

有用糸状菌のゲノム情報を活用した  
スタチンの新規デザインと効率的な生産

2019年1月

伊東 広哉

有用糸状菌のゲノム情報を活用した  
スタチンの新規デザインと効率的な生産

筑波大学大学院

生物資源科学研究科

生物機能科学専攻

博士（生物工学）学位論文

伊東 広哉

## 目次

第一章	序論	1
1.1	醗酵産物由来医薬品の開発について	1
1.2	糸状菌の二次代謝産物について	4
1.3	高血症治療薬 FR901512 について	5
1.4	糸状菌 No. 14919 について	5
1.5	本研究の目的	6
第二章	糸状菌 No. 14919 株のゲノムシーケンス	9
2.1	序	9
2.2	実験材料と方法	10
2.2.1	使用菌株	10
2.2.2	ゲノム DNA の調製	10
2.2.3	FR90512 の生産	10
2.2.4	RNA 抽出と精製	11
2.2.5	野生株のゲノム解析と遺伝子アノテーション	11
2.3	結果	12
2.3.1	ゲノムアセンブルと遺伝子アノテーション	12
2.3.2	糸状菌 No. 14919 の同定	13
2.3.3	FR901512 生合成遺伝子の探索	13
2.4	考察	14
第三章	FR901512 生合成遺伝子を用いた新規スタチンの生合成	24
3.1	序	24
3.2	実験材料と方法	25
3.2.1	使用菌株	25
3.2.2	プラスミド構築	25
3.2.3	<i>S. cerevisiae</i> への形質転換	27
3.2.4	<i>S. cerevisiae</i> を用いた生産	28
3.2.5	生成物の抽出と UPLC-MS、MS/MS 分析	28
3.2.6	<i>S. cerevisiae</i> の RNA の抽出と qRT-PCR	28
3.3	結果	29
3.3.1	異種発現による FR901512 生合成遺伝子の確定	29

3.3.2	FR901512 生合成遺伝子の比較解析 .....	30
3.3.3	新規スタチンの生合成.....	31
3.3.4	MIPS-CG を用いたさらなる新規化合物の生合成.....	31
3.4	考察.....	33
第四章	FR901512 の生産性に寄与する鍵遺伝子の探索 .....	50
4.1	序 .....	50
4.2	実験材料と方法.....	52
4.2.1	使用菌株とゲノム情報 .....	52
4.2.2	ゲノム DNA の調製 .....	52
4.2.3	高生産変異株のゲノム解析と変異点解析 .....	52
4.2.4	クローニング配列の決定 .....	53
4.2.5	プラスミド構築 .....	53
4.2.6	糸状菌 No. 14919 の形質転換.....	54
4.2.7	PCR を用いた導入 DNA の確認.....	56
4.2.8	サザンハイブリダイゼーション .....	56
4.2.9	FR901512 の生産.....	57
4.2.10	<i>Aspergillus terreus</i> の形質転換、ロバスタチン生産培養 .....	57
4.2.11	FR901512 とロバスタチンの生産性の評価.....	58
4.2.12	RNA 抽出と精製 .....	58
4.2.13	RNA-seq 解析.....	59
4.3	結果.....	60
4.3.1	変異点解析結果 .....	60
4.3.2	SCAP 遺伝子に導入された変異とその影響について.....	60
4.3.3	SCAP 遺伝子の相補解析.....	61
4.3.4	SCAP 遺伝子と SREBP 遺伝子の遺伝子破壊株の解析 .....	61
4.3.5	qRT-PCR による遺伝子発現量の解析 .....	62
4.3.6	SREBP 制御系遺伝子の他糸状菌での効果検証 .....	63
4.3.7	転写因子過剰発現による FR901512 の生産性への影響評価.....	64
4.3.8	FR901512 の生産に関わる転写因子.....	65
4.4	考察.....	67
4.4.1	UV 変異点に基づく FR901512 の生産性向上に寄与する鍵遺伝子探索 .....	67
4.4.2	新規転写因子探索.....	72

第五章 総合考察 .....	107
参考文献 .....	113
付記 .....	129
謝辞 .....	131

## 第一章 序論

### 1.1 醗酵産物由来医薬品の開発について

微生物は、二次代謝産物と総称される自身の成長に必須ではない複雑・怪奇な化合物を産生する [1]。我々人類は、これまでに、アレクサンダー・フレミングにより発見されたペニシリン [2] を含む抗生物質をはじめ、免疫抑制剤であるシクロスポリン [3] やタクロリムス [4]、高コレステロール血症の治療薬であるロバスタチン [5] など、多くの二次代謝産物をさまざまな用途の医薬品として利用してきた。微生物の産生する二次代謝産物は、これらの医薬品のリード化合物の重要な供給源となることが知られている [6, 7]。2013 年までに FDA によって承認された医薬品（新規化合物）の 38%が天然物またはその誘導体であり、このうち 28%が微生物由来である [8]。また、医薬品に限らず、微生物の産生する生理活性物質のおよそ 80%以上を糸状菌と原核微生物の放線菌とで占めるほど、糸状菌と放線菌は重要な生理活性物の源泉である [9]。

しかし、1950 年代から 1960 年代ころにかけての「抗生物質の黄金時代」とされる時期には多くの生理活性物質がスクリーニングされ単離されてきたものの、1990 年代以降には、徐々に新規化合物が発見される割合は下がってきた。微生物培養抽出物の生物活性に基づく伝統的なスクリーニングを続けると、必然的に既知の代謝産物を発見する可能性が高くなっていったことがその原因である [10]。単離された化合物の構造解明には時間がかかることもあり、近年、製薬業界では微生物を用いた創薬開発から撤退する動きも多い。これらは醗酵由来医薬品開発における最大の課題であり、実際、バイオ医薬品の主力は抗体医薬やワクチン、核酸医薬にとって代わられている。二次代謝産物資源から医薬品の新たなシーズとなる生理活性物質を効率的に取得するためには、新たな手法

の構築が必要である。このために、現在は、構造ベースの薬物設計やコンビナトリアルケミストリーの手法への関心が高まっている [11, 12]。次世代シーケンサーの利用が身近になり、それに伴うゲノム解析技術の発展により、ゲノムから新しい二次代謝産物の生合成遺伝子を発見する手法も確立された [13]。微生物のゲノム中に存在する休眠遺伝子や機能未知の遺伝子は、新規物質を創出するために非常に有用な資源であり、これらを探索するために様々な手法がとられてきた。例えば、リボソーム工学による休眠遺伝子の発現やグローバルレギュレーターによる制御や特定の生合成遺伝子に対するプロモーター変換やリプレッサーの解除、転写因子の過剰発現化、異種発現などである。しかし、実践的に有用で優れていると認められる単一の方法論は開発されていない [14]。それは生合成遺伝子が多様な微生物に属しており、多くの場合、極めて特殊な条件下でのみ活性化されるように厳格に制御されているからである。醗酵創薬の革新に向けて、新たな方法論の樹立が望まれている。

また、微生物の二次代謝産物を医薬品として活用するために解決すべき重要な課題がもう一つある。それは、工業化を視野に入れた生産性の向上である。人知を超えた化合物を産生できる点が二次代謝産物の特徴であるが、その複雑な構造故に、有機化学的手法を用いて全合成することが困難であったり、たとえ実験室レベルでの全合成が可能となっても、その合成ステップが多いと医薬品開発としての製造コストには全く見合わないこともしばしばある。化合物を取得するために微生物を大量培養することも方策の一つであるが、醗酵産物を安価に、「医薬品」としての品質で安定的に製造するためには多大な労力が必要である [15, 16]。通常、医薬品の候補化合物の開発ステージにおいて商用生産株を開発する際には、医薬品原料の供給やコスト改善のために、紫外線等の変異原処理によるランダム変異の導入によって野生株の生産性を向上させた変異株の育

種が不可欠である。例えば抗真菌剤ミカファンギンの醗酵原体として用いられる FR901379 では、工業化に際して生産性を 30 倍に向上させた [17]。しかし、変異株の育種は数百～数千の変異株をスクリーニングし変異を重ね合わせるため、多大な時間・労力・コストを要する。さらに、変異による生産性向上のメカニズムは多くの場合ブラックボックスであることから、効率的に生産株を取得するための有益な情報を得ることができないのが現状である。医薬品開発では、物質特許に守られる期間内に投資を回収することが重要であることから、生産株の開発にスピードが求められる。経験的な高生産性変異株の取得による手法に頼らない新たな高効率な手法を確立することは、医薬品開発において重要かつ大きなメリットとなる。

旧藤沢薬品工業が探索・開発を手掛けたタクロリムス (FK506、医薬品名プログラフ) のアステラス製薬株式会社による売上高推移を Fig. 1-1 に示す。通常、特許切れに伴って売上額が激減するのが医薬品業界の常であるが、プログラフの場合、日米欧の特許が切れた後でも継続しておよそ 2,000 億円の売上高を誇るブロックバスターとして同社の売り上げを牽引している。タクロリムスの有機合成は 1989 年に既に Merck のチームにより報告されており [18]、多くの研究者によってその合成スキームも改善されている [19, 20, 21]。しかしながら、前述のとおり多くのステップを要する有機合成では製造コストは見合わずに、後発品でも醗酵法が用いられているとされる。後発薬への切り替えが進まずに売り上げが維持されている理由には、適応拡大や販売戦略などの複数の要因があるものの、高品質で安定した生産性を維持できる生産株の樹立も重要な要因である [22]。

このような特徴的な構造を持ち、人々の生活に影響を与えるポテンシャルを持つ二次代謝産物は医薬品として非常に魅力的である。医薬品のシーズとなる



化合物の新たな探索手法が生まれ、高生産株を効率的に取得できれば、微生物由来の医薬品開発の革新技術となり、より多くの優れた医薬品の開発によって人々の生活を豊かにすることができる。

## 1.2 糸状菌の二次代謝産物について

前述のように、糸状菌は二次代謝産物の宝庫である。複雑・怪奇な化合物を生産する理由はその生合成機構にある。糸状菌由来の二次代謝産物の多くはアミノ酸を骨格とする非リボソーマルペプチド (non-ribosomal peptide; NRP) もしくはポリケトン鎖を骨格とするポリケチド (Polyketide) であり、それぞれの NRP 合成酵素 (NRPS) とポリケチド合成酵素 (PKS) によって生合成される。他にもテルペン骨格を持つ分子や、NRP とポリケチド、ポリケチドとテルペノイドなどのハイブリット骨格を持つ化合物など、その分子構造は多様性に富んでいる。一般的に NRPS や PKS は、これらの生産物を修飾する修飾酵素や転写因子などの遺伝子とともにゲノム上にクラスターを形成して存在している [23]。また、この遺伝子クラスターの発現は、栄養源、光、pH、活性酸素等の様々な環境刺激に応答して変化することが知られている。一方で、ヒストンメチルトランスフェラーゼ LaeA [24] のようなクロマチンを介した制御因子など、広く知られる制御因子によっても発現制御されるが、その詳細な機構については不明な部分が多い。これら制御機構を解明し、生合成遺伝子クラスターを自在に制御することができれば、より標的化合物の生産性を簡便かつ効率的に向上させることができると考えられる。

### 1.3 高血症治療薬 FR901512 について

FR901512 は、糸状菌 No. 14919 によって産生される高脂血症治療薬であり、3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素の阻害剤である。ヒトヘパトーマ細胞である HepG2 細胞を用いた *in vitro* 試験では、コレステロール合成に関する半数阻害濃度は 1.0 nM、HMG-CoA 還元酵素の阻害については、0.95 nM であった [25]。コレステロール合成に関して、同条件下でのロバスタチン (24 nM) やシンバスタチン (34 nM) の 20 倍以上の活性を持つことが知られている [26]。また、単回経口投与によりラットのステロール合成を強く阻害し、ビーグル犬への 1 日 1 回の経口投与で血漿コレステロールレベルを低下させた [27]。構造的には、ロバスタチンと非常に良く似ている。ロバスタチンが主骨格としてヘキサヒドロナフタレン核を持ち、メチルブチリル基を側鎖として有するのに対し、FR901512 はテトラリン核にアセチル基を側鎖として保有する (Fig. 1-2)。ロバスタチンは糸状菌 *Aspergillus terreus* の PKS によって生合成されることが分かっており [28]、類似構造を持つ FR901512 も PKS によって生合成されることが予想される。

### 1.4 糸状菌 No. 14919 について

糸状菌 No. 14919 株は、旧藤沢薬品工業によって千葉県清澄山の土壌から単離された糸状菌である [25]。プレート上で分生子は形成するが、胞子を形成せず、単核である。菌の分類は不明のため、本菌は便宜的に No. 14919 株とナンバリングされて呼称されており、本博士論文でもそのように記述する。No. 14919 株は FR901512 の工業化研究の過程で、紫外線照射による突然変異を用いた育種により生産性向上変異株が取得されている。これら変異株は野生株

(MC3 株) から直列に第五世代まで育種されており、最も生産性の高い株で野生株と比較して 15 倍の生産性を示した (Fig. 1-3)。生産性向上を指標としたスクリーニングにより育種を行ったものの、高い生産性を担う遺伝子やその機構等の詳細についての詳細は不明である。

## 1.5 本研究の目的

前述のように、醗酵由来医薬品の開発には「シーズ化合物の探索」と「工業化へ向けた生産性の向上」の 2 つが課題となる。そこで本研究では、FR901512 を産生する糸状菌 No. 14919 のゲノム解析を起点として、これら課題の解決に向けた新たな手法を構築することを目的とした。

まず、糸状菌 No. 14919 のゲノム情報の整備を行った。FR901512 の生合成遺伝子を決定後、1 つ目の課題である「シーズ化合物の探索」に向けた新たな手法の開発を目指した。即ち、*Saccharomyces cerevisiae* を用いた異種生産系を構築し、合成生物学的手法によって新規化合物をデザインすることを試みた。さらに、遺伝子情報の収集とデータベースからの効率的な探索を行うことによる新規化合物デザインの拡張性についても考察した。

次に、2 つ目の課題である効率的な生産へのアプローチとして、ブラックボックスとなっている高生産性に関わる鍵遺伝子を探索した。このために、FR901512 の生産性が向上した紫外線 (UV) 変異株のゲノム塩基配列の解析を実施した。特定した機能遺伝子を活用することによって複数種の菌による PKS 由来二次代謝産物の効率的な生産を試みた。これらを通して、ゲノム情報を効率的に活用することによる醗酵由来医薬品のシーズ化合物の探索と効率的な生産の新たな方法論を確立することができた。

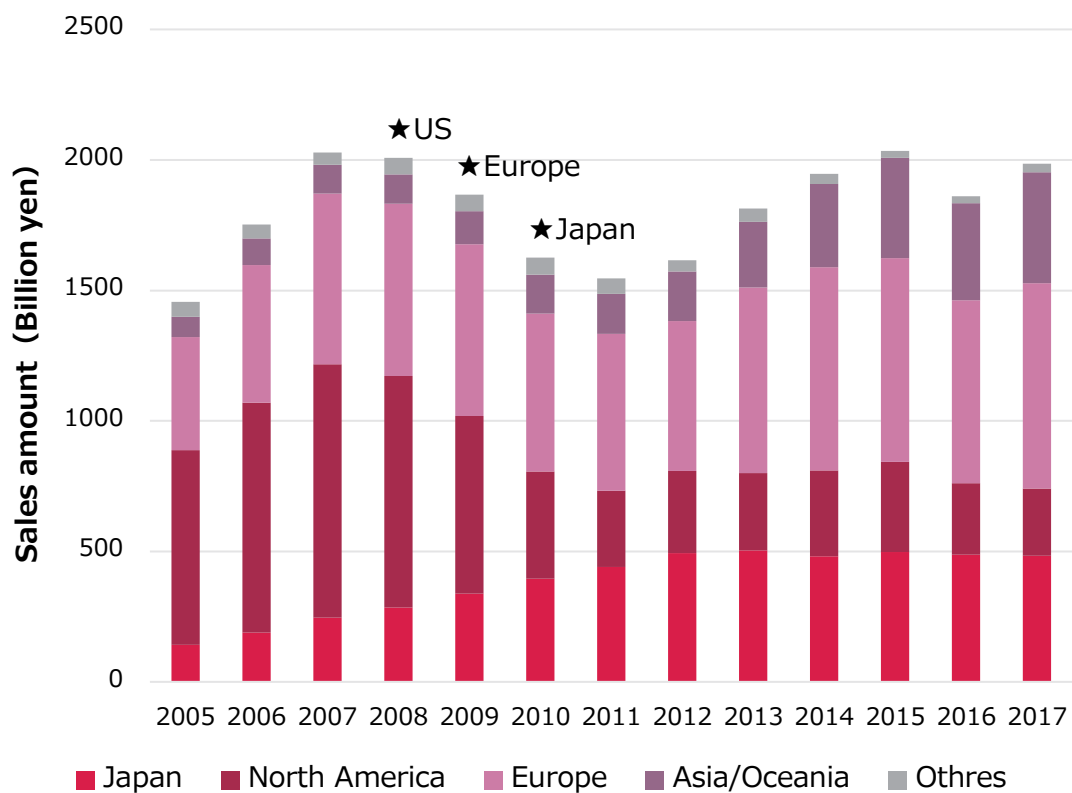


Fig. 1-1 プログラフ (タクロリムス) の売上高推移と特許切れタイミング

2005～2017年度アステラス製薬決算資料より作成。日米欧三局での特許満了タイミングを星印で表記した。

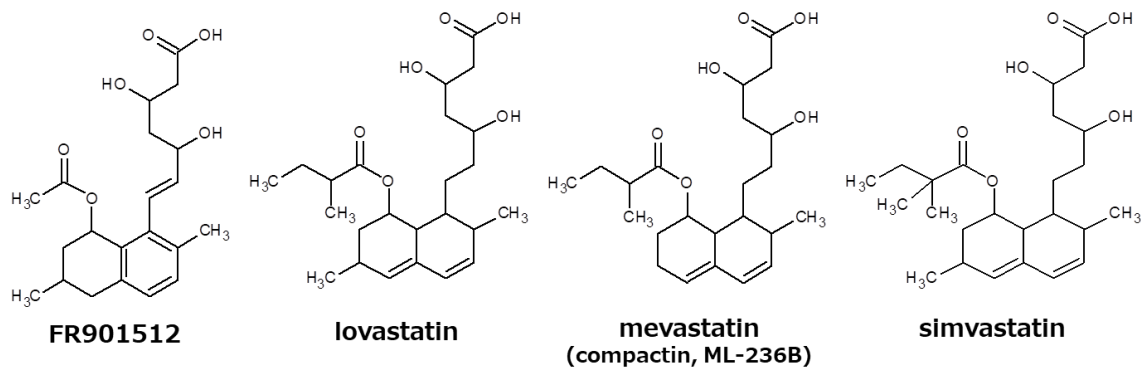


Fig. 1-2 FR901512 と代表的な HMG-CoA 還元酵素阻害剤の化学構造

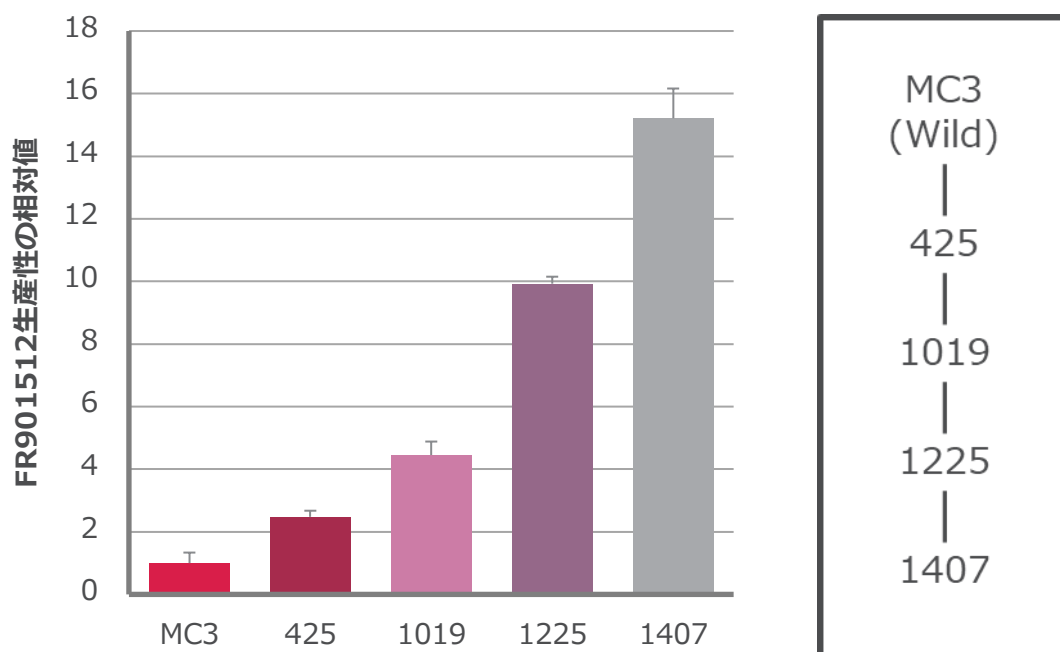


Fig. 1-3 糸状菌 No. 14919 野生株と高生産変異株における FR901512 の生産

## 第二章 糸状菌 No. 14919 株のゲノムシーケンス

### 2.1 序

FR901512 を産生する糸状菌 No. 14919 株が清澄山の土壌から単離され、その分子育種が行われていた時代（2000 年代初頭）は、ゲノムシーケンスはまだ高価なものであり、アセンブル技術や遺伝子アノテーション技術も進歩の途上にあつた。我が国の国菌 [29] とされる麹菌 *Aspergillus oryzae* の全ゲノム解析が産学官の共同プロジェクトにより完了したのも 2005 年のことである [30]。價格的にも解析速度的にも、ゲノム解析の敷居が高い時代において、工業化の現場ではさらにその敷居は高かった。このため、糸状菌 No. 14919 においては、ゲノム情報をベースにした遺伝子操作をはじめ、菌の同定すら実施されていない。FR901512 の生合成遺伝子についても明らかになっておらず、その生合成経路も未知である。近年、次世代シーケンサーが登場し、2007 年頃から急激に塩基配列の解析速度が向上した。2012 年には、ヒトゲノム計画が終了した 2003 年時に比べて、そのコストは 1/10,000 にまで低下し [31]、糸状菌でも多くのゲノム解析が簡便に手軽に行えるようになり、多くの糸状菌ゲノムの塩基配列が解読されてきた。本章では、次世代シーケンサーを用いて糸状菌 No. 14919 のゲノム塩基配列を解析し、本研究を進める上で必要なリファレンス情報を整備することとした。

## 2.2 実験材料と方法

### 2.2.1 使用菌株

No. 14919株の野生株 MC3 (受託番号 : FERM BP-3752) をゲノム解析に使用した。

### 2.2.2 ゲノム DNA の調製

No. 14919株の野生株 MC3をポテトデキストロース培地 (BD-Diagnostic Systems, MD, USA) で25℃、180 rpmで4日間培養した。菌体を回収し、液体窒素で凍結させてすり鉢で粉末状になるまで破碎した。破碎した菌体を NucleoBond® AXG 100 Column (Macherey Nagel, Bethlehem, PA, USA) を用いて精製し、ゲノムDNA溶液を得た。

### 2.2.3 FR90512 の生産

前培養培地として、2% soluble starch、1% glucose、4% sucrose、3% Pharmamedia (Archer Daniels Midland, MN, USA) 、1.5% soybean flour (Sigma-Aldrich, Mo, USA) 、1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2% CaCO<sub>3</sub>、0.05% Antifoam PE-L (Wako, Tokyo, Japan) 、0.05% Antifoam SI (Wako) を121℃、20分オートクレーブしたものを使用した。No. 14919株の野生株が生育した5 mm辺のプレート培地を20 mLの前培養培地を添加した100 mL三角フラスコに植菌し、25℃、220 rpmで生育に合わせて3日間培養した。生産培養培地は、0.5% glucose、8.5% glycerol、6% MS#3600 (Nisshoku, Tokyo, Japan) 、1.5% corn steep liquor (Sigma-Aldrich) 、1.5% potato protein、1% beta-cyclodextrinを含む溶液を硫酸でpH3.7に調製し、

121℃、20分オートクレーブしたものを使用した。前培養液を2%、20 mLの生産培地を添加した100 mL三角フラスコに植菌し、25℃、220 rpmで5日間実施した。

#### **2.2.4 RNA 抽出と精製**

培養の3日目と5日目の培養液からRNAを抽出した。2 mLの培養液をミクロロス (Merck Millipore, MA, USA) でろ過して菌体を回収した。回収した菌体はMilli-Q水でよく洗浄後、液体窒素で凍結させてすり鉢で粉末状になるまで破碎した。粉末状の菌体から1.5 mL ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を使用してRNA を抽出後、RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いてプロトコールに従ってRNA 精製を実施した。

#### **2.2.5 野生株のゲノム解析と遺伝子アノテーション**

2.2.2で調製したゲノムDNA溶液を用いて、PacBio RSII single-molecule real-time (SMRT) method (chemistry version P6-C4) を用いてゲノム解析を実施した。並行して、TruSeq DNA LT Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプロトコール通りにライブラリを調製し、MiSeq (Illumina) とMiSeq reagent kit version 3, 600 cycles (Illumina) を用いて塩基配列を決定した。得られたドラフトゲノム塩基配列は、MaSuRCA assembler version 3.2.1\_12132016 [32] を用いてアセンブルした。さらに、2.2.4で調製したRNAについて、TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いたライブラリを調製し、MiSeq (Illumina) とMiSeq Reagent Kits v3 (150 cycles) を用いてシーケンスを行った。得られたRNA-SeqデータはCufflinks version 2.2.1 [33] を使用して転写領域をア



センブルにより解析することで、CodingQuarry version 2.0 [34] により遺伝子アノテーションを実施した。また、tRNAscan-SE version 1.23 [35] によりtRNA遺伝子を予測した。

NRPS遺伝子、PKS遺伝子を含む二次代謝関連遺伝子の探索とそのタンパク質のドメイン構造予測は、antiSMASH fungal version [36] を用いて実施した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 ゲノムアセンブルと遺伝子アノテーション

PacBio RSIIを用いたゲノム解析によって、1 分子リアルタイム (SMRT) セル 1セルから、62,301個のPacBioサブリードからなる計703.8 Mbp のロングリード情報が得られた。Illumina MiSeqからは、ショートリードデータとして21.3百万個のペアエンドリード (鎖長572 bp) を含む計12.6 Gbpが得られた。これらの塩基配列をアセンブルし、N50値が711,440 bpである104個のscaffoldsが取得された (Table 2-1) 。この結果、全長48.7 Mbpのゲノム塩基配列が得られた。

さらに、MiSeqを用いたRNA-Seqの結果、72.9百万個のペアエンドリード (総計5.5 Gbp) のRNA-Seqリードデータを得た。このリードをアセンブルしたゲノムにマッピングすることで、イントロン情報を元にした遺伝子アノテーションを実施した。その結果、総数14,342個のcoding sequences (CDSs) が予測された。tRNA遺伝子は、tRNAscan-SE version 1.23により予測し、217個のtRNAが検出された。antiSMASH fungal versionを用いて、二次代謝関連

物の生合成遺伝子を探索した結果、計58の生合成遺伝子が見つかった (Table 2-2)。得られたゲノムはDDBJ/EMBL/GenBank に登録した (Accession No. BDMC01000001 to BDMC01000104) [37] 。

### 2.3.2 糸状菌 No. 14919 の同定

得られたゲノム塩基配列より、5S、18S-5.8S-28S rRNA遺伝子を探索した。5.8S rRNA領域と18S、28Sの間に挟まれたinternal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1、ITS2) 配列は、*Xylaria grammica*のそれと99%の相同性を示すことが明らかとなった (Fig. 2-1) 。

### 2.3.3 FR901512 生合成遺伝子の探索

FR901512の構造がロバスタチンと非常に良く似ていること、*Aspergillus terreus*のPKS (nonaketide synthase) であるLovBのアミノ酸配列 (Accession No. AAD39830) と相同性を持つ遺伝子を糸状菌No. 14919のゲノムの中からBlastPを用いて探索した。その結果、LovBと52%の相同性を持つANO14919\_109980が見出された。これは、antiSMASHでの検索結果にも含まれていた。さらに、ANO14919\_109980の周辺配列を解析すると、ロバスタチン生合成遺伝子とアミノ酸配列の相同性が高い遺伝子群が近傍に位置していた。FR901512推定生合成遺伝子を*frIX*とし、ロバスタチンの生合成遺伝子のホモログにそれぞれのアルファベットを割り当てた。FR901512推定生合成遺伝子とロバスタチン生合成遺伝子との相同性をTable 2-3に示した。

## 2.4 考察

PacBio RSII によるロングリード計 703.8 Mbp、MiSeq によるショートリード 12.6 Gbp のリード情報から、No. 14919 のゲノムアセンブルを実施した。アセンブル結果から、糸状菌 No. 14919 のゲノムサイズは 48.7 Mbp であった。他の糸状菌では *Aspergillus oryzae* が 37.6 Mbp であり [30]、No. 14919 株のゲノムサイズは比較的大きく、遺伝子数も多かった (No. 14919 株: 14,342 個、*A. oryzae*:12,074 個)。Scaffold の数は 104 と多めであり、ショートリードとしての情報量は十分であるが、ロングリードの読み取り深度がおおよそ x14 程度であったことがこの原因であると考えている。ただし、使用目的である高生産変異株での変異点解析、糸状菌 No. 14919 の遺伝子操作に必要なゲノムリファレンスを整備することはできた。本情報を元に、FR901512 を産生する糸状菌 No. 14919 の解析を進めることとした。

これまでに糸状菌 No. 14919 の属種は同定されていなかったが、本菌が *Xylaria* 属の糸状菌であることが明らかとなった。最も相同性の高い *X. grammica* を含む *Xylaria* 属糸状菌は一般に、腐朽菌および植物内生菌として知られる [38]。植物内生菌は、重要な二次代謝産物源であり、医薬および農薬分野で活用が期待される多くの二次代謝産物を産生することが知られている [39]。NCBI で全ゲノムが取得できる 5 種の *Xylaria* 属糸状菌のゲノムサイズは、*X. longipes* (ID: 71621) で 43.91 Mbp、*X. polymorpha* (ID: 71616) では 43.52 Mbp、*Xylaria striata* (ID: 64263) では 59.79 Mbp、*X. sp.* MSU\_SB201401 (ID: 56894) では 56.83 Mbp、*X. sp.* JS573 (ID: 36783) では 40.89 Mbp であり、糸状菌 No. 14919 のゲノムサイズに近かった。

antiSMASH を用いて二次代謝産物の生合成遺伝子を検索したが、このアルゴリズムは、特定のタイプの遺伝子クラスターに特異的な遺伝子の隠れマルコ

フモデルに基づいて、既知の広範な化合物群に属する二次代謝産物をコードする遺伝子クラスターを正確に同定することができる [36]。ロバスタチンの合成に関わる nonaketide synthase である LovB との相同性を指標として見出した FR901512 の推定生合成遺伝子クラスターは 8 つの遺伝子を含み、そのうち 2 つが PKS 遺伝子であった。全ての遺伝子は *A. terreus* のロバスタチン生合成遺伝子 (*lov*) に加え、*Penicillium citrinum* のメバスタチンの生合成遺伝子 (*mlc*) とも相同性が高かった (Table 2-3)。ロバスタチンの生合成経路を Fig. 2-2 に示す [40]。2 つの PKS 遺伝子 *frlB* と *frlF* は反復型の I 型 PKS であり、*frlB* はテトラリン核構造の生合成に、*frlF* は FR901512 のアセチル基の生合成に関与することが予想される。*frlB* は、*lovB* および *mlcA* と 52% のアミノ酸配列の相同性を示し、ketosynthase (KS)、acyltransferase (AT)、dehydratase (DH)、carbon methyltransferase (cMT)、ketoreductase (KR)、acyl carrier protein (ACP) の 6 つのドメインを持つ PKS であった (Fig. 2-3A)。メチルトランスフェラーゼに保存されるコンセンサス配列 [41] は保持されていた (Fig. 2-4)。もう一つの PKS 遺伝子である *frlF* はアセチル基の側鎖の生合成を担うと予想されるが、ロバスタチンおよびメバスタチンの 2-メチルブチリル側鎖を担う *lovF* と *mlcB* が持つ cMT ドメインを保持していなかった。ただし、cMT 以外の KS、AT、DH、enoyl reductase (ER)、KR、ACP の 6 つのドメイン構造は *lovF* と *mlcB* と同一のものであった (Fig. 2-3C)。また、*frlB*、*frlF* の全てのドメインについて、糸状菌 No. 14919 のものは *A. terreus*、*P. citrinum* および *M. pilosus* の当該生合成遺伝子のドメインとは進化的距離が大きく離れていた (Fig. 2-3B, D)。この差異が、生産される化合物の構造の違いを生むと考えられた。さらに、FR901512 の推定遺伝子クラスターには、*A. terreus* の *lovI*、*P. citrinum* の

*mlcE*、*M. pilosus* の *mokI* に該当する排出ポンプ機構を担う遺伝子が存在しなかった。これらの遺伝子は、自身の産生するスタチンの細胞毒性に対する耐性化機構としての役割をもつが、*A. terreus* によるロバスタチン生産には必須ではないことが明らかになっている [42]。第三章にて、この FR901512 の推定生合成遺伝子の同定を行う。

Table 2-1 糸状菌No. 14919のゲノムアセンブル情報

Feature	value
Size (bp)	48,734,900
Scaffolds	104
G+C content (%)	46.87
N50 (bp)	711,440
Protein-coding genes	14,342
tRNA genes	217

Table 2-2 糸状菌 No. 14919 の二次代謝産物の生合成遺伝子 (1/2)

Gene ID	Type	MC3 RPKM Value	
		day3	day5
ANO14919_017950	t1pks	0.1	0.1
ANO14919_043060	t1pks	4.9	5.1
ANO14919_043340	t1pks	16.5	5.1
ANO14919_053210	t1pks	16.1	74.0
ANO14919_053300	t1pks	369.1	604.6
ANO14919_053420	t1pks	41.3	19.9
ANO14919_054390	t1pks	0.0	0.0
ANO14919_055580	t1pks	3.8	3.2
ANO14919_056580	t1pks	8.8	66.6
ANO14919_060780	t1pks	0.0	0.0
ANO14919_063150	t1pks	0.1	0.0
ANO14919_064510	t1pks	338.7	19.7
ANO14919_066200	t1pks	3.0	2.9
ANO14919_066680	t1pks	4.2	29.4
ANO14919_069660	t1pks	0.2	0.3
ANO14919_070760	t1pks	202.2	59.8
ANO14919_075550	t1pks	2.5	3.9
ANO14919_079710	t1pks	1.5	0.3
ANO14919_085260	t1pks	0.9	1.0
ANO14919_092940	t1pks	0.0	0.0
ANO14919_093480	t1pks	17.6	16.9
ANO14919_096270	t1pks	1.4	1.5
ANO14919_097410	t1pks	0.5	0.5
ANO14919_103570	t1pks	3.6	1.0
ANO14919_109980	t1pks	16.2	115.6
ANO14919_110090	t1pks	0.3	0.0
ANO14919_110610	t1pks	0.9	0.5
ANO14919_116900	t1pks	9.7	308.4
ANO14919_117890	t1pks	22.8	5.7
ANO14919_142930	t1pks	119.8	199.9

t1pks; I型 PKS、MC3 RPKM Value; 野生株 MC3 の RNA-seq 解析

Table 2-2 糸状菌 No. 14919 の二次代謝産物の生合成遺伝子 (2/2)

