

博士論文

麹菌 *Aspergillus oryzae* の二次代謝産物生合成
遺伝子クラスターに関する研究

篠原 靖智

目次

序論.....	1
第 1 章 <i>Aspergillus oryzae</i> における cyclopiazonic acid 生合成遺伝子クラスターの解析	
1.1 序.....	13
1.2 実験材料および方法.....	15
1.3 結果.....	22
1.4 考察.....	32
第 2 章 二次代謝産物産生プロファイルによる <i>A. oryzae</i> 転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニングおよび astellolides 高生産株の同定	
2.1 序.....	37
2.2 実験材料および方法.....	44
2.3 結果.....	49
2.4 考察.....	58
第 3 章 <i>A. oryzae</i> における astellolide 生合成遺伝子クラスターの同定	
3.1 序.....	63
3.2 実験材料および方法.....	64
3.3 結果.....	70
3.4 考察.....	82

第4章 astelloide 生合成に関わる新奇酵素 AstA および AstC の機能解析	
4.1 序	86
4.2 実験材料および方法	89
4.3 結果	93
4.4 考察	109
総括	120
引用文献	125
付録	137
原著論文	148
論文の内容の要旨	149
謝辞	152

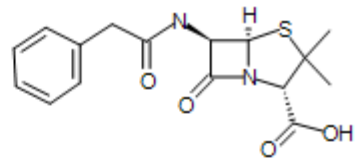
序論

二次代謝産物と醸造用微生物

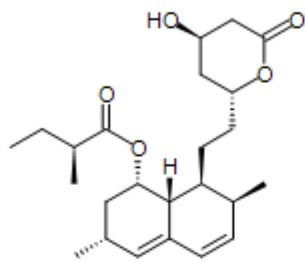
二次代謝産物とは、一般的に生体の生育に必須な代謝である一次代謝経路によって生合成される化合物以外の経路によって生合成される化合物を指し、生育に必要不可欠ではないものの、その多くは生体が有利に生育していくための様々な生物活性を備えている。植物や真菌、バクテリアなどをはじめとし、多くの生物が多種多様な二次代謝産物を生合成することが知られているが、特に真菌が生合成する二次代謝産物は、その基本骨格の生合成に関与する遺伝子(バックボーン遺伝子)によって、**polyketides**、**non-ribosomal peptides**、**terpenoids** および **indole alkaloids** に大別することが出来る[1]。また、上述のバックボーン遺伝子とともに、その生合成に関与する遺伝子群が染色体上に隣接して存在し、クラスターを形成していることが知られている。

麹菌 *Aspergillus oryzae* が属する糸状菌も多様な二次代謝産物を生合成することが知られている。その中には、**penicillins** や **lovastatins**、**gibberellins** などそれらが有する生物活性を上手く利用することで医薬や農薬として活用される化合物が存在する一方で、**aflatoxins** や **aflatremis**、**ochratoxins** といったヒトに対して有害な生物活性を有するマイコトキシンと呼ばれる化合物も存在する(図 1-1) [1, 2]。

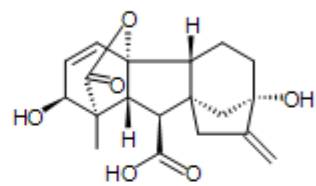
有用な生物活性を有する
化合物



penicillin G

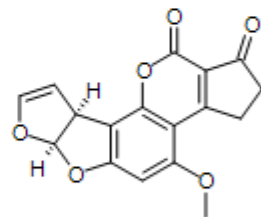


lovastatin

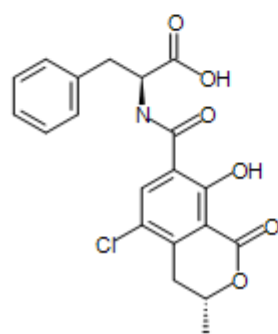


gibberellin A3

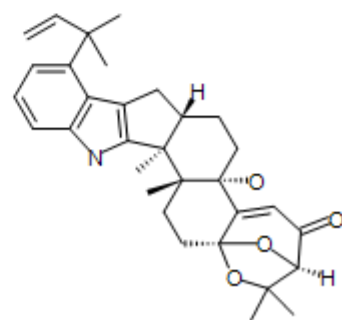
有害な生物活性を有する
化合物
(マイコトキシン)



aflatoxin B1



ochratoxin A



aflatrem

図 1-1 糸状菌が生産する代表的な二次代謝産物

A. oryzae は、古くから醤油、味噌、日本酒などの日本の伝統的な発酵食品の生産に広く利用される醸造用微生物であり、長い年月をかけた育種により、こういった二次代謝産物、特に毒性を有するマイコトキシン類の生合成能の多くを喪失していると考えられている。実際に、*A. oryzae* の野生型であると考えられている *A. flavus* は上述の aflatoxins を生合成することが知られているものの、*A. oryzae* はその生合成能を喪失していることが遺伝子レベルで証明されている[3, 4]。この aflatoxins 非生産性の証明に加え、その長い食経験から FDA (Food and Drug Administration : 食品医薬品局) では *A. oryzae* を GRAS (Generally Recognized As Safe)に加えており、その安全性は国際的にも認められている。

しかしながら、二次代謝産物の生産能は株間によっても多様性があり、*A. oryzae* の一部の株からは、数は多くないものの ferrichrysin や kojic acid、astellolides など、いくつかの二次代謝産物が単離されている[5-10]。これらの多くは、ヒトにとって有用な生物活性を示す化合物であることが知られているものの、中には cyclopiazonic acid や β -nitropropionic acid、aspergillic acid などのマイコトキシンの一種も存在する。本研究では、これら一部の *A. oryzae* が生産する二次代謝産物の内、cyclopiazonic acid および astellolides について検討を行った。

cyclopiazonic acid (CPA)

CPA は、インドールテトラミン酸骨格を有する化合物であり、上述の通り、一部の *A. oryzae* が生産することが知られているマイコトキシンの一種である。1968年に *Penicillium cyclopium* の培養物から最初に単離・構造決定の報告がなされ[11]、その後、いくつかの *Aspergillus* 属糸状菌も生合成能を有することが報告されている[10]。生物活性としては、金属カチオンと安定な複合体を形成するキレート作用[12]や、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA)の特異的な阻害活性

を有していることが知られている[13]。この SERCA と CPA の相互作用については、両者の共結晶構造解析による詳細な解析がなされており、SERCA の CPA 結合領域中の極性領域が CPA のテトラミン酸部位との結合に重要であり、CPA が結合することによりカルシウムチャンネルがブロックされてしまうことなどが明らかにされている[14]。SERCA は Ca^{2+} ポンプとして機能しており、筋収縮・弛緩サイクルにおける Ca^{2+} 輸送に重要な役割を担っていることから、この SERCA の阻害活性が CPA の毒性の作用機序の一つであると考えられている。各種実験動物を用いた CPA の急性毒性試験が検討されており、雄ラットにおける LD_{50} が 36 mg/kg [15]、雌マウスにおける LD_{50} が 63 mg/kg [16] (いずれも経口投与)などの報告がある。*A. oryzae* が生産することが知られているマイコトキシンの中では、最も毒性の高い化合物であると考えられているが、上述の他の糸状菌が生産する主要なマイコトキシンと比べると、その毒性は低く、実際に、これまでに人間に対して中毒症状を引き起こしたという明確な事例は報告されていない。しかしながら、主に *A. flavus* などの CPA 生産菌による汚染により大豆やトウモロコシ、ピーナッツなどの穀物類から検出される例も多く、大きな問題となっている[17-19]。また、CPA が検出された穀物では aflatoxins も同様に検出される例が多く報告されており、実際に aflatoxins 生産能を有する *A. flavus* 18 株について検討が行われた結果、その内の 14 株は aflatoxins とともに CPA の生産能も有していることが確認されている[17]。CPA の最も大きな問題の一つは、発酵食品の生産に用いられる醸造用微生物の一部にも生産能を有する株が存在することである。上述の通り、本研究対象である *A. oryzae* に加え、醤油や味噌の生産に利用される *Aspergillus tamaris* や、各種チーズの生産に利用される *Penicillium camembertii* などから単離の報告がある[20, 21]。食品の製造に、これらの醸造用微生物を用いるに際しては、CPA の生産能が無いことを確認する必要がある、これまでに吸光度法や ELISA 法、HPLC や TLC

などのクロマトグラフィー法など様々な CPA 分析方法が検討されている[22]。

CPA の生合成経路の解析過程において、Bisecodehydro CPA (β -CPA)および CPA imine と呼ばれる CPA の誘導体が *P. cyclopium* から単離されているが、その後の解析により β -CPA については CPA 生合成の前駆体であることが明らかにされている[12, 23]。この他、*A. tamarii* からは speradine A と呼ばれる CPA の誘導体が単離されている[24]。各化合物の構造を図 1-2 に示す。

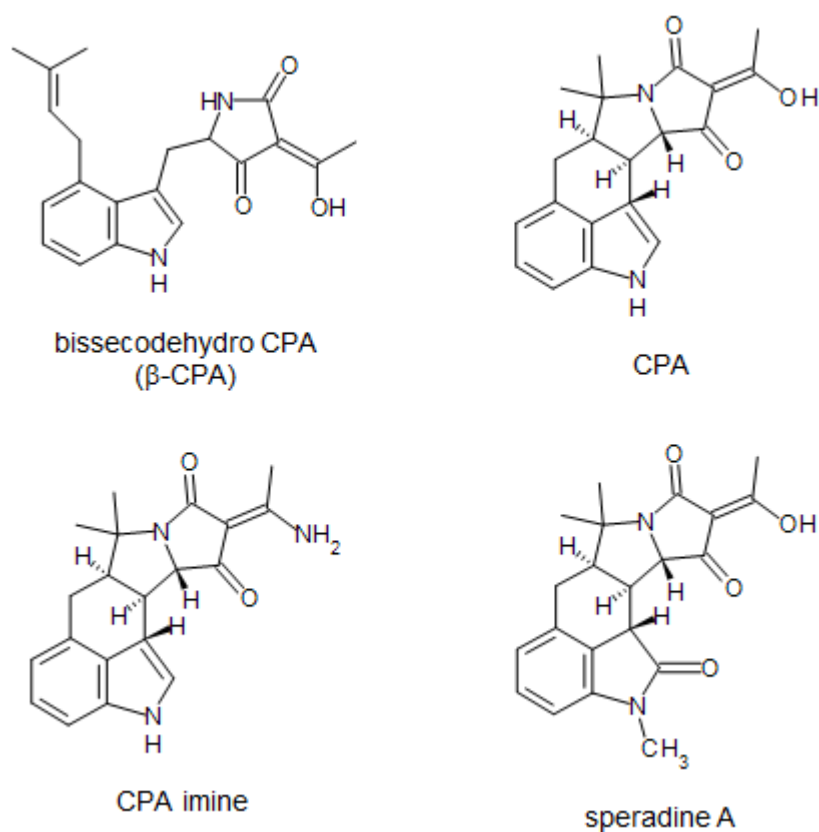
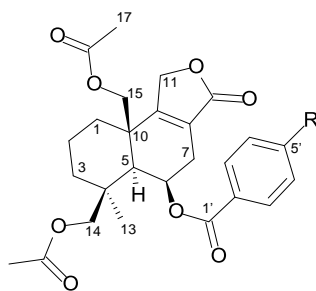


図 1-2 CPA およびその類縁化合物

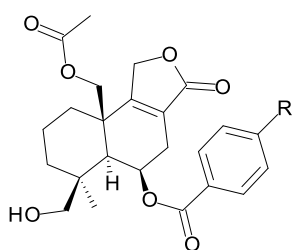
astellolides

astellolides は、ラクトン化したドリマン型のセスキテルペンにアリール酸がエステル結合した化合物であり、CPA と同様に、一部の *A. oryzae* が生産することが知られている[7]。astellolides は parasiticolides と呼ばれ、1975 年に *Aspergillus parasiticus* から parasiticolide A が初めて単離・構造決定された[25]。その後、*Aspergillus varicolor* の変異株から astellolide A (parasiticolide A と同一の化合物)とともに astellolide B が単離されている[26]。*A. oryzae* では、Rank ら[7]によってゲノム解読株である *A. oryzae* RIB40 株から astellolide A の 14 位がアセチル修飾を受けていない化合物(14-deacetyl astellolide A)、並びに、14 位とともに 15 位もアセチル修飾を受けていない化合物(dideacetyl astellolide A)が単離されている。しかしながら、*A. oryzae* RIB40 株の代謝物からは astellolide A の生産は確認されていない。このことから、*A. oryzae* RIB 40 株は astellolide 生合成遺伝子クラスターを保持するものの、14 位のアセチル化に関与する acetyltransferase は変異等によりその機能を喪失している可能性が示唆されている[7]。一方、近年、*A. oryzae* QXPC-4 株と呼ばれる別株の *A. oryzae* から astellolide A および B とともに、いくつかの誘導体を単離したとの報告がなされている[27]。各化合物の構造を図 1-3 に示す。



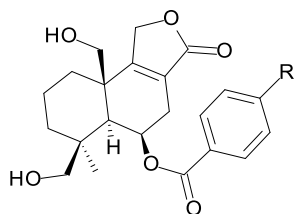
R=H : astellolide A (parasiticolide A)

R=OH : astellolide B



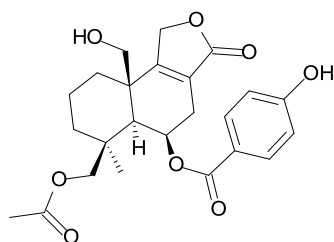
R=H : 14-deacetyl astellolide A

R=OH : 14-deacetyl astellolide B (astellolide F)

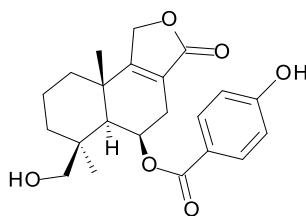


R=H : dideacetyl astellolide A

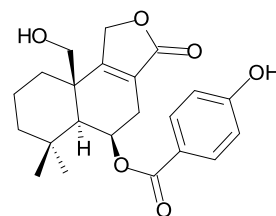
R=OH : dideacetyl astellolide B



astellolide G



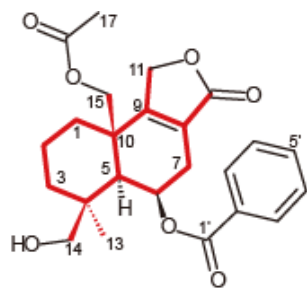
astellolide H



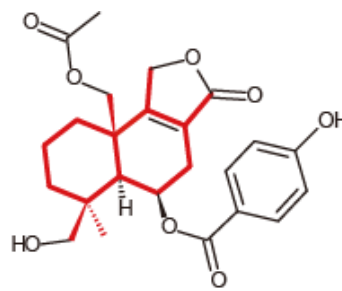
astellolide I

図 1-3 astellolides およびその類縁化合物

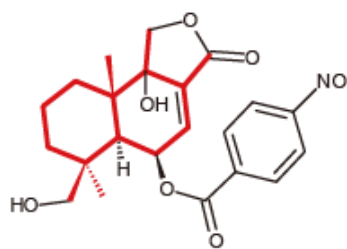
astellolides の生物活性に関する報告はほとんどない。しかしながら、**astellolides** と同様にドリマン型のセスキテルペンラクトンにアリール酸や脂肪酸、アミノ酸などがエステル結合した多様な化合物が糸状菌や植物から単離されている[28-34] (図 1-4)。これら **astellolides** の類縁化合物の中には、非常にユニークな生物活性を有する化合物も存在し、*Aspergillus* sp. RE-1149 株から単離された RES-1149-2 は endothelin type B 受容体のアンタゴニスト活性を有し、*Penicillium solitium* から単離された **berkedrimanes** は caspase-1 および caspase-3 の阻害活性を有することなどが報告されている[32, 33]。この他にも、多くの類縁化合物が有用な生物活性を示すことが報告されているものの、**astellolides** を含めいずれの化合物についてもその生合成遺伝子に関する知見はない。このことから、**astellolides** の解析を行うことにより、これら類縁化合物の生合成遺伝子クラスターの探索に有益な情報をもたらすことが出来ると考え、本研究では、**astellolides** の生合成遺伝子クラスターを同定するとともに、本クラスターにコードされていた haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase と予測される 3 つの遺伝子産物の機能解析を試みた。



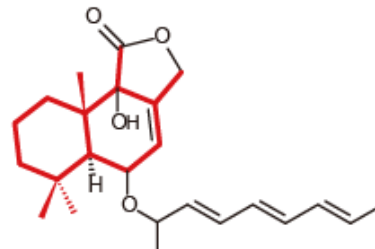
14-deacetyl astellolide A



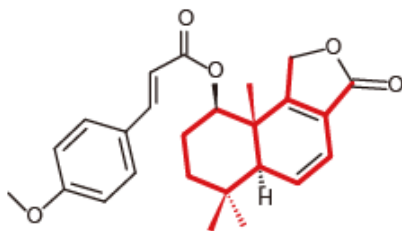
14-deacetyl astellolide B



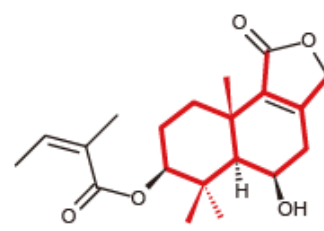
insulicolide A



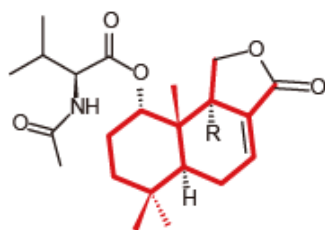
RES-1149-2



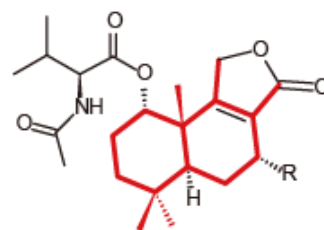
1β-O-(p-Methoxy-(E)-cinnamoyl)-bemadienolide



3β-angeloyloxy-7-epifutronolide



R=H :berkedrimane A
R=OH :berkedrimane B



R=Cl :minioluteumide A
R=OH :minioluteumide B

図 1-4 astellolides およびその類縁化合物の構造式
各化合物に共通するドリマン型のセスキテルペン骨格を赤で示した。

haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase

HAD-like hydrolase は、原核生物からヒトを含めた高等真核生物まで全ての生物種に存在するタンパク質スーパーファミリーの一つである[35]。各生物種が複数の HAD-like hydrolase を保持しており、その数は、*Escherichia coli* で 28 遺伝子、*Saccharomyces cerevisiae* で 45 遺伝子、ヒトでは 183 遺伝子にも上る[36]。本スーパーファミリーに属するタンパク質の多くは、phosphatase 活性や P-type ATPase 活性等のリン酸基転移反応を触媒することが知られている。また、全長のアミノ酸配列類似性は非常に低い(15-30%同一性)が、触媒活性に重要な DxD モチーフを含め 4 つの高度に保存された配列モチーフが存在するとともに、cap ドメインと呼ばれる基質との結合に重要なコアドメインを有することが報告されている[35]。これまでに、*E. coli* [37]や *S. cerevisiae* [38] について HAD-like hydrolase ドメインを有するタンパク質の網羅的な機能解析がなされているものの、その数の多さから、まだ機能が明らかになっていないものも非常に多く存在する。

リン酸は、タンパク質の活性化や分解、シグナル伝達をはじめとし、生命活動を維持していく上で重要な役割を果たしており、本スーパーファミリーに属するタンパク質は、このリン酸生成における主要なツールの一つとして機能している[36]。その役割は多岐に渡るが、主要なカテゴリーとして一次代謝および二次代謝、代謝プールの調節、細胞のメンテナンス、栄養素の取り込みの 4 つに大別することが出来る[36]。本研究の主題である二次代謝産物の生合成では、alunomycin 生合成系における AlnB [39]や oxazolomycin 生合成系における OzmB [40]などが知られている。また、近年、イソペンテニルピロリン酸の脱リン酸化活性を指標としたスクリーニングにおいて、*E. coli* が保持する HAD4 と HAD10 にその活性があることが報告されている[41]。

本論文の意義と構成について

上述の通り、醸造用微生物である *A. oryzae* は、二次代謝産物の生合成能の多くを喪失していると考えられてきた。しかしながら、2005 年になされた *A. oryzae* の全ゲノム解読の結果からは、上述の概念を覆す結果が得られている [42]。すなわち、*A. oryzae* のゲノムサイズは約 37.6 Mbp であり、他の近縁の *Aspergillus* 属糸状菌である *A. nidulans* や *A. fumigatus* と比べ 25~30%程度大きく、そのゲノム中には non-syntenic blocks (NSBs) と呼ばれる他の 2 属の *Aspergillus* とはシンテニーの低い領域がモザイク状に存在しており、この領域に二次代謝に関連する遺伝子が多く含まれていることが明らかになった [43, 44]。これらの全てが生合成能を有しているとは限らないが、この結果から *A. oryzae* は、潜在的には多くの二次代謝産物の生合成能を有している可能性が示唆される。*A. oryzae* が産生する二次代謝産物並びにその生合成遺伝子クラスターを同定すること、更には、その生産制御メカニズムを明らかにすることは、*A. oryzae* の醸造用微生物としての安全性の更なる向上に繋がる。また、この検討により新規有用化合物の同定や生合成経路に関する新たな知見をもたらす可能性も考えられる。

A. oryzae は有性世代を持たないこと、相同組換えによるジーンターゲティング頻度が非常に低いことなどから遺伝子破壊等の分子生物学的なアプローチによる二次代謝産物の生合成研究を行うことが困難であった。このため、上述の aflatoxins の例を除き二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに関する研究は余りなされておらず、代謝物の単離やその分析等に関する研究が主体となっていた。しかしながら、近年、非相同組換えに関わる因子として知られる *Ku70* や *Ku80*、*ligD* などの遺伝子を破壊することにより、非相同組換えを抑制し、結果的に相同組換え頻度を飛躍的に向上させることが出来ることが明らかとなり、*A. oryzae* のジーンターゲティングが容易に行えるようになった [45]。これによ

り、これまでは非現実的であった網羅的な遺伝子破壊という方法論による二次代謝産物研究が *A. oryzae* を用いて行うことが可能になった。

そこで、本論文では、この遺伝子破壊技術を用いた分生生物学的なアプローチによる *A. oryzae* の二次代謝産物の生合成および転写制御に関する研究を通して、その醸造用微生物としての安全性の検証を行うとともに、新規有用化合物ならびに酵素の同定を試みた。第 1 章では、一部の *A. oryzae* が生産するマイコトキシン CPA の生合成遺伝子クラスターの全容を解明するとともに、解析を通して明らかになった *A. oryzae* の堅牢な安全性について論じ、第 2 章では、転写因子を網羅的に破壊した *A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーの代謝物解析を通して明らかにした *A. oryzae* における二次代謝産物生産制御に関与する遺伝子について論じる。また、第 3 章および第 4 章では、第 2 章での検討の過程で見出された *astellolides* の生合成遺伝子クラスター(第 3 章)および生合成酵素(第 4 章)について論じる。

第1章 *Aspergillus oryzae* における cyclopiazonic acid 生合成遺伝子クラスターの解析

1.1 序

序論でも述べた通り、cyclopiazonic acid (CPA) は *Penicillium* 属および *Aspergillus* 属糸状菌が生産するマイコトキシン的一种であり、*A. oryzae* の一部も CPA の生合成能を有することが報告されている[10, 11, 21]。同位体標識化合物を用いたフィーディング試験などの生化学的な先行研究[12, 46, 47]において、CPA の生合成基質(tryptophan、acetyl-CoA、malonyl-CoA、dimethylallyl pyrophosphate)および、その生合成中間体(cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan (cAATrp)、β-CPA)が明らかにされており、図 1-1-1 に示す生合成経路が推定されているものの、分子生物学的な検討はこれまでなされていなかった。

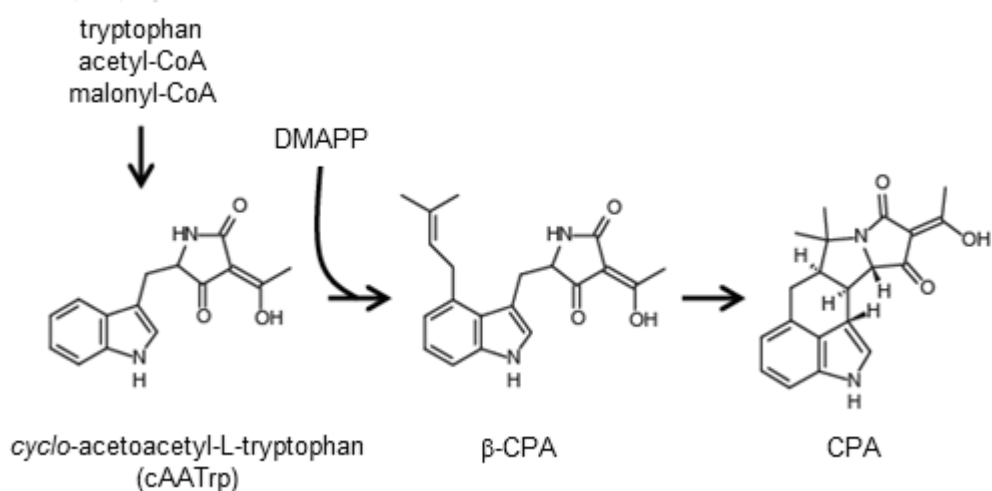
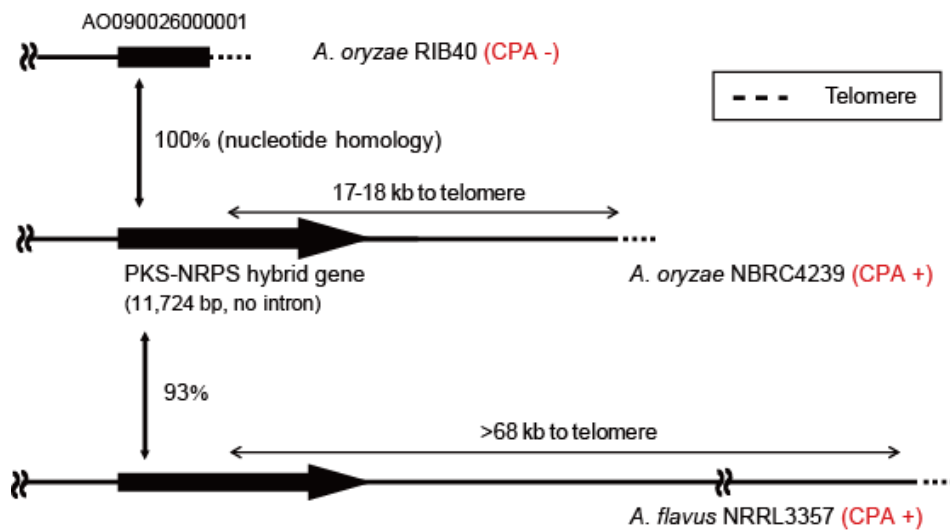


図 1-1-1 推定 CPA 生合成経路

近年、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム解析の結果から、上述の cAATrp からβ-CPA への変換を触媒する dimethylallyl tryptophan synthase (DMATS)をコードする遺伝子が染色体 3 番上に存在することが推定されたことを皮切りに[48]、2008 年に Tokuoka ら[49]により CPA 生合成のバックボーン遺伝子である polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase (PKS-NRPS; *cpaA*)が、CPA 生産能を有する *A. oryzae* NBRC4177 株から単離され、ゲノム解読株 *A. oryzae* RIB40 株(CPA 非生産菌)との比較解析から、その非生産性に起因する遺伝的要因が明らかにされた(図 1-1-2)。その後、*A. oryzae* の野生型であると考えられている *A. flavus* の CPA 生合成遺伝子クラスターの同定もなされている[50]。本章では、上述の *cpaA* に隣接してコードされる推定 CPA 生合成遺伝子群の解析を行い、*A. oryzae* における CPA 生合成遺伝子クラスターの全容の解明を試みた。



Tokuoka et al: Fungal Genet. Biol, 45, 1608-1615, (2008) [49]

図 1-1-2 *Aspergillus oryzae* および *A. flavus* の 3 番染色体末端領域の比較

CPA 生合成の初発の酵素である PKS-NRPS をコードする *cpaA* (黒矢印)は、3 番染色体末端領域に存在する。CPA 非生産菌である *A. oryzae* RIB40 株は telomere の付加により *cpaA* のコード領域約 7 kb が欠失しており、この欠失により CPA 非生産の表現型を示す。一方、*A. oryzae* の野生型であると考えられている *A. flavus* は、*cpaA* のオルソログを保持していることが確認されている。

1.2 実験材料および方法

1.2.1 培地組成

ポリペプトンデキストリン(PD)培地: 1% peptone, 2% dextrin, 0.5% KH₂PO₄, 0.1% NaNO₃, 0.05% MgSO₄, 0.1% casamino acids (pH 6.0)

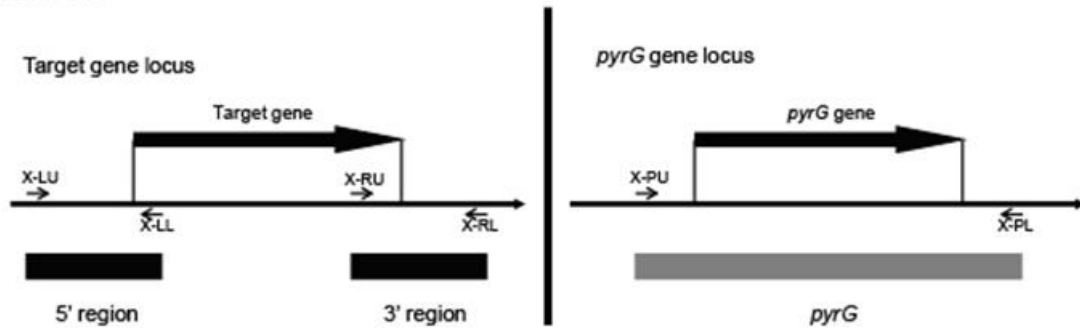
Czapek-Dox (Cz)培地: 0.2% NaNO₃, 0.05% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄, 0.001% FeSO₄, 3% glucose (pH 6.0)

Czapek-yeast (autolysate) extract (CYA)培地: 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄, 0.001% FeSO₄, 0.5% yeast extract, 3% sucrose (pH 6.0)

1.2.2 推定 CPA 生合成遺伝子の破壊カセットの作製

破壊の対象遺伝子は、表 1-3-1 に示した *cpaR* から *cpaT* までの 7 遺伝子とし、各遺伝子の破壊カセットを fusion PCR 法により作製した(図 1-2-1)。まず、*A. oryzae* NBRC4177 株由来のゲノム DNA を鋳型とした First PCR を行い、破壊対象遺伝子の上流領域を増幅するプライマーセット(X-LU および X-LL)により増幅した 5' region、下流領域を増幅するプライマーセット(X-RU および X-RL)により増幅した 3' region、選択マーカーである *pyrG* を増幅するプライマーセット(X-PU および X-PL)により増幅した *pyrG* をそれぞれ調製した。次に、これら 3 つの PCR 産物の混合液を鋳型とし X-LU および X-RL のプライマーセットを用いた Second PCR (fusion PCR)を行い、得られた PCR 産物を各遺伝子の破壊カセットとして使用した。上記の“X”は各破壊対象の遺伝子名を示す。各遺伝子の破壊カセット作製に使用したプライマーを表 1-2-1 に示す。

First PCR



Second PCR (fusion PCR)



Transformation

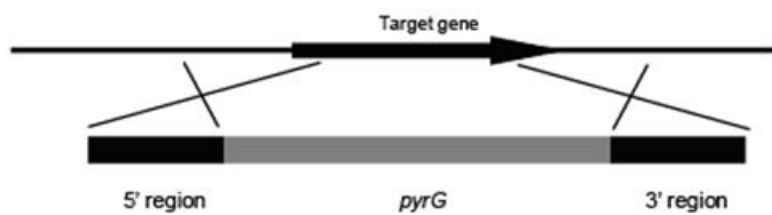


図 1-2-1 Fusion PCR 法による遺伝子破壊カセットの作製および形質転換スキーム

表 1-2-1 遺伝子破壊カセット作製に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	purpose
cpaD-LU	CTGCCAAAGCCCTTCTACGTGCTGAGTC	5' region of <i>cpaD</i>
cpaD-LL	<u>GTACGTCTGTTGTGGCAGCCTTGATTGCGTCAAACATGAG</u>	
cpaD-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTGCCACTCCACTGGCAATCCTCGAGGAG</u>	3' region of <i>cpaD</i>
cpaD-RL	GCAGCAGCACTGAACGCTTCGAAGGTATG	
cpaD-PU	<u>TGACGCAATCAAGGCTGCCACAACAGACGTACCCTGTGATGTTT</u>	<i>pyrG</i> amplification for <i>cpaD</i>
cpaD-PL	<u>GGATTGCCAGTGGAGTGGCAACTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG</u>	
cpaO-LU	TCTTTCCACCGTCGCCTATCTTGCTTTG	5' region of <i>cpaO</i>
cpaO-LL	<u>GTACGTCTGTTGTTCCAGGACATCGCCAGATGTGTGAG</u>	
cpaO-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTCGGCTGCCTTGAATGAGGGCTACGTC</u>	3' region of <i>cpaO</i>
cpaO-RL	CCCCACAGCAAGGTCGAGTAATCTGAC	
cpaO-PU	<u>ATCTGGCGATGTCCTGGAAACAACAGACGTACCCTGTGATGTTT</u>	<i>pyrG</i> amplification for <i>cpaO</i>
cpaO-PL	<u>CCCTCATTCAAGGCAGCGGAAGTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG</u>	
cpaH-LU	CGGTTGCTTGCGAAGGGATTTTCAGATG	5' region of <i>cpaH</i>
cpaH-LL	<u>GTACGTCTGTTGTTGGCGCTAAGAGCTGTTGCTGTCGCTCTC</u>	
cpaH-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTGAACGAAAATGCCAAGCGCAAAGTCATC</u>	3' region of <i>cpaH</i>
cpaH-RL	CTCTGATCCAGGGGCTAGCTCCCAATC	
cpaH-PU	<u>GCAACAGCTCTTAGCGCCACAACAGACGTACCCTGTGATGTTT</u>	<i>pyrG</i> amplification for <i>cpaH</i>
cpaH-PL	<u>GCGCTTGGCATTTCGTTCAACTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG</u>	
cpaM-LU	GCGAATATCCCTCCTTCACTCAACCACAAC	5' region of <i>cpaM</i>
cpaM-LL	<u>GTACGTCTGTTGTGGTAAGCCACTTCTTGCCCTGAGATCTTC</u>	
cpaM-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTACATTTGGCCTTCTTGACATGCTGATC</u>	3' region of <i>cpaM</i>
cpaM-RL	CGCTCAAACGAATCGAAATCCATACAC	
cpaM-PU	<u>GGGCAAGAAGTGGCTTACCACAACAGACGTACCCTGTGATGTTT</u>	<i>pyrG</i> amplification for <i>cpaM</i>
cpaM-PL	<u>GTCCAAGAAGGCCAAATGTAAGTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG</u>	
cpaT-LU	AACAGGGAGAGGGACCAGCAGAGAAGAC	5' region of <i>cpaT</i>
cpaT-LL	<u>GTACGTCTGTTGCTTGTCCAGCGTTACCTCCACTGAG</u>	
cpaT-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTGTGCGCTTGTCTCGCTATACACAGGTAAG</u>	3' region of <i>cpaT</i>
cpaT-RL	CAAACCACCGGGAGGCCCTAAACTAT	
cpaT-PU	<u>GAGGTGAACGCTGGACAAGACAACAGACGTACCCTGTGATGTTT</u>	<i>pyrG</i> amplification for <i>cpaT</i>
cpaT-PL	<u>ATAGCGAGAACAAGGCGACAAGTGCACCTCAGAAGAAAAGGA</u>	
cpaR-LU	GAGCATTACTCTCCCACCAGCAGAAATACAG	5' region of <i>cpaR</i>
cpaR-LL	<u>GTACGTCTGTTGTCATCAGTACGCAATCGGAATCAAGTTG</u>	
cpaR-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTCGGCGCTGGCTTTAACGTTCACTAC</u>	3' region of <i>cpaR</i>
cpaR-RL	CATTCCCACCCTTGCACGAAACAGAC	
cpaR-PU	<u>CCGATTTGCGTACTGATGGACAACAGACGTACCCTGTGATGTTT</u>	<i>pyrG</i> amplification for <i>cpaR</i>
cpaR-PL	<u>AACGTTAAAGCCAGCGCGGAAGTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG</u>	

¹ Underlined sequences represent the additional nucleotides for fusion PCR

1.2.3 形質転換による遺伝子破壊株の作製

CPA 生産菌である *A. oryzae* NBRC4177 株由来の Akp4177 (*ku70::ptrA* Δ *pyrG*)株を宿主に用いた[49]。1.2.2 で作製した各遺伝子破壊カセットを用いプロトプラスト-PEG 法による形質転換を Tokuoka ら[49]の方法に準じて行った。形質転換体のセレクションは 1.2 M ソルビトールを含む Cz 寒天培地(1.5% Agar)を用いた。また、サザンブロット法を用いて、得られた形質転換体の目的遺伝子が破壊されていることを確認した。

1.2.4 遺伝子破壊株の代謝物解析

各遺伝子破壊株およびコントロール株として Ak4177 株(Akp4177 株の *pyrG* 相補株)をそれぞれ CYA 寒天培地(1.5% agar)に植菌し 30 °C で 1 週間培養した。培養終了後、直径 6 mm のコルクボーラーを用いて菌体ごと培地をくり抜いたプラグ 3 つに抽出溶媒(1%ギ酸含有メタノール:ジクロロメタン:酢酸エチル =1:2:3)を 0.8 mL 加え、15 分ソニケーションを行った後に 15 分室温で静置した。得られた抽出液の遠心上清を LC-MS に供した。LC-MS は表 1-2-2 に示す条件で行った。

表 1-2-2 LC-MS 測定条件

HPLC	Agilent 1100 Series
column	L-column 2 (2.1 mm × 100 mm with a 3 mm particle size)
column temperature	40 °C
flow rate	200 μ l/min
injection volume	10 μ l
Solvent A	0.1% (v/v) formic acid-water
Solvent B	0.1% (v/v) formic acid-acetonitrile
gradient condition	t = 0 min, 95% A; t = 5 min, 95% A; t = 25 min, 5% A; t = 35 min, 5% A; t = 36 min, 95% A
MS	QSTAR Elite
ion source	ESI (positive mode)
ESI spray voltage	5,500 V
capillary temperature	450 °C

1.2.5 代謝物の単離・精製

A. oryzae NBRC4177 株を Ohmomo ら[51]記載の培地(3% mannitol, 1% glucose, 1% succinate, 0.1% KH₂PO₄, 0.03% MgSO₄, pH 5.6)にて 30 °C で 1 週間培養した。培養終了後、培養液をミラクロースでろ過し培養上清を得た。得られた培養上清を Sep-Pack Vac C18 カートリッジ(10 g, Waters)を用いた固層抽出により分画し、**4** が含まれる画分(20%~50%アセトニトリル画分)を、HPLC を用いて精製した。HPLC の条件は以下の通りとした。

column: COSMOSIL 5C18-AR-II (20 × 250 mm, Nacalai Tesque), flow rate: 5 ml min⁻¹, solvent A: 0.1% (v/v) formic acid-30% acetonitrile, solvent B: 0.1% (v/v) formic acid-100% acetonitrile, gradient condition: t = 0 min, 100% A; t = 10 min, 100% A; t = 60 min, 50% A; t = 61 min, 100% A; t = 81 min, 100% A, UV detection: 280 nm

溶媒に重クロロホルムを用い、得られた **4** の ¹H-NMR (共鳴周波数 500 MHz)、¹³C-NMR (共鳴周波数 125 MHz)、および二次元 NMR スペクトラム測定を行った。

1.2.6 筋小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害活性の検討

筋小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害活性は、蛍光 Ca²⁺指示薬である fluo-4 AM (Invitrogen)を用いて細胞内 Ca²⁺を測定することによって評価した。1 晩培養したヒト繊維肉腫細胞 HT1080 (1 × 10⁴ cell/well/200 μL)を、終濃度 5 μM の fluo-4 AM、および 0.03% Pluronic F-127 (Invitrogen)を含む Ca²⁺培地(20 mM HEPES, 138 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 20 mM glucose, pH 7.4)にて 37 °C で 1 時間処理した後に、細胞を PBS にて 2 回洗浄し fluo-4 AM を含まない Ca²⁺培地に置換した。30 分インキュベートした後に各種濃度の **4** を添加し、蛍光強度の変化を測定した。コントロールとして CPA

標品(Wako)も同様の方法で評価した。蛍光強度の測定には SpectraMax GeminiXP (Molecular Devices)を使用した(励起波長 485 nm、蛍光波長 520 nm)。

1.2.7 ノーザンブロット解析

cpaR 破壊株およびコントロール株、*A. oryzae* RIB40 株を CYA 培地で 48 時間培養し、ミラクロースを用いて菌体を回収した。得られた菌体は、直ちに液体窒素で凍結させ乳鉢を用いて粉末化した。粉末化した菌体に ISOGEN (Nippon Gene)を加えマニュアルに記載の方法で RNA を抽出した。RNA は DNase I (Takara Bio)で 37 °C で 1 時間処理した後に RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて精製した。方法はキットに記載の方法に従った。10 µg の RNA を 0.4 M ホルムアルデヒドを含む 1%アガロースゲルにて泳動し、Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences)にトランスファーした。ハイブリダイゼーションは DIG system (Roche Diagnostics)を用いて行い、検出用の Dig ラベルプローブは遺伝子破壊カセット作製時に使用した 5' region の増幅プライマー(表 1-2-1)を用いた PCR により作製した。

1.2.8 *Aspergillus tamarisii cpaM* のクローニングおよび形質転換

A. oryzae の配列情報を元に作製したプライマーを用い、speradine A (1-*N*-methyl-2-oxoCPA)生産菌である *A. tamarisii* NBRC4099 株の *cpaH* から *cpaT* までの約 6 kb のシーケンスを得た。得られたシーケンスに対し *A. oryzae cpaM* (*AocpaM*)の塩基配列をクエリーとした blast 検索を行い *A. tamarisii* の *cpaM* ホモログ(*AtcpaM*)の探索を試みた。その結果、推定通り、*AocpaM* と高い相同性を示す領域が確認できたため、これを *AtcpaM* とし、以下の解析を行った。まず、*AtcpaM* のコード領域とその上流 376 bp、下流 529 bp の領域を増幅するプライマーセット(*AtcpaM*-L および *AtcpaM*-R)を用いた PCR により、

約 2.5 kb の *AtcpaM* 増幅断片を調製した。次に、ピリチアミン耐性遺伝子(*ptrA*) を持つ染色体組込型シャトルベクター pPTR I (Takara Bio) をプライマーセット (pPTRI-L および pPTRI-R) を用いた PCR により線状化した。これに、上記の *AtcpaM* 増幅断片を連結し、*AtcpaM* 導入用ベクター (pPAtcM) を作製した。増幅断片の連結には In-Fusion クローニングキット (Takara Bio) を用い、方法はキットのマニュアルに従った。*A. oryzae* NBRC4177 株を宿主とし、得られた pPAtcM を用いた形質転換を 1.2.3 記載の方法で行った。形質転換体のセレクションは 1.2 M ソルビトールおよび終濃度 0.1 µg/ml のピリチアミンを含む Cz 寒天培地 (1.5% Agar) を用いた。得られた形質転換体に目的遺伝子が挿入されていることは *AtcpaM-L* および *AtcpaM-R* のプライマーセットによる PCR で確認した。各プライマーの配列を表 1-2-3 に示す。

表 1-2-3 *AtcpaM* クローニングに用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'-3')	Fragment
<i>AtcpaM-L</i>	<u>CCAAGCTTGCATGCC</u> TTTGGGTAGATTCAGGCGAACAGGTAGAC	<i>AtcpaM</i> and its flanking regions
<i>AtcpaM-R</i>	CCTCTAGAGTCGACC <u>GGCGGCTCTT</u> CCTGGTGACCCATG	
pPTRI-L	GGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCG	pPTRI fragment
pPTRI-R	GGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTC	

¹ Underlined sequences represent the additional nucleotides for In-Fusion cloning

1.3 結果

1.3.1 CPA 生合成遺伝子破壊株の代謝物解析

A. oryzae RIB40 株の塩基配列を元に作製したプライマーを用い、CPA 生産菌である *A. oryzae* NBRC4177 株の 3 番染色体末端領域のシーケンス解析を行った。この結果と Tokuoka ら[49]の先行研究により明らかにされている *cpaA* からテロメア領域までの塩基配列とを合せ約 35 kb の塩基配列を取得した (DDBJ アクセションナンバー : AB506492)。FGENESH ソフトウェア (Softberry)を用いて得られた塩基配列中の ORF を予測した結果、この領域中に *cpaA* を含め 7 つの ORF を見出した(図 1-3-1)。各 ORF の推定機能を表 1-3-1 に示す。

A. oryzae RIB40 株と *A. oryzae* NBRC4177 株が共通して保持する領域は、塩基配列が 100%一致するものの ORF 予測の結果に一部相違が見られ、*cpaT* と *cpaH* の間には、methyltransferase と弱い相同性を示す *cpaM* が存在している可能性が示唆された。本検討では、*cpaM* を含めた 7 遺伝子を CPA 生合成遺伝子クラスターであると推定し、各遺伝子の破壊株を作製した。

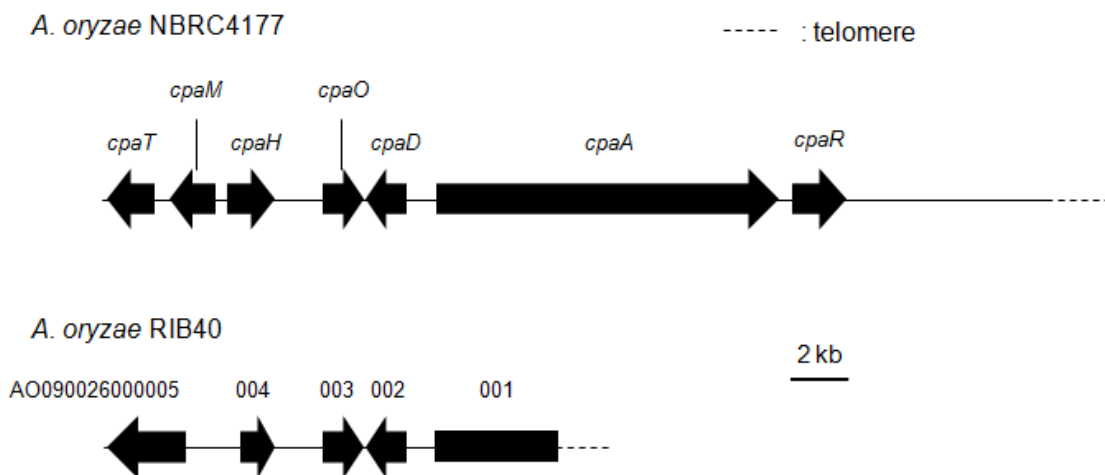


図 1-3-1 *A. oryzae* NBRC4177 株および RIB40 株の CPA 生合成遺伝子クラスター

表 1-3-1 各遺伝子の推定機能

Protein	Size (bp/aa)	Deduced function	orthologs in <i>A. oryzae</i> RIB40	Relatives (accession number, identities/positives [%])
CpaR	1853 /598	Transcription factor	NA	C6 transcription factor FarB from <i>A. nidulans</i> (ABD5199, 31/48)
CpaA	11724 /3907	PKS-NRPS hybrid	AO090026000001 (partial)	PKS-NRPS hybrid TENS from <i>Cordyceps bassiana</i> (CAL69597, 34/51)
CpaD	1370 /437	DMATS	AO090026000002	Trp-DMT FgaPT2 from <i>A. fumigatus</i> (EAL94103, 45/62)
CpaO	1368 /455	Oxidocyclase	AO090026000003	None ^b (FAD binding domain, PF00890 ^c)
CpaH	1650 /509	Cytochrome P450	AO090026000004	Isotrichodermin C-15 hydroxylase Tri11 from <i>Fusarium sporotrichioides</i> (O13317, 41/59)
CpaM	1574 /434	Methyltransferase?	NA ^a	None ^b (methyltransferase small domain, PF05175 ^c)
CpaT	1606 /496	Transporter	AO090026000005	MFS transporter protein CefM from <i>Acremonium</i> (CAJ77895, 46/66)

^a Part of the coding region of *cpaM* was found in the AO090026000005 sequence. ^b There was no relative protein with a known function in the database. ^c Pfam domain found in the sequence (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Abbr.: PKS, polyketide synthase; NRPS, nonribosomal peptide synthetase; DMATS, dimethylallyl tryptophan synthase; NA, not available.

