環は、ユニークなシクロール構造との平衡を生成した。これの構造は、スペクトル解析と誘導体化によって詳細に決定した。ergometrin と lentopeptin 類は 6/5 シクロール構造を持っていることが知られているが [8]、**2b** にみられる 6/6 シクロール構造は、調べた限りでは、天然物としてこれまで報告例がなかいユニークな構造であった。*A. oryzae* を宿主とした異種発現実験により、新規化合物の取得とその生合成機構の解明だけでなく、HR-PKS の新しい AT を介した加水分解鎖放出システムも明らかにした。この研究は、ゲノムマイニングと異種発現に基づく合成生物学的手法が、新規天然物探索において有用であることを示すものである。

共同研究者・謝辞

本研究は、東北大学大学院薬学研究科医薬資源化学分野において、尾崎太郎准教授、菅原章公助教、本間悠人氏、森下陽平博士および塚田健人博士の協力のもと行った。また、本研究に対し多大なご援助を頂きました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Tammi, C. V.; Jane, L. N.; Sebastian, T.; Jens C. F.; Thomas, O. L.; Kristian, F. N.; Jakob, B. H.; Julian, B.; Asaf, S.; Robert, R.; John, M. G.; Pallavi, P.; Morten, T. N.; Ellen, K. L.; Martin, E. K.; Kimchi, S.; Erin, M.; Kerrie, B.; Alicia, C.; Cindy, C.; Kurt, L.; Sajeet, H.; Matt, N.; Laura, S.; Alan, K.; Anna, L.; Matthieu, H.; Elodie, D.; Adrian, T.; Jon, K. M.; Bernard, H.; Ad, W.; Blake, A. S.; Miia R. M.; Ronald, P. V.; Igor, V. G.; Uffe, H. M.; Scott, E. B.; Mikael, R. A. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of Aspergillus section Nigri. Nat. Genet. 2018 Dec;50 （12):1688-1695. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30349117, DOI: 10.1038/s41588-018-0246-1.

2) Morishita, Y.; Zhang, H.; Taniguchi, T.; Mori, K.; Asai, T. The Dis-covery of Fungal Polyene Macrolides via a Postgenomic Approach Reveals a Polyketide Macrocyclization by trans-Acting Thioesterase in Fungi. Org. Lett. 2019 Jun 21;21（12):4788-4792.Epub 2019 Jun 10. PMID: 31180682, DOI: 10.1021/acs.orglett.9b01674.

3) Tsukada, K.; Shinki, S.; Kaneko, A.; Murakami, K.; Irie, K.; Murai, M.; Miyoshi, H.; Dan, S.; Kawaji, K.; Hayashi, H.; Kodama, E. N.; Hori, A.; Salim, E.; Kuraishi, T.; Hirata, N.; Kanda Y.; Asai T. Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fun-gal decalin-containing diterpenoid pyrones. Nat. Commun. 2020 Apr 14;11（1):1830. PMID: 32286350, PMCID: PMC7156458, DOI: 10.1038/s41467-020-15664-4.

4) Chiang, Y.–M.; Szewczyk, E.; Nayak, T.; Davidson, A. D.; Sanchez, J. F.; Lo, H.–C.; Ho, W.–Y.; Simityan, H.; Kuo, E.; Praseuth, A.; Watanabe, K.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. C. Molecular Genetic Mining of the Aspergillus Secondary Metabolome: Discovery of the Emericellamide Biosynthetic Pathway. Chem. Biol. 2008 Jun;15（6):527-32. PMID: 18559263, PMCID: PMC2494592, DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.05.010.

5) Wang, X.; Gao, Y.–L.; Zhang, M.–L.; Huang, J.–Z.; Li, L. Genome mining and biosynthesis of the Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor beauveriolide I and III in Cordyceps militaris. J. Biotech. 2020 Feb 10; 309: 85-91. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31926180, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.01.002.

6) Sinha,S.; Nge, C.-E.; Leong, C. Y.; Ng, V. Crasta, S.; Alfatah, M.; Goh, F.; Low, K.–N.; Zhang, H.; Arumugam, P.; Lezhava, A.; Chen, S. L.; Kanagasundaram, Y.; Ng, S. B.; Eisenhaber, F.; Eisenhaber, B. Genomics-driven discovery of a biosynthetic gene cluster required for the synthesis of BII-Rafflesfungin from the fungus Phoma sp. F3723. BMC Genom. BMC Genomics 2019, volume 20, Article number: 374, doi.org/10.1186/s12864-019-5762-6.

7) Matsui, M.; Yokoyama, T.; Nemoto, K.; Kumagai, T.; Terai, G.; Ta-mano, K.; Machida, M.; Shibata, T. Identification of a putative FR901469 biosynthesis gene cluster in fungal sp. No. 11243 and en-hancement of the productivity by overexpressing the transcription factor gene frbF. J. Biosci. Bioeng. 2017 Feb; 123 (2): 147-153. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27660098, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.08.007

8) Kishimoto, S.; Matsubara, Y.; Watanabe, K. Alkaloid Biosynthetic Enzyme Generates Diastereomeric Pair via Two Distinct Mecha-nisms. J. Am. Chem. Soc. 2022, 144, 12, 5485–5493. doi.org/10.1021/jacs.1c13621.