Gene ID	Type	MC3 RPKM Value	
		day3	day5
ANO14919_074860	t1pks-nrps	0.7	0.3
ANO14919_082590	t1pks-nrps	3.1	4.0
ANO14919_139500	t3pks	14.1	6.1
ANO14919_029360	nrps	1.6	1.0
ANO14919_041050	nrps	1.8	1.5
ANO14919_075570	nrps	0.1	0.7
ANO14919_087960	nrps	8.2	2.5
ANO14919_104050	nrps	0.3	0.3
ANO14919_116660	nrps	0.0	0.0
ANO14919_138060	nrps	0.0	0.1
ANO14919_026880	terpene	0.1	0.3
ANO14919_051690	terpene	27.3	29.6
ANO14919_069210	terpene	30.0	34.4
ANO14919_091750	terpene	0.1	0.8
ANO14919_105450	terpene	0.0	0.0
ANO14919_107290	terpene	119.5	682.1
ANO14919_126310	terpene	295.4	417.0
ANO14919_033500	other	0.4	0.0
ANO14919_046260	other	8.6	3.4
ANO14919_069500	other	0.5	0.3
ANO14919_073600	other	0.1	0.0
ANO14919_089730	other	3.6	14.0
ANO14919_090610	other	20.4	4.2
ANO14919_113090	other	0.3	0.3
ANO14919_115540	other	0.2	0.1
ANO14919_116520	other	0.3	0.1
ANO14919_141970	other	46.3	36.4
ANO14919_143200	other	1.5	5.2

t3pks; III型PKS、MC3 RPKM Value; 野生株 MC3 の RNA-seq 解析



```

No.14919      1  -----
AB524025     1  -----GTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAG
JQ341087     1  CTTGGTCCATTTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAG
HM752504     1  -----
consensus    1  .....

No.14919      1  -----AAGAGTTATTACAACCTCCCAAACCCATGTGAACTTACCTTCTGTTGCCTCG
AB524025     36  GGATCATTAAAGAGTTATTACAACCTCCCAAACCCATGTGAACTTACCTTCTGTTGCCTCG
JQ341087     61  GGATCATTAAAGAGTTATTACAACCTCCCAAACCCATGTGAACTTACCTTCTGTTGCCTCG
HM752504     1  -----AAGAGTTATTACAACCTCCCAAACCCATGTGAACTTACCTTCTGTTGCCTCG
consensus    61  .....*****

No.14919      52  GCAGGTCGCGACCTACCCGTGAGGCCCTACCCTGTAGGGCCCTACCTGGTAGTCGCGGG
AB524025     96  GCAGGTCGCGACCTACCCGTGAGGCCCTACCCTGTAGGGCCCTACCTGGTAGTCGCGGG
JQ341087     121 GCAGGTCGCGACCTACCCGTGAGGCCCTACCCTGTAGGGCCCTACCTGGTAGTCGCGGG
HM752504     52  GCAGGTCGCGACCTACCCGTGAGGCCCTACCCTGTAGGGCCCTACCTGGTAGTCGCGGG
consensus    121 *****

No.14919     112  TACGCCTGCCGGTGGCCCATGAAACTCTGTTTATTCTTGTATTCTGAATCTATAACTAA
AB524025     156  TACGCCTGCCGGTGGCCCATGAAACTCTGTTTATTCTTGTATTCTGAATCTATAACTAA
JQ341087     181  TACGCCTGCCGGTGGCCCATGAAACTCTGTTTATTCTTGTATTCTGAATCTATAACTAA
HM752504     112  TACGCCTGCCGGTGGCCCATGAAACTCTGTTTATTCTTGTATTCTGAATCTATAACTAA
consensus    181 *****

No.14919     172  ATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AB524025     216  ATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
JQ341087     241  ATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
HM752504     172  ATAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
consensus    241 *****

No.14919     232  AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
AB524025     276  AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
JQ341087     301  AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
HM752504     232  AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
consensus    301 *****

No.14919     292  TGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCC
AB524025     336  TGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCC
JQ341087     361  TGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCC
HM752504     292  TGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCC
consensus    361 *****

No.14919     352  CTGTTGCTTAGCGTTGGGAGCCTACAGCCTTCTGTAGCTCCCCAAAGTTAGTGGCGGAGT
AB524025     396  CTGTTGCTTAGCGTTGGGAGCCTACAGCCTTCTGTAGCTCCCCAAAGTTAGTGGCGGAGT
JQ341087     421  CTGTTGCTTAGCGTTGGGAGCCTACAGCCTTCTGTAGCTCCCCAAAGTTAGTGGCGGAGT
HM752504     352  CTGTTGCTTAGCGTTGGGAGCCTACAGCCTTCTGTAGCTCCCCAAAGTTAGTGGCGGAGT
consensus    421 *****

No.14919     412  CGGTTTACACTCTAGACGTAGTAAATTTTATCTCGTCTGTAGTTAGGCCGGTCCCTCGCC
AB524025     456  CGGTTTACACTCTAGACGTAGTAAATTTTATCTCGTCTGTAGTTAGGCCGGTCCCTCGCC
JQ341087     481  CGGTTTACACTCTAGACGTAGTAAATTTTATCTCGTCTGTAGTTAGGCCGGTCCCTCGCC
HM752504     412  CGGTTTACACTCTAGACGTAGTAAATTTTATCTCGTCTGTAGTTAGGCCGGTCCCTCGCC
consensus    481 *****

No.14919     472  GTAAAACCCCTAATTTTAA-----
AB524025     516  GTAAAACCCCTAATTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT
JQ341087     541  GTAAAACCCCTAATTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT
HM752504     472  GTAAAACCCCTAATTTTAA-----
consensus    541 ***** * * * * *

```

Fig. 2-1 糸状菌No. 14919と*Xylaria grammica*のITS-1、5.8S rRNA、ITS-2領域のアライメント

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で検索可能な*Xylaria grammica*をAccession No. AB524025、JQ341087、HM752504で示した。

Table 2-3 FR901512 の推定生合成遺伝子と対応するホモログ遺伝子

Gene name	Gene locus	Putative function	Amino acid length	Amino acid identity with lovastatin and mevastatin genes (%)
<i>frlA</i>	ANO14919_109970	P450 monooxygenase	518	<i>lovA</i> 44 <i>mlcC</i> 43
<i>frlB</i>	ANO14919_109980	polyketide synthase	3,008	<i>lovB</i> 52 <i>mlcA</i> 52
<i>frlC</i>	ANO14919_109960	enoyl reductase	357	<i>lovC</i> 62 <i>mlcG</i> 59
<i>frlD</i>	ANO14919_109940	acyltransferase	402	<i>lovD</i> 54 <i>mlcH</i> 49
<i>frlE</i>	ANO14919_110000	transcription factor	422	<i>lovE</i> 27 <i>mlcR</i> 29
<i>frlF</i>	ANO14919_110090	polyketide synthase	2,400	<i>lovF</i> 35 <i>mlcB</i> 34
<i>frlG</i>	ANO14919_109950	thioesterase	243	<i>lovG</i> 44 <i>mlcF</i> 49
<i>frlH</i>	ANO14919_109990	HMG-CoA reductase	1,136	<i>ivrA</i> 42 <i>mlcD</i> 50

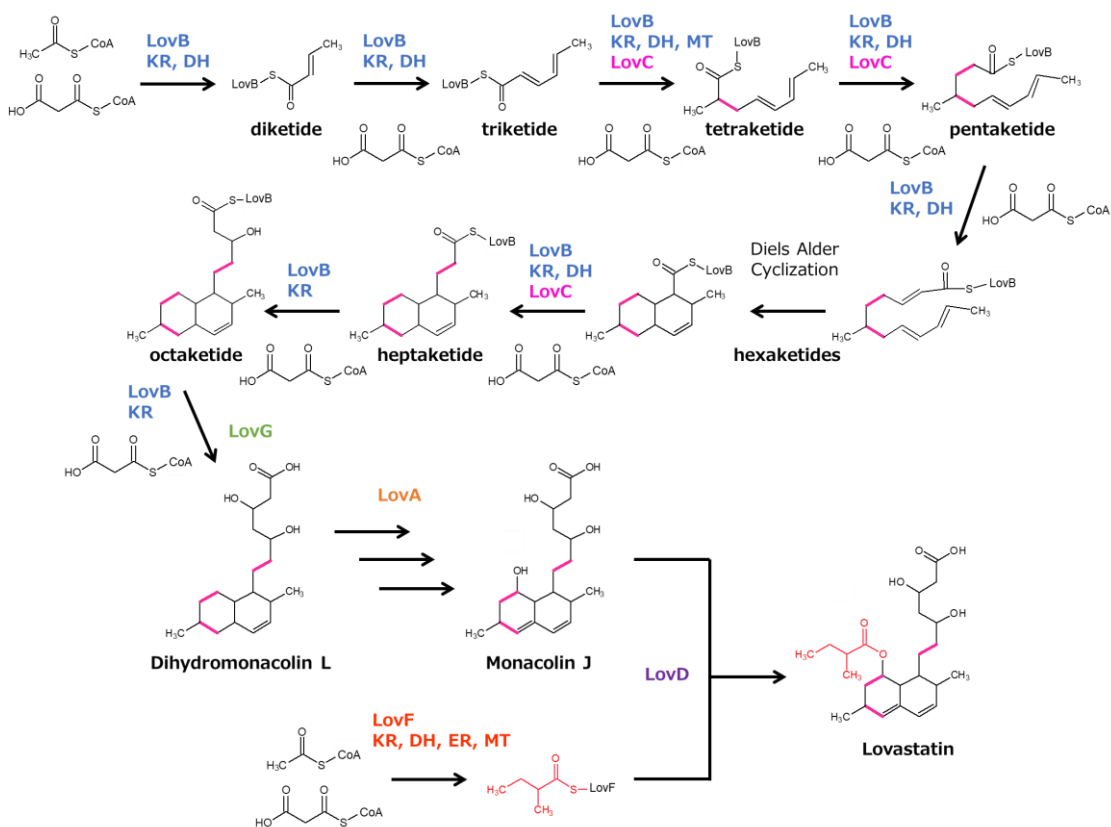


Fig. 2-2 ロバスタチンの生合成経路

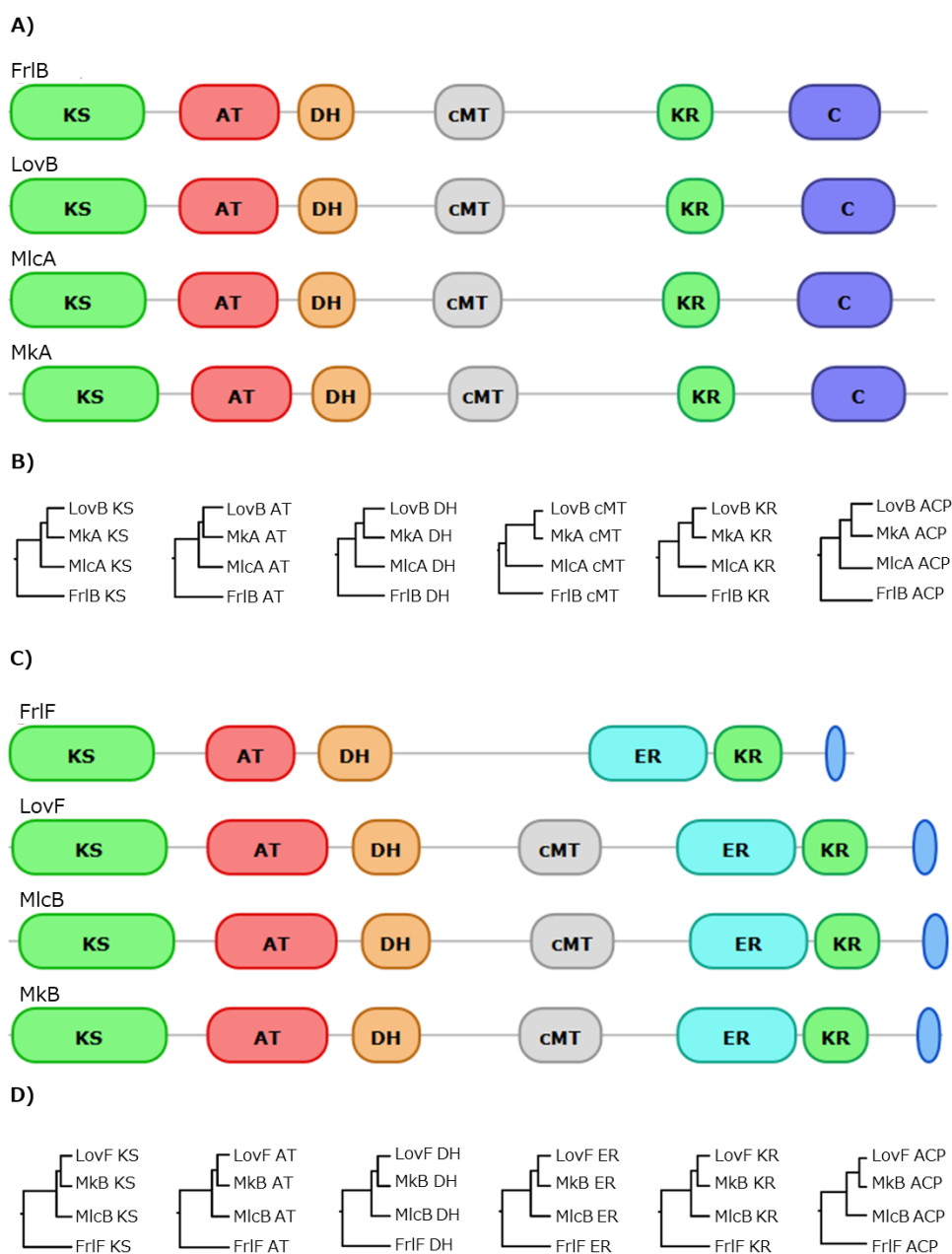


Fig. 2-3 FR901512 の生合成に関わる推定 PKS 遺伝子のドメイン構造

FrIB とスタチン生合成酵素の A) ドメイン構造の比較と B) 各ドメインの系統解析 (UPGMA 法)。FrIF とスタチン合成酵素の C) ドメイン構造と D) 各ドメインの系統樹解析 (UPGMA 法)。

Mkb, Mkf: *Monascus pilosus*, monacolin K 生合成遺伝子



### 第三章 FR901512 生合成遺伝子を用いた新規スタチンの生合成

#### 3.1 序

HMG-CoA還元酵素の阻害剤は、高脂血症の治療薬として広く使用され、一般にスタチンと呼ばれている。コンパクチンやML-236Bとも呼ばれるメバスタチンは、遠藤章氏によって1976年に*Penicillium citrinum*から単離された最初のスタチン化合物であり [43]、同氏はガードナー賞を受賞するなどスタチン発見の第一人者として知られる。同氏が見出したメバスタチンそのものは上市されなかったが、*Aspergillus terreus*、*Monascus pilosus*により産生されるロバスタチン (*M. pilosus*ではメビノリン、MK803とも呼ばれる) は、高脂血症に有効な薬剤としてメルクにより上市され、側鎖を合成修飾して開発されたシンバスタチンは数十億ドル以上を売り上げるブロックバスターに成長した。現在ではさらに、4つの合成スタチンであるロスバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチンおよびフルバスタチンが市販されている [44, 45]。中でも、アトルバスタチン (商品名リピトール) は、一時世界で最も多い売上高を誇っていた医薬品であり、ピーク時には百億ドル以上の売り上げを記録した。天然のスタチン化合物は、コア構造として、ヘキサヒドロナフタレン構造を持つが、合成スタチンは全く違ったコア構造を持っており、全てのスタチン化合物で共通するのは、HMG-CoA還元酵素と競合するアナログ構造となる3,5-dihydroxy-hepta(e)noic acid部分である [46]。コア構造の違いが半減期等の生物活性に寄与しており、その薬効を決定するとされる。しかしながら、構造と医薬としての価値との関係についての詳細は不明である。FR901512は、テトラリン骨格にアセチル基が結合したユニークなコア構造を持つ天然スタチンであり、1.1で述べたように、*in vitro*での活性が非常に高いという特徴を持

つことから、構造と医薬価値の関係は非常に興味深い。これと非常に良く似た構造を持つロバスタチンの生合成経路は、詳細に研究され解明されている [40]。 *Aspergillus terreus* は、 nonaketide synthase *lovB* と diketide synthase *lovF* の2つのPKS遺伝子によってロバスタチンのコア構造を生合成する。 *lovA*、 *lovC* および *lovD* がロバスタチン生合成に必須な遺伝子とされ、 *A. terreus* では13 以上の遺伝子がこれらと同一の遺伝子クラスター内に存在すると予想されている [46]。第二章では、ロバスタチンおよびメバスタチンの生合成遺伝子と極めて相同性の高い推定生合成遺伝子クラスターが見出されたことから、FR901512も各遺伝子の同様の機能によって生合成されることが予想される (Fig. 3-1)。そこで本章では、FR901512の生合成遺伝子を同定するとともに、FR901512に特有な構造の生合成に重要な遺伝子を調べるために、全遺伝子を導入した *S. cerevisiae* の組換え酵素発現系を目指した。さらに、この発現系を用いて様々な相同遺伝子を組み合わせることで発現させることによって、異なる構造を持つスタチン類縁体を生合成することを試みた。

## 3.2 実験材料と方法

### 3.2.1 使用菌株

*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) を異種発現の宿主として使用した [48]。

### 3.2.2 プラスミド構築

それぞれセレクションマーカーが異なる3種類の発現ベクター-pATP423

(*HIS3*)、pATP425 (*LEU2*)、pATP426 (*URA3*) を使用した [49]。これらは *TDH3*、*ADH1*、*PGK1* の3つのプロモーター、ターミネーターを配し、3種類の遺伝子をクローニングできるが、それぞれの発現カセットに *PmeI*、*NotI*、*XbaI* の制限酵素が対応する。FR901512 とロバスタチンの生合成遺伝子、その他 PKS 産物の生合成遺伝子、phosphopantetheinyl transferase である *npgA* の cDNA を合成しクローニングした。RNA の調製と cDNA 合成の手順は以下の通りとした。糸状菌 No. 14919、*Aspergillus. terreus* ATCC 20542、*Aspergillus. nidulans* FGSC A4、*Aspergillus clavatus* NRRL 1 を、ポテトデキストロース培地 (BD-Diagnostic Systems, MD, USA) を用いて 25°C、220 rpm で培養した。菌体を回収後、milliQ 水で洗浄し、液体窒素を用いて凍結させた後、すり鉢で粉末状になるまで破碎した。破碎した粉末を、15 mL の ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) に溶解させ、RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて精製した。精製した RNA を TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, CA, USA) を用いて処理し、SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, MA, USA) を用いて逆転写させた。得られた cDNA の DNA 配列は、PCR を用いて確認した。使用したプライマーを Table 3-1 に示す。得られた cDNA を鋳型として、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, CA, USA) を用いてタグ生成し、発現プラスミドの挿入位置にクローニングした。鎖長の長い配列は、3 kb を目安に分割して In-fusion クローニングを実施した。発現プラスミドの挿入位置にそれぞれ、*PmeI* (*TDH3*)、*NotI* (*ADH1*)、*XbaI* (*PGK1*) が保存されているため、適切な制限酵素処理、連結させることによって遺伝子を入れ替えた。

### 3.2.3 *S. cerevisiae* への形質転換

50 mLファルコンチューブ内に調製した5 mLのYPDA培地 (Clontech, CA, USA) に、*S. cerevisiae* BY4741のコロニーを懸濁し、30°C、220 rpmで一晩、前培養した。500 mL三角フラスコに調製した50 mL YPDA培地に前培養液1 mLを添加し、 $2 \times 10^7$  cells/mLになるまで3-5時間培養した。細胞数が規定数に達したことを血球計算盤を用いて確認した後、50 mLファルコンチューブに移し、800 x g、5分間遠心分離した。得られた沈殿を30 mLの滅菌水で洗浄、再度遠心分離し、1 mLの100 mM 酢酸リチウム (富士フイルム和光純薬, Tokyo, Japan) に菌体を懸濁させた。懸濁液を1.5 mLのエッペンチューブに移し、2,300 x g、1分間遠心分離後、上清を除去し、50  $\mu$ Lの100 mM 酢酸リチウムに回収したものをコンピテントセルとして利用した [50]。導入するプラスミドの組み合わせを確認し、制限酵素処理をせずにpATP423\_xx、pATP425\_xx、pATP426\_xxの各シリーズをそれぞれ1  $\mu$ gずつ混合し滅菌水で70  $\mu$ Lとした。調製したプラスミド溶液と240  $\mu$ L 50%ポリエチレングリコール (Sigma-Aldrich, MO, USA)、31  $\mu$ Lの1 M 酢酸リチウム、5  $\mu$ L Yeastmaker™ Carrier DNA (Clontech) を混合したものに、コンピテントセル50  $\mu$ Lを添加した。穏やかに混合し、30°C、30分間保温後、さらに42°C、20分間保温した。2,300 x g、5分間遠心分離して得られた沈殿を1 mL滅菌水で洗浄、200  $\mu$ L滅菌水に回収した。SD最少寒天培地 (Clontech) に-His/-Leu/-Ura DropOut Supplement (Clontech) を添加した選択培地に20  $\mu$ Lずつスプレッドし、30°Cで3日間静置培養を行った。得られたコロニーを生産培養 (3.2.4参照) して得られる菌体を用いてqRT-PCRを行うことによって、目的の形質転換体であることを確認した (3.2.6参照)。



### 3.2.4 *S. cerevisiae* を用いた生産

3.2.3で得られた形質転換体を10 mLのSD培地 (-His/-Leu/-Ura) に懸濁し、30℃、220 rpmで前培養した。新しい20 mL SD培地 (-His/-Leu/-Ura) に、培養開始OD600が0.1となるように前培養液を植菌し、18℃、220 rpmで72時間培養した。

### 3.2.5 生成物の抽出と UPLC-MS、MS/MS 分析

3.2.4で得られた酵母培養液10 mLに等量の99% 酢酸エチル/1%アセトン溶液を添加し、ボルテックスにより混和した。15,000 x g, 5分間遠心分離し、溶媒層 8 mLを15 mLのファルコンチューブに移した。これを減圧乾固した後、100 µLの0.05 M 水酸化ナトリウム/メタノール溶液に溶解させた。得られた溶液を、Waters Xevo G2 QTof UPLC-MS system (Waters, MA, USA) を用いて分析した。カラムはAcquity UPLC BEH C18 2.1 µm × 100 mmを使用した。流速0.6 mL/minの条件で、0.1%ギ酸を含んだ35%アセトニトリル溶液からアセトニトリル濃度100%への直線濃度勾配下で分離した。MS解析は、ネガティブイオンモード下で行い、目的物の分子量のイオン強度を検出した。標準品として、社内生成品のFR901512と、ロバスタチン (Wako) を使用した。MS/MSは、コリジョンエネルギーを20 eVに設定し、目的物質を開裂させた。

### 3.2.6 *S. cerevisiae* の RNA の抽出と qRT-PCR

*S. cerevisiae*の形質転換体を72時間培養して得られる培養液2 mLを15,000 x g、5分間遠心分離し、得られた菌体を 1 mL ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) に懸濁させ、bead-type MS-100 crusher (TOMY) を用いて

5,500 rpm、60秒間破碎した。ISOGENのプロトコールに従ってRNAを抽出後、TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, CA, USA) を用いて処理した。精製したRNAは、high-capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, MA, USA) を用いて逆転写し、得られたcDNAをStepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) とFast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いてプロトコールに従ってqPCR解析した。使用した全てのプライマーは、Table 3-1に示した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 異種発現による FR901512 生合成遺伝子の確定

第二章で探索したFR901512の推定生合成遺伝子の機能を解明するために、転写因子をコードする*frtE*以外の7つの遺伝子を同時に発現できる発現系をデザインした。この際、発現遺伝子を3つのベクターに分けてクローニングすることとした [49]。その概略図をFig. 3-2に示す。各遺伝子の発現は、qRT-PCRによって確認した (Table 3-2)。3つの発現プラスミドを*S. cerevisiae*で共発現させた結果、UPLC-MS/MSによってFR901512の産生を確認することができた。ネガティブイオンモードで得られた $m/z$  375 のイオンをプリカーサーとしてMS/MSスペクトル解析した結果、FR901512のマスイオンフラグメントに特徴的な $m/z$  315、253、211のMS/MSイオンピークが得られたことから、この化合物はFR901512であることが示された (Fig. 3-4, 3-5)。

### 3.3.2 FR901512 生合成遺伝子の比較解析

本章で開発した発現系では、FR901512の生合成遺伝子のプラスミド上での配置を固定した上で、対応する*A. terreus*のロバスタチンの生合成遺伝子とそれぞれ相同遺伝子同士を入れ替えることにより、コンビナトリアルに発現パターンを変更して比較解析を実施した。その結果、2つのPKS遺伝子について、*frlB*と*lovB* (nonaketide synthase gene) 、または*frlF*と*lovF* (diketide synthase gene) を入れ替えた組み合わせでもFR901512と一致するマスイオンピークが検出された。さらに、*frlF*と*lovF*を入れ替えた場合に得られるFR901512の量は、FR901512の生合成遺伝子のみを用いた場合のそれと同じであった。

FR901512の側鎖はジケチドではなくアセチル基であることから、PKSをコードするである*frlF*がFR901512の生産に不要である可能性が考えられた。そこで、*frlF*を発現システムから除いた形質転換体によるFR901512の生産を検証した。その結果、量は減ったものの、*frlF*を発現システムから除いた場合にもFR901512が産生されていた。また、この時、アセチル基が付加される前の生合成前駆体であるdeacetylated FR901512の蓄積は見られなかった (Table 3-3) 。一方で、アシルトランスフェラーゼをコードする*frlD*を発現系から除いた場合には、FR901512の生産がおおよそ1/3となったことに加え、この前駆体が顕著に蓄積していた。このことから、*frlD*とは異なり、*frlF*はFR901512の生産に必要なことが示された。以上の結果から、以後の解析では*frlF*を除外した発現系を用いることとした。

PKS遺伝子以外のFR901512の生産に補助的な役割をもつ遺伝子の機能を明らかにするために、これらの置換をした際の生産物の解析を行った。*frlA* (シトクロムP450モノオキシゲナーゼ) 、*frlC* (エノイルレダクターゼ) および

*frlG* (PKSからの生成物放出のためのチオエステラーゼ) を、*A. terreus*のそれぞれに対応する遺伝子と置換した。その結果、*frlA*および*frlC*をそれぞれ*lovA*および*lovC*と置換すると、FR901512がほとんど検出されないか、ごく微量生産されただけだった。一方で、*frG*と*lovG*を置換した際には、*frlG*を置換せずに用いた場合よりもFR901512の生産量が多かった (Table 2)。

### 3.3.3 新規スタチンの生合成

様々な遺伝子の組み合わせを検討したところ、FR901512やロバスタチンとは異なる化合物が生産されることが見出された。そこで、次に、これらの構造を決定した。まず、FR901512の*frlF*および*frlD*遺伝子をロバスタチンの*lovF*および*lovD*と置換した。得られた生成物のMS/MS解析の結果、これはFR901512のコア構造にロバスタチンの側鎖であるメチルブチリル側鎖が付加したテトラリン核であることが示された (Fig. 3-6)。

この対照実験として、FR901512と同様に3つのプラスミドを用いてロバスタチンの生合成遺伝子7つを*S. cerevisiae*内で共発現させたところ、生成物のMS/MSスペクトルは市販のロバスタチンの標準スペクトルと一致していたことから、ロバスタチンの産生が確認された (Fig. 3-7, 3-8)。また、*lovD*と*lovF*を欠失させた系へに*frlD*を導入したところ、0-アセチルモアコリン]と考えられる新たな構造のスタチンが得られた (Fig. 3-9)。この化合物は、*lovD*と*lovF*を欠失させ*frlD*を導入しない場合には検出されなかった。

### 3.3.4 MIPS-CG を用いたさらなる新規化合物の生合成

さらに、FR901512とロバスタチンの生合成遺伝子を活用したコンビナトリアル実験をさらに発展させる検討を試みた。3,5-ジメチルオクタジエノン側鎖

を生成するアスペルフラノンのPKSとして知られる*A. nidulance*の*dafoG* (AN1036) [51] と*frIF*を置換することにより、異なるPKS産物への*FrID*の適用性を検証した。しかし、この置換実験は期待された構造を生じなかった。これは、非天然型の側鎖を付加する際には、PKSと相性の良いトランスフェラーゼを組み合わせる必要があることを示唆する。これは、FR901512とロバスタチンの生合成を例に挙げると、コア構造であるテトラリン（またはヘキサヒドロナフタレン）の*frIA*、*frIB*、*frIC*、*frIG*（または*lovA*、*lovB*、*lovC*、*lovG*）グループと側鎖の*frID*、*frIF*（または*lovD*、*lovF*）グループの2つの独立した遺伝子セットが重要であることが考えられる。そこで、異なるコア構造を生合成することができる遺伝子セットを探索するために、生合成遺伝子クラスター内に*frIA*、*frIB*、*frIC*、*frIG*と相同性の高い4つの遺伝子すべてを持つ遺伝子群をMIPS-CGを用いて探索した。MIPS-CGは糸状菌遺伝子データベースから、機能未知な遺伝子も含めて、クエリー遺伝子セットと相同性の高いクラスターを形成する遺伝子セットを検出することができる [52]。その結果、5つの遺伝子クラスターを発見できた。昆虫病原体である*Metarhizium majus* ARSEF 297、*Metarhizium brunneum* ARSEF 3297 (both in Clavicipitaceae, Sordariomycetes) と*Aspergillus clavatus* NRRL 1からひとつずつ、植物病原菌である*Pestalotiopsis fici* W106-1 (Xylariales, Sordariomycetes) から2つである (Table 3-4)。これら*frIA*、*frIB*、*frIC*、*frIG*の相同性遺伝子らの機能を確認するために、*A. clavatus*の当該クラスターを構成する遺伝子 (ACLA\_055640、ACLA\_055680、ACLA\_055660およびACLA\_055670) を、*S. cerevisiae*の発現系を用いて発現させた。その結果、FR901512の前駆体であるジヒドロ-デアセチル (DHDA) FR901512 (Fig. 3-3) に対応するピークを生じる化合物が得られた。この化合物は側鎖を導入するために必須なヒ

ドロキシル基を欠いており、DA-FR901512は検出されなかった。さらに、モナコリンJもジヒドロモナコリンLも検出されなかった。

### 3.4 考察

本章では、*S. cerevisiae*を用いて新規スタチンを作製するための発現系を開発した。この発現系を用いることでFR901512の生産が確認されたことから、糸状菌No. 14919の持つFR901512の推定生合成遺伝子クラスターがFR901512の生合成に関わることが顕となった。

本研究では、*S. cerevisiae*の標準的な発現システムを使用して様々なスタチン類縁体を生産することができた。*S. cerevisiae*をスタチンの工業生産に用いることは困難である [42]。一方で、*S. cerevisiae*を利用することで複数の効率的な発現ベクターが利用できることは発現遺伝子の組み合わせを多様化させる上で利点である。本研究では、この利点を生かすことで多様な類縁体の生産が可能となったと考えられる。このシステムは用いる遺伝子の数をスケラブルに増やすことが可能である。今後、多くの配列情報を集めることで、さらに多くの新規スタチン類縁体を生産できることが期待できる。

本研究では、まず、pATP423ベクターに、*frlA*、*frlC*と*frlD*の3遺伝子をクローニングした。*frlA*の推定機能はテトラリン核を修飾するP450 monooxygenaseである。*frlC*は*frlB*から独立しているERドメインであり、*frlB*と共同してスタチンの主骨格を形成する。*frlD*は2つのポリケチド鎖を連結するtrans-esteraseの役割を担う。2つ目のプラスミドpATP425には、nonaketide PKSに関連する3つの遺伝子、*npgA*、*frlB*、*frlG*をクローニングした。*npgA*は、PKSの活性化に必要な*Aspergillus nidulans*が持つphosphopantetheinyl

transferaseである [53]。 *frlG*は*frlB*から生合成したポリケチド鎖をリリースするthioesteraseである。3つ目のプラスミドpATP426には、diketide PKSの *frlF*とスタチン耐性のために存在するとされるHMG-CoA還元酵素 *frlH*をクローニングした。この遺伝子座で配置を固定した上で、相同遺伝子同士を入れ替えることでコンビナトリアル発現系を実現した。

本研究によるコンビナトリアル発現を用いた解析の結果、FR901512とロバスタチンの生合成遺伝子機能の違いについての多くの知見が得られた。*frlB*と *lovB* (nonaketide synthase gene)、または*frlF*と*lovF* (diketide synthase gene) を入れ替えてもFR901512構造をもつ化合物が生産されたことから、これら2つのPKS遺伝子がFR901512やロバスタチンの主骨格の構造を決定しないことが示された。おそらく主骨格の構造は、その他の補助遺伝子との協調によって決められると予想される [54]。糸状菌No. 14919の*frlF*は、RNA-Seqによる遺伝子発現解析が示す発現量は他の生合成遺伝子より低く、クラスターを形成する他の*frl*遺伝子とは離れて存在していることは、FR901512の生産に必須ではないことと合致する。

*S. cerevisiae*によるFR901512の生合成に際して、*frlF*だけでなく*frlD*も必要ではなかった。両者がいない状態でFR901512前駆体にアセチル基が付加されるメカニズムは現在のところ不明である。アセチルCoAは菌体内に定常的に存在することから、*S. cerevisiae*は*frlD*がコードするアシルトランスフェラーゼの機能を代替することができる酵素遺伝子を持つのかもしれない。これは、*S. cerevisiae*のみで起こる特異的な反応であり、糸状菌No. 14919においてはFR901512の生合成には*frlD*が必須であることも考えられる。PKS以外をコードする遺伝子の解析によって、FR901512の生合成に*frlA*と*frlC*が必須であることが明らかになった。特に、*frlA*によるテトラリン核の認識およびアセチル側

鎖の転移のためのヒドロキシル基の付加は重要なステップであり、この機能は *lovA* の発現によって完全に補完されることはなかったことは興味深い。これらは、生合成遺伝子が協同してFR901512の生産に寄与していることを示すものである。