各遺伝子破壊株の代謝物を LC-MS で解析した結果、*cpaA* 破壊株($\Delta cpaA$)は CPA とともに、その生合成中間体と推定されている cAATrp および β -CPA に相当する m/z 337 $[M + H]^+$ (CPA, **1**)、 m/z 271 $[M + H]^+$ (cAATrp, **2**)、 m/z 339 $[M + H]^+$ (β -CPA, **3**)の 3 つのピークが全て消失した(図 1-3-2 A)。一方、*cpaD* 破壊株 ($\Delta cpaD$)では、**2** が蓄積し、**3** および **1** が消失、*cpaO* 破壊株($\Delta cpaO$)では、**3** の蓄積と **1** の消失が確認された。これらの結果から、PKS-NRPS をコードする CpaA によって生合成された **2** が DMATS をコードする CpaD により **3** に変換され、最後に oxidocyclase をコードすると考えられる CpaO によって **3** が **1** に変換されているものと考えられた。この結果は過去に推定されていた CPA の生合成経路とよく一致する。また、*cpaR*、*cpaM*、*cpaT* の 3 遺伝子の破壊株($\Delta cpaR$ 、 $\Delta cpaM$ 、 $\Delta cpaT$)は、上記の **3** 化合物いずれもコントロール株と同程度の産生量を示すことから、これらの遺伝子産物は CPA の生合成に関与していないと考えられた(図 1-3-2 B)。一方、興味深いことに *cpaH* 破壊株($\Delta cpaH$)では m/z 353 (**4**)の未知化合物のピークが消失するとともに **1** の蓄積が確認された(図 1-3-2 A)。この **4** は **1** が消失する $\Delta cpaA$ 、 $\Delta cpaD$ 、 $\Delta cpaO$ の 3 株でも同様に消失することから、CPA の誘導体である可能性が考えられた。*cpaH* が cytochrome p450 をコードすると予測されていること、**4** (m/z 353)と CPA (m/z 337 $[M + H]^+$)との質量差が一酸素原子の付加(+16)に相当することから、**4** は CPA の酸化物である可能性が示唆された。

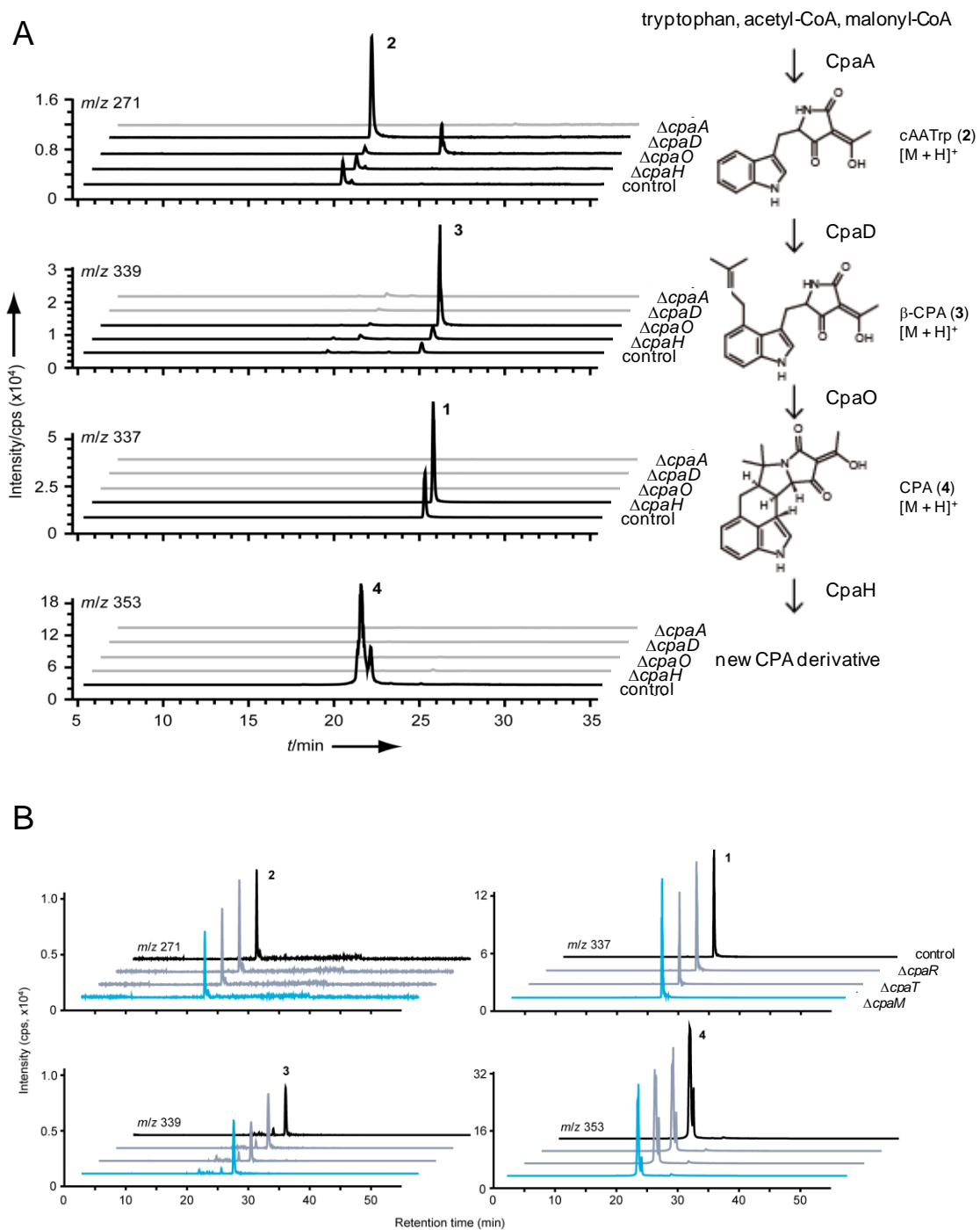


図 1-3-2 LC-MS による各破壊株の代謝物解析

m/z 271 [M + H]⁺ (cAATrp; **2**)、 m/z 339 [M + H]⁺ (β-CPA; **3**)、 m/z 337 [M + H]⁺ (CPA; **1**)および m/z 353 (**4**)の抽出イオンクロマトグラム。コントロールには Ak4177 株を用い、同様の条件下で代謝物解析を行った(control)。

A) *cpaA*, *cpaD*, *cpaO*, *cpaH* 破壊株の代謝物解析。

B) *cpaR*, *cpaT*, *cpaM* 破壊株の代謝物解析。

1.3.2 2-oxocyclopiazonic acid の同定および生物活性の検討

A. oryzae NBRC4177 株の代謝物から **4** を単離・精製し、各種 NMR による構造解析を行った。その結果、**4** は CPA の 2 位の炭素がカルボニル化した化合物(2-oxocyclopiazonic acid; 2-oxoCPA)であることが明らかになった(図 1-3-3、表 1-3-2)。

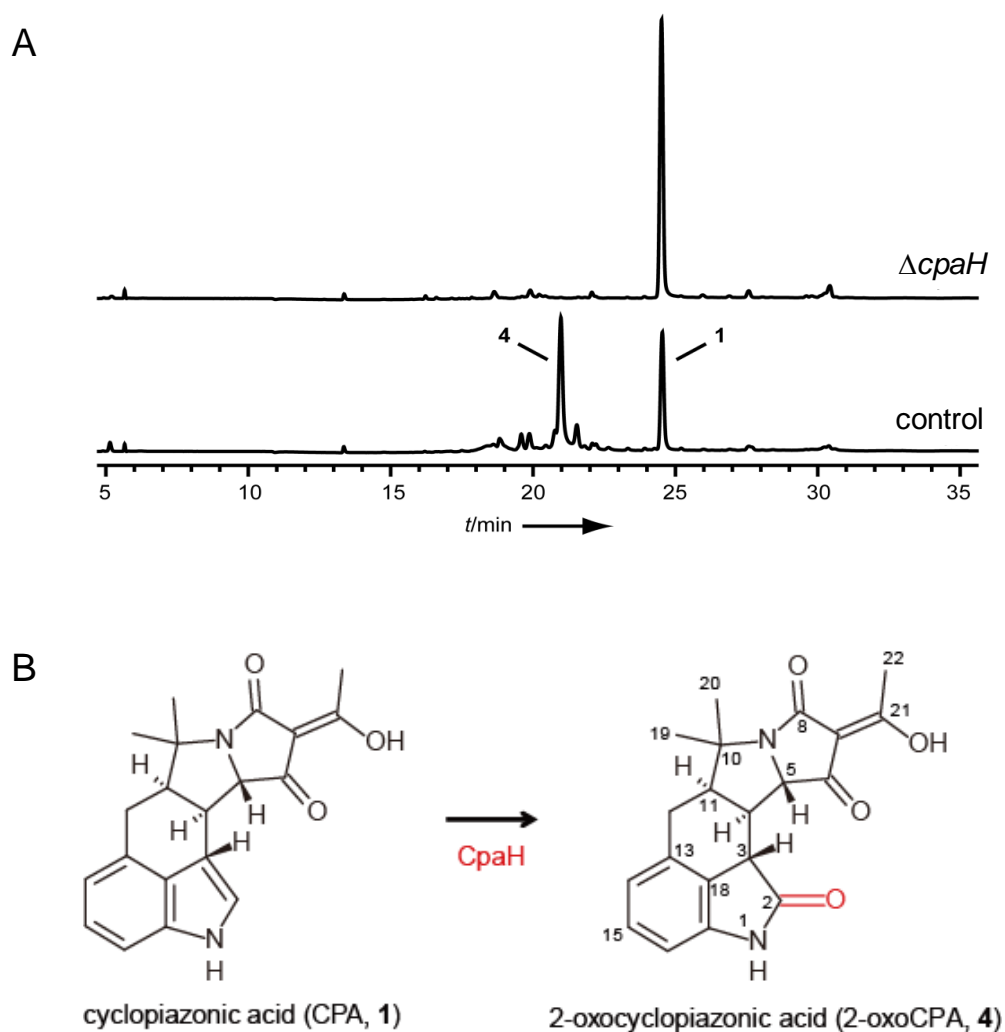


図 1-3-3 新規 CPA 誘導体の解析

A) *cpaH* 破壊株の代謝物プロファイル(A₂₈₀)。コントロールには Ak4177 株を用い、同様の条件下で代謝物解析を行った(control)。

B) 新規 CPA 誘導体(2-oxoCPA)の構造および生合成経路。

表 1-3-2 2-oxocyclopiazonic acid の ^{13}C (125 MHz) および ^1H (500 MHz) NMR スペクトルデータ (CDCl_3)

2-oxocyclopiazonic acid (4)		
No.	^{13}C	^1H (J in Hz)
1	-	7.95
2	179.8	-
3	43.5	3.53, d (6.0)
4	37.8	2.62, m
5	71.5	4.23, d (10.1)
6	193.9	-
7	104.8	-
8	173.3	-
9	-	-
10	62.3	-
11	55.1	2.13, m
12	27.8	2.74, dd (5.0, 14.7) 2.61, m
13	135.4	-
14	120.2	6.83, d (7.8)
15	128.3	7.12, t (7.8)
16	107.6	6.74, d (7.8)
17	139.6	-
18	126.8	-
19	24.8	1.50, s
20	26.4	1.59, s
21	193.3	-
22	19.6	2.43, s

次に、CPA の 2-oxoCPA への変換がヒトに及ぼす影響を検討するため、CPA の毒性の作用機序として知られる筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害活性[13]をヒトの繊維肉腫細胞 HT1080 を用いて測定した。筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase はカルシウムポンプとして機能しており、細胞質に放出された Ca^{2+} を小胞体内へ能動輸送する役割を担っている[13]。つまり、この筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase が阻害されると小胞体内への Ca^{2+} の取り込みが阻害され、これにより細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇する。そこで、CPA および 2-oxoCPA 添加による細胞質内の Ca^{2+} 濃度の上昇を測定することで、両化合物の Ca^{2+} -ATPase の阻害活性を評価した。その結果、CPA および 2-oxoCPA は濃度依存的に Ca^{2+} の小胞への取り込みを阻害し、細胞質内の Ca^{2+} 濃度が増加することを確認した。両化合物の EC_{50} は、CPA が 10.6 μM であるのに対し 2-oxoCPA は 49.4 μM であり CPA のそれと比較し、約 1/5 に低下していることが明らかになった(図 1-3-4)。

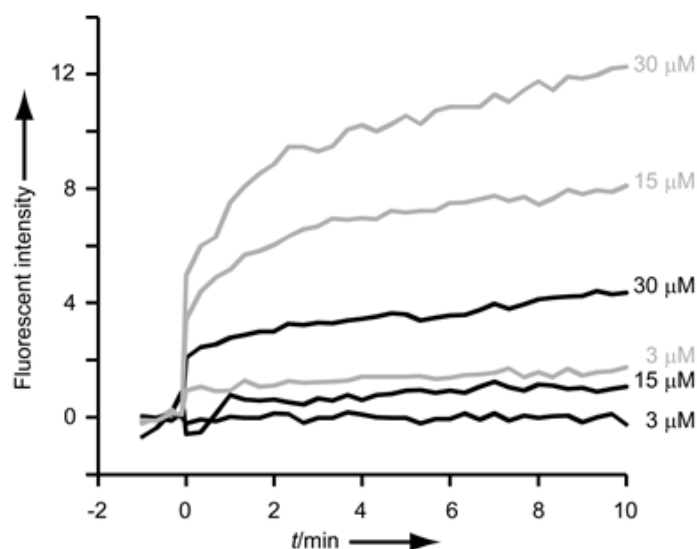


図 1-3-4 CPA (1)および 2-oxoCPA (4)の Ca^{2+} -ATPase 阻害活性

CPA (灰色)および 2-oxoCPA (黒)添加時の細胞質内の Ca^{2+} 濃度の変化を蛍光 Ca^{2+} 指示薬(fluo-4)を用いて測定した。データは独立して実施した 4 回の試験の平均値で示した。

1.3.3 CPA 生合成遺伝子の転写量解析

二次代謝産物の生合成遺伝子は、クラスターに隣接して存在する転写因子によりクラスター遺伝子群の転写が制御されている例が多く報告されている。ゲノム解析の結果から *A. oryzae* NBRC4177 株は *cpaA* に隣接して Zn_2 -Cys₆ タイプの DNA 結合ドメインを有する転写因子 *cpaR* がコードされることが示唆されているものの、破壊株の結果では、CpaR は CPA 生合成系に関与していないとの結果が得られている。そこで、CPA 生合成遺伝子群の転写制御への CpaR の関与を検証するためノーザンブロット解析を行った。その結果、 $\Delta cpaR$ は *cpaA*、*cpaD*、*cpaO* および *cpaH* いずれもコントロール株と同程度の転写量を示した。また、先行研究[49]においてテロメアの付加により *cpaR* を完全に欠失していることが報告されている *A. oryzae* RIB40 株(図 1-3-1)においても上記の 4 遺伝子の転写が確認された。以上の結果から CpaR は CPA 生合成遺伝子クラスターの転写制御に関与しないことが明らかになった(図 1-3-5)。

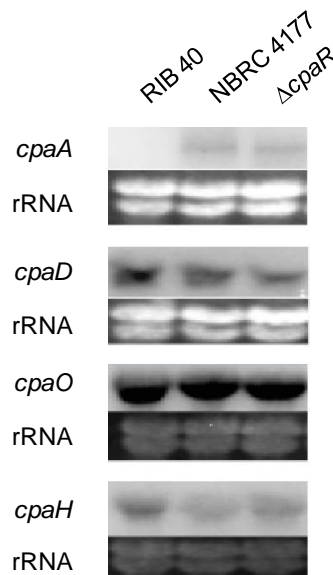


図 1-3-5 CPA 生合成遺伝子群の転写解析

CYA 培地で 48 時間培養した菌体から抽出した RNA 10 μ g を解析に供し、ノーザンブロット法を用い *cpaA*、*cpaD*、*cpaO*、*cpaH* の 4 遺伝子の発現量を検討した。各サンプルの RNA の状態は、エチジウムブロマイド染色による rRNA を用いて評価した。

1.3.4 *AtcpaM* の機能解析

破壊株の解析から、methyltransferase と弱い相同性を示す *cpaM* は CPA 生合成系には関与しないとの結果が得られている。一方で、*A. oryzae* の近縁種である *A. tamarii* から 2-oxoCPA の 1 位の窒素がメチル化された化合物 speradine A (1-*N*-methyl-2-oxoCPA) の単離報告がなされている[24]。この知見から、本来、*cpaM* は 2-oxoCPA のメチル化に関与するものの *AocpaM* がその機能を喪失している可能性を考えた。この仮説を検証するため、次に、*A. tamarii* の *cpaM* ホモログ(*AtcpaM*)の機能解析を試みた。まず、*A. oryzae* のゲノム配列情報を基に設計したプライマーを用いて speradine A 生産菌である *A. tamarii* NBRC4099 株の *cpaH* から *cpaT* までの領域をクローン化し、シーケンス解析により、約 6 kb の塩基配列を決定した。得られた配列全長を *A. oryzae* の配列と比較したところ、同一性は 78.9% であり、*A. tamarii* の *cpaM* (*AtcpaM*) と *A. oryzae* の *cpaM* (*AocpaM*) の同一性は 83% であった。*A. tamarii* の形質転換系が未構築であったため、*AtcpaM* を *A. oryzae* NBRC4177 株に導入することで *AtcpaM* の機能解析を行った。得られた *AtcpaM* 発現株(PAtcM-5 株および PAtcM-6 株)の代謝物解析の結果、いずれの株の代謝物からも speradine A に相当する m/z 367 [M + H]⁺ のピークが検出された(図 1-3-6 A)。更に、MSMS 解析を用い、このピークのフラグメントパターンを解析した結果、speradine A 標品のそれと一致した(図 1-3-6 B)。以上の結果から、推定通り *AtcpaM* は 2-oxoCPA の 1 位の窒素のメチル化反応を触媒し、speradine A の生合成に関与することが強く示唆された(図 1-3-6 C)。

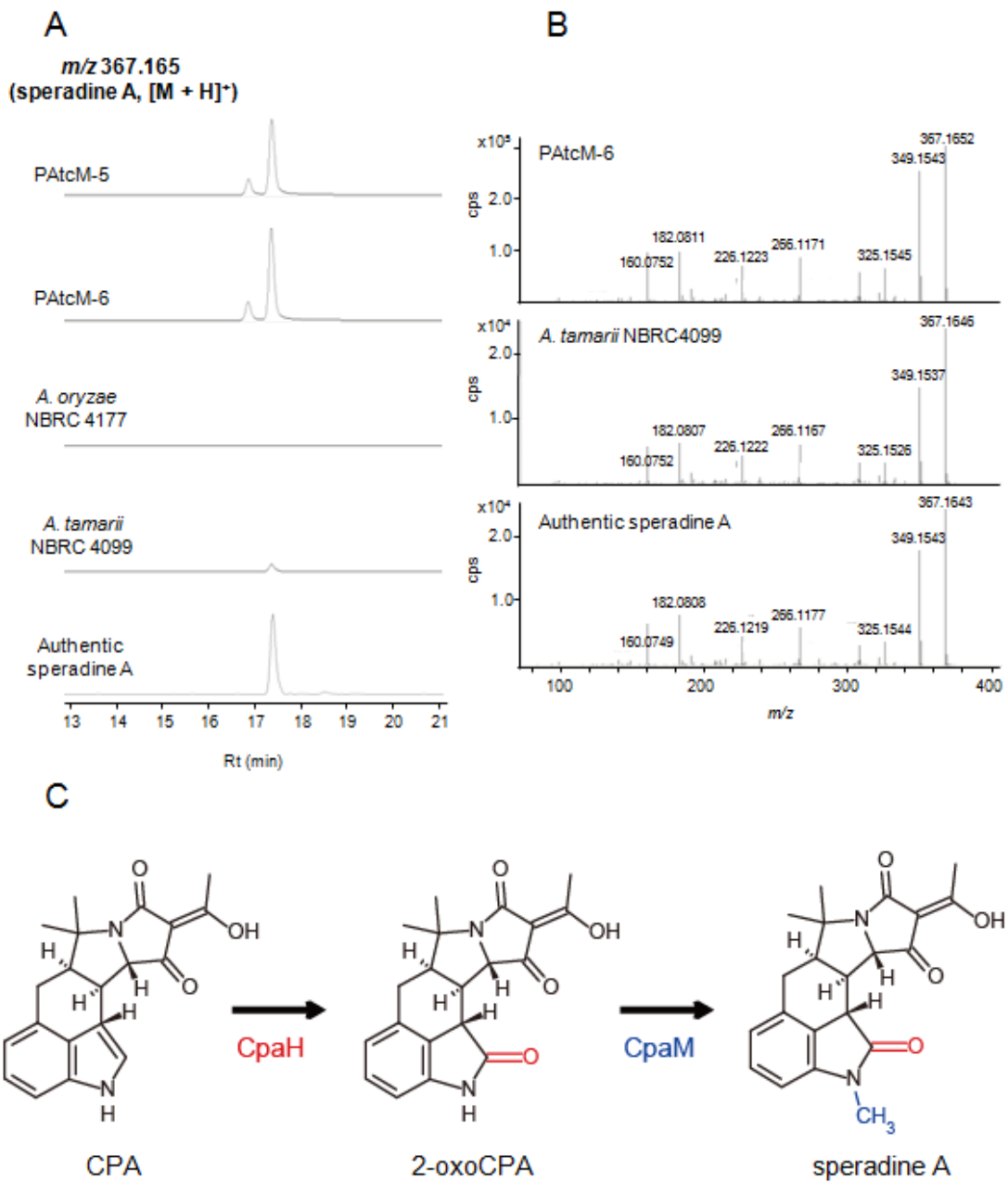


図 1-3-6 *AtcpaM* の機能解析

- A) m/z 367 $[M + H]^+$ (speradine A) の抽出イオンクロマトグラム。
B) m/z 367 のシグナルを示すピークの MSMS 解析。
C) speradine A の生合成経路。

1.4 考察

CPA 生産菌である *A. oryzae* NBRC4177 株の CPA 生合成遺伝子クラスターの遺伝子破壊株の解析から、CPA の生合成には *cpaA*、*cpaD*、*cpaO* の 3 遺伝子が必須であることを明らかにするとともに、*A. oryzae* は CPA 生合成遺伝子クラスター内に cytochrome P450 をコードする *cpaH* 遺伝子を保持しており、CPA 生合成系の最終生合成産物として 2-oxoCPA を産生することを明らかにした。更に、*A. oryzae* の近縁種である *A. tamarii* が産生することが知られていた speradine A (1-*N*-methyl-2-oxoCPA) の生合成に methyltransferase をコードする *cpaM* が関与することを明らかにした。*AtcpaM* 遺伝子を導入した *A. oryzae* の代謝物中には、1-*N*-methyl-CPA に相当する m/z 351 [M + H]⁺ のピークが検出されなかったことから、CpaM は 2-oxoCPA を基質として speradine A を産生するものと推測される。また、*AocpaM* と *AtcpaM* の cDNA 配列を比較したところ *AocpaM* は開始コドンから 1,158 bp 下流に 4 塩基の欠失が確認された(図 1-4-1)。この欠失に伴うフレームシフトにより、*AocpaM* は *AtcpaM* に比べアミノ酸長が約 70 残基ほど短くなっており、これが原因で *AocpaM* は methyltransferase としての機能を喪失している可能性が考えられる。

```

AtcpaM 1 ATGAAGATCGGACTTCTSGTTTTACGCGGAGATSCBSTAGAGGAGGGCCAGTATTATCGATCTAGTCGCTATATACC
AocpaM 1 ATGAAGATGGGCTTCTAGTTTTACGCGGAGATCCBTAGAGGSG---CCAGTSTTETCGATCTAGTAGCTATATACC

AtcpaM 81 TCAGTCTCGTCATCAATTTAGACCCDTTACATAGCAAGTCTAAGCCGAGGSCAGATATCGACGACATCTGCAAGATG
AocpaM 78 TCATCTCGTCATCASTTCGAGACCCSTTACATAGCAAGTCCGAGSGCGAAGCTGSGATCGATAGATCTGCAAGATG

AtcpaM 161 ACTATACATGSTTCTGAATTATATGACGGCAGAGTCCGSCCGATGATGTTSCAACAGTGGCAGCSATCACAGATATCTC
AocpaM 158 AETTTACATGCTCTGAATTATATGACGGTAGAGTCCGTCCGATGATGTTCAACAGTGGCAGCSATCACAGATACCTC

AtcpaM 241 GAGGCGAAAGATATCTCACTTCTCAACCGTCCCTTCTCACTCAATCCACGACGCGGGGAGAAGAACCAATCGTITCCG
AocpaM 238 GAGGCGAAAGATATCACTTCTCAACAGTCCATGCTCACTCAATCACCACGCGGGGAGAAGAACSCSTCGCTTCCG

AtcpaM 321 AACGTGATAAACGACACCCGAACTGSAACTGGAACTCTTAGGGCAGCAGGTGGSTCAATCCTAGCCATGGASATGGGTG
AocpaM 318 AATTCGATAAAGSCTCAGAAITGAACTGGAASTCTCAGGGCAGAAAGTGGCTTACCTAGCCATGGATATGGGTC

AtcpaM 401 GAGAGGAGATGGTGTTTAGTCCCTGCTCAATSCSGTACCTCCGATGCTTGTATGGAGACAACTACATCCSCATCGACA
AocpaM 398 GAGAGGCCATGTCCTTTAGTCCCGSTCAATTCACCTACCTCGATGCTCTTGTATCAGAGAGATTTACATCCSCATCGACA

AtcpaM 481 GATTTTGCCTGGGTAAAGAGGSCCCCTTGCACTCCATGCTGAAGTCTATGGCGTTGGATGTGCTGAAGTGTCTCTGTGG
AocpaM 478 GACTTCACCTGGGTCAAGGAGATCCCTTGAAGTCCATGTTGAAGTCTATGGCGTTGGATGTTTGAAGGCTCTGTGGG

AtcpaM 561 TGGATTTGTGCTGTGTGAGGCTTCAATTGAATTCASAGGCTGACAGTATGTACTGGAGGGTCTCTTGTCTCTCCICGG
AocpaM 558 TGGCTTTGTGTGTGTAGAGGCTTCACTCCAGGCAAGGCTGACAGTATGTACTGGAGGGTCTCTCTGTCTCTCCICGG

AtcpaM 641 CTTTTTACCGCGAGGGTTTACACATACGAGGACGTGTTATCMAAAGAGAGTTTCCTGGCGGACATATGGCAITCTTG
AocpaM 638 CTTTTTACCGCGAGAGCACACACATACGAGGACGTAGTATCSAAAGAGAGTTTCCTGGTGGACATATGGCTTCTTG

AtcpaM 721 GACATGCTGATCACCAGTCAACAGATCCGCTCGGGTCAGGATCACGCCCGGAATCAACACTTGGCSGGCGTTTATGACGG
AocpaM 718 GACATGCTGATCACCAGTCAACATCCGCTCGGGTCAGGATCACGCCCGGAATCAACACTTGGCCGGCGTTTATGACAG

AtcpaM 801 CTTTGGCCCTCGSTACCATGCTGCTCGSGCCAAATCTGGGCTGAGTCCSATGCAGGAAAGCATGAGCCGAGACTACGATT
AocpaM 798 CTTTGGCCCTCGSTACCATGCTGCTCGAGCCAAATCTGGGCTGAGTCCSATGCAGGAAAGCATGAGCCGAGACTACGATT

AtcpaM 881 TCTCSGGAACAGTCTCTGATCTCGCGTGTGGCAACGGTGAATTCGGSGCCACCTTCAATGACATGGCGTCTCTGCAAAA
AocpaM 878 TCTCTGGAACAGTCTCTGACTCTCGCGTGTGGCAACGGSGAATTTGGTGCCACTCTCAACGAAATGGCGTCTCTCGCAAA

AtcpaM 961 GTCACATGGCATCGACGTCCTCGAGGGGATGACCCGATCGTCATACATTGAGGATCACTACGAGAAAACCGCTCTGTATCGG
AocpaM 958 GTCACATGGCATCGACGTCCTCGAGGGGATGACCCGATCGTCATACATTGAGGATCACTACGAGASGCGCTCTGTATCGG

AtcpaM 1041 GCCCATGGACGAACTTATCATGAGCATGCCTGAATTCGACCATGTGGTTTGTTCGCGGCATTTAGTITTTAGACCCCG
AocpaM 1038 GCCCATGGACGAACTTATCATGAGCATGCCTGAATTCGACCATGTGGTTTGTTCGCGGCATTTAGTITTTAGACCCCG

AtcpaM 1121 TCCACTTGACTGCGTCTTTAGCTCGCATGTTTATGTTGTCAGAAAGTCGGTGAATGCGATCCATGAGGACCTTAGTGAG
AocpaM 1118 TCCACTTGACTGCGTCTTTAGCTCGCATGTTTATGTTGCTCAGAAAGTCGGTGAATGCGATCCATGAGGACCTTAGTGAG
-----AGTCGGTGA-----

AtcpaM 1201 GCATACATTGAAAATATGAGAGAAGCGCAACGGTGAAGTGTGTAGTAATTTCAATCAGGTCTCTACCCTAGAGGACTTTGG
AocpaM 1167 -----

AtcpaM 1281 TGTACCTAATGGTTGGAAGCAAGTTCTCATGGAACGTTTCCCCTTATATGATAATCCTAATCGGGGGACACTGTGTATG
AocpaM 1167 -----

AtcpaM 1361 GATTTGCCGTTTCGTTTTGAGAGAACATAA
AocpaM 1167 -----

```

<i>AtcpaM</i>	<u>CGC</u>	<u>ATG</u>	<u>TTC</u>	<u>ATG</u>	<u>ATT</u>	<u>GCT</u>	<u>CAG</u>	<u>AAG</u>	<u>TCG</u>	<u>GTG</u>	<u>ACT</u>
	R	M	F	M	I	A	Q	K	S	V	T	
<i>AocpaM</i>	<u>CGC</u>	<u>ATG</u>	<u>TTC</u>	<u>ATG</u>	<u>GTT</u>	<u>GCC</u>	<u>AGT</u>	<u>CGG</u>	<u>TGA</u>			
	R	M	F	M	V	A	S	R	*			

図 1-4-1 *cpaM* cDNA のアラインメント

*AtcpaM*と*AocpaM*のcDNA配列のアラインメント。*AocpaM*は開始コドンから1,158 bp 下流に4塩基(CAGA)の欠失が存在する。この欠失に伴うフレームシフトにより、6塩基下流に stop codon が入る。

一方、*A. oryzae* の野生型であると考えられている *A. flavus* のゲノム解読株 NRRL3357 は、*cpaH* および *cpaM* に相当する ORF が予測されていない[50]。両者の CPA 生合成遺伝子クラスターを比較すると、*A. oryzae* の *cpaO* から *cpaT* までの領域が約 8 kb であるのに対し、*A. flavus* NRRL3357 株の同領域は約 6 kb であり、*A. oryzae* に比べ 2 kb ほど短い。この領域をドットプロット解析に供したところ、*A. flavus* は *cpaH* および *cpaM* がコードされている領域に 500 bp 程度のモザイク状の断続的な相同領域を保持していることが明らかになった(図 1-4-2)。種分化後に *A. oryzae* および *A. tamarii* が *cpaH* および *cpaM* を獲得したと考えると、断続的に見られる相同領域の説明が付かないことから、*A. flavus* NRRL3357 株がこれらの領域を欠失した可能性が高いと考えられる。

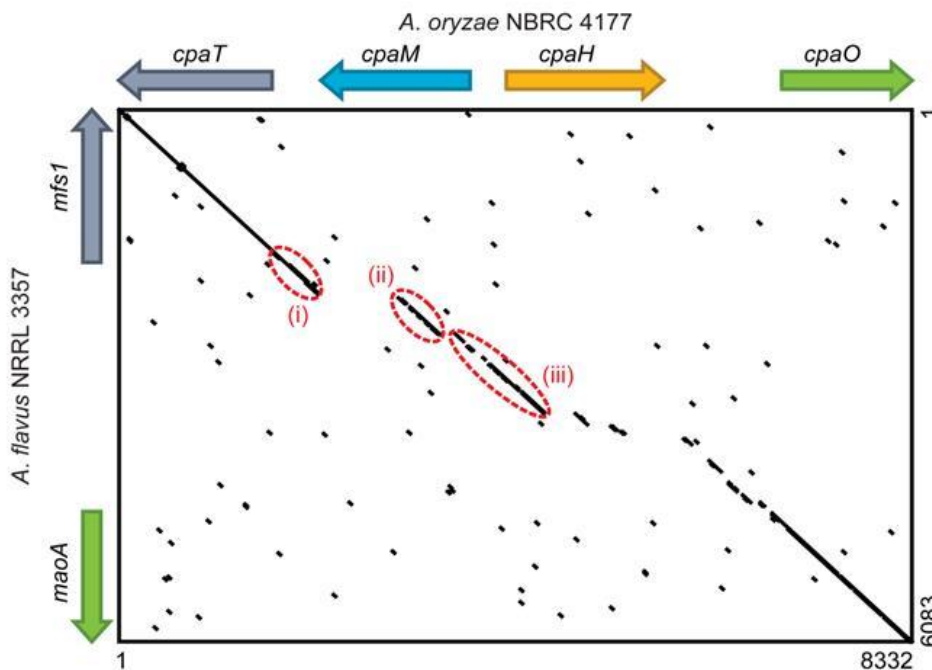
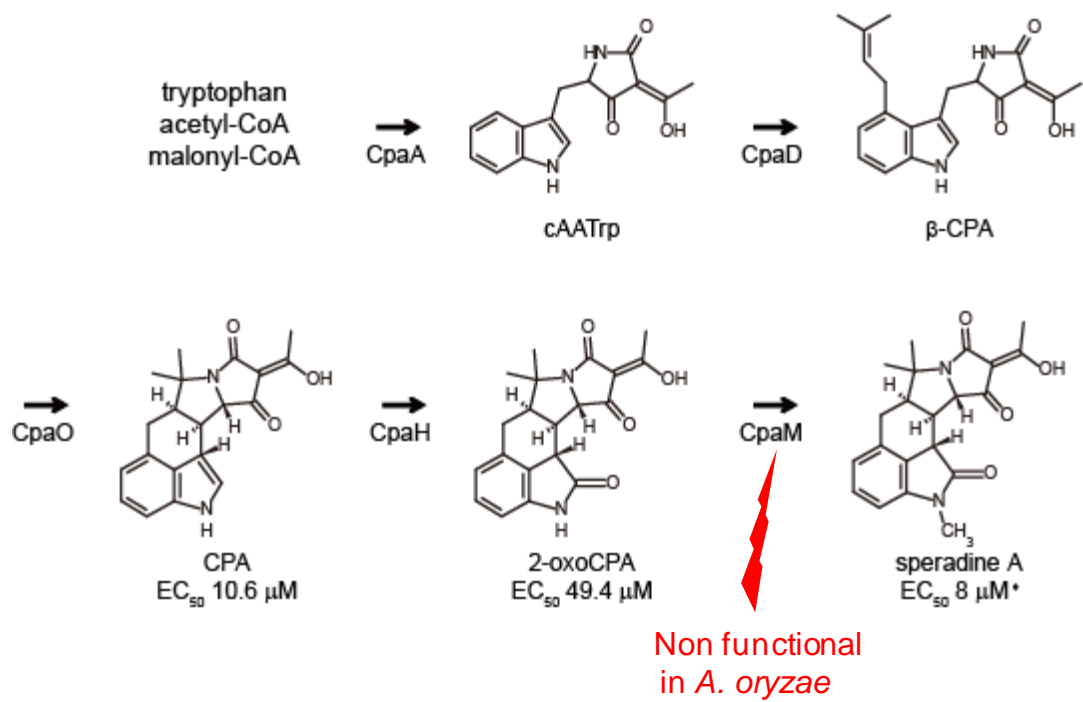


図 1-4-2 ドットプロット解析

A. oryzae の *cpaO* から *cpaT* までの領域 8.3 kb と *A. flavus* の対応する領域 6.1 kb を比較した。赤丸で囲んだ 500 bp 程度の相同領域が 3 カ所存在する。

以上の結果から、*Aspergillus section Flavi* における本来の CPA 生合成系は、CpaA、CpaD、CpaO、CpaH、CpaM の 5 つの酵素反応によって構成され、その生合成経路の最終生合成産物が speradine A であるものの *A. oryzae* では CpaM の機能喪失により 2-oxoCPA が最終生合成産物となっていることが強く示唆される(図 1-4-3)。また、*A. flavus* のゲノム解読株 NRRL3357 は、CpaM に加え CpaH も機能を喪失しているため CPA が最終生合成産物となっていることが示唆される。この 3 化合物の筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害活性の比較から 2-oxoCPA は、ヒトに対する毒性の最も低い化合物である可能性が高く、*A. oryzae* が CpaM の機能を喪失すると共に CpaH を保持しているという結果は、醸造用微生物としての家畜化の産物の一つであるとも考えられ非常に興味深い。

本章の検討によりアフラトキシンに続き、CPA の生合成遺伝子クラスターについても、その全容が明らかになった。一方で、序論でも述べた通り、*A. oryzae* のゲノム中には、生合成産物が明らかになっていない二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが、多数存在する。第 2 章では、*A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーを用い、二次代謝産物産生に関与する転写因子の探索ならびに、その制御下にある二次代謝産物の同定を試みた。



*Tsuda et al: Tetrahedron, 59, 3227-3230, (2003) [24]

図 1-4-3 *Aspergillus section Flavi* における CPA 生合成系

CPA および 2-oxoCPA、speradine A の Ca²⁺-ATPase 阻害活性(EC₅₀)を各化合物の下に示した。

第2章 二次代謝産物産生プロファイルによる *A. oryzae* 転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニングおよび *astellolides* 高生産株の同定

2.1 序

序論で述べた通り、*A. oryzae* は、これまで考えられてきた以上に多くの二次代謝産物の生合成遺伝子とそのゲノム中に保持していることが推定されている。2010年に報告された Secondary Metabolite Unknown Regions Finder (SMURF) と呼ばれる真菌の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの予測ソフトを用いた解析結果では、*A. oryzae* が 69 個ものバックボーン遺伝子をゲノム中に保持しているとの報告がなされている[43] (表 2-1-1 および表 2-1-2)。この数は、*A. oryzae* の野生型であると考えられている *A. flavus* のそれと同等であり、近縁種の *A. nidulans* や *A. fumigatus* よりも多い。これらの内、第1章で検討を行った CPA [49]に加え、aflatoxins [3, 4]や aflatrem [52]といったマイコトキシンについては、それらの非生産性の遺伝的要因を含め生合成遺伝子クラスターの解析がなされているものの、その他の二次代謝産物の生合成遺伝子に関する知見は非常に少ない。

A. oryzae に限らず多くの糸状菌において、過去に単離された二次代謝産物数とゲノム中に存在する二次代謝産物の生合成遺伝子数には、大きな開きがあることが知られている[53]。糸状菌が保持している二次代謝産物の生合成遺伝子の多くが通常の培養条件下では機能していない休眠遺伝子であることが、この原因の1つとして考えられている。このことから、近年、休眠遺伝子を活性化する様々な試みがなされており、一連の検討の中で、エピジェネティック制御が休眠遺伝子の発現に関与していることが明らかとなりつつある[54, 55]。 *A.*

oryzae においても *hstD* と呼ばれるサーチュインタイプのヒストンデアセチラーゼを破壊することによって、*kojic acid* や *penicillin* などの二次代謝産物の産生量が増加するとの報告がある[56]。

野田産業科学研究所ではクロマチンリモデリング因子を含めた転写因子をコードする遺伝子を破壊した *A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーを保有している[57]。そこで本章では、このライブラリー株の二次代謝物産生プロファイルの解析を行い、*A. oryzae* における二次代謝産物の生産制御に関与する転写因子を同定するとともに新規有用二次代謝産物の探索並びにその生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。

表 2-1-1 SMURF を用いたバックボーン遺伝子数の予測結果

	PKS	NRPS	DMATS	PKS-NRPS Hybrid	PKS-like	NRPS-like	total
<i>A. oryzae</i>	27	16	8	2	0	16	69
<i>A. flavus</i>	25	18	8	2	3	14	70
<i>A. nidulans</i>	24	11	6	1	4	12	58
<i>A. fumigatus</i>	13	13	7	1	1	5	40

PKS: polyketide synthase

NRPS: non-ribosomal synthetase

DMAT: prenyltransferase

表 2-1-2 各遺伝子クラスターのアノテーション

Cluster:1		Cluster:4	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090001000024	Tryptophan halogenase	AO090001000293	PKS
AO090001000023	C6 transcription factor, putative	AO090001000292	predicted protein
AO090001000022	C6 transcription factor, putative	AO090001000291	Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family
AO090001000021	multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily	AO090001000290	FAD-dependent oxidoreductases
AO090001000020	MFS transporter, putative	AO090001000289	O-methyltransferase, putative
AO090001000019	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	AO090001000288	Cytochrome P450, putative
AO090001000018	C6 transcription factor, putative	AO090001000287	alcohol dehydrogenase, putative
AO090001000017	iron/ascorbate family oxidoreductases	AO090001000286	predicted protein
AO090001000016	H+/oligopeptide symporter	AO090001000285	C6 transcription factor, putative
AO090001000015	FAD-dependent oxidoreductase	AO090001000284	Cytochrome P450, putative
AO090001000014	predicted protein	AO090001000283	predicted protein
AO090001000013	N-methyltransferase, putative	AO090001000282	MFS transporter, putative
AO090001000012	2OG-Fe(II) oxygenase	AO090001000281	C6 transcription factor, putative
AO090001000011	H+/oligopeptide symporter		
AO090001000010	Phenol hydroxylase	Cluster:5	
AO090001000009	NRPS	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090001000008	predicted protein	AO090001000404	MFS transporter, putative
AO090001000007	predicted protein	AO090001000403	predicted protein
AO090001000006	predicted protein	AO090001000402	PKS
AO090001000003	NRPS-like	AO090001000401	predicted protein
		AO090001000400	predicted protein
Cluster:2		AO090001000399	short-chain dehydrogenase, putative
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090001000398	2OG-Fe(II) oxygenase
AO090001000051	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family	AO090001000397	predicted protein
AO090001000050	predicted protein	AO090001000396	predicted protein
AO090001000049	Short-chain oxidoreductase, putative	AO090001000395	monocarboxylate transporter
AO090001000048	predicted protein	AO090001000394	Monoxygenase, putative
AO090001000047	predicted protein	AO090001000393	predicted protein
AO090001000046	O-methyltransferase, putative	AO090001000392	C6 transcription factor
AO090001000045	Oxidoreductase, putative	AO090001000391	predicted protein
AO090001000044	uridine permease/thiamine transporter/allantoin transport	AO090001000390	amino acid transporters
AO090001000043	NRPS	Cluster:6	
AO090001000042	renal dipeptidase	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090001000041	Cytochrome P450, putative	AO090001000506	PKS
AO090001000040	Glutathione S-transferase, putative	AO090001000505	MFS transporter, putative
AO090001000039	O-methyltransferase, putative	AO090001000504	Haloacid dehalogenase-like hydrolase
AO090001000038	Thioredoxin reductase, putative	AO090001000503	predicted protein
AO090001000037	Thioredoxin reductase, putative	AO090001000502	nuclear polyadenylated RNA-binding protein Nab2, putative
AO090001000036	predicted protein	AO090001000500	protoporphyrinogen oxidase
AO090001000035	Cytochrome P450, putative	AO090001000499	predicted protein
AO090001000034	predicted protein	AO090001000498	predicted protein
AO090001000033	Aminotransferase, putative	AO090001000497	N-end rule pathway, recognition component UBR1
AO090001000032	heavy metal exporter HMT1, ABC superfamily	Cluster:7	
AO090001000031	MFS transporter, putative	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090001000030	predicted protein	AO090001000516	NRPS-like
AO090001000029	C6 transcription factor, putative	AO090001000515	C6 transcription factor, putative
AO090001000028	Cytochrome P450	Cluster:8	
AO090001000026	Cytochrome P450, putative	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090001000025	predicted protein	AO090003000954	cytochrome P450
AO090001000024	predicted protein	AO090003000953	translation initiation factor 5B (eIF-5B)
Cluster:3		AO090003000952	predicted protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090003000951	predicted protein
AO090001000289	O-methyltransferase, putative	AO090003000950	predicted protein
AO090001000288	Cytochrome P450, putative	AO090003000949	predicted GTPase activator protein
AO090001000287	Alcohol dehydrogenase, putative	AO090003000948	Yip1 domain family
AO090001000286	predicted protein	AO090003000947	ubiquitin/60s ribosomal protein L40 fusion
AO090001000285	C6 transcription factor, putative	AO090003000946	Short chain type dehydrogenase, putative
AO090001000284	Cytochrome P450, putative	AO090003000945	NRPS-like
AO090001000283	predicted protein	Cluster:9	
AO090001000282	monocarboxylate transporter	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090001000281	C6 transcription factor, putative	AO090003001556	MFS transporter, putative
AO090001000280	C6 transcription factor, putative	AO090003001555	predicted protein
AO090001000279	predicted protein	AO090003001554	predicted protein
AO090001000278	predicted protein	AO090003001553	predicted protein
AO090001000277	PKS-NRPS hybrid	AO090003001552	MFS transporter, putative
AO090001000275	transcription factor, putative	AO090003001551	Amidohydrolase, putative
AO090001000273	Quinone oxidoreductase, putative	AO090003001550	Phosphotransferase enzyme family
AO090001000272	predicted protein	AO090003001549	H+/oligopeptide symporter
AO090001000271	predicted protein	AO090003001548	predicted protein
AO090001000270	predicted protein	AO090003001547	Ankyrin domain protein
AO090001000269	predicted protein	AO090003001546	predicted protein
AO090001000268	geranylgeranyl pyrophosphate synthase/Polyprenyl synthetase	AO090003001545	NRPS-like
AO090001000267	Glycosyl hydrolase family 115	AO090003001544	Cytochrome P450 monooxygenase, putative
AO090001000266	beta-glucosidase-related glycosidases	AO090003001543	C6 transcription factor, putative
AO090001000265	MFS transporter, putative	AO090003001542	C6 transcription factor, putative
AO090001000264	Alcohol dehydrogenase, putative	AO090003001541	MFS transporter, putative
AO090001000263	predicted protein		
AO090001000262	NRPS		
AO090001000261	2OG-Fe(II) oxygenase		
AO090001000260	cytochrome P450		

表 2-1-2 各遺伝子クラスターのアノテーション (続き)

Cluster:10		Cluster:17	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090005000693	MFS transporter, putative	AO090010000054	Short-chain dehydrogenase, putative
AO090005000692	amidases	AO090010000053	Dihydroxy-acid dehydratase, putative
AO090005000691	predicted protein	AO090010000052	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase, putative
AO090005000690	NRPS-like	AO090010000051	N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase, putative
AO090005000689	predicted protein	AO090010000050	predicted protein
AO090005000688	NRPS-like	AO090010000049	C6 transcription factor, putative
Cluster:11		AO090010000048	PKS
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090010000047	O-methyltransferase, putative
AO090005000955	C6 transcription factor, putative	AO090010000046	predicted protein
AO090005000954	alpha/beta hydrolase, putative	AO090010000045	predicted protein
AO090005000953	MFS transporter, putative	AO090010000043	predicted protein
AO090005000952	NRPS-like	AO090010000041	alcohol dehydrogenase, putative
Cluster:12		AO090010000040	predicted protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090010000039	predicted protein
AO090005000968	MFS transporter, putative	AO090010000038	predicted protein
AO090005000967	short-chain dehydrogenase, putative	AO090010000037	C6 transcription factor, putative
AO090005000966	predicted protein	AO090010000036	MFS transporter, putative
AO090005000965	AAA family ATPase, putative	AO090010000035	MFS transporter, putative
AO090005000964	predicted protein	AO090010000034	beta-glucosidase-related glycosidases
AO090005000963	MFS transporter, putative	Cluster:18	
AO090005000962	MFS glucose transporter, putative	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090005000961	PKS	AO090010000082	DMATS
Cluster:13		AO090010000081	CRAL/TRIO domain protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090010000080	male sterility domain containing protein
AO090005001001	mRNA cleavage and polyadenylation factor II complex	AO090010000079	predicted protein
AO090005001000	aminotransferase, class III	AO090010000078	NmrA-like family protein
AO090005000999	predicted protein	AO090010000077	Phage lysozyme, putative
AO090005000998	predicted protein	AO090010000076	predicted protein
AO090005000997	C6 transcription factor, putative	AO090010000075	cytochrome P450
AO090005000996	microtubule-binding protein	AO090010000074	2OG-Fe(II) oxygenase, putative
AO090005000995	sphingolipid hydroxylase	AO090010000073	Thioesterase-like superfamily
AO090005000994	predicted protein	AO090010000072	Putative oxalocrotonate tautomerase enzyme
AO090005000993	NRPS	AO090010000071	flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase
AO090005000992	acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	AO090010000070	Zn-dependent hydrolases, including glyoxylases
AO090005000991	MFS transporter, putative	AO090010000069	Serine hydrolase (FSH1)
AO090005000990	C6 transcription factor, putative	AO090010000068	FAD binding domain containing protein
Cluster:14		Cluster:19	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090005001087	C6 transcription factor, putative	AO090010000114	PKS
AO090005001086	MFS transporter, putative	AO090010000113	C6 transcription factor, putative
AO090005001085	TIM barrel metal-dependent hydrolase, putative	AO090010000112	transferase family protein
AO090005001084	Alpha-glucosidase, putative	AO090010000111	alpha-N-acetylglucosaminidase
AO090005001083	Translation initiation factor eIF-2B, putative	AO090010000110	Ankyrin domain protein
AO090005001081	amino acid transporters	AO090010000109	FAD binding domain containing protein
AO090005001079	DMATS	AO090010000108	enoyl reductase domain of yeast-type FAS1
AO090005001078	sorbitol dehydrogenase	AO090010000107	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase
Cluster:15		AO090010000106	glycogen synthase
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090010000105	MFS transporter, putative
AO090009000071	PKS	AO090010000104	predicted protein
AO090009000070	carboxylesterase and related proteins	AO090010000103	Homocysteine S-methyltransferase,
AO090009000069	predicted protein	AO090010000102	Extracellular lipase, putative
AO090009000068	MFS transporter, putative	AO090010000101	MFS transporter, putative
Cluster:16		AO090010000100	Peptidase A4 family protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090010000099	predicted protein
AO090009000143	Metallo-beta-lactamase superfamily	AO090010000098	Short chain type dehydrogenase, putative
AO090009000142	predicted protein	AO090010000097	C6 transcription factor, putative
AO090009000141	MFS transporter, putative	Cluster:20	
AO090009000140	Formyl transferase, putative	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090009000139	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, putative	AO090010000350	MFS transporter, putative
AO090009000138	monocarboxylate transporter	AO090010000349	NRPS-like
AO090009000136	homoserine dehydrogenase	Cluster:21	
AO090009000135	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090009000134	predicted protein	AO090010000407	MFS transporter, putative
AO090009000133	C6 transcription factor, putative	AO090010000406	mitochondrial solute carrier protein
AO090009000132	predicted hydrolases or acyltransferases	AO090010000405	monoxygenase, putative
AO090009000131	PKS	AO090010000404	PKS
Cluster:17		AO090010000403	Serine hydrolase (FSH1)
Cluster:18		AO090010000402	PKS
Cluster:19		AO090010000401	Alpha/beta hydrolase family protein
Cluster:20		AO090010000400	2OG-Fe(II) oxygenase
Cluster:21		AO090010000399	translation initiation factor 5A (eIF-5A)
Cluster:22		AO090010000398	2OG-Fe(II) oxygenase
Cluster:23		AO090010000397	2OG-Fe(II) oxygenase
Cluster:24		AO090010000396	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase
Cluster:25		AO090010000395	MFS transporter, putative
Cluster:26		AO090010000394	Fungal specific transcription factor, putative
Cluster:27		AO090010000393	Short-chain dehydrogenase, putative

