



2023年2月27日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

糸状菌から新たなフラボノイド生合成システムを発見 糸状菌カルコン合成酵素およびカルコン異性化酵素の発見

【発表のポイント】

- ゲノムマイニングにより糸状菌からカルコン合成酵素およびカルコン異性化酵素を発見した。
- 植物のカルコン生合成とは異なる第二のカルコン生合成システムを発見した。
- 糸状菌を宿主としたフラボノイド生産プラットフォームを構築した。

【概要】

カルコンは、植物天然物でもっとも重要なグループの一つであるフラボノイドの生合成前駆体です。カルコン生合成はこれまでに広く研究されていますが、カルコン合成酵素として知られているのは III 型ポリケタイド合成酵素に属する酵素だけでした。これらは植物や藻類に普遍的に存在しており、このことは天然物化学のどの教科書にも記載されています。

糸状菌のゲノム上には膨大かつ多様な天然物生合成に関わる遺伝子が存在しており、これらは新しい天然物や生合成システム発見の有望な資源です。東北大学大学院薬学研究科の浅井禎吾教授の研究グループは、糸状菌の遺伝子資源からユニークな天然物や生合成システムを探索する過程で、糸状菌から新たなカルコン合成酵素を発見しました。加えて、カルコンからフラバノンへの立体選択的な環化を触媒するカルコン異性化酵素も糸状菌から初めて発見しました。さらに、これらの成果に基づき、麹菌を宿主としたフラボノイド類の生産プラットフォームを構築しました。

この成果は、植物とは異なる新たなフラボノイド生合成システムの発見であり、天然物化学分野に一石を投じるものです。また本研究で構築した糸状菌を宿主とするフラボノイド生産プラットフォームは、医薬資源としても重要なフラボノイド類の合成生物学研究の基盤になり得るものであり、今後の創薬研究の展開も期待されます。

本研究の成果は、2023年2月10日付で米国科学雑誌 *Journal of Natural Products* にオンライン掲載されました。

【詳細な説明】

カルコンは、植物の天然物の中で最も重要な化合物群の一つであるフラボノイド (注1)の前駆体です。カルコンの生合成が、III型ポリケタイド合成酵素 (注2)の一種であるカルコン合成酵素 (CHS) によって触媒されることは、いずれの天然物化学の教科書にも記載されている良く知られた事実であり、この生合成システムは植物や藻類に普遍的に保存されています。1983年に初めてカルコン合成酵素遺伝子が同定されて以来、これまで発見されてきた CHS は全て III型ポリケタイド合成酵素であり、このシステムが唯一のカルコン生合成システムだと理解されてきました。

糸状菌、いわゆるカビのゲノム上には、膨大な数の天然物生合成に関わる遺伝子が存在し、それらは新たな天然物や生合成システムの宝庫です。今回、東北大学大学院薬学研究科浅井禎吾教授の研究グループは、糸状菌の遺伝子資源からユニークなポリケタイド合成酵素 (PKS) の発見を目的としてゲノムマイニング (注3)を行いました。探索の結果、高還元型 PKS (HR-PKS) の N 末端に Aドメインと Tドメイン (注4)が融合した非典型的な PKS 遺伝子を *Discosia* 属糸状菌のゲノム上に発見し、これを *diapA* と名付けました (図 1)。糸状菌における異種発現の汎用宿主である麴菌を利用して *diapA* の機能解析を実施した結果、驚くべきことに、DiapA がナリンゲニンカルコンを合成することが明らかとなりました (図 1)。植物 CHS の反応では、*p*-クマロイル CoA などのフェニルプロパノイド (注5)の CoA エステル体が開始基質となりカルコンが合成されますが、今回発見した DiapA は開始基質として *p*-ヒドロキシ安息香酸を利用する点で異なっていました (図 1)。また植物の CHS が KSドメイン (注6)のみで構成されるのに対し、DiapA は複数のドメインで構成される HR-PKS であり、この点でも違いが見られました。各ドメインの機能についても解析を進め、C 末端の TEドメイン (注7)が環化反応を触媒することをアミノ酸変異実験により示しました。さらに、AlphaFold2 (注8)を用いた構造予測と酵素反応中間体構造を用いたドッキングシミュレーションにより環化反応に重要な役割を果たすアミノ酸残基の特定にも成功しました (図 2)。