*frlG* とは対照的に、2つのPKS遺伝子またはそれらの生産物同士の結合に必要な酵素をコードする *frlD* を *lovD* に置換しても、FR901512の産生が妨げられなかったことも非常に興味深い。FR901512の *frlF* および *frlD* 遺伝子をロバスタチンの *lovF* および *lovD* と置換した結果、メチルブチリル基が付加されたFR901512のコア構造体が確認された。これより、LovDとLovFが共に機能し、LovDがヘキサヒドロナフタレンだけでなくFR901512のテトラリンコアも認識し、修飾できることが見出された。また、ロバスタチン生合成遺伝子の組み合わせでは、FR901512の場合とは異なり、LovDまたはLovFを発現パターンに組み合わせに入れていないと、ロバスタチンの産生が抑制され、メチルブチリル側鎖を持たないロバスタチンの前駆体であるモナコリンJの蓄積をもたらす (Table 3-3、Fig. 3-3)。また、*lovD*、*lovF* 欠失系への *frlD* の導入は、新しいスタチン構造であるO-アセチルモアコリンJをもたらしたが、この構造の創出には *frlD* が必須であることが示された。これらの知見は、*FrID* がLovDと同様に、ヘキサヒドロナフタレンのみならずモナコリンJのテトラリンコアにもアセチル部分を転移することができるが、LovDとは異なり、*FrID* は *FrIF* とは独立して機能する点でユニークである。*FrID* の広い特異性は、LovFと協調してシンバスタチンを産生するためにジメチルブチリル部分を受け入れることができるLovDの可塑性に似ている [54, 55, 56]。

さらなるスタチン類縁化合物の生合成を行うために、MIPS-CGを用いてコンビナトリアル実験を発展させる検討を試みた。コア構造であるテトラリン (ま



たはヘキサヒドロナフタレン) の *frlA*、*frlB*、*frlC*、*frlG* (または *lovA*、*lovB*、*lovC*、*lovG*) グループをベースに検索した結果、得られた遺伝子クラスター群は一様に、*frlA*、*frlB*、*frlC*、*frlG*に加えてdiketide PKSである *frlF*を含んでいるが、*frlD*とHMG-CoA還元酵素である *frlH*のホモログ遺伝子は含んでいなかった。*frlH*が含まれていないことから、検出されたクラスター遺伝子の産物はスタチンではないと予想される。それでも、*A. clavatus*の当該クラスターを構成する遺伝子を *S. cerevisiae*の発現系を用いて発現させた結果、FR901512の前駆体であるジヒドロ-デアセチル (DHDA) FR901512に対応するピークを生じる化合物が得られた。*frlA*ホモログも発現しているものの、ヒドロキシル基が欠如しているのは、*frlA*に対応するACLA\_055640が活性型として発現していないか水酸化以外の機能を持つためであると考えられる。

本研究では、新たな類縁体や関連遺伝子の機能の情報を得ることはできなかった。しかしながら、本研究で抽出された、ACLA\_055640、ACLA\_055680、ACLA\_055660およびACLA\_055670を含む生合成遺伝子クラスターが何を生合成するのは未知であるものの [57]、FR901512前駆体の構造物が検出されることを見出した。全くもって新規構造体の検出には、検出方法やその感度向上に工夫が必要であるが、MIPS-CGによって見出された機能未知のホモログ遺伝子を組み合わせで発現させ、そのサイクルを繰り返していくことで、ベースとしたコア構造に対する有用な修飾酵素は得られると考えられる。さらなるMIPS-CGを用いた遺伝子探索によって新たなスタチン生合成系関連遺伝子を見出し、本研究で用いた発現系に導入することによって、数多くの新たなスタチン類縁体を得ることが可能なはずである。

Table 3-1 本章で使したプライマー一覧 (1/6)

Name	Sequence
<i>npgA</i> of <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	
npgA_PmeI-F	atacacctagggtttaaacATGGTGCAAGACACATCAAG
npgA_PmeI-R	cgcgccgcccgtttaaacTTAGGATAGGCAATTACACA
FR901512 biosynthetic genes of Fungal sp. No.14919	
frlA_PmeI-F	atacacctagggtttaaacATGGAGGCCTTCAACTCT
frlA_PmeI-R	cgcgccgcccgtttaaacCTAGACGTGGAATTCCTCCT
frlB_NotI-F	gacacgcgtgcggccgcATGGCTCCTTCAATACCCAA
frlB_NotI-R	taaattcacgcggccgcTTAACCCGCTACCCCTTGG
frlB_mid1-R	cttgctgatgctcaaTCCCATG
frlB_mid2-F	ttgagcatcgacaagGCCATCA
frlB_mid2-R	actcagcttgattcGATAACG
frlB_mid3-F	gaatccaagctgagtGCTTCGA
frlC_NotI-F	gacacgcgtgcggccgcATGGGGTCGTCGGCGCCAGA
frlC_NotI-R	taaattcacgcggccgcCTAGGCCACCCGAACCACAA
frlD_XmaI-F	aatataaaacccccgggATGCAAGATATTGAAAGAGC
frlD_XmaI-R	tcggcgcgccccgggTCAATCGTTTCTCAGCTGCT
frlF_NotI-F	gacacgcgtgcggccgcATGTCTGTGCAACCCATTGC
frlF_NotI-R	taaattcacgcggccgcTCAAGAGATCTTGGCATTAC
frlF_mid1-R	agtcgatgttcacgATTGATG
frlF_mid2-F	cgtggaacatcgactGGAAGCC
frlG_XmaI-F	aatataaaacccccgggATGACCGCACACAGGTGGA
frlG_XmaI-R	tcggcgcgccccgggTCATTCATTTGGTATAAATC
frlH_PmeI-F	atacacctagggtttaaacATGTTTGCCGCGGCATCGTTGA
frlH_PmeI-R	cgcgccgcccgtttaaacTCAGGCCCCAGCCGGCGGAG
lovastatin biosynthetic genes of <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	
lovA_PmeI-F	atacacctagggtttaaacATGACTGTGACGCGCTCAC
lovA_PmeI-R	cgcgccgcccgtttaaacCTATAGTGAACCAGGAAGGC
lovB_NotI-F	gacacgcgtgcggccgcATGGCTCAATCTATGTATCC
lovB_NotI-R	taaattcacgcggccgcTCATGCCAGCTTCAGGGCGG
lovB_mid1-R	atgcgatgcatcaaGCCATTC
lovB_mid2-F	ttgatggacatgcattGCAAGG
lovB_mid2-R	gcatgcaatgtagcCAGGACT
lovB_mid3-F	gctaacattgcatcTCGCGAC
lovC_NotI-F	gacacgcgtgcggccgcATGGGCGACCAGCCATTCAT
lovC_NotI-R	taaattcacgcggccgcTTACGGCCCTCGAGCCGAA
lovD_XmaI-F	aatataaaacccccgggATGGGATCCATCATTGATGC
lovD_XmaI-R	tcggcgcgccccgggTTAACCTGCTGGTACTGCG
lovF_NotI-F	gacacgcgtgcggccgcATGACACCATTAGATGCGCC
lovF_NotI-R	taaattcacgcggccgcCTAAGCTTTGTATCTCTGCA
lovF_mid1-R	gatgtctggagcccaATGCCAG
lovF_mid2-F	tgggctccagacatcAGCTTAG

In-fusion Cloning のためのオーバーラップ配列は小文字で表記した。

Table 3-1 本章で使したプライマー一覧 (2/6)

Name	Sequence
<b>lovastatin biosynthetic genes of <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 (continued)</b>	
lovG_XmaI-F	aatataaaacccccgggATGCGTTACCAAGCATCTCC
lovG_XmaI-R	tcggcgccccccgggCTACTCCAATGTCTGGGCCG
ivrA_PmeI-F	atacacctagggttaaacATGGATCCGGTGGTTAGAAA
ivrA_PmeI-R	cgcgccggccgttaaacTTACCTACCTAAGTTACATG
lovI_XmaI-F	aatataaaacccccgggATGACATCCCACCACGGTGA
lovI_XmaI-R	tcggcgccccccgggTCATTCGCTCCGTCCTTTCTC
<b>biosynthetic genes of <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4</b>	
afoG_NotI_F	gacacgctgctggccgcATGGGACGACATCTTCCGAG
afoG_NotI_R	taaattcacgcgccgcTCAAGCAACAACGACAGTTCCC
afoG_mid1_R	ccacgactgtcacgtTCGCTTC
afoG_mid2_F	acgtgacagtctgtgACGAGGC
<b>biosynthetic genes of <i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1</b>	
A_ACLA_055740_PmeI-F	atacacctagggttaaacATGTTCCGCGAGAATCTTGG
A_ACLA_055740_PmeI-R	cgcgccggccgttaaacTTATGAAGAAATCTTTCTCCCG
B_ACLA_055680_NotI-F	gacacgctgctggccgcATGACCCAATCTGAAGCCCG
B_ACLA_055680_mid1-R	cgatggagaggttcaGAACTTCC
B_ACLA_055680_mid2-F	tgaacctctcatcgACAAGGC
B_ACLA_055680_mid2-R	gcctcaaccagacactGAGACGC
B_ACLA_055680_mid3-F	gtgtctggttaggcGTCCGG
B_ACLA_055680_NotI-R	taaattcacgcgccgcTCAAGCCCTCGATTTGGCCC
C_ACLA_055660_NotI-F	gacacgctgctggccgcATGGGATCGGTTGATACTGC
C_ACLA_055660_NotI-R	taaattcacgcgccgcCTAGCTGACTAGACGAACCACAC
G_ACLA_055670_XmaI-F	aatataaaacccccgggATGTCTAGGGTACCGTCCAAAGC
G_ACLA_055670_XmaI-R	tcggcgccccccgggTCAATTTGGCGCGTCAATTG
<b>Sequencing primer</b>	
ADH1_seqF	CTCGTCATTGTTCTCGTTCC
ADH1_seqR	CCTACAGGAAAGAGTTACTC
TDH3_seqF	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG
TDH3_seqR	CAATGCAATAGCGCATCAAG
PGK1_seqF	CTTGCAATAATTGGTCAATGC
PGK1_seqR	CATAAAGGCATTAAGAGAGGAGCG
frlA_seq	CGCGCATCTAGTCAACAATG
frlB_seq1	TCGGCTGTCGTATTTCTTCG
frlB_seq2	TGAAAACATTAAGTCGGGCAC
frlB_seq3	AACCATCTAACTTCTTCACTGC
frlB_seq4	ATCTCAAGAAACGCTCAACC
frlB_seq5	GCGTTTCAAGGTCGCGTCTG
frlB_seq6	AGGCTCTCCCACTGTATCCC
frlB_seq7	TGGAAATCTCTCAAGGCG
frlB_seq8	ACAAGATCCACTTCAATTCCTC

In-fusion Cloning のためのオーバーラップ配列は小文字で表記した。

Table 3-1 本章で使したプライマー一覧 (3/6)

Name	Sequence
Sequencing primer (continued)	
friB_seq9	ACAGATGTGTGAGAGGTGCG
friB_seq10	ACCTTTACTGATCTCTCTTC
friB_seq11	GAGCCCAACTCTTCCTCCTTG
friB_seq12	CTGGGATTTCTGTACCTTAC
friB_seq13	GCAACATGTCTTCCACCAACG
friB_seq14	CGAGATGATGGAATGGTCC
friB_seq15	AAGAGCGAAGAGAGCCAAGG
friB_seq16	GAGGCGGCAACAAGACTACC
friB_seq17	TATTGGTCCTCGGCTACAGC
friC_seq	GAGAATGTGCTGTTTATGGC
friD_seq	CGAACCAACCCCTTTCGTC
friF_seq1	GTTCATAGAGAAGAGAAAAGTGC
friF_seq2	TTGTCCTTAAGCGGATGTCG
friF_seq3	CTGTCATTAAGAGCATTCTC
friF_seq4	AAGAACTCACTTCACTGGC
friF_seq5	GTTTGTATGTTTGGTGACAC
friF_seq6	ACACGAAATCTCTAGGCGAG
friF_seq7	AATATGGCGGAACTGGATTC
friF_seq8	TCGGGCTTGTATTTGGCAAG
friF_seq9	AGCAAGACTTTCGGGACCG
friF_seq10	GACAAGCTATCCAACATCCGC
friF_seq11	AAGTTATCGACGGGGTGGTC
friF_seq12	ATATTGGAGACTTGGGAAAG
friF_seq13	CAACAGAATGACATGGGACG
friF_seq14	TCTTCAAAAATCCGAGCTGC
friH_seq1	AACAGATGCAAAGAGCCAGG
friH_seq2	TGTCTTGTCCCATGCGCTGG
friH_seq3	AGATACGATCCTAAACGCCG
friH_seq4	GCCATCTCCGTCGTGTTCTAC
friH_seq5	TTGACGGACGAAGTTATTTTC
lovA_seq1	ATGCACATCTCATCCAAG
lovA_seq2	ATCCAGTGGTTCGAGGATACTG
lovB_seq1	TGCGTCCAACCGCATCTCG
lovB_seq2	ACAGGTGCCAATTCTTCGAG
lovB_seq3	CATGGAGCCAGAGCAAAACC
lovB_seq4	TCCAACGTCCAATATGCTAC
lovB_seq5	CTAGAAGAGTGTGTTGTGC
lovB_seq6	CTGTATGAGTGTGTGGAAGC
lovB_seq7	TAGCGACCAGCACCATCTTC
lovB_seq8	TGACATTGTGGTGTGTTGACG

Table 3-1 本章で使用したプライマー一覧 (4/6)

Name	Sequence
Sequencing primer (continued)	
lovB_seq9	GATATTCTGGAGATTGGAGC
lovB_seq10	TAGTACCCATGCAATTGACG
lovB_seq11	ATAACCGAATGAACTCCTCG
lovB_seq12	CTCGTTCTGAATCCCCCAG
lovB_seq13	AACATATCTCCTGGTCGGAC
lovB_seq14	TGCAATTCGGTTCATGTTCCG
lovB_seq15	GAGAATGAAGTTTCGGGACG
lovB_seq16	TCTGCTGGTTGTGGCTTACC
lovC_seq	CTGGATTGGCGATGAAGTTG
lovD_seq	TCGTACGTCTTCCTCCATCC
lovF_seq1	AGTACCGACTCATACTTGAAG
lovF_seq2	TCCGATGGGATTTCTACTC
lovF_seq3	TCATGGATACCAACCGATGG
lovF_seq4	AAGCAAGTCAGCCGACCAAG
lovF_seq5	ACAGGTTCCATTACAGAGTG
lovF_seq6	CGTGTGACATCCCTTATCTG
lovF_seq7	CGACATCAGTTACATCCTAC
lovF_seq8	GTAGCAGTTTTTGTGAGGC
lovF_seq9	GAAATGATCTGTGCCTGGG
lovF_seq10	TCACTAAGCCCTACGATGTG
lovF_seq11	CAAGGAGCGACAATGAAGTC
lovF_seq12	GACCACAAGCCGACCAACG
lovF_seq13	TGATATTCTCTACTGGCAGC
lovF_seq14	GTTCAGGGAAGTTGGAATCTG
ivrA_seq1	CTCTTGTACCCCTCGATCTAC
ivrA_seq2	GTGCTGTTCTCTCGGTGTCG
ivrA_seq3	ATATGGCTAATGGTACTCTGC
ivrA_seq4	AGTCATTGCTCCCTTATCGC
ivrA_seq5	AAGAACCTGGTCGGGAGTGC
lovI_seq1	GCTCACCAATGGCGCAATCACC
lovI_seq2	CTCCCAGGAACTGATACATGAC
afoG_seq1	CAAGCGTGACTGTAGACACC
afoG_seq2	GGATTGGCTCTGTCAAGACG
afoG_seq3	AACGCAGCACCGCACTCGCTTC
afoG_seq4	CCATGGCAGCAGACAAGACG
afoG_seq5	TTCACTGATATGGTGCTTGG
afoG_seq6	TGCAGGATTCGTGTCTCG
afoG_seq7	GACGACGCTCGACTCAATCG
afoG_seq8	TGGCAAATCTCGATTCCAC
afoG_seq9	AGCTGGCACTTTACTGACATC

Table 3-1 本章で使用したプライマー一覧 (5/6)

Name	Sequence
<b>Sequencing primer (continued)</b>	
afoG_seq10	TTCGAGCCCTGAGAAGGTGG
afoG_seq11	GAGTTCGCTCTGCGAGACG
afoG_seq12	ACGACCACATCTTCAACTCTC
afoG_seq13	AGCTGGATGGTCGAACACG
afoG_seq14	AATCAAAGATGTCGGCTACGTC
afoG_seq15	TAGTATCCTGCAGAGTGTG
A_ACLA_055740_seq1	CTCCCGAACTGGGTGAGCATG
A_ACLA_055740_seq2	CTGATTGTGCTTCCTGGAGCAG
B_ACLA_055680_seq1	CCTCGACAACCAGAACTACGATC
B_ACLA_055680_seq2	GCCAATACTTCGAAGCGCACG
B_ACLA_055680_seq3	CCACCATGGAGGAGCTGAGTC
B_ACLA_055680_seq4	CACTTCGAGGCATGCAGGTAG
B_ACLA_055680_seq5	CATCGAAGTTGGAGCTCATCC
B_ACLA_055680_seq6	CAGCATGGTCGAGATCAACCTC
B_ACLA_055680_seq7	CCTACTGGAATTGATCGCATTGC
B_ACLA_055680_seq8	GGTGAAGGAGCCTTGGACACAC
B_ACLA_055680_seq9	GAAGTTGCACACCGTGAGCAC
B_ACLA_055680_seq10	GCAACTTGATGCCTTGCAAACC
B_ACLA_055680_seq11	GTGACGGTCCAGTGAGTAC
B_ACLA_055680_seq12	GCCAGATGTCTCCGTCTAGC
B_ACLA_055680_seq13	CCTTTGGACCACTGGTCCTCC
B_ACLA_055680_seq14	GGATCCTGCTAACCATGACCG
B_ACLA_055680_seq15	CCTGCGATGAGGATGGCTTTG
B_ACLA_055680_seq16	CGATGGCTGGACCACTGAAC
<b>qRT-PCR primer</b>	
HTA1_qF	GCTGGTTTGACATTCCCAGT
HTA1_qR	CCAATTGCAAATGTCTTGGA
HIS3_qF	CCTCCACGTTGATTGTCTGCG
HIS3_qR	GGAACATCGTTGGTACCATTGG
LEU2_qF	CCAGCAACATGTTTGGTGATATC
LEU2_qR	CGTGCCATGGTTCGTACAAAC
URA3_qF	CAGTATAGAACCCTGGATGATGTGG
URA3_qR	CTGGCCGCATCTTCTCAAATATG
frlA_qF	CTAACACGAGCGTGGATCAGTATG
frlA_qR	GAAAGCACGATAGACCGCTTG
frlB_qF	CAAGACCGCGCTCATCACGTTT
frlB_qR	GCTGTCTGGTCCAGACGTCCTTC
frlC_qF	CAGTGACGAGATGAGGCAGTTC
frlC_qR	CGAACCACAATCTTCTCTCCGG

Table 3-1 本章で使用したプライマー一覧 (6/6)

Name	Sequence
qRT-PCR primer (continued)	
friD_qF	GTCGGCAAGGTTTCGATGAGC
friD_qR	CTCTCAAATGCGCAACCAAGTTC
friF_qF	CTCGAGGCGTTGCTAGAGAAGC
friF_qR	GGAGACGTCGGAGCCAATCTC
friG_qF	CGAGAAACCGCTCATCAACGTC
friG_qR	GTCTCAACGTCGTGTCGCATG
friH_qF	CATCATCGCAGCTGCAGTCATG
friH_qR	CTAGAACCATGGCTCGCAGGTG
lovA_qF	CCGGTTCTTTGCTCTAAGGAG
lovA_qR	CATGAGCTTCGTGGTGGGATG
lovB_qF	GGGTGCCAAGATAACCGAGGTG
lovB_qR	GTGAGCCTCGTAGCGGGAACTC
lovC_qF	GCAGTTCGGCGAGGATCTGTG
lovC_qR	CGACAGCTCTCCCTTCCGGAC
lovD_qF	CGCCGAAAAGGTTCTTGACC
lovD_qR	GCTCGAATGTGCGTGTGAGATC
lovF_qF	GTGATCATGGAGGCGATGAGC
lovF_qR	CTGTGATCCAGTTCGGGAGCTC
lovG_qF	GGAACTGGTCATTTCGGATACCG
lovG_qR	GTCGATTGGGAACTGATGCTGC
ivrA_qR	GCACGAAATGGATGTCTCCCG
ivrA_qF	GGTCACTTGGTCAATGCCCATATG
lovI_qF	CAATATGCGCCAACCCTCAATG
lovI_qR	CAGGCGAAGATGAAGGTAGCTCC
npgA_qF	CGGTGATTACCTATTTGCAACGG
npgA_qR	CACAGGGCTGGATATCTCGCTC

FR901512 (Fungus sp. No.14919)



lovastatin (*Aspergillus terreus*)



mevastatin (*Penicillium citrinum*)

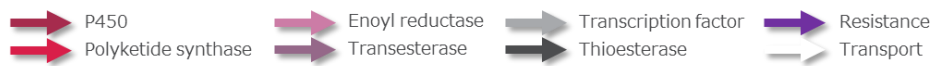


Fig. 3-1 FR901512、ロバスタチン、メバスタチンの推定生合成遺伝子

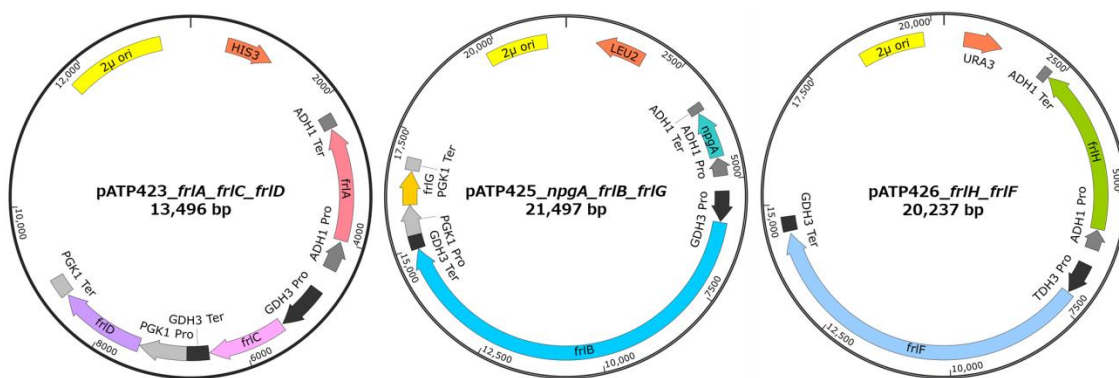


Fig. 3-2 FR901512 の発現に用いたプラスミド



Table 3-2 RT-qPCR 結果

	Promoter	Gene	Empty Vector	FR901512						
				FR901512 all	FR901512 $\Delta$ frIF	FR901512 $\Delta$ frIDF	FR901512 $\Delta$ frIADF	FR901512 $\Delta$ frIF Ex.A	FR901512 $\Delta$ frIF Ex.B	FR901512 $\Delta$ frIF Ex.C
		<i>HIS3</i>	2.3±0.6	10.8±1.3	12.3±3.9	12.4±1.5	13.7±0.4	12.1±0.4	13.7±0.3	11.5±1.8
pATP423	$P_{ADH1}$	<i>frIA</i>		21.9±2.1	14.8±4.2	36.1±3.6			31.1±1.1	33.1±4.9
		<i>lovA</i>					15.3±1.2			
	$P_{TDH3}$	<i>frIC</i>		43.7±8.3	45.5±12.2	51.9±5.3	73.4±10.0	8.9±1.2	34.2±1.5	
		<i>lovC</i>								37.0±5.2
$P_{PGK3}$	<i>frID</i>		19.6±2.0					3.3±0.5	19.5±1.2	19.8±2.6
	<i>lovD</i>									
		<i>LEU2</i>	3.2±1.2	13.8±3.0	24.0±7.1	19.2±1.8	14.8±0.2	10.1±0.6	30.0±1.0	20.4±2.6
pATP425	$P_{ADH1}$	<i>npaA</i>		11.4±2.4	21.2±5.5	16.5±1.8	12.3±2.0	7.9±0.3	16.5±0.7	18.1±2.5
		<i>frIB</i>		28.8±1.9	13.6±4.0	48.8±5.2	43.6±4.4	28.2±0.5		40.3±4.1
	$P_{TDH3}$	<i>lovB</i>							50.0±1.8	
		<i>frIG</i>		1.7±0.6	0.9±0.2	2.3±0.1	1.8±0.1	0.9±0.0	2.1±0.1	2.0±0.3
$P_{PGK3}$	<i>lovG</i>									
		<i>URA3</i>	1.8±0.5	4.2±0.3	7.4±2.4	7.3±0.6	5.0±0.6	3.4±0.0	7.9±0.3	7.5±1.2
pATP426	$P_{ADH1}$	<i>frIH</i>		2.3±0.1	10.6±3.4	11.0±1.3	6.3±0.6	3.0±0.2	10.1±0.6	8.2±1.9
		<i>ivrA</i>								
	$P_{TDH3}$	<i>frIF</i>		48.5±3.9						
		<i>lovF</i>								
$P_{PGK3}$	<i>lovI</i>									

	Promoter	Gene	FR901512				lovastatin			
			FR901512 $\Delta$ frIF Ex.D	FR901512 $\Delta$ frIF Ex.G	FR901512 Ex.F	FR901512 Ex.DF	lovastatin all	lovastatin $\Delta$ lovDF	lovastatin $\Delta$ lovADF	lovastatin $\Delta$ lovF Ex.D
		<i>HIS3</i>	11.0±0.3	8.2±0.2	6.2±1.1	11.1±0.9	22.5±3.0	10.4±1.0	8.8±1.5	31.1±2.2
pATP423	$P_{ADH1}$	<i>frIA</i>	30.6±0.5	20.4±2.3	14.1±1.6	43.3±2.8				
		<i>lovA</i>					41.2±3.3	18.2±1.2		24.4±5.2
	$P_{TDH3}$	<i>frIC</i>	46.0±4.9	35.3±3.7	32.4±4.3	76.5±11.0				
		<i>lovC</i>					83.3±10.6	52.5±4.2	48.8±7.6	74.1±8.8
$P_{PGK3}$	<i>frID</i>		15.5±3.1	10.8±1.5					25.0±7.6	
	<i>lovD</i>	13.4±0.2			27.5±1.8	28.8±3.4				
		<i>LEU2</i>	18.8±0.4	12.4±0.9	8.9±1.6	15.4±0.7	13.6±2.1	9.3±0.2	8.9±0.4	29.2±1.9
pATP425	$P_{ADH1}$	<i>npaA</i>	20.7±0.6	11.9±0.6	8.7±0.6	24.4±2.3	14.6±3.4	8.6±0.3	8.2±0.6	46.8±7.0
		<i>frIB</i>	46.3±2.8	29.2±2.0	19.0±3.3	40.3±2.4				
	$P_{TDH3}$	<i>lovB</i>					46.5±3.2	55.1±9.3	48.9±12.3	40.6±7.4
		<i>frIG</i>	2.4±0.1		1.2±0.1	5.9±0.5				
$P_{PGK3}$	<i>lovG</i>		4.5±0.8			6.7±0.9	6.8±0.3	5.2±0.9	10.2±0.1	
		<i>URA3</i>	7.3±0.5	4.9±0.4	2.8±0.5	3.9±0.2	3.8±0.3	2.9±0.1	2.9±0.4	4.3±0.5
pATP426	$P_{ADH1}$	<i>frIH</i>	10.7±0.5	6.9±1.2	2.1±0.3	4.5±0.0				
		<i>ivrA</i>					7.8±1.1	33.6±4.0	26.3±1.8	44.5±8.8
	$P_{TDH3}$	<i>frIF</i>								40.9±4.5
		<i>lovF</i>			14.4±1.7	29.8±1.4	5.7±0.5			
$P_{PGK3}$	<i>lovI</i>					8.3±1.5				

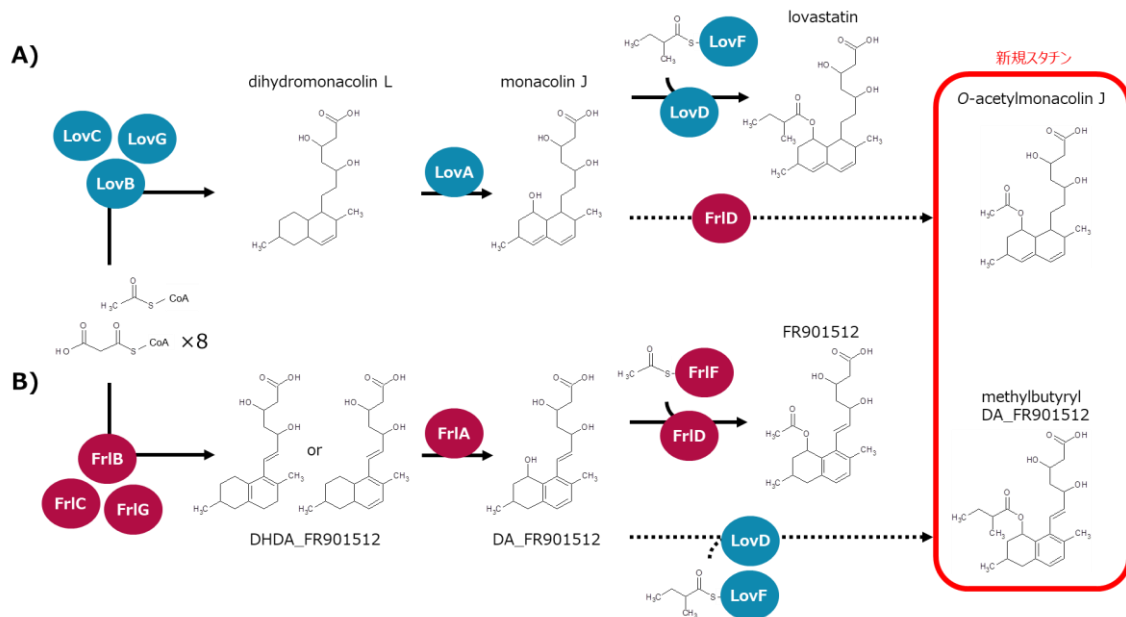


Fig. 3-3 ロバスタチン、FR901512 の生合成経路

Table 3-3 *S. cerevisiae* での遺伝子発現パターンと検出物質

	Gene Expression Pattern → empty → FR901512 <i>frfX</i> → Lovastatin <i>lovX</i> A B C D F G	FR901512				lovastatin			
		FR901512	DA_FR901512	DHDA_FR901512	methylbutyryl DA_FR901512	lovastatin	monacolin J	dihydro-monacolin L	O-acetyl-monacolin J
		m/z 375.18	m/z 333.17	m/z 319.07	m/z 417.23	m/z 412.26	m/z 337.20	m/z 323.22	m/z 379.21
Empty Vector	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_all	→→→→→→	+	+	+	+	+	+	+	+
FR901512_ΔF	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔDF	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔADF	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExA	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExB	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExC	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExD	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExE	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExF	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ΔF_ExG	→→→→→→	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
FR901512_ExF	→→→→→→	+	+	+	+	+	+	+	+
FR901512_ExDF	→→→→→→	+	+	+	+	+	+	+	+
lovastatin_all	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+
lovastatin_ΔDF	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+
lovastatin_ΔADF	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+
lovastatin_ΔF_ExD	→→→→→→	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+

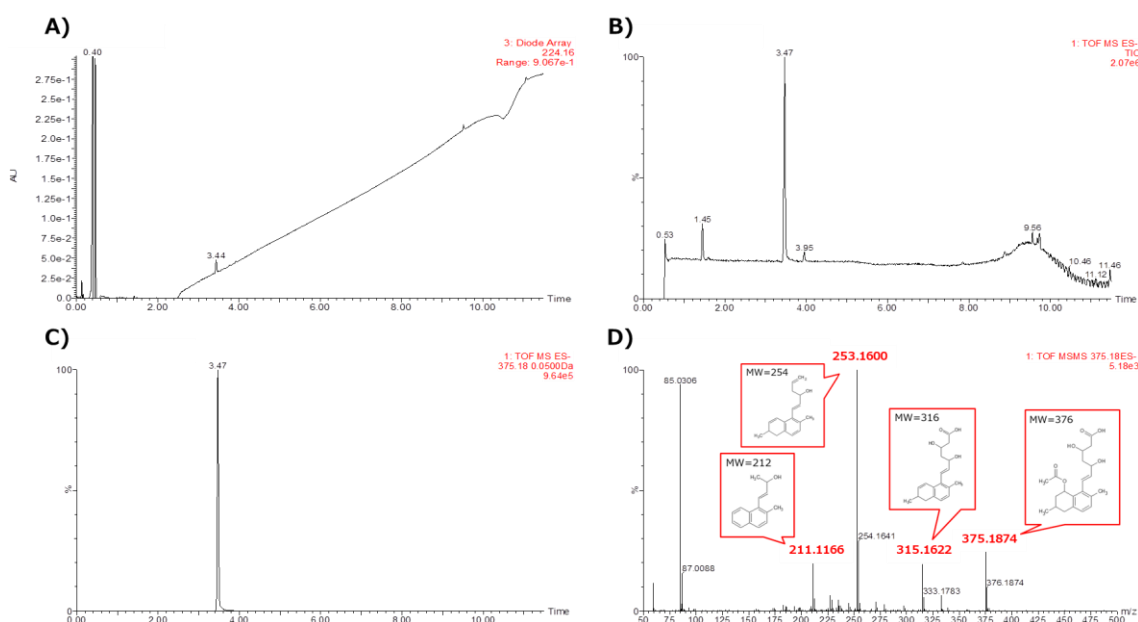


Fig. 3-4 FR901512 標準品の LC-MS、MS/MS スペクトル

A) UPLC クロマトグラム (224.16 nm) 、 B) トータルイオンクロマトグラム、 C) MS スペクトル ( $m/z$  375.18) 、 D) MS/MS スペクトル。ネガティブイオンモードで検出し、MS/MS はコリジョンエネルギーを 20 eV とした。