表 2-1-2 各遺伝子クラスターのアノテーション (続き)

Cluster:22	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090010000426	NRPS-like
AO090010000424	flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase
Cluster:23	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090010000500	MFS transporter, putative
AO090010000498	NRPS-like
AO090010000496	HAMP domain
AO090010000495	Acetyltransferase (GNAT), putative
AO090010000494	beta-xylosidase
AO090010000493	Neutral protease 2
AO090010000492	predicted protein
AO090010000491	transporter, putative
AO090010000490	Riboflavin aldehyde-forming enzyme
AO090010000489	molybdopterin synthase sulfurlyase
AO090010000488	MFS transporter, putative
Cluster:24	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090011000023	MFS transporter, putative
AO090011000022	Alternative oxidase
AO090011000021	predicted protein
AO090011000020	Galactose oxydase, putative
AO090011000019	predicted iron-dependent peroxidase
AO090011000017	multidrug resistance-associated protein
AO090011000016	multidrug resistance-associated protein
AO090011000015	PKS
AO090011000014	Sugar transporter, putative
AO090011000013	NACHT and TPR domain protein
AO090011000012	NACHT and TPR domain protein
AO090011000011	Dynamin GTPase, putative
AO090011000010	predicted protein
AO090011000009	predicted protein
AO090011000008	MFS transporter, putative
AO090011000007	predicted protein
AO090011000006	C6 transcription factor, putative
AO090011000005	C6 transcription factor, putative
AO090011000004	Short-chain dehydrogenases/reductase, putative
Cluster:25	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090011000043	NRPS
AO090011000042	predicted protein
AO090011000041	RTA1 domain protein, putative
AO090011000040	enoyl reductase domain of yeast-type FAS1
AO090011000039	predicted protein
AO090011000038	ABC transporter, putative
AO090011000037	ABC transporter, putative
AO090011000036	Elastinolytic metalloproteinase Mep
AO090011000035	predicted protein
AO090011000034	amino acid transporters
AO090011000033	predicted protein
AO090011000032	magnesium transporters: CorA family
AO090011000031	amino acid transporters
Cluster:26	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090011000328	NRPS-like
AO090011000327	RING finger protein (Zin), putative
AO090011000326	Peroxisomal multifunctional beta-oxidation protein, putative
AO090011000325	predicted kinase
AO090011000324	predicted protein
AO090011000323	cystathionine beta-lyases/cystathionine gamma-synthases
AO090011000322	C6 transcription factor, putative
AO090011000321	Fungal specific transcription factor, putative
Cluster:27	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090011000744	Carboxylic acid transport protein
AO090011000743	Cytochrome P450, putative
AO090011000742	predicted protein
AO090011000741	integral membrane protein
AO090011000740	integral membrane protein
AO090011000739	cytochrome P450, putative
AO090011000738	DMATS
Cluster:28	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090020000192	acetyl-CoA transporter
AO090020000191	predicted protein
AO090020000190	MFS transporter, putative
AO090020000189	predicted protein
AO090020000188	predicted protein
AO090020000186	PKS
AO090020000185	predicted protein
AO090020000183	FAD binding oxidoreductase, putative
AO090020000182	RING finger protein
AO090020000180	putative cytochrome C oxidase assembly protein
AO090020000179	Molybdopterin synthase catalytic subunit
AO090020000178	predicted protein
AO090020000177	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein, putative
Cluster:29	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090020000241	predicted NAD-dependent oxidoreductase
AO090020000240	NRPS-like
AO090020000239	NmrA-like family protein
AO090020000238	Cytochrome P450, putative
AO090020000237	Cytochrome P450, putative
AO090020000236	inorganic phosphate transporter
Cluster:30	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090020000386	MFS transporter, putative
AO090020000385	predicted amidohydrolase
AO090020000384	C6 transcription factor, putative
AO090020000383	flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase
AO090020000381	FAD dependent oxidoreductase, putative
AO090020000380	NRPS
Cluster:31	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090020000535	Short-chain dehydrogenase/reductase family protein, putative
AO090020000533	MFS transporter, putative
AO090020000532	predicted protein
AO090020000531	predicted protein
AO090020000530	uncharacterized conserved protein
AO090020000529	nucleoside phosphorylase
AO090020000528	predicted protein
AO090020000527	DMATS
Cluster:32	
Gene_id	Annotated_gene_function
AO090023000097	Zn-dependent hydrolases
AO090023000096	flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase
AO090023000095	Cytochrome domain of cellobiose dehydrogenase
AO090023000094	predicted protein
AO090023000092	OPT oligopeptide transporter protein
AO090023000089	predicted protein
AO090023000088	predicted protein
AO090023000087	17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3, HSD17B3
AO090023000086	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
AO090023000085	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein
AO090023000083	GPI anchored endo-1,3(4)-beta-glucanase, putative
AO090023000082	NRPS-like
AO090023000081	O-methyltransferase, putative
AO090023000080	carboxylesterase type B
AO090023000079	predicted protein
AO090023000078	predicted protein
AO090023000077	GNAT family acetyltransferase, putative
AO090023000076	beta-galactosidase
AO090023000075	MFS sugar transporter, putative
AO090023000074	predicted protein
AO090023000073	Terpene synthase family protein
AO090023000072	cytochrome P450

表 2-1-2 各遺伝子クラスターのアノテーション (続き)

Cluster:33		Cluster:38	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090023000450	cytochrome P450	AO090026000388	FAD dependent oxidoreductase, putative
AO090023000448	multiple inositol polyphosphate phosphatase	AO090026000386	predicted protein
AO090023000447	Cytochrome P450, putative	AO090026000385	predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases
AO090023000446	predicted protein	AO090026000384	Cytochrome P450, putative
AO090023000445	O-methyltransferase, putative	AO090026000383	Cytochrome P450, putative
AO090023000444	PKS	AO090026000382	Sesquiterpene cyclase, putative
AO090023000443	NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase	AO090026000381	predicted protein
AO090023000442	predicted protein	AO090026000380	ornithine decarboxylase
AO090023000441	PKB family kinase, putative	AO090026000379	Galactose-proton symport, putative
AO090023000440	predicted protein	AO090026000378	NRPS
AO090023000439	predicted protein	Cluster:39	
AO090023000438	Peptidase family S41	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090023000437	nucleoside phosphorylase	AO090026000592	kelch repeat-containing proteins
AO090023000436	Serine/threonine-protein kinase ripk4, putative	AO090026000591	predicted protein
AO090023000434	Nonsense-mediated mRNA decay protein Upf3, putative	AO090026000590	guanine nucleotide binding protein MIP1
AO090023000433	serine/threonine specific protein phosphatase	AO090026000589	predicted protein
AO090023000432	Phenol 2-monooxygenase, putative	AO090026000588	predicted protein
Cluster:34		AO090026000587	predicted protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090026000586	phenylalanine and histidine ammonia-lyase
AO090023000528	NRPS	AO090026000585	NRPS-like
AO090023000527	predicted protein	AO090026000584	cytochrome P450
AO090023000526	UV damage repair endonuclease	AO090026000582	HAD-like hydrolase
AO090023000525	predicted protein	AO090026000581	cytochrome P450
AO090023000524	predicted protein	AO090026000580	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family
AO090023000523	alcohol dehydrogenase, putative	AO090026000579	cytochrome P450
Cluster:35		AO090026000578	transferase family protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090026000577	MFS transporter, putative
AO090023000881	monocarboxylate transporter	AO090026000576	HAD-like hydrolase
AO090023000880	Monooxygenase, putative	AO090026000575	cytochrome P450
AO090023000879	predicted protein	Cluster:40	
AO090023000878	O-methyltransferase, putative	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090023000877	PKS	AO090038000086	PKS
AO090023000876	C6 transcription factor, putative	AO090038000085	predicted protein
AO090023000875	short chain type dehydrogenase, putative	AO090038000084	MFS transporter, putative
AO090023000874	tryptophan synthase beta chain	AO090038000083	FAD binding domain containing protein
Cluster:36		AO090038000082	Sugar transporter, putative
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090038000081	Short-chain dehydrogenase, putative
AO090026000029	cytochrome P450	AO090038000080	predicted protein
AO090026000028	choline dehydrogenase and related flavoproteins	AO090038000079	predicted protein
AO090026000027	cytochrome P450	AO090038000078	monocarboxylate transporter
AO090026000026	O-methyltransferase	Cluster:41	
AO090026000025	O-methyltransferase	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090026000024	cytochrome P450	AO090038000150	predicted protein
AO090026000023	predicted protein	AO090038000149	NRPS-like
AO090026000022	cytochrome P450	AO090038000148	predicted protein
AO090026000021	cytochrome P450	AO090038000147	vesicular amine transporter
AO090026000020	cytochrome P450	AO090038000146	predicted protein
AO090026000019	short-chain alcohol dehydrogenases	AO090038000145	predicted protein
AO090026000018	voltage-gated shaker-like K+ channel, subunit beta/KCNAB	AO090038000144	inorganic phosphate transporter
AO090026000017	esterase/lipase	Cluster:42	
AO090026000016	short chain alcohol dehydrogenase	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090026000015	predicted protein	AO090038000400	chromodomain-helicase DNA-binding protein
AO090026000014	C6 transcription factor	AO090038000399	RNAse L inhibitor, ABC superfamily
AO090026000013	enoyl reductase domain of yeast-type FAS1	AO090038000398	spliceosomal protein FBP11/Splicing factor PRP40
AO090026000012	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	AO090038000397	predicted protein
AO090026000011	Norsolorinic acid reductase	AO090038000396	peroxisomal membrane protein MPV17 and related proteins
AO090026000010	predicted protein	AO090038000395	3-phosphoglycerate kinase
AO090026000009	PKS	AO090038000392	uncharacterized conserved protein
AO090026000008	Putative ABC transporter	AO090038000391	MFS transporter, putative
AO090026000006	predicted protein	AO090038000390	NRPS
AO090026000005	MFS multidrug transporter, putative	Cluster:37	
AO090026000004	cytochrome P450	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090026000003	FAD dependent oxidoreductase, putative	AO090026000157	transporter, ABC superfamily
AO090026000002	DMATS	AO090026000156	predicted protein
AO090026000155	predicted protein	AO090026000154	MFS transporter, putative
AO090026000153	alkyl sulfatase and related hydrolases	AO090026000151	predicted protein
AO090026000150	predicted protein	AO090026000149	PKS

表 2-1-2 各遺伝子クラスターのアノテーション (続き)

Cluster:43		Cluster:49	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090038000557	C6 transcription factor, putative	AO090103000227	predicted protein
AO090038000556	predicted protein	AO090103000226	ABC multidrug transporter, putative
AO090038000555	predicted protein	AO090103000225	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family, putative
AO090038000554	predicted protein	AO090103000224	PKS-NRPS hybrid
AO090038000553	predicted protein	AO090103000223	NRPS
AO090038000552	Extracellular rhamnogalacturonase, putative	AO090103000222	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family, putative
AO090038000551	Sugar transporter, putative	AO090103000221	predicted protein
AO090038000550	NRPS-like	AO090103000220	alcohol dehydrogenase, putative
AO090038000549	7-keto-8-aminopelargonate synthetase and related enzymes		
AO090038000547	predicted protein	Cluster:50	
AO090038000546	predicted protein	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090038000545	Acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase	AO090103000366	short-chain dehydrogenases/reductase, putative
AO090038000544	isopenicillin N synthase and related dioxygenases	AO090103000365	predicted protein
AO090038000543	NRPS	AO090103000364	predicted protein
AO090038000542	predicted protein	AO090103000363	predicted protein
AO090038000541	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase, putative	AO090103000362	predicted protein
AO090038000540	carboxylesterase type B	AO090103000361	predicted flavoprotein involved in K+ transport
AO090038000539	predicted protein	AO090103000360	predicted protein
AO090038000537	amidases	AO090103000359	reductases with broad range of substrate specificities
AO090038000536	predicted protein	AO090103000356	ABC multidrug transporter, putative
AO090038000535	MFS transporter, putative	AO090103000355	NRPS
		Cluster:51	
Cluster:44		Gene_id	Annotated_gene_function
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090113000209	PKS
AO090102000169	MFS transporter, putative	AO090113000208	monocarboxylate transporter, putative
AO090102000168	cytochrome P450	AO090113000207	cytochrome P450, putative
AO090102000167	predicted protein	AO090113000206	monooxygenase, putative
AO090102000166	PKS	AO090113000205	predicted protein
		AO090113000204	predicted protein
Cluster:45		Cluster:52	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090102000322	DMATS	AO090120000024	NRPS
AO090102000321	predicted protein	AO090120000023	DMATS
AO090102000320	C6 transcription factor, putative	AO090120000022	alpha/beta hydrolase, putative
AO090102000319	predicted protein	AO090120000021	MFS sugar transporter, putative
AO090102000318	predicted protein	AO090120000020	C6 transcription factor, putative
AO090102000317	MFS transporter, putative		
AO090102000316	zinc binding dehydrogenase, putative	Cluster:53	
AO090102000315	predicted protein	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090102000313	FAD-dependent oxidoreductase	AO090206000075	cytochrome P450
		AO090206000074	PKS
Cluster:46		Cluster:54	
Gene_id	Annotated_gene_function	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090102000338	NRPS	AO090701000539	predicted protein
AO090102000337	multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily	AO090701000538	ABC transporter, putative
AO090102000336	predicted protein	AO090701000537	ABC transporter, putative
AO090102000335	phospholipase D precursor, putative	AO090701000536	ABC transporter, putative
AO090102000334	predicted protein	AO090701000535	predicted protein
AO090102000332	predicted protein	AO090701000534	MFS transporter, putative
AO090102000331	beta-xylosidase	AO090701000533	amino acid transporters
AO090102000330	cytochrome P450	AO090701000532	predicted protein
AO090102000329	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III	AO090701000530	PKS
		AO090701000529	glyoxylase
Cluster:47		AO090701000528	O-methyltransferase, putative
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090701000527	choline dehydrogenase and related flavoproteins
AO090102000466	N-methyltransferase, putative	AO090701000526	Short-chain dehydrogenase, putative
AO090102000465	NRPS	AO090701000525	Oxidoreductase, FAD-binding, putative
AO090102000464	voltage-gated shaker-like K+ channel, subunit beta/KCNAB		
AO090102000461	nucleoside phosphorylase	Cluster:55	
AO090102000460	predicted hydrolases or acyltransferases	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090102000459	predicted protein	AO090701000603	FAD/FMN-containing dehydrogenases
AO090102000458	predicted protein	AO090701000602	Alpha/beta hydrolase family protein
AO090102000457	FAD binding domain containing protein	AO090701000601	phenylalanine and histidine ammonia-lyase
		AO090701000600	DMATS
Cluster:48		AO090701000599	predicted protein
Gene_id	Annotated_gene_function	AO090701000598	AMP-binding enzyme, putative
AO090103000179	C6 transcription factor, putative	AO090701000597	Glutamyl-tRNA synthetase
AO090103000178	O-methyltransferase, putative	AO090701000596	ankyrin
AO090103000177	tandem pore domain K+ channel	AO090701000595	ankyrin
AO090103000176	predicted protein		
AO090103000175	predicted protein	Cluster:56	
AO090103000174	predicted protein	Gene_id	Annotated_gene_function
AO090103000173	Cytochrome P450, putative	AO090701000833	short chain dehydrogenase/oxidoreductase, putative
AO090103000172	Lipase 2, putative	AO090701000832	predicted protein
AO090103000170	predicted hydrolases or acyltransferases	AO090701000831	PKS
AO090103000169	acyltransferases, including N-acetylases of ribosomal proteins	AO090701000830	delta 6-fatty acid desaturase/delta-8 sphingolipid desaturase
AO090103000168	enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	AO090701000829	predicted protein
AO090103000167	NRPS	AO090701000828	Monoxygenase, putative
AO090103000166	multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily	AO090701000827	predicted protein
AO090103000165	MFS siderophore transporter, putative	AO090701000826	PKS

2.2 実験材料および方法

2.2.1 転写因子破壊株ライブラリーの二次代謝物産生プロファイル解析

Ogawa ら[57]の報告にある *A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーの内、111 株について解析を行った。試験に供した株の情報を表 2-2-1 に示す。各遺伝子破壊株を CYA 寒天培地(2% agar)に植菌し 30 °C で 1 週間培養した。コントロールとして、破壊株ライブラリーの宿主に用いた RkuptrP2-1 Δ AF 株(*A. oryzae* RIB40 $\Delta ku70::ptrA \Delta AF \Delta pyrG$)に選択マーカである *pyrG* を相補した RkuptrP2-1AF/P 株を同様に培養した。培養終了後、直径 6 mm のコルクボーラーを用いて菌体ごと培地をくり抜いたプラグ 10 個に酢酸エチルを 2 mL 加え、15 分ソニケーションを行った後に 15 分室温で静置した。得られた抽出液の遠心上清 1.8 mL を減圧濃縮により乾固させ、その後、180 μ L のアセトニトリルを加え再溶解したサンプルを LC-MS に供した。LC-MS は表 1-2-2 に示す条件で行った。

表 2-2-1 代謝物解析を行った遺伝子破壊株

Strain_ID	Gene ID or position	Motif *	Strain_ID	Gene ID or position	Motif
BR-TF001	AO090012000945	Zn2-Cys6	BR-TF089	AO090009000336	Zn2-Cys6
BR-TF005	AO090012000104	C2H2 ZF	BR-TF090	AO090020000302	WD repat
BR-TF007	AO090120000340	MYND ZF	BR-TF091	AO090023000255	Zn2-Cys6
BR-TF008	AO090005000460	C2H2 ZF	BR-TF093	AO090701000526	Zn2-Cys6
BR-TF009	AO090102000489	NmrA-like	BR-TF096	AO090003000502	C2H2 ZF
BR-TF011	AO090003000962	Zn2-Cys6	BR-TF097	AO090003001363 _ 1362	Zn2-Cys6
BR-TF012	AO090026000719	GATA ZF	BR-TF098	AO090701000019	C2H2 ZF
BR-TF015	AO090005000894	C2H2 ZF	BR-TF099	AO090_SC005_not predicted	Zn2-Cys6
BR-TF016	AO090020000471	No fam	BR-TF101	AO090124000076	PHD-finger
BR-TF017	AO090038000596	CCHC ZF	BR-TF103	AO090009000276 _ 277	Zn2-Cys6
BR-TF018	AO090003001321	HDAC	BR-TF104	AO090005000284	HDAC (sirtuin fam)
BR-TF019	AO090003001380	Zn2-Cys6	BR-TF106	AO090011000264	Zn2-Cys6
BR-TF020	AO090003000884	No fam	BR-TF107	AO090003001504 _ 1505	Zn2-Cys6
BR-TF023	AO090005000270	PHD-finger	BR-TF108	AO090038000557	Zn2-Cys6
BR-TF024	AO090005001289	C2H2 ZF,HAT (MYST)	BR-TF109	AO090001000639	Zn2-Cys6
BR-TF025	AO090012000859_860	Zn2-Cys6	BR-TF111	AO090005000235	Zn2-Cys6
BR-TF027	AO090011000890	Zn2-Cys6	BR-TF112	AO090003001441	Zn2-Cys6
BR-TF029	AO090026000412	Zn2-Cys6	BR-TF113	AO090011000629	SET, MYND ZF
BR-TF030	AO090005001529	NmrA-like	BR-TF115	AO090026000279	Zn2-Cys6
BR-TF031	AO090005000294	Zn2-Cys6	BR-TF117	AO090009000106	Zn2-Cys6
BR-TF032	AO090001000424	PHD-finger	BR-TF119	AO090_SC113_not predicted	Zn2-Cys6,C2H2 ZF
BR-TF037	AO090102000613	HDAC (sirtuin fam)	BR-TF120	AO090005001162	C2H2 ZF
BR-TF039	AO090005001203	Zn2-Cys6	BR-TF121	AO090003000967	Zn2-Cys6
BR-TF040	AO090113000137	Zn2-Cys6	BR-TF122	AO090005001547 _ 1546	bZIP
BR-TF041	AO090005001169	Zn2-Cys6	BR-TF124	AO090005001502	C2H2 ZF
BR-TF042	AO090011000687 _ 688	Zn2-Cys6	BR-TF125	AO090003001292	Zn2-Cys6
BR-TF043	AO090010000097	Zn2-Cys6	BR-TF126	AO090026000797	bHLH
BR-TF044	AO090011000422	Zn2-Cys6	BR-TF127	AO090102000244	C2H2 ZF
BR-TF045	AO090003000762	Zn2-Cys6	BR-TF129	AO090012000525	Zn2-Cys6
BR-TF047	AO090103000430	No fam	BR-TF130	AO090026000614	Zn2-Cys6
BR-TF048	AO090026000222	Zn2-Cys6	BR-TF133	AO090026000200	C2H2 ZF
BR-TF049	AO090701000293	Zn2-Cys6	BR-TF134	AO090003000885	HAT (ADA3)
BR-TF050	Not predicted	Zn2-Cys6	BR-TF135	AO090010000762	Zn2-Cys6
BR-TF052	AO090010000159	Zn2-Cys6	BR-TF137	AO090003001259	Zn2-Cys6
BR-TF053	AO090701000629	Zn2-Cys6	BR-TF138	AO090003000002	SET
BR-TF056	AO090001000515	Zn2-Cys6	BR-TF140	AO090023000487	Zn2-Cys6
BR-TF057	AO090012000163	Zn2-Cys6	BR-TF142	AO090003000635	bZIP
BR-TF058	AO090113000169	Zn2-Cys6	BR-TF143	AO090009000320	Ub-hydrolase
BR-TF059	AO090003001750	PHD-finger	BR-TF144	AO090206000064	HDAC
BR-TF060	AO090003000361	Zn2-Cys6	BR-TF148	AO090001000633	Zn2-Cys6
BR-TF061	AO090003000758	C2H2 ZF	BR-TF150	AO090010000207	Zn2-Cys6
BR-TF062	AO090012000267	Zn2-Cys6	BR-TF152	AO090009000153	NmrA-like
BR-TF063	AO090102000597	bZIP	BR-TF153	AO090102000387	Zn2-Cys6
BR-TF064	AO090009000502	GATA ZF	BR-TF155	AO090026000595	bZIP
BR-TF069	AO090005000765	Myb-like	BR-TF158	AO090023000578	Zn2-Cys6
BR-TF070	AO090010000233	Zn2-Cys6	BR-TF160	AO090012000035	Zn2-Cys6
BR-TF071	AO090005001475	Zn2-Cys6	BR-TF175	AO090010000334	Zn2-Cys6
BR-TF073	AO090001000296	C2H2 ZF	BR-TF197	AO090001000599	HDAC (sirtuin fam)
BR-TF075	AO090701000096	SET	BR-TF202	AO090009000660	SET
BR-TF080	AO090_SC005_not predicted	HDAC	BR-TF203	AO090001000714 _ 715	PHD-finger
BR-TF081	AO090003000236	C2H2 ZF	BR-TF224	AO090012000132	HDAC
BR-TF082	AO090701000716	bHLH	BR-TF225	AO090003001434	Zn2-Cys6
BR-TF083	AO090003000996	HDAC (sirtuin fam)	BR-TF257	AO090001000709	HDAC (sirtuin fam)
BR-TF086	AO090701000429	No fam	BR-TF281	AO090038000300	SET,chromo
BR-TF087	AO090166000092	Zn2-Cys6	BR-TF289	AO090003000653	Bromo domain
BR-TF088	AO090003000754	PHD-finger			

* Zinc finger等のDNA結合モチーフまたは転写制御に関与すると考えられるモチーフ。

2.2.2 遺伝子破壊株の作製

cclA および *sppA* の遺伝子破壊株は以下の通り作製した(2.3.1 参照)。各遺伝子の破壊カセットは *A. oryzae* RIB40 株由来のゲノム DNA を鋳型とし fusion PCR 法を用いて作製した。選択マーカである *pyrG* の増幅は、各遺伝子破壊カセットに共通のプライマーセット(*pyrG-U* および *pyrG-L*)を用いて行い、それ以外については 1.2.2 に記載の方法で行った。各プライマーは、AspGD (<http://www.aspgd.org/>)の ORF 予測情報を参考に設計した。破壊カセット作製に用いたプライマーを表 2-2-2 に示す。RkuptrP2-1ΔAF 株を宿主とし、得られた破壊カセットを用い 1.2.3 に記載の方法で形質転換を行った。得られた形質転換体の目的遺伝子が破壊されていることは、各破壊対象遺伝子の LU プライマーおよび RL プライマーを用いた PCR 法により確認した。

表 2-2-2 遺伝子破壊カセット作製に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	purpose
<i>cclA</i> -LU	TCGCTGCTATATTTCCCAATGAAGTC	5' region of <i>cclA</i>
<i>cclA</i> -LL	<u>GTACGCTCTGTTGTTT</u> TGGACCTTGGACCGTCAGTTTG	
<i>cclA</i> -RU	<u>CTGAGGTGCAGTTGGCAATGTAGGCTCCCCTGATGTAG</u>	3' region of <i>cclA</i>
<i>cclA</i> -RL	CGGCTGCATACACTGGGACAGTTG	
<i>sppA</i> -LU	CATCTTGTGCCCGACCTTTGATTC	5' region of <i>sppA</i>
<i>sppA</i> -LL	<u>GTACGCTCTGTTGTGGAGTTGCCCTGGCAAGTGATAAC</u>	
<i>sppA</i> -RU	<u>CTGAGGTGCAGTTGTTGGCGACACAGCGGATATTTTG</u>	3' region of <i>sppA</i>
<i>sppA</i> -RL	CGGACGAGATTCACGAATGTGTTAC	
<i>pyrG</i> -U	ACAACAGACGTACCCTGTGATGTTTC	<i>pyrG</i> amplification
<i>pyrG</i> -L	AACTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG	

¹ Underlined sequences represent the additional nucleotides for fusion PCR

2.2.3 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は Mueller ら[58]の方法に準じて行った。各遺伝子破壊株およびコントロール株をそれぞれ PD 培地で 24 時間培養し、ミラクロースを用いて菌体を回収した。得られた菌体は、直ちに液体窒素で凍結させ乳鉢を用いて粉末化した。粉末化した菌体を氷冷した 1%プロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma-Aldrich)を含む RIPA buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, and 1% SDS) に添加し、氷上で 30 分静置した。その後、サンプルを 16,000 × g で 20 分遠心分離し、得られた遠心上清を whole-cell extract (WCE) としてウェスタンブロットに供した。WCEs は 15% SDS-PAGE gels を用いて分離した後に、PVDF 膜(Bio-Rad)に転写した。ヒストン 3 リジン 4 (H3K4)のメチル化レベルは、それぞれ以下の一次抗体：anti-H3K4 mono-methylation (Active Motif)、anti-H3K4 di-methylation (Merck Millipore)、anti-H3K4 trimethylation (Active Motif)、anti-histone 3 (Active Motif) を用いて測定した。検出は二次抗体として horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Thermo Scientific) および SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific)を用いて行った。

2.2.4 代謝物の単離・精製

cclA および *sppA* 破壊株で顕著な産生量の増加が見られた 1 および 2 (図 2-3-1)を単離し構造解析を行うこととした。*cclA* 破壊株を 1 L (25 mL/plate × 40 plates)の CYA 寒天培地(2% agar)に植菌し 30 °C で 1 週間培養した。培養終了後、菌体を寒天培地ごと細かく砕き、2 倍量の酢酸エチルで 2 回抽出を行った。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後に、40 mL の 50% アセトニトリルを加え再溶解し、30 分遠心分離した。得られた遠心上清を 0.45 μm のフィルター(Merck Millipore)でろ過し、ろ液を HPLC に供した。HPLC 条

件を表 2-2-3 に示す。溶媒に DMSO-*d*6 を用い、得られた **1** および **2** の ¹H-NMR (共鳴周波数 500 MHz)、¹³C-NMR (共鳴周波数 125 MHz)、および二次元 NMR スペクトラム測定を行った。

表 2-2-3 HPLC 条件

HPLC	Shimadzu prominence HPLC system
column	COSMOSIL 5C18-AR-II (20 × 250 mm)
column temperature	40 °C
flow rate	5 ml/min
Solvent A	0.1% (v/v) formic acid-water
Solvent B	0.1% (v/v) formic acid-acetonitrile
gradient condition	t = 0 min, 100% A; t = 10 min, 60% A; t = 35 min, 20% A; t = 36 min, 0% A; t = 45 min, 0% A
UV detection	260 nm

2.2.5 ガン細胞増殖抑制活性の検討

ヒト子宮頸がん細胞株(HeLa)、ヒト白血病細胞株(HL-60)、マウス乳がん細胞腫の *cdc2* 温度感受性変異株(tsFT210)およびラット繊維芽細胞腫の *v-src* 温度感受性変異株(*src*^{ts}-NRK)を用いたガン細胞増殖抑制活性の測定を行った。測定法は Osada ら[59-61]の方法に従い、以下の通り行った。HeLa 細胞(4×10^3 cells/well/200 μ L)は 96-well microtiter plate (IWAKI) で一晩培養した細胞、HL-60 細胞 (1.5×10^4 cells/well/200 μ L)、tsFT210 細胞 (1.6×10^4 cells/well/200 μ L)および *src*^{ts}-NRK 細胞(1×10^4 cells/well/200 μ L)は、3 時間培養した細胞を、それぞれ試験に供した。各細胞に DMSO を用いて段階希釈した **1** または **2** を添加し(DMSO 終濃度 0.5% (v/v))、48 時間後の生細胞数を測定した。生細胞数の測定は生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque)を用いて、以下の通り行った。各ウェルに 20 μ L の WST-8 を加え HeLa 細胞および HL-60 細胞は 37 °C で 1 時間、tsFT210 細胞および *src*^{ts}-NRK 細胞は 32 °C で 1 時間それぞれインキュベートし、450 nm の吸収をマイクロプレートリーダー(Perkin

Elmer)を用いて測定した。

2.3 結果

2.3.1 *A. oryzae* 転写因子破壊株の二次代謝産物産生プロファイル

2.1 で述べた通り、エピジェネティック制御が糸状菌の二次代謝産物の生産制御に関与している可能性が示唆されていることから、クロマチンの修飾に関与すると予測された 23 遺伝子を含む、転写因子破壊株 111 株の二次代謝産物産生プロファイルの解析を行った。その結果、再現性良く代謝物の産生量が顕著に増加し、かつ非常によく似たプロファイル変化を示す株を 2 株見出した。そこで、この 2 株の破壊対象遺伝子 (AO090124000076 および AO090003001750) について更に解析を行うこととした。各破壊対象遺伝子のアミノ酸配列をクエリーとし blast 解析を行ったところ、AO090124000076 は、*A. nidulans* の CclA と 75.8% の同一性を示したことから、*A. oryzae* の *cclA* オルソログ (AocclA) であると判断した (以下、*cclA* と略)。また、AO090003001750 は C 末側のアミノ酸配列が出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Spp1p のそれと非常に類似しており、Pfam database (<http://pfam.xfam.org/>) によるドメイン検索の結果においても *S. cerevisiae* Spp1p が保持することが知られている plant homeodomain (PHD) finger を保持することが示唆された。以上の結果から、AO090003001750 は *A. oryzae* の *spp1* ホモログであると判断し、AosppA と命名した (以下、*sppA* と略)。*cclA* 破壊株 ($\Delta cclA$) および *sppA* 破壊株 ($\Delta sppA$) の代謝物プロファイルの結果を図 2-3-1 に示す。

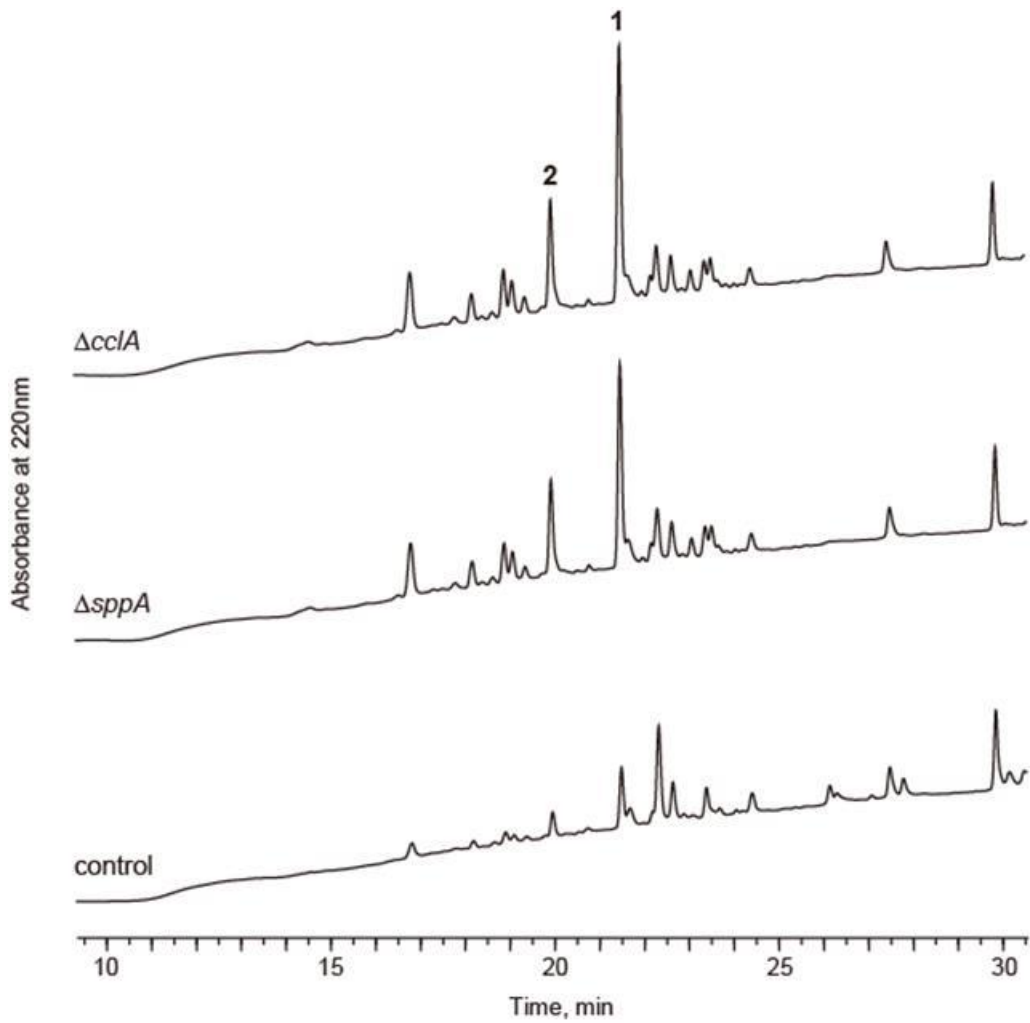


図 2-3-1 *cclA* 破壊株($\Delta cclA$)および *sppA* 破壊株($\Delta sppA$)の代謝物プロファイル

A_{220} における $\Delta cclA$ および $\Delta sppA$ の代謝物プロファイル。コントロールには RkuptrP2-1AF/P 株を用い、同様の条件下で代謝物解析を行った(control)。

2.3.2 ヒストン 3 リジン 4 (H3K4)のメチル化状態の解析

S. cerevisiae において SPP1 および BRE2 (*S. cerevisiae* における *cclA* ホモログ)は、H3K4 のメチル化に関する complex of proteins associated with Set1 complex (COMPASS)の構成因子として知られている(図 2-3-2) [58, 62]。

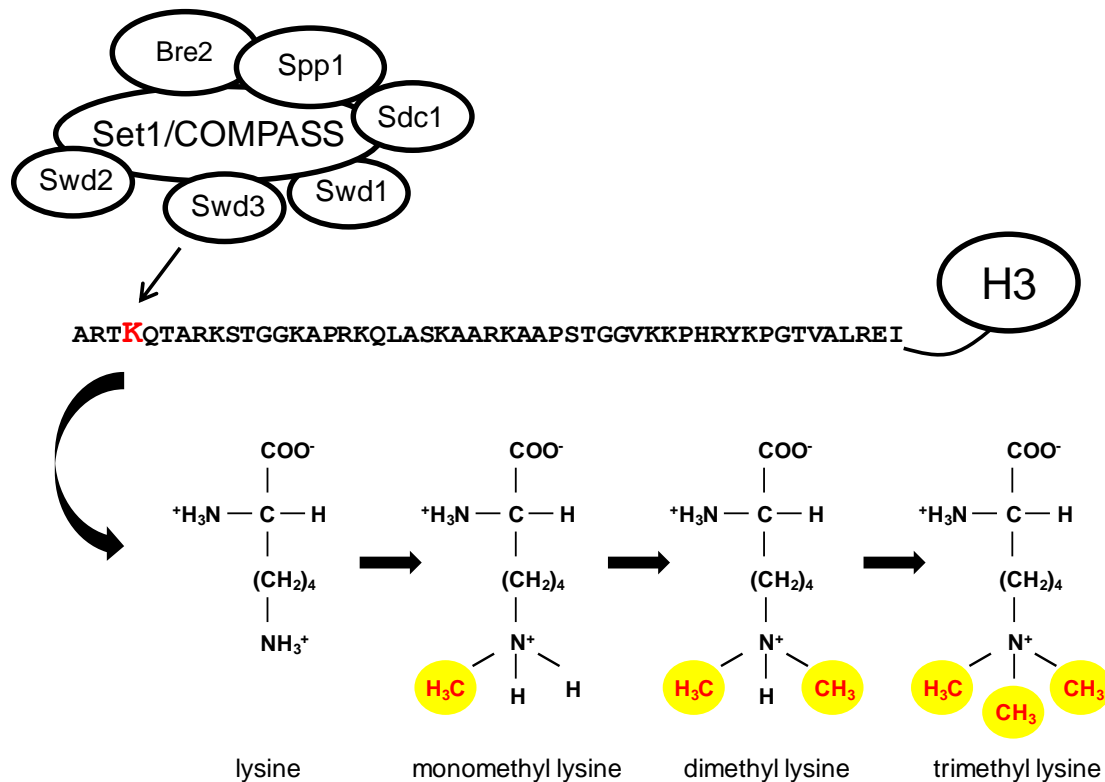


図 2-3-2 COMPASS によるヒストン 3 リジン 4 (H3K4)のメチル化機構

COMPASS はメチル化を触媒する Set1 を含め 7 つのサブユニットから構成され、ヒストン 3 の N 末端側から 4 番目のリジンのメチル化に関する事が知られている。COMPASS によりリジン残基のε位のアミノ基が段階的にメチル化されモノ-、ジ-、トリメチル化リジンが生成する。

そこで、*A. oryzae* において *cclA* および *sppA* 破壊が H3K4 のメチル化レベルに及ぼす影響を検討するため、ウェスタンブロットを用いモノー、ジー、トリメチル化 H3K4 の検出を試みた。その結果、 $\Delta cclA$ および $\Delta sppA$ いずれも、モノーおよびジメチル化 H3K4 はコントロール株とほぼ同等であるのに対し、トリメチル化 H3K4 が顕著に抑制されていることが明らかになった(図 2-3-3)。

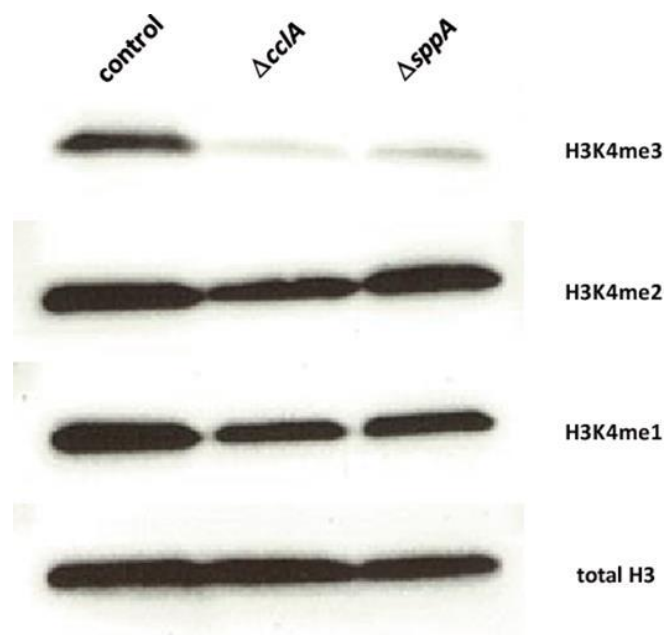
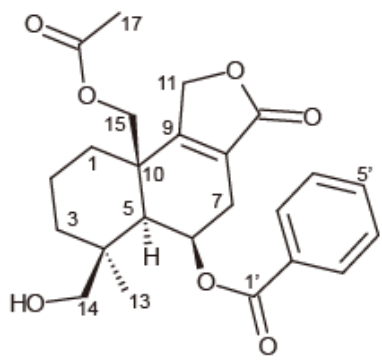


図 2-3-3 H3K4 のメチル化状態の解析

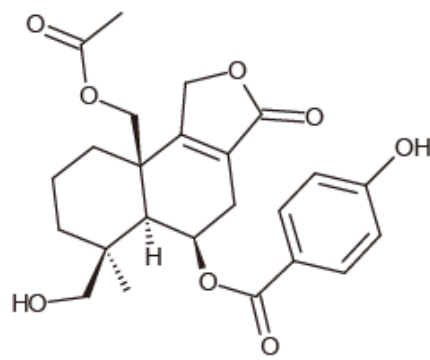
各遺伝子破壊株およびコントロール株の whole cell extracts を用いたウェスタンブロットによる H3K4 のメチル化状態の解析。コントロールには RkuptrP2-1AF/P 株を用い、同様の条件下で解析を行った(control)。

2.3.2 14-deacetyl astellolide A および B の同定

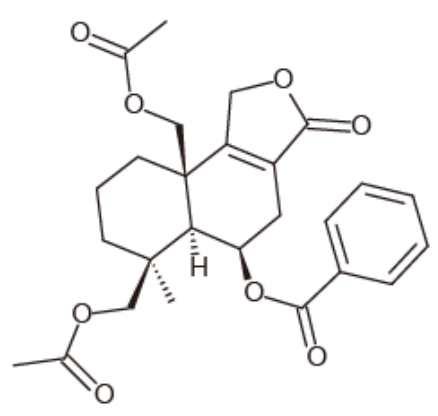
$\Delta cclA$ および $\Delta sppA$ で顕著な産生量の増加が観察された **1** および **2** (図 2-3-1) について、その構造を明らかにするため $\Delta cclA$ の培養物から化合物を単離・精製し、各種 NMR および精密質量分析による構造解析を行った。その結果、**1** および **2** は、*A. varicolor* から単離の報告がある[26]、astellolide A および astellolide B の 14 位がアセチル修飾を受けていない化合物であることが明らかになったことから、14-deacetyl astellolide A (**1**) および 14-deacetyl astellolide B (**2**) と命名した(図 2-3-4)。表 2-3-1 に NMR ケミカルシフトを示す。また、**2** の NOESY 測定において、H-5 (δ 1.88)/H-6 (δ 5.81)、H-5/13-CH₃ (δ 1.03) および H-15 (δ 4.84)/H-14 (δ 3.63) に相関が見られたことから 14 位の水酸基、15 位のアセチル基および 6 位のパラ水酸化安息香酸部位は同一方向に配置しており、その相対配置は(4*S*^{*}, 5*S*^{*}, 6*R*^{*}, 10*R*^{*})であることが示唆された。この結果は、過去に X 線結晶構造解析により絶対配置が明らかになっている astellolide A のそれと一致する[26]。加えて、**2** の旋光度($[\alpha]_{589} -9^\circ$)と astellolide A のそれ($[\alpha]_D -8^\circ$)がいずれも左旋性であることから、**2** の絶対配置は(4*S*, 5*S*, 6*R*, 10*R*)であることが強く示唆された。**2** の ¹H-¹H COSY および HMBC 相関、並びに NOESY 相関を図 2-3-5 に示す。



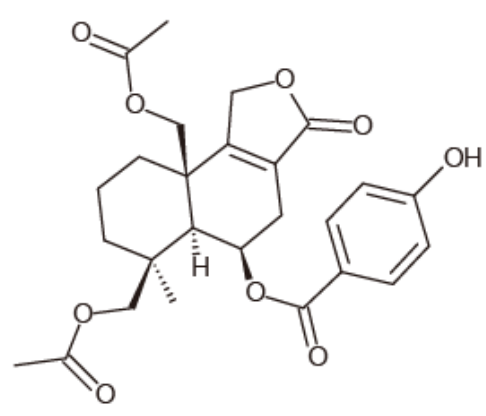
14-deacetyl astellolide A (1)



14-deacetyl astellolide B (2)



astellolide A *



astellolide B *

* Gould et al: Tetrahedron Letters, 22, 1047-1050 (1981)[26]

図 2-3-4 14-deacetyl astellolide A および B の構造式

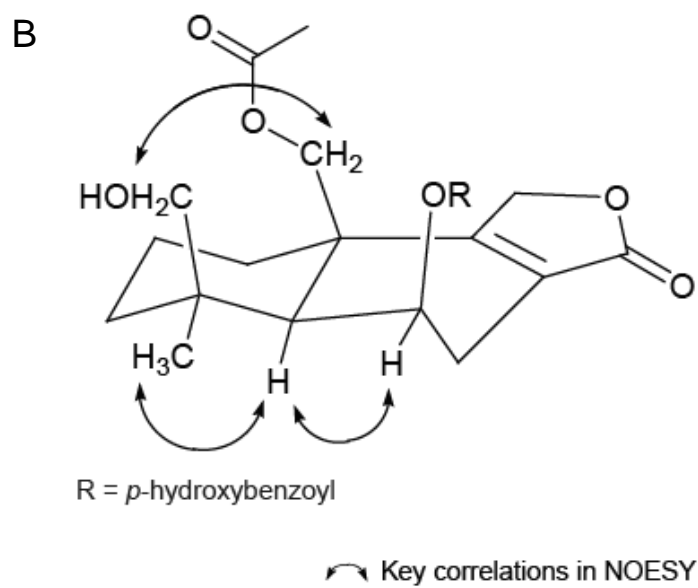
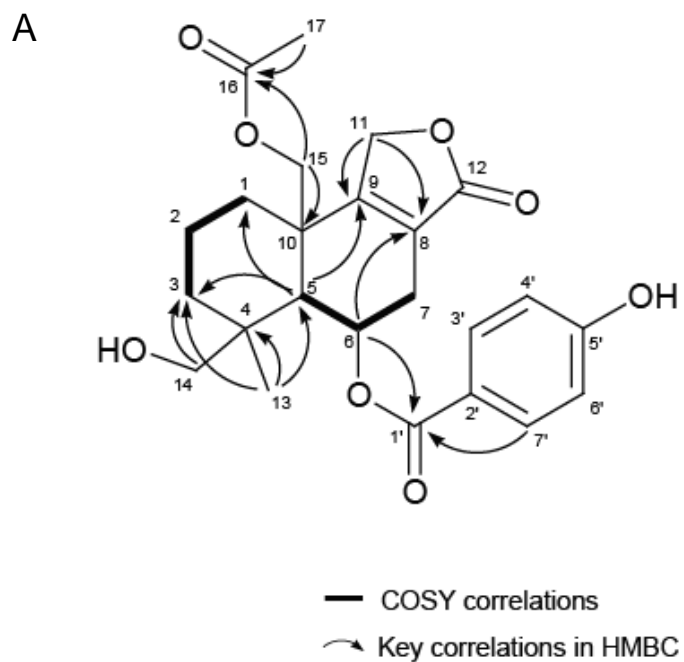


図 2-3-5 14-deacetyl astellolide B の NMR correlation

- A) COSY および主要 HMBC
 B) 主要 NOESY

表 2-3-1 14-deacetyl astellolide A および B の ^{13}C (125 MHz) および ^1H (500 MHz) NMR スペクトルデータ (DMSO- d_6)

No.	14-deacetyl astellolide A (in DMSO- d_6)		14-deacetyl astellolide B (in DMSO- d_6)	
	^{13}C	^1H (J in Hz)	^{13}C	^1H (J in Hz)
1	31.0	1.37, ddd (13.1, 13.1, 2.5) 2.12, m	30.9	1.35, ddd (13.2, 13.2, 2.8) 2.10, m
2	17.5	1.47, m 1.63, m	17.5	1.45, m 1.61, m
3	34.8	0.97, ddd (13.5, 3.4) 1.99, m	34.6	0.94, ddd (13.7, 3.5) 1.99, m
4	39.2	-	39.2	-
5	52.7	1.92, brs	52.8	1.87, brs
6	66.6	5.85, d (5.5)	65.9	5.78, d (5.6)
7	28.4	2.37, d (19.0) 2.77, m	28.5	2.29, d (18.9) 2.73, m
8	121.2	-	121.2	-
9	166.7	-	166.8	-
10	40.0	-	40.0	-
11	71.3	4.98, m	71.3	4.96, m
12	173.2	-	173.2	-
13	27.3	1.02, s	27.3	1.00, s
14	63.2	3.16, dd (10.5, 5.1) 3.63, dd (10.5, 5.1)	63.0	3.19, d (10.5) 3.61, d (10.5)
15	65.6	4.68, d (10.9) 4.82, d (10.9)	65.6	4.65, d (10.9) 4.77 d (10.9)
16	170.3	-	170.4	-
17	20.7	2.10, s	20.8	2.08, s
1'	165.4	-	165.1	-
2'	129.6	-	120.1	-
3',7'	129.2	7.98, d (7.6)	131.6	7.81, d (8.8)
4',6'	128.8	7.53, t (7.7)	115.4	6.83, d (8.8)
5'	133.5	7.68, t (7.6)	162.3	-
14-OH		4.50		4.46
5'-OH		-		10.48

