

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。