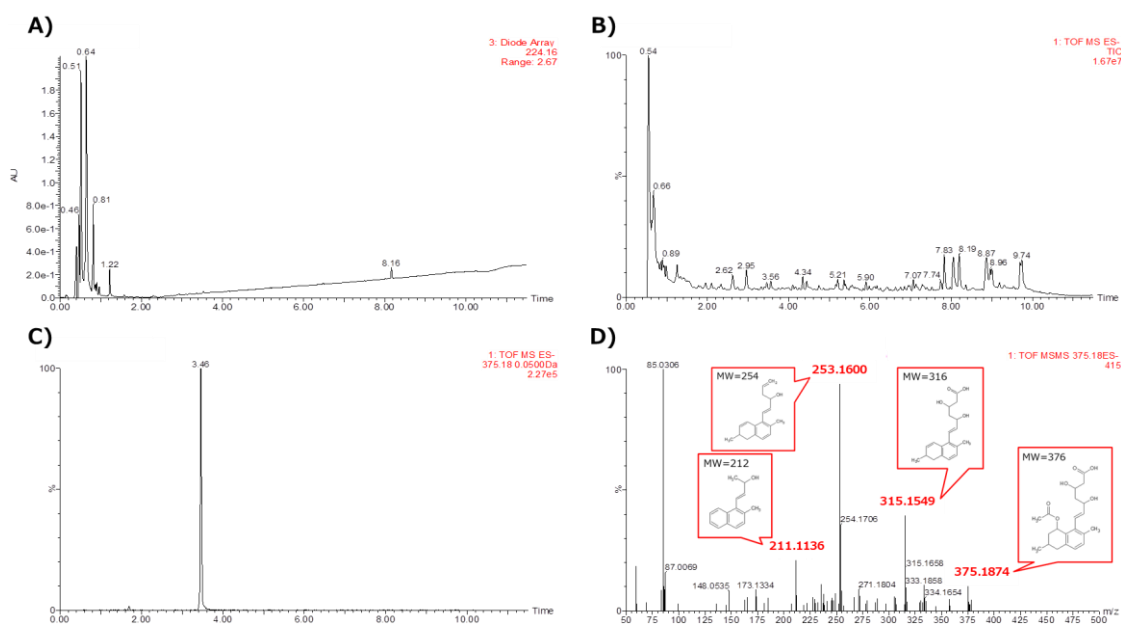


Fig. 3-5 *S. cerevisiae* によって産生された FR901512 の LC-MS、MS/MS 解析

A) UPLC クロマトグラム (224.16 nm) 、 B) トータルイオンクロマトグラム、 C) MS スペクトル ( $m/z$  375.18) 、 D) MS/MS スペクトル。ネガティブイオンモードで検出し、MS/MS はコリジョンエネルギー 20 eV とした。

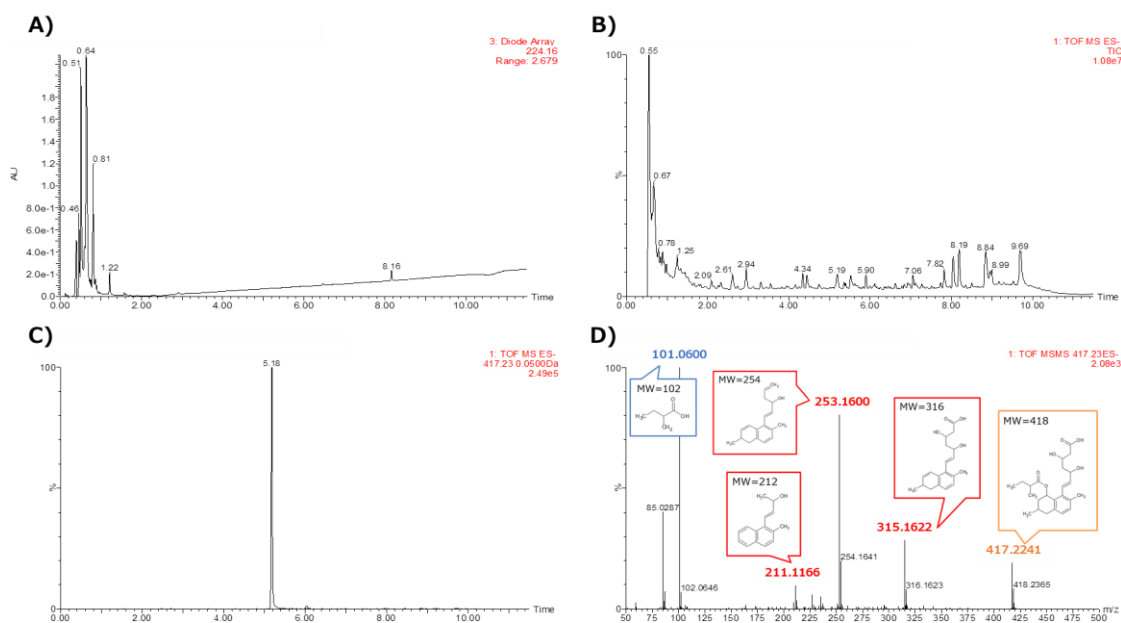


Fig. 3-6 *S. cerevisiae* によって産生された Methylbutyryl-DA-FR901512 の LC-MS、MS/MS 解析

A) UPLC クロマトグラム (224.16 nm)、B) トータルイオンクロマトグラム、C) MS スペクトル ( $m/z$  224.16)、D) MS/MS スペクトル。ネガティブイオンモードで検出し、MS/MS はコリジョンエネルギー 20 eV とした。

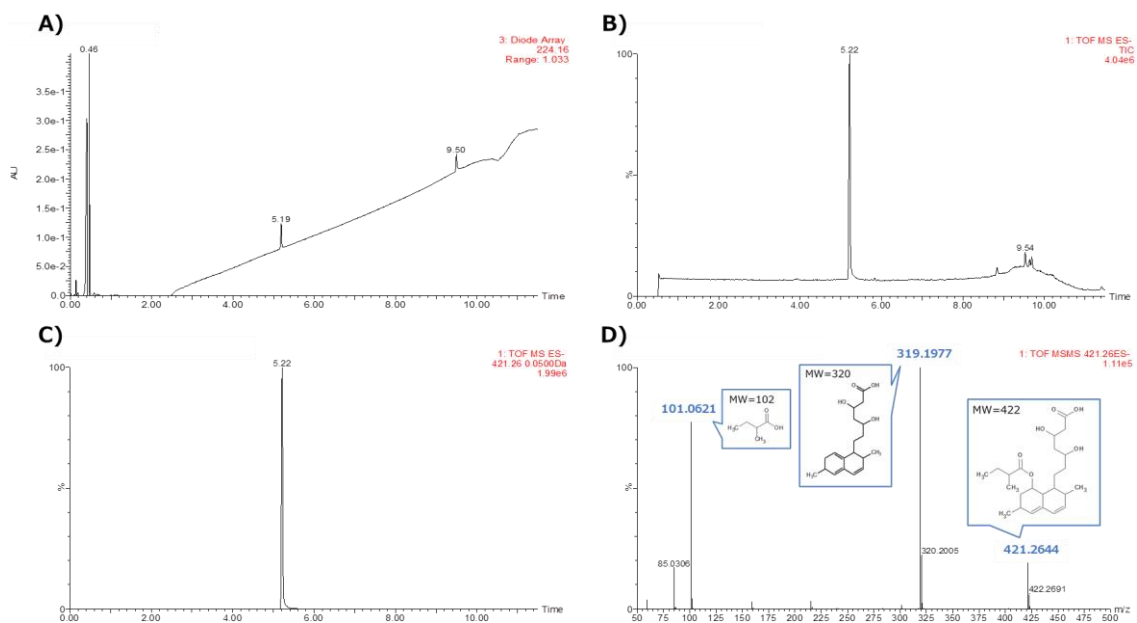


Fig. 3-7 ロバスタチン標準品の LC-MS、MS/MS 解析

A) UPLC クロマトグラム (224.16 nm)、B) トータルイオンクロマトグラム、C) MS スペクトル ( $m/z$  421.26)、D) MS/MS スペクトル。ネガティブイオンモードで検出し、MS/MS はコリジョンエネルギー 20 eV とした。

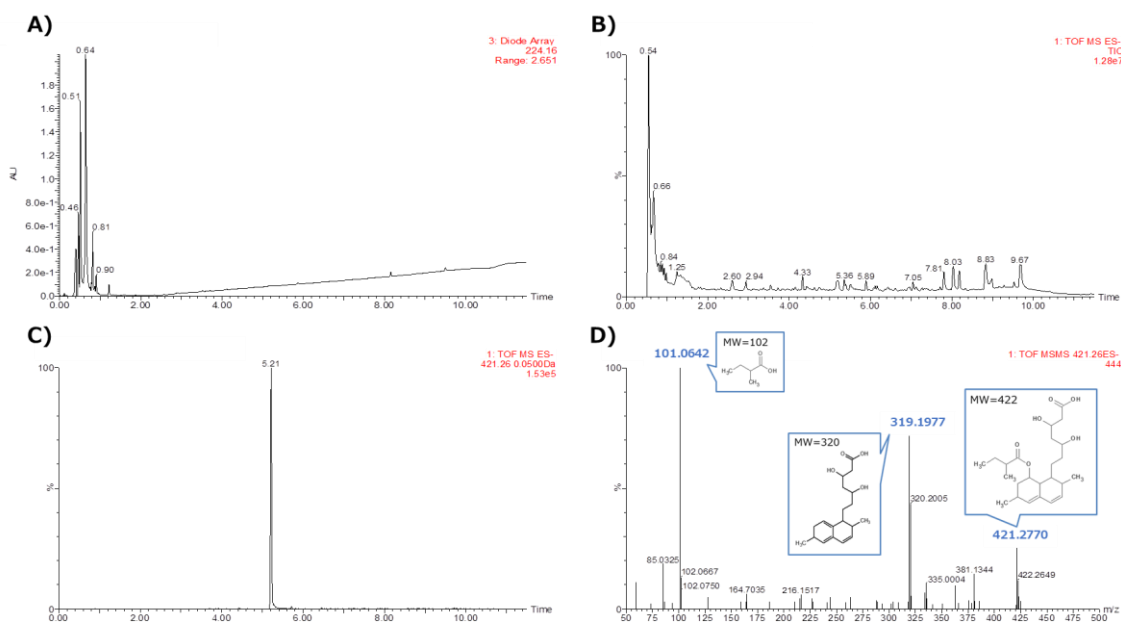


Fig. 3-8 *S. cerevisiae* によって産生されたロバスタチンの LC-MS、MS/MS 解析  
 A) UPLC クロマトグラム (224.16 nm)、B) トータルイオンクロマトグラム、C) MS スペクトル ( $m/z$  421.26)、D) MS/MS スペクトル。ネガティブイオンモードで検出し、MS/MS はコリジョンエネルギー 20 eV とした。

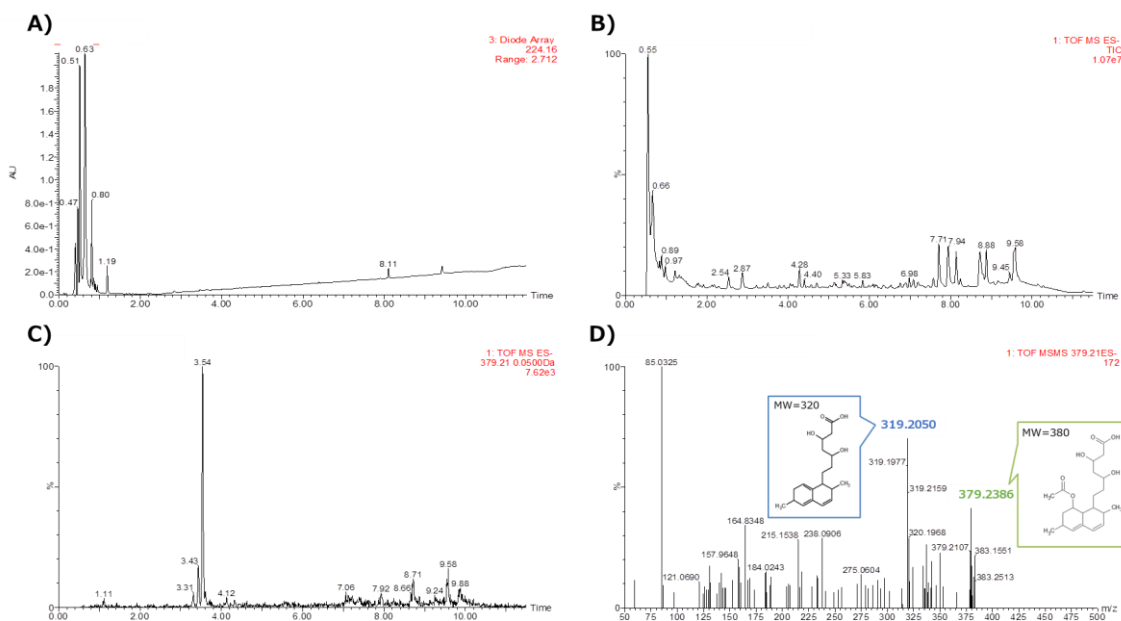


Fig. 3-9 *S. cerevisiae* によって産生された *O*-acetylmonacolin J の LC-MS、MS/MS 解析

A) UPLC クロマトグラム (224.16 nm)、B) トータルイオンクロマトグラム、C) MS スペクトル ( $m/z$  379.21)、D) MS/MS スペクトル。ネガティブイオンモードで検出し、MS/MS はコリジョンエネルギー 20 eV とした。

Table 3-4 MIPS-CG を用いたスタチン生合成遺伝子の検索結果

		FrIA	FrIB	FrIC	FrIG
<i>Metarhizium majus</i> ARSEF 297	#1	MAJ_09232	MAJ_09237	MAJ_09238	MAJ_09233
		—	MAJ_09235	MAJ_09236	—
<i>Metarhizium brunneum</i> ARSEF 3297	#1	MBR_09788	MBR_09791	MBR_09792	MBR_09789
<i>Pestalotiopsis fici</i> W106-1	#1	PFICI_00297	PFICI_00294	PFICI_00296	PFICI_00298
	#2	PFICI_07933 —	PFICI_07942 PFICI_07941	PFICI_07939 —	PFICI_07940 —
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	#1	ACLA_055740	ACLA_055680	ACLA_055660	ACLA_055670
		ACLA_055780	ACLA_055790	—	—

## 第四章 FR901512 の生産性に寄与する鍵遺伝子の探索

### 4.1 序

一般的に、糸状菌の育種の際には、孢子に対して UV 照射を行いランダムに変異株を取得する方法が取られている。しかしながら、本菌 No. 14919 株が孢子を形成する培養条件を見つけることは困難であったことから、予め形成させた分生子を集め UV を照射する、通常の手法とは異なる戦略を用いて変異株の取得・スクリーニングが実施された。本菌は、酵母エキス濃度と pH によりコロニーのサイズと気中菌糸の長さに変化が見られることから、コロニーが大きくなる生育条件での培養においてもコロニーが小さく、コロニーの高さが低く、気中菌糸の長さが短いものを選択することで変異株が取得された (Fig. 4-1)。Fig. 2-1 に示すように、医薬品開発の過程で、野生株 (MC3) から 4 世代、425 株、1019 株、1225 株、1407 株の直列に変異を重ね合わせた変異株が FR901512 の生産性を指標にスクリーニングされ取得されているが、その変異の数と箇所は不明のままであった。そこで本章では、これらの生産性向上株変異株について変異点解析を行った。

本章では、SCAP および SREBP をコードするステロール代謝調節遺伝子を遺伝子破壊することによって FR901512 の生産性が有意に向上することを明らかにした。さらに、他属の糸状菌のこれらに対応する遺伝子を破壊することにより、FR901512 以外の PKS 産物の生産性も向上することが確認された。SCAP および SREBP からなる SREBP 制御系は、哺乳動物において詳細に研究されている。SREBP は、高度に保存された塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) モチーフを介して小胞体 (ER) 膜に結合する転写因子である。ステロール合成を制御する転写因子としての機能する際、その機能的ドメインは、ゴルジ体膜上

で SCAP によってプロセシングされ核内に移行される [58, 59, 60]。この研究で変異が導入されていた SCAP は、SREBP と複合体を形成し、SREBP のタンパク質分解活性化を促進する ER およびゴルジ膜結合型の調節タンパク質である [61, 62]。タンパク質切断のメカニズムはショウジョウバエで詳細に研究され、その作用は明らかにされている [63]。SCAP はステロール感知ドメインを含み、SREBP-SCAP 複合体をプロセシングが起こるゴルジ膜に移動させるセンサーとして機能する [64, 65]。この SREBP-SCAP 複合体の形成により、細胞内のステロール濃度が減少すると、活性型の SREBP は核内に移行し、ステロール生合成遺伝子の発現を増強する転写因子として機能する [60]。本章では、SREBP 制御系の破壊が糸状菌による 2 種類の PKS 産物の生産性向上に効果があることを初めて報告する。この発見は、この制御系の破壊が PKS によって生合成されるポリケチド化合物の生産性を向上させるための効果的な戦略である可能性を提唱するものである。

また、最も簡便に糸状菌の二次代謝産物の生産性を向上させる手法として、生合成遺伝子クラスター内の転写因子の高発現化 [66] や、global regulator として知られる因子の高発現化が挙げられる [24, 67]。本章では、糸状菌 No. 14919 での FR901512 生産における、これら因子の影響を検証するとともに、発現解析をもとに新たな二次代謝のネットワークに寄与する因子の探索を試みた。



## 4.2 実験材料と方法

### 4.2.1 使用菌株とゲノム情報

No. 14919株の野生株 (MC3、受託番号 : FERM BP-37529) 、アステラス製薬株式会社で取得した高生産変異株である452株、1019株、1225株、1407株を使用した。SCAP遺伝子とSREBP遺伝子の遺伝子改変用の親株として1019株を用いた。SCAP遺伝子、SREBP遺伝子を1225株と1407株へ導入し相補株を作製した。 *frlE*、*laeA*、*veA*高発現株はMC3、1019、1407株を、*drf1*高発現はMC3を形質転換の宿主として使用した。プライマーデザインとRNA-seqの際のリファレンスゲノムには、第二章で取得したNo. 14919のMC3株ゲノム情報 (Accession No. BDMC01000001 to BDMC01000104) [37] を使用した。

*Aspergillus terreus* ATCC 20542として、ATCCより分譲された、*A. terreus* Thom (ATCC® 20542™) を使用した。遺伝子改変のために、*A. terreus* NIH 2624 (Accession No. AAJN00000000) のゲノム情報を参考に、プライマーデザインを実施した。

### 4.2.2 ゲノム DNA の調製

2.2.2に示した方法でゲノムDNAを調製した。

### 4.2.3 高生産変異株のゲノム解析と変異点解析

4.2.2で調製したDNA溶液とTruSeq DNA LT Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてプロトコール通りにライブラリを調製し、Miseq (Illumina) とMiSeq reagent kit version 3,600 cycles (Illumina) を

用いてシーケンスを行った。各変異株のBAMファイルは、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) software [68] を用いて、MC3のリファレンスゲノムにマッピングした。FreeBayes (<https://github.com/ekg/freebayes>) を用いて変異点を抽出し、変異callerのvcf出力をQUAL > 100でフィルタした後、すべてを目視で確認した。

#### 4.2.4 クローニング配列の決定

No. 14919株のSREBP遺伝子、*leaA*、*veA*は、*A. fumigatus*のSrbA [69]、*P. citrinum*のLaeA (ADL63139)、VeA (ADX36108) のアミノ酸配列と類似のアミノ酸配列をコードする遺伝子をBlastPを用いて検索することで決定した。*A. terreus* ATCC 20542のSCAP遺伝子とSREBP遺伝子は、*A. terreus* NIH 2624 (Accession No. AAJN00000000) の配列情報をもとに周辺配列の塩基配列を解読することで決定した。この際、ABI3730 capillary sequencer (Applied Biosystems, MA, USA) とプライマー (Table 4-1) を用いて塩基配列を決定した。

#### 4.2.5 プラスミド構築

すべてのプラスミドは、In-Fusion® HD Cloning Kits (Clontech, CA, USA) を用いて作製した。PCRには、KOD-Plus-Neo DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) を用いた。全てのプラスミドは、作製後にABI3730 capillary sequencer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を確認した。使用したプライマーはTable 4-1に示す。

糸状菌No. 14919にSCAP遺伝子 (ANO14919\_020700) を導入するためのプラスミドは、コーディング配列の上流1,000 bpから下流300 bpまでをブレ

オマイシン耐性遺伝子 ( $Ble^R$ ) と共にpUC19にクローニングして作製した。

糸状菌No. 14919のSCAP遺伝子およびSREBP遺伝子 (ANO14919\_032770) の遺伝子破壊株を作製する際に用いるプラスミドは、各コーディング領域の上下流各1,000~1,500 bpで $Ble^R$ を挟みこんだDNA断片をpUC19にクローニングすることで作製した。*A. terreus* ATCC 20542のSCAP遺伝子とSREBP遺伝子の遺伝子破壊株を作製する際に用いるプラスミドは、4.2.4で決定した配列に対して、上記と同様の方法で作製した。

No. 14919株の遺伝子破壊のために、上記のプラスミドと共に、CRISPR-Cas9プラスミドを使用した。このCRISPR-Cas9プラスミドは、荒添らによって糸状菌用に最適化されたpCRISPR-Cas9-U6-2を使用した [70]。SCAP遺伝子とSREBP遺伝子特異的に作用させるため、pCRISPR-Cas9-U6-2に標的配列に相補的な塩基配列を持つガイドRNAをRNAスキャフォールドの上流にクローニングした。

*frtE* (ANO14919\_110000)、*laeA* (ANO14919\_121910)、*veA* (ANO14919\_116240)、*drf1* (ANO14919\_086630) の過剰発現用プラスミドは、各遺伝子のコーディング領域とその下流300 bpまでの領域の上流に糸状菌No. 14919の内在性GAPDH遺伝子 (ANO14919\_044360) の推定プロモーター領域を配し、下流に $Ble^R$ を配したフラグメントをpUC19にクローニングすることで作製した。

#### 4.2.6 糸状菌 No. 14919 の形質転換

No. 14919の形質転換用培地として以下の培地を調製した。前培養培地として、4% MS3600 (Nisshoku, Tokyo, Japan)、2% Pharmamedia (Archer Daniels Midland, MN, USA)、1% キナコ、1%  $KH_2PO_4$ 、0.2%  $CaCO_3$ を

121℃で20分オートクレーブ滅菌することで作製した。また、形質転換培地として、1.0% soluble starch、0.5% glucose、2.0% Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)、0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を121℃で20分オートクレーブ滅菌することで作製した。

No. 14919株の各株を生育させたプレート培地から、5 mmの寒天辺をあらかじめ20 mLの前培養培地を添加した100 mL三角フラスコに植菌し、25℃、180 rpmで5日間培養した。さらにその前培養液400  $\mu\text{L}$ を20 mLの形質転換培地を添加した100 mL三角フラスコに植菌し、25℃、180 rpmで3日間培養した。

培養後の菌体はミラクロス (Merck Millipore, MA, USA) を用いてろ過により回収し、10 mLのSolution A (1 M KCl、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) で洗浄した。洗浄後の菌体を、10 mM dithiothreitol (DTT) を添加したSolution A (pH 8.0) に懸濁させて30℃で30分間保温した。保温後の菌体をDTTを含まないSolution Aで洗浄後、0.5% Yatalase (Takara, Shiga, Japan) と0.5% Zymolyase (Nacalai Tesque) を添加したSolution Aに懸濁して80 rpmで振盪しながら30℃で3時間保温した。ろ液に含まれるプロトプラストを、ミラクロスでろ過することで回収した。1 mLあたりプロトプラストが $10^8$ 個になるようにSolution B (1.2 M sorbitol、50 mM  $\text{CaCl}_2$ 、10 mM Tris-HCl、pH 7.5) に懸濁させた。形質転換に際しては、5  $\mu\text{g}$ のプラスミドDNAを用いた。ただし、SCAP遺伝子とSREBP遺伝子の遺伝子破壊の際には、破壊株作製用プラスミドをそれぞれSaI / NdeI、SaIであらかじめ処理して一本鎖DNAとし、等量の標的配列のガイドRNAをクローニングしたCRISPR-Cas9-U6-2プラスミドとあわせて5  $\mu\text{g}$ とした。DNA溶液と200  $\mu\text{L}$ のプロトプラスト懸濁液をよく混合し氷上に30分間静置後、1 mLのSolution C (40%

polyethylene glycol 3350、50 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM Tris-HCl、pH 7.5) を加えてよく混合し、25℃で1時間保温した。その後、100 µg/mlのZeocin (Invitrogen, MA, USA) を含む再生用プレート培地 (0.6 M sucrose、1% yeast extract (Becton, Dickinson and Company) 、5 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1% ZnSO<sub>4</sub>、0.1% MnSO<sub>4</sub>、0.75% agar) にプロトプラスト溶液を播種し、30℃でコロニーが形成するまで8~10日間培養をした。

#### 4.2.7 PCR を用いた導入 DNA の確認

得られた形質転換体を生育させたプレート上から菌糸を掻きとってPCRを行うことでDNAの宿主株への導入を確認した。PCRには、KOD-Plus-Neo DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) を用いた。使用したプライマーは Table 4-1に示す。

#### 4.2.8 サザンハイブリダイゼーション

3 µgのゲノムDNAを適切な制限酵素 (*Xba*I, *Eco*RI) で処理後、0.7%アガロースゲルで泳動し、Nytran SuPerCharge membrane (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) に転写した。ハイブリダイゼーションとシグナル検出は、取扱説明書に従って、digoxigenin (DIG) systemを用いて実施した。DIGラベルしたプローブは500~800 bpに設計し、PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いて増幅させた。この際使用したプライマーをTable 4-1に示した。プローブをハイブリダイズさせた後にanti-DIG Fab-fragment-alkaline phosphatase conjugate (Roche Applied Science) 、CDP-Star Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて検出した。

#### 4.2.9 FR901512 の生産

2.2.3に示した方法で各株を培養した。前培養は菌の生育に合わせ、MC3、425株は3日間、1019、1225株は4日間、1407株は5日間とした。遺伝子組み換え株も、その遺伝子操作前の親株と同様の前培養日数を実施した。

#### 4.2.10 *Aspergillus terreus* の形質転換、ロバスタチン生産培養

*A. terreus* ATCC 20542の形質転換には、*A. oryzae*で実績があるプロトプラスト法を用いた [71]。200 mLのポテトデキストロース培地 (BD-Diagnostic Systems, MD, USA) で30℃、20-24時間培養し、0.8 M NaClで菌体を洗浄した。洗浄した菌体に、100 mg lysing enzyme (Sigma, St. Louis, MO, USA)、100 mg Yatalase (TaKaRa, Shiga, Japan) を10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.8 M NaCl溶液に溶かした30 mlの酵素溶液を添加し、30℃、2.5時間穏やかに振とうすることでプロトプラストを作製した。20 µgのDNAを用いて形質転換を実施し、250 µg/mlのZeocin (Invitrogen, MA, USA)、1.2 Mソルビトールを含むglucose minimal agar (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) プレートにプロトプラスト溶液を播種し、30℃でコロニーが形成するまで5~7日間培養をした。

*A. terreus* ATCC 20542のロバスタチンの生産用の培養液は、4% lactose、0.3% corn steep liquor、0.2% KNO<sub>3</sub>、0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O、0.05% NaCl、0.05% Antifoam PE-L、trace elements (final 0.008% MnSO<sub>4</sub>、0.017% ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O、0.01% CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O、0.025% FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O)、pH6.5を100 mLフラスコに20 mL分注し、121℃、20分オートクレーブすることで調製した。プレートから1.0 × 10<sup>6</sup>個

の胞子を生産培養液に植菌し、30℃、220 rpmで6日間培養した。

#### 4.2.11 FR901512 とロバスタチンの生産性の評価

FR901512の生産は以下の手順で確認した。200  $\mu$ Lの培養液を2.0 mLのチューブに分注後、200  $\mu$ Lのアセトンを添加してよく混合後、30分間室温で静置することで生成物を抽出した。抽出後の試料を21,900  $\times$   $g$ 、室温で5分間遠心分離を行った後、上清を0.22  $\mu$ mのフィルターでろ過した。フィルターろ過後の抽出液1  $\mu$ Lを、Waters Xevo G2 QTof UPLC-MS system (Waters, MA, USA) を用いて分析した。カラムはAcquity UPLC BEH C18 2.1  $\mu$ m  $\times$  100 mmを使用した。流速0.6 ml/minの条件で、0.1%ギ酸を含んだ35%アセトニトリル溶液からアセトニトリル濃度100%へのリニアグラジエントで分離した。FR901512は、分子量のMSピーク面積値をもとに検量線を作製し定量した。

培養液中のロバスタチンを分析する際は、500  $\mu$ Lの培養液を2.0 mLのチューブに分注後、500  $\mu$ Lのアセトニトリル、25  $\mu$ Lの濃リン酸を添加してよく混合後、30分間室温で静置することで抽出を行った。抽出後のサンプルは21,900  $\times$   $g$ 、室温で5分間遠心分離を行った後、上清を0.22  $\mu$ mのフィルターでろ過した。これをFR901512と同じ条件下で質量分析し定量した。

#### 4.2.12 RNA 抽出と精製

2.2.4に示した方法に従い、培養開始後3日目と5日目のRNAを抽出・精製した。

#### 4.2.13 RNA-seq 解析

4.2.12で得られたRNAとTruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) を用いてライブラリを調製し、MiSeq (Illumina) とMiSeq Reagent Kits v3 (150 cycles) を用いてシーケンス解析した。Bowtie2 [72] を用いてリファレンスゲノムをインデックス化し、高品質のシーケンスリードをTopHat2 [73] を用いてリファレンスゲノムにマッピングした。各遺伝子の発現レベルは、Reads Per Kilobase of exon per million Mapped fragments (RPKM) として正規化し計算した。本研究により取得したRNA-Seqリードデータは、以下の通りにDDBJに登録した。DRX083430-DRX083435 (425株)、DRX083436-DRX083441 (1019株)、DRX083454-DRX083459 (1225株)、DRX083466-DRX083471 (1407株)、DRX140762-DRX140767 (*frlE*過剰発現MC3株)、DRX140768-DRX140773 (*frlE*過剰発現1019株)、DRX140774-DRX140779 (*frlE*過剰発現1407株)、DRX140780-DRX140785 (*drf1*過剰発現MC3株)。



## 4.3 結果

### 4.3.1 変異点解析結果

MC3からUV変異導入によって直列に育種された4世代の変異株である425株、1019株、1225株、1407株に導入された変異点の数を決定した (Table 4-2)。変異によってアミノ酸配列が変化したタンパク質をTable 4-3に示した。

### 4.3.2 SCAP 遺伝子に導入された変異とその影響について

4.3.1に示した変異のうち、ANO14919\_020700がコードする1129アミノ酸残基からなるタンパク質では、1019株から1225株を取得する過程で、アミノ酸199残基目からの塩基配列中でAACCAがGに置換されていた。これによりフレームシフトが生じることで、207残基目に該当するコドンでナンセンス変異が出現していた (Fig. 4-2)。ANO14919\_020700は、sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) をコードすることが推定された。哺乳動物をはじめ、多くの生物のSCAPはエルゴステロール生合成経路に関与するタンパク質をコードする遺伝子群の転写を促進する転写因子であり、SREBPの活性化に関わることが知られている [74]。RNA-Seqを用いた遺伝子発現プロファイルを比較した結果、1019株から1225株への変異導入によって、エルゴステロール生合成に関わる3つの遺伝子の発現が低下していることが見出された (Fig. 4-3)。これらは、squalene monooxygenase (Sqm, ANO14919\_054940)、methylsterol monooxygenase (Msm, ANO14919\_110980)、delta7-sterol 5-desaturase (Dsd, ANO14919\_004690)をコードしており、培養5日目の発現量は、50%以上低下していた (Table 4-4)。一方、1225株では1019株と比

較してFR901512の生産性は増加していたものの、FR901512の生合成遺伝子クラスターの発現量に変動は見られなかった。以上の結果から、エルゴステロール生合成に関わる3つの遺伝子の発現量がSCAPへの変異導入により影響を受けている可能性が示唆された。

#### 4.3.3 SCAP 遺伝子の相補解析

SCAPのフレームシフト変異によってSCAPの機能が失われることにより、FR901512の生産性が向上する可能性を検証した。野生型のSCAP遺伝子の全長を、1225株と1407株に導入した。取得した形質転換体は、SCAP遺伝子がゲノム中に挿入されていることをPCRによって確認した (Fig. 4-4)。これらの株によるFR901512の生産を調べた結果、1225株、1407株の生産性がそれぞれ1/2、1/3に有意に低下し、1019株の生産性と同等程度であった (Fig. 4-7A)。以上の結果から、導入したSCAP遺伝子が1225株と1407株のSCAP遺伝子へのナンセンス変異を相補することが確認され、SCAP機能の喪失がFR901512の高生産に必要であることが明らかとなった。

#### 4.3.4 SCAP 遺伝子と SREBP 遺伝子の遺伝子破壊株の解析

4.3.3の結果から、SCAP遺伝子の変異がFR901512の生産性に影響を及ぼすことが分かった。そこで、SCAPの変異を持たない1019株のSCAP遺伝子とSREBP遺伝子を遺伝子破壊した場合のFR901512の生産性への影響も解析した。糸状菌No. 14919株のSREBP遺伝子 (ANO14919\_032770) を*A. fumigatus*のSrbAとの相同性をもとに見出した。これと糸状菌No. 14919株のSCAP遺伝子の遺伝子破壊株の作製用にこれらのCDS領域をブレオマイシン耐性遺伝子に置き換えたDNA断片を作製し、1019株に導入した。その結果、得

られた形質転換株は全て、組換え用相同組み換え断片が非相同末端結合によってランダムにゲノムDNAに挿入されたものだった。これは、No. 14919株では、相同組み換えの頻度が低いためであると考えられ、この手法による遺伝子破壊は困難であることが分かった。一般に、糸状菌では相同組み換えの頻度を非相同末端結合に関与する遺伝子、*ligD*を破壊することによって高めることができるが [75]、*ligD*ホモログ遺伝子の破壊自体も困難であった。そこで、CRISPR-Cas9システムを用いた遺伝子破壊を試みることにした。荒添らによって、*Aspergillus oryzae*の内在性U6プロモーターによりガイドRNAを発現するように改変された糸状菌用に最適化されたシステム [70] を用いることとした。このシステムを用いれば、相同組み換えが標的遺伝子領域上で起こるDNAの二本鎖切断によって促進され、目的の形質転換株が取得できると期待される。実際、これを使用することによって得られた形質転換体では、PCRとサザンハイブリダイゼーションによって標的遺伝子が破壊されていることが確認できたことから、1019株のSCAP遺伝子とSREBP遺伝子の遺伝子破壊株を取得することができたと判断された (Fig.4-5, 4-6)。両遺伝子破壊株について、そのFR901512の生産性を解析したところ、両株では、1019株と比較して、2.7倍、1.7倍にFR901512の生産性が向上していた (Fig.4-7B)。

#### 4.3.5 qRT-PCR による遺伝子発現量の解析

エルゴステロール生合成遺伝子の遺伝子発現量をqRT-PCRによって解析した。その結果、FR901512高生産性変異株、SCAP遺伝子導入株とSCAP遺伝子破壊株のトランスクリプトームは、SCAPの有無で明確にパターンに分離することができた (Fig. 4-8)。1019株、SCAP遺伝子を導入した1225/1407両株では、SREBP、*Sqm*、*Msm*、*Dsd*をコードする遺伝子の発現レベルは同等