2.3.3 ガン細胞増殖抑制活性

4つのガン細胞種(HeLa、HL-60、tsFT210、*src*^{ts}-NRK)を用い **1** および **2** の増殖抑制活性を評価した。その結果、**1** はいずれの細胞種に対しても増殖抑制活性を示さないものの、**2** は全ての細胞種に対し活性を有することが明らかになった(表 2-3-2)。しかしながら、Ren ら[27]は、astellolide A および B とともに **2** について幾つかのガン細胞種に対する増殖抑制活性を検討しており、いずれの化合物も活性を示さなかったと報告しており、活性の評価方法を含め、より詳細な検討が必要である。

表 2-3-2 14-deacetyl astellolide A および B のガン細胞増殖抑制活性

cell lines	antiproliferative activity (IC ₅₀ , μM)	
	14-deacetyl astellolide A	14-deacetyl astellolide B
HeLa	>30	5.6
HL-60	>30	1.8
tsFT210	>30	16.1
<i>src</i> ^{ts} -NRK	>30	17.4

2.4 考察

A. oryzae の転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニングにより $\Delta cclA$ および $\Delta sppA$ が類似の二次代謝産物の産生プロファイル変化を示し、一部の二次代謝産物の産生量を増加させることを明らかにした。この 2 遺伝子以外にも複数の転写因子破壊株で二次代謝産物の産生プロファイルの変化が確認されたが、中には再現性を得る事が難しい株も存在しており、それらの株については今後より詳細な解析が必要である。

CclA および SppA のホモログであると考えられる *S. cerevisiae* BRE2 および SPP1 は、いずれも H3K4 のメチル化に関与する COMPASS の構成因子であり、破壊により H3K4 のトリメチル化レベルが低下することが知られている[58]。本検討において、*A. oryzae* においても両遺伝子の破壊株では、H3K4 のトリメチル化レベルが著しく低下していることを明らかにした。H3K4 のメチル化は、一般的に転写の活性化に関与することが知られているが、接合型遺伝子や染色体末端にコードされる遺伝子については転写抑制に関与するとの報告もある[58]。今回の *A. oryzae* での検討結果に加え、近縁種である *A. nidulans* や *A. fumigatus* においても *cclA* の破壊により、H3K4 のメチル化レベルが低下するとともに、一部の二次代謝産物の産生量が増加するとの報告[63, 64]があることから、*Aspergillus* 属糸状菌では、H3K4 のメチル化が二次代謝産物生合成遺伝子の転写抑制に関与している可能性が示唆される。醸造という側面から考えると、二次代謝産物の産生は不要である可能性が高いことから *cclA* や *sppA* は、二次代謝産物の産生を抑制することで、不要なエネルギーを醸造に向けるために機能しているとも考えられ非常に興味深い。本検討では、解明には至らなかったものの、今後、*cclA* および *sppA* の制御下にある二次代謝産物生合成遺伝子を同定した上で、各遺伝子がコードされているゲノム領域に位置するヒスト

ンのメチル化状態を解析する事で、*cclA* および *sppA* が二次代謝産物の生合成遺伝子の転写を直接的に制御しているのか、または一次代謝等の転写制御を介し間接的に制御しているかについて明らかにしていく必要がある。

次に、*cclA* 破壊により著しい産生量の増加が見られた 2 つの代謝物を単離・精製し構造解析を行った。その結果、これらは *astellolides* の誘導体である、14-deacetyl *astellolide A* (**1**) および 14-deacetyl *astellolide B* (**2**) であることが明らかになった。序論でも述べた通り、転写因子破壊株ライブラリーの宿主に用いている *A. oryzae* RIB40 株からは、**1** とともに、更に 15 位もアセチル修飾を受けていない化合物 (*dideacetyl astellolide A*) が単離されているものの、*astellolide A* および *B* の生産は確認されていない。本検討で見出した *astellolides* 高生産株である *cclA* 破壊株の代謝物においても *astellolide A* および *B* に相当するピークは検出出来なかったことから、*A. oryzae* RIB40 株における *astellolides* 生合成系の最終生合成産物は、**1** および **2** であることが示唆される。一方、*dideacetyl astellolide A* および *B* については、各化合物のナトリウムアダクトイオンに相当する *m/z* 409 および *m/z* 425 のピークを検出出来た。更に、両ピークのピーク強度が *cclA* 破壊株でコントロール株よりも高くなっていることが確認された(図 2-4-1)。この結果から、*dideacetyl astellolide A* および *B* が *astellolides* 生合成系の生合成中間体である可能性が強く示唆される(図 2-4-2)。また、本検討では、構造解析を行っていないが *astellolides* 以外にも *cclA* の破壊によって産生量が増加する二次代謝産物が複数確認されていることから、これらの化合物についても今後、詳細に検討していく必要がある。

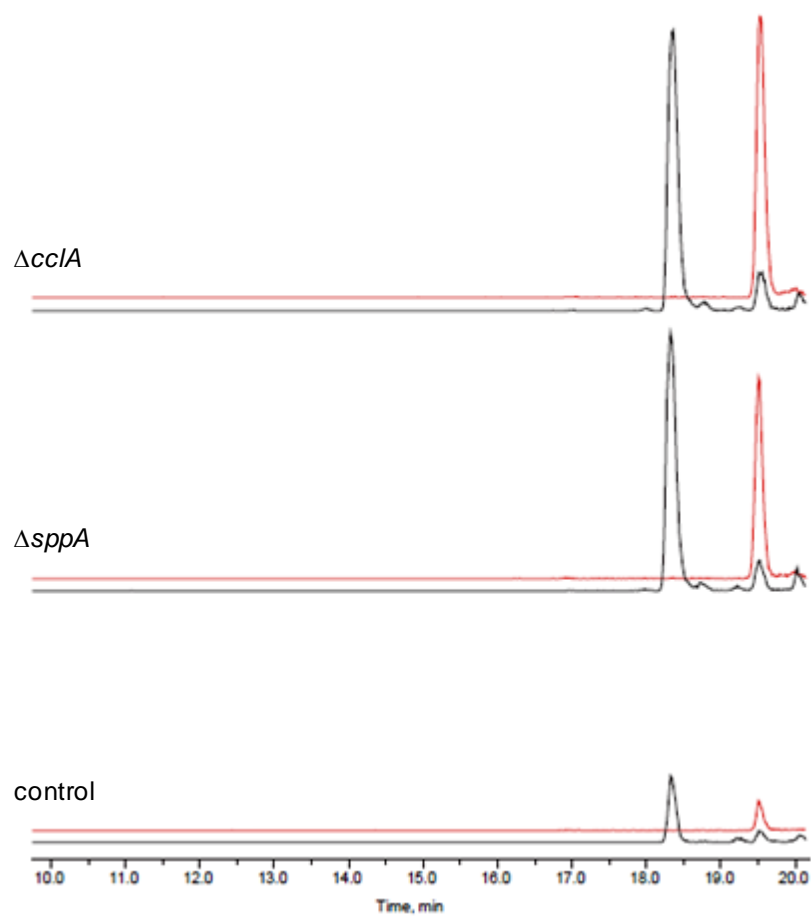


図 2-4-1 dideacetyl astellolides の解析

各遺伝子破壊株とコントロール株の LC-MS 解析。赤は dideacetyl astellolide A (m/z 409 $[M + Na]^+$)、黒は dideacetyl astellolide B (m/z 425 $[M + Na]^+$) に相当する抽出イオンクロマトグラムを示す。コントロールには RkuptrP2-1AF/P 株を用いた(control)。

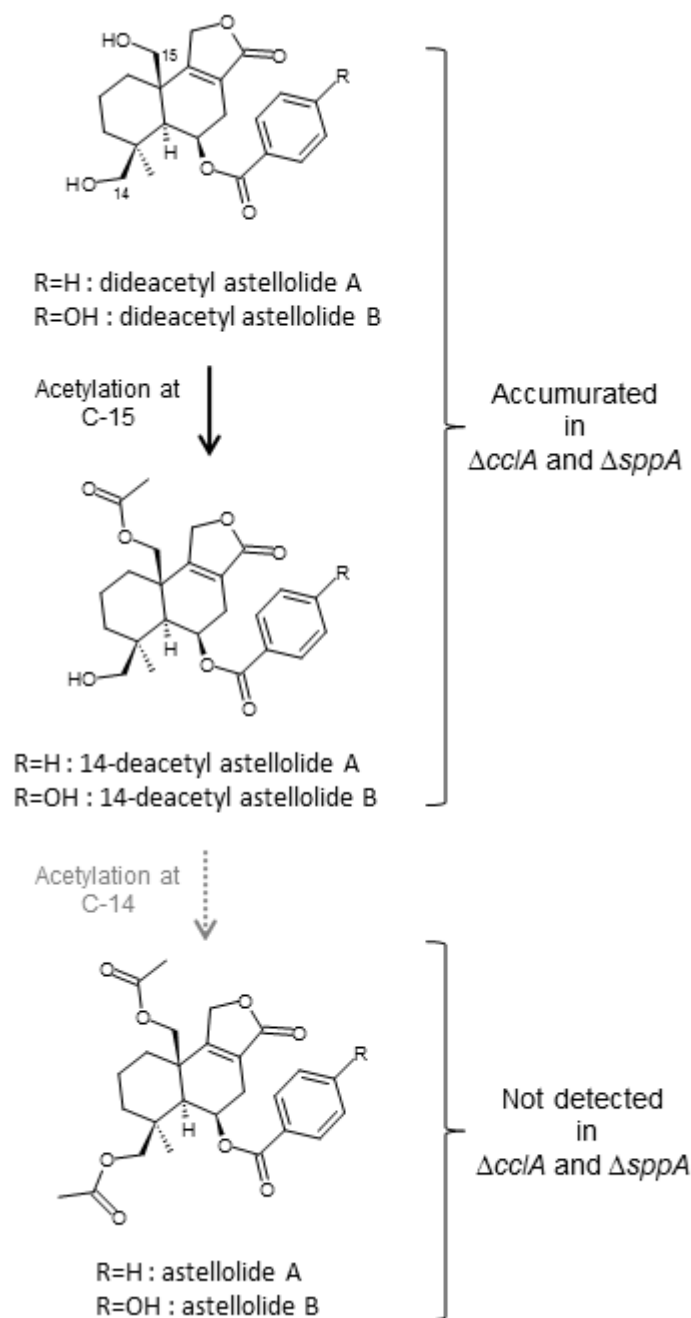


図 2-4-2 *A. oryzae* RIB40 株における推定 astellolide 生合成経路

$\Delta cclA$ および $\Delta sppA$ では、14-deacetyl astellolides とともに didecetyl astellolides と考えられる代謝物が蓄積するものの astellolides に相当する代謝物は検出されない。このことから、*A. oryzae* RIB40 株における astellolide 生合成系の最終生合成産物は 14-deacetyl astellolides であること、dideacetyl astellolides はその生合成中間体である可能性が示唆される。

astellolides の基本骨格を構成しているセスキテルペンラクトンは、抗腫瘍活性を含め様々な生物活性を有する化合物であることから、最後に今回単離した **1** および **2** のガン細胞増殖抑制活性を検討した。その結果、**1** は活性を示さないものの、**2** は試験に供した **4** 細胞種全ての増殖を抑制した。両者の違いは、側鎖のフェノール性水酸基の有無であることから、この違いが活性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかしながら、**2.3.3** でも述べた通り、**2** がガン細胞増殖抑制活性を示さなかったとの報告もある[27]。本検討では **WST-8** を用いて生細胞を測定しているのに対し、上記の報告では **MTT** を用いているなど、測定法に違いはあるものの活性の有無についてはより詳細な検討が必要である。

astellolides およびその類縁化合物は、複数の *Aspergillus* 属糸状菌から単離の報告があるものの、その生合成に関与する遺伝子については全く知見がない。そこで、第 3 章では、**astellolides** 高生産株である *ccIA* 破壊株を用い **astellolides** の生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。

第3章 *A. oryzae* における *astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定

3.1 序

Astellolides は、*A. oryzae* が産生することが 2012 年に報告されているもののその生合成遺伝子に関する知見はない[7]。また、序論でも述べた通り、*astellolides* の類縁化合物は糸状菌のみならず、植物等からも単離の報告がなされており、中には非常にユニークな生物活性を示す化合物も存在する[28-34]。しかしながら、いずれの化合物もその生合成遺伝子に関する報告はない。

A. oryzae が産生する二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを同定することは、醸造用微生物としての安全性向上に寄与すると考えられる。更に、*astellolides* の生合成遺伝子クラスターを同定することが出来れば、上述の類縁化合物の生合成遺伝子クラスターを探索する上で、有益な情報を与えることが出来ると考えられる。そこで、本章では、第 2 章の検討において見出した *astellolides* の高生産株である *cclA* 破壊株を用いて、*A. oryzae* における *astellolide* 生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 DNA マイクロアレイ解析

cclA 破壊株およびコントロール株(RkuptrP2-1AF/P 株)を CYA 寒天培地(2% agar)に植菌し 30 °C で 5 日間培養した。RNA の調製は 1.2.7 に記載の方法で行い、得られた RNA 500 ng を DNA マイクロアレイ解析に供した。DNA マイクロアレイ解析は Ogawa ら[65]の方法に準じて行った。

3.2.2 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)

RNA の調製は 3.2.1 と同様の条件で行った。*cclA* 破壊株およびコントロール株ともに、独立して 3 回調製を行った RNA を鋳型とし、Primescript™ RT reagent Kit (Takara Bio)を用いてランダムヘキサマーによる逆転写反応により cDNA を調製した。qRT-PCR 反応は SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio)および MX3000p cycler (Stratagene)を用いて行った。測定には検量線法を用い、全ての反応を 2 連で行った。内在性遺伝子としてヒストン 2B (H2B)を測定し、各遺伝子の発現量は H2B 遺伝子との相対発現量として算出した。qRT-PCR に使用したプライマーを表 3-2-1 に示す。

表 3-2-1 qRT-PCR に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	target gene
587qRT-F	AGGAGATCCCCGGCTGTCCTA	AO090026000587
587qRT-R	TGGAAGCAGCATCCCCTTGGT	
586 qRT-F	ATGGCGTCAATACGGGCTTC	AO090026000586
586 qRT-R	ATTGCCGGACGCGGTATCCT	
astA qRT-F	CATCTGCGACTCGGGTGGTG	AO090026000585 (astA)
astA qRT-R	TGGCCAGTACGGCTCACTGA	
astB qRT-F	TGGATGGTGGATTTCGTTCCCGA	AO090026000584 (astB)
astB qRT-R	CTGCGCATGAATCTGCTGACCGA	
astC qRT-F	CTTCGTAGCCATGCGAAGTCC	AO090026000582 (astC)
astC qRT-R	CGACAAGATCGATGTCACCCGT	
astD qRT-F	ATACCAGGCAAGACCGTTGTCA	AO090026000581 (astD)
astD qRT-R	TAGCGTCCTCGTCGAAACGTGG	
astE qRT-F	AGCGAAAGCGTCCAGGCCAT	AO090026000580 (astE)
astE qRT-R	GCCAGTGATCCTCGTGGAGT	
astF qRT-F	CTACTGGTCGGGGCACATGGAC	AO090026000579 (astF)
astF qRT-R	GCGCTAATCGACGTCTGCACA	
astG qRT-F	GCCTGGAAGTCTTTGACGTGCCT	AO090026000578 (astG)
astG qRT-R	GCGCAGACGACCCAACACCT	
astH qRT-F	CCATCGTAGCAGTGCAAGGCTC	AO090026000577 (astH)
astH qRT-R	ACGTTCTGGCCGACGGACAT	
astI qRT-F	TCATCCGGCAGCTGAAGCAG	AO090026000576 (astI)
astI qRT-R	CCGAGGCAAAGACCTCGTCGA	
astJ qRT-F	CTTGCAATTGGAAGAAACCTCGCA	AO090026000575 (astJ)
astJ qRT-R	TGCCAGTCTGCTGAACGCT	
astK qRT-F	TCCACCAGCTACGGGAGATG	AORIB40_NS.05916 (astK)
astK qRT-R	GTTTCAGCCGCCGAGGTA	
NS.05917 qRT-F	TGTCGAGTGGCCTCTGTGCA	AORIB40_NS.05917
NS.05917 qRT-R	AGTCCGACCACTGTGCGAGCA	
574 qRT-F	GTGAAGGGTCTCGGCATCCT	AO090026000574
574 qRT-R	AGGAGTAGCCGTAGGTCTGGGA	
H2B qRT-F	AAGAAGCGTGGAAGACCAGG	Histone 2B
H2B qRT-R	GACATGGCACGAGTGGAGATT	

3.2.3 *pyrG* マーカーリサイクリング

astellolides 高生産条件下で解析を行うため *pyrG* マーカーリサイクリング法により *cclA* 破壊株の *pyrG* を除去した。マーカーリサイクリング用のカセットは、*cclA* 遺伝子の 5' region と 3' region の PCR 産物を fusion PCR によって直接繋げることで作製した。また、fusion PCR は nested PCR になるように設計したプライマーセット(LU-2 および RL-2)を用いて行った。各 PCR 産物が直接繋がるように additional nucleotides を改変した 5' region と 3' region の増幅用プライマーおよび fusion PCR に用いたプライマーを表 3-2-2 に示す。次に、*cclA* 破壊株を宿主とし、得られた *pyrG* マーカーリサイクリングカセットを用い 1.2.3 に記載の方法で形質転換を行った。形質転換体のセレクションは以下の方法で行った。まず、形質転換後のプロトプラストを 1.2 M ソルビトールおよび 15 mM のウリジンを含む Cz 寒天培地(1.5% Agar)に植菌し胞子を再生させた。次に、15 mM のウリジンと 2 mg/ml の 5-フルオロオロチン酸を含む Cz 寒天培地(1.5% Agar)を用いたポジティブセレクションにより再生した胞子から *cclA* および *pyrG* の二重破壊株を得た。*pyrG* が除去されていることは、LU プライマーおよび RL プライマーを用いた PCR 法により確認した。

表 3-2-2 *pyrG* マーカーリサイクリングカセット作製に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	purpose
<i>cclA</i> -LU	AAGGATGAGATCGGCTAGATTTGTG	5' region of <i>cclA</i>
<i>cclA</i> -LL	<u>TCAGGGGAGCCTACATTGCC</u> TTTGGACCTTGGACCGTCAGTTTG	
<i>cclA</i> -RU	<u>TGACGGTCCAAGGTCCA</u> AAGGCAATGTAGGCTCCCCTGATGTAG	3' region of <i>cclA</i>
<i>cclA</i> -RL	TGAATTTGGCATGGGTTCTCATTC	
<i>cclA</i> -LU-2	TCGCTGCTATATTTCCCAATGAAGTC	fusion PCR for <i>cclA</i>
<i>cclA</i> -RL-2	CGGCTGCATACACTGGGACAGTTG	

¹ Underlined sequences represent the additional nucleotides for fusion PCR

3.2.4 astellolide 生合成遺伝子破壊株の作製

遺伝子発現解析の結果から *cclA* 破壊株で顕著な発現量の増加が見られた SMURF で cluster39 と予測される遺伝子群の破壊株を作製することとした(3-3-1 参照)。*pyrG* の増幅には、2.2.2 記載のプライマーセットを用い、得られた PCR 産物を全ての破壊株カセット作製に使用した。また、fusion PCR は nested PCR になるように設計したプライマーセット(LU-2 および RL-2)を用いて行った。上記以外の点については、1.2.2 記載の方法に従い、遺伝子破壊カセットを作製した。各プライマーは AspGD および NITE (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/AO2>)の ORF 予測情報を参考に設計した。破壊カセット作製に用いたプライマーを表 3-2-3 に示す。次に、3.2.3 で作製した *cclA* および *pyrG* の二重破壊株を宿主とし、得られた破壊カセットを用い 1.2.3 に記載の方法で形質転換を行った。得られた形質転換体の目的遺伝子が破壊されていることは、各破壊対象遺伝子の LU プライマーおよび RL プライマーを用いた PCR 法により確認した。

3.2.5 二次代謝物産生プロファイル解析

各遺伝子破壊株の二次代謝産物の解析は、2.2.1 に記載の方法で行い、LC-MS は表 1-2-2 に示す条件で行った。

3.2.6 代謝物の単離、精製

cclA および *astA* の二重破壊株で蓄積が見られた **3**、*cclA* および *astG* の二重破壊株で蓄積が見られた **4** および **5** をそれぞれ単離し構造解析を行うこととした(3-3-2 参照)。代謝物の単離は HPLC の UV detection を 220 nm に変更し、それ以外については 2.2.4 に記載の方法で行った。

表 3-2-3 遺伝子破壊カセット作製に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	purpose
astA-LU	CACCAGTGGAGTGACAGATCAT	5' region of <i>astA</i>
astA-LL	<u>AGGGTACGTCTGTTGT</u> AGGATACTGAAGATGAGGCCAG	
astA-RU	<u>CTTCTGAGGTGCAGTT</u> GACTCCTATCGATCGTACTCTG	3' region of <i>astA</i>
astA-RL	GGATCGATACTCACTACGGA	
astA-LU-2	GACTCCCAGCTCTGAATGATCT	fusion PCR for <i>astA</i>
astA-RL-2	CAGGATCGATACTCACTACGGA	
astB-LU	CGAAAGGCAGTGTTTGATCGTCTGC	5' region of <i>astB</i>
astB-LL	<u>GTACGTCTGTTGTC</u> TTCCCTTGAAAAGGCTGACGGT	
astB-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTC</u> GCCTCAAGCACACCAGTGGAGT	3' region of <i>astB</i>
astB-RL	TGCCACATGCGTTTATGCGGAGG	
astB-LU-2	AAAGTCGCCAGGAGCTTCGTCA	fusion PCR for <i>astB</i>
astB-RL-2	TGATCGAGCAGAGGATCGATGTCCT	
astC-LU	TGCATACGGCAAGTAATCCGCCA	5' region of <i>astC</i>
astC-LL	<u>GTACGTCTGTTGTT</u> GGAAGTACTTGAGCATGGCAT	
astC-RU	<u>CTGAGGTGCAGTIT</u> TCCGCCATGTCCTGGAGAGCA	3' region of <i>astC</i>
astC-RL	AGCTGATCGGGTCTACTGGTACACC	
astC-LU-2	ATCTGGCCCTTATCAGTTGGCTGCA	fusion PCR for <i>astC</i>
astC-RL-2	CACTTGACGTACCCAGGCCAAAGT	
astD-LU	CCTGCAATCGGTAACAAGTACGGCT	5' region of <i>astD</i>
astD-LL	<u>GTACGTCTGTTGT</u> TGGTCCAGTACAACTGCACCCA	
astD-RU	<u>CTGAGGTGCAGTIT</u> CACACAGCACCTGTTGGATGCA	3' region of <i>astD</i>
astD-RL	TCTCAAAGCGTACTGCAAGTTGGCA	
astD-LU-2	TGGACGGATGATATGGAAGCCTTGC	fusion PCR for <i>astD</i>
astD-RL-2	AGCTTCGGCTTTTTGTCCAGCAGA	
astE-LU	TGGTCGAGTAAACCATGTACGCCGT	5' region of <i>astE</i>
astE-LL	<u>GTACGTCTGTTGTT</u> GACCATGGCCTGGACGCTTTC	
astE-RU	<u>CTGAGGTGCAGTIA</u> ACCTTGTGGCGTCGCATTCT	3' region of <i>astE</i>
astE-RL	CCGGTCAGCAATGATCGTAGGCTC	
astE-LU-2	GGCTGGAGTGATCGCCTCGATC	fusion PCR for <i>astE</i>
astE-RL-2	TCCGAGACCAACTTTTGCCTCTG	
astF-LU	ACCCCTTGCAAGAAGGTGGCTT	5' region of <i>astF</i>
astF-LL	<u>GTACGTCTGTTGTC</u> GTTGCGTTGGTAAGTGTCTGGGT	
astF-RU	<u>CTGAGGTGCAGTIT</u> GATCGGCGTGCTTTTTGAGGCAG	3' region of <i>astF</i>
astF-RL	ACAGAGCGCAAAAGTTGGTCTCGGA	
astF-LU-2	GTTGACAGCGGAGATGCTCCCTAC	fusion PCR for <i>astF</i>
astF-RL-2	TCGCGTTCCTGAAAGAGGCGTTCT	

表 3-2-3 遺伝子破壊カセット作製に用いたプライマー (続き)

Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	purpose
astG-LU	CAATCAGCCCATGAAGCCACACC	5' region of <i>astG</i>
astG-LL	<u>GTACGTCTGTTGTC</u> GATCGATGGTGAAGCGTCCTCA	
astG-RU	<u>CTGAGGTGCAGTTC</u> GC GCACTAAAGTCCCATGGCT	3' region of <i>astG</i>
astG-RL	CGTTCATGCATACCCGGAGTTCAGCT	
astG-LU-2	CATGGATTGCGCTCTCAGGTAGGT	fusion PCR for <i>astG</i>
astG-RL-2	AGGAACCATCTCCAGGCACGTCA	
astH-LU	AGCTGAACTCCGGTATGCATGAACG	5' region of <i>astH</i>
astH-LL	<u>GTACGTCTGTTGT</u> AACAGTCAGCCAGCCAAATCAC	
astH-RU	<u>CTGAGGTGCAGT</u> TAAGTGGAAACGAAGGCCGCTTTTGA	3' region of <i>astH</i>
astH-RL	ACGCGTTGTTGGAGTCCATTCGA	
astH-LU-2	AGGCTGTGAACATCTGCCATCCAT	fusion PCR for <i>astH</i>
astH-RL-2	CTGCTAGCACCATCGGGAGGTT	
astI-LU	TCGATGCGGCTAGAGTGCTCCA	5' region of <i>astI</i>
astI-LL	<u>GTACGTCTGTTGT</u> TAACGGGGGACTTCATGCTGGTG	
astI-RU	<u>CTGAGGTGCAGT</u> ITCATCCGGCAGCTGAAGCAGAC	3' region of <i>astI</i>
astI-RL	CATGGTCGGTTTGTGCCAAAGGTC	
astI-LU-2	GAGGCCTTCTATGTTGCTGTGGCT	fusion PCR for <i>astI</i>
astI-RL-2	CAGAGATGGCTTGATCGTGACGCA	
astJ-LU	AGATGCAGCCCTACCATCCCAAC	5' region of <i>astJ</i>
astJ-LL	<u>GTACGTCTGTTGT</u> AGCCTTCTGAACCAATCCACACAGG	
astJ-RU	<u>CTGAGGTGCAGT</u> TGACACTGGTAAGGGCTGATTCCCCT	3' region of <i>astJ</i>
astJ-RL	GCTGCGTTCATCTCAATCTCGGGTG	
astJ-LU-2	GCCATCGAACAAGTCCCCTCGTAG	fusion PCR for <i>astJ</i>
astJ-RL-2	AAATGGCTCCCCAAATGCAAGGTC	
astK-LU	CCGAATGACGTCCCCGTACACT	5' region of <i>astK</i>
astK-LL	<u>GTACGTCTGTTGTC</u> CTTGAGGGATACTTGCGTGTCGA	
astK-RU	<u>CTGAGGTGCAGT</u> ITCGGAAATCGCCGCACATTTCG	3' region of <i>astK</i>
astK-RL	ACGGCATCAATCGTCTGCGTCGT	
astK-LU-2	CAGGTGCAGATTGCCTGTGCA	fusion PCR for <i>astK</i>
astK-RL-2	GTA CT CAGGGTTT CCTACAGGGCTG	
586-LU	GAGGCAAACTTTTGCGTGGTGCGAA	5' region of 586
586-LL	<u>GTACGTCTGTTGTC</u> AACTGTGCTAGCAGCGCGAGTT	
586-RU	<u>CTGAGGTGCAGT</u> ITCTACTACGGACGGCCAGTCAGT	3' region of 586
586-RL	TGGAACGTGCAGTTGATGGCGAAC	
586-LU-2	GACCTCAACGCGGCCATTCAGG	fusion PCR for 586
586-RL-2	ACTTGGGATGACGCTTGCCCTTCCA	

表 3-2-3 遺伝子破壊カセット作製に用いたプライマー (続き)

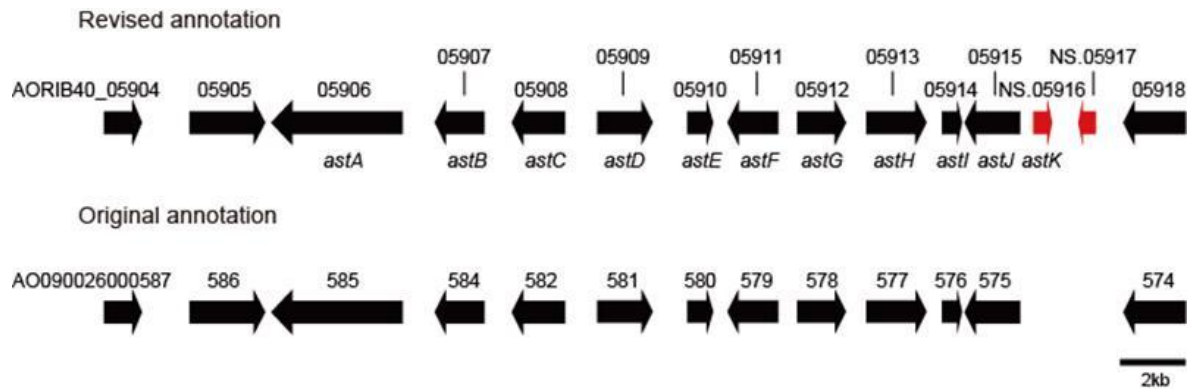
Primer name	Sequence (5' to 3') ¹	purpose
NS.05917-LU	TGGAGCCTTGATCTGAGGTCAGGT	5' region of NS.05917
NS.05917-LL	<u>GTACGCTCTGTTG</u> TA ¹ CTGCGTCGTAGGCTTTGGCTG	
NS.05917-RU	CTGAGGTGCAGTTC ¹ AAACCTGCCATTGAGCGAGGT	3' region of NS.05917
NS.05917-RL	GTAAGTCCCCTGCCAGCCTGT	
NS.05917-LU-2	TTAGCTCCGGAATCGCGGGAATTG	fusion PCR for NS.05917
NS.05917-RL-2	ACAGCGGATACTCAGACACCCACTA	
pyrG-U	ACAACAGACGTACCCTGTGATGTTC	pyrG amplification
pyrG-L	AACTGCACCTCAGAAGAAAAGGATG	

¹ Underlined sequences represent the additional nucleotides for fusion PCR

3.3 結果

3.3.1 推定 astellolide 生合成遺伝子クラスターの同定

astellolides の生合成に関与している遺伝子の絞り込みを行うため DNA マイクロアレイ解析を用い、astellolides 高生産株である *ccIA* 破壊株において発現量が増加しているバックボーン遺伝子の探索を行った。その結果、第 2 章で述べた SMURF 解析により cluster39 と名付けられた遺伝子群の発現量が上昇していることを見出した。2015 年に NITE によって行われた *A. oryzae* RIB40 株の ORF 再予測を含めた遺伝子の re-annotation の結果では、cluster39 に 2 つの新たな ORF の存在が予測されている(図 3-3-1)。そこで、これら 2 つの ORF を含め、各遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて検証したところ AO090026000586 から AORIB40_NS.05917 までの 13 遺伝子の発現量が *ccIA* 破壊株で 10 倍以上も上昇していることが明らかになった(図 3-3-2)。



Gene name	revised annotation					original annotation						
	Locus Gene ID	Position		Dir	Gene bp	Protein aa	Locus Gene ID	Position		Gene bp	Protein aa	
		Start	End					Start	End			
	AORIB40_05904	1638037	1639172	R	1136	317	AO090026000587	1638037	1639172	R	1136	317
	AORIB40_05905	1634259	1636578	R	2320	730	AO090026000586	1634259	1636578	R	2320	730
<i>astA</i>	AORIB40_05906	1630069	1634085	F	4017	1338	AO090026000585	1630069	1634085	F	4017	1338
<i>astB</i>	AORIB40_05907	1627556	1629097	F	1542	513	AO090026000584	1627556	1629097	F	1542	513
<i>astC</i>	AORIB40_05908	1625110	1626740	F	1631	480	AO090026000582	1625110	1626740	F	1631	480
<i>astD</i>	AORIB40_05909	1622434	1624148	R	1715	512	AO090026000581	1622434	1624148	R	1715	512
<i>astE</i>	AORIB40_05910	1620585	1621370	R	786	261	AO090026000580	1620585	1621370	R	786	261
<i>astF</i>	AORIB40_05911	1618599	1620164	F	1566	521	AO090026000579	1618599	1620164	F	1566	521
<i>astG</i>	AORIB40_05912	1616505	1618010	R	1506	471	AO090026000578	1616505	1618010	R	1506	471
<i>astH</i>	AORIB40_05913	1614075	1615892	R	1818	564	AO090026000577	1614075	1615892	R	1818	564
<i>astI</i>	AORIB40_05914	1612969	1613574	R	606	201	AO090026000576	1612969	1613574	R	606	201
<i>astJ</i>	AORIB40_05915	1611203	1612908	F	1706	507	AO090026000575	1611203	1612908	F	1706	507
<i>astK</i>	AORIB40_NS.05916	1610213	1610803	R	591	196	-	-	-	-	-	-
	AORIB40_NS.05917	1608890	1609453	F	564	187	-	-	-	-	-	-
	AORIB40_05918	1606152	1608053	F	1902	633	AO090026000574	1606152	1608053	F	1902	633

図 3-3-1 推定 *astellolide* 生合成遺伝子クラスターの ORF 予測結果の比較

Revised annotation および Original annotation の ORF 予測情報は、それぞれ NITE (<http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/AO2>) および AspGD (<http://www.aspgd.org/>) のデータベースから入手した。Revised annotation において新たに予測された 2 つの ORF を赤字で示した。

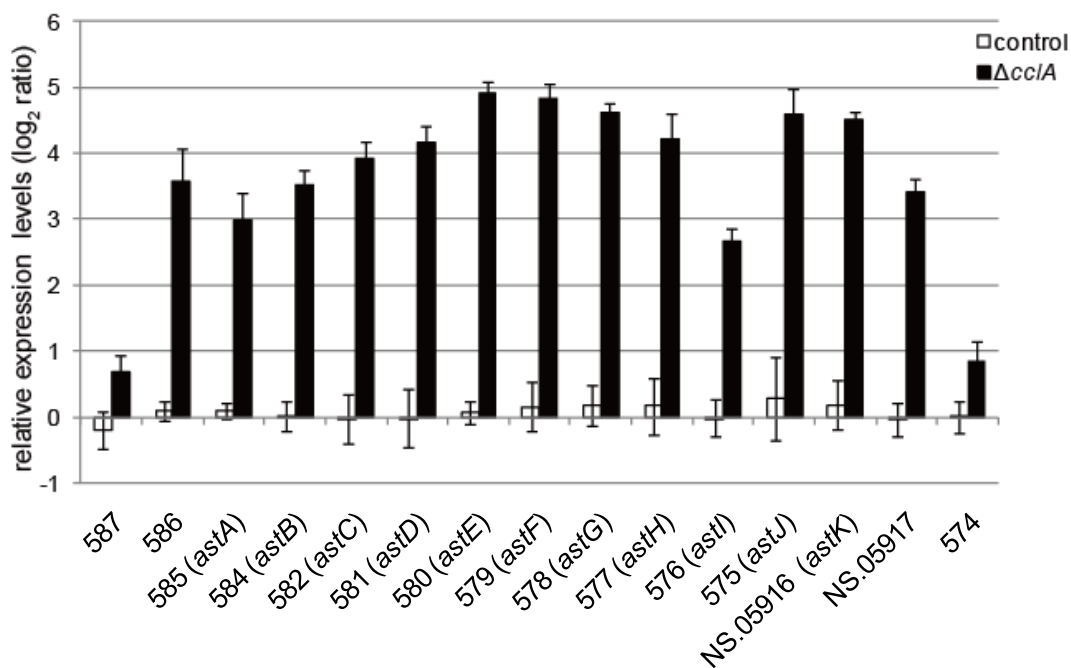


図 3-3-2 推定 *astellolide* 生合成遺伝子発現量

各遺伝子を 2 連で測定しヒストン 2B の発現量に対する相対発現量を求めた。データは独立して実施した 3 回の試験の平均値(± SD.)で示した。X 軸には解析対象遺伝子の略語を示した。略語は、Original annotation の Gene ID の下 3 けたの数字または、Revised annotation の Gene ID の AORIB40 以下とした。

次に、これらの遺伝子群が *astellolides* の生合成に関与しているかどうかを検証するため、*cclA* 破壊バックグラウンドで各遺伝子の破壊株を作製し、得られた株の代謝物解析を行った。その結果、作製した 13 遺伝子破壊株の内、7 つの遺伝子(*astA*、*astB*、*astC*、*astD*、*astF*、*astG*、*astJ*)破壊株で、第 2 章で単離した 14-deacetyl *astellolide* A (**1**)および B (**2**)の産生が消失していることが明らかになった(図 3-3-3)。また、消失はしないものの *astE* の破壊株では、**1** および **2** の産生量が著しく低下し、*astI* および *astK* の破壊株では明確な産生量の低下が確認された。以上の結果から、cluster39 が *astellolides* の生合成に関与していることが明らかになった。一方、*astH* および AO090026000586、AORIB40_NS.05917 の 3 遺伝子は、qRT-PCR 解析の結果では *cclA* 破壊株で顕著な発現量の増加が見られるものの、破壊しても **1** および **2** の産生量に変化は見られなかった。AO090026000586 および AORIB40_NS.05917 の 2 遺伝子がクラスターの両端に位置していることから、この 2 遺伝子を除く 11 遺伝子が *astellolide* 生合成遺伝子クラスターであると推定し、それぞれ *astA* から *astK* と命名した(表 3-3-1)。

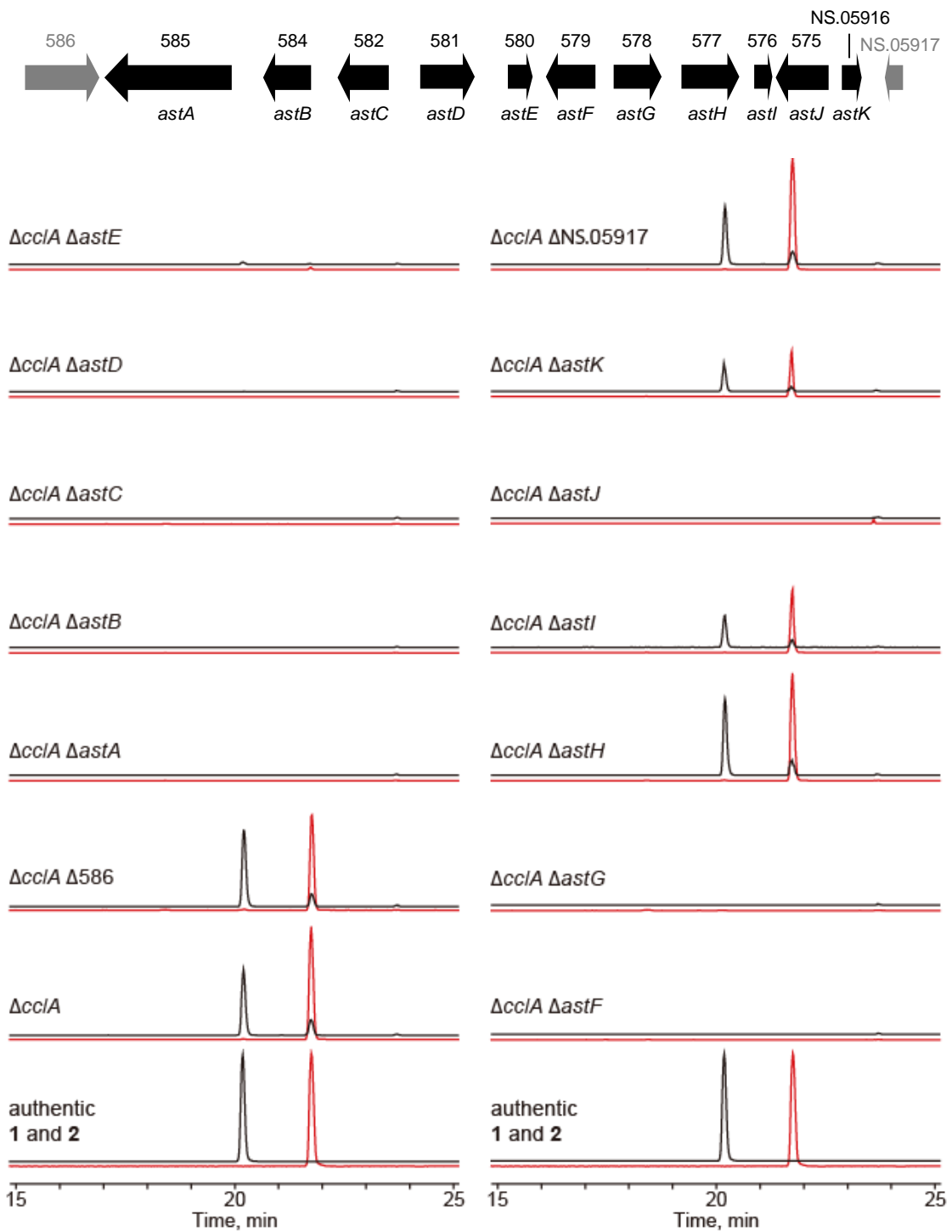


図 3-3-3 推定 *astellolide* 生合成遺伝子破壊株の *astellolides* 生合成能の検討

各遺伝子破壊株の代謝物および第 2 章で単離・精製した **1** および **2** の標品を LC-MS で解析した。赤は **1** (m/z 429 $[M + H]^+$)、黒は **2** (m/z 445 $[M + H]^+$) の抽出イオンクロマトグラムを示す。

表 3-3-1 推定 astellolide 生合成遺伝子クラスターのアノテーション

Name	Original gene ID (Revised gene ID)	Size (aa)	Putative function	Protein homolog (species, NCBI accession No)	Identity/ similarity (%)	Conserved domain (e-value) ^a
-	AO090026000587 (AORIB40_05904)	317	unknown	hypothetical protein (<i>A. flavus</i> , KJJ29440.1)	99/100	no conserved domain detected
-	AO090026000586 (AORIB40_05905)	730	ammonia lyase	aromatic amino acid lyase (<i>A. parasiticus</i> , KJK60308.1)	97/98	lyase_aromatic (3.6e-152)
AstA	AO090026000585 (AORIB40_05906)	1338	ester-bond forming NRPS	AMP-dependent synthetase/ligase (<i>P. expansum</i> , KGO43219)	40/55	AMP-binding (5.4e-62) PP-binding (6.2e-5) Condensation (1.3e-12)
AstB	AO090026000584 (AORIB40_05907)	513	cytochrome P450	cytochrome P450 (<i>A. niger</i> , XP_001391091.1)	50/68	cytochrome P450 (5.3e-63)
AstC	AO090026000582 (AORIB40_05908)	480	sesquiterpene cyclase	HAD-like hydrolase (<i>A. parasiticus</i> , KJK60343.1)	97/98	HAD-like hydrolase (2.8e-19)
AstD	AO090026000581 (AORIB40_05909)	512	cytochrome P450	hypothetical protein (<i>P. brasilianum</i> , CEJ62411.1)	62/75	cytochrome P450 (5.3e-73)
AstE	AO090026000580 (AORIB40_05910)	261	dehydrogenase	glucose dehydrogenase (<i>Citricoccus sp.</i> , WP_010144002.1)	55/71	short-chain dehydrogenase (3.6e-50)
AstF	AO090026000579 (AORIB40_05911)	521	cytochrome P450	cytochrome P450 (<i>A. parasiticus</i> , KJK60355.1)	96/97	cytochrome P450 (7.2e-69)
AstG	AO090026000578 (AORIB40_05912)	471	acetyl transferase	hypothetical protein (<i>P. crustosum</i> , AGZ20197.1)	33/52	transferase (6.8e-24)
AstH	AO090026000587 (AORIB40_05913)	564	transporter	drug resistance transporter EmrB/QacA subfamily protein (<i>A. parasiticus</i> , KJK60349.1)	97/98	major facilitator superfamily transporter (7.9e-39)
AstI	AO090026000576 (AORIB40_05914)	201	phosphatase	HAD-like hydrolase (<i>A. parasiticus</i> , KJK60328.1)	96/98	HAD-like hydrolase (1.1e-28)
AstJ	AO090026000575 (AORIB40_05915)	507	cytochrome P450	cytochrome P450 (<i>A. parasiticus</i> , KJK60354.1)	57/72	cytochrome P450 (3.3e-67)
AstK	- (AORIB40_NS.05916)	196	phosphatase	phosphatase yihX, putative (<i>A. flavus</i> , XP_002379379.1)	99/99	HAD-like hydrolase (1.8e-29)
-	- (AORIB40_NS.05917)	187	oxidoreductase	oxidoreductase, putative (<i>A. flavus</i> , XP_002379380.1)	100/100	GFO_IDH_MocA (4.4e-15)
-	AO090026000574 (AORIB40_05918)	633	unknown	hypothetical protein (<i>A. flavus</i> , KOC17980.1)	97/97	no conserved domain detected

^a 各タンパク質のドメイン予測は Pfam database (<http://pfam.xfam.org/>) を用いて行った。

3.3.2 *astA* および *astG* 破壊株の解析

NRPS をコードすると予測される *astA* の破壊株($\Delta cclA \Delta astA$) では **1** および **2** の産生が消失するとともに **3** の蓄積が見られた(図 3-3-4 A)。また、transferase をコードすると予測される *astG* の破壊株($\Delta cclA \Delta astG$) では **1** および **2** に加えて、未同定の 2 つのピーク(RT 18.8 min と 19.0 min)が消失し、**3** とともに **4**、**5** の蓄積が見られた(図 3-3-4 A)。**3**、**4** および **5** については、その化合物の構造を明らかにするため、 $\Delta cclA \Delta astA$ の培養物から **3** を、 $\Delta cclA \Delta astG$ の培養物から **4** および **5** をそれぞれ単離し、各種 NMR および精密質量分析による構造解析を行った。HR-ESI-MS の結果、**3** は m/z 283.1563 $[M + H]^+$ ($C_{15}H_{23}O_5$, calcd 283.1545)のシグナルを示した。各種 NMR の解析から **3** は過去に植物から単離の報告がある confertifolin [66]と呼ばれるセスキテルペンラクトンの 6 位、14 位、15 位が水酸化された新規誘導体(trihydroxy confertifolin)であることが明らかとなった(図 3-3-4 B)。一方、**4** および **5** は m/z 387.1811 $[M + H]^+$ ($C_{22}H_{27}O_6$, calcd 387.1808)および m/z 403.1764 $[M + H]^+$ ($C_{22}H_{27}O_7$, calcd 403.1757)のシグナルを示した。この分子式は、それぞれ第 2 章で述べた **1** および **2** の 15 位がアセチル修飾をうけていない化合物 dideacetyl astellolide A および B のそれと一致する。NMR の測定結果からも、**4** および **5** は、それぞれ dideacetyl astellolide A および B であることが裏付けられた(図 3-3-4 B)。表 3-3-2 に **3**、**4** および **5** の NMR ケミカルシフトを示す。

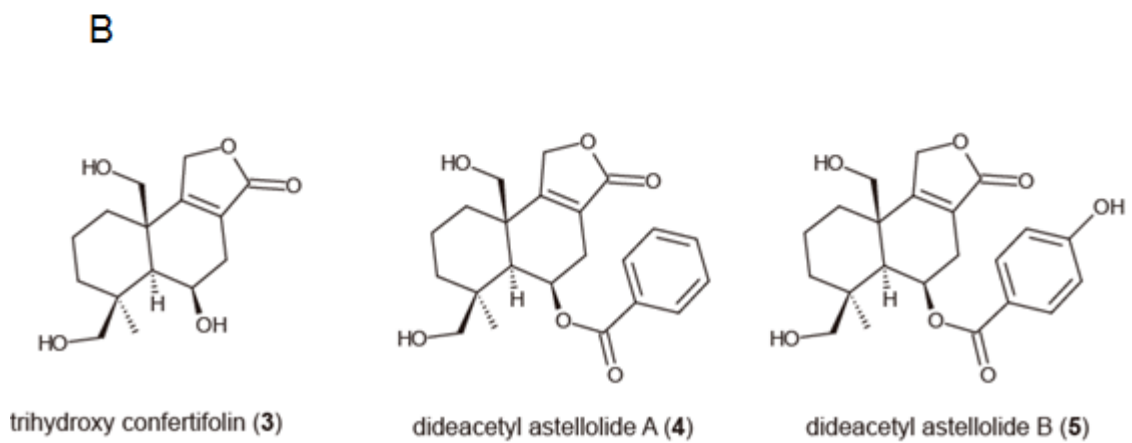
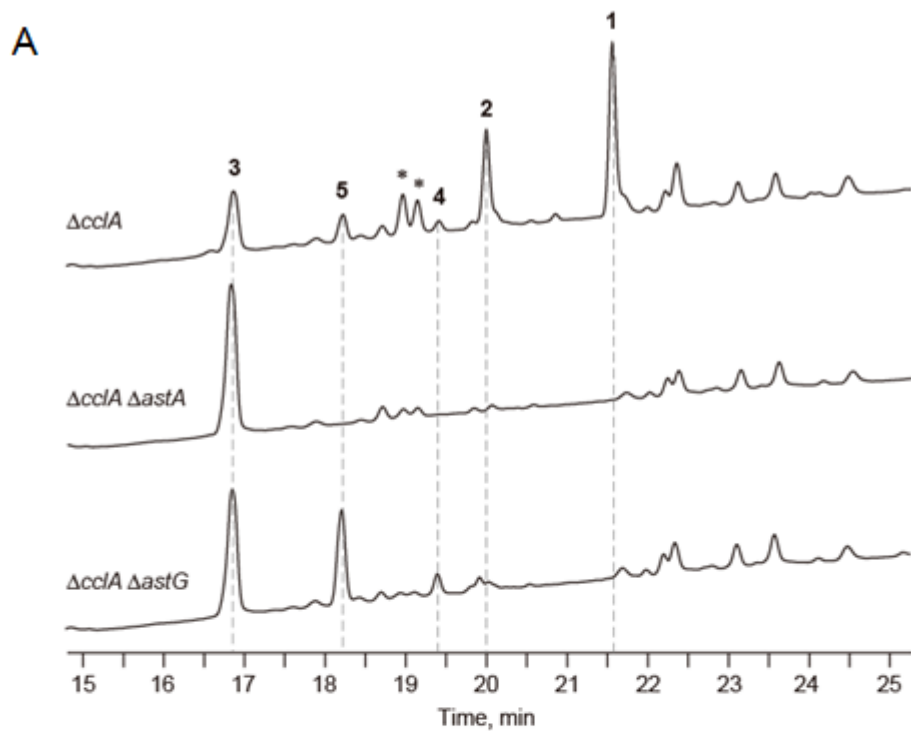


