

糸状菌ゲノムの酵母を宿主とした発現によるペプチド系抗生物質の合成

Genetic indoctrination of yeast for innovative drug discovery

- 石川格靖、恒松雄太、杉本覚、石内勘一郎、守屋央朗¹、野口博司、渡辺賢二（静岡県大・薬、¹岡山大学・コア）
- Noriyasu Ishikawa, Yuta Tsunematsu, Satoru Sugimoto, Ishiuchi Kan'ichirou, Hisao Moriya¹, Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, ¹Research core for interdisciplinary sciences, Okayama University)

【目的】糸状菌が生産する二次代謝産物にはpenicillinやcyclosporineのように臨床的に重要な化合物が多い。糸状菌由来天然物は依然有力な生物活性物質候補であるが、最近では単離容易な化合物はほぼ取り尽くされ、新規化合物の獲得が困難になってきている。しかし、糸状菌のゲノム上には、天然物の生合成酵素はコードされているが合成産物を確認することのできない遺伝子群が多数存在すると考えられている。そこで本研究では、糸状菌が持つ潜在的な二次代謝産物の生合成能力を異種発現させ、これまでに単離されていない分子の創製法を確立することを試みた。

【方法】糸状菌由来の非リボソーム依存型ペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthase, NRPS）は巨大な酵素であるため完全長cDNAを自由に発現するシステムの構築には困難を伴う。そこで、非翻訳領域であるイントロンを効率よく削除する方法を開発した。まず、糸状菌である *Aspergillus fumigatus* のゲノム上においてNRPSをコードしているAfu6g12080¹⁾の全エクソン配列をPCR法によって増幅した。得られたエクソン配列とベクターを酵母に導入すると、相同組換えによって目的のエクソン配列が挿入された発現ベクターが一挙に構築された。これはスプライソソームに依存すること無く、効率的にイントロンを取り除き読み枠を構築するものであった。続いて作成したベクターをNRPSの活性化に必要な *Aspergillus nidulans* 由来 *npgA* を導入した酵母細胞中で発現誘導を行うと培養液から新規代謝産物の生産を確認した。各種クロマトグラフィを用いて合成産物を単離し、化合物の化学構造を決定した。

【結果】酵母に導入されたNRPS遺伝子を発現させた後、ウエスタンブロッティングによって酵素へ翻訳されていることを確認した。さらに、得られた化合物について各種スペクトル解析および分解反応を行って化学構造を決定した。また、2つある不斉点に関してはMarfey法により絶対立体配置を決定した。その結果、抗腫瘍性抗生物質fumiquinazoline Fと類似の骨格構造を有した新規化合物7-hydroxyfumiquinazoline Fであると決定した。

【考察】本方法では一般的な培養では発現しない遺伝子を強制的に

発現させて化合物を獲得する。新規骨格を形成するNRPS遺伝子やポリケタイド合成酵素遺伝子の他に、様々な修飾遺伝子を導入することで種々の新規化合物の生産を期待できる。

【文献】1) Ames, B. D. *et al. Biochemistry*. **2010**, 49, 8564.