であった。一方で、野生型のSCAP遺伝子を持たない1225株と1407株では、これらの遺伝子の発現レベルは、1019株のその1/2以下に低下していた。1225株と1407株は、SCAPの遺伝子を薬剤耐性遺伝子に置換した1019株とは異なり、サイレンス変異により終止コドンが導入されているため、SCAPのmRNAが検出されているが、タンパク質として機能はしていないと考えられる。このため、SREBP、Sqm、Msm、Dsd遺伝子の発現が低下したと考えられる。

#### 4.3.6 SREBP 制御系遺伝子の他糸状菌での効果検証

他の糸状菌においても、SREBP制御系遺伝子の機能の喪失が二次代謝産物であるPKS産物の生産性を向上させる効果をもつかを検証した。ロバスタチンを産生する*A. terreus* ATCC 20542 [76] のSCAP遺伝子とSREBP遺伝子を同定し、それぞれの遺伝子を破壊した。この際、*A. terreus*は多核であることから単一胞子の分離を繰り返し、ホモ体の遺伝子破壊株の取得を試みた。この手法によって、SCAP遺伝子の遺伝子破壊株を取得することはできたが、SREBPについては野生型と遺伝子破壊が起こった核をともに有するヘテロ体しか得られなかった (Fig. 4-11)。SCAP遺伝子の遺伝子破壊株とSREBP遺伝子のヘテロ破壊株は、親株と比較してロバスタチンの生産性がそれぞれ5.1倍、2.6倍に向上していた (Fig. 4-12)。このことから、糸状菌No. 14919でのFR901512の生産においてのみでなく、*A. terreus*でのロバスタチン生産においてもSREBP制御系遺伝子の機能の喪失が生産性を向上させることが明らかとなった。

#### 4.3.7 転写因子過剰発現による FR901512 の生産性への影響評価

FR901512 の推定生合成遺伝子クラスター中に存在する転写因子 *FrIE* (ANO14919\_110000) は、*A. terreus* のロバスタチン生合成遺伝子クラスター中の *LovE*、*P. citrinum* の ML-236B 生合成遺伝子クラスター中の *MlcR* らと同様に、GAL4-like Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster DNA-binding domain を持ち、それぞれと 27%、29%の相同性を持つ (Table 2-3)。転写因子をコードする *frIE*、*laeA*、*veA* を MC3 株、1019 株、1407 株内で内在性の GAP promoter を用いてそれぞれ過剰発現させた。遺伝子の導入が行われたことを PCR を用いて確認した結果を Fig. 4-14 に示す。これらの株での FR901512 の生産性の解析の結果、MC3 株と 1019 株では、菌体あたりの FR901512 の生産性がそれぞれ 1.7、1.8 倍に向上した (Fig. 4-15)。一方で、既に変異の重ね合わせによって生産性が MC3 株を基準として 15 倍、1019 株を基準として 4 倍に向上している 1407 株ではこれらの遺伝子の高発現によって生産性が向上することはない。さらに、*frIE* と同様に *laeA*、*veA* を MC3 株、1019 株、1407 株内で過剰発現させた結果、すべての株で FR901512 の生産量は増加しなかった。これら作製した遺伝子組み換え株における過剰発現させた遺伝子の発現量を qPCR によって定量した。全ての過剰発現株のうち、1407 株内で *frIE* を過剰発現させた株のみ親株と比較して発現量が上昇していなかったが (Fig. 4-16A)、他の株では、遺伝子導入前の親株と比較して、各遺伝子の発現量は有意に向上していたことから目的とする遺伝子が過剰発現していることが確認された (Fig. 4-16B, C)。また、MC3 株と 1019 株内で *laeA*、*veA* を高発現させると、*frIE* および PKS である *frIB* の発現に影響がある傾向が見られた (Fig. 4-16D)。

#### 4.3.8 FR901512 の生産に関わる転写因子

MC3 株、425 株、1225 株、1019 株、1407 株による *frtE* の発現量を RNA-Seq 解析で得られた RPKM 値によって比較した。その結果、1407 株のみがそれより前世代の高生産変異株に比べて 2 倍の *frtE* を発現していた (Fig. 4-17A)。1407 株では、*FrIE* の制御下にある *frtB* の発現量も増加しており (Fig. 4-17B)、他の FR901512 生合成遺伝子の発現も同様の傾向が見られた (data not shown)。1225 株の世代までは生合成遺伝子の発現にほぼ変化は見られず、1407 株の世代になって初めて生合成遺伝子の発現が増加することに着目し、1407 株が FR901512 の生合成遺伝子の発現を増加させるメカニズムを検証することとした。このために、まず、糸状菌 No. 14919 の全遺伝子のうち、転写因子モチーフを持つタンパク質をコードする遺伝子を抽出した。続いて、MC3 株と各世代の変異株の培養開始後 3、5 日目のトランスクリプトームの RPKM 値をもとに、*frtE* の発現量と FR901512 の生合成遺伝子との相関解析を実施した。*frtE* 発現量と FR901512 の生合成遺伝子との相関係数が高い 5 つの遺伝子を Table 4-5 に示した。これらのうち、最上位の ANO14919\_084720、2 番目で負の相関がある ANO14919\_086630 について、各遺伝子の高発現株を作製し、FR901512 の生産性の変化に対するバリデーションを実施した。その結果、ANO14919\_084720 を過剰発現させても FR901512 の生産性に変化は見られず (data not shown)、ANO14919\_086630 を過剰発現させると FR901512 の生産性が 1/10 まで低下した (Fig. 4-18)。ANO14919\_086630 が FR901512 の生産性を負に制御することが明らかとなったことから、ANO14919\_086630 を *drf1*; down regulate factor 1 of FR901512 biosynthetic genes と命名した。

Drf1 のアミノ酸配列の相同性を検索した結果、*A. oryzae* と *A. terreus* の遺

伝子の中からそのホモログ遺伝子が見出された (Table 4-6) 。ロバスタチンを産生する *A. terreus* ではホモログ遺伝子 ATEG\_10025 (XP\_001209327) が見出されたが、ML-236B を産生する *P. citrinum* ではホモログ遺伝子は存在しなかった。続いて、MC3 株、1019 株、1407 株の *frlE* 過剰発現株および上述の MC3 株で *drf1* を過剰発現させた株の全 RNA の RNA-Seq 解析を実施した。*drf1* を過剰発現させると、*frlB* の発現量が 18.5%までに低下していた (Fig. 4-19B, C) 。一方で、*frlE* の発現に有意な低下しておらず、寧ろ増加していた (Fig. 4-19A) 。この遺伝子が他の遺伝子発現に及ぼす影響を考察するため、以下の条件で遺伝子を抽出した (Table 4-7) 。

1. *drf1* 過剰発現によって発現量が 0.8 倍未満となった遺伝子
2. *drf1* の発現が低下し *frlE* の発現が向上している 1407 株と比べて、MC3 と 1407 株、1225 と 1407 株間でそれぞれ発現量が 1.2 倍以上になった遺伝子

これらには、FR901512の生合成に関わる遺伝子を含め63遺伝子が該当していた。FR901512以外の二次代謝関連遺伝子の負の制御を行っている可能性を考え、糸状菌No. 14919に見出される二次代謝生合成遺伝子 (Table 2-2) をこの中から検索したが、これらには二次代謝産物の生合成遺伝子は含まれていなかった。二次代謝関連以外にも、該当した63遺伝子についてはその遺伝子がコードする機能によって分類することができなかつたため、*drf1*の発現量によって影響を受けている生理機能を解析することはできなかつた。

## 4.4 考察

### 4.4.1 UV 変異点に基づく FR901512 の生産性向上に寄与する鍵遺伝子探索

本章ではまず、FR901512を産生する糸状菌No. 14919の各種の高生産変異株の変異点を解析し、生産性の向上の鍵となる遺伝子を探索した。その結果、タンパク質のアミノ酸配列を変化させる変異が少なかったため、各遺伝子の過剰発現体を作製し、高生産化の鍵遺伝子としてFR901512の生産に影響するかどうかを調べたが、多くの遺伝子でFR901512の生産性に変化は見られなかった (data not shown)。その中で、1019株から1225株を取得する過程でフレームシフト変異が導入され、遺伝子のアノテーションとしても興味深かった SCAP遺伝子について、詳細に検証を進めた。SREBPとSCAPによってコントロールされる制御システムは、哺乳動物でよく研究されている。4.1にも記載したように、細胞内のステロール濃度が低下すると、SREBPが核内に移行し、ステロール生合成遺伝子の発現を促進する転写因子として機能する [60]。真菌類も、SREBPとSCAPによって制御されるシステムを持つ。例えば、*Schizosaccharomyces pombe*は、エルゴステロール生合成を正に制御するSREBPオルソログを持ち、これは低酸素条件下への適応に寄与している [77]。このような報告は多数あり、微妙な違いはあるものの、真菌のSREBP-SCAP複合体は、哺乳動物の複合体のそれと同様の作用機序を有する [78, 79, 80, 81, 82]。一方で、*S. cerevisiae*はSREBPオルソログを持たず、UPC2によって同様の制御が行われている [83]。糸状菌では、*A. fumigatus*のSREBPに関する報告がある。SREBPのオルソログであるSrbAは、アゾール系抗生物質の標的であるエルゴステロール生合成遺伝子のCYP51Aの発現を正に制御する [69, 84]。CYP51A遺伝子を高発現させることでアゾール系抗生物



質耐性となった株のSrbAを遺伝子破壊することによって、アゾール系抗生物質に対して感受性となる [85]。このように、酵母や糸状菌でSREBPによって支配される制御システムについて解析がなされており、エルゴステロール生合成がSREBP制御系の支配下にあることが明らかになっているが、SREBP制御系がPKSによる二次代謝産物生産に影響することについて言及した報告は、これまでにない。糸状菌No. 14919の1225株では、SCAPにナンセンス変異が生じていた (Fig. 4-2)。RNASeq解析によって、1225株では1019株に比べて squalene monooxygenase (ANO14919\_054940)、methylsterol monooxygenase (ANO14919\_110980)、delta 7-sterol 5-desaturase (ANO14919\_2004690) 遺伝子の発現量が1/2以下に低下していた (Fig. 4-3, Table 4-4)。同じ変異をもつ1407株も、同じ現象を示しており、どちらの株もエルゴステロール生合成が向上していない。1225株ではFR901512の生産量が増加しているものの、生合成遺伝子クラスターの発現は上昇していない。一方で、1407株ではこれらの発現が上昇しているが、SCAPへの変異によってこの1407株では生合成遺伝子の発現向上が引き起こされているとは考えにくい。1407株で新たに導入された他の変異により、この現象が引き起こされていると考えられるが、Table 4-2に示すように、1407株から導入された変異数自体少なく、タンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼす変異自体が2つしかなかった。現在のところ、これらの変異がFR901512の高生産化を引き起こしているかどうかは不明であるが、タンパク質のコード領域の塩基配列の変異に依存しない転写調節領域やエピジェネティックな変化が、この現象を担っている可能性が考えられる。

本研究では、SCAP遺伝子の変異株への再導入や、SREBP遺伝子などの遺伝子破壊によって、ステロール生合成関連遺伝子の発現量への低下効果を検証し

た。エルゴステロール生合成遺伝子中の3遺伝子の発現量の変化に応じて、FR901512の生産量が増加することから、SCAPの有無がこの生産性の変化に寄与することが明らかになった。SREBP制御系がFR901512の生産に関する鍵因子であることは新たな知見である。SREBP遺伝子の発現量は、SCAP遺伝子の破壊によっても減少している (Fig. 4-8)。このようなSREBP遺伝子の自己制御は、*A. fumigatus*でも報告されており [69]、本結果は、糸状菌No. 14919も同様な制御システムを発現することを示唆している。

本研究では、SCAP遺伝子とSREBP遺伝子の遺伝子破壊により、FR901512の生産が増加することを示した (Fig. 4-7B)。SCAPとSREBPのいずれを欠損させるかによって生産性の向上効果に違いが見られるが、これはSCAPの遺伝子破壊でのみ $frlE$ の発現量が増加することに起因すると考えている。(Fig. 4-9)。4.3.7で示したように、1019株内で $frlE$ を過剰発現させると、FR901512の生産量が1.8倍となる (Fig. 4-15)。SCAPの遺伝子破壊による $frlE$ の発現レベルの上昇のメカニズムの原因は不明だが、SCAP遺伝子破壊株で見られた2.7倍の生産性の向上は、 $frlE$ の発現増加による結果以上の効果が現れており、SCAPの遺伝子破壊による効果は正味1.5倍程度と見積もられ、SCAP遺伝子、SREBP遺伝子の破壊による効果は同等であると言える。ただし、SCAPがSREBPにだけでなく、その他のPKS生産に関わる他の因子に影響を与えている可能性は残されている。

NRPSによる二次代謝産物の生合成では、原料としてのアミノ酸の供給を増やすことで、生産性が増加する報告がある [86]。本研究でも同様に、SREBP制御システムが機能しない株では、必要以上にエルゴステロール生合成遺伝子が活性化せず、結果としてPKS産物の原料としてのアセチルCoA、マロニルCoAの供給が増加したと考えられた。これらの多くがポリケチド合成の原料と

して利用されれば、FR901512の生産性は増加すると予想される。また一般に、二次代謝産物は栄養飢餓条件下で培養後期に生産されることが知られている [87]。これに基づくと、ステロール生合成の調節に関与するSREBP制御系を破壊することは、ポリケチド二次代謝産物の生産性を高めるための非常に合理的な方法であると考えられる。ステロールが培養後期に過剰に生合成されないことで、ポリケチドおよびステロール生合成に共通する原材料の細胞内プールはポリケチド生合成に選択的に使用されることになる。本研究では、これらの細胞内レベルの定量は出来なかったが、これを調べることによりPKS原料のフローについても詳細なメカニズムを解明することで、二次代謝生産の更なる理解に繋がることが予想される。

*A. terreus*におけるロバスタチン生産においても、SREBP制御系の遺伝子のPKS産物の生産性の向上効果が示された (Fig. 4-11)。*A. terreus* ATCC 20542は、工業生産株としても使用され、ロバスタチンの生産性の向上や培養法の検討に関する多数の報告がある [76, 88, 89, 90]。しかしながら、ロバスタチンの生産性の向上に関与する具体的な鍵因子に関する報告はない。よって本研究は、ロバスタチンの生産性の向上に直接的に寄与する鍵遺伝子を明らかにした点で非常に意義のあるものであった。bHLH 因子であるSREBPのホモロギーをもとに作成した糸状菌の系統樹解析から、糸状菌 No. 14919と*A. terreus*は決して近縁ではなかった (Fig. 4-12)。従って、他の糸状菌においても、SREBP制御系の破壊によってPKS産物の生産量の増加が普遍的に起こることが予想される。

本研究によって生産性の向上が確認されたPKS化合物は、どちらもHMG-CoA還元酵素の阻害剤である。*S. pombe*では、HMG-CoA還元酵素の阻害剤の添加はステロール枯渇を引き起こし、続いてSREBPのオルソログ遺伝子である

*sre1*がコードするSre1が切断され活性化される [77]。言い換えれば、PKS産物の生産性の増加は、SREBP制御系の破壊と同様にHMG-CoA還元酵素の阻害によっても引き起こされ得る。よって、今回示されたFR901512とロバスタチンの生産性の向上は、SREBP調節系の欠損とHMG-CoA還元酵素の阻害剤の効果との協同的な作用によって引き起こされた可能性も考えられる。しかし、SREBP制御系の機能喪失によるスタチン系PKS産物の生産性向上の効果は、HMG-CoA還元酵素の阻害剤の効果とは独立しており、本研究で扱ったスタチン系以外のPKS産物の生産も調節すると考えている。FR901512の生合成遺伝子クラスターは、HMG-CoA還元酵素をコードする*frlH*を含む (Table 2-3)。これはロバスタチンおよびコンパクトチン生合成遺伝子クラスターの両方にも存在し、HMG-CoA還元酵素阻害剤として機能するPKS産物による成長阻害を克服するための機構であると考えられている [41]。糸状菌No. 14919は、FR901512の生合成遺伝子クラスターには含まれないANO14919\_122100と*frlH*との2つのHMG-CoA還元酵素をコードする遺伝子を持つが、これら2つの遺伝子の発現量は、SREBP制御系の破壊によって変化していなかった (Table 4-4)。これらの2種のHMG-CoA還元酵素によって、自身の産生するスタチン系PKS産物によるメバロン酸経路阻害の作用を克服することができると考えられる。結果として、1019株と1407株、および本研究で構築した遺伝的に改変された菌株の培養5日目の乾燥菌体重量に有意差はなかった (Fig. 4-10)。以上から、FR901512の産生量にかかわらず菌体重量に変化がなかったため、SREBP制御系の破壊は、PKS産物の機能とは独立して生産性の増加に寄与することが示唆された。すなわち、PKS産物の生産性の増加メカニズムは、標的PKS産物の作用がHMG-CoA還元酵素阻害剤であるか否かは関係ない。SREBP制御系の破壊が、実際に他属の糸状菌でも、他の作用を持つPKS産物の生産性

を向上することに有効かどうかは非常に興味深く、今後、その普遍性が広く解明されることを期待している。

#### 4.4.2 新規転写因子探索

糸状菌における生合成遺伝子の転写因子の高発現による二次代謝産物の高生産の例として、*Aspergillus flavus* での aflatoxin 生産 [91]、*Monascus pilosus* での monacolin K 生産 [92] などが報告されている。本菌でも、MC3 株と 1019 株の FR901512 の転写因子をコードする *frlE* の過剰発現により FR901512 の生産性を向上できた。1407 株での *frlE* 過剰発現化では、発現コンストラクトの挿入は確認されているものの (Fig. 4-14)、*frlE* の遺伝子の発現量自体が増加しておらず、FR901512 の生産性も変化しなかった。RNA-Seq 解析の結果から、1407 株が他の株よりも *frlE* を含めた生合成遺伝子群の発現量が高く (Fig. 4-19A)、発現量向上の閾値に達していることが原因であることが示唆された。

*Aspergillus* 属の *LaeA* は、クロマチンレベルでエピジェネティックに二次代謝クラスターの遺伝子を制御していることが報告されており [24]、*laeA* の高発現によって *A. terreus* ATCC 20542 のロバスタチンの生合成遺伝子クラスター中の転写因子 *lovE* が高発現化し、生合成遺伝子も高発現に誘導される [24]。*LaeA* は核内の *VeA* および *VelB* と複合体を形成してその機能を発揮することが知られているが [67]、SAM 結合ドメインを有していることからメチル化酵素 (脱メチル化、ユークロマチン化) と考えられている一方で、その分子機構の詳細は明らかになっていない。*Aspergillus* 属だけでなく、*P. citrinum* でも *laeA* を高発現させることによって ML-236B の生産性が向上することが報告されている [93]。また、*M. pilosus* でも、*laeA* を高発現させると、monacolin K を含む二次代謝産物が増加した報告がある [94]。しかし、糸状菌 No. 14919 で

は、*laeA* や *veA* の高発現によって、FR901512 の生産性は向上しなかった。*P. citrinum* の変異株を用いた検討では、変異によって C 末が 15 残基伸長した変異体 *LaeA2* のみが ML-236B の生産性を向上させることが報告もされている [95]。そこで、*P. citrinum* の *LaeA1* と変異型 *LaeA2*、スプライシングバリエーションが報告されている *A. terreus* の *LaeA $\alpha$* 、 $\beta$  [96] と、本検討で過剰発現化した糸状菌 No. 14919 の *LaeA* ホモログを比較したが、*LaeA* ホモログは、*P. citrinum* の変異型 *LaeA2* が持つ C 末モチーフを保持しており、Methyltransferase domain、SAM binding Site [24] も保存されていた (Fig. 4-20)。これは、本菌の *LaeA* がメチル化酵素として機能しうることを示唆する。MC3 株と 1019 株内で *laeA*、*veA* を過剰発現化させた際に、*frlE*、*frlB* の発現が最大で 3 倍程度まで増加していることは、これと一致する。しかし、これらを考え合わせると、現在のところ、*laeA* の高発現によって FR901512 の生産性向上が見られない理由は不明である。今後、*laeA*、*veA* をそれぞれ遺伝子破壊した場合の FR901512 の生産を検討し、本菌でのこれらグローバルレギュレーターの仕事解析することは、更なる二次代謝生産への理解に繋がると考えられる。

本研究では、FR901512 の生産性を高めるグローバルレギュレーター以外の鍵遺伝子を探索した。MC3 株、425 株、1019 株、1225 株における *drf1* の発現量には大きな変動がなかったが、1407 では他の株に比べて 36~45%低下しており、*frlE* の発現量との相関が見られる (Fig. 4-21)。*drf1* の過剰発現により、FR901512 の生合成遺伝子群の発現が抑制されることが明らかになったため、*drf1* の遺伝子破壊によって生合成遺伝子がより高発現化することが期待されたが、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子破壊実験によって *drf1* の遺伝子破壊株を取得することは出来なかった。これは、*drf1* の遺伝子破壊が致死性を示すた

めである可能性を示す。興味深いことに、*drf1* は *frlE* との発現量の相関をもとに見い出されたものの、*drf1* の過剰発現によって *frlE* は負に制御されず、FrlE の制御下に置かれている *frlA*、*frlB*、*frlC*、*frlD*、*frlG*、*frlH* および *frlF* の 7 遺伝子が負に調節されていた (Fig. 4-22)。Drf1 の制御機構として、FrlE の binding domain と DNA 認識配列が競合するのかなど、配列解析を含めた詳細な相互作用の解析が望まれる。

Drf1 と相同性の高い転写因子としては *Candida albicans* SC5314 の ADR1 が挙げられる。これは、酢酸によって誘導されるプログラム細胞死のシグナリングに関与しているとされる [97]。一方、糸状菌では、Drf1 ホモログを解析した研究はない。本研究では *drf1* の高発現の影響の解析にとどまったが、今後の研究によって、低発現プロモーターへの置換による *drf1* の発現量の低下や、Drf1 タンパク質の *in vitro* の性質の解明などが進むことが望まれる。また、*A. terreus* における *drf1* ホモログのロバスタチン生合成遺伝子クラスターの発現への効果は非常に興味深く、今後、FR901512 の他にも応答する PKS があるのかなどの詳細な検討が進めば、二次代謝産物の生産のための転写ネットワークの理解がさらに進むと思われる。

本研究では、糸状菌 No. 14919 株の FR901512 の生合成遺伝子クラスター内の転写因子の発現量に応じて FR901512 の生産性が向上することを確認した。また、他種の糸状菌で二次代謝産物の生産性を向上させた実績があるグローバルレギュレーターである LaeA、VeA が、本菌では FR901512 の生産には大きく寄与しないことを示した。さらに、FR901512 の高生産変異株の RNA-Seq 解析によって、FR901512 の生合成遺伝子の発現を負に制御する新規な因子 Drf1 を見出した。本研究は、生合成遺伝子の発現の増減に関わる新たな転写因子を見つけたことによって、遺伝子工学的手法による糸状菌の二次代謝産物の効率的

な生産に大きく貢献するものである。



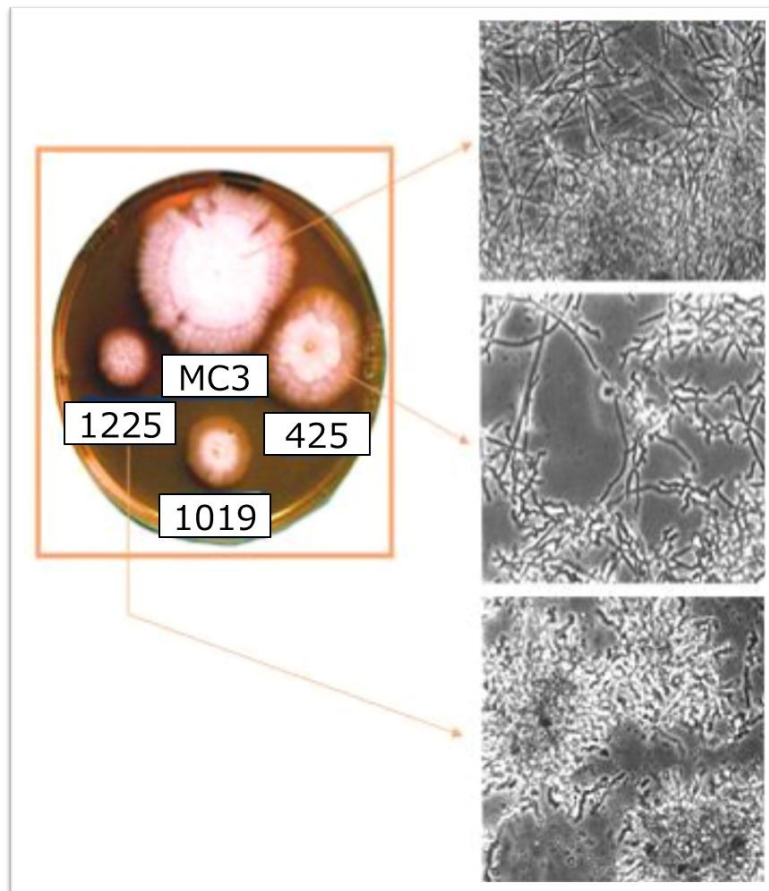


Fig. 4-1 糸状菌 No. 14919 の野生株と高生産変異株のコロニーと菌糸形態

Table 4-1 本章で使したプライマー一覧 (1/4)

Name	Sequence
<b>bleomycin resistance</b>	
ble_comp / del / oe_fw	AGGAGCCATGGCGGGGGGTGGTGACGAAAATCTGCAA
ble_comp / oe_rv	CGACTCTAGAGGATCACTCCAACATGGAGGGGTACAGG
ble_del_rv	GCCTTCGGGGTCCAGACTCCAACATGGAGGGGTACAGG
<b>Construct for Fungal sp. No. 14919</b>	
<b>Complementation of SCAP (ANO14919_020700)</b>	
SCAP_Comp_fw_pUC	CGGTACCCGGGGATCATCCCATCTACGCTAGCAGCAG
SCAP_Comp_rv_ble	CCCGCCATGGCTCCTCCATGTACGTACGAGCCTCATG
<b>SCAP (ANO14919_020700) complementation check</b>	
M13F_high	GACGGCCAGTGAATTCGAGCTC
ble_check_Rv	ATTGCAGATTTTCGTCACCACCC
<b>5'UTR region for SCAP (ANO14919_020700) deletion</b>	
SCAP_5UTR_fw_ble	CGGTACCCGGGGATCGCAGCAGGCGGCTTACCCATAC
SCAP_5UTR_rv_pUC	CCCGCCATGGCTCCTGCGACCAAGGTAGGGTATCCGA
<b>3'UTR region for SCAP (ANO14919_020700) deletion</b>	
SCAP_3UTR_fw_ble	CTGGACCCCGAAGGCGTGAGAAAGGGCAGAGCATGGC
SCAP_3UTR_rv_pUC	CGACTCTAGAGGATCCGGACAACACCGAATCTTACTC
<b>5'UTR region for SREBP (ANO14919_032770) deletion</b>	
SREBP_5UTR_fw_pUC	CGGTACCCGGGGATCGAGAGGGGTAGCAATTGGGAGTC
SREBP_5UTR_rv_ble	CCCGCCATGGCTCCTGCTGATACGATCACCAGATGCG
<b>3'UTR region for SREBP (ANO14919_032770) deletion</b>	
SREBP_3UTR_fw_ble	CTGGACCCCGAAGGCGCAGCCTACCACAATCGACTACC
SREBP_3UTR_rv_pUC	CGACTCTAGAGGATCGACTTGCGAAAACGCGGACGAG
<b>SCAP (ANO14919_020700) guide RNA</b>	
SCAP_gRNA_fw	TTCGATTCCTTGCATGTTGTCAA
SCAP_gRNA_rv	AAACTTGACAACATGCAAGGAAT
<b>SREBP (ANO14919_032770) guide RNA</b>	
SREBP_gRNA_fw	TTCGGCACTTATGCCGCTACTCA
SREBP_gRNA_rv	AAACTGAGTGACGGCATAAGTGC
<b>SCAP (ANO14919_020700) deletion PCR check</b>	
SCAP_delcheck_fw	CGAGTCTCTATGCGAAGGCTGTC
SCAP_delcheck_rv	CCCTACTTACCAACCAACCGTCC
<b>SREBP (ANO14919_032770) deletion PCR check</b>	
SREBP_delcheck_fw	GCTCAATCAACCCACACACC
SREBP_delcheck_rv	CCACTAGGCCCATCAACACATG
<b>SCAP (ANO14919_020700) deletion Southern hybridization check</b>	
SCAP_SBprobe_fw	CCATTATTCAGCCAAAGCTCAG
SCAP_SBprobe_rv	CTTCGCATAGAGACTCGAATCGC
<b>SREBP (ANO14919_032770) deletion Southern hybridization check</b>	
SREBP_SBprobe_fw	CACATTTCTCGTCATCACGAGG
SREBP_SBprobe_rv	GCGTTAGGCAGCATACATGAGAG

In-fusion Cloning のためのオーバーラップ配列は赤文字で表記した。

Table 4-1 本章で使したプライマー一覧 (2/4)

Name	Sequence
Construct for Fungal sp. No. 14919 (continued)	
PGAPDH (ANO14919_044360)	
GAP_Pro_pUC_fw	CGGTACCCGGGGATCGGATGCCATGTACCTCACAAGTACC
GAP_Pro_rv	AATGGTGCTTTAGGTCTAGAAGGAAGAGG
overexpression of <i>frlE</i> (ANO14919_110000)	
<i>frlE</i> _oe_fw	ACCTAAAGCACCATTATGGATGCGGGCGAAAACCTCGC
<i>frlE</i> _oe_rv	CCCGCCATGGCTCCTTCACGACGGGGCCAAGAGCGAA
overexpression of <i>laeA</i> (ANO14919_121910)	
<i>laeA</i> _oe_fw	ACCTAAAGCACCATTATGCACAAGTTTTTCTTGGTGG
<i>laeA</i> _oe_rv	CCCGCCATGGCTCCTTCACAGAGTACAATATGTCCGCC
overexpression of <i>veA</i> (ANO14919_116240)	
<i>veA</i> _oe_fw	ACCTAAAGCACCATTATGTTAACAATCGCTCTATCATCACAG
<i>veA</i> _oe_rv	CCCGCCATGGCTCCTCTATGGTAACCAAAGGTGTTGTGG
overexpression of <i>drf1</i> (ANO14919_086630)	
<i>drf1</i> _oe_fw	ACCTAAAGCACCATTATGTCCAATTCGTACCGCC
<i>drf1</i> _oe_rv	CCCGCCATGGCTCCTGGCTGTCCTCACATAAGATCG
qRT-PCR primer for Fungal sp. No. 14919	
Actin (ANO14919_020980)	
Actin_qPCR_fw	GGACCGTATGCAGAAGGAGATC
Actin_qPCR_rv	ACTTGCGGTGAACGATCGAAG
SCAP (ANO14919_020700)	
SCAP_qPCR_fw	GACATGACGCCCTTGAATCG
SCAP_qPCR_rv	GACGAACGATCTTTGCGTGATCC
SREBP (ANO14919_032770)	
SREBP_qPCR_fw	GAGAATATGGACCGGGAAGGAG
SREBP_qPCR_rv	GGTTCTGGTTCTGGGTCTGATAC
squalene monooxygenase (ANO14919_054940)	
Sqm_qPCR_fw	GCTACCACTTCTTCACGGTGC
Sqm_qPCR_rv	GAAGGCCAACTCTTGCCACATG
methylsterol monooxygenase (ANO14919_110980)	
Msm_qPCR_fw	CACCATGTACTTGTGGATTGTTGG
Msm_qPCR_rv	GAATCTCTCATGATGGGTATCGTGG
delta7-sterol 5-desaturase (ANO14919_004690)	
Dsd_qPCR_fw	CTGCCACACTATGCACCACCTG
Dsd_qPCR_rv	CTGCTGCTTCCATTGCACCTC
<i>frlE</i> (ANO14919_110000)	
<i>frlE</i> _qPCR_fw	GACATGACGCCCTTGAATCG
<i>frlE</i> _qPCR_rv	GACGAACGATCTTTGCGTGATCC
<i>laeA</i> (ANO14919_121910)	
<i>laeA</i> _qPCR_fw	CATTGGCTTTGTTGATGTCGAGC
<i>laeA</i> _qPCR_rv	CTCGTGCTCTGGATAGTTCAGCC

In-fusion Cloning のためのオーバーラップ配列は赤文字で表記した。

Table 4-1 本章で使したプライマー一覧 (3/4)

Name	Sequence
qRT-PCR primer for Fungal sp. No. 14919 (continued)	
veA (ANO14919_116240)	
veA_qPCR_fw	CCGTCTGCTCTCATGTAACCTCG
veA_qPCR_rv	GTAGGCAGGTTAAACGGTCAGC
frib (ANO14919_109980)	
frib_qPCR_fw	GCTCATCACGTTCAAGCTGAAGG
frib_qPCR_rv	CTGTCTGGTCCAGACGTCCTTC
Construct for <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	
Cloning of SCAP coding region	
ATSCAP_fw	CGGTACCCGGGGATCATGATAATCGACTCTATGCCGGCATG
ATSCAP_rv	CGACTCTAGAGGATCCTAGTCAGCATTATTCCAATCATCGATGG
Sequencing of SCAP coding region	
ATSCAP_SQ1	GCCATTGTGGGAAGAAGTCG
ATSCAP_SQ2	CTCAGGCGGCAAAGCGATGG
ATSCAP_SQ3	GGCGAGATCGTTCATTCAGC
ATSCAP_SQ4	GACGTTTGCTTCAAGCCAC
ATSCAP_SQ5	CACGGATGCAAAGATTGTGG
ATSCAP_SQ6	TGTTGGAATGCCGGCAGTCA
ATSCAP_SQ7	TCGGAAGTGGTCCACCGGTG
Cloning of SREBP coding region	
ATSREBP_fw	CGGTACCCGGGGATCGGTAGCGACTTCCAGCTCTTCTC
ATSREBP_rv	CGACTCTAGAGGATCTCAGTCGACGGCGTCAGACCGG
Sequencing of SREBP coding region	
ATSREBP_SQ1	GCAACAAACGCCTCGAGGAC
ATSREBP_SQ2	GGAACCGAAGAAGTCCGA
ATSREBP_SQ3	GGTGAAGACGTGGGATATTG
ATSREBP_SQ4	CATCCAGTCCTCTCTCGATG
Cloning of SCAP 5' UTR region	
ATSCAP_5UTR_fw	CGGTACCCGGGGATCAAGTTGGCATCGCCATCTG
ATSCAP_5UTR_rv	CGACTCTAGAGGATCCCACCTGGACCACTACAGGC
Sequencing of SCAP 5' UTR region	
ATSCAP_5UTR_SQ1	GAGTGTACCGCCTCACAAC
ATSCAP_5UTR_SQ2	GAACCCGAAGAACAACAAGC
ATSCAP_5UTR_SQ3	GATTCGATCCCAGTTGTCTG
ATSCAP_5UTR_SQ4	CCACACTGCCCCGTGATGTCT
Cloning of SCAP 3' UTR region	
ATSCAP_3UTR_fw	CGGTACCCGGGGATCCTGGCCTTGATCATCTTTGC
ATSCAP_3UTR_rv	CGACTCTAGAGGATCGGTGTCGGTGGTCTTGCTGT
Sequencing of SCAP 3' UTR region	
ATSCAP_3UTR_SQ1	CCGACGGAGGCCTTGAAGAG
ATSCAP_3UTR_SQ2	GTCTTCGGGATTGCTGCTAC