図 3-3-4 *astA* 破壊株($\Delta cclA \Delta astA$)および *astG* 破壊株($\Delta cclA \Delta astG$)の代謝物プロファイル

A) A_{220} における代謝物プロファイル。*は m/z 325 のシグナルを示すピーク。

B) trihydroxy confertifolin および dideacetyl astellolide A、B の構造式。

表 3-3-2 trihydroxy confertifolin および dideacetyl astellolide A、B の ^{13}C (125 MHz) および ^1H (500 MHz) NMR スペクトルデータ (DMSO- d_6)

No.	trihydroxy confertifolin (3)		dideacetyl astellolide A (4)		dideacetyl astellolide B (5)	
	^{13}C	^1H (J in Hz)	^{13}C	^1H (J in Hz)	^{13}C	^1H (J in Hz)
1	32.0	1.14, ddd (13.0, 13.0, 3.6) 2.11, d (12.3)	30.5	1.19, ddd (13.2, 13.2, 3.4) 2.29, d (13.2)	30.5	1.18, ddd (13.0, 13.0, 3.3) 2.28, m
2	17.9	1.38, m 1.58 - 1.62, m	17.5	1.43, m 1.65, m	17.5	1.42, m 1.63, m
3	37.6	1.08, ddd (14.2, 14.2, 4.2) 1.58 - 1.62, m	34.9	0.92, ddd (13.4, 13.4, 3.5) 1.98, d (13.4)	34.7	0.90, ddd (13.4, 13.4, 3.3) 1.99, d (13.4)
4	38.8	-	39.9	-	39.9	-
5	54.5	1.48, s	52.8	1.82, brs	52.9	1.78, brs
6	61.9	4.36, d (4.8)	66.9	5.81, d (5.8)	66.1	5.75, d (5.8)
7	30.5	2.18, d (18.0) 2.36, m	28.5	2.32, d (19.4) 2.73, m	28.6	2.25, d (18.2) 2.69, m
8	120.6	-	119.5	-	119.6	-
9	168.5	-	169.3	-	169.4	-
10	42.8	-	42.9	-	42.9	-
11	71.0	4.77, ddd (17.4, 3.5, 1.2) 4.96, dt (17.4, 2.7)	72.0	4.87, dd (17.6, 2.1) 5.05, m	72.0	4.86, dd (17.5, 1.9) 5.05, m
12	174.0	-	173.5	-	173.5	-
13	28.0	0.99, s	27.3	0.99, s	27.3	0.97, s
14	66.1	3.26, d (11.4) 3.81, d (11.4)	63.1	3.09, dd (10.6, 4.8) 3.60, dd (10.6, 4.8)	63.0	3.06, dd (10.6, 4.6) 3.59, dd (10.6, 4.6)
15	61.8	3.82, d (11.1) 4.14, d (11.1)	62.6	4.10, m	62.6	4.07, m
1'	-		165.5	-	165.3	-
2'	-		129.8	-	120.3	-
3',7'	-		129.1	7.91, brd (7.3)	131.4	7.75, d (8.8)
4',6'	-		128.9	7.55, brt (7.7)	115.4	6.86, d (8.8)
5'	-		133.5	7.68, brt (7.4)	162.2	-
6-OH		5.64		-		-
14-OH		5.40		4.37		4.36
15-OH		5.01		5.08		5.04
5'-OH		-		-		10.43

3.3.3 cytochrome P450 (*astB*, *astD*, *astF*, *astJ*) 破壊株の解析

破壊によって **1** および **2** の産生が消失した 7 遺伝子の中には、cytochrome P450 をコードすると予測される 4 つの遺伝子(*astB*, *astD*, *astF*, *astJ*)が存在する(表 3-3-1)。これら 4 遺伝子の内、*astB* ($\Delta cclA \Delta astB$)、*astF* ($\Delta cclA \Delta astF$) および *astJ* ($\Delta cclA \Delta astJ$)の 3 遺伝子の破壊株では、3.3.2 で同定した **3** のピークが消失するとともに、それぞれリテンションタイムが異なる *m/z* 267 のシグナルを示すピークの蓄積が見られた(図 3-3-5 A-C)。一方、*astD* の破壊株($\Delta cclA \Delta astD$)では、**3** のピークは消失するものの破壊により蓄積するピークは確認されなかった。

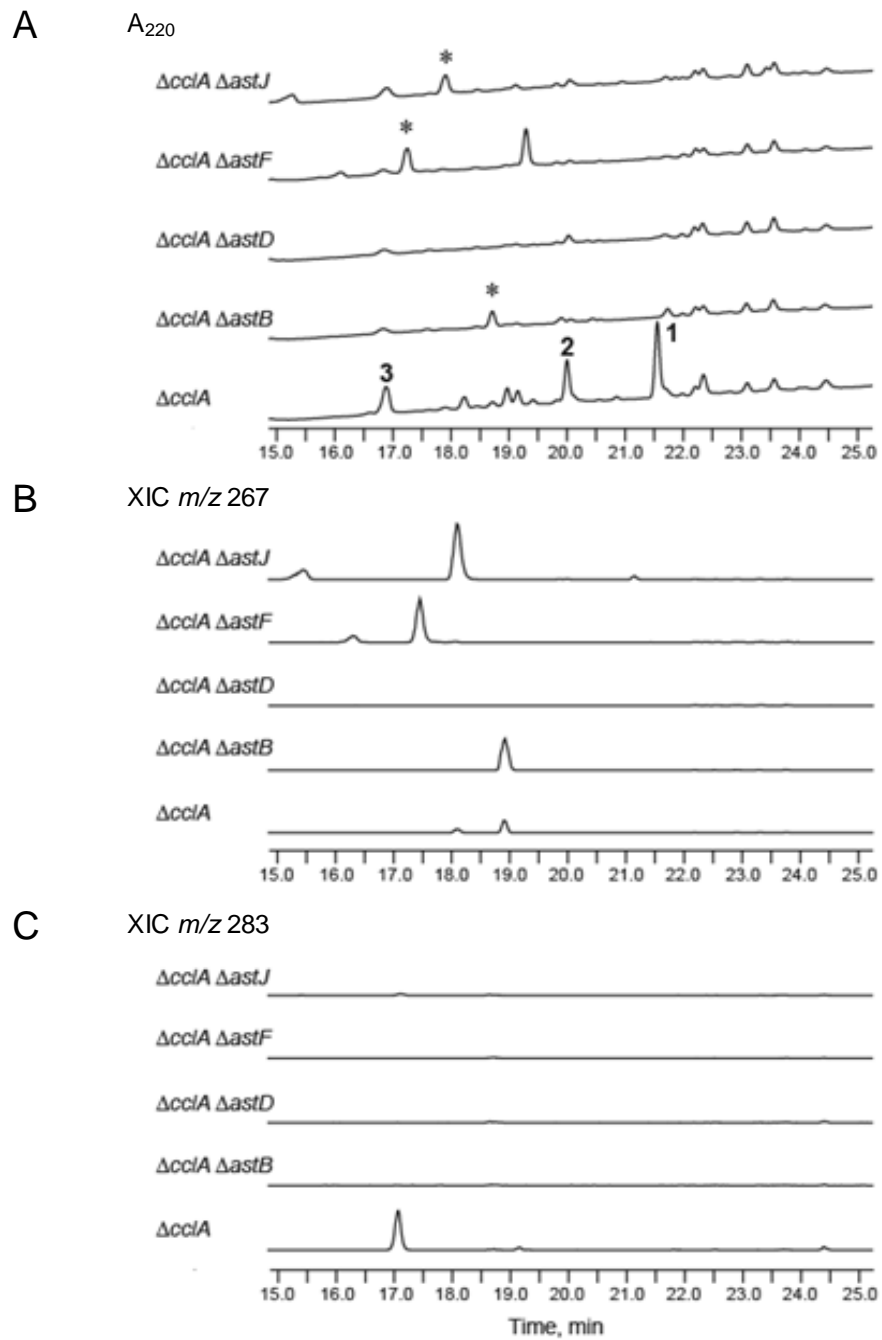


図 3-3-5 cytochrome P450 をコードすると予測される遺伝子群(*astB*、*astD*、*astF*、*astJ*)の破壊株の代謝物プロファイル

- A)** A_{220} における代謝物プロファイル。*は m/z 267 のシグナルを示すピーク。
B) dihydroxy confertifolin に相当する m/z 267 $[M + H]^+$ の抽出イオンクロマトグラム。
C) trihydroxy confertifolin (m/z 283 $[M + H]^+$) の抽出イオンクロマトグラム。

3.3.4 *astC* 破壊株の解析

haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase をコードすると予測される *astC* の破壊株($\Delta cclA \Delta astC$)も $\Delta cclA \Delta astD$ と同様に、これまでに同定した全ての *astellolides* 生合成中間体の産生が消失するものの破壊により蓄積するピークは確認されなかった(図 3-3-6)。

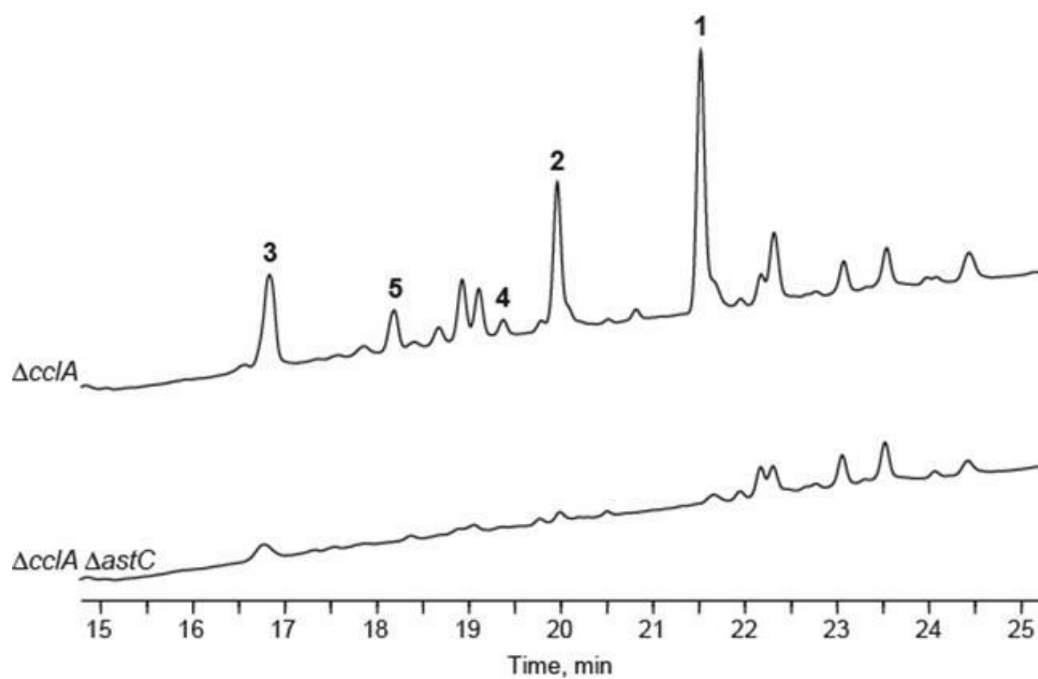


図 3-3-6 *astC* 破壊株($\Delta cclA \Delta astC$)の代謝物プロファイル A_{220} における代謝物プロファイル。

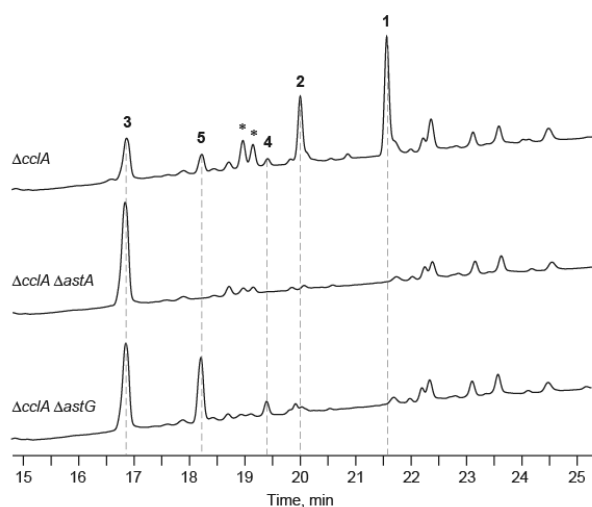
3.4 考察

クロマチンリモデリング因子の破壊などのエピジェネティック制御による二次代謝産物生合成の活性化は、新規二次代謝産物の同定だけでなく、得られた高生産株の解析を通して、その生合成遺伝子クラスターの同定にも利用できる。本検討では、*astellolides* 高生産株である *ccIA* 破壊株を用いることによって、*A. oryzae* における *astellolide* 生合成遺伝子クラスターを明らかにした。転写解析によって推定された *astellolides* の生合成遺伝子群をそれぞれ破壊した株を作製し、得られた株の代謝物解析を行った結果、*astellolide* 生合成遺伝子クラスターが 11 遺伝子から構成されていることが推測された。これらの内、7 つの遺伝子破壊株では **1** および **2** の産生が完全に消失したことから、少なくともこれらの 7 遺伝子は *astellolides* の生合成に関与することが明らかになった。一方、MFS transporter をコードすると予測される *astH* の破壊株($\Delta ccIA \Delta astH$)では、**1** および **2** の産生が確認されることから、AstH は *astellolides* の生合成自体には関与していないことが示唆された(図 3-3-3)。また、short-chain dehydrogenase をコードすると予測される *astE* の破壊株($\Delta ccIA \Delta astE$)および、HAD-like hydrolase をコードすると予測される *astI* と *astK* の破壊株($\Delta ccIA \Delta astI$ および $\Delta ccIA \Delta astK$)は **1** および **2** の産生量が著しく低下するものの消失はしなかった(図 3-3-3)。このことから、これらの 3 遺伝子がコードする酵素は *A. oryzae* が保持する別の酵素によって一部機能が相補されている可能性が考えられる。

生合成に関与する 7 遺伝子の内、NRPS をコードすると予測される *astA* を破壊したところ、**1** および **2** が消失し、**3** の顕著な蓄積が見られた。各種構造解析の結果、**3** は *confertifolin* と呼ばれるセスキテルペンラクトンが水酸化された新規誘導体であった。一般的に NRPS はアミド結合を触媒する活性を有することが知られている。しかし、*astA* の破壊により **3** が蓄積することから AstA

はアミド結合ではなく、benzoic acid (BA)や 4-hydroxy benzoic acid (4HBA)などのアリール酸と **3** のエステル結合を触媒する活性を有している可能性が考えられる。

Transferase をコードすると予測される *astG* を破壊することによって蓄積が見られた **4** および **5** は、それぞれ **1** および **2** の **15** 位がアセチル修飾をうけていない dideacetyl astellolide A および B であったことから、AstG は **4** および **5** の **15** 位の O-アセチル化を触媒する活性を有する acetyltransferase である可能性が強く示唆された。また、この事実は dideacetyl astellolide A および B が 14-deacetyl astellolide A および B の生合成中間体であるという推測を強く支持する結果である。さらに、*astG* の破壊によって **1** および **2** とともに消失する未同定の 2 つのピークは、いずれも **3** のアセチル化体と一致する m/z 325 $[M + H]^+$ のシグナルを示した(図 3-3-4 A)。この 2 つのピークは *astA* の破壊によってもピーク強度の低下が確認された。AstG が **3** を基質として認識しアセチル化するのであれば、*astA* の破壊株では **3** ではなく m/z 325 を示す **3** のアセチル化体の蓄積が確認されると考えられる。このことから、恐らく AstG は **3** ではなく **4** または **5** を基質として認識し O-アセチル化を触媒しているものと考えられる(図 3-4-1)。しかし、この点に関しては精製酵素を用いた基質特異性の検討などの詳細な解析が必要である。



*: m/z 325のシグナルを示すピーク。

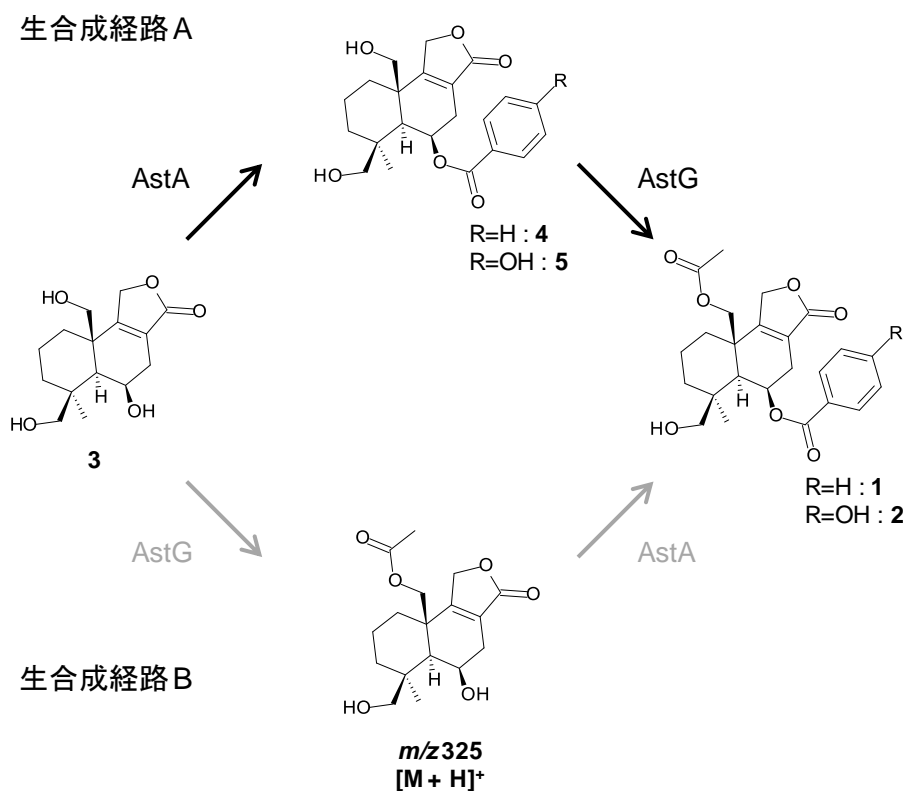


図 3-4-1 AstA および AstG の反応順序

本検討の結果から、*astA* の破壊株では 3 の、*astG* の破壊株では 4 および 5 の蓄積が見られた。このことから、AstA は 3 を基質として認識し、4 および 5 を生成し、その後 AstG により 4 および 5 が 1 および 2 に変換される生合成経路 A により astelloldies が生合成されることが示唆される。

cytochrome P450 をコードすると予測される 4 つの遺伝子(*astB*、*astD*、*astF*、*astJ*)の内、*astB*、*astF*、*astJ* の 3 遺伝子は、いずれも破壊により **3** が消失し、*m/z* 267 のシグナルを示すピークが蓄積した。上記の通り、これらの 3 遺伝子が水酸化活性を有することが知られる cytochrome P450 をコードすると予測されていること、そして *m/z* 267 を有する化合物の同定には至っていないが、trihydroxy confertifolin である **3** から水酸基を 1 つ失った化合物の *m/z* が 267 であることを考え合せると AstB、AstF、AstJ が confertifolin の 6 位、14 位、15 位のいずれかを水酸化する活性を有し、**3** の生合成に関与している可能性が考えられる。一方、もう一つの cytochrome P450 である *astD* 並びに、HAD-like hydrolase をコードすると予測される *astC* を破壊した株では、本検討で見出した全ての *astellolide* 生合成中間体のピークが消失するものの、破壊によって蓄積が見られるピークが検出されなかった。両遺伝子の破壊株で蓄積が見られるピークが検出できなかった原因として、蓄積する生合成中間体が本試験の培養、抽出条件下では、抽出出来ていないもしくは揮発してしまっている可能性が考えられる。セスキテルペン等の低分子化合物は揮発性が高いことが知られていることから、上述の点と考え合せると AstD および AstC が、ドリマン型セスキテルペンの形成や修飾といった上流の生合成系に関与している可能性も考えられる。

本試験で同定した *astellolide* 生合成遺伝子クラスターには、既知のテルペン環化酵素に相同性を示す遺伝子は存在していないものの、*astellolides* の基本骨格がドリマン型のセスキテルペンであることから、クラスター内に未知のセスキテルペン環化酵素が存在する可能性が考えられる。第 4 章では、この新奇セスキテルペン環化酵素の探索、並びにエステル結合活性を有する可能性が示唆された NRPS (AstA) の活性を検証することとした。

第4章 astellolide 生合成に関わる新奇酵素 AstA および AstC の機能解析

4.1 序

テルペノイドとは、5つの炭素からなるイソプレンを構成単位とする天然有機化合物の総称であり、有用な生物活性を示す化合物も多数存在し、その一部は香料や薬剤等に使用されている。astellolidesの基本骨格を構成するセスキテルペンは、イソプレンが3つ繋がった炭素15個からなる farnesyl pyrophosphate (FPP)を基質に生合成される化合物である。環化様式並びに、水酸化等の修飾によって非常に多様な構造が存在することが知られており(図4-1-1)、この多様性を担う様々な環化反応を触媒するセスキテルペン環化酵素が植物や真菌、バクテリアから多数単離されている[67, 68]。astellolide 生合成遺伝子クラスターには、上記の既知セスキテルペン環化酵素と相同性を示す遺伝子は存在しないものの、その基本骨格がドリマン型のセスキテルペンであることから本クラスターには未知のセスキテルペン環化酵素がコードされている可能性が考えられる。11 遺伝子からなる astellolide 生合成遺伝子クラスターの各破壊株の代謝物解析から *astA*、*astB*、*astF*、*astG*、*astJ* の5 遺伝子については、その機能を推定するに至った。また、MFS transporter をコードすると予測される *astH* は astellolides の生合成に関与しないことを明らかにしている。しかしながら、HAD-like hydrolase をコードすると予測される *astC*、*astI*、*astK* の3 遺伝子並びに cytochrome P450 をコードすると予測される *astD*、short-chain dehydrogenase をコードすると予測される *astE* の5 遺伝子については、機能が未解明であり、これらの中に新奇セスキテルペン環化酵素がある可能性が考えられる。

また、**AstA** は、**Pfam** によるドメイン検索からアデニレーションドメイン (**A-domain**)、チオレーションドメイン (**T-domain**)、コンデンセーションドメイン (**C-domain**)を1つずつ有する、一般的なシングルモジュールの **NRPS** であると予想されるにもかかわらず、破壊株の解析からアリール酸とセスキテルペンラクトン(**3**)とのエステル結合を触媒する可能性が示唆されている(図 3-3-4)。これまでに、**fumonisin** 生合成における **FUM14** [69]や **cryptophycin** 生合成における **CrpD-M2** [70]、**C-1027** 生合成における **SgcC5** [71]など、エステル結合を触媒する **NRPS** の報告例もある。そこで、本章では、新奇なセスキテルペン環化酵素の探索を試みるとともに、大腸菌による組換え酵素を用いた **AstA** の活性評価を行った。

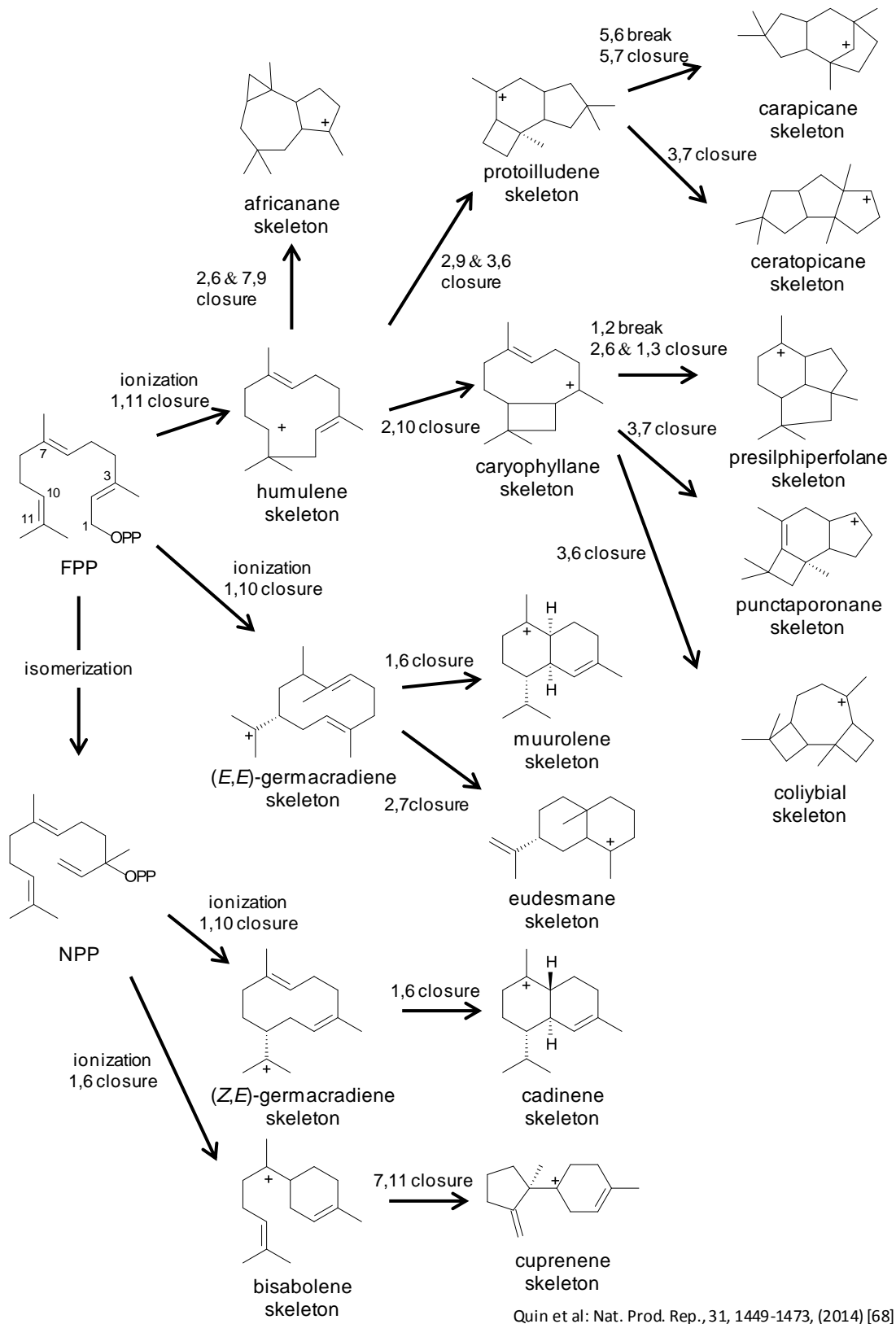


図 4-1-1 真菌における主要なセスキテルペンの環化様式

4.2 実験材料および方法

4.2.1 遺伝子のクローニングおよび発現プラスミドの構築

3.2.2 で調製した cDNA を鋳型とし、表 4-2-1 に示すプライマーセットを用いた PCR により *astA*、*astC*、*astI* および *astK* の cDNA を得た。得られた cDNA を gel extraction キット(Qiagen) を用いて精製した後に、TARget Clone Plus (Toyobo)を用いて pTA2 vector にクローニングした。方法はキット付属のマニュアルに従った。*astC* および *astI*、*astK* は、それぞれ表 4-2-1 に示した制限酵素で処理し、N 末端に His タグが付加されるように設計されている pCold I (Takara Bio)の該当部位へクローニングを行うことでタンパク質の発現プラスミド(pCold I-*astC*、pCold I-*astI*、pCold I-*astK*)を構築した。一方、同様のコンストラクトで作製した *AstA* の発現プラスミドは、タンパク質の発現検討において不溶性となったため、*astA* のみ C 末端に His タグが付与されるように設計したプライマーを用いて cDNA を調製し、pCold IV へクローニングを行った (pCold IV-*astA*His)。得られたプラスミドはシーケンス解析を行い、配列に問題が無いことを確認した。

表 4-2-1 遺伝子クローニングに用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' to 3') ^{1,2}	Restriction enzyme
astA-L	TCGCC <u>CATATG</u> GACCTGGAGCCGTTGGGA	<i>Nde</i> I
astA-His-R	ACTGGT <u>CGACTT</u> AGTGATGGTGGT GATGATGTA AAAA CACTATCAGGAGAATCAAGA	<i>Sa</i> I
astC-L	TCGCC <u>CATATG</u> ACCAAGATCAACCCCTACA	<i>Nde</i> I
astC-R	ACTGGT <u>CGACA</u> AATCCAGCGCACTGGTTGGCT	<i>Sa</i> I
astI-L	TCGCC <u>CATATG</u> ACAGTCAGAGTCACTATCAAGC-	<i>Nde</i> I
astI-R	ACTGGT <u>CGACTC</u> AAATCCCAAGAAGATGTCCCCGCA	<i>Sa</i> I
astK-L	TCGCC <u>CATATG</u> TGCACTACCTTCAAGGCTGCCA	<i>Nde</i> I
astK-R	ACTGCT <u>GCA</u> GCTAGCAGCCAACCAGCTGTCGT	<i>Pst</i> I

¹ Underlined sequences represent the restriction site

² Bold sequences represent the His-tag site

4.2.2 組換えタンパク質の発現および精製

タンパク発現の宿主には *E. coli* BL21 を用いた。pCold IV-astAHis および pCold I-astI、pCold I-astK を導入した *E. coli* BL21 は ampicillin (100 µg/ml) を含む Luria-Bertani 培地 (Invitrogen) を用い 37 °C で培養した。pCold I-astC を導入した *E. coli* BL21 は ampicillin (100 µg/ml) を含む Terrific broth 培地 (Sigma-Aldrich) を用い 37 °C で培養した。培養液の OD₆₀₀ の値が 0.6 から 0.7 になったところで 15 °C に移し 30 分静置した。これに終濃度 0.1 mM の isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) を添加し、更に 15 °C で 20 時間培養した。培養後、菌体を 3,000 × g で 10 分の遠心分離により回収し、バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM dithiothreitol (DTT)、10% glycerol、10 mM imidazole) に懸濁した。BioRuptor (Cosmobio) を用いた超音波処理により菌体を破砕した後に 16,000 × g で 20 分の遠心分離を行い、上清を調製した。組換えタンパク質の精製は、HisTrap FF カラム (GE Healthcare) を用いて以下の方法で行った。カラムに上清をロードし、AstA は 20 mM imidazole を含む洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、10% glycerol)、AstC および AstI、AstK は 60 mM imidazole を含む洗浄バッファーを用いカラムの洗浄を行った後、組換えタンパク質を溶出バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、10% glycerol、300 mM imidazole) を用いて溶出させた。各組換えタンパク質は、Amicon 100-kDa (AstA)、10-kDa (AstC)、3-kDa (AstI および AstK) を用いて脱塩および濃縮を行った。タンパク質の濃度は BSA をスタンダードとした Bradford 法により算出した。

4.2.3 AstC の活性評価

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、5 mM DTT に精製した AstC 1 µM と FPP 100 µM を加えて全量を 500 µL とした反応液を、30 °C で 1 時間反応さ

せた。次に、alkaline phosphatase 10 μ L (5 unit 相当) (Takara Bio)を添加し更に 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応を行った。その後、0.5 M EDTA (pH 8.0)を 100 μ L 添加して反応を終了させ、0.45 μ m のフィルター(Merck Millipore)でろ過したサンプルを HPLC に供した。また、同様の反応を行った反応液の酢酸エチル抽出物を GC-MS に供した。得られた GC-MS スペクトルとマススペクトルライブラリ (Wiley 9th edition NIST11 (W9N11))との比較から、化合物の推定を行った。HPLC および GC-MS の分析条件は以下の通りとした。

HPLC 条件

HPLC	Shimadzu prominence HPLC system
column	COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 150 mm)
flow rate	1 ml/min
Solvent	25 mM NH_4HCO_3 in water/acetonitrile (75:25, v/v)
UV detection	210 nm

GC-MS 条件

GC-MS	Agilent 5975 GC-MSD system
column	HP-5MS UI column (30 x 0.25 mm x 0.25 μ m)
oven temperature	50 $^{\circ}$ C to 260 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min
injector temperature	250 $^{\circ}$ C
detector temperature	280 $^{\circ}$ C

4.2.4 AstI および AstK の活性評価

4.2.3 と同様の組成で AstC の反応を行い、AstC 反応液を調製した。そこに、精製した AstI 1 μ M または AstK 1 μ M、もしくは両者を 1 μ M 添加し、それぞれ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、0.5 M EDTA (pH 8.0)を 100 μ L 添加して反応を終了させた。反応液の HPLC および GC-MS による解析は 4.2.3 と同様の方法で行った。また、AstI の反応によって生成した無機リン酸は、Malachite green assay kit (Bioassay Systems)を用いて以下の通り測定した。FPP の濃度を 20 μ M に

変更して調製した AstC 反応液に AstI 1 μ M を添加し、30 $^{\circ}$ C で 30 分反応させ、malachite green reagent (4:1 v/v) を添加して反応を終了させた。発色のため 30 分静置した後に Infinite M200 microplate reader (Tecan) を用いて 620 nm の吸収を測定した。

4.2.5 AstC 反応生成物の単離および構造解析

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mM MgCl₂、5 mM DTT に精製した AstC 1 μ M と FPP 100 μ M を加えて全量を 10 mL とした反応液 6 本(total 60 mL)を 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、2.5 mL の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を添加して反応を停止した。次に、25 mM NH₄HCO₃ で平衡化した Sep-Pak Vac C18 カートリッジ(500 mg; Waters) に得られた反応液をロードし、5 mL の 25 mM NH₄HCO₃、続いて 5 mL の 25 mM NH₄HCO₃ /acetonitrile (95:5, v/v) でカートリッジを洗浄した。その後、反応生成物を 3 mL の 25 mM NH₄HCO₃ /acetonitrile (50:50, v/v) で溶出させた。遠心濃縮機を用いて溶出液中の acetonitrile を除去し、HPLC に供して反応生成物の精製を行った。HPLC の条件は以下の通りとした。

Column: COSMOSIL 5C18-AR-II (20 x 250 mm, Nacalai Tesque), flow rate: 4 mL min⁻¹, solvent: 25 mM NH₄HCO₃/acetonitrile (75:25, v/v), UV detection: 210 nm

溶媒に重水を用い、得られた反応生成物の ¹H-NMR (共鳴周波数 500 MHz)、¹³C-NMR (共鳴周波数 125 MHz)、および二次元 NMR スペクトラム測定を行った。

4.2.6 AstA の活性評価

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、5 mM ATP、1 mM DTT、200 μ M CoA、2 μ M 4'-phosphopantetheine transferase (Sfp) from *Bacillus subtilis* (New

England Biolabs)に、精製した AstA 1 μ M と trihydroxy confertifolin (**3**) 200 μ M および BA または 4HBA 200 μ M を加えて全量を 100 μ L とした反応液を、30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後、1 mL の酢酸エチルを加え反応を停止させるとともに反応生成物を抽出した。16,000 \times g で 10 分遠心分離した上清 900 μ L を遠心濃縮機で乾固し、90 μ L のアセトニトリルに再溶解したもののサンプルとして LC-MS に供した。ネガティブコントロールとして予め熱失活させた AstA を用いて同様の反応を行った。また、Sfp による AstA の翻訳後修飾の必要性の有無を検討するため、Sfp 非添加の条件でも同様の反応を行った。

4.3 結果

4.3.1 セスキテルペン環化酵素の探索

astellolide 生合成遺伝子クラスターの各遺伝子破壊株の解析から、その生合成に必須であることが明らかになった 7 遺伝子の内、astC および astD の 2 遺伝子については、破壊によって蓄積が見られるピークが確認されていない。このことから、この 2 遺伝子がコードする酵素が astellolides 生合成の上流の生合成系に関与している可能性を考え、その配列を詳細に解析した。その結果、HAD-like hydrolase と予測される AstC の C 末端側には、Mycobacterium 属菌由来のジテルペン環化酵素(Rv3377c)が保持する DxDTT モチーフが存在することが明らかになった[72] (図 4-3-1 A)。Nakano ら[72]の検討により、この DxDTT モチーフは、class II/type-B の環化様式を示すテルペン環化酵素が保持することが知られている DxDD モチーフのバリエーションの一つであることが明らかにされている。この知見から、AstC にテルペンの環化活性があるのではないかと

考え、大腸菌を用いて AstC の組換えタンパク質の発現系を構築し、精製酵素を調製した(図 4-3-1 B)。

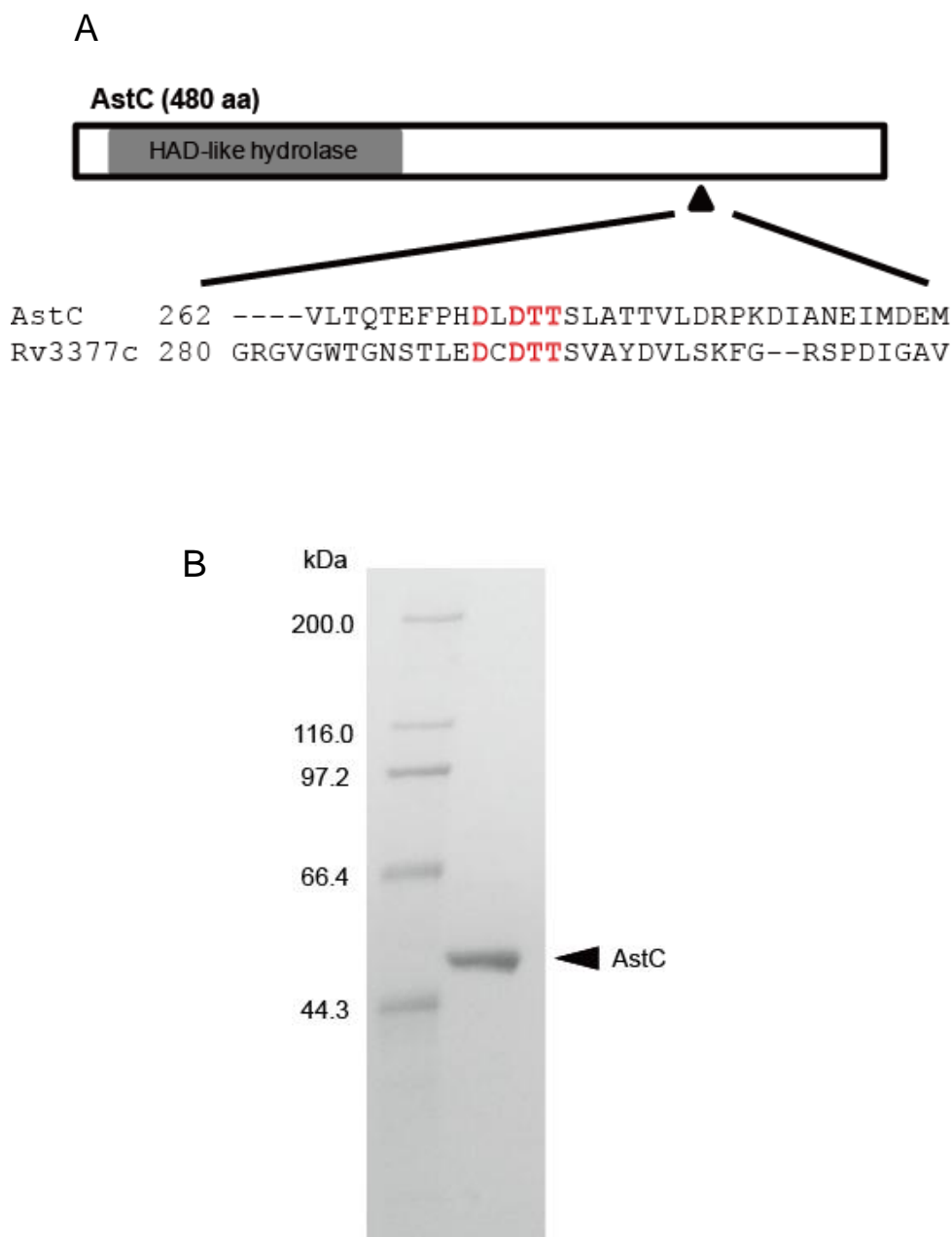


図 4-3-1 AstC のドメイン構成および精製酵素

A) AstC のドメイン構成。DxDTT モチーフ(赤字)が保存されている領域についてジテルペン環化酵素(Rv3377c)とのアラインメント結果を示した。

B) 精製 AstC の SDS-PAGE。

4.3.2 AstC の活性評価

セスキテルペンの基質となる FPP に精製した AstC を作用させた反応液を HPLC で解析したところ、FPP が消失するとともに新たなピーク(6)が生成していることが確認された(図 4-3-2)。興味深いことに、この新しく生成した 6 は alkaline phosphatase 処理によって消失した。この結果は、6 に基質である FPP のピロリン酸基が残存している可能性を示唆するものである。alkaline phosphatase により 6 が脱ピロリン酸化されているのであれば、その反応生成物は溶媒抽出により有機層に分配されると考えられることから、次に GC-MS を用いた検討を行った。AstC による反応後、alkaline phosphatase 処理をしたサンプルとしていないサンプルをそれぞれ調製し、酢酸エチル抽出を行った後に、その酢酸エチル層を GC-MS で解析した。その結果、推定通り、alkaline phosphatase で処理したサンプルにのみピーク(7)が確認された(図 4-3-3 A)。また、7 の MS スペクトルをスペクトルライブラリと比較したところ、同一性 99% で drim-8-ene-11-ol のそれと一致することが明らかになった(図 4-3-3 B)。以上の結果から、AstC によって生合成される 6 は drim-8-ene-11-ol のピロリン酸化体である可能性が示唆された(図 4-3-3 C)。

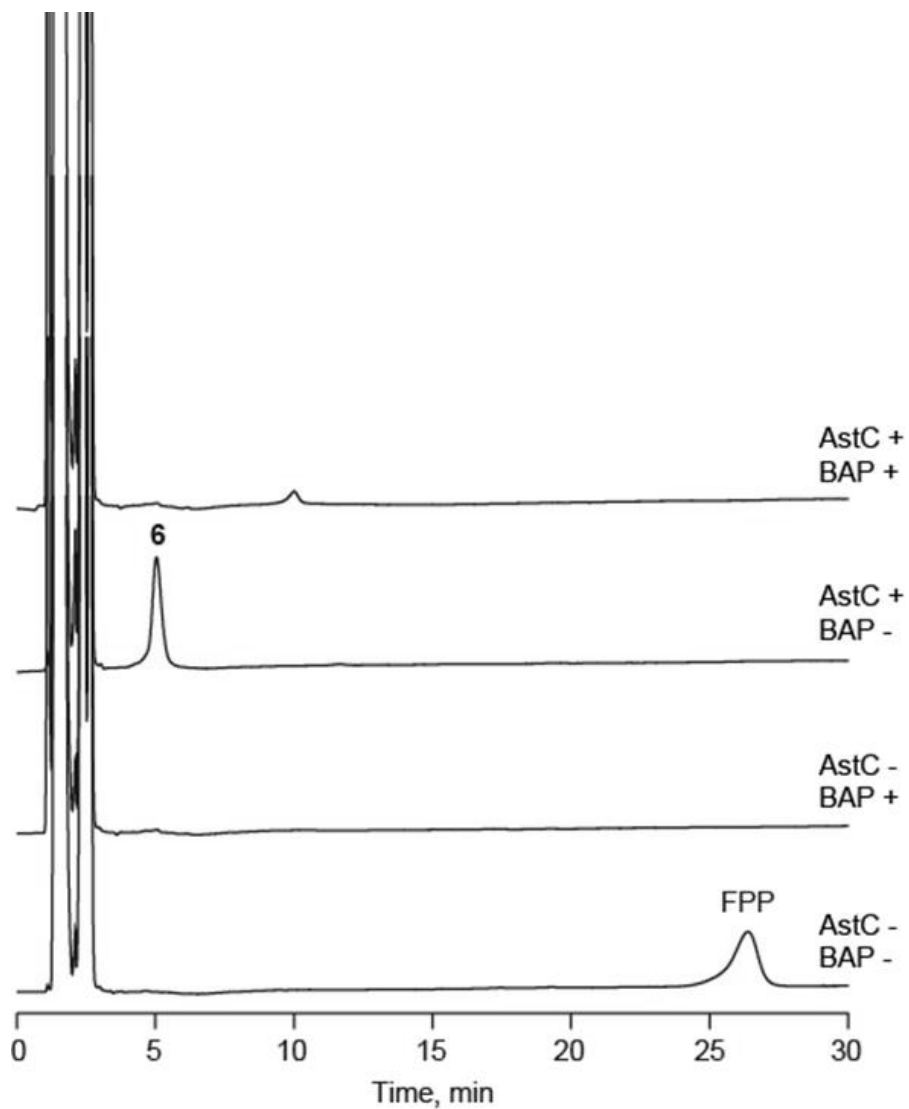


図 4-3-2 HPLC による AstC 反応生成物の解析

HPLC (A₂₁₀)による AstC および bacterial alkaline phosphatase (BAP)添加・非添加条件下での反応生成物の解析。AstC および BAP の非添加条件は、酵素の代わりに滅菌水を添加した。それぞれ添加条件を+、非添加条件を-で示した。

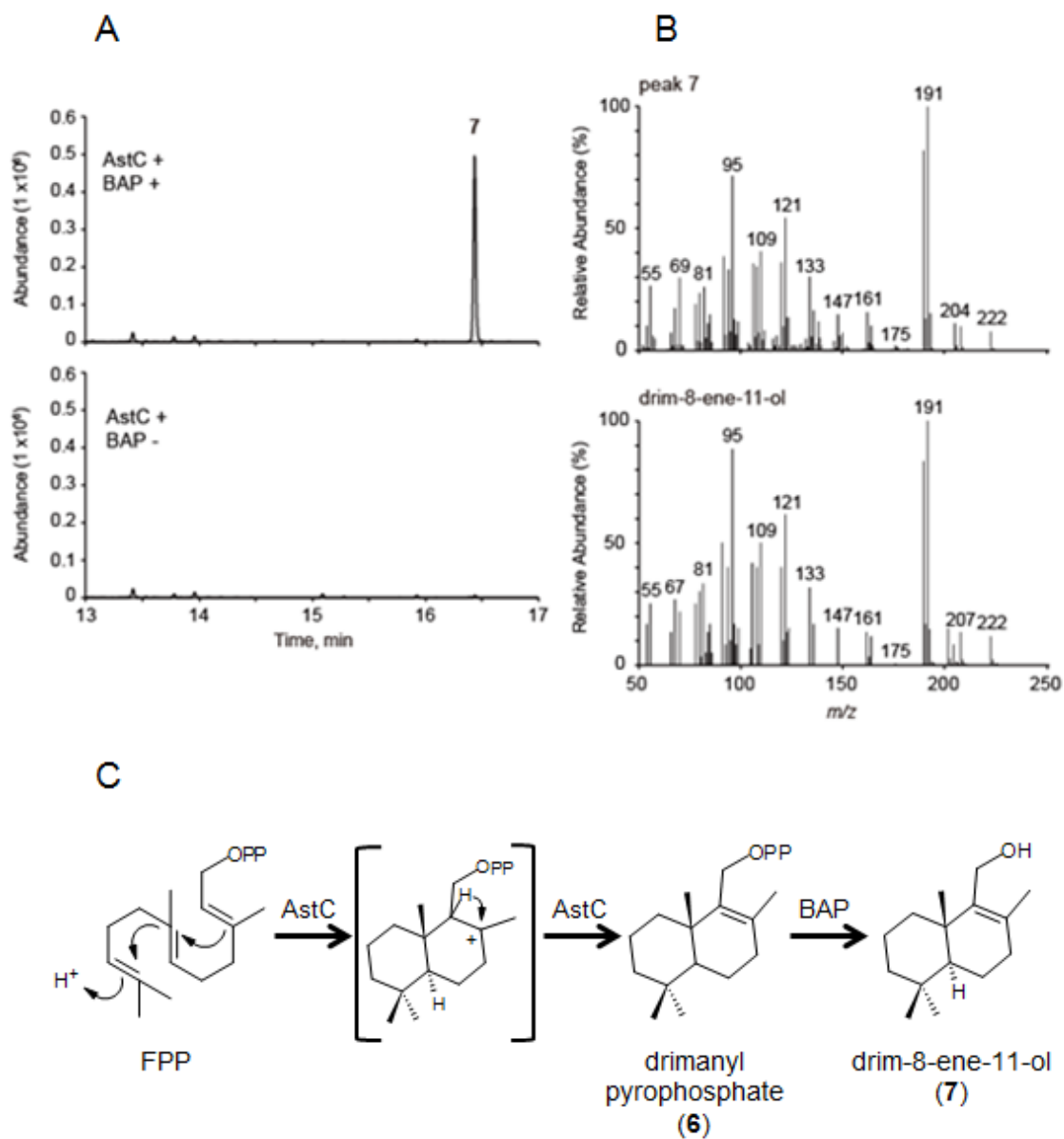


図 4-3-3 GC-MS による AstC 反応生成物の解析

- A) GC-MS (total ion chromatogram)による BAP 添加・非添加条件下での AstC 反応生成物の解析。それぞれ添加条件を+、非添加条件を-で示した。
- B) Peak 7の MS スペクトル(上段)および、drim-8-ene-11-olの MS スペクトル(下段)。
- C) 推定される drim-8-ene-11-ol の生合成経路。AstC により環化された **6** に残存する pyrophosphate が BAP により脱リン酸化され **7** が生成しているものと考えられる。

4.3.3 AstC の反応生成物の単離、同定

AstC の反応生成物である **6** の構造を明らかにするとともにピロリン酸基の存在を確認するため、6 mg 相当量の FPP に AstC を作用させた反応液から **6** を単離・精製し構造解析を行った。HR-ESI-MS の結果、**6** は m/z 381.1223 [M-H]⁻ (C₁₅H₂₇O₇P₂, calcd 381.1232) のシグナルを示したことから、本化合物の分子式は C₁₅H₂₈O₇P₂ であると推定された。また、上述した MS スペクトルの解析に加えて、各種 NMR の解析から、**6** のセスキテルペン部分が drim-8-ene-11-ol であることが裏付けられた。ピロリン酸基の存在を確認するためリン酸を外部標準として ³¹P NMR (202 MHz) を測定したところ、 δ -6.9 (d, J = 22 Hz) および δ -10.7 (d, J = 22 Hz) にピークが確認できた。更に、¹³C NMR の測定において、C-9 (δ 140.1) および C-11 (δ 64.3) が、それぞれカップリング係数 9.5 Hz および 4.2 Hz で ³¹P とカップリングしていることが観測された。以上の結果から、**6** は drimanyl pyrophosphate であると決定した。表 4-3-1 に **6** の NMR ケミカルシフトを示す。

表 4-3-1 drimanyl pyrophosphate の ^{13}C (125 MHz) および ^1H (500 MHz) NMR スペクトルデータ (D_2O)

drimanyl pyrophosphate (6)		
No.	^{13}C	^1H (J in Hz)
1	38.9	1.23, m
		1.92, brd (13.4)
2	21.3	1.52, m
		1.64, m
3	44.1	1.17, m
		1.41, m
4	35.4	-
5	54.3	1.11, d (12.6)
6	21.2	1.52, m
		1.71, m
7	36.2	2.08 - 2.11, m
8	138.9	-
9	140.1 ^a	-
10	40.7	-
11	64.2 ^a	4.40, brd (10.7)
		4.53, brd (10.7)
12	21.8	1.74, s
13	23.8	0.86, s
14	35.5	0.90, s
15	22.8	0.99, s

^a $J_{\text{C-P}}$ couplings were observed.

