

日本—中国 国際共同研究「第2回生物遺伝資源分野」 ～植物—微生物共生系、微生物叢の機能と制御に着目した基盤技術の創出～ 平成29年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	植物共生菌相互作用の包括的利用による二次代謝産物の網羅的解析
研究課題名（英文）	Exploitation of the cryptic secondary metabolites from plant microbiome through biological interaction
日本側研究代表者氏名	阿部 郁朗
所属・役職	東京大学 大学院薬学系研究科・教授
研究期間	平成29年12月 1日～平成33年 3月31日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
阿部 郁朗	東京大学大学院・薬学系研究科・教授	研究全般
淡川 孝義	東京大学大学院・薬学系研究科・助教	遺伝子発現系の構築、化合物単離

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

生合成研究の例として、糸状菌ゲノムに存在するステロイド系抗生物質、メロテルペノイド化合物の生合成遺伝子の発現系の構築を試みる。それぞれの生合成遺伝子を糸状菌 *Aspergillus oryzae* ホストにて異種発現し、蓄積する中間体を構造決定することで、生合成経路の全容解明と中間体の取得を行う。最終的には、ヘルポール酸生産系の構築を目指す。また、得られた化合物の活性評価を行い、天然物をしのぐ抗菌活性を持つものが存在するか試験する。興味深い生合成酵素については *in vitro* 反応を行い、その活性と基質特異性を評価する。本研究計画によって、次年度以降にスムーズに生合成研究を行うための基盤を築く。

医薬品の原料やモデル骨格として、天然から単離される化合物は重要である。世界初の抗生物質である penicillin に知られるように、微生物から単離される天然化合物は医薬品資源として特に重要な位置を占める。これらは酵素によって合成されるが、その酵素反応を明らかにし、利用することで、通常合成が困難な化合物でも容易に取得することが可能となる。本計画では、糸状菌(=カビ)の生合成酵素をコードする遺伝子を、コウジカビに発現し、そ

ここでできる化合物を取得することで、酵素反応を明らかにする。このような遺伝子発現生物系を用いることで、容易に他の生合成経路との組み合わせや、非天然型基質の投与による新規化合物生産が可能になる。今後、生物相互作用を用いた物質生産で得られた化合物の生合成を行い、それらの生合成の知見を元に物質生産研究を行うことで、天然から得られる化合物の骨格多様性を人為的に増幅することを目指す。

3. 日本側研究チームの実施概要

今後、植物-微生物共生系、微生物叢の機能を制御する化合物を研究していく上で、ゲノム情報から、そこにコードされる酵素、酵素産物である二次代謝産物を繋げる生合成研究は非常に重要となる。

今年度は、その準備段階として、糸状菌ゲノムに存在するステロイド系抗生物質、メロテルペノイド化合物の生合成遺伝子の異種発現系の構築を試みた。それぞれの生合成遺伝子を麹菌ホストにて異種発現し、蓄積する中間体を構造決定することで、生合成経路の全容解明と中間体の取得を行った。まず、翻訳過程を阻害することで、抗細菌活性を示すストロイド系抗生物質であるヘルボール酸の生合成に関わる遺伝子群に注目し、それらを糸状菌ホストで異種発現することで、オキシドスクアレンからヘルボール酸に至る9つの生合成ステップの全てを明らかにし、それぞれの中間体を単離することで、非天然型の抗生物質を取得することに成功した。その中には、ヘルボール酸よりも高い抗ブドウ球菌活性を持つ中間体が存在することを明らかにし、ステロイドのA、B環の構造が活性に寄与することを示した。さらに、研究の過程で、P-450酸化酵素と還元酵素が協奏的に働くことで、4位の脱メチル化を行う新規な生合成経路を示すことに成功した。次に、脂質異常症治療薬である pyripyropene A を含む生理活性物質の宝庫である、メロテルペノイドの一種であるアスコクロリンの生合成遺伝子を同定し、それぞれ糸状菌ホストで異種発現することで、そのポリケタイド骨格合成、テルペン転移、酸化、テルペン環化までの生合成反応の解明を行った。続いて、シトクロム P450 酸化酵素である AscG, フラビン結合型ハロゲン化酵素 AscD を共発現し、それぞれ AscG を脱水素酵素、AscD を芳香環ハロゲン化に関わる酵素であると同定した。また AscE、AscF 酵素の *in vitro* 反応を行い、その反応に関する酵素学的知見を取得した。

本研究を通して、糸状菌の生合成遺伝子を異種発現に用いた活性物質生産系の構築が達成され、その物質生産ポテンシャルを最大限に生かし、植物-微生物共生系における生物相互作用の探索、その二次代謝産物の生合成的手法による供給へとつなげるための基盤技術が構築された。