DiapA とのアミノ酸配列相同性を指標として探索したところ、様々な糸状菌のゲノム上に DiapA の類縁酵素遺伝子が存在することが明らかになりました。それらの中には、糸状菌由来のフラボノイドであるクロロフラボニンの生合成に関わることが推測されていた PKS 遺伝子 *cfvA* も含まれていました。DiapA と同様に麴菌発現系を利用して解析した結果、CfvA もカルコンを合成することがわかりました。さらに興味深いことに、*cfvA* の近傍に存在する *cfvF* がカルコンを立体選択的に(2*S*)-フラバノンへと変換する カルコン異性化酵素 (CHI) (注9)遺伝子であることがわかりました (図 3)。(2*S*)-フラバノンはフラボノイド類に共通の中間体として知られています。CHI は植物と細菌で知られていますが、それぞれアミノ酸配列や立体構造が異なります。CfvF は細菌型の CHI とわずかに類似性を示す新規酵素で、糸状菌における CHI の初めての例だと考えられます。本研究によって、糸状菌が植物とは異なるタイプの CHS と CHI を使う新たな経路でフラボノイドの骨格を作ることが明らかになりました。

フラボノイド類は植物に普遍的に存在し、生存や環境への適応などに重要な天然物です。また、抗ウイルス活性をはじめとして多種多様な生物活性を示す化合物が数多く知られているため、重要な医薬資源であるともいえます。それゆえ、有用希少もしくは新規フラボノイドの創製を指向した合成生物学研究が盛んに行われています。麴菌は糸状菌における汎用ホストであり、物質生産能に優れた宿主です。膨大に存在する糸状菌生合成関連遺伝子を麴菌内で発現することで、天然には存在しない化合物を含めて多様な分子創製の実現が期待できます。そこで、麴菌を用いたフラボノイド類の合成生物学に基づく分子創製を目指し、フラボノイド類の共通中間体である (2S)-ナリンゲニンの生産系の構築を実施しました。麴菌には *p*-クマル酸から DiapA の基質である *p*-ヒドロキシ安息香酸への分解系が存在します。このことを利用して、L-チロシンから *p*-クマル酸への変換を触媒する酵母由来のチロシンアンモニアリアーゼ (TAL) を発現することで細胞内で *p*-クマル酸を供給しました。ここに DiapA と植物由来の CHI を共発現することで、麴菌を用いた (2S)-ナリンゲニンの生産を達成しました (図 4)。

本研究では、糸状菌遺伝子資源を材料としたゲノムマイニングにより、新たな CHS および CHI を発見しました。特に、糸状菌 CHS は、植物の酵素とは異なる特徴を備えた新しいタイプのカルコン生合成システムといえます。さらに、今回発見したカルコン生合成系を利用して、麴菌を宿主としたフラボノイド類の合成生物学研究のプラットフォーム構築に成功しました。今後、本研究成果に基づき、新たな糸状菌フラボノイド類の発見や合成生物学を基盤とした多様なフラボノイド類の創製が実現され、新たな医薬シーズの開発に貢献することが期待されます。

本研究は、文部科学省研究費補助金 (JP22H02775, JP22K19095, JP21H04791, 21H05113)、日本医療研究開発機構 (AMED) (JP20wm0325003, JP22gm1610007, JP22am121038, JP22ama121040)、JST 創発的研究支援事業 (JPMJFR205W, JPMJFR215T) の助成を受けたものです。

【発表論文】

雑誌名: *Journal of Natural Products*

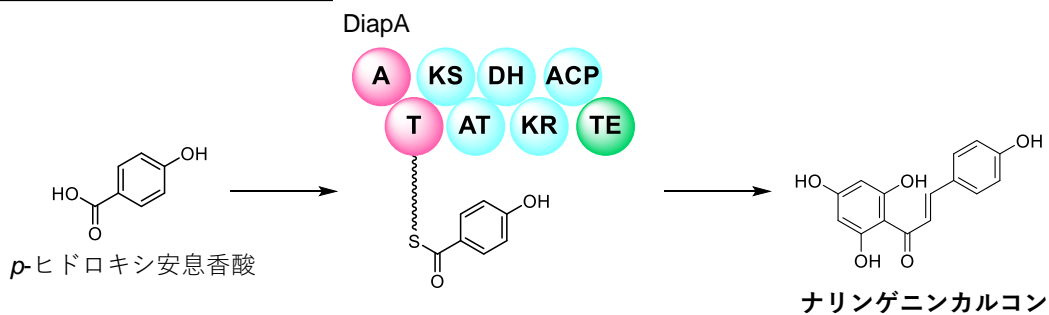
論文タイトル: Identification and Functional Characterization of Fungal Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase.

著者: Sho Furumura, Taro Ozaki, Akihiro Sugawara, Yohei Morishita, Kento Tsukada, Tatsuya Ikuta, Asuka Inoue, Teigo Asai*.