In-fusion Cloningのためのオーバーラップ配列は赤文字で表記した。

Table 4-1 本章で使したプライマー一覧 (4/4)

Name	Sequence
<b>Construct for <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 (continued)</b>	
Cloning of SREBP 5' UTR region	
ATSREBP_5UTR_fw	CGGTACCCGGGGATCTCCAATCCAGACTGCACACC
ATSREBP_5UTR_rv	CGACTCTAGAGGATCCCCACCTCATCCACTGGTTC
Sequencing of SREBP 5' UTR region	
ATSREBP_5UTR_SQ1	GACTCGTTGCTGGCAACCAG
ATSREBP_5UTR_SQ2	GAGTGTCCGAACCTGGTGCG
ATSREBP_5UTR_SQ3	CTGGCACGGTGAGCTTCAAC
ATSREBP_5UTR_SQ4	GATACTCGGCTTGCCGGAAC
Cloning of SREBP 3' UTR region	
ATSREBP_3UTR_fw	CGGTACCCGGGGATCAGCCGAACAAACCCGACTAC
ATSREBP_3UTR_rv	CGACTCTAGAGGATCAGTCGCAGCGGAATAGTGC
Sequencing of SREBP 3' UTR region	
ATSREBP_3UTR_SQ1	CTGACCAAGCCATCTTGAG
ATSREBP_3UTR_SQ2	GGAGTCTGCTCTACTCATGG
ATSREBP_3UTR_SQ3	CTGCATTACCACCAATCTAG
5'UTR region for SCAP deletion	
ATSCAP_5UTR_fw_pUC	GGTACCCGGGGATCCGTTTCGCAATGCTGACCTATGC
ATSCAP_5UTR_rv_ble	CCCGCCATGGCTCCTCATGGGGCATCTATTACAGCGAG
3'UTR region for SCAP deletion	
ATSCAP_3UTR_fw_ble	CTGGACCCCGAAGGCCACTGGTCAATGTCGGAGGG
ATSCAP_3UTR_rv_pUC	GACTCTAGAGGATCCGGTGTGCGTGGTCTTGCTGTG
5'UTR region for SREBP deletion	
ATSREBP_5UTR_fw_pUC	GGTACCCGGGGATCCCGACACAGGATAACGCGGAC
ATSREBP_5UTR_rv_ble	CCCGCCATGGCTCCTGTTGCTCAGCAGCTAGGCGG
3'UTR region for SREBP deletion	
ATSREBP_3UTR_fw_ble	CTGGACCCCGAAGGCCGGAAGCCTGCGATTACCCC
ATSREBP_3UTR_rv_pUC	GACTCTAGAGGATCCGCAATGAAACAGCGGCTCCG
SCAP deletion check	
ATSCAP_delcheck_fw	CCCTTCTCTCATCACCCCTCAGC
ATSCAP_delcheck_rv	TCTTCAAGGCCTCCGTCGGG
SREBP deletion check	
ATSREBP_delcheck_fw	CTCGACATCAACATCGCCATCAC
ATSREBP_delcheck_rv	CGTACAGGCATACAACGCCAACC

In-fusion Cloning のためのオーバーラップ配列は赤文字で表記した。

Table 4-2 糸状菌 No. 14919 由来の FR901512 高生産性変異株の変異の一覧

mutant strains	Total number	cSNP, Short InDel wo/Frameshift in CDS	Frameshift mutation in CDS
425	31	4	1
1019	80	10	0
1225	47	4	1
1407	16	2	0

Table 4-3 アミノ酸レベルの変異を伴う変異遺伝子

mutation introduced Strain	geneID	mutation	Annotation	KEGG ID
425	<i>ANO14919_020880</i>	cSNP	—	K15147
425	<i>ANO14919_046840</i>	cSNP	GTPase-activating protein subunit alpha-2	—
425	<i>ANO14919_026230</i>	Frameshifts	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	—
425	<i>ANO14919_101860</i>	cSNP	Adenylate cyclase	K01768
425	<i>ANO14919_104770</i>	cSNP	Para-nitrobenzyl esterase	K03929
1019	<i>ANO14919_022780</i>	cSNP	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase A1	—
1019	<i>ANO14919_082880</i>	cSNP	L-lysine 2,3-aminomutase	K01843
1019	<i>ANO14919_048450</i>	cSNP	tRNA-specific adenosine deaminase subunit tad2	—
1019	<i>ANO14919_045970</i>	cSNP	Ubiquitin conjugation factor E4	K10597
1019	<i>ANO14919_139350</i>	cSNP	Trifunctional UDP-glucose 4,6-dehydratase	K01710
1019	<i>ANO14919_004530</i>	cSNP	—	—
1019	<i>ANO14919_077040</i>	cSNP	Implicated in zinc homeostasis protein 3	K07297
1019	<i>ANO14919_081700</i>	cSNP	Lovastatin diketide synthase LovF	—
1019	<i>ANO14919_132870</i>	cSNP	Levodione reductase	—
1019	<i>ANO14919_040730</i>	cSNP	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	—
1225	<i>ANO14919_094540</i>	cSNP	Tubulin-specific chaperone E	—
1225	<i>ANO14919_020700</i>	Frameshifts	Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein	—
1225	<i>ANO14919_004450</i>	cSNP	Meiotically up-regulated protein	—
1225	<i>ANO14919_090230</i>	cSNP	Dual specificity protein kinase shkD	—
1225	<i>ANO14919_144590</i>	cSNP	Cytochrome c biogenesis ATP-binding export protein CcmA	—
1407	<i>ANO14919_032540</i>	Short InDel	Cross-pathway control protein 1	—
1407	<i>ANO14919_098830</i>	cSNP	TD and POZ domain-containing protein 2	—

SCAP (ANO14919\_020700)

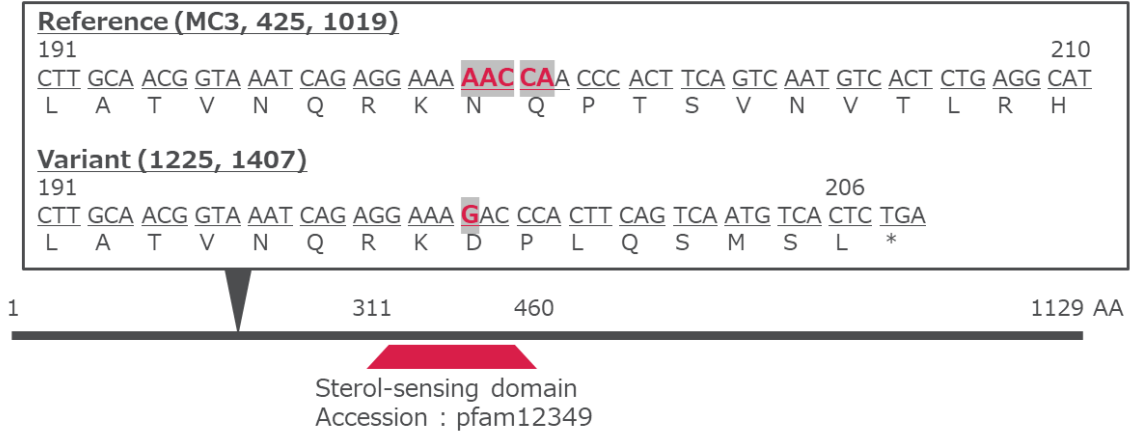


Fig. 4-2 1225 株以降の世代の変異株に導入されていた SCAP 遺伝子内の変異



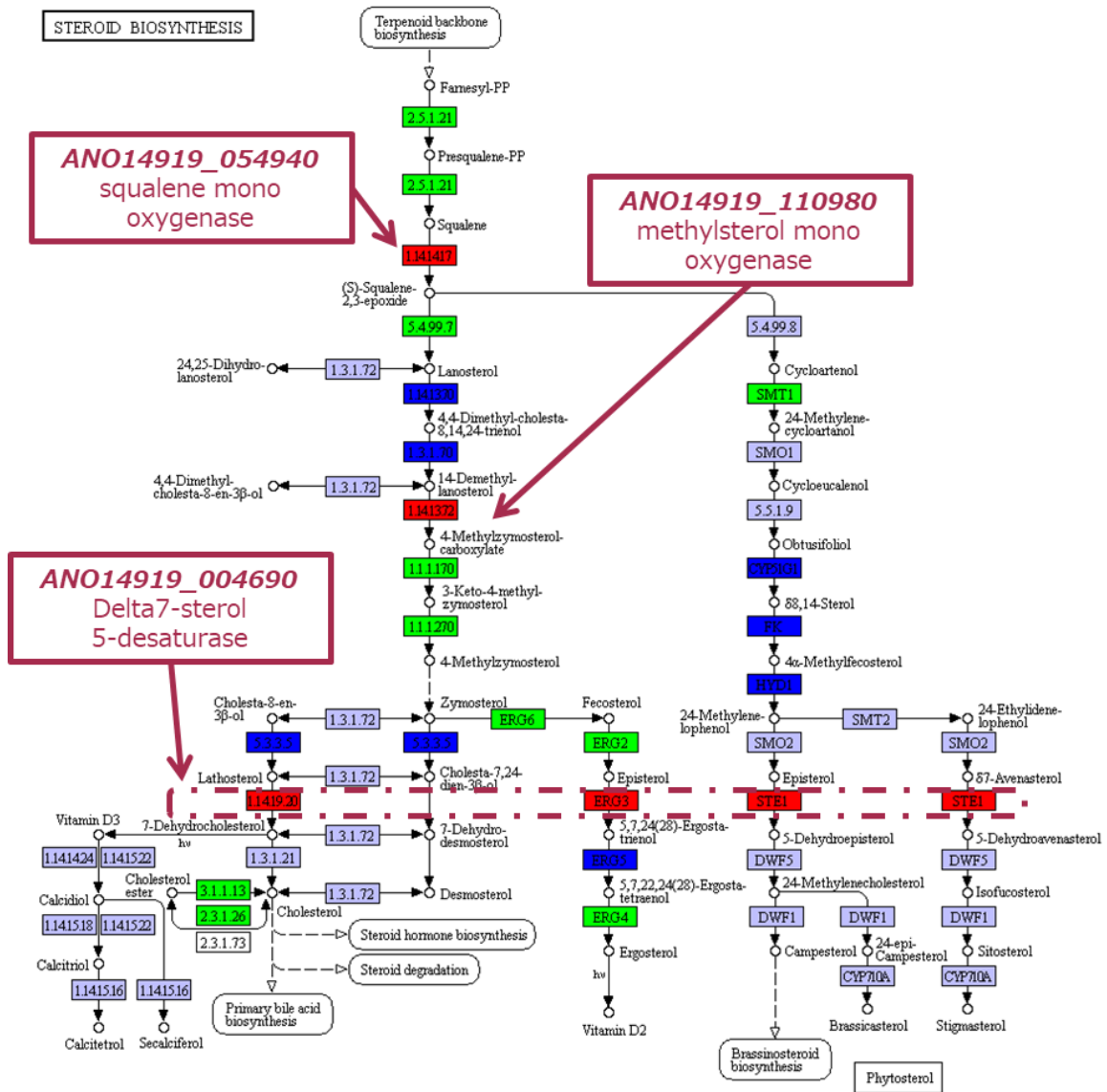


Fig. 4-3 ステロール合成経路の発現

1019 株と 1225 株の発現変動値を KEGG Mapper—Search&Color Pathway ([http://www.kegg.jp/kegg/tool/map\\_pathway2.html](http://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)) を用いて表示した。各遺伝子の発現比率によって、 $\log_2 (1225/1019) \geq 1$  は青、 $1 > \log_2 (1225/1019) > -1$  は緑、 $-1 \geq \log_2 (1225/1019)$  は赤で表示した。

Table 4-4 ステロール生合成遺伝子と FR901512 生合成遺伝子の発現

Gene ID	KEGG ID	Annotation	Day3 expression		Day5 expression	
			log <sub>2</sub> (1225 /1019)	log <sub>2</sub> (1407 /1019)	log <sub>2</sub> (1225 /1019)	log <sub>2</sub> (1407 /1019)
ANO14919_054940	K00511	squalene monooxygenase	-1.23	-1.21	-1.29	-1.38
ANO14919_110980	K07750	methylsterol monooxygenase	-0.88	-0.63	-1.75	-1.50
ANO14919_004690	K00227	delta7-sterol 5-desaturase	-0.74	-0.68	-1.60	-1.33
ANO14919_109940	-	<i>frlD</i> (Transesterase)	-1.74	1.38	-0.91	1.26
ANO14919_109950	-	<i>frlG</i> (Thioesterase)	-1.11	1.34	-0.58	1.36
ANO14919_109960	-	<i>frlC</i> (Enoyl reductase)	-1.57	1.41	-0.92	1.21
ANO14919_109970	-	<i>frlA</i> (P450 monooxygenase)	-1.67	1.14	-0.63	1.02
ANO14919_109980	-	<i>frlB</i> (Polyketide synthase)	-1.49	1.43	-0.75	1.07
ANO14919_109990	K00021	<i>frlH</i> (HMG-CoA reductase)	-0.17	0.90	0.62	0.79
ANO14919_110000	-	<i>frlE</i> (Transcription factor)	-0.44	2.06	-0.12	1.60
ANO14919_110090	-	<i>frlF</i> (Polyketide synthase)	-2.39	-0.10	-1.52	-0.13
ANO14919_122100	K00021	HMG-CoA reductase	0.30	0.82	-0.07	0.05

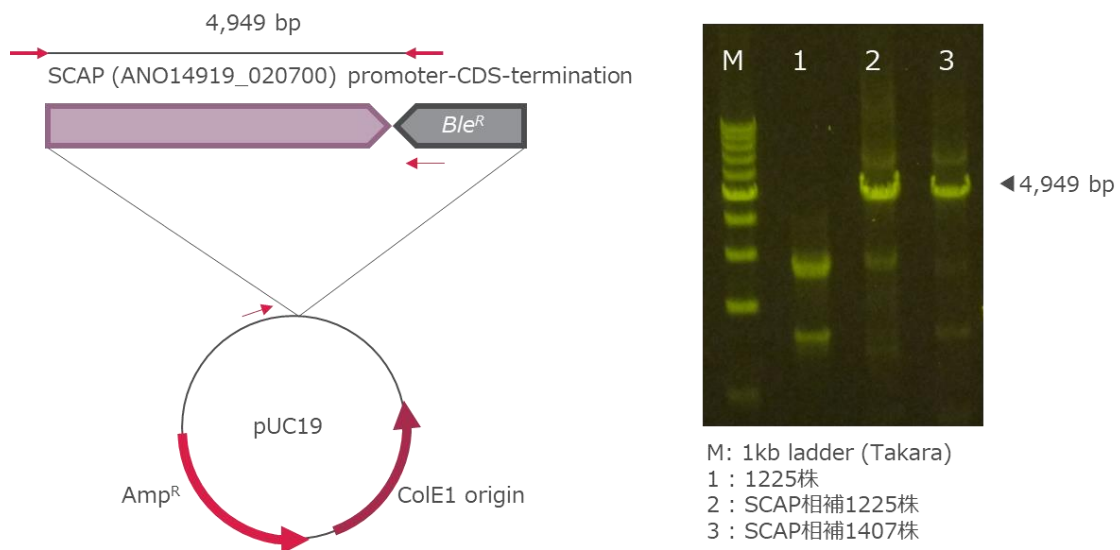


Fig. 4-4 SCAP 遺伝子導入用のプラスミドの構築と導入株ゲノムの PCR 解析

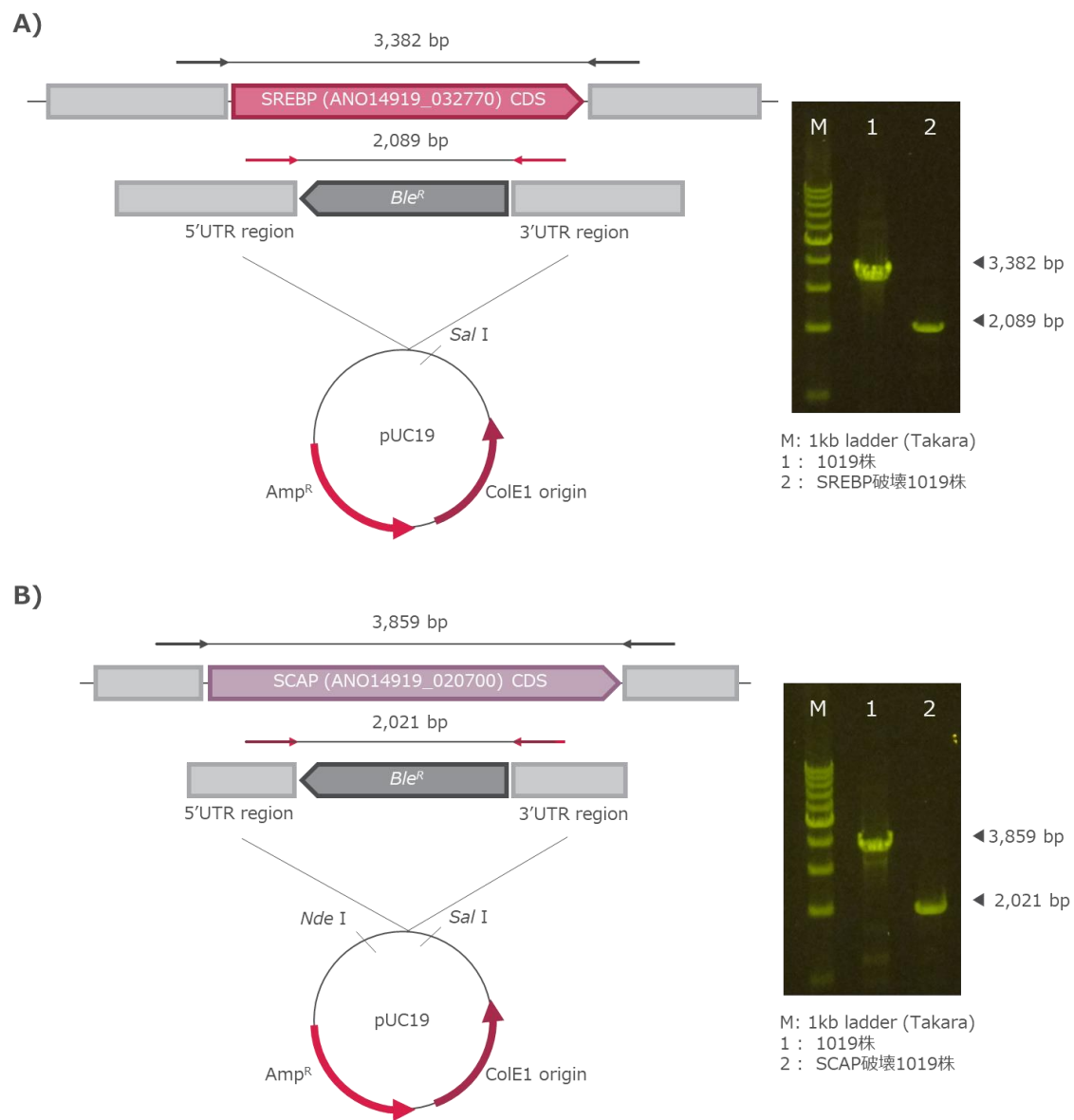


Fig. 4-5 A) SCAP 遺伝子および B) SREBP 遺伝子破壊用プラスミドと形質転換体ゲノムの PCR 解析

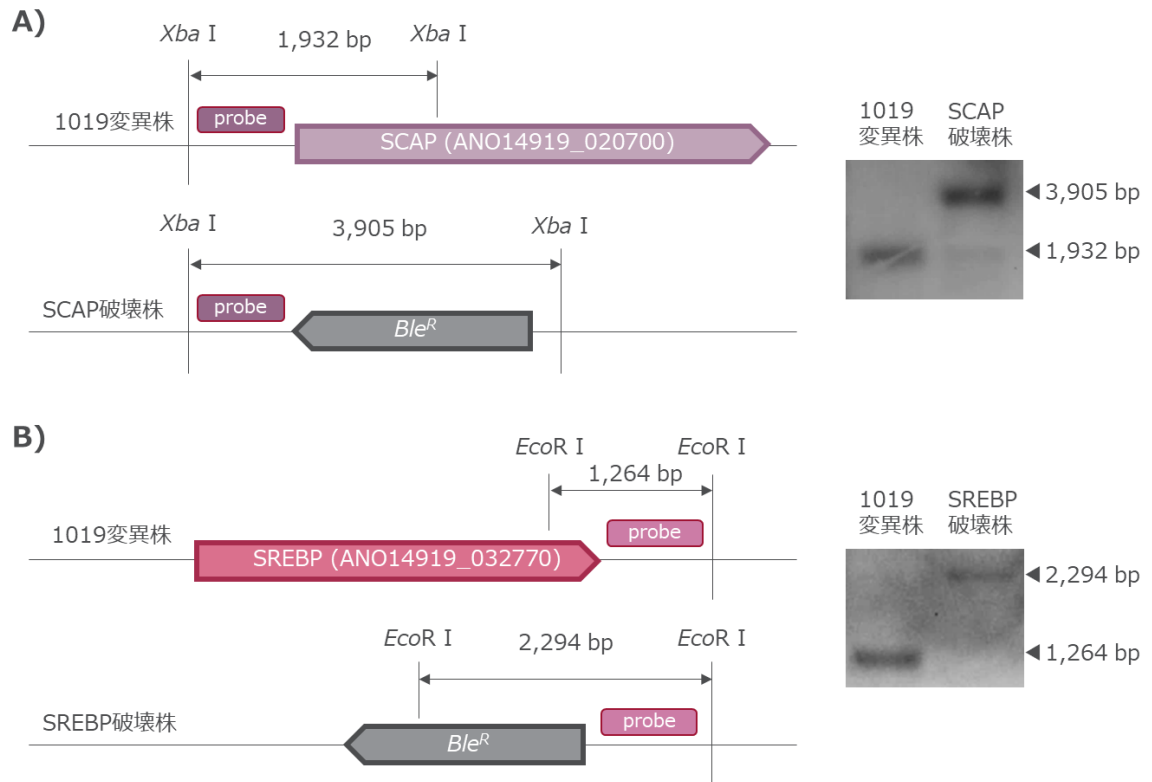


Fig.4-6 サザンハイブリダイゼーションによる A) SCAP 遺伝子、B) SREBP 遺伝子破壊株のゲノムの解析

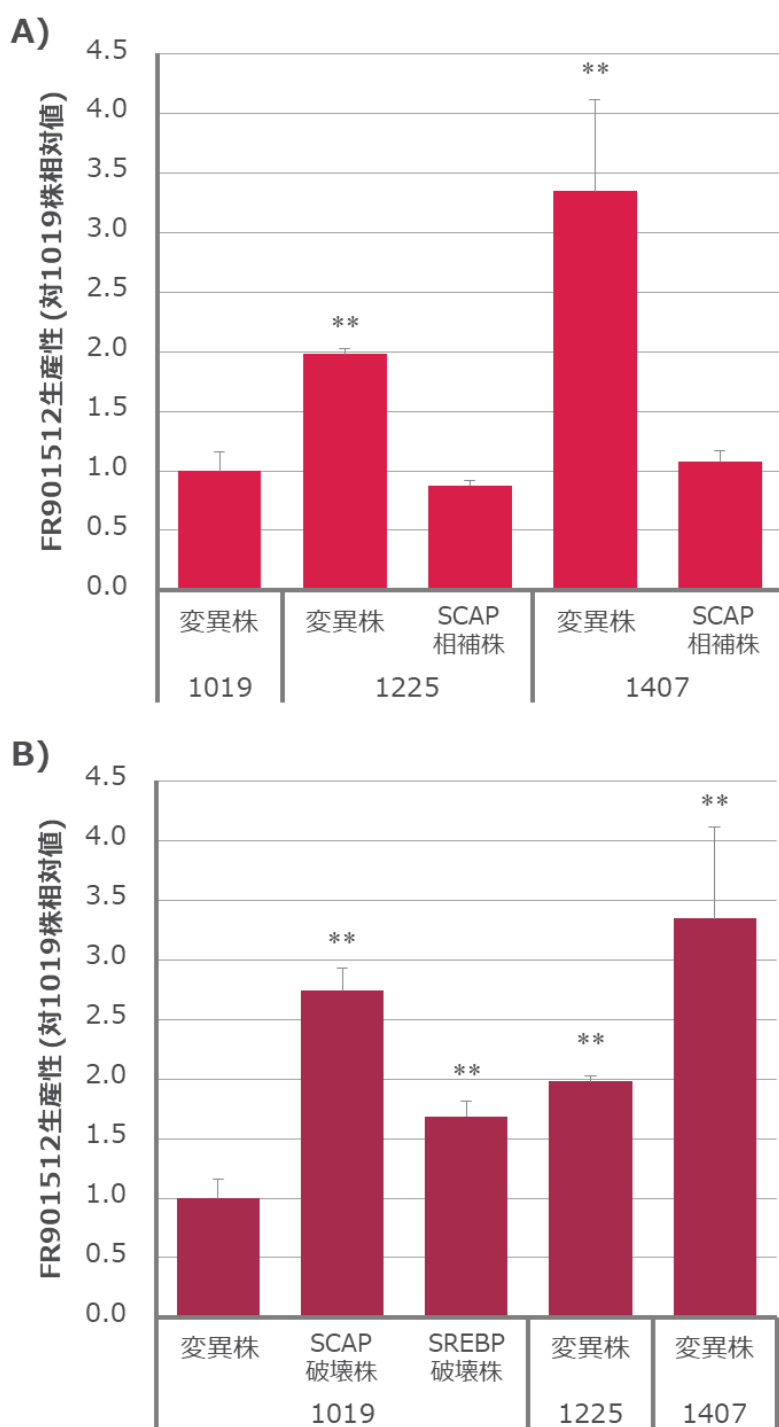


Fig. 4-7 A) SCAP の導入および B) SCAP または SREBP の遺伝子破壊による FR901512 生産への影響

\*\* ,  $p < 0.01$

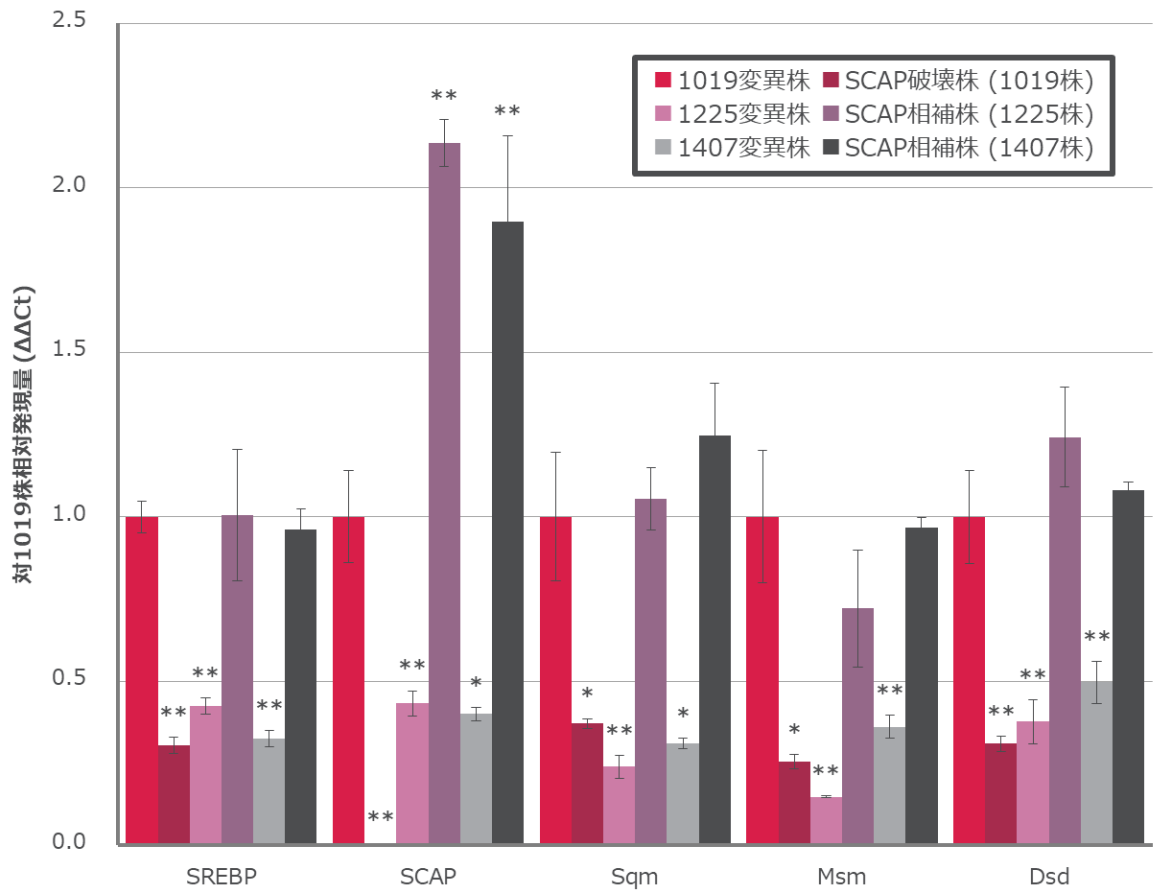


Fig. 4-8 RT-qPCR による SREBP および SCAP とステロール生合成遺伝子の発現解析

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$

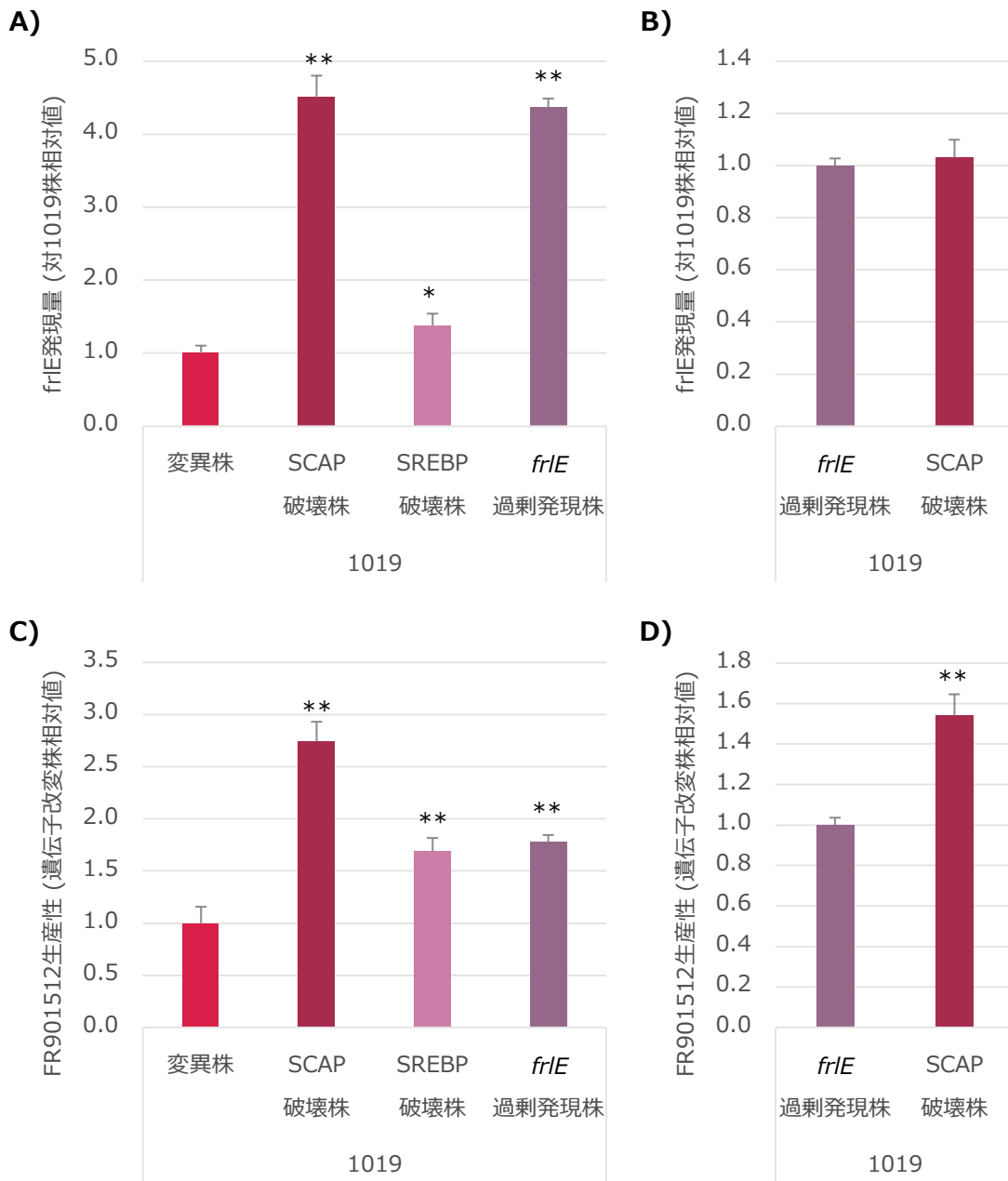


Fig. 4-9 SREBP 制御系遺伝子の遺伝子破壊株の性質

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$



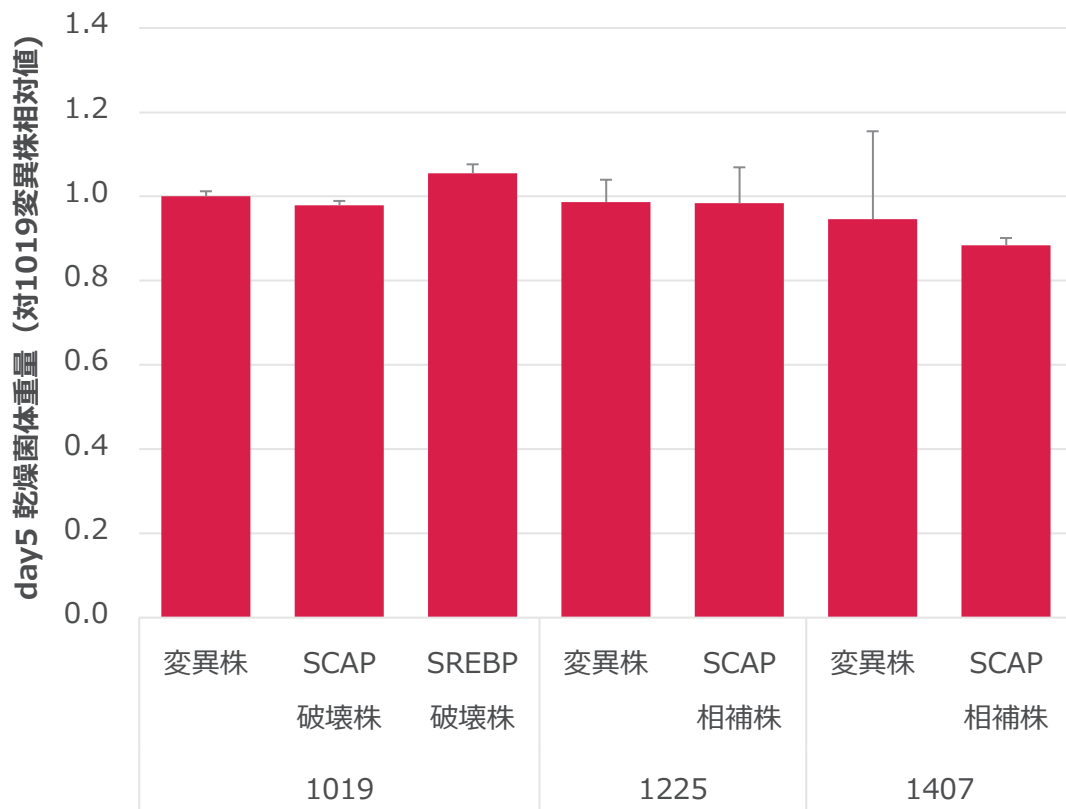


Fig. 4-10 高生産変異株と SCAP 導入株の生育 (乾燥菌体重量)