4.3.4 脱リン酸化酵素の探索

これまでの検討から、**AstC** は新奇セスキテルペン環化酵素であり、ピロリン酸基が残存したドリマン型のセスキテルペンである **6** を生合成する活性を有することを明らかにした。この **6** にピロリン酸基が残存するという結果は、**astellolide** 生合成遺伝子クラスターに特異的な脱リン酸化酵素が存在する可能性を示唆する。そこで、次に **6** の脱ピロリン酸化に寄与する酵素の探索を行った。**astellolide** 生合成遺伝子クラスターには、**AstC** と同様に **HAD-like hydrolase** をコードすると予測される 2 つの遺伝子(**astI** および **astK**)が存在する。序論でも述べた通り、この **HAD-like hydrolase** スーパーファミリーに属する多くの酵素が脱リン酸化活性を有し、その中にはイソペンテニルピロリン酸を基質とする酵素も存在するとの報告[37, 41]がある。このことから、**AstI** および **AstK** が **6** の脱ピロリン酸化に関与しているのではないかと考え、**AstC** と同様に、大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現系を構築し、精製酵素を調製した(図 4-3-4)。

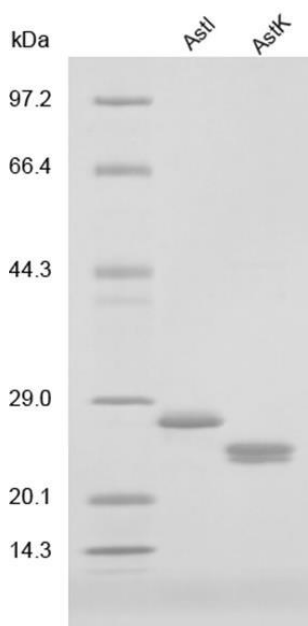


図 4-3-4 **AstI** および **AstK** の SDS-PAGE

精製酵素の SDS-PAGE の結果、AstK で明瞭な 2 本のバンドが確認された。このことから、AstK は、十分な精製が出来ていない、もしくは精製過程で His タグの切れた AstK が混入している可能性が考えられたが、その移動度からドミナントに検出される上のバンドがインタクトな AstK であると考え、活性評価に使用した。

4.3.5 AstI および AstK の活性評価

4.3.2 と同様の方法で調製した AstC の反応液に、精製した AstI および AstK をそれぞれ独立して作用させたサンプル、AstI と AstK の両方を作用させたサンプルを調製し、HPLC および GC-MS による解析を行った。HPLC による解析において、AstI のみを作用させたサンプルは **6** のピークが消失するとともに新たなピーク (**8**) が生成し、AstK のみを作用させたサンプルは **6** のピークが確認されるのみであった(図 4-3-5)。一方、AstI と AstK の両方を作用させたサンプルは、**6** のピークが消失し、新たに生成するピークは確認されなかった。GC-MS による解析では、単独で作用させたサンプルは、どちらもピークが確認されないものの、両方を作用させたサンプルではピークが確認され、このピークの MS スペクトルは **7** と同様に drim-8-ene-11-ol のそれと一致した(図 4-3-6 A, B)。以上の結果から、AstI と AstK の両酵素によって **6** が脱ピロリン酸化し **7** が生成していることが示唆される。リン酸基を有する化合物は溶媒抽出において水層に分配されると考えられることから、GC-MS では検出されず、HPLC でのみ検出された **8** は、**6** からリン酸基が一つ脱離した drimanyl monophosphate である可能性を考え、AstI を作用させることによって生成する遊離のモノリン酸(Pi)量を malachite green assay を用いて測定した。その結果、推定通り、AstI の作用に伴い顕著な Pi 量の増加が確認された(図 4-3-7)。以上の結果から、AstI および AstK はそれぞれ脱リン酸化活性を有しており、

AstI によって **6** が脱リン酸化されることにより **8** が生成し、続いて AstK によって **8** が脱リン酸化されて **7** が生成することが明らかになった。

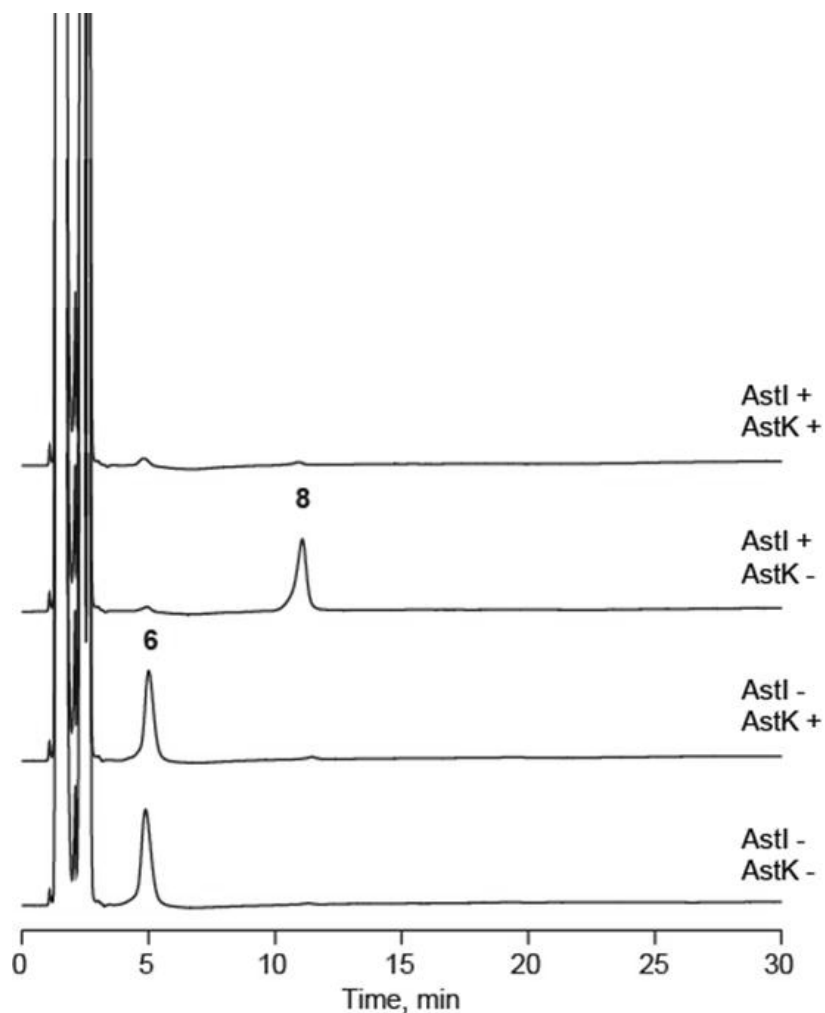


図 4-3-5 HPLC による AstI および AstK 反応生成物の解析

HPLC (A₂₁₀)による AstI および AstK 添加・非添加条件下での反応生成物の解析。AstI および AstK の非添加条件は、酵素の代わりに滅菌水を添加した。それぞれ添加条件を +、非添加条件を - で示した。

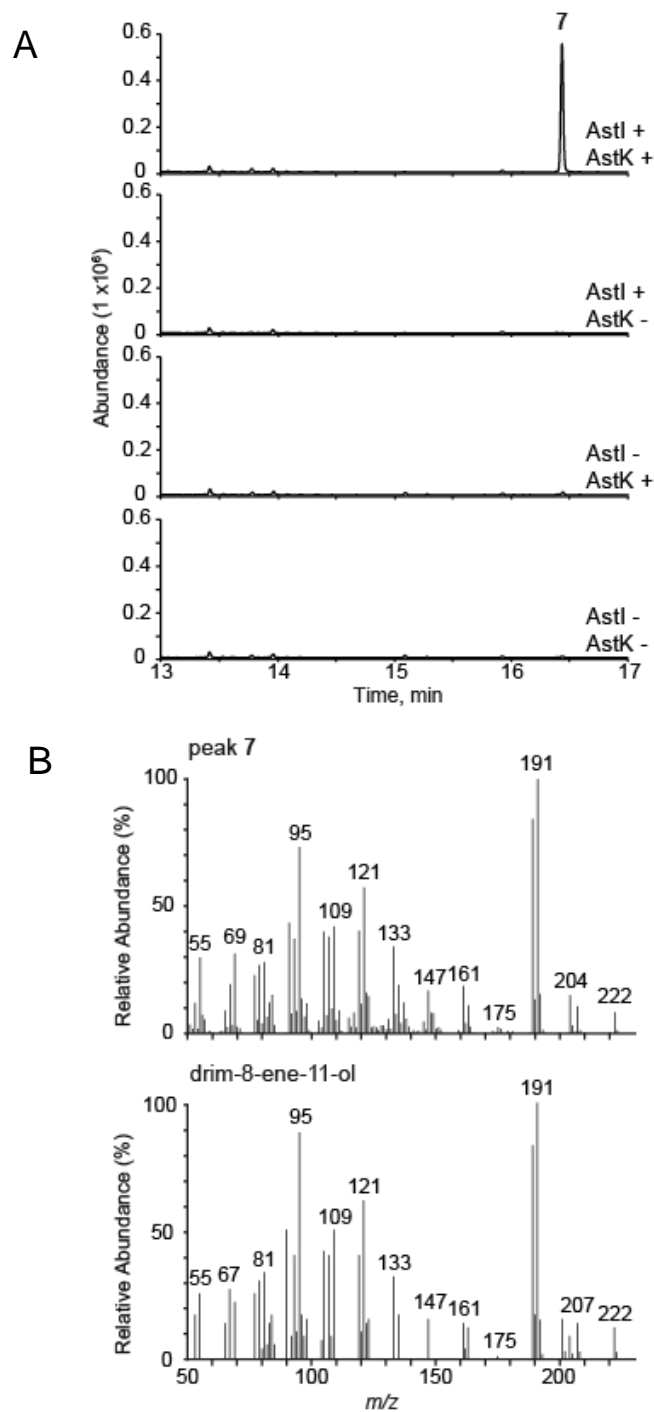


図 4-3-6 GC-MS による AstI および AstK 反応生成物の解析

A) GC-MS (total ion chromatogram)による AstI および AstK 添加・非添加条件下での反応生成物の解析。AstI および AstK の非添加条件は、酵素の代わりに滅菌水を添加した。それぞれ添加条件を+、非添加条件を-で示した。

B) Peak 7の MS スペクトル(上段)および、drim-8-ene-11-olの MS スペクトル(下段)。

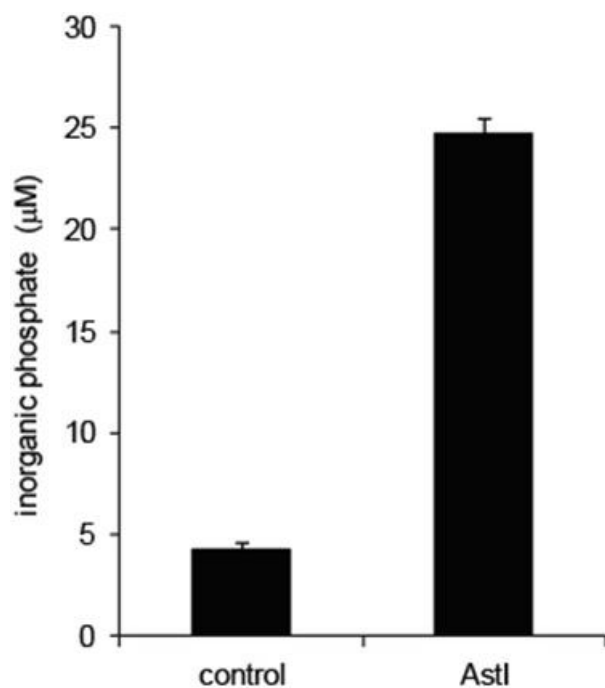


図 4-3-7 遊離無機リン酸の解析

AstC 反応液に AstI を添加し 30 分後の遊離リン酸量を測定した。コントロールは AstI の代わりに滅菌水を添加した。データは独立して実施した 3 回の試験の平均値(±SD.)で示した。

4.3.6 AstA の活性評価

4.1 で述べた通り、AstA は A-domain、T-domain、C-domain をそれぞれ一つずつ有するシングルモジュールの NRPS であると予測されているものの、その破壊株の解析から、アリール酸と **3** のエステル結合を触媒する酵素である可能性が示唆されている。そこで、AstA についても組換えタンパク質を調製し(図 4-3-8)、その活性を検討した。

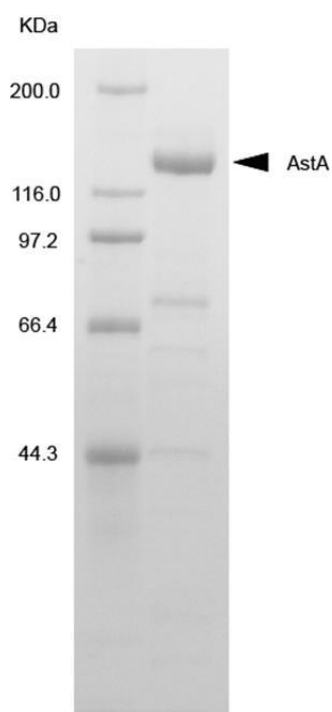


図 4-3-8 AstA の SDS-PAGE

BA および **3** 存在下で精製した AstA を作用させ、反応生成物を LC-MS を用いて解析した。その結果、**3** のピークが消失するとともに新たなピークが生成していることが確認できた(図 4-3-9 A)。更に、このピークは、第 3 章で単離した **4** とリテンションタイムおよび MS スペクトル(m/z 387 $[M + H]^+$ 、 m/z 409 $[M + Na]^+$)が一致した(図 4-3-9 B)。以上の結果から、AstA は推定通り、BA と **3** のエステル結合を触媒する活性を有しており、**4** の生合成に関与していることが明らかになった。astA の破壊株は **1** とともに **2** の産生も消失することから、次に、BA の代わりに 4HBA を基質として同様の反応を行い、LC-MS を用いて解析した。その結果、AstA は 4HBA も基質として認識することができ、**5** を生合成する活性を有することが明らかとなった(図 4-3-9 C,D)。

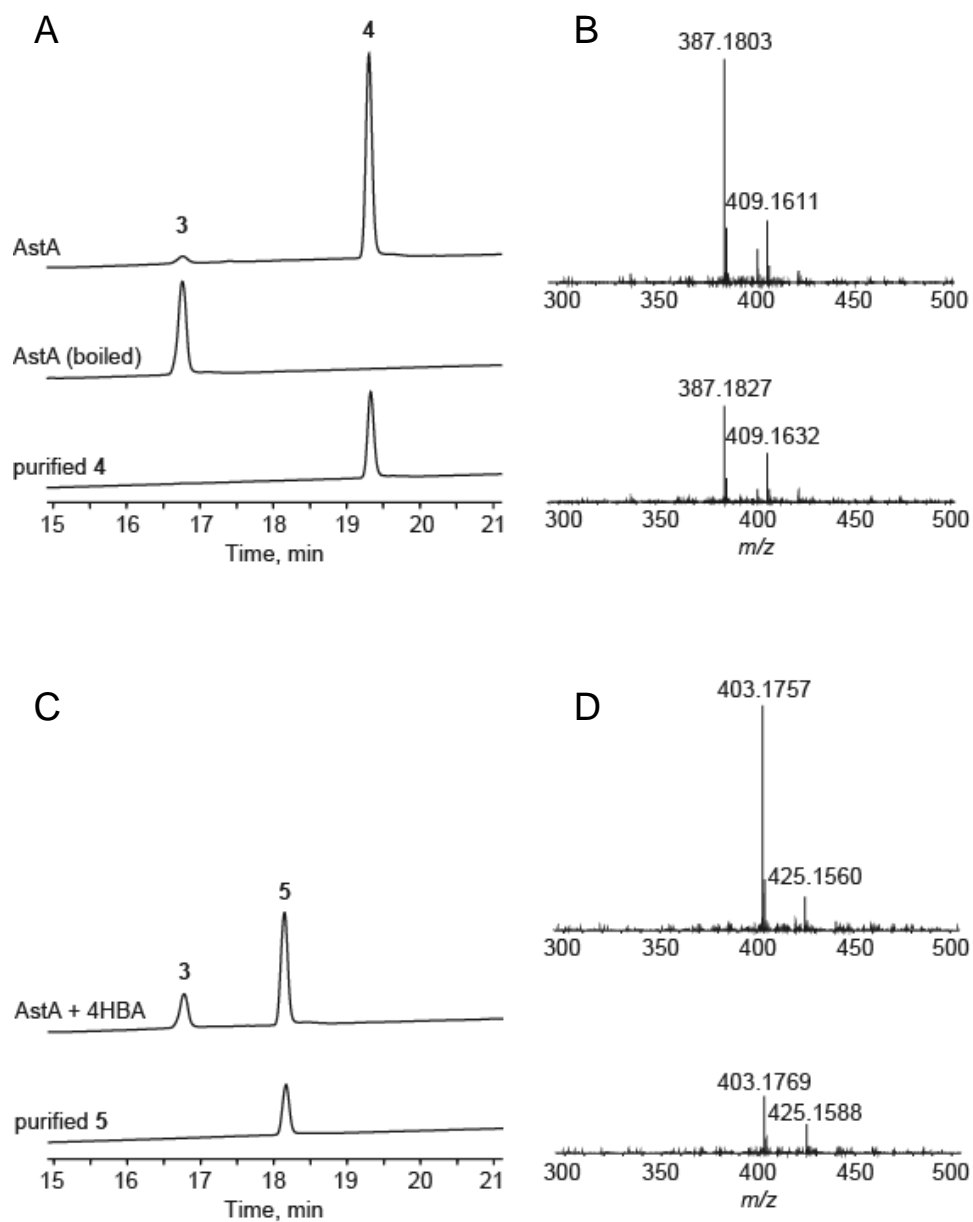


図 4-3-9 LC-MS による AstA 反応生成物の解析

A) HPLC (A₂₂₀)による AstA 反応生成物および精製した **4** の解析。BA および **3** 存在下で AstA を作用させた。コントロールには予め熱失活させた AstA (boiled)を用いて反応を行った。第 3 章で精製した **4** を同様の条件で測定した。

B) AstA 反応生成物の MS スペクトル(上段)および、精製した **4** の MS スペクトル(下段)。

C) HPLC (A₂₂₀)による AstA 反応生成物および精製した **5** の解析。4HBA および **3** 存在下で AstA を作用させた。第 3 章で精製した **5** を同様の条件で測定した。

D) AstA 反応生成物の MS スペクトル(上段)および、精製した **5** の MS スペクトル(下段)。

一般的に NRPS の T-domain は、翻訳後修飾によるホスホパンテテニル化が活性に必須であることが知られている。そこで、このホスホパンテテニル化を触媒する Sfp の添加・非添加条件下で AstA の反応を行い活性の有無を検討した。LC-MS による解析の結果、Sfp 非添加条件下では **4** の生成が確認されないことが明らかになった。このことから、AstA の T-domain は、翻訳後修飾によるホスホパンテテニル化が活性に必須である可能性が強く示唆された(図 4-3-10)。

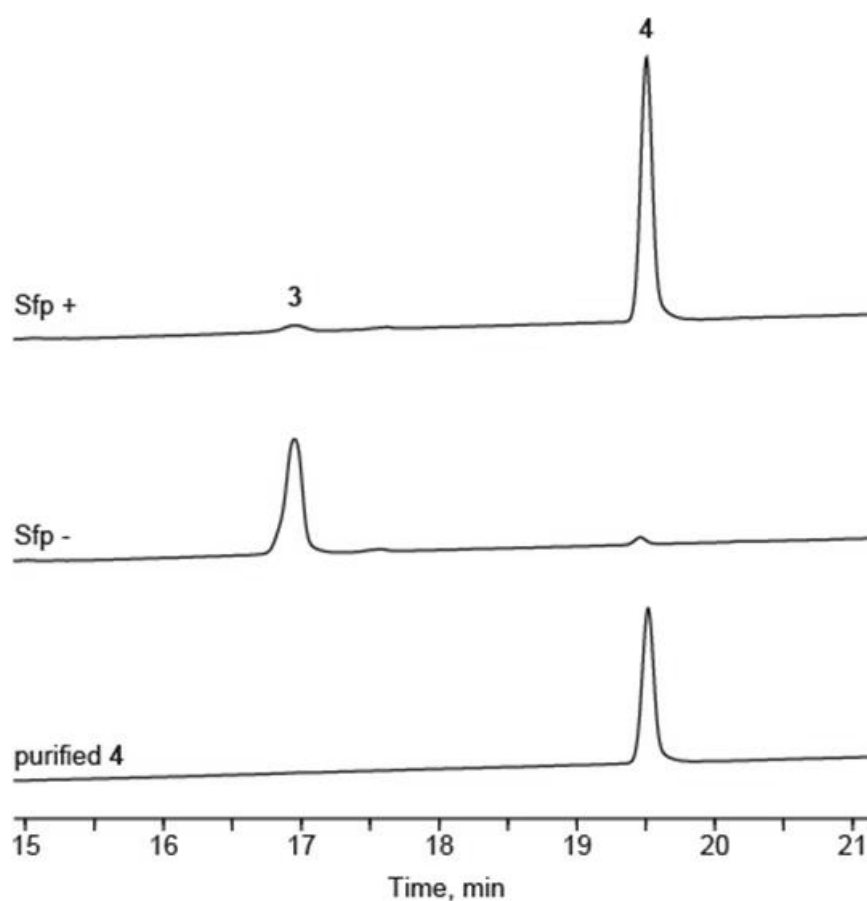


図 4-3-10 Sfp による翻訳後修飾の必要性の検証

HPLC (A₂₂₀)による Sfp 添加(Sfp+)・非添加(Sfp-)条件下での AstA 反応生成物および精製した **4** の解析。

4.4 考察

テルペンの環化様式は、初発のカルボカチオンの生成メカニズムから **Class I/type-A** と **Class II/type-B** の 2 種類に分類出来る。**Class I/type-A** は、基質となる FPP の脱ピロリン酸化反応(ionization)に伴うカルボカチオンの生成によって反応を開始する環化様式であり、この環化反応を触媒する酵素は、その活性に重要な DDxxD モチーフを保持している。一方、**Class II/type-B** は、プロトン付加反応(protonation)によるカルボカチオン生成によって反応を開始する環化様式であり、DxDD モチーフが活性に必須である。4.3.1 で述べた、*Mycobacterium tuberculosis* H37 から単離されたジテルペン環化酵素 Rv3377c は、この DxDD モチーフのバリエーションである DxDTT モチーフを保持しており、protonation による環化反応を触媒することが報告されている[72]。Rv3377c を含めジテルペンの環化酵素では、**Class II/type-B** の環化反応を触媒する例が複数報告されているものの、図 4-1-1 に示した通り、セスキテルペンは、一般的に **Class I/type-A** による環化反応によって生合成されることが知られており、**Class II/type-B** のセスキテルペン環化酵素の報告例は無い[68, 73]。一方で、ドリマン型のセスキテルペンは、上述の **Class II/type-B** のジテルペン環化酵素の反応生成物によく見られる構造を有していることから **Class II/type-B** による環化反応により生合していることが推測されている[28]。近年、Kwon ら[74]により典型的な DDxxD モチーフを有する **Class I/type-A** のドリマン型のセスキテルペン環化酵素 (drimenol synthase, VoTPS3)を植物から単離したとの報告がなされているが、彼らの報告でも反応機構については明らかに出来ていない。本研究で見出した AstC は、DxDTT モチーフを有し、組換え酵素を用いた解析からピロリン酸基が残存したドリマン型のセスキテルペンを生合成することを明らかにした。この結果は、AstC が protonation による環化反

応を触媒していることを強く示唆する結果であり、セスキテルペンの環化酵素としては初めての例であると考えられる(図 4-4-1)。

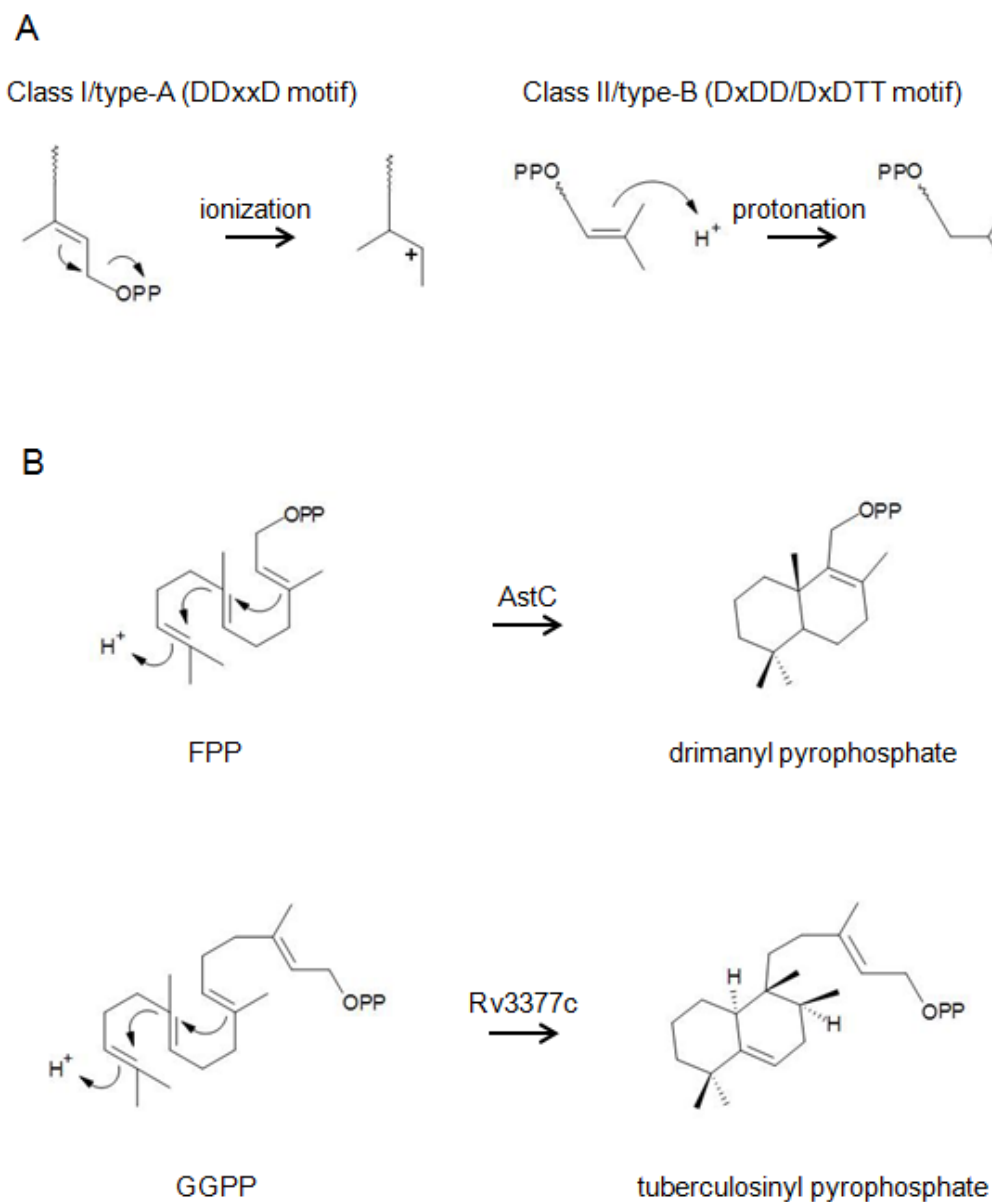


図 4-4-1 テルペンの環化機構

- A) Class I/type A および Class II/type B のカルボカチオン生成メカニズム。
 B) AstC およびジテルペン環化酵素(Rv3377c)による protonation による環化反応。

テルペンの環化酵素は、上述の DDxxD や DxDD (DxDTT)モチーフといった活性に重要なモチーフを除き、種間の配列上の同一性が非常に低いことが知られている。実際に、AstC のアミノ酸配列と Rv3377c のそれは、15%の同一性しか示さない。真菌ではジテルペンの環化酵素を含め protonation による環化反応のみを触媒する酵素の報告はなく配列を比較することが出来ないが、protonation および ionization による環化反応の両方を触媒する bifunctional な酵素は過去に複数報告[75-78]があることから、これらと AstC との比較を行った。しかしながら、AstC はこれら真菌由来のテルペン環化酵素とも 10%前後の非常に低い同一性しか示さなかった。以上の結果から、AstC は真菌のテルペン環化酵素の中でもユニークな配列を持っていることが示唆される。一方、AstC のアミノ酸配列をクエリーとした blast 検索の結果、astC ホモログと考えられる遺伝子が Ascomycetes のみならず Basidiomycetes を含め多くの真菌に確認された。更に、AstC とそのホモログのアラインメントを行った結果、DxDTT モチーフ以外にも protonation による環化反応を触媒するジテルペン環化酵素やトリテルペン環化酵素に保存されていることが報告されている QW モチーフ (Qxx(D/G)G(G/S)W)と呼ばれるテルペン環化酵素に特有なモチーフが全ての配列に存在することが明らかになった[79] (図 4-4-2)。これらは、AstC が protonation による環化反応を触媒するという結論を支持するとともに、同様の反応を触媒する酵素が広く真菌に存在することを示唆する結果である。

```

AstC      1 --MTKIN---PYKGLVLELKDIVETS--SSD-QIKLPIINTFKSILCCGATAQYQGGKIN-RAQYYSRLARD
Aspergillus terreus 1 ----MAITKGPVKALILDVFNVLCSW-KPPSNVAVPQPQILKMMSSDIWHDYEGGRYS-REDCYARVADR
Aspergillus niger 1 MVVAVPVTSSPDRAILLVNLNHHVFKS-SFV-DVGIPENTYKSIILCCGASTEYQGGKAG-LDQYYSRLSKD
Penicillium roquefortii 1 --MGKIIKRIPYKGVLIELKNIVLHS-SMQ-NIELPTNTLKSILYCGATVEYQGGGRIT-EEQYFARLASD
Trichoderma atroviride 1 MPHSTLTRPKSFHATVLDLNGVLLSYGSSFPSSVLKPSQIKWVLDSPTWYDYECCGKISSRQCYQVRSSE
Agaricus bisporus 1 ----MAPPQRPFATAIVFDLGDVLFQW-SATTKTSSISPKTLRSILNCPWFYDYEGRGLA-ENACYAAISQEQ
Laccaria bicolor 1 -----IIFDLGDVVFQW-SPETKTSISSRTRLDLSSPTWFFNYERQGLA-EEECYQIGEE

AstC      63 FALSADVTALFDTVQATIRPEESFLAFLAELKSRFGEQLKLYAVANMSREDYAMLKSLPIDWSLFDGVF
Aspergillus terreus 65 FHISAADMEDTLKQARKSLQVHHETLLFIQQVKKDAGELMVGCMNTPRPEQDVMHSINAEYPVFDRIY
Aspergillus niger 68 FDTPKSQIHDMFSAINKTQVVDHGILACLARLKAHCRGTLAIYGAONMSCKDFEKVQGYSDWNIFDGI
Penicillium roquefortii 66 FRHPQEEIKKAILAVRKSCLVNPVKVVEALASMKAKSKGLFELYAVINFSKEDYALVKFLGFDWSLFEFV
Trichoderma atroviride 71 FEMDVDFVSDTLEQLTKTKVPHSEFIAAIAKNIKAAPP-EIKVYGMNSISQPDYEFKPMISSWGILDGFQ
Agaricus bisporus 65 FNVNPFDEVRDAFSQARDSLQANHDFISLIRELKAQANGRLRVYAMSNISLPDWEVLRMKPADWDIFDHVF
Laccaria bicolor 55 FNLLSGEVRRAFQARESLVADEALIDLIRDLKTQSDGRLRIFAMSNISPPDWAVALRTPADWSIFDQVF

AstC      133 LSADLGMKRPFLRFRRHVLESISMKPEDTILLVDNDTDNILLCALSMGLKGLFGSTS-VPQALTNLLEYDH
Aspergillus terreus 135 ISGLMGMKRPSCFCYQVMEIEIGLSGDAIMEFIDDKLENVIAAQSVGIRGVLFQSQDILRRVVLNVLG-DF
Aspergillus niger 138 ISGDMGISKPELRFSSHILDRQLAPSEVIVVDHNTDNLTAISMGSAVLANSRDDVQRSLVNYIERNP
Penicillium roquefortii 136 VSSDIDGMQKPELRFYQHVLNQIGLSSEQVILVDDDTSNLLAAMSMGQGVMPSPDYS-LYRSILNFVDIDF
Trichoderma atroviride 140 ASGQAGVRKPDNASYITFLQKFFLDSARCVPIDDSVENTVAASALGFKGKYKSNPIEVERTLWNLGLG-SF
Agaricus bisporus 135 TSGAVGERKPNLAFYRHVIAATDLQPHQTIIFVDDKLENVLSARSLGFTGIVFDFEPEVKRALRNLIG-DF
Laccaria bicolor 125 TSSGAGERKPNLGFYEHVLAGTGVGPRQTIIFVDDKLENVLSARSLGPHGIVFDSPEPVKRALRNLIG-DF

AstC      202 ISRAEQFLRSHAKSLHSVT-----HTGVTIRENFAQLLILEATGDIIDLVELEYHP-TIWNVYIGTPEVLTIQ
Aspergillus terreus 204 VHRGLQFLAANAKKMSDVT-----NTGDTIQDNFAQLLILELAQDRELVLKQAGK-RTWNVYIGPPKLTIT
Aspergillus niger 208 TERGRKFLERNAKNNHSVT-----HTGVLIRENFAQLLILEASGDSITLVDIKPHA-TIWNVYIDKPEVLTIQ
Penicillium roquefortii 205 IGRGTRYLHENAQKHSFT-----HTGVPVKENFTQLLILELTGDRSLIDIGSHR-TIWNLEIVTPEVLTIQ
Trichoderma atroviride 209 VDRGMEYMERNAKMMLELS-----TGGEQPDNFSQFILLELTQDERLIKLERKRGFTWNMEHHSNTFNG
Agaricus bisporus 204 VORGGEFLVRNASKLGSITRTTAKHESISPLDENFAQLLILEITGNRALVNLVEHP-QTWNFQGGKQLTIT
Laccaria bicolor 194 LARGQAFLEHENAANLVSVTENSNDHEAVLLQENFAQLLILEVIGDANLVNLVEHP-RTWSFQGGKQLTIT

AstC      266 TEFFEDLDTTSELTATTVLD-RPKDIANEIMDEMLKYRSDLDLMLTFITDFKNRVDPVVCCNVLSLIFYKYGR
Aspergillus terreus 268 ATFFEDLDTTSEALSVP-VAEDVWVSVLDEMLKFTVDDGIEMTYFDSSRERVDPVVGINVLGVECRHNR
Aspergillus niger 272 KNFFEDLDTTSEELTIITN-ATPEVANQVNLKILHYRTYDGLIMTFITDFKNRVDPVVCCNVLSLIFYQYGR
Penicillium roquefortii 269 ADFFEDLDTTSEGITILN-RPTHVANLVMDKMLQYRTSDGLMQTFITDFKRRVDEIVCCNINLNIIFYQYGR
Trichoderma atroviride 274 TTYSDCDTTSEAMCTLDDIPAHEKEAAMDIIILNLSFDNLPLCWFNKNRFRLLCHGIIANAFRFFALSQ
Agaricus bisporus 273 EEFFEDLDTTSEELTILK-RSREIADSVMDLELVDDPGIITQTYFDHRRRFRFDPVVCVNALSLFYWAYGR
Laccaria bicolor 263 EEFFEDLDTTSEELTVMK-RDKAVANSVMNEMLELVDDHGIITQTYFDHRRRFRFDPVVCVNALSLFYTHGR

AstC      335 GHELHHTLAWRVQVLIIRAWINGTAFYMPPEAFLYFFRFLQHIT-HLPQLYDGLKVLKLERLQBRVGVF
Aspergillus terreus 337 ERDVLPTFHWRDILINRAVLSGTRYFSPDLFLFFLARLCLAVR--NQSLREQLVLELVDRLRBRVGVF
Aspergillus niger 341 GEEVSDTFDWWQVLVRRRAVHGTAFYSPPEAFYFFSRLLRRLSPPTYNEQLRERVABRIGVF
Penicillium roquefortii 338 GNELSETFDWVYQVLTQRTVYHGSFAFVBLPEAFFFLSRMMLRLKNNRHPCVYIIRMRGLIKRLEBRLSVF
Trichoderma atroviride 344 GHKLAHTYLFCLRLRTKAYELGSRYYENIDYMPYILSNLCSRRP--TDSLAEEMRELLKKEIQDRSGCD
Agaricus bisporus 342 GEQLRSTLTWVHEVLLNRAVLDGTRYETAECFLYFMSRLLATSG--DPDLHSLKPLKERVQDRIGAD
Laccaria bicolor 332 GSELSRTLQWIHKVLLNRAVLDGTRYETAECFLFFLSRLLASSE--DRELLHALLKPLRERIQBRIGVE

AstC      404 VDPISLSMRLIACNGVGIH-DRMGLNALLSMDNPDGSSWDLGTMHYHASKRLPTENQGVSTAMAIKAIKQC
Aspergillus terreus 405 GEAVSLAARILACRSFGLD-SARDMDSRGCXCEDEGGWPEVWVYRFASFLGNVGNRGLATAFAVRALESF
Aspergillus niger 411 VDAISLAMRLLVCHQVGMR-DTLGLEMLLSMQQPDGGWPEGTIYHYASKKQAIENRGVSTALAVQCIDVC
Penicillium roquefortii 408 VDAASLAMRLIVCHQVGVV-HVSGLKFFLSMQEPPDGGWPEGTLYQYYSKRLWLNRGVSTADALDAIRRC
Trichoderma atroviride 412 SDVLGAALRTLQAQANGVPYAKRDVQVLLSQQLDGGWNVWLFKYGKEDIKVGSRGVITAMAVKALRQY
Agaricus bisporus 410 GDSLALAMRILACDFVGIH-DEVDLRLLTLQCEDEGGWPEVWVYKYGSSGSIENRGLATAFAIKAVDITM
Laccaria bicolor 400 GDSIALAMRILVCDVGLR-DEIDRLSLLRQCEDEGGWPEVWVYKYGSSGLRIGNRGLTATAALNAL----

AstC      473 QANQCAGI-----
Aspergillus terreus 474 YGESAVKVMRRIV-----
Aspergillus niger 480 SQWKKSPNGHPKATVYTRTERHYGSP-----
Penicillium roquefortii 477 QPWLAHRF-----
Trichoderma atroviride 482 YADEE-----
Agaricus bisporus 479 FQPQIRFSESPTDILVENAIHKRRPSFSEKFLGKRPSSGSRFRKPLQWILQGSKLRKSVEIGS
Laccaria bicolor 465 -----

```

図 4-4-2 AstC およびそのオルソログのアラインメント

ClustalW による AstC および *A. niger* (XP_001391086)、*A. terreus* (XP_001217376)、*T. atroviride* (XP_013943363)、*P. roquefortii* (CDM29845)、*L. bicolor* (XP_001877382)、*A. bisporus* (XP_006461126) のアラインメント。DxDTT モチーフおよび QW モチーフを赤枠で示した。

AstC の反応生成物(6)にピロリン酸が残存していることから、次に astellolide 生合成遺伝子クラスターにコードされる 6 の脱ピロリン酸化を触媒する酵素の探索を試み、AstI および AstK を見出した。AstI および AstK の両方を作用させた時にのみ 7 が生成することから、両酵素が 6 のリン酸基の脱離に関与することは間違いないと考えられる。しかし、malachite green assay を用いた Pi 量の測定において、AstI を単独で作用させたサンプルと AstI および AstK の両方を作用させたサンプルとで Pi 量に大きな差が見られないとの結果を得ており(図 4-4-3)、AstK の至適反応条件や触媒機構については、今後、詳細な検討が必要である。

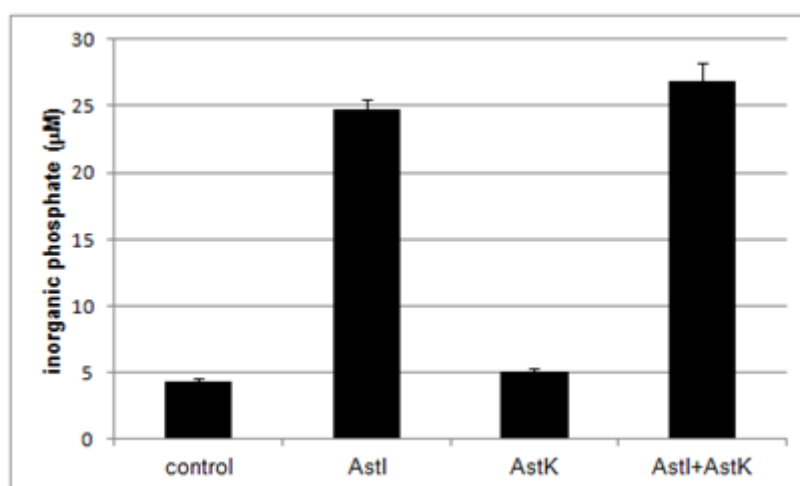


図 4-4-3 遊離無機リン酸の解析

AstC 反応液に AstI および AstK を添加し 30 分後の遊離リン酸量を測定した。コントロールは各酵素の代わりに滅菌水を添加した。データは独立して実施した 3 回の試験の平均値(± SD.)で示した。

第3章の検討において、両遺伝子の破壊株は、いずれも**1**および**2**の産生量が低下はするものの消失はしないという結果を得ている。本章の検討(4.3.2)において、大腸菌由来の **alkaline phosphatase** を用いた場合も**6**の脱ピロリン酸化反応が進むことが示されていることから、*A. oryzae* が保持する内在性の **phosphatase** にも同様の活性がある可能性が高いと考えられる。従って、上述の破壊株の表現型は、*A. oryzae* の内在性の **phosphatase** により **AstI** および **AstK** の機能が一部、相補されてしまうことに起因すると推測される。

以上、本検討において **AstC** および **AstI**、**AstK** という **HAD-like hydrolase** スーパーファミリーに属する**3**つの酵素による新しいセスキテルペンの生合成経路を明らかにすることが出来た(図4-4-4)。すなわち、新奇セスキテルペン環化酵素である **AstC** が **protonation** による環化反応を触媒することにより、**FPP** のピロリン酸が残存したドリマン型のセスキテルペン(**drimanyl pyrophosphate**) が生成し、続いて、この残存したピロリン酸を **AstI** および **AstK** という**2**つの **phosphatase** が段階的に脱リン酸化することで **drimanyl monophosphate** を経て **drim-8-ene-11-ol** が生成するという経路を見出した。

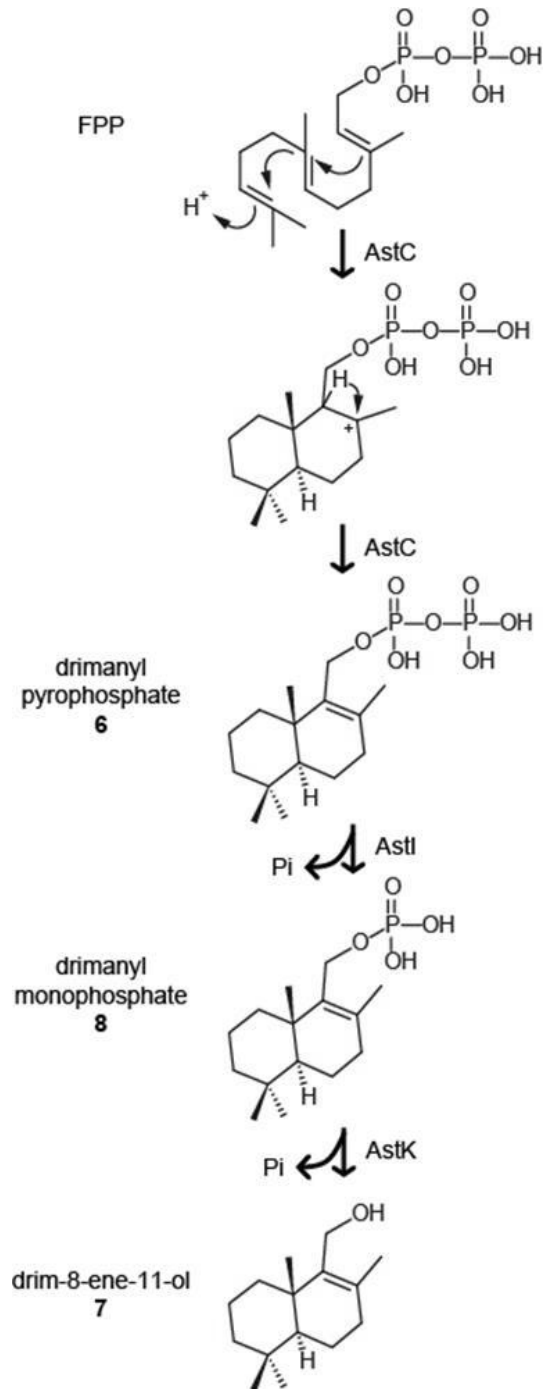


図 4-4-4 新奇セスキテルペン生合成経路

AstC により protonation による FPP の環化反応がおこり、drimanyl pyrophosphate が生成する。その後、AstI および AstK による段階的な脱リン酸化反応により drim-8-ene-11-ol が生成する。

更に、本検討ではシングルモジュールの NRPS である AstA にアリアル酸と **3** のエステル結合を触媒する活性があることを明らかにした。第 2 章において、**1** および **2** のガン細胞増殖抑制活性を評価し、**1** には活性が無いものの、**2** は試験に供した **4** 細胞種全ての増殖を抑制するとの結果を得ている。この結果は、astellolides の 6 位にエステル結合する側鎖部分の構造がその活性に重要であることを示唆する。一般的に、アミノ酸を基質として認識し活性化する A-domain は非常に高い基質特異性を有していることが知られているが、AFUA_6g12080 の A1-domain の様に有機酸などを基質として認識する一部の A-domain は基質特異性が低いことが知られている[80]。このことから、AstA の A-domain の基質特異性も高くないのではないかと考え、試験的にいくつかの安息香酸誘導体について 4.3.6 と同様の方法で活性の確認を行ったところ、試験に供した多くの化合物と **3** がエステル結合したと考えられる化合物が生成することを確認している(図 4-4-5)。今後、詳細な検討が必要ではあるが、この結果から、AstA を用いることにより 6 位の側鎖部分が異なる多様な化合物を生産することが出来ると考えられる。

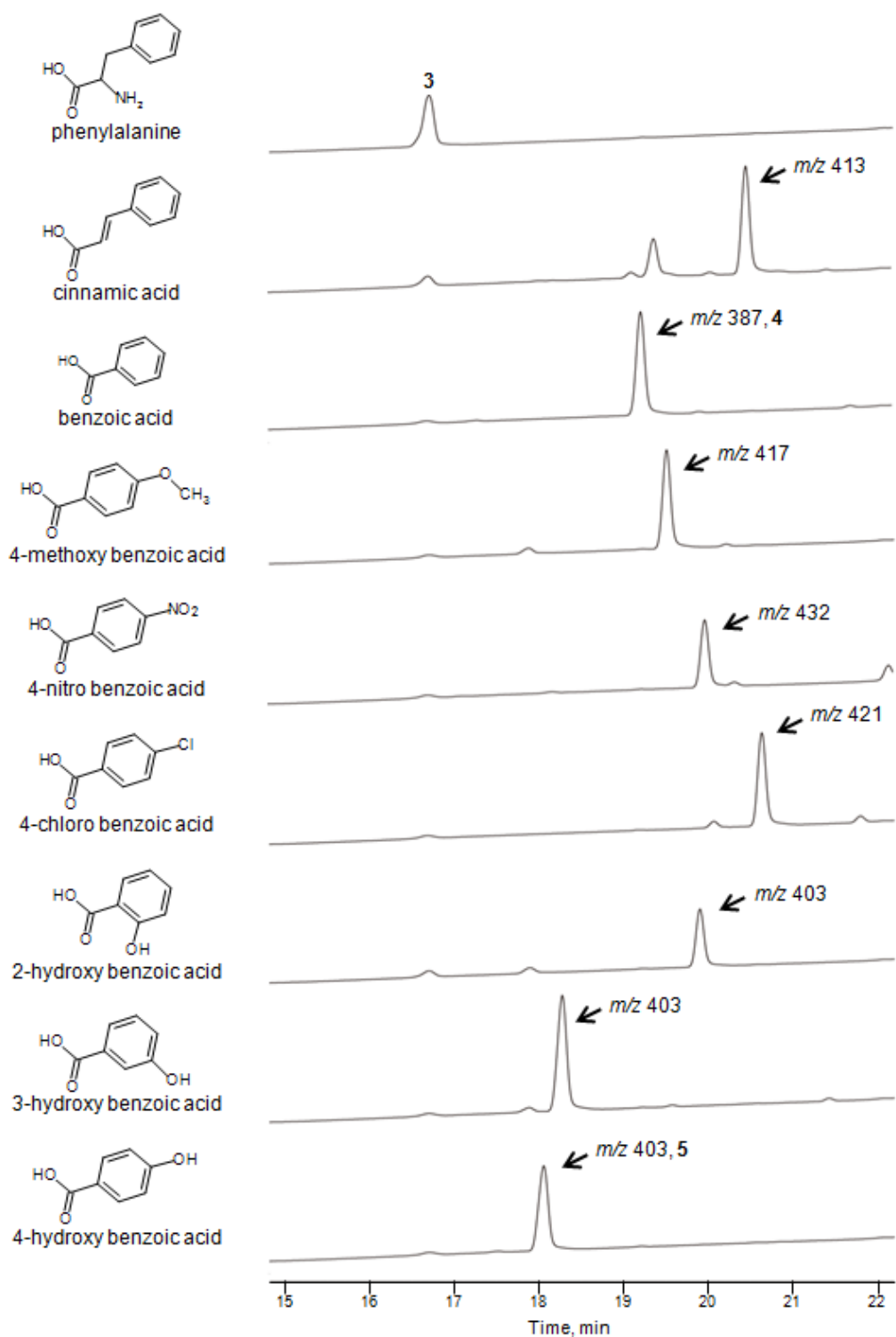


図 4-4-5 AstA の基質特異性の検討

HPLC (A₂₂₀)による AstA 反応生成物の解析。各種安息香酸誘導体および **3** 存在下で AstA を 18 時間作用させたところ、phenylalanine 以外は、いずれも各化合物と **3** がエステル結合していると考えられる m/z 値を示すピークが確認された。