*責任著者

DOI: doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c01027

糸状菌のカルコン合成



植物のカルコン合成

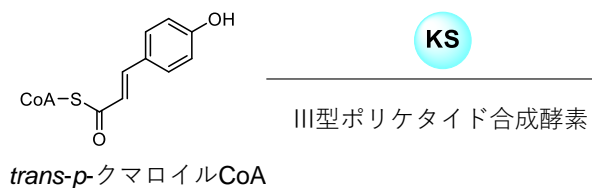
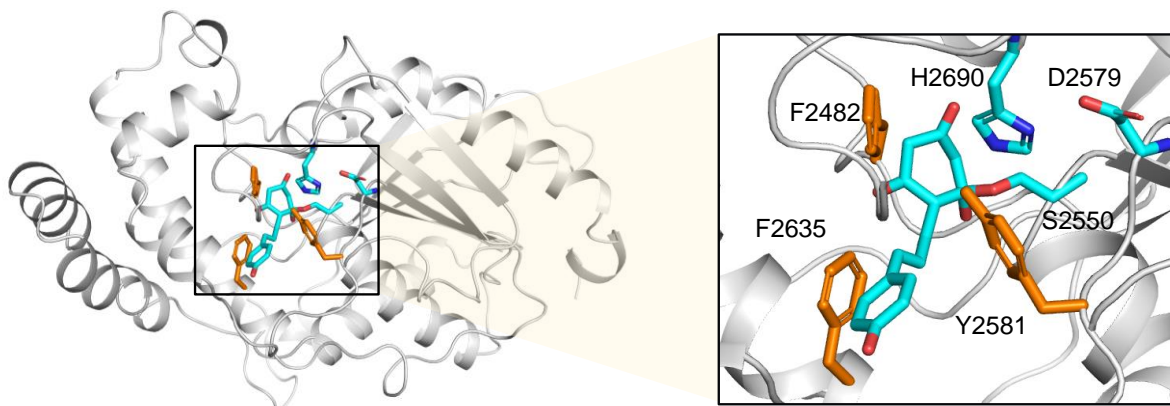