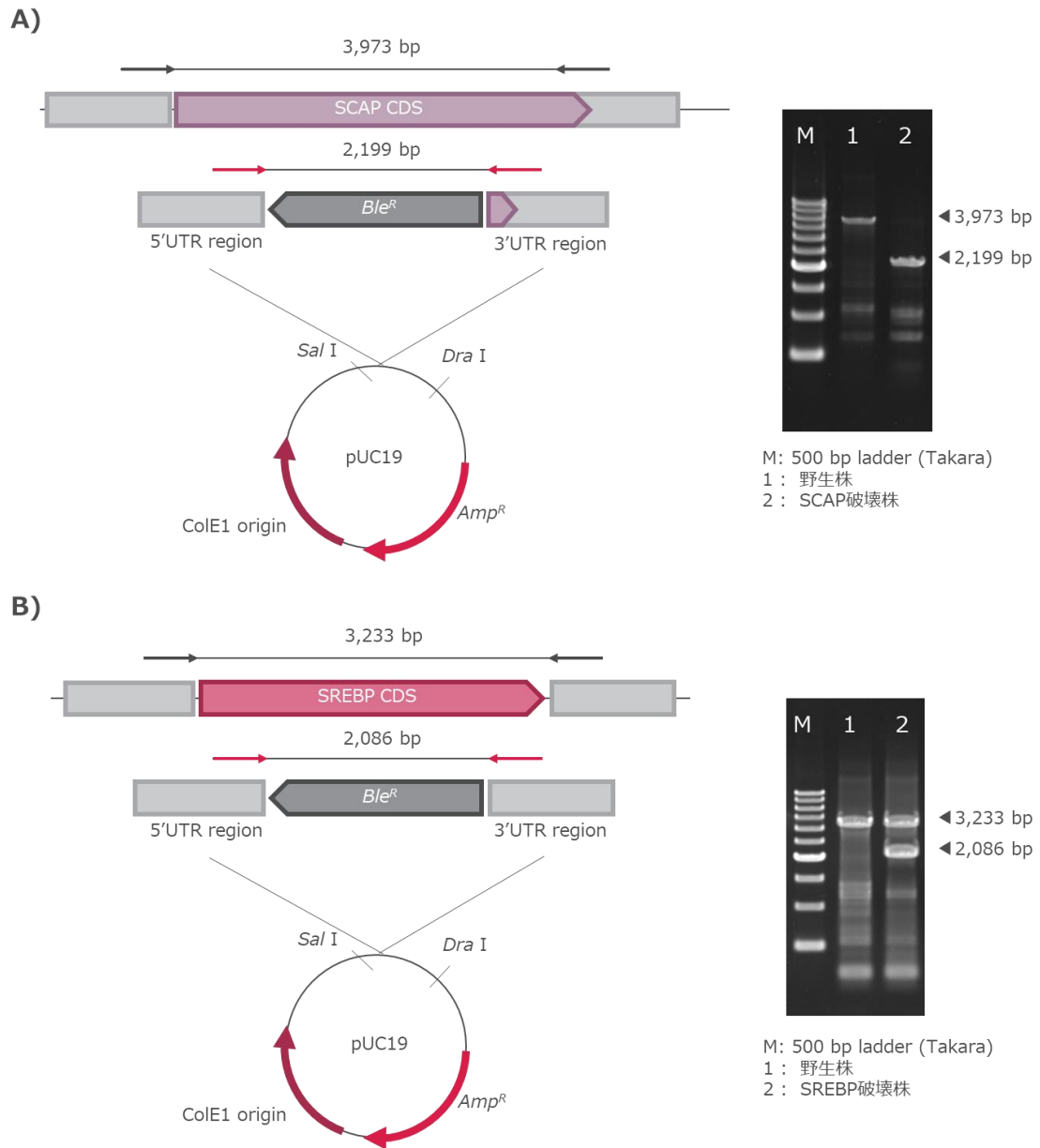


Fig. 4-11 *Aspergillus terreus* の A) SCAP 遺伝子および B) SREBP 遺伝子の遺伝子破壊用プラスミドの構築と遺伝子破壊株ゲノムの PCR 解析

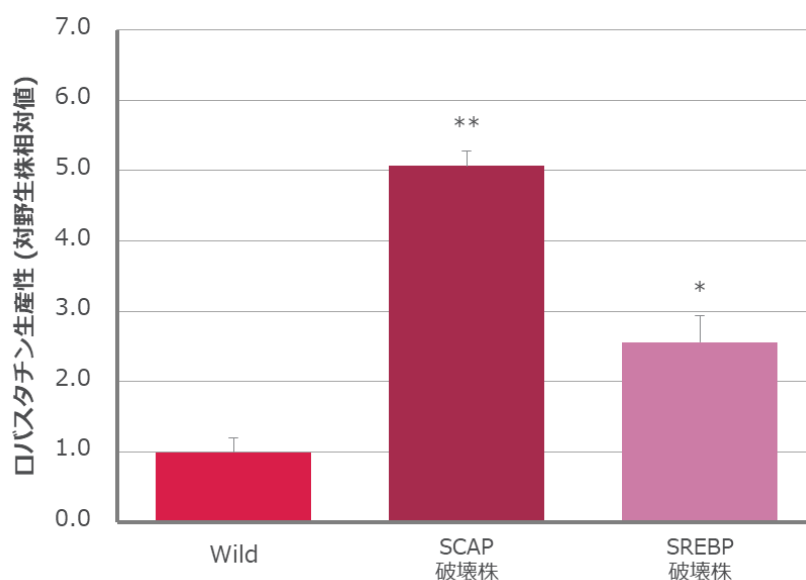


Fig. 4-12 *Aspergillus terreus* ATCC 20542 の SCAP/SREBP 遺伝子破壊によるロバスタチンの生産

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$

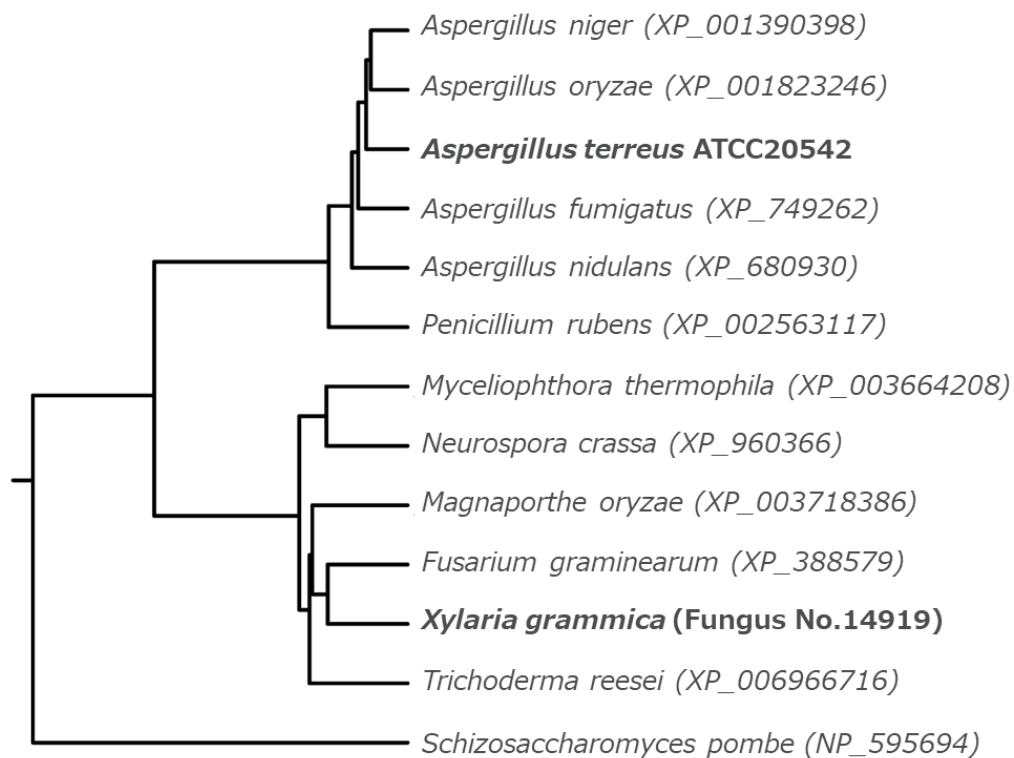


Fig. 4-13 SREBP タンパク質の系統樹 (UPGMA 法)

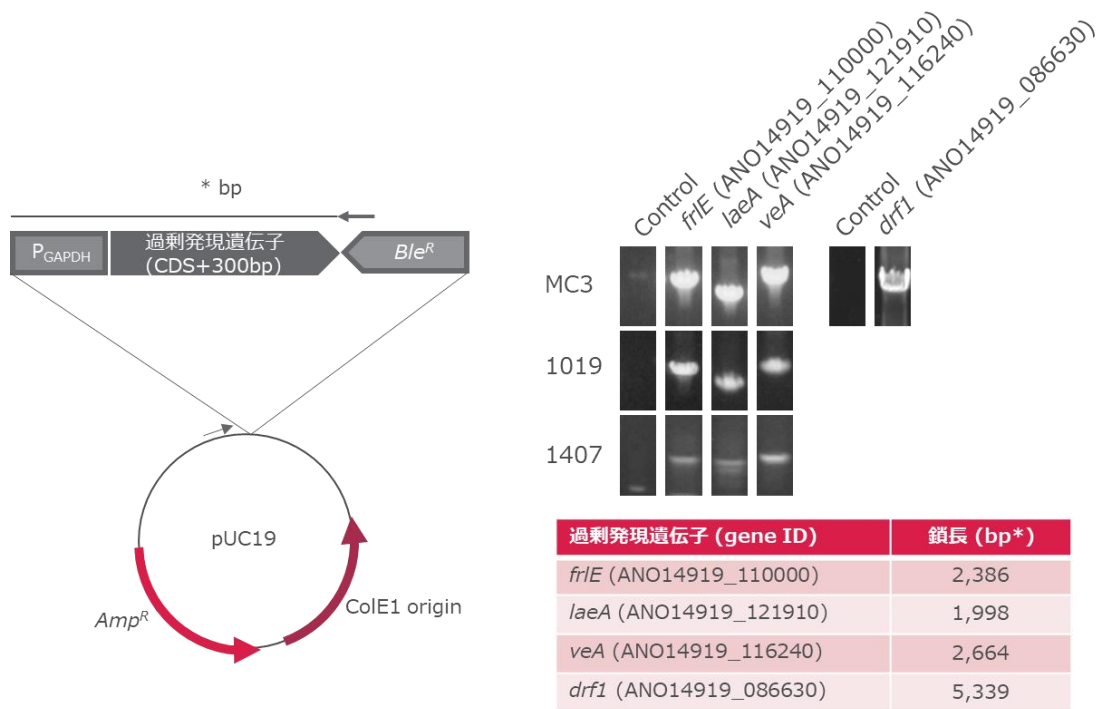


Fig. 4-14 転写因子過剰発現株の作製用プラスミドの構築と形質転換体ゲノムのPCR解析

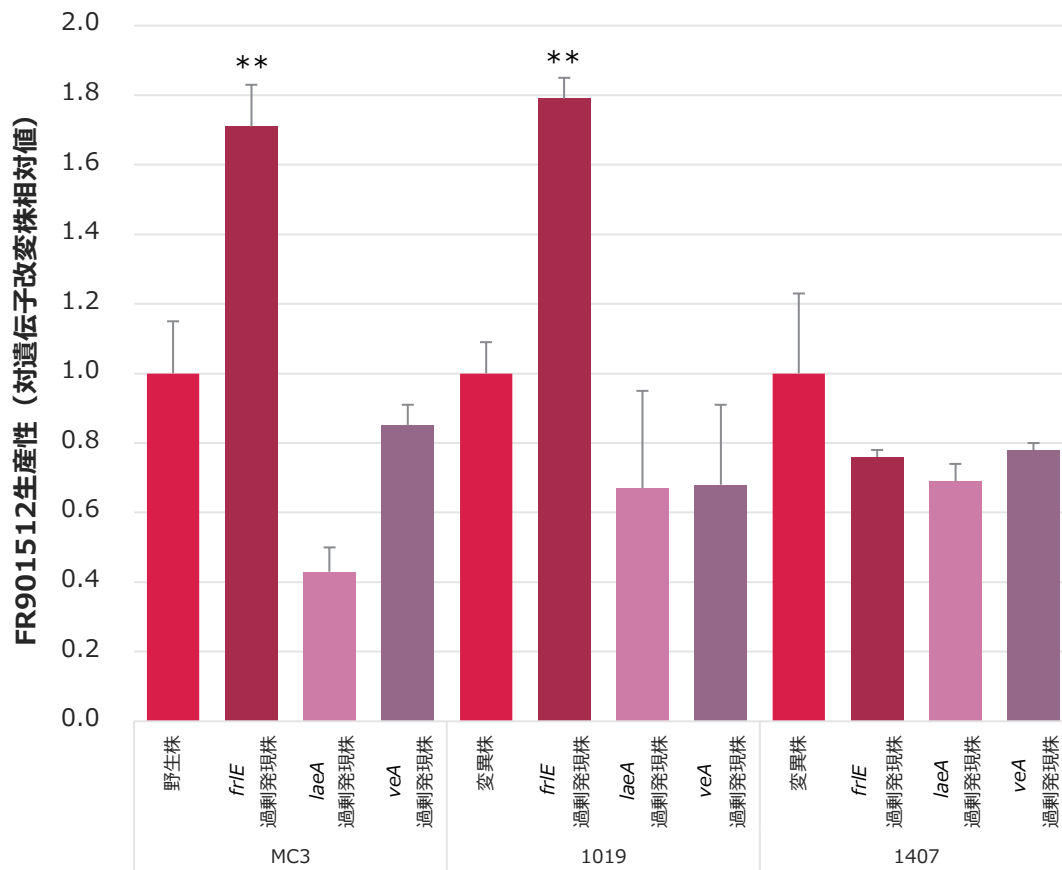


Fig. 4-15 転写因子過剰発現株による FR901512 の生産

\*\* ,  $p < 0.01$

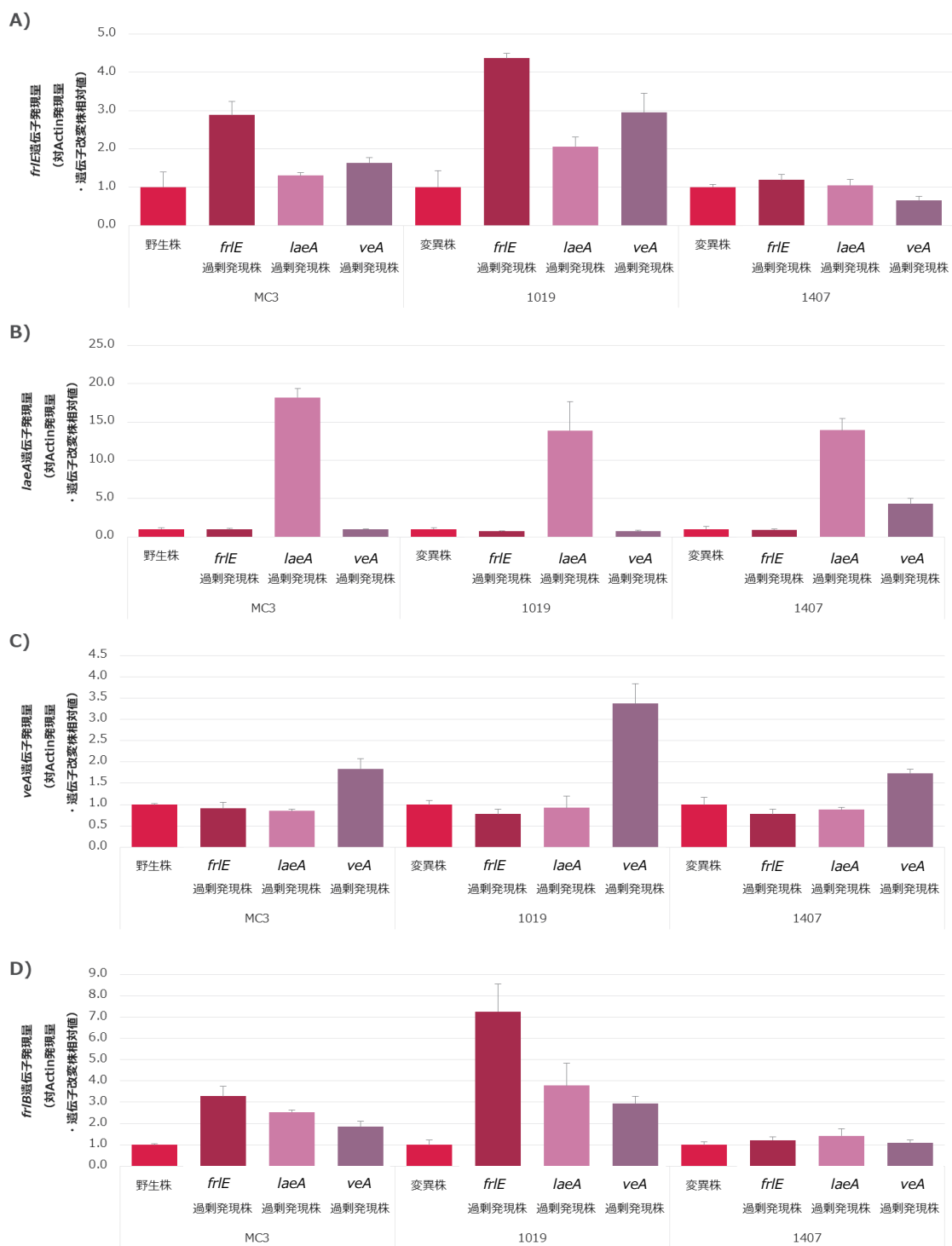


Fig. 4-16 転写因子過剰発現株の RT-qPCR 解析

A) *frlE* の転写量、B) *laeA* の転写量、C) *veA* の転写量、D) *frlB* の転写量

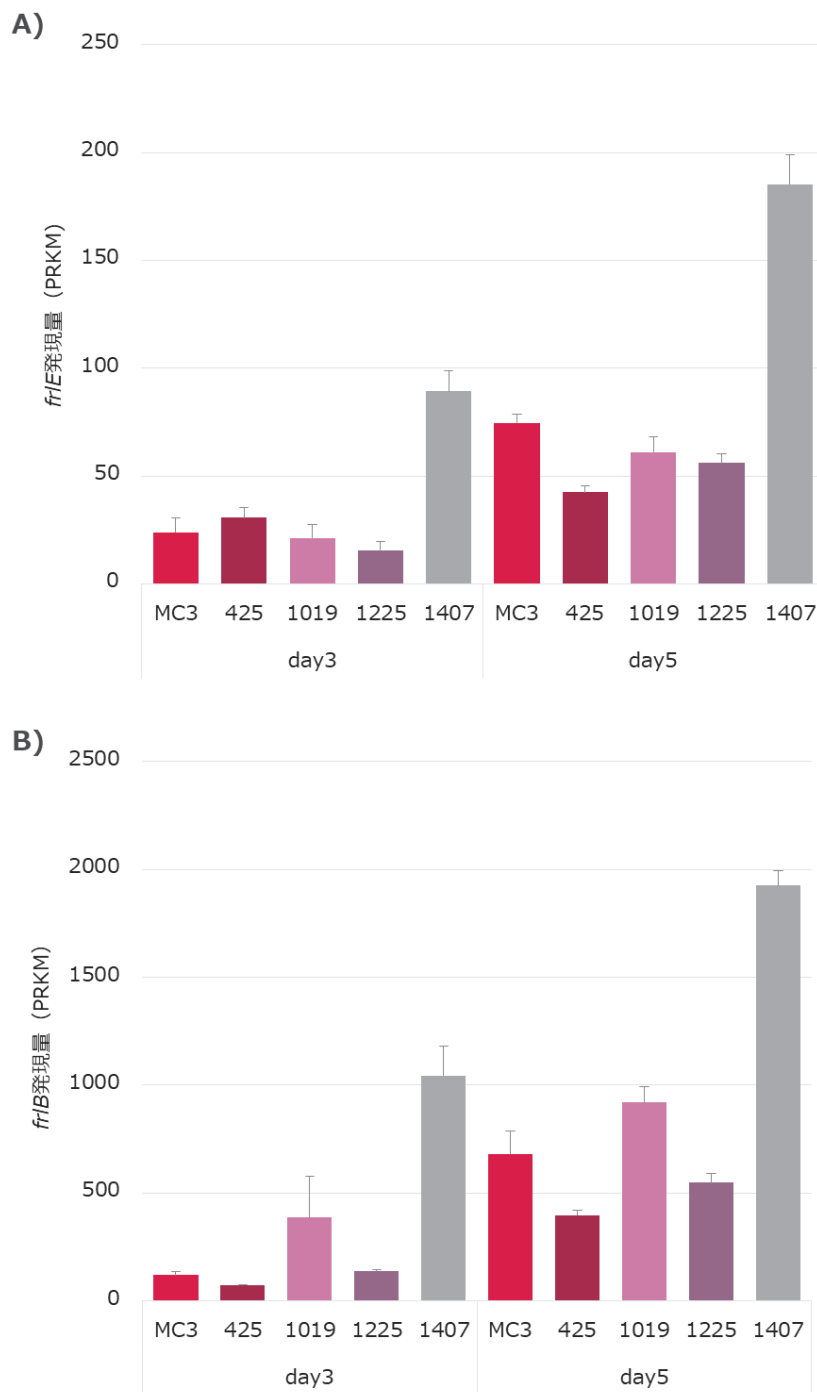


Fig. 4-17 FR901512 の生合成遺伝子の転写量

A) *frlE* の転写量、B) *frlB* の転写量

Table 4-5 *frlE* の発現量と相関のある転写因子 (Top 5)

gene ID	Correlation coefficient with <i>frlE</i>	Pfam: Family	description
ANO14919_084720	0.82	PF00170	bZIP_1
ANO14919_086630	-0.81	PF04082	Fungal_trans
ANO14919_113780	0.80	PF04082, PF02746, PF13378	Fungal_trans, MR_MLE_N, MR_MLE_C
ANO14919_116160	0.79	PF04082	Fungal_trans
ANO14919_055150	0.76	PF04082	Fungal_trans

MC3、425、1019、1225、1407 株の day3、day5 における RPKM データを使用して算出した。

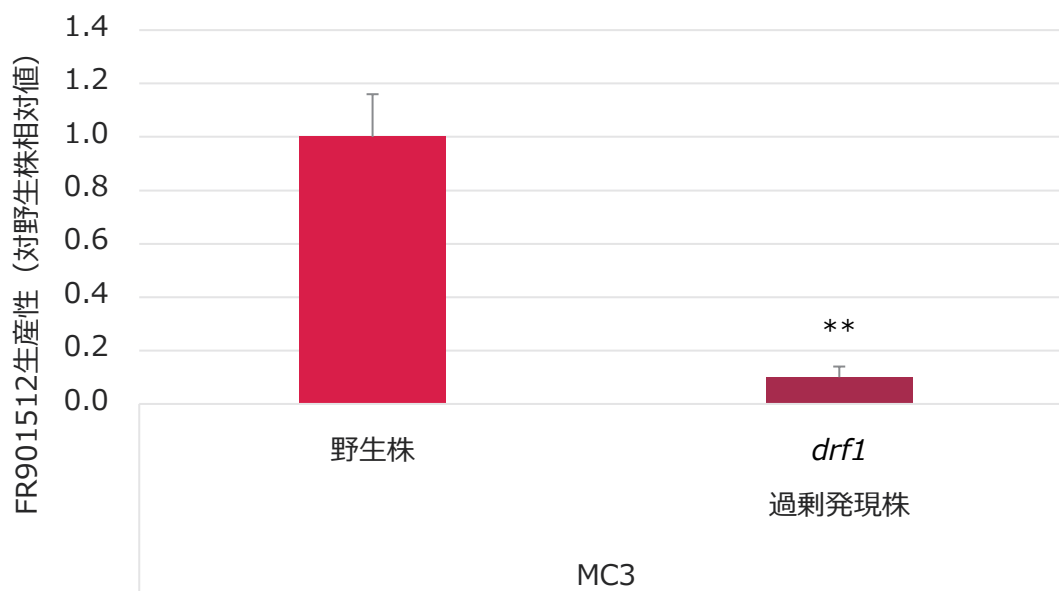


Fig. 4-18 *drf1* 過剰発現による FR901512 の生産

\*\* ,  $p < 0.01$



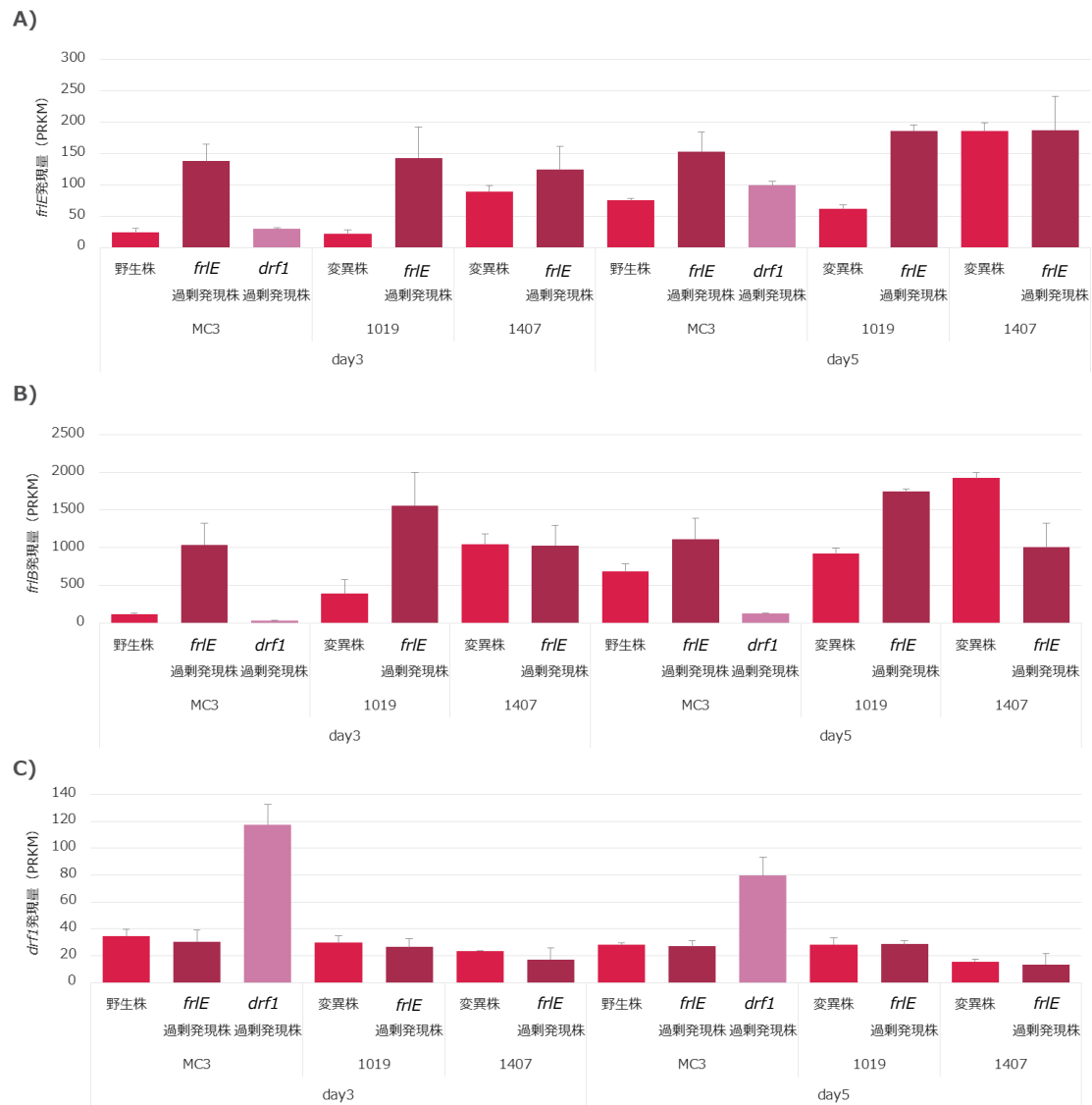


Fig. 4-19 *frlE*、*drf1* の過剰発現株の RNA-Seq 解析

遺伝子発現量は RPKM 値として示した。A) *frlE* の転写量、B) *frlB* の転写量、C) *drf1* の転写量

Table 4-6 糸状菌の *drf1* ホモログの探索

organism	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession No.
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 (taxid:341663)	hypothetical protein ATEG_10025	974	974	95%	0	49%	XP_001209327
<i>Penicillium citrium</i> (taxid:5077)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 (taxid:510516)	unnamed protein product	699	699	61%	0	51%	XP_001822339

Table 4-7 *drf1* の発現量に影響を受ける遺伝子 (1/3)

Gene ID	KEGG ID	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession No.
ANO14919_003870	-	Epigen	30.8	30.8	15%	6.6E+00	29%	Q924X1.1
ANO14919_010330	-	Putative nudix hydrolase 7	63.9	63.9	58%	3.0E-10	26%	P91148.2
ANO14919_010760	-	Nitrogen assimilation transcription factor nirA	96.3	96.3	45%	5.0E-19	24%	P28348.1
ANO14919_011490	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_013460	K19366	Satratoxin biosynthesis SC1 cluster protein 4	37.0	37.0	40%	4.7E-02	27%	A0A084B9Z2.1
ANO14919_017610	-	Uncharacterized protein C3H1.02c	535.0	535.0	91%	2.0E-171	31%	Q10068.1
ANO14919_022420	-	Efflux pump FUS6	221.0	221.0	95%	5.0E-67	43%	W7MLD3.1
ANO14919_023990	-	Non-reducing end beta-L-arabinofuranosidase	284.0	284.0	89%	3.0E-85	33%	E8MGH8.1
ANO14919_024000	K12580	Zinc finger protein MSN2	68.2	105.0	17%	6.0E-11	55%	P33748.1
ANO14919_025830	-	Mitotic-spindle organizing protein 1	100.0	100.0	72%	1.0E-28	79%	A4QYG1.1
ANO14919_028640	-	Forkhead protein sep1	33.1	33.1	10%	5.9E+00	32%	O43058.1
ANO14919_030430	-	Putative NADP-dependent oxidoreductase YfmJ	266.0	266.0	99%	4.0E-86	44%	O34812.1
ANO14919_038080	K11483	Uncharacterized N-acetyltransferase YsnE	32.0	32.0	18%	2.5E+00	31%	P94562.1
ANO14919_040320	-	Ankyrin repeat and SOCS box protein 3	55.5	55.5	31%	7.0E-07	30%	Q9Y575.1
ANO14919_041010	-	Efflux pump patC	399.0	399.0	96%	3.0E-132	40%	A1CFL0.1
ANO14919_046120	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_051740	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_053640	-	Transcriptional repressor NrdR	27.3	27.3	33%	5.2E+00	56%	Q983B3.1
ANO14919_059150	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_059330	-	Uncharacterized MFS-type transporter C1683.03c	264.0	264.0	87%	1.0E-80	34%	Q9P6J7.1
ANO14919_059340	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_059720	-	Berberine bridge enzyme-like 26	78.2	78.2	33%	4.0E-14	29%	Q9FKU8.1
ANO14919_061820	-	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 4B	31.6	31.6	13%	9.8E+00	38%	Q8C6J9.1
ANO14919_062740	K00750	Lon protease homolog 2, peroxisomal	31.2	31.2	13%	4.1E+00	45%	Q2V573.1
ANO14919_063230	-	FAD-dependent monooxygenase BOA8	145.0	145.0	99%	1.0E-37	31%	GOLET6.1
ANO14919_063240	-	Homoserine O-acetyltransferase	28.1	28.1	45%	6.8E+00	35%	B8IZQ7.1
ANO14919_063250	-	Probable feruloyl esterase B-2	145.0	145.0	79%	1.0E-40	59%	B8NPT0.1

Table 4-7 *drf1* の発現量に影響を受ける遺伝子 (2/3)

Gene ID	KEGG ID	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession No.
ANO14919_063260	-	Replication-associated protein	28.5	28.5	76%	7.4E+00	27%	Q80GM6.2
ANO14919_069190	-	Periplasmic beta-glucosidase	282.0	282.0	97%	1.0E-82	31%	P33363.2
ANO14919_070800	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_075280	K08192	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial	496.0	496.0	95%	4.0E-166	41%	Q9H6R3.1
ANO14919_076630	-	Uncharacterized transcriptional regulatory protein C1773.12	37.4	37.4	75%	1.4E-01	23%	O94569.1
ANO14919_079220	-	Probable cytosol aminopeptidase	33.9	33.9	9%	3.2E+00	36%	O32956.1
ANO14919_079750	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_082030	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_083960	-	Halotolerance protein 9	44.3	44.3	7%	3.0E-03	40%	Q12180.1
ANO14919_086180	-	Regulatory protein cys-3	45.4	45.4	27%	5.0E-04	29%	P22697.1
ANO14919_088480	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_089660	-	Alkaline phosphatase H	92.0	92.0	51%	4.0E-19	35%	P35483.2
ANO14919_092390	-	Vacuolar basic amino acid transporter 1	126.0	126.0	55%	1.0E-29	30%	Q04301.1
ANO14919_095610	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_097970	-	2,4-dichlorophenol 6-monoxygenase	419.0	419.0	99%	5.0E-139	39%	Q8KN28.3
ANO14919_101040	K17807	Enolase	34.3	34.3	7%	3.5E+00	36%	C4Z1M9.1
ANO14919_102660	-	SEC14 cytosolic factor	118.0	118.0	71%	5.0E-29	28%	Q75DK1.2
ANO14919_103830	-	Protein CfxQ	134.0	301.0	58%	2.0E-33	36%	P23013.1
ANO14919_106840	K00108	MICAL-like protein 2	35.0	35.0	26%	7.2E-01	32%	D3ZEN0.2
ANO14919_107950	K15877	Uncharacterized transporter YIL166C	406.0	406.0	84%	1.0E-134	42%	P40445.1
ANO14919_109940 ( <i>frlD</i> )	-	Transesterase (FR901512 biosynthetic gene)	-	-	-	-	-	-
ANO14919_109950 ( <i>frlG</i> )	-	Thioesterase (FR901512 biosynthetic gene)	-	-	-	-	-	-
ANO14919_109960 ( <i>frlC</i> )	-	Enoyl reductase (FR901512 biosynthetic gene)	-	-	-	-	-	-
ANO14919_109970 ( <i>frlA</i> )	-	P450 monoxygenase (FR901512 biosynthetic gene)	-	-	-	-	-	-
ANO14919_109980 ( <i>frlB</i> )	-	Polyketide Synthase (FR901512 biosynthetic gene)	-	-	-	-	-	-
ANO14919_114840	-	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	590.0	590.0	99%	0.0E+00	62%	P54874.1
ANO14919_118640	-	Probable 1-alkyl-2-acetyl-glycerophosphocholine esterase	142.0	142.0	97%	1.0E-37	30%	D4AZY1.1