4.1 でも述べた通り、いくつかの NRPS がエステル結合を触媒することが知られていた[69-71]。しかし、fumonisin 生合成における FUM14 および C-1027 生合成における SgcC5 は、いずれも基質が polyketide であり、また cryptophycins 生合成における CrpD-M2 は polyketide-nonribosomal peptide を基質とすることから、本検討で見出した AstA はテルペン化合物を基質とする初めての例であると考えられる(図 4-4-6)。

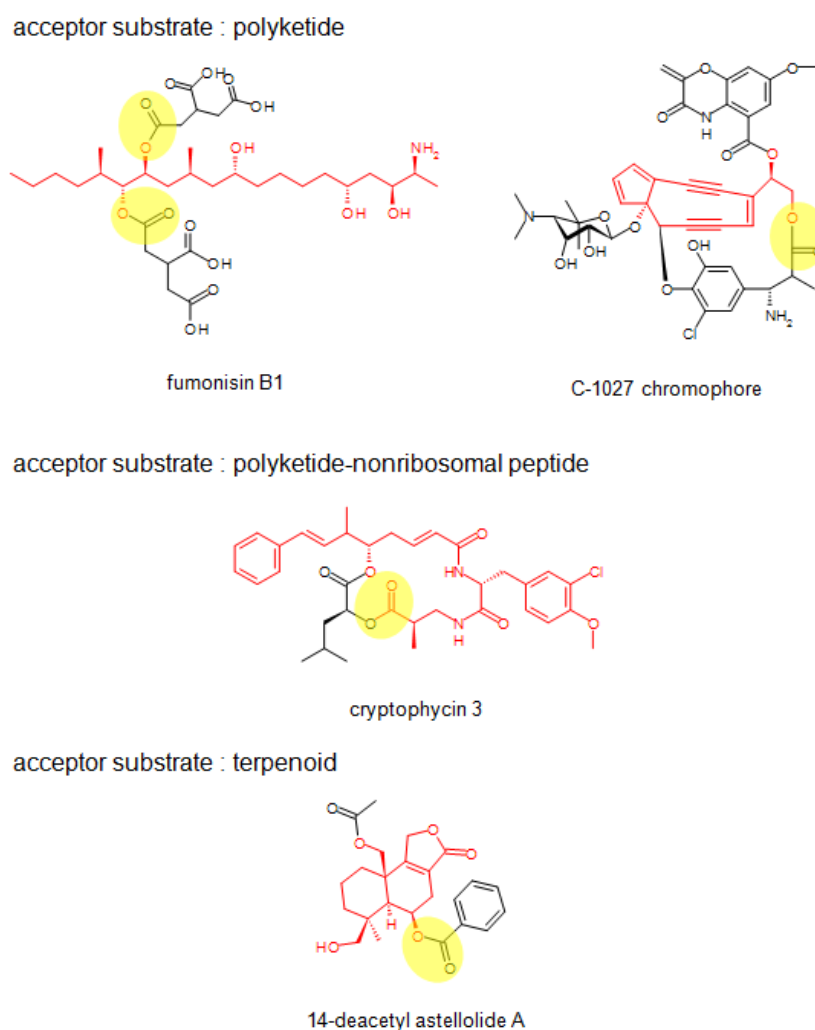


図 4-4-6 NRPS によるエステル修飾反応

NRPS によって触媒されるエステル結合を黄色で示し、修飾を受ける骨格を赤で示した。

本章での検討結果と第 3 章における破壊株の解析結果から *astellolides* は図 4-4-7 に示す経路により生合成されることが示唆される。cytochrome P450 をコードする *AstD* と short-chain dehydrogenase をコードする *AstE* については、本検討でその機能を解明するには至らなかったものの、破壊株による解析結果と両者の推定機能から *drim-8-ene-11-ol* の水酸化および脱水素によるカルボン酸の形成に関与しており、その後、非酵素的な脱水によるラクトン形成により *confertifolin* が生成すると推測される。しかし、これらの点については今後、精製酵素を用いた詳細な検討が必要である。

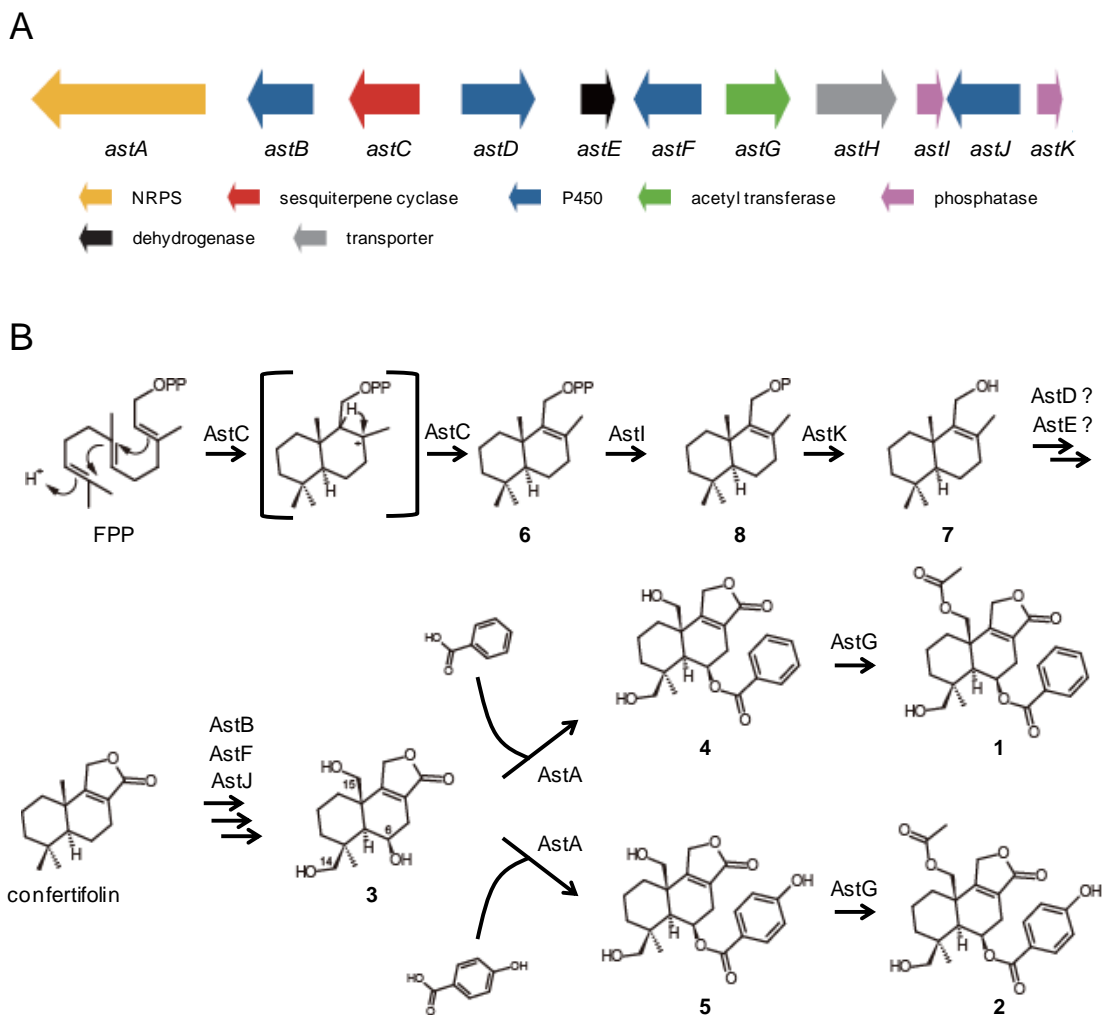


図 4-4-7 *astellolide* 生合成の概要

- A) *astellolide* 生合成遺伝子クラスター。
 B) *astellolides* の推定生合成経路。

総括

本研究は、麹菌 *A. oryzae* が産生する二次代謝産物およびその生合成遺伝子に関する理解を深めることを目的に行った。

第 1 章では、一部の *A. oryzae* が産生することが知られていたマイコトキシンである CPA の生合成経路の全容解明を目的とし CPA 産生菌である *A. oryzae* NBRC4177 株、並びに speradine A 産生菌である *A. tamarii* NBRC4099 株を用いて解析を行った。その結果、CPA の生合成に必須な 3 つのステップ(CpaA、CpaD、CpaO)を明らかにするとともに、CPA が更に修飾される 2 つのステップ(CpaH による水酸化、CpaM によるメチル化)が存在し、各ステップにより 2-oxoCPA および speradine A が生合成されることを明らかにした。この結果は、*Aspergillus* Section Flavi の共通祖先における CPA 生合成系が CpaA、CpaD、CpaO、CpaH、CpaM の 5 つのステップによって構成されており、その生合成経路の最終生合成産物が speradine A であったことを示唆する。*A. oryzae* の野生型であると考えられている *A. flavus* のゲノム解読株 NRRL3357 は、進化の過程において、この CPA の修飾に関与する *cpaH* および *cpaM* の部分欠失により CPA を最終生合成産物とし、一方、*A. oryzae* は *cpaM* のみを欠失し、*cpaH* を保持することで 2-oxoCPA を最終生合成産物としたと考えられる。興味深いことに、CPA および 2-oxoCPA、speradine A の 3 化合物について、その毒性の作用機序である筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害活性を比較すると、2-oxoCPA が最も低いことが分かる。今後、CPA 産生能を有する *A. oryzae* が普遍的に *cpaH* を保持しているかどうかを検証していく必要があるものの、CPA 産生能を有する *A. oryzae* は、同時に、その弱毒化に関与する *cpaH* という遺伝子を保持しているという現象は、*A. oryzae* が有するマイコトキシン生産に対する遺伝的なセーフガードの一例であると考えられる。序論でも触れた通り、アフラトキシン

生合成遺伝子クラスターにおいては、クラスター遺伝子の欠失や *afIR* の転写不全によりアフラトキシン生産能を喪失していることが明らかにされている[3, 4]。また、近年、アフラトレムというマイコトキシンについても *A. flavus* のゲノム解析からその生合成遺伝子クラスターが明らかにされ、*A. oryzae* の同クラスターとの比較から *A. oryzae* では生合成に関与する遺伝子にフレームシフト変異が起こっていることが報告されている[52]。これらの知見は、長い年月をかけた育種により *A. oryzae* が安全な形質を獲得してきたことを裏付ける結果であり、*A. oryzae* のゲノム中には、こういった遺伝的要因が数多く蓄積していることが推測される。これらを一つ一つ分子レベルで明らかにし積み重ねていくことで、*A. oryzae* の安全性がより確固たるものになり、ひいては、その安全な産業利用に繋がっていくと考えられる。

第2章以降では、*A. oryzae* における二次代謝産物の生産制御に関与する転写因子の探索、並びにその過程で見出した *astellolides* の生合成遺伝子クラスターの同定、生合成経路の解析を行った。二次代謝産物の生産制御に *LaeA* と呼ばれるクロマチンリモデリング因子が関与するとの報告[81]がなされたことを皮切りに、近年、エピジェネティック制御による二次代謝産物の生産制御に関する研究が国内外で精力的に行われるようになった。エピジェネティック制御とは、DNA のメチル化またはヒストンのメチル化やアセチル化といった化学修飾を介して起こる、クロマチンの構造変化によって各種遺伝子発現が制御される機構のことである。この内、DNA のメチル化に関しては、*A. flavus* において *Bisulfite Sequencing* 解析による検討が行われており、その結果 DNA のメチル化はほとんど確認されないとの報告がなされている[82]。一方、ヒストンの修飾に関しては、*A. flavus* とともに *A. nidulans* や *A. fumigatus* など多くの糸状菌において様々な検討がなされており、いくつかの因子が二次代謝産物の生産制御に関与していることが明らかになっている[54, 55]。本研究では、*A. oryzae*

の転写因子破壊株ライブラリーを用いた代謝物プロファイルのスクリーニングから、H3K4のメチル化に参与するCOMPASSの構成因子であるCclAおよびSppAが二次代謝産物の産生制御に参与することを明らかにした。加えて、その制御下にある二次代謝産物の1つがastellolidesであることを見出した。二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターには、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターにおけるAfIRの様に、クラスター内にそのクラスター全体の転写制御を司る転写因子が存在する場合もあるが、一方で近傍に転写因子が存在しないクラスターも存在する。本研究で同定したastellolide生合成遺伝子クラスターには、その近傍を含め転写因子をコードする遺伝子は存在していない。また、CPA生合成遺伝子クラスターは、バックボーン遺伝子であるcpaA (PKS-NRPS)に隣接して、Zn₂-Cys₆タイプの転写因子(cpaR)がコードされているものの、第1章での検討においてCpaRはクラスターの転写制御に参与しないことを明らかにしている。興味深いことに、マイクロアレイによるcclA破壊株の発現解析では、astellolide生合成遺伝子クラスターのみならず、CPA生合成遺伝子クラスターの発現量も増加しているとの結果が得られており、このことからクラスター内に転写因子が存在しない二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターは、CclA等によるヒストン修飾によって転写制御を受けている可能性が考えられる。転写因子破壊株ライブラリーのスクリーニングの結果では、本研究で同定したcclAやsppA破壊株以外にも複数の転写因子破壊株で二次代謝産物産生プロファイルが変化することが確認されている。今後は、これらの転写因子を複合的に解析していくことにより、*A. oryzae*における二次代謝産物の生産制御メカニズムをより詳細に検討していく必要がある。

近年の遺伝子破壊技術などの分子生物学的アプローチの発展に伴い、*A. oryzae*が生産する各種有用生物活性物質の生合成遺伝子の解析が精力的に行われるようになり、その結果、β-ラクタム系抗生物質として知られるpenicillin

[83]、チロシナーゼ阻害活性を有する kojic acid [84]、DPP IV 阻害活性を有する WYK-1 [85]、強力なキレート活性を有する deferriferrichrysin [86]など、多くの有用生物活性物質の生合成遺伝子クラスターが明らかにされている。このことから、*A. oryzae* の二次代謝産物の研究は、その安全性の検証という側面と同時に、新規有用化合物の同定という側面を併せ持つ。本研究では、検討の過程で見出した 14-deacetyl astellolide B という化合物に各種ガン細胞の増殖抑制活性があることを明らかにした。本化合物は、*A. oryzae* が産生することは知られていたものの、その生合成に関与する遺伝子に関する知見は全くなかったことから、次に生合成遺伝子クラスターの同定並びにその生合成経路の解明を試みた。その結果、astellolide 生合成遺伝子クラスターを同定するとともに、その基本骨格であるドリマン型セスキテルペンの生合成経路を明らかにした。更に、アリアル酸とセスキテルペンのエステル結合を触媒する活性を有する NRPS (AstA)を見出した。

近年の次世代シーケンス技術の革新、並びに ORF 予測などのバイオインフォマティクス技術の向上により、多くの生物種のゲノム、ORF 情報が得られるようになった。しかし、得られた ORF の機能推定は、既知タンパク質との相同性検索やドメイン検索に依るところが大きく、過去に例のない機能未知のタンパク質については、その機能を推定することが困難なのが現状である。二次代謝産物の生合成酵素、特に真菌におけるテルペンの環化酵素は非常に多様性に富んでおり、fumagillin 生合成における *fma*-TC [87]や pyripyropene 生合成における Pyr4 [88]は、既知のテルペン環化酵素とは全く相同性を示さない膜結合タンパク質であるにも拘らず、セスキテルペンおよびメロテルペノイドの環化活性を有することが報告されている。本研究によって見出された HAD-like hydrolase スーパーファミリーに属する AstC も同様に、これまで知られてきたセスキテルペンの環化様式(ionization)とは異なり protonation による環化様式

でセスキテルペンの環化を触媒する新奇セスキテルペン環化酵素である。本研究によって得られた知見が今後、ゲノムマイニングによるセスキテルペノイド生合成遺伝子探索に活用され、真菌におけるテルペノームの発展に寄与することを期待したい。

引用文献

1. Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 937-947.
2. Hoffmeister, D., Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 393-416.
3. Watson, A. J., Fuller, L. J., Jeenes, D. J., Archer, D. B. (1999). Homologs of Aflatoxin Biosynthesis Genes and Sequence of *afIR* in *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 307-310.
4. Tominaga, M., Lee, Y. H., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, K., et al. (2006). Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 484-490.
5. Tadenuma, M., Sato, S. (1967). Studies on the colorants in sake -Presence of ferrichrysin as iron containing colorant in sake. *Agric. Biol. Chem.*, 31, 1482-1489.
6. Yabuta, T., (1924). LXXIII.—The constitution of kojic acid, a γ -pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates. *J. Chem. Soc.*, 125, 575-587.
7. Rank, C., Klejnstrup, M. L., Petersen, L. M., Kildgaard, S., Frisvad, J. C., Held Gotfredsen, C., Ostenfeld Larsen, T. (2012). Comparative chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). *Metabolites*, 2, 39-56.
8. Pfefferle, W., Anke, H., Bross, M., Steffan, B., Vianden, R., Steglich, W.

- (1990). Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. *J. Antibiot.*, 43, 648-654.
9. Tanaka, S., Wada, K., Katayama, M., Marumo, S. (1984). Isolation of sporogen-AO1, a sporogenic substance, from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 3189-3191.
 10. Blumenthal, C. Z. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 39, 214-228.
 11. Holzapfel, C. W. (1968). The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*, 24, 2101-2119.
 12. Holzapfel, C. W., Wilkins, D. C. (1971). On the biosynthesis of cyclopiazonic acid. *Phytochemistry*, 10, 351-358.
 13. Goeger, D. E., Riley, R. T., Dorner, J. W., Cole, R. J. (1988). Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca²⁺-transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 978-981.
 14. Moncoq, K., Trieber, C. A., Young, H. S. (2007). The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.*, 282, 9748-9757.
 15. Purchase, I. F. H. (1971). The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 114-123.
 16. Nishie, K., Cole, R. J., Dorner, J. W. (1987). Toxic effects of cyclopiazonic acid in the early phase of pregnancy in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 55, 303-315.

17. Gallagher, R. T., Richard, J. L., Stahr, H. M., Cole, R. J. (1978). Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, 66, 31-36.
18. Urano, T., Trucksess, M. W., Beaver, R. W., Wilson, D. M., Dorner, J. W., Dowell, F. E. (1992). Co-occurrence of cyclopiazonic acid and aflatoxins in corn and peanuts. *J. AOAC Int.*, 75, 838–841.
19. Zorzete, P., Baquiao, A.C., Atayde, D. D., Reis, T. A., Goncalvez, E., Correa, B. (2013). Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. *Food Res. Int.*, 52, 380–386.
20. Dorner, J. W. (1983). Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii* Kita. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1435-1437.
21. Pitt, J. I., Cruickshank, R. H., Leistner, L. (1986). *Penicillium commune*, *P. camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiology*, 3, 363-371.
22. Matsudo, T., Sasaki, M. (1995). Simple determination of cyclopiazonic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 355-357.
23. Holzapfel, C. W., Hutchison, R. D., Wilkins, D. C. (1970). The isolation and structure of two new indole derivatives from *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*, 26, 5239-5245.
24. Tsuda, M., Mugishima, T., Komatsu, K., Sone, T., Tanaka, M., Mikami, Y., et al. (2003). Speradine A, a new pentacyclic oxindole alkaloid from a marine-derived fungus *Aspergillus tamarii*. *Tetrahedron*, 59, 3227-3230.
25. Hamasaki, T., Kuwano, H., Isono, K., Hatsuda, Y., Fukuyama, K., Tsukihara, T., Katsube, Y. (1975). A new metabolite, parasiticolide A, from *Aspergillus parasiticus*. *Agric. Biol. Chem.*, 39, 749-751.

26. Gould, R. O., Simpson, T. J., Walkinshaw, M. D. (1981). Isolation and X-ray crystal structures of astellolides A and B, sesquiterpenoid metabolites of *Aspergillus varicolor*. *Tetrahedron Lett.*, 22, 1047-1050.
27. Ren, R., Chen, C. J., Hu, S. S., Ge, H. M., Zhu, W. Y., Tan, R. X., et al. (2015). Drimane Sesquiterpenoids from the *Aspergillus oryzae* QXPC-4. *Chem. Biodivers.*, 12, 371-379.
28. Jansen, B. J. M., de Groot, A. (2004). Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 449-477.
29. Ebel, R. (2010). Terpenes from marine-derived fungi. *Mar. Drugs*, 8, 2340-2368.
30. Ngokpol, S., Suwakulsiri, W., Sureram, S., Lirdprapamongkol, K., Aree, T., Wiyakrutta, S., et al. (2015). Drimane sesquiterpene-conjugated amino acids from a marine isolate of the fungus *Talaromyces minioluteus* (*Penicillium minioluteum*). *Mar. Drugs*, 13, 3567-3580.
31. Fotsop, D. F., Roussi, F., Le Callonec, C., Bousserouel, H., Litaudon, M., Guéritte, F. (2008). Isolation and characterization of two new drimanes from *Zygomycetes baillonii* and synthesis of analogues. *Tetrahedron*, 64, 2192-2197.
32. Ogawa, T., Ando, K., Tanaka, T., Uosaki, Y., Matsuda, Y. (1996). RES-1149-1 and-2, novel non-peptidic endothelin type B receptor antagonists produced by *Aspergillus* sp. I. Taxonomy of producing strain, fermentation, isolation, and physico-chemical and biological properties. *J. antibiot.*, 49, 1-5.
33. Stierle, D. B., Stierle, A. A., Girtsman, T., McIntyre, K., Nichols, J. (2012). Caspase-1 and-3 inhibiting drimane sesquiterpenoids from the

- extremophilic fungus *Penicillium solitum*. *J. Nat. Prod.*, 75, 262-266.
34. Sultana, R., Hossain, R., Adhikari, A., Ali, Z., Yousuf, S., Choudhary, M. I., et al. (2011). Dimeric-type sesquiterpenes from *Polygonum hydropiper*. *Planta med.*, 77, 1848-1851.
 35. Burroughs, A. M., Allen, K. N., Dunaway-Mariano, D., Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *J. Mol. Biol.*, 361, 1003-1034.
 36. Allen, K. N., Dunaway-Mariano, D. (2009). Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 658-665.
 37. Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I., et al. (2006). Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J. Biol. Chem.*, 281, 36149-36161.
 38. Kuznetsova, E., Nocek, B., Brown, G., Makarova, K. S., Flick, R., Wolf, Y. I., et al. (2015). Functional diversity of haloacid dehalogenase superfamily phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 290, 18678-18698.
 39. Oja, T., Klika, K. D., Appassamy, L., Sinkkonen, J., Mäntsälä, P., Niemi, J., et al. (2012). Biosynthetic pathway toward carbohydrate-like moieties of alnumycins contains unusual steps for CC bond formation and cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 6024-6029.
 40. Dorrestein, P. C., Van Lanen, S. G., Li, W., Zhao, C., Deng, Z., Shen, B., et al. (2006). The bifunctional glyceryl transferase/phosphatase OzmB belonging to the HAD superfamily that diverts 1, 3-bisphosphoglycerate

into polyketide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 10386-10387.

41. Chou, H. H., Keasling, J. D. (2012). Synthetic pathway for production of five-carbon alcohols from isopentenyl diphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 7849-7855.
42. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., et al. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438, 1157-1161.
43. Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., Fedorova, N. D. (2010). SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.*, 47, 736-741.
44. Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., et al. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids Res.*, 39, W339-W346.
45. Takahashi, T., Masuda, T., Koyama, Y. (2006). Enhanced gene targeting frequency in ku70 and ku80 disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics.*, 275, 460-470.
46. McGrath, R. M., Steyn, P. S., Ferreira, N. P., Neethling, D. C. (1976). Biosynthesis of cyclopiazonic acids in *Penicillium cyclopium*: The Isolation of dimethylallylpyrophosphate: cyclo-acetoacetyltryptophanyl dimethylallyltransferase. *Bioorg. Chem.*, 5, 11-23.
47. McGrath, R. M., Steyn, P. S., Ferreira, N. P. (1973). α -Acetyl- γ -(β -indolyl) methyltetramic acid. A biosynthetic intermediate of cyclopiazonic acid and of bis-secodehydrocyclopiazonic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*,

21, 812-813.

48. 勢ノ康代 (2006) 麹菌 *Aspergillus oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子に関する研究. 東京大学学位論文.
49. Tokuoka, M., Seshime, Y., Fujii, I., Kitamoto, K., Takahashi, T., Koyama, Y. (2008). Identification of a novel polyketide synthase–nonribosomal peptide synthetase (PKS–NRPS) gene required for the biosynthesis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 1608-1615.
50. Chang, P. K., Horn, B. W., Dorner, J. W. (2009). Clustered genes involved in cyclopiazonic acid production are next to the aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.*, 46, 176-182.
51. 大桃定洋, 杉田正徳, 阿部又三. (1973). *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi の培養から cyclopiazonic acid, cyclopiazonic acid imine および bissecodehydrocyclopiazonic acid の分離. 農化, 47, 57-63.
52. Nicholson, M. J., Koulman, A., Monahan, B. J., Pritchard, B. L., Payne, G. A., Scott, B. (2009). Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 7469-7481.
53. Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 21-32.
54. Brakhage, A. A., Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol.*, 48, 15-22.
55. Strauss, J., Reyes-Dominguez, Y. (2011). Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet.*

- Biol.*, 48, 62-69.
56. Kawauchi, M., Nishiura, M., Iwashita, K. (2013). Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA. *Eukaryot. Cell*, 12, 1087-1096.
 57. Ogawa, M., Kobayashi, T., Koyama, Y. (2012). ManR, a novel Zn(II)₂Cys₆ transcriptional activator, controls the β-mannan utilization system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 49, 987-995.
 58. Mueller, J. E., Canze, M., Bryk, M. (2006). The requirements for COMPASS and Paf1 in transcriptional silencing and methylation of histone H3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 173, 557-567.
 59. Osada, H., Magae, J., Watanabe, C., Isono, K. (1988). Rapid screening method for inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiot.*, 41, 925–931.
 60. Osada, H., Cui, C. B., Onose, R., Hanaoka, F. (1997). Screening of cell cycle inhibitors from microbial metabolites by a bioassay using a mouse cdc2 mutant cell line, tsFT210. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 193–203.
 61. Osada, H., Koshino, H., Isono, K., Takahashi, H., Kawanishi, G. (1991). Reveromycin A, a new antibiotic which inhibits the mitogenic activity of epidermal growth factor. *J. Antibiot.*, 44, 259–261.
 62. Shilatifard, A. (2012). The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 81, 65-95.
 63. Bok, J. W., Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., et al. (2009). Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.*, 5, 462-464.
 64. Palmer, J. M., Bok, J. W., Lee, S., Dagenais, T. R., Andes, D. R.,

- Kontoyiannis, D. P., Keller, N. P. (2013). Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. *PeerJ*, 1, e4. doi:10.7717/peerj.4
65. Ogawa, M., Tokuoka, M., Jin, F. J., Takahashi, T., Koyama, Y. (2010). Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 47, 10-18.
66. Appel, H. H., Connolly, J. D., Overton, K. H., Bond, R. P. M. (1960). 906. Sesquiterpenoids. Part II. The constitution and stereochemistry of drimenin, isodrimenin, and confertifolin. *J. Chem. Soc.* 4685-4692.
67. Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-ya, K., Omura, S., Cane, D. E., Ikeda, H. (2015). Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 857-862.
68. Quin, M. B., Flynn, C. M., Schmidt-Dannert, C. (2014). Traversing the fungal terpenome. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 1449-1473.
69. Ding, Y., Rath, C. M., Bolduc, K. L., Håkansson, K., Sherman, D. H. (2011). Chemoenzymatic synthesis of cryptophycin anticancer agents by an ester bond-forming non-ribosomal peptide synthetase module. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14492-14495.
70. Zaleta-Rivera, K., Xu, C., Yu, F., Butchko, R. A., Proctor, R. H., Hidalgo-Lara, M. E., et al. (2006). A bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by FUM14 catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry*, 45, 2561-2569.
71. Lin, S., Van Lanen, S. G., Shen, B. (2009). A free-standing condensation enzyme catalyzing ester bond formation in C-1027 biosynthesis. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 4183-4188.
72. Nakano, C., Hoshino, T. (2009). Characterization of the Rv3377c Gene Product, a Type - B Diterpene Cyclase, from the *Mycobacterium tuberculosis* H37 Genome. *ChemBioChem*, 10, 2060-2071.
 73. Wendt, K. U., Schulz, G. E. (1998). Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure*, 6, 127-133.
 74. Kwon, M., Cochrane, S. A., Vederas, J. C., Ro, D. K. (2014). Molecular cloning and characterization of drimenol synthase from valerian plant (*Valeriana officinalis*). *FEBS Lett.*, 588, 4597-4603.
 75. Toyomasu, T., Kawaide, H., Ishizaki, A., Shinoda, S., Otsuka, M., Mitsunashi, W., Sassa, T. (2000). Cloning of a full-length cDNA encoding *ent*-kaurene synthase from *Gibberella fujikuroi*: functional analysis of a bifunctional diterpene cyclase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 660-664.
 76. Toyomasu, T., Niida, R., Kenmoku, H., Kanno, Y., Miura, S., Nakano, C., et al. (2008). Identification of diterpene biosynthetic gene clusters and functional analysis of labdane-related diterpene cyclases in *Phomopsis amygdali*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1038-1047.
 77. Kawaide, H., Imai, R., Sassa, T., Kamiya, Y. (1997). *ent*-Kaurene Synthase from the Fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. *J. Biol. Chem.*, 272, 21706-21712.
 78. Bromann, K., Toivari, M., Viljanen, K., Vuoristo, A., Ruohonen, L., Nakari-Setälä, T. (2012). Identification and characterization of a novel diterpene gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 7, e35450.
 79. Cao, R., Zhang, Y., Mann, F. M., Huang, C., Mukkamala, D., Hudock, M. P., et al. (2010). Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold.

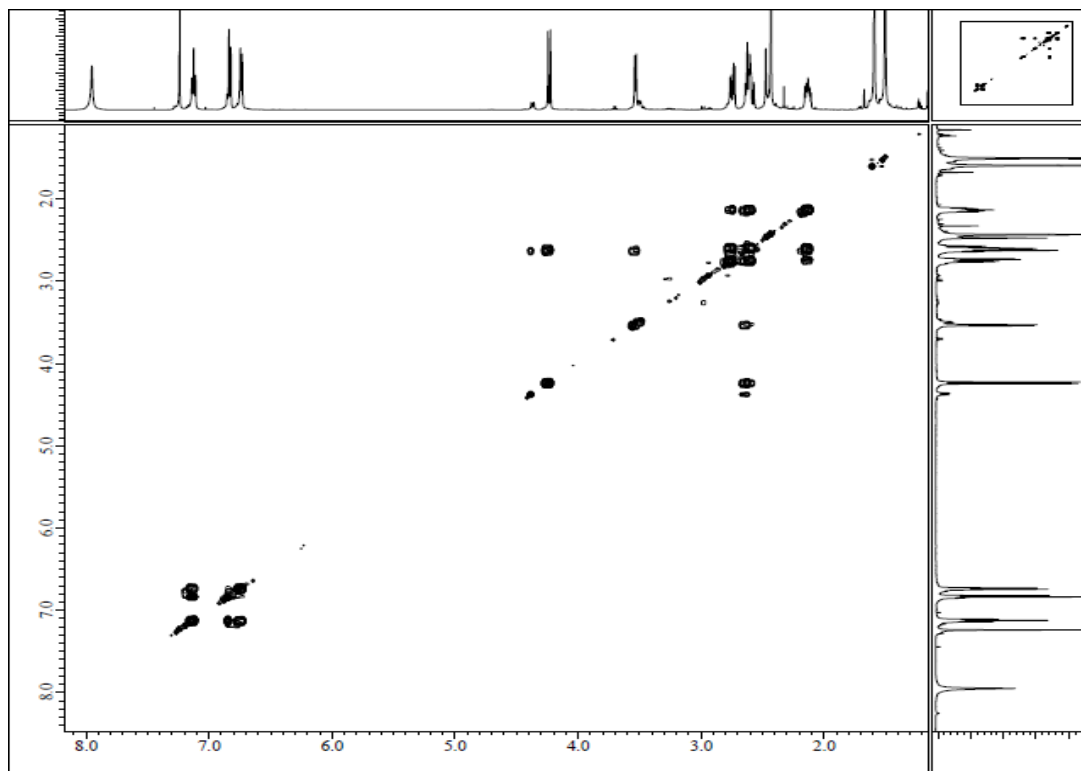
Proteins, 78, 2417-2432.

80. Ames, B. D., Walsh, C. T. (2010). Anthranilate-activating modules from fungal nonribosomal peptide assembly lines. *Biochemistry*, 49, 3351-3365.
81. Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., et al. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320, 1504-1506.
82. Liu, S. Y., Lin, J. Q., Wu, H. L., Wang, C. C., Huang, S. J., Luo, Y. F., et al. (2012). Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation. *PloS One*, 7(1), e30349.
83. Marui, J., Ohashi-Kunihiro, S., Ando, T., Nishimura, M., Koike, H., Machida, M. (2010). Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 8-11.
84. Terabayashi, Y., Sano, M., Yamane, N., Marui, J., Tamano, K., Sagara, J., et al. (2010). Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.*, 47, 953-961.
85. Imamura, K., Tsuyama, Y., Hirata, T. (2011). Identification and characterization of a novel fermented substance produced by edible *Aspergillus oryzae* AO-1 that inhibits DPP-IV activity. *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 37-40.
86. 山田修. (2004). 麹菌によるデフェリフェリクリシン生合成のからくり. 日本醸造協会誌, 99, 2-6.
87. Lin, H. C., Chooi, Y. H., Dhingra, S., Xu, W., Calvo, A. M., Tang, Y. (2013).

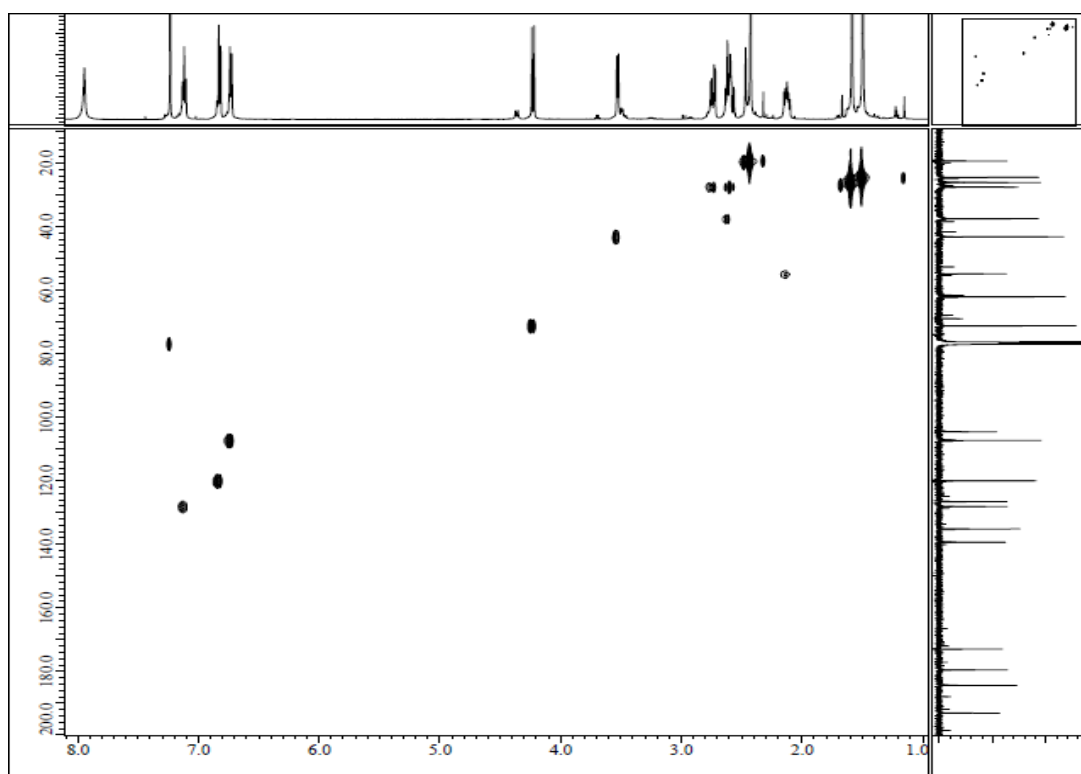
The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β -trans-bergamotene. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 4616-4619.

88. Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y., Kushiro, T. (2010). Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nat. Chem.*, 2, 858-864.

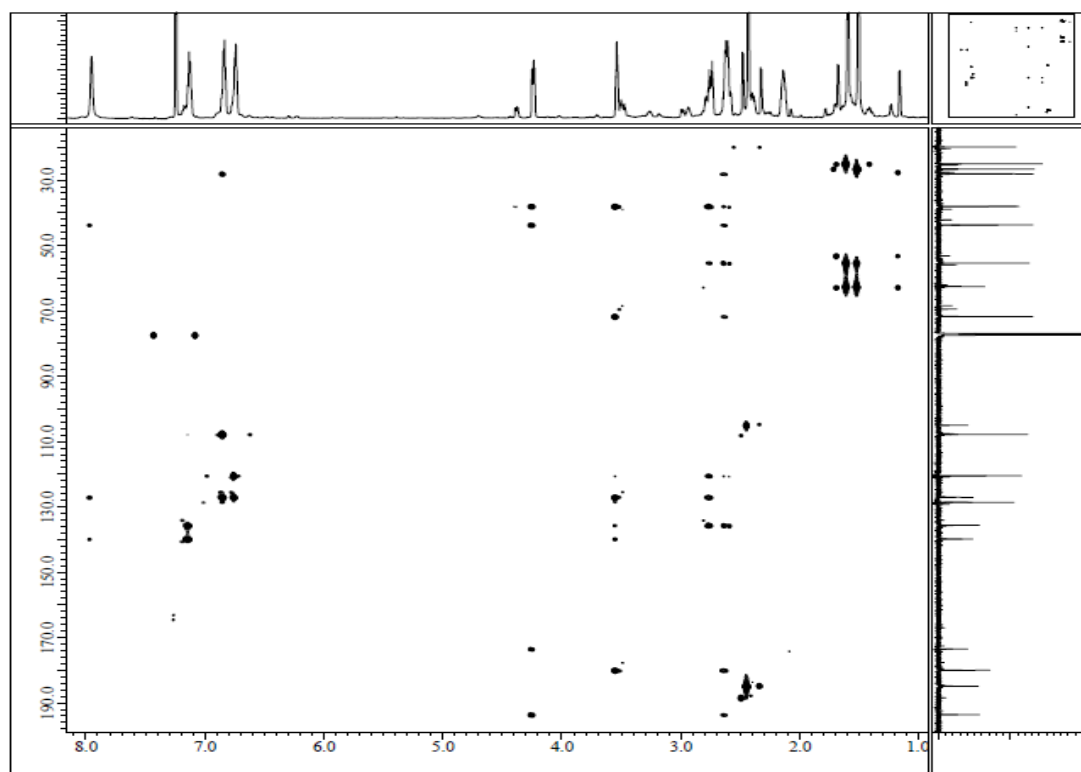
付録



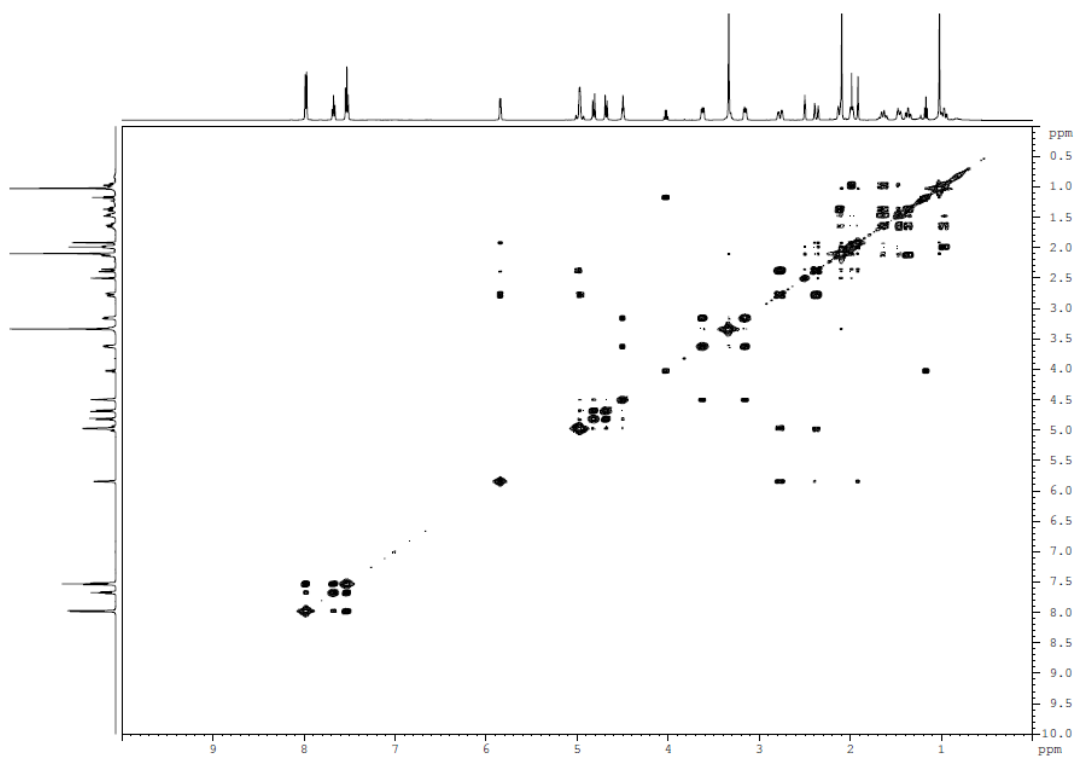
2-oxocyclopiazonic acid の COSY spectra



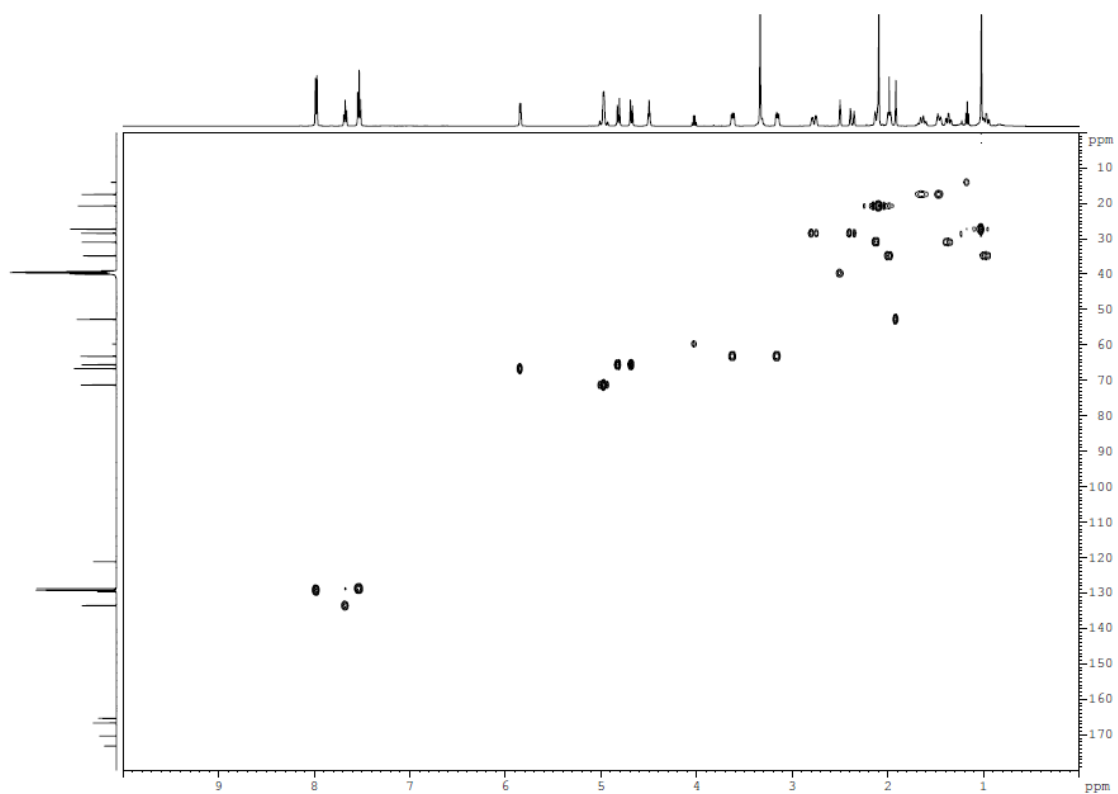
2-oxocyclopiazonic acid の HMQC spectra



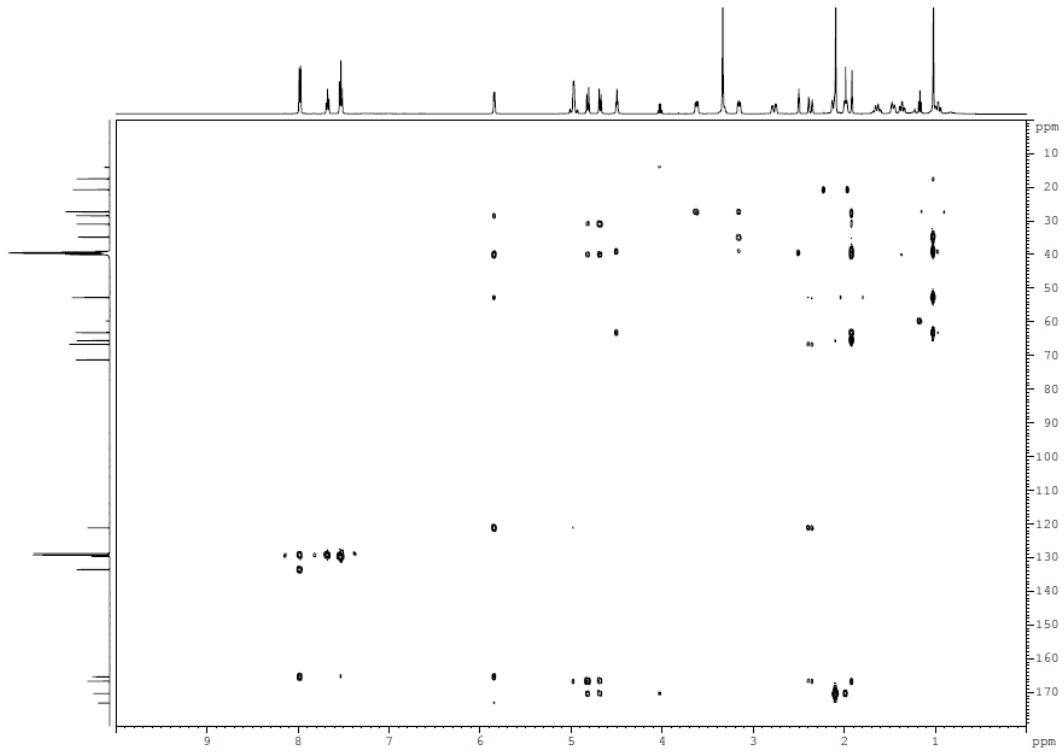
2-oxocyclopiazonic acid の HMBC spectra



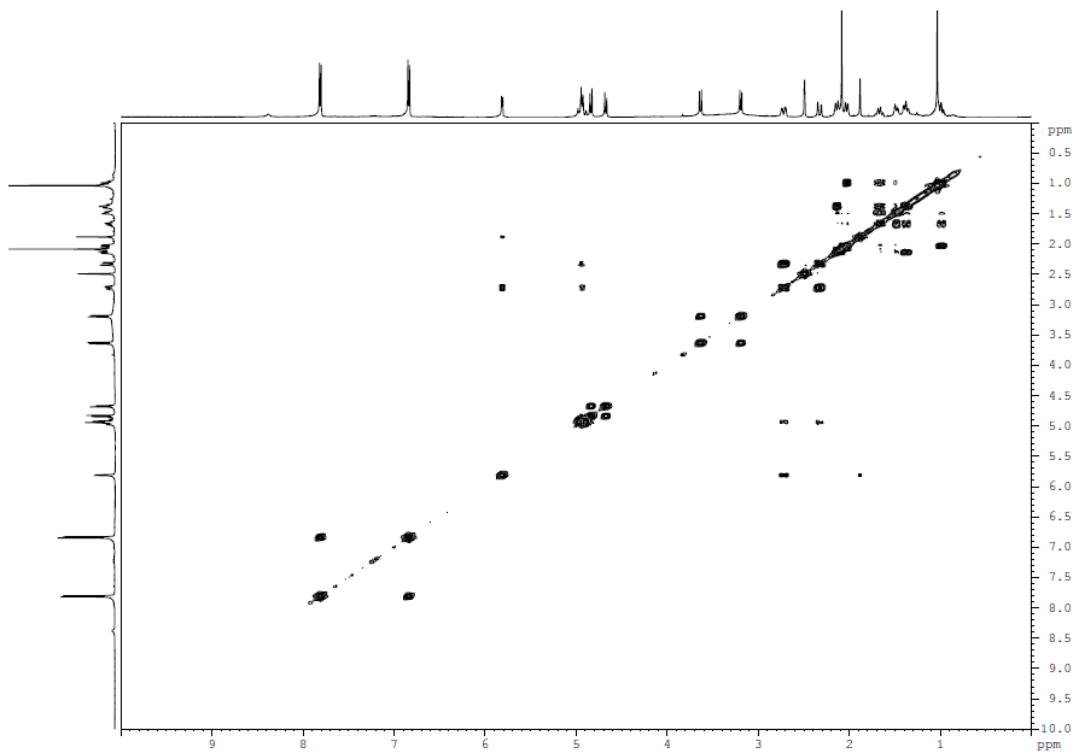
14-deacetyl astellolide A の COSY spectra