図 1. 今回発見した糸状菌におけるカルコン合成と、植物におけるカルコン合成の比較



活性中心付近の様子

図 2. 糸状菌カルコン合成酵素の TE ドメインのモデル構造と推定反応中間体とのドッキングシミュレーション

クロロフラボニン生成遺伝子群

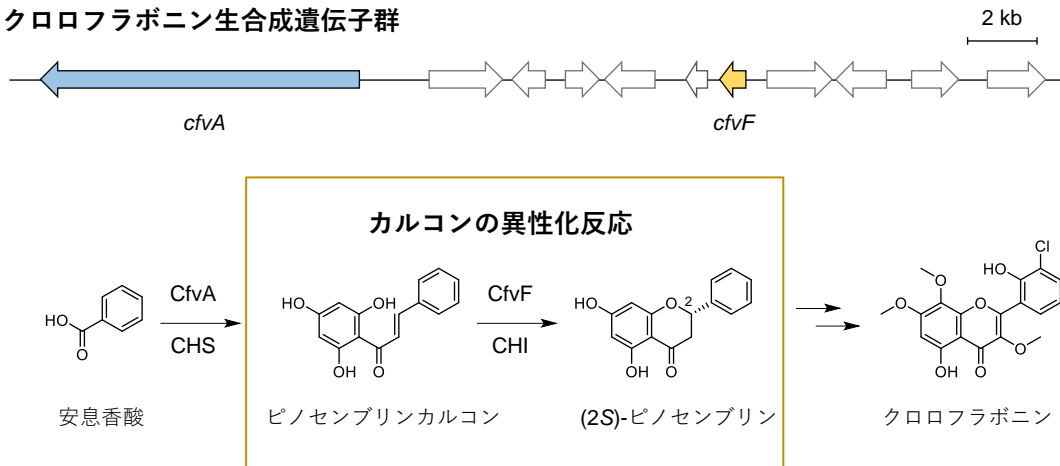


図 3. クロロフラボニン生成遺伝子群とカルコン異性化反応

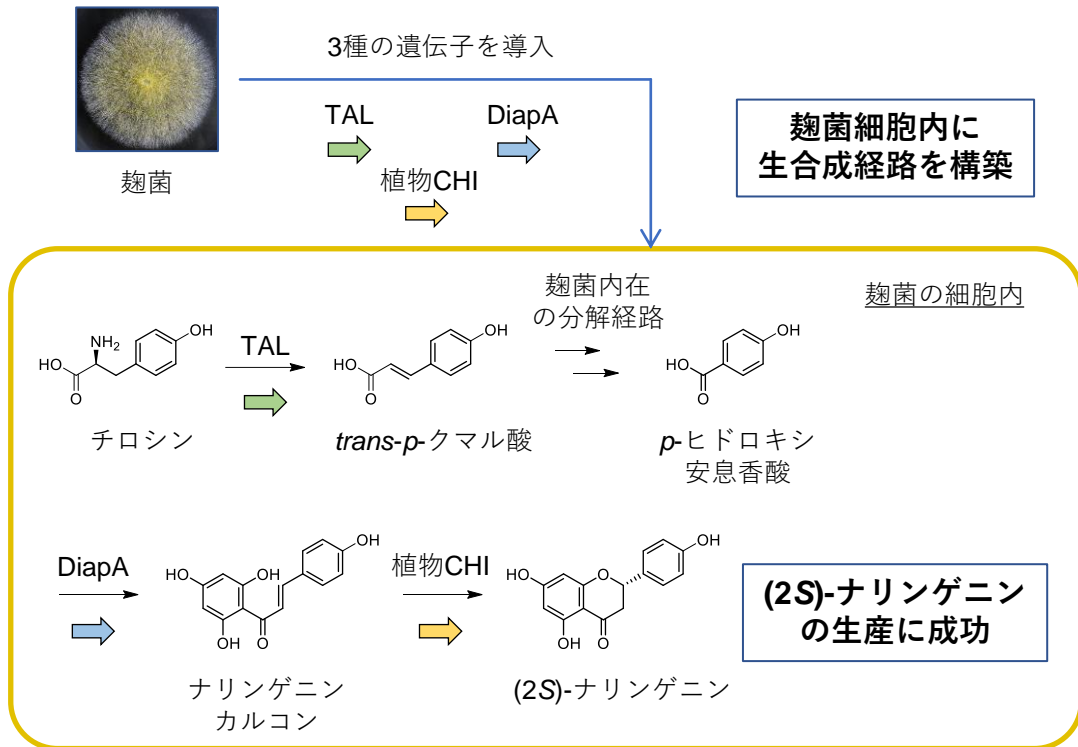


図 4. 麹菌を宿主とする(2S)-ナリンゲニン生産系の構築

【用語解説】

注 1) フラボノイド : 植物が作る芳香族化合物の主要なグループの一つ。抗ウイルスや抗炎症をはじめとして様々な生物活性が知られている重要な化合物群である。

注 2) III 型ポリケタイド合成酵素 : ポリケタイド合成酵素の一種で、炭素鎖の伸長を触媒する KS ドメインのみで構成される。開始基質と酢酸に由来する C₂ 単位を繰り返し縮合することで炭素骨格を構築する。フラボノイドをはじめとする様々なポリケタイド系天然物の生合成にかかわる酵素群である。

注 3) ゲノムマイニング : 生合成研究の情報をもとに、目的の生合成遺伝子をデータベースなどの遺伝子情報から探索する方法。生合成研究の飛躍的な発展により、遺伝子情報からある程度生産される化合物の特徴が予想できるようになった。一方で、未開拓な生合成遺伝子が豊富に存在することも明らかとなり、新規天然化合物が数多くゲノム上に隠されていることもわかってきた。

注 4) A ドメインと T ドメイン : 非リボソームペプチド合成酵素の触媒ドメインの一種。反応の基質(多くはアミノ酸)は A (Adenylation) ドメインによって活性化された後、T (Thiolation) ドメインと反応しチオエステルを介して結合する。基質は T ドメインと結合した形で他のドメインに受け渡され、ペプチド結合形成などの反応が進行する。DiapA の場合は、T ドメインと結合した *p*-ヒドロキシ安息香酸を下流の KS ドメインが受け取ることでカルコンの合成が進行していると考えられる。

注 5) フェニルプロパノイド : ベンゼン環に C₃ 単位が結合した基本骨格を持つ化合物の総称。チロシンやフェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸から生合成される天然物のグループで、フラボノイドもこれに含まれる。

注 6) KS ドメイン : PKS の触媒ドメインの一つで、炭素鎖の伸長を触媒することから KS (Ketosynthase) ドメインという名前と呼ばれている。

注 7) TE ドメイン : PKS の触媒ドメインの一つで、炭素鎖の加水分解を触媒することから TE (Thioesterase) ドメインと呼ばれる。加水分解以外にマクロラクトン化を触媒する例なども知られている。DiapA の場合は、TE ドメインが Claisen 型の環化反応を触媒することで、カルコンの骨格を合成している。

注 8) AlphaFold2 : DeepMind 社が開発したタンパク質の立体構造を高精度に予測できるプログラム。

注 9) カルコン異性化酵素 : カルコンを(2*S*)-フラバノンに異性化する酵素。カルコン

は非酵素的にも異性化するが、その際は立体化学が区別されないため、生合成の中間体になる *S* 体を選択的に供給するために重要な酵素である。

【問い合わせ先】

（研究に関すること）

東北大学大学院薬学研究科

教授 浅井 禎吾

TEL 022-795-6822

E-mail teigo.asai.c8@tohoku.ac.jp

（報道に関すること）

東北大学大学院薬学研究科

総務係

TEL 022-795-6801

E-mail ph-som@grp.tohoku.ac.jp