Table 4-7 *drf1* の発現量に影響を受ける遺伝子 (3/3)

Gene ID	KEGG ID	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession No.
ANO14919_119550	-	Beta-glucosidase	32.7	32.7	13%	2.0E+00	48%	P07337.1
ANO14919_124110	K13093	B3 domain-containing transcription repressor VAL1	33.5	33.5	26%	2.6E+00	34%	Q8W4L5.1
ANO14919_125450	-	Pantothenate transporter liz1	386.0	386.0	99%	9.0E-129	41%	O43000.2
ANO14919_125800	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_127530	-	(+)-eremophilene synthase	100.0	100.0	48%	2.0E-24	55%	S0DX56.1
ANO14919_129040	-	No significant similarity found.	-	-	-	-	-	-
ANO14919_131620	-	Isoaspartyl peptidase	160.0	160.0	29%	4.0E-42	36%	Q7CQV5.1
ANO14919_142050	-	Heterokaryon incompatibility protein S	110.0	110.0	100%	5.0E-28	27%	B2ACC7.1
ANO14919_144960	-	Drug resistance protein YOR378W	187.0	187.0	70%	1.0E-51	33%	Q08902.1

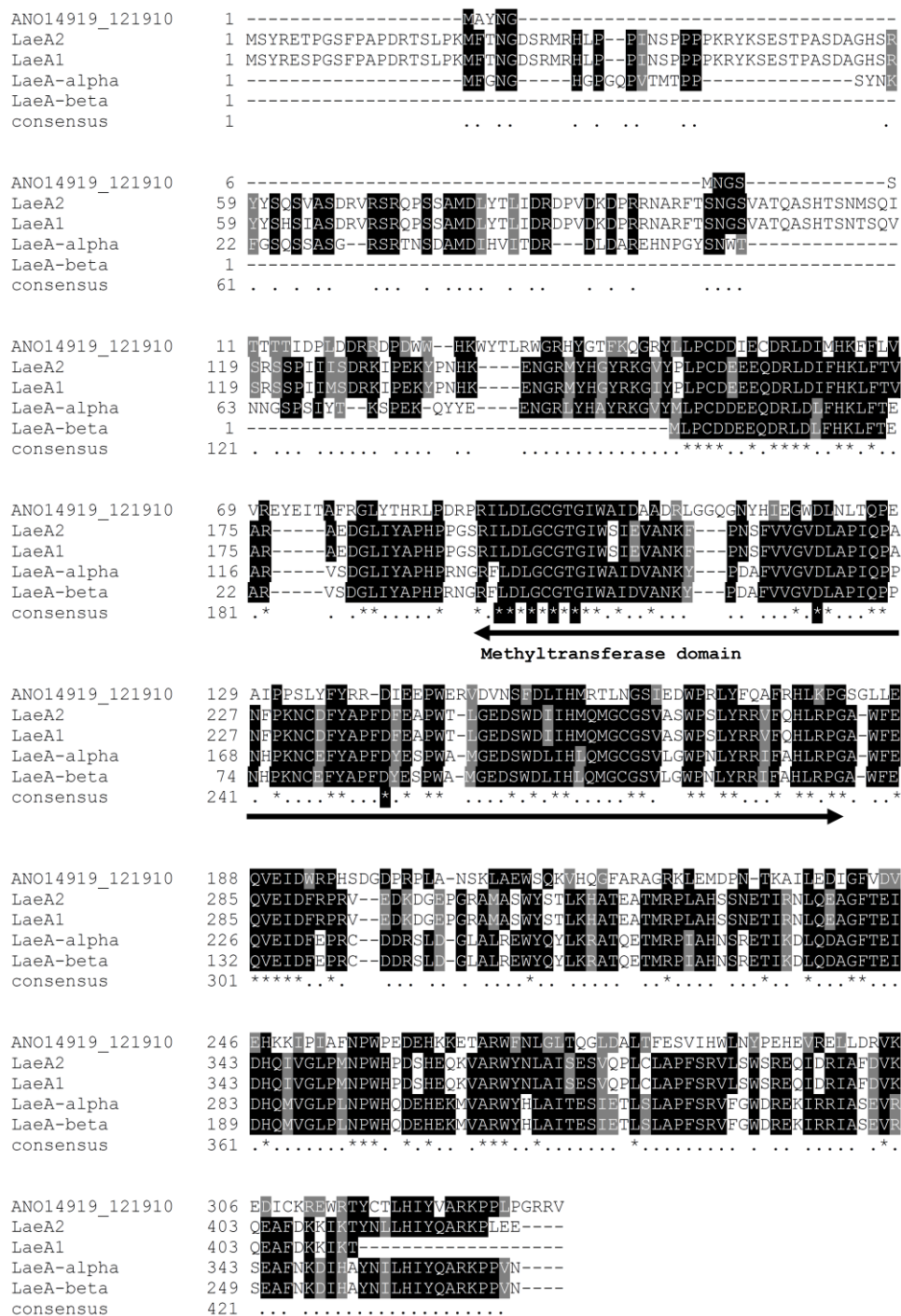


Fig. 4-20 LaeA のアミノ酸配列の比較

保存された methyltransferase SAM binding sites の範囲を矢印で表示した。 *P. citrinum* の LaeA2 (BAL61197.1)、LaeA1 (BAL61196.1) と *A. terreus* の LaeA-alpha (ARB51348.1)、LaeA-beta (ARB51350.1) を比較対象として使用した。

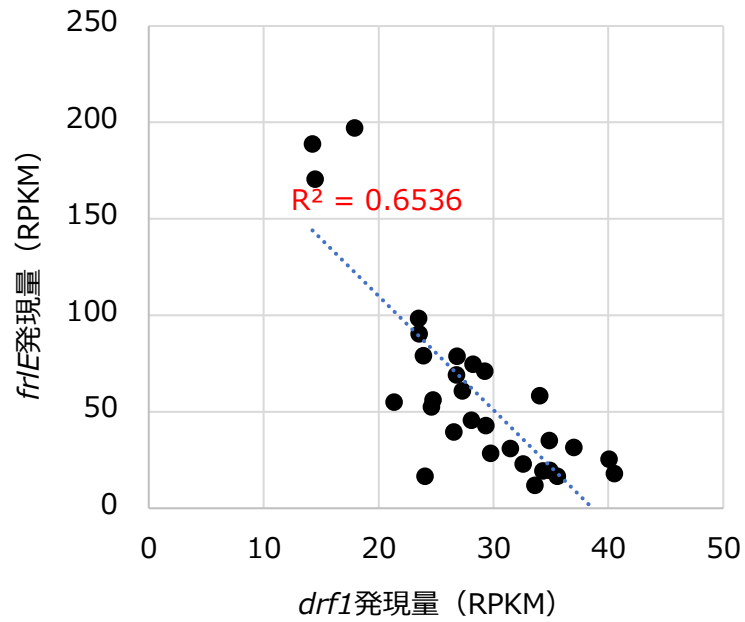


Fig. 4-21 *drf1* 発現量と *frlE* 発現量の相関

MC3 株、425 株、1019 株、1225 株、1407 株における RPKM データを使用した。

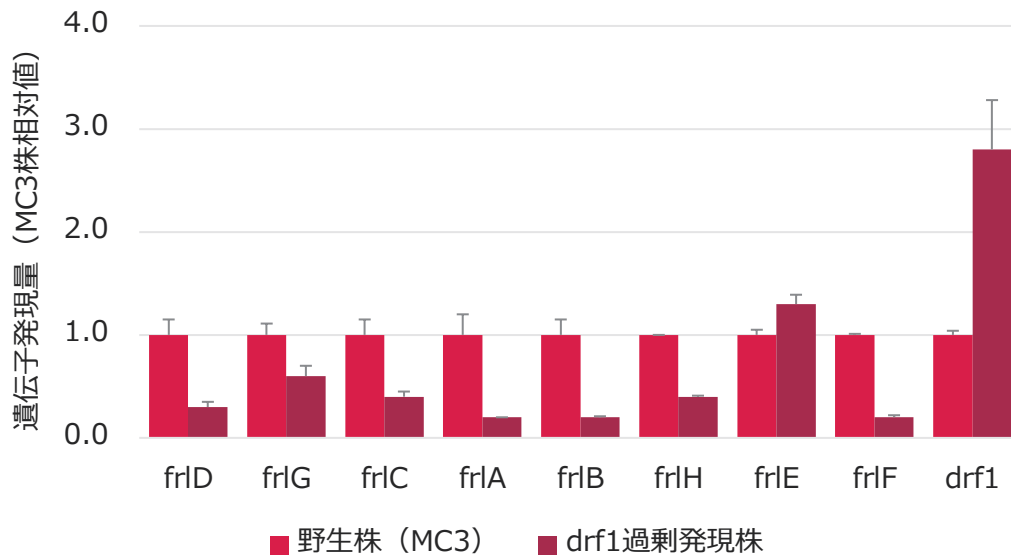


Fig. 4-22 *drf1* 過剰発現株における FR901512 生合成遺伝子の発現

各菌株の培養 5 日目のデータを示した。

## 第五章 総合考察

次世代シーケンサーが身近なものとなり、ゲノム解析やトランスクリプトーム解析などの遺伝子解析を簡単に実施できる世の中になった。本研究でも実施した糸状菌程度（数十 Mbp）のゲノムサイズであれば数か月の期間、数十万円程度の費用でゲノム解析を実施することが可能であり、糸状菌 No.14919 のようにモデル生物ではない微生物のゲノム解析の報告事例も増加している。しかしゲノム解析により得られた情報を、工業化レベルでの生産性の向上やスケールギャップ解析やトラブル対応などの産業に直結する事例は少ない。また、情報を取得しても、得られた膨大なビッグデータをどのように利用・活用するかという点も課題となっており、生物学のいわゆるウェットな実験にドライな情報解析を有効に活用できるかが重要となっている。

本研究では、かつて開発が進められていた高脂血症薬である FR901512 の生産菌である糸状菌 No. 14919 株を題材に、野生株や生産性向上変異株のゲノム解析から得られた知見を分子育種に応用することを目指した。本研究によって解読したゲノム情報から FR901512 の生合成遺伝子を初めて同定することができた。FR901512 がこれまで基礎研究の知見が多いロバスタチンと非常によく似た構造を持つうえ、FR901512 の生合成遺伝子もロバスタチンのそれらと相同性が高く、クラスターの構成も一致していたため、これらの生合成遺伝子の比較解析を行った。醗酵原体として既知な生合成スタチンであるロバスタチンとメバスタチンの構造の違いはメチル基の修飾の有無のみでありよく似ている。一方、コア構造中の還元位置が異なる FR901512 の生合成研究を実施することは、未知な部分の多い生合成遺伝子によるポリケチド生合成のさらなる理解に繋がる。



ゲノム情報から推定した FR901512 の生合成遺伝子の機能の解明とロバスタチンの生合成遺伝子との入れ換えによる両者の機能の比較解析には、*S. cerevisiae* を異種発現ホストとして用いた。糸状菌の異種発現宿主としては、*A. oryzae* が用いられることが多いが [98]、*S. cerevisiae* を宿主として糸状菌に眠る新規物質を発現させる報告もある [19]。本研究のように複雑な二次代謝物の生合成遺伝子を入れ替え、合成生物学的手法によって新規化合物を作る手法は従来から提案されているが、ドメインの入れ換えなどの事例が多く [99]、巨大な遺伝子クラスターを自由に組み替える技術は限られた研究グループしか実現してこなかった。本研究では、複数の発現ベクターを活用し、さらに簡便に遺伝子を入れ替える工夫をすることで、類似の生合成遺伝子クラスター間でクラスターを形成する遺伝子の組み合わせを容易に得ることを可能にした。これまでの類似の研究では、メチル基や水酸基などの簡単な修飾基に限られた改変が主であり、基本骨格となる構造が大きく異なる新規物質を創出できることを示した例として本研究は非常に価値が高い。実際に本研究では、FR901512 とロバスタチンの生合成遺伝子を入れ替え、2 つのコア構造と 2 つの側鎖（アセチル鎖または 2-メチルブチリル鎖）のコンビナトリアルスタチン生合成を行った。これにより、2 つの新規スタチン化合物が得られた。さらに、PKS 研究において興味深い結果が得られた。コンビナトリアル比較実験により、2 つの PKS 遺伝子 (*fri/lovB*、*fri/lovF*) が必ずしもコア構造を特定するとは限らないが、エノイルレダクターゼおよびチオエステラーゼ (*fri/lovC*、*fri/lovG*) はコア構造を決定する因子であることを示した。アシルトランスフェラーゼ遺伝子 (*fri/lovD*) はテトラリンとヘキサヒドロナフタレンのヒドロキシル基を区別しないが、P450 モノオキシゲナーゼ (*fri/lovA*) はその違いを認識する。スタチンの側鎖は、*lovD* と *lovF* のホモログを利用することによってさらに多様化する

ることができるが、*lovD* ホモログを有するスタチン様遺伝子クラスターは、FR901512 以外には、ロバスタチンとコンパクトチンの生合成遺伝子クラスターにのみ見出された。*in vitro* での酵素反応により生合成研究を行うことも重要であるが、それと並行して本研究のような *in vivo* での生合成研究を実施することで、研究サイクルを高速化・高質化することが可能である。

本研究では、FR901512 とロバスタチンの比較研究の発展事例として、機能が類似した二次代謝産物の生合成遺伝子を MIPS-CG を用いて網羅的に収集し、*S. cerevisiae* のコンビナトリアル発現系と組み合わせることで、多様な医薬品シーズの候補化合物の生合成が期待できることを示した。二次代謝産物の生合成遺伝子には機能未知なものが多く含まれることから、機能が同定されずにデータベースの中に眠る遺伝子情報を本研究で用いた戦略によって効果的に発掘することで、様々な二次代謝産物を生合成することが可能であると期待される。スタチンやその他の基礎研究が進んだ化合物と生合成遺伝子の情報を活用して、この研究を繰り返していけば、MIPS-CG の検索条件設定の高質化により、複雑な二次代謝産物の構造をデザインすることも可能となり、醗酵医薬品のシーズとなる化合物を自由自在にデザインすることにつながるだろう。医薬品シーズの探索・開発に際して、有機合成と生物活性の構造活性相関による化合物変換が行われるが、ひとつひとつの官能基変換に時間がかかり、置換基変換のバラエティにも制限があるなどの課題がある。これに対して、本研究で見出した MIPS-CG とコンビナトリアル発現系を用いれば、様々な遺伝子発現パターンの組み合わせによって得られる、主成分が異なる抽出物を同時に活性測定に用いて有用物質を探索することで、より大規模なスクリーニングを短期間に展開することが可能となる (Fig. 5-1)。人知を超えた新規化合物の創出し、スクリーニングに供することができる可能性もある。さらに本法は、遺伝子抽出に AI による機

械学習を取り入れ、自動化によって遺伝子クローニングと酵母での発現・解析を大幅な省力化をすることも可能である。今後、提唱したこの拡張性の高いスクリーニング法を実用レベルまで高質化し、実際に醗酵産物の医薬品シーズの探索に用いられるようになることを期待する。

また、本研究では、ランダム突然変異導入株の変異点の分析と逆遺伝学的手法による、二次代謝産物の生産性向上の原因となる鍵遺伝子の検証を実施した。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析技術をベースにした二次代謝産物の生産性の向上の報告は多数ある [100, 86]。糸状菌 No. 14919 からは、ステロール欠乏条件下で関連遺伝子を高発現化する制御因子である SREBP が見いだされた。他の糸状菌での PKS 産物の生産性向上効果も示された。このように当該化合物の高生産性変異株から生産性の向上に寄与する鍵遺伝子情報を収集するために、突然変異のスクリーニング、変異点解析、鍵遺伝子の同定、過剰発現または欠失の操作のこのサイクルをより迅速に繰り返せば、産業上有用な二次代謝産物をより効率的に生産することが可能になる。これにより、有用物質の生産株の育種のハードルが大幅に低下すると期待される。ただし、この戦略には課題がある。FR901512 の生産性が最大で 15 倍向上した糸状菌 No. 14919 において、見いだされた変異数は少なかった。一方で、同様に UV 変異により取得した抗真菌剤 FR901469 の生産株では、1 世代ごとの変異導入数が多い [100]。このように、糸状菌の特性によって導入される変異数が異なり、解析の手法にも工夫が必要になる。本研究では得られた変異数が少なく、ひとつひとつに対するバリデーションを実施できたが、変異数が多い場合、膨大なデータから生産性向上に寄与する鍵遺伝子を抽出するためには、新たな情報解析のアルゴリズムを構築することによって、遺伝子変異の情報から生産性に寄与する変異を迅速に判別する技術が必要である。この技術の構築のためには、解析によって得られた

情報を生産菌への遺伝子操作による実検証（ウェットな検証）に効率的に結び付けることが最大の課題であり、情報解析分野（ドライ分野）と遺伝子工学的手法による生物学的分野（ウェット分野）とのより密接な融合が望まれる。より多くの有用化合物の生産菌を対象として本研究と同様の検証が行われることによって、醗酵医薬品開発の再興につながる新たな手法が確立されることを期待する。

さらに本研究では、FR901512 の生合成遺伝子の発現を負に制御する新たな転写因子も見出した。この機能を完全に解明することは叶わなかったが、複雑で機能未知な二次代謝遺伝子の発現の制御ネットワークにおいて、新たな転写因子を発見したことは、今後の二次代謝系発現の制御の分子機構の理解に繋がるものである。

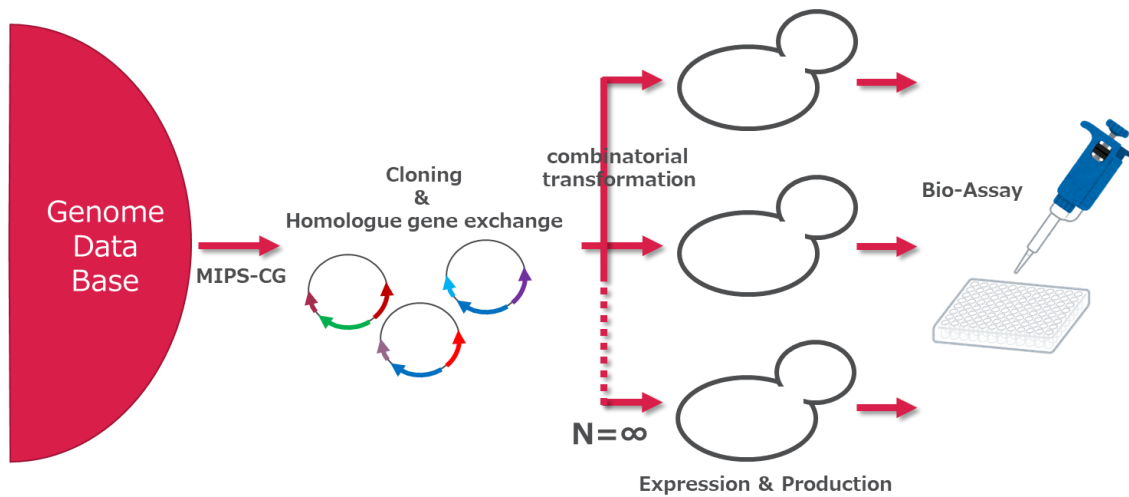


Fig. 5-1 MIPS-CG とコンビナトリアル発現系を利用した医薬品シーズ探索法の概要図

## 参考文献

1. Singh, S. B. (2014). Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 24(16), 3683-3689.
2. Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226.
3. Laupacis, A., Keown, P. A., Ulan, R. A., McKenzie, N., & Stiller, C. R. (1982). Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Canadian Medical Association Journal*, 126(9), 1041.
4. Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., NISHIYAMA, M., YAJIMA, T., ... & OCHIAI, T. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *The Journal of antibiotics*, 40(9), 1256-1265.
5. Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., ... & Patchett, A. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3957-3961.
6. Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature reviews microbiology*, 13(8), 509.
7. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources

- of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
8. Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., & Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug discovery today*, 21(2), 204-207.
  9. Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1.
  10. Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 371.
  11. Anderson, A. C. (2003). The process of structure-based drug design. *Chemistry & biology*, 10(9), 787-797.
  12. Awan, A. R., Shaw, W. M., & Ellis, T. (2016). Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. *Advanced drug delivery reviews*, 105, 96-106.
  13. Bachmann, B. O., Van Lanen, S. G., & Baltz, R. H. (2014). Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making?. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(2), 175-184.
  14. Baral, B., Akhgari, A., & Metsä-Ketelä, M. (2018). Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology*.
  15. Kanda, M., Yamamoto, E., Hayashi, A., Yabutani, T., Yamashita, M., & Honda, H. (2010). Scale-up fermentation of echinocandin type antibiotic FR901379. *Journal of bioscience and bioengineering*,

- 109(2), 138-144.
16. Nagao, K., Ueda, S., Kanda, M., Oohata, N., Yamashita, M., Hino, M. (2010) Drug development from natural fermentation products: establishing a manufacturing process which maximizes the potential of microorganisms. [Article in Japanese] *Yakugaku Zasshi*. 130(11):1471-8.
  17. Kanda, M., Tsuboi, M., Sakamoto, K., Shimizu, S., Yamashita, M., & Honda, H. (2009). Improvement of FR901379 production by mutant selection and medium optimization. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(5), 530-534.
  18. Nicolaou, K. C., Murphy, F., Barluenga, S., Ohshima, T., Wei, H., Xu, J., ... & Baudoin, O. (2000). Total synthesis of the novel immunosuppressant sanglifehrin A. *Journal of the American Chemical Society*, 122(16), 3830-3838.
  19. Nakatsuka, M., Ragan, J. A., Sammakia, T., Smith, D. B., Uehling, D. E., & Schreiber, S. L. (1990). Total synthesis of FK506 and an FKBP probe reagent, [C (8), C (9)-13C2]-FK506. *Journal of the American Chemical Society*, 112(14), 5583-5601.
  20. Smith III, A. B., Chen, K., Robinson, D. J., Laakso, L. M., & Hale, K. J. (1994). Formal total synthesis of FK506. Concise construction of the C (10)-C (34) segment via an effective coupling tactic. *Tetrahedron letters*, 35(25), 4271-4274.
  21. Maddess, M. L., Tackett, M. N., & Ley, S. V. (2008). Total synthesis studies on macrocyclic pipercolic acid natural products:



- FK506, the antascomicins and rapamycin. In *Natural Compounds as Drugs* (pp. 13-186). Birkhäuser Basel.
22. Shimizu, S., Futase, A., Yokoyama, T., Ueda, S., & Honda, H. (2017). Reduction of FR900525 using an S-(2-aminoethyl) l-cysteine-resistant mutant. *Journal of bioscience and bioengineering*, *123*(6), 685-691.
23. Palmer, J. M., & Keller, N. P. (2010). Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter?. *Current opinion in microbiology*, *13*(4), 431-436.
24. Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, *3*(2), 527-535.
25. Hatori, H., Sato, B., Sato, I., Shibata, T., Tsurumi, Y., Sakamoto, K., ... & Fujii, T. (2004). FR901512, a novel HMG-CoA reductase inhibitor produced by an agonomycetous fungus No. 14919. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and physico-chemical properties. *The Journal of antibiotics*, *57*(4), 264-270.
26. Cohen, L. H., Van Vliet, A., Roodenburg, L., Jansen, L. M., & Griffigen, M. (1993). Pravastatin inhibited the cholesterol synthesis in human hepatoma cell line Hep G2 less than simvastatin and lovastatin, which is reflected in the upregulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and squalene synthase. *Biochemical pharmacology*, *45*(11), 2203-2208.
27. Hatori, H., Sato, B., Sato, I., Shibata, T., Tsurumi, Y., Sakamoto,

- K., ... & Fujii, T. (2004). FR901512, a novel HMG-CoA reductase inhibitor produced by an anamniote fungus no. 14919. II. Biological profiles. *The Journal of antibiotics*, 57(6), 390-393.
28. Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, C., Aldrich, T., McAda, P. C., & Reeves, C. D. (1999). Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chemistry & biology*, 6(7), 429-439.
29. 一島英治 (2002) 学士会会報, 836, 135.
30. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., ... & Abe, K. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1157.
31. Erika Check Hayden, Technology: The \$1,000 genome, *Nature News Feature*, 19 March 2014
32. Zimin, A. V., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S. L., & Yorke, J. A. (2013). The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics*, 29(21), 2669-2677.
33. Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., ... & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5), 511.
34. Testa, A. C., Hane, J. K., Ellwood, S. R., & Oliver, R. P. (2015). CodingQuarry: highly accurate hidden Markov model gene prediction

- in fungal genomes using RNA-seq transcripts. *BMC genomics*, 16(1), 170.
35. Lowe, T. M., & Eddy, S. R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic acids research*, 25(5), 955.
36. Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M. G., Lu, X., Schwalen, C. J., Kautsar, S. A., ... & Dickschat, J. S. (2017). antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic acids research*, 45(W1), W36-W41.
37. Itoh, H., Matsui, M., Kumagai, T., Arita, M., Machida, M., & Shibata, T. (2017). Genome Sequence of the Fungal Strain 14919 Producing 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Inhibitor FR901512. *Genome announcements*, 5(14), e00129-17.
38. Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
39. Macías-Rubalcava, M. L., & Sánchez-Fernández, R. E. (2017). Secondary metabolites of endophytic *Xylaria* species with potential applications in medicine and agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 15.
40. Ames, B. D., Nguyen, C., Bruegger, J., Smith, P., Xu, W., Ma, S., ... & Vederas, J. C. (2012). Crystal structure and biochemical studies of the trans-acting polyketide enoyl reductase LovC from lovastatin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11144-11149.

41. Abe, Y., Suzuki, T., Mizuno, T., Ono, C., Iwamoto, K., Hosobuchi, M., & Yoshikawa, H. (2002). Effect of increased dosage of the ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster on ML-236B production in *Penicillium citrinum*. *Molecular genetics and genomics*, 268(1), 130-137.
42. Ley, A., Coumou, H. C., & Frandsen, R. J. N. (2015). Heterologous expression of MlcE in *Saccharomyces cerevisiae* provides resistance to natural and semi-synthetic statins. *Metabolic Engineering Communications*, 2, 117-123.
43. Endo, A., Kuroda, M., & Tsujita, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *The Journal of antibiotics*, 29(12), 1346-1348.
44. Schachter, M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & clinical pharmacology*, 19(1), 117-125.
45. Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(5), 484-493.
46. Istvan, E. S., & Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 292(5519), 1160-1164.
47. Martin J.F, Garcia-Estrada C, Zeilinger S. Editors (2014) Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites. Springer

48. de Jesus Ferreira, M. C., Bao, X., Laizé, V., & Hohmann, S. (2001). Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Current genetics*, 40(1), 27-39.
49. Ishii, J., Kondo, T., Makino, H., Ogura, A., Matsuda, F., & Kondo, A. (2014). Three gene expression vector sets for concurrently expressing multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 14(3), 399-411.
50. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research*, 20(6), 1425.
51. Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R., & Wang, C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 2965-2970.
52. Takeda, I., Umemura, M., Koike, H., Asai, K., & Machida, M. (2014). Motif-independent prediction of a secondary metabolism gene cluster using comparative genomics: application to sequenced genomes of *Aspergillus* and ten other filamentous fungal species. *DNA research*, 21(4), 447-457.
53. Márquez-Fernández, O., Trigos, Á., Ramos-Balderas, J. L., Viniegra-González, G., Deising, H. B., & Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for

- Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryotic cell*, 6(4), 710-720.
54. Xie, X., Watanabe, K., Wojcicki, W. A., Wang, C. C., & Tang, Y. (2006). Biosynthesis of lovastatin analogs with a broadly specific acyltransferase. *Chemistry & biology*, 13(11), 1161-1169.
55. Xie, X., Meehan, M. J., Xu, W., Dorrestein, P. C., & Tang, Y. (2009). Acyltransferase mediated polyketide release from a fungal megasynthase. *Journal of the American Chemical Society*, 131(24), 8388-8389.
56. Xie, X., Pashkov, I., Gao, X., Guerrero, J. L., Yeates, T. O., & Tang, Y. (2009). Rational improvement of simvastatin synthase solubility in *Escherichia coli* leads to higher whole-cell biocatalytic activity. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 20-28.
57. Bhetariya, P. J., Prajapati, M., Bhaduri, A., Mandal, R. S., Varma, A., Madan, T., ... & Sarma, P. U. (2016). Phylogenetic and structural analysis of polyketide synthases in *Aspergilli*. *Evolutionary Bioinformatics*, 12, EBO-S32694.
58. Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3), 331-340.
59. Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *Journal of lipid research*, 50 (Supplement), S15-S27.
60. Espenshade, P. J. (2006). SREBPs: sterol-regulated transcription

- factors. *Journal of cell science*, 119(6), 973-976.
61. Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997). Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 20213-20221.
  62. Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein Evidence from *in vivo* competition studies. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5785-5793.
  63. Rawson, R. B. (2013). The site-2 protease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(12), 2801-2807.
  64. Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1996). Sterol Resistance in CHO Cells Traced to Point Mutation in SREBP Cleavage-Activating Protein. *Cell*, 87(3), 415-426.
  65. Nohturfft, A., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1998). Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 17243-17250.
  66. Matsui, M., Yokoyama, T., Nemoto, K., Kumagai, T., Terai, G., Tamano, K., ... & Shibata, T. (2017). Identification of a putative FR901469 biosynthesis gene cluster in fungal sp. No. 11243 and enhancement of the productivity by overexpressing the transcription

- factor gene *frbF*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 123(2), 147-153.
67. Bayram, Ö., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., ... & Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 320(5882), 1504-1506.
68. Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
69. Chung, D., Barker, B. M., Carey, C. C., Merriman, B., Werner, E. R., Lechner, B. E., ... & Morohashi, K. (2014). ChIP-seq and in vivo transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *PLoS pathogens*, 10(11), e1004487.
70. Arazoe, T., Miyoshi, K., Yamato, T., Ogawa, T., Ohsato, S., Arie, T., & Kuwata, S. (2015). Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and bioengineering*, 112(12), 2543-2549.
71. Tamano, K., Satoh, Y., Ishii, T., Terabayashi, Y., Ohtaki, S., Sano, M., ... & Machida, M. (2007). The  $\beta$ -1, 3-exoglucanase gene *exgA* (*exg1*) of *Aspergillus oryzae* is required to catabolize extracellular glucan, and is induced in growth on a solid surface. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(4), 926-934.
72. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009).



- Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), R25.
73. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology*, 14(4), R36.
74. Hagiwara, D., Miura, D., Shimizu, K., Paul, S., Ohba, A., Gono, T., ... & Kawamoto, S. (2017). A novel Zn<sup>2</sup>-Cys<sub>6</sub> transcription factor AtrR plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* expressions. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006096.
75. Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K., & Gomi, K. (2008). A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6), 878-889.
76. Bizukojc, M., Pawlowska, B., & Ledakowicz, S. (2007). Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *Journal of biotechnology*, 127(2), 258-268.
77. Hughes, A. L., Todd, B. L., & Espenshade, P. J. (2005). SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell*, 120(6), 831-842.
78. Raychaudhuri, S., Young, B. P., Espenshade, P. J., & Loewen, C.

- J. (2012). Regulation of lipid metabolism: a tale of two yeasts. *Current opinion in cell biology*, 24(4), 502-508.
79. Lloyd, S. J. A., Raychaudhuri, S., & Espenshade, P. J. (2013). Subunit architecture of the Golgi Dsc E3 ligase required for sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.
80. Shao, W., Espenshade, P.J., (2014). Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage regulates Golgi-to-endoplasmic reticulum recycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP). *The Journal of Biological Chemistry*, 289(11):7547–7557.
81. Kim, J., Ha, H. J., Kim, S., Choi, A. R., Lee, S. J., Hoe, K. L., & Kim, D. U. (2015). Identification of Rbd2 as a candidate protease for sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage in fission yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(4), 606-610.
82. Burr, R., Stewart, E. V., Shao, W., Zhao, S., Hannibal-Bach, H. K., Ejsing, C. S., & Espenshade, P. J. (2016). Mga2 transcription factor regulates an oxygen-responsive lipid homeostasis pathway in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M116.
83. Maguire, S. L., Wang, C., Holland, L. M., Brunel, F., Neuvéglise, C., Nicaud, J. M., ... & Butler, G. (2014). Zinc finger transcription factors displaced SREBP proteins as the major sterol regulators during Saccharomycotina evolution. *PLoS genetics*, 10(1), e1004076.
84. Dhingra, S., & Cramer, R. A. (2017). Regulation of sterol

- biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. *Frontiers in microbiology*, 8, 92.
85. Hagiwara, D., Watanabe, A., & Kamei, K. (2016). Sensitisation of an azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strain containing the cyp51A-related mutation by deleting the *srbA* Gene. *Scientific reports*, 6, 38833.
86. Matsui, M., Yokoyama, T., Nemoto, K., Kumagai, T., Tamano, K., Machida, M., & Shibata, T. (2017). Further enhancement of FR901469 productivity by co-overexpression of *cpcA*, a cross-pathway control gene, and *frbF* in fungal sp. No. 11243. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(1), 8-14.
87. Itoh, E., Shigemoto, R., Oinuma, K. I., Shimizu, M., Masuo, S., & Takaya, N. (2017). Sirtuin A regulates secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans*. *The Journal of general and applied microbiology*, 63(4), 228-235.
88. Pecyna, M., & Bizukojc, M. (2011). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* with the simultaneous use of lactose and glycerol in a discontinuous fed-batch culture. *Journal of biotechnology*, 151(1), 77-86.
89. Bizukojc, M., Pawlak, M., Boruta, T., & Gonciarz, J. (2012). Effect of pH on