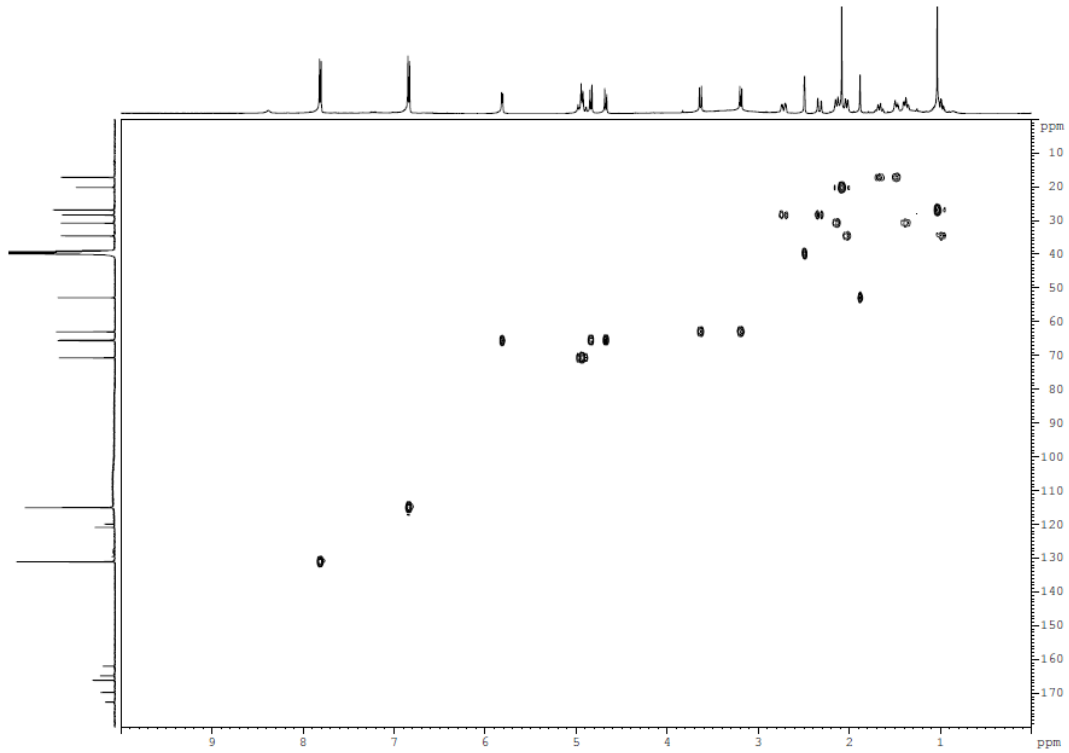
14-deacetyl astellolide A の HMQC spectra



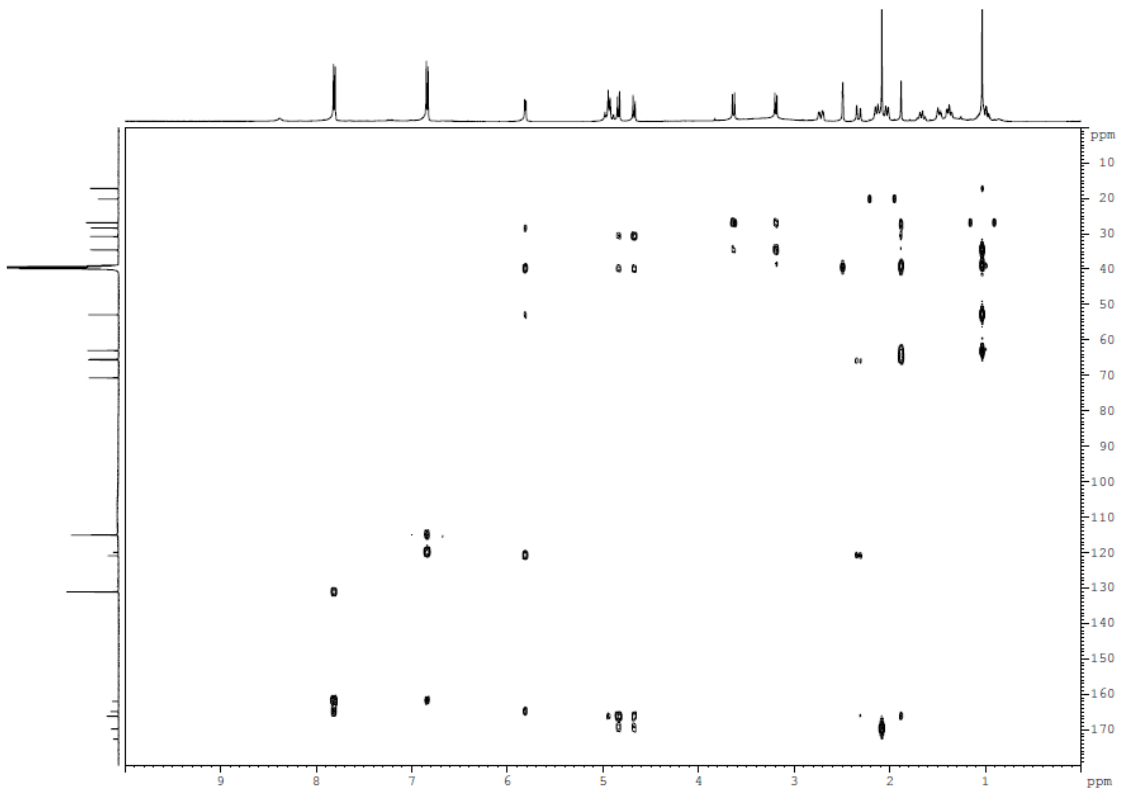
14-deacetyl astellolide A の HMBC spectra



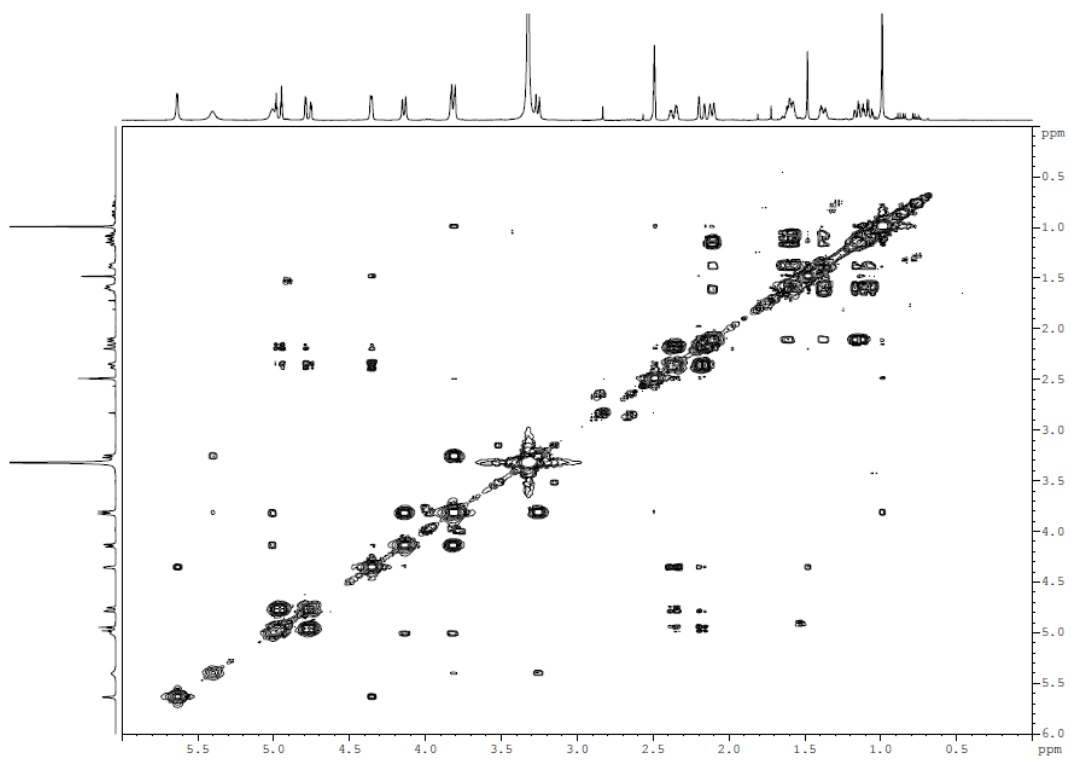
14-deacetyl astellolide B の COSY spectra



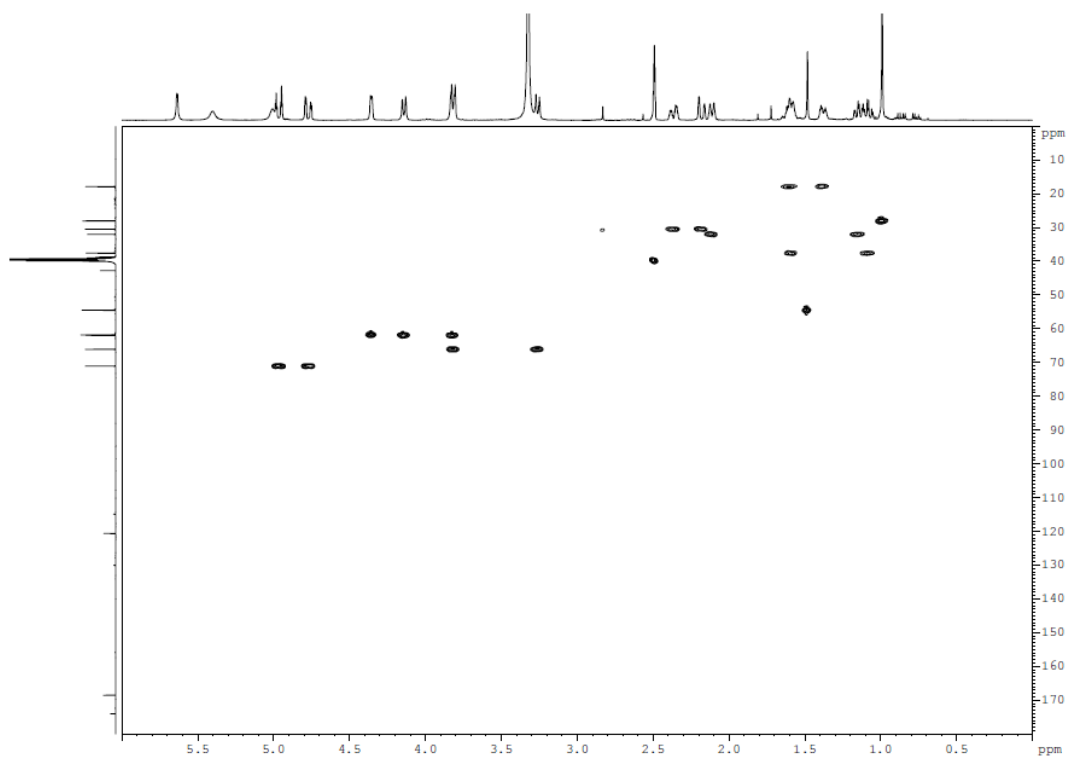
14-deacetyl astellolide B の HMQC spectra



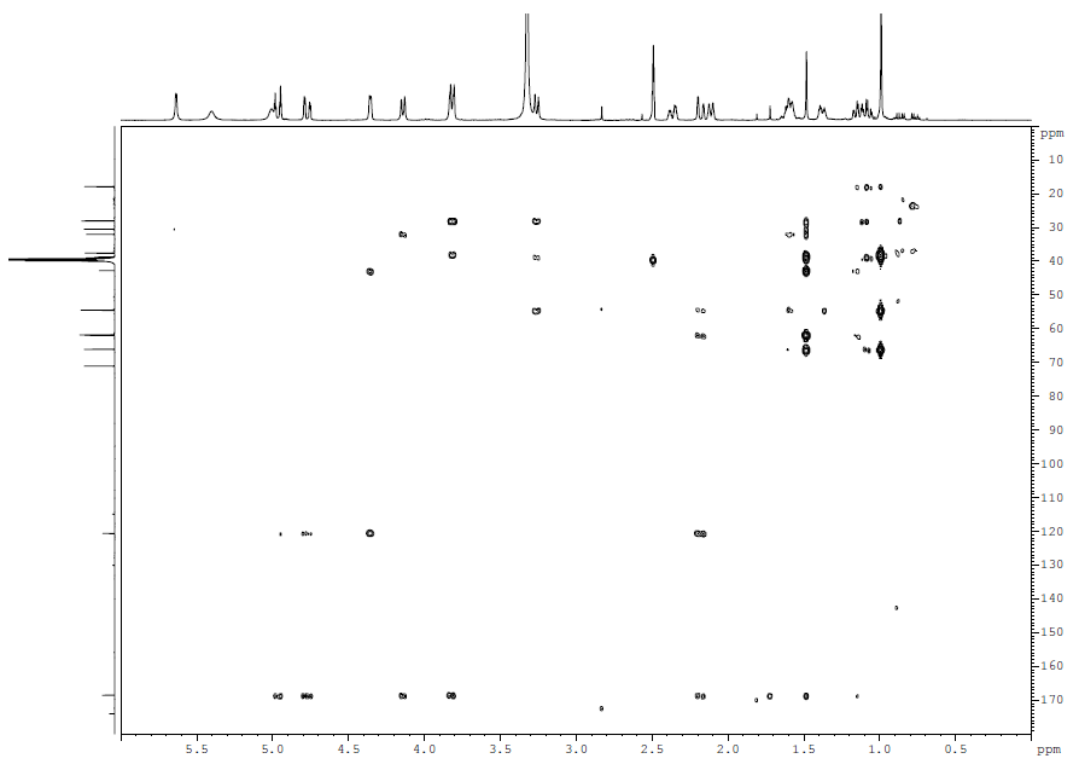
14-deacetyl astellolide B の HMBC spectra



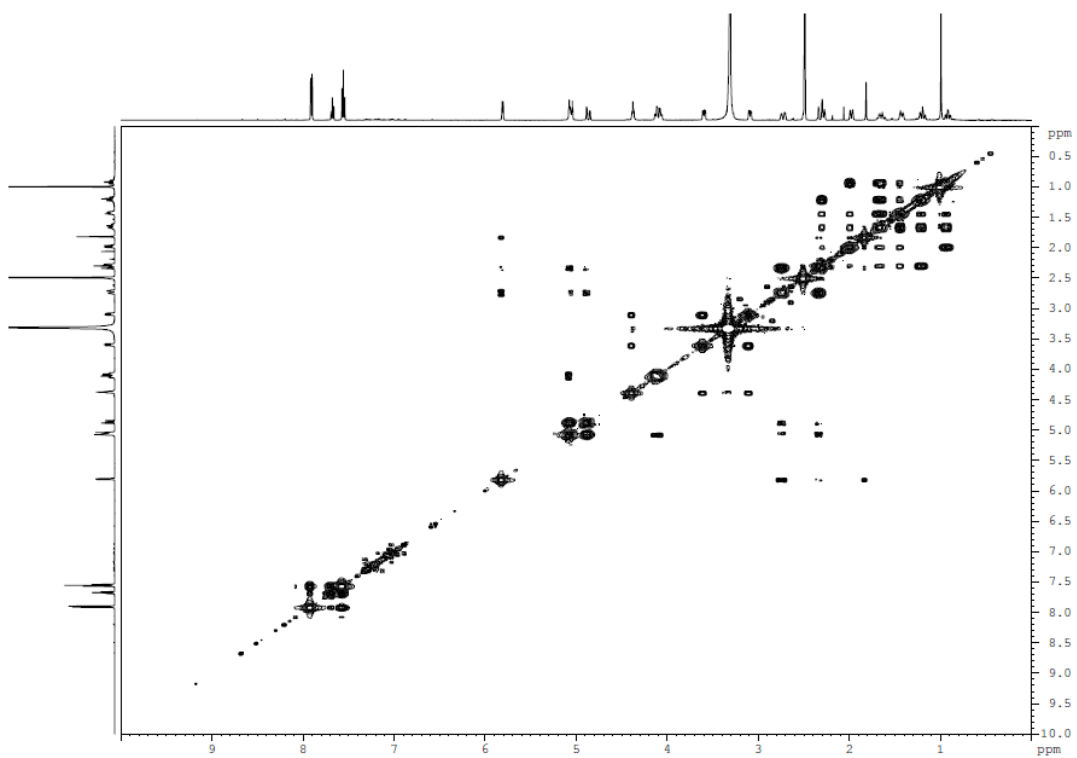
trihydroxy confertifolin の COSY spectra



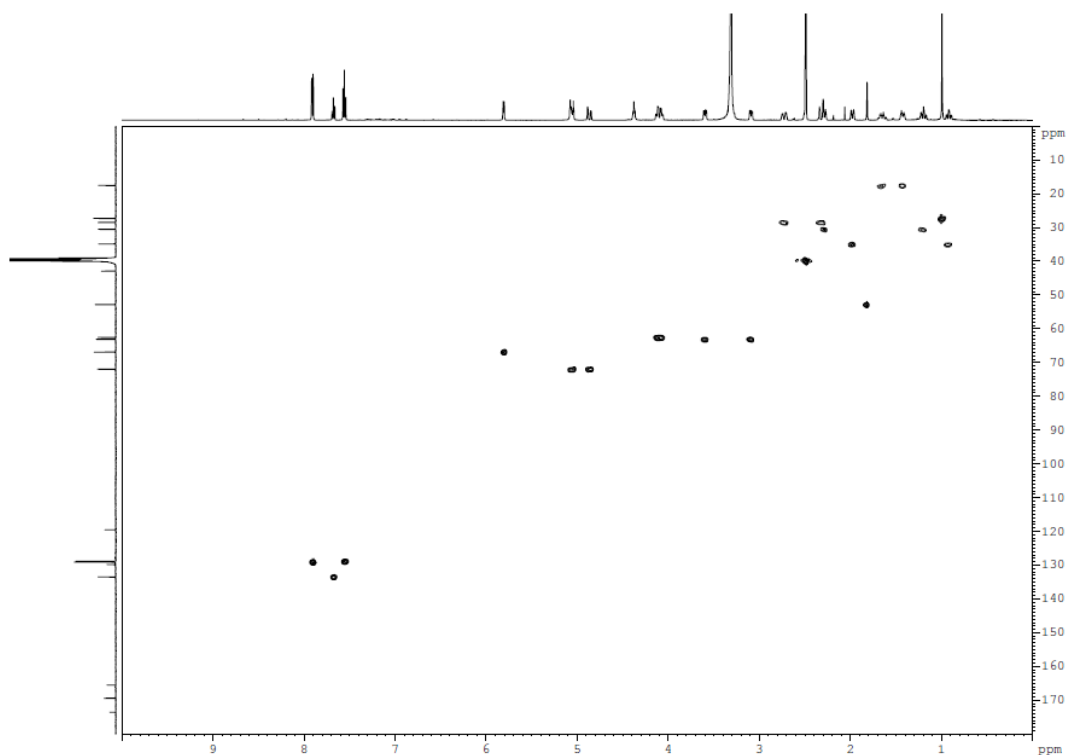
trihydroxy confertifolin の HMBC spectra



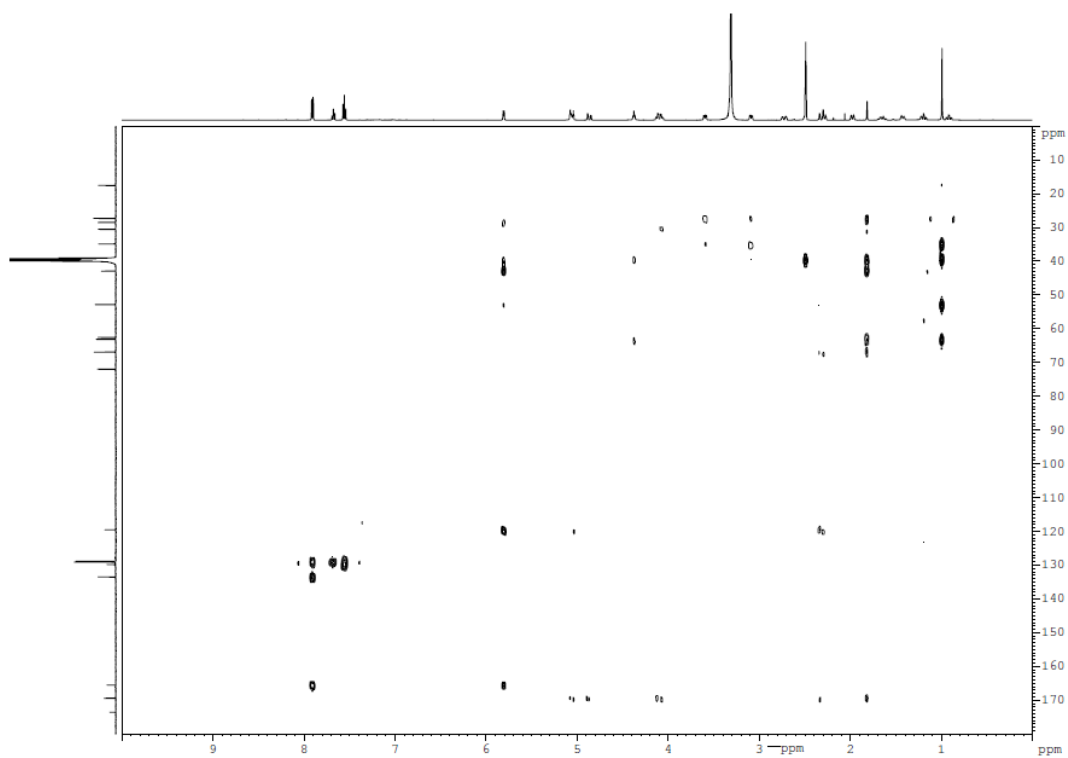
trihydroxy confertifolin の HMBC spectra



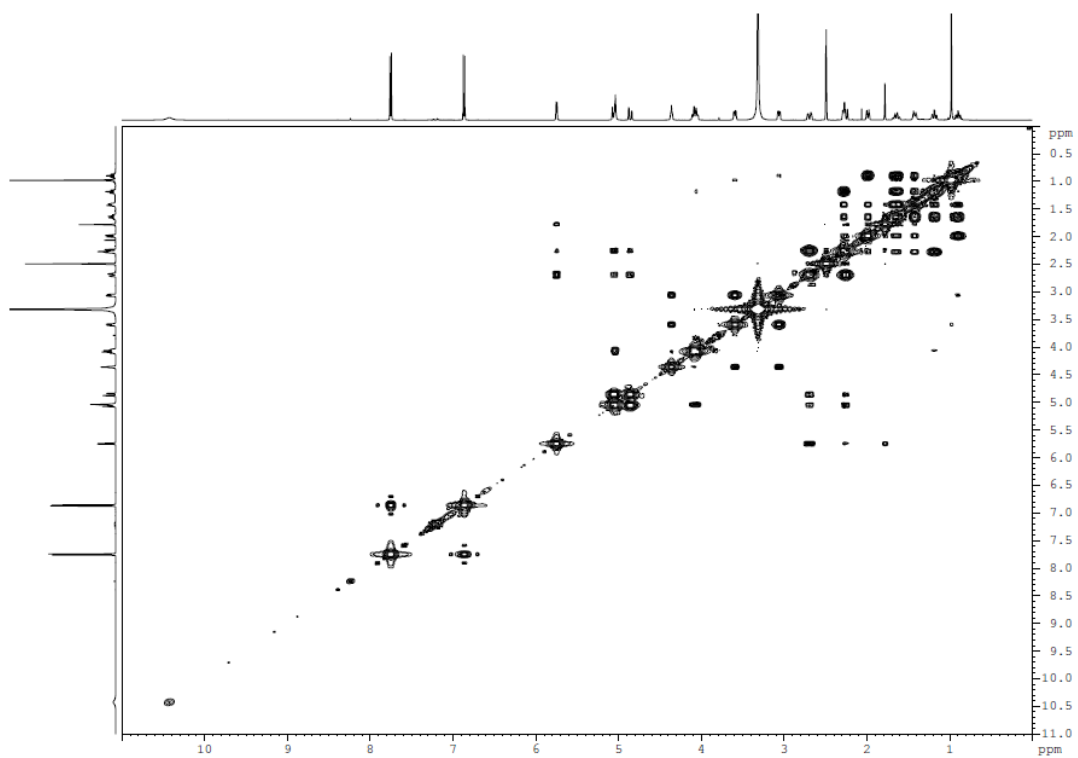
dideacetyl astellolide A の COSY spectra



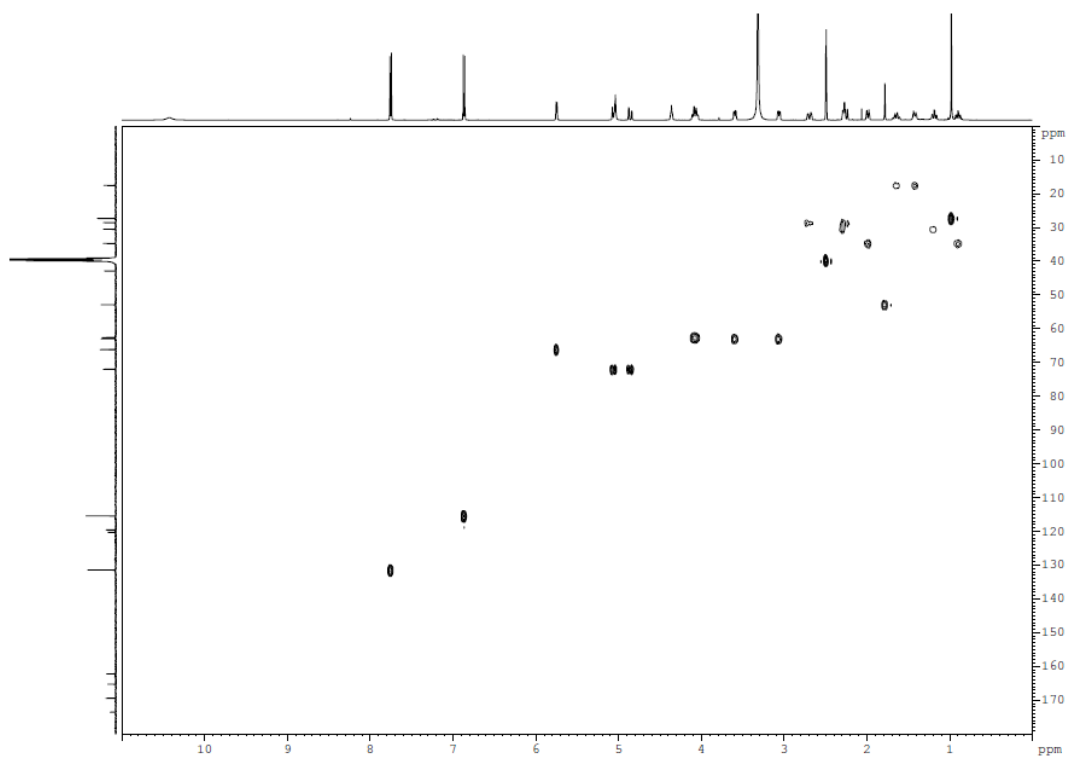
dideacetyl astellolide A の HMBC spectra



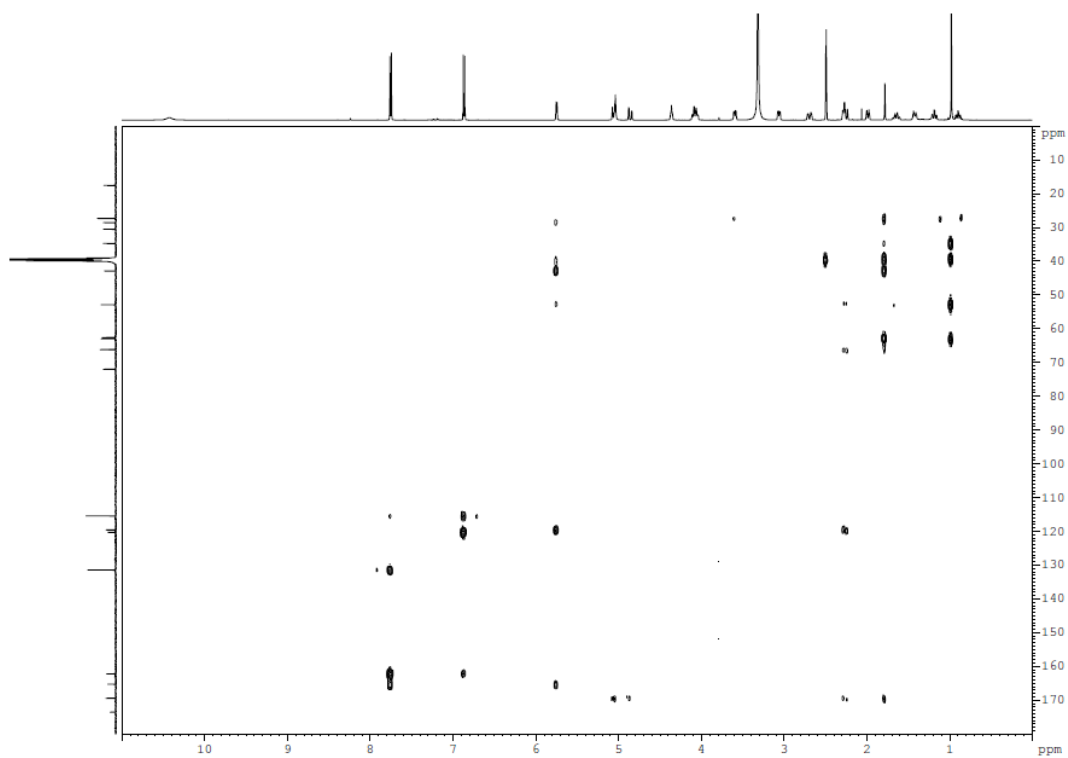
dideacetyl astellolide A の HMBC spectra



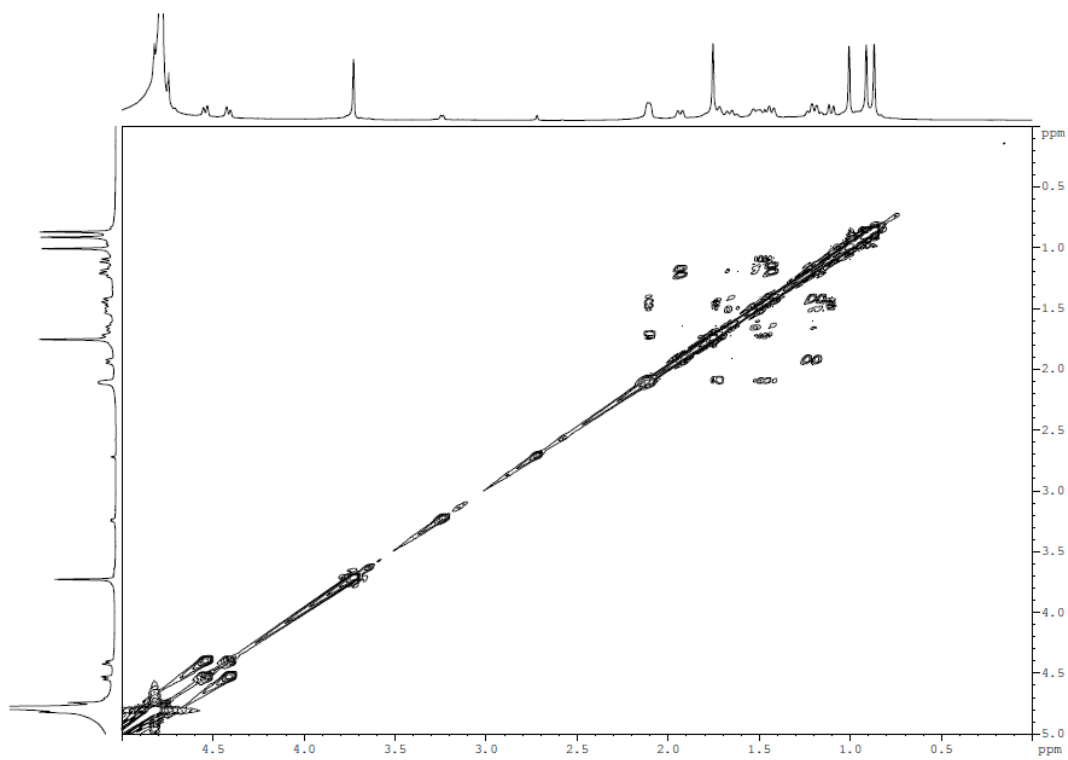
dideacetyl astellolide B の COSY spectra



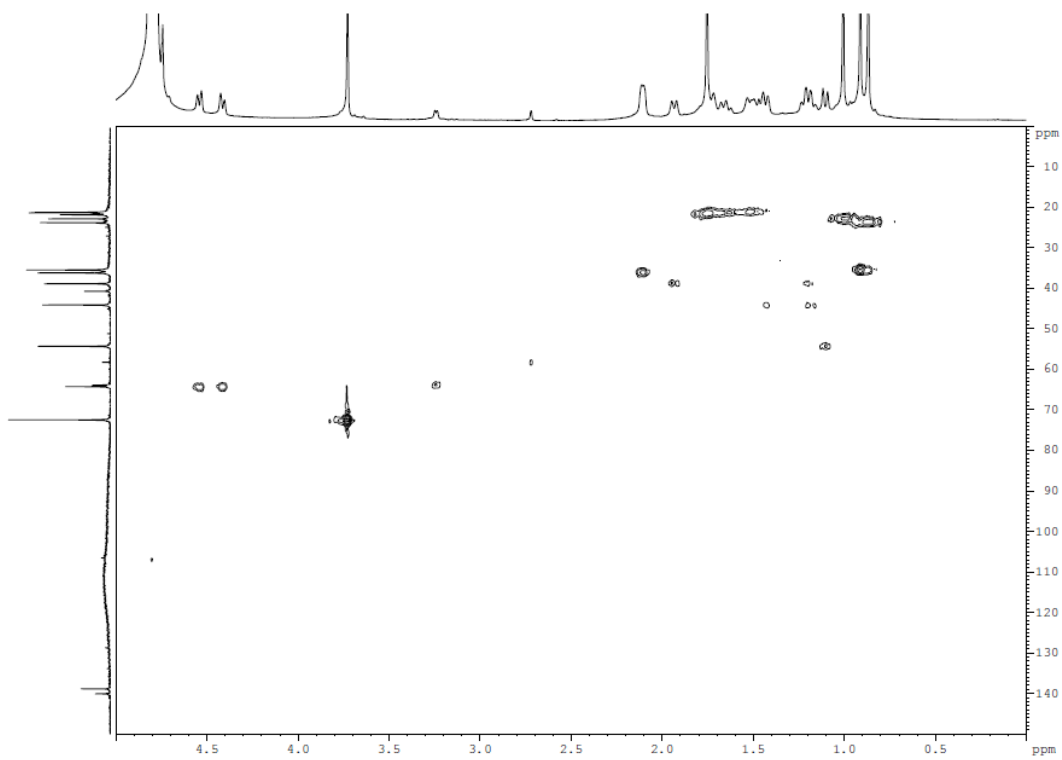
dideacetyl astellolide B の HMQC spectra



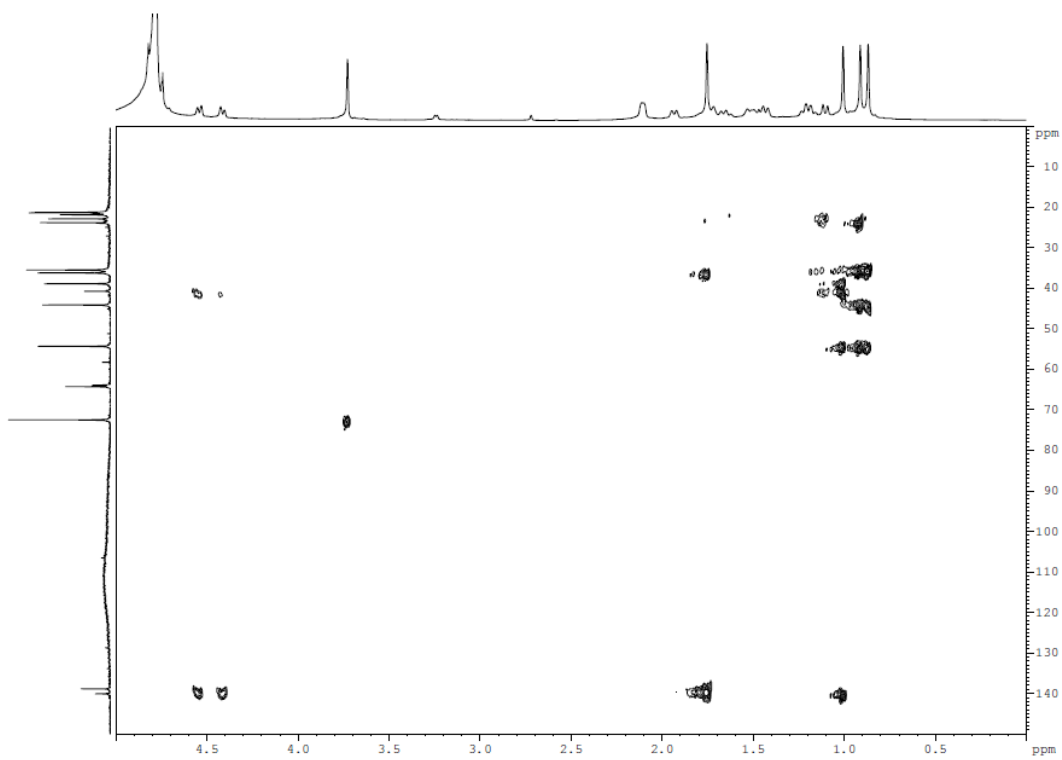
dideacetyl astellolide B の HMBC spectra



drimanyl pyrophosphate の COSY spectra



dimanyl pyrophosphate の HMQC spectra



dimanyl pyrophosphate の HMBC spectra

原著論文

Kato, N., Tokuoka, M., Shinohara, Y., Kawatani, M., Uramoto, M., Seshime, Y., Fujii, L., Kitamoto, K., Takahashi, T., Takahashi, S., Koyama, Y., and Osada, H. (2011). Genetic safeguard against mycotoxin cyclopiazonic acid production in *Aspergillus oryzae*. *ChemBioChem*, 12, 1376-1382.

Shinohara, Y., Tokuoka, M., and Koyama, Y. (2011). Functional analysis of the cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB 40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2249-2252.

Shinohara, Y., Kawatani, M., Futamura, Y., Osada, H., and Koyama, Y. (2016). An overproduction of astellolides induced by genetic disruption of chromatin-remodeling factors in *Aspergillus oryzae*. *J. Antibiot*, 69, 4-8.

Shinohara, Y., Takahashi, S., Osada, H., and Koyama, Y. (2016). Identification of a novel sesquiterpene biosynthetic machinery involved in astellolide biosynthesis. *Sci. Rep.*, 6, 32865; doi: 10.1038/srep32865

関連論文

Tokuoka, M., Kikuchi, T., Shinohara, Y., Koyama, A., Iio, S. I., Kubota, T., Kobayashic, J., Koyama, Y., Totsuka, A., Shindo, H., and Sato, K. (2015). Cyclopiazonic acid biosynthesis gene cluster gene *cpaM* is required for speradine A biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 2081-2085.

論文の内容の要旨

論文題名 麹菌 *Aspergillus oryzae* の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに関する研究

氏名 篠原 靖智

1. 背景

麹菌 *Aspergillus oryzae* は古くから醤油、味噌、日本酒などの日本の伝統的な発酵食品の生産に広く利用される醸造用微生物であり、長い年月をかけた育種により、二次代謝産物の生合成能の多くを喪失していると考えられてきた。しかし、近年のゲノム解析の結果から、*A. oryzae* が非常に多くの二次代謝産物の生合成遺伝子を保持していることが明らかにされ、このことから *A. oryzae* が潜在的には、多くの二次代謝産物の生合成能を有している可能性が示唆された。醸造における安全性という側面からも、有用生物活性物質の探索という側面からも *A. oryzae* の二次代謝産物研究は非常に重要である。しかしながら、分子生物学的なアプローチによる *A. oryzae* の二次代謝産物に関する研究は、アフラトキシンの例を除き、ほとんどなされていなかった。そこで、本研究では、*A. oryzae* が産生する二次代謝産物およびその生合成遺伝子に関する理解を深めることを目的に、一部の *A. oryzae* が産生することが知られているマイコトキシン cyclopiazonic acid (CPA) の生合成遺伝子クラスターの全容解明を試みるとともに、*A. oryzae* における二次代謝産物生合成制御に関与する遺伝子の探索を行った。また、検討の過程で見出した astellolides と呼ばれるセスキテルペンラクトンのアリアル酸エステル化合物の生合成遺伝子クラスターの同定およびその生合成経路の解明についても検討を行った。

2. CPA 生合成遺伝子クラスターの解析

CPA 産生菌である *A. oryzae* NBRC4177 株のゲノム情報から予測された推定 CPA 生合成遺伝子群の網羅的な破壊株を作製し、その代謝物を測定することで、CPA の生合成経路の解明を試みた。その結果、CPA の生合成に必須な 3 つの遺伝子(*cpaA*, *cpaD*, *cpaO*)を同定することに成功した。近縁種である *A. tamarii* および *A. flavus* に存在する CPA 生合成遺伝子クラスターとの比較、および *A. tamarii* の CpaM の機能解析から、*Aspergillus* 属の共通祖先では、5 つの酵素反応(CpaA、CpaD、CpaO、CpaH、CpaM)によって speradine A を最終産物とする生合成経路が形成されていたと考えられた。

そこから、*A. oryzae* では、*cpaM* が不活化され、毒性の最も低い化合物である 2-oxoCPA を最終産物として生合成するようになったと推測された。

3. 二次代謝産物生産制御に関与する転写因子の探索

A. oryzae の転写因子破壊株ライブラリーを用い、その代謝物プロファイルを解析することで、二次代謝産物の生産制御に関与する転写因子の同定を試みた。その結果、ヒストン 3 リジン 4 (H3K4) のメチル化に関与することが知られている *CclA* および *SppA* が二次代謝産物の生産制御に関与することを明らかにした。また、ウェスタンブロットにより H3K4 のメチル化状態を解析した結果、両遺伝子の破壊によりトリメチル化 H3K4 が著しく低下することを明らかにした。更に、*ccIA* の破壊によって顕著な産生量の増加を示した 2 つの化合物を単離精製し、この化合物が 14-deacetyl astellolide A および B であることを明らかにした。両化合物のガン細胞増殖抑制活性を検討したところ、14-deacetyl astellolide A は活性を示さなかったものの 14-deacetyl astellolide B は試験に供した全ての細胞種の増殖を抑制した。

4. astellolide 生合成遺伝子クラスターの同定

次に astellolide 生合成遺伝子クラスターの同定を試みた。マイクロアレイ解析並びに qRT-PCR 解析により、*ccIA* 破壊株で顕著に発現量が増加している二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを見出した。このクラスターが astellolide の生合成に関与していると考え、発現量の増加を示した 13 遺伝子を破壊し解析を行うこととした。astellolides 高生産条件下で解析を行うため、*ccIA* 破壊バックグラウンドで上記の遺伝子群を破壊した 2 重破壊株を作製し、代謝物解析を行った。その結果、7 遺伝子の破壊株で 14-deacetyl astellolide A および B の産生が消失した。一方、破壊した 13 遺伝子の内、染色体上の両端にコードされている 2 つの遺伝子破壊株では、両化合物の産生量に変化は見られなかった。以上の結果から、両端にコードされた 2 遺伝子を除く 11 遺伝子が astellolide 生合成遺伝子クラスターであると推定し、それぞれ *astA* から *astK* と命名した。更に、non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) をコードすると予測された *astA* の破壊株で蓄積が見られた 1 化合物、transferase をコードすると予測された *astG* の破壊株で蓄積が見られた 2 化合物を、それぞれ単離精製し構造解析を行った。その結果、*astA* 破壊株で蓄積が見られた化合物は、confertifolin と呼ばれるセスキテルペンラクトンの 6 位、14 位、15 位が水酸化された新規誘導体(trihydroxy confertifolin)であることが明らかとなった。また、*astG* の破壊株で蓄積が見られた 2 化合物は、それぞれ 14-deacetyl astellolide A および B の 15 位がアセチル修飾を受けていない化合物(dideacetyl astellolide A および B)であることが明らかになった。

5. 新奇セスキテルペン生合成経路の発見

同定した astellolide 生合成遺伝子クラスターには、既知のテルペン環化酵素と相同性を示す遺伝子は存在しない。しかし、astellolides の基本骨格がドリマン型のセスキ

テルペンであることから、本クラスターに未知のセスキテルペン環化酵素がコードされている可能性を考え、その同定を試みた。破壊株の解析結果から、**astellolides** 生合成系の上流の生合成に関与する可能性が示唆された **AstC** は、テルペン環化酵素が保存することが知られている機能ドメイン(**DxDTT** モチーフ)を保持していた。このことから、**AstC** にテルペン環化活性があるのではないかと考え、組換え酵素を用いた機能解析を行った。その結果、**AstC** は脱リン酸化を伴わずに **FPP** を環化する活性を有し、**drimanyl pyrophosphate** の生合成に関与することを見出した。この結果から、クラスターには **drimanyl pyrophosphate** の脱リン酸化に関与する遺伝子がコードされていると考え、次に、この脱リン酸化酵素の同定を試みた。本クラスターには、脱リン酸化反応に関与している可能性が考えられる **haloacid dehalogenase (HAD)-like hydrolase** をコードすると予測された遺伝子が 2 つ(**astI** および **astK**)存在することから、これらについて、同様に組換え酵素を用いた機能解析を行った。その結果、**AstI** および **AstK** は **drimanyl pyrophosphate** の段階的な脱リン酸化を触媒し、**drim-8-ene-11-ol** の生合成に関与していることを明らかにした。

6. NRPS (**AstA**)の機能解析

遺伝子破壊株の解析結果から **NRPS** と予測された **AstA** がアリアル酸のエステル結合に関与している可能性が示唆されたことから、組換え酵素を用いた検証を行った。その結果、推定通り **AstA** は安息香酸やパラヒドロキシ安息香酸などのアリアル酸とセスキテルペンラクトン(**trihydroxy confertifolin**)のエステル結合を触媒し、**dideacetyl astellolide A** および **B** の生合成に関与していることを明らかにした。

本研究では、**CPA** 生合成遺伝子クラスターの解析を通し、**A. oryzae** が **CPA** 生合成における遺伝的セーフガードとして **CPA** 弱毒化遺伝子を保持することを明らかにし、改めて麹菌 **A. oryzae** の安全性を示した。また、**A. oryzae** の二次代謝産物産生制御に関与する遺伝子を明らかにするとともに、その制御下にある **astellolide** 生合成遺伝子クラスターの解析から新奇セスキテルペン生合成経路の存在を明らかにした。本研究での成果が、安全な産業利用、有用化合物および酵素の探索の両面から、今後の **A. oryzae** の二次代謝産物研究の一助になることを期待する。

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始ご指導・ご助言を頂きました東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究室の西山真教授に心より感謝申し上げます。

理化学研究所環境資源科学研究センターケミカルバイオロジー研究グループの長田裕之博士には、本研究の開始時から実験にご協力いただき、多大なるご指導と有益なご助言を賜りました。深く感謝申し上げます。また、二次代謝産物の生合成研究について門外漢であった著者に、懇切丁寧なご指導して下さるとともに、研究の方向性に関する多大なるご助言をいただきました同研究グループの高橋俊二博士並びに加藤直樹博士、化合物の構造解析および生物活性測定にご尽力頂くとともに有意義なご助言を下された川谷誠博士並びに二村友史博士、同研究グループの皆様に深く感謝申し上げます。

Speradine A の標準品を快くご提供下さった北海道大学の小林淳一先生並びに久保田高明先生(現：昭和薬科大学薬学部教授)、**A. tamarii** の解析にご尽力下さった東京農業大学応用生物科学部醸造科学科醸造技術分野酒類生産科学研究室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

微生物研究に関する知識を全く持たなかった著者に本研究テーマに挑戦する機会を与えて下さったキッコーマン株式会社常務執行役員 松山旭博士に深く感謝致します。また、その著者を温かく迎え入れ、多大なご指導とご助力を賜りました(公財)野田産業科学研究所の小山泰二博士に深く感謝申し上げます。微生物の取り扱いから細かくご指導下さいました松島健一郎博士、高橋理博士をはじめ同研究所の皆様に、厚く御礼を申し上げます。徳岡昌文博士(現：東京農業大学助教)には、本研究を行うきっかけを与えて頂くとともに、本論文をまとめるに当たり様々なご協力を頂きました。ここに深く感謝致します。

最後に、常に暖かく見守ってくれた両親、心身ともに支えてくれた妻と息子に心より感謝いたします。

2016年12月
篠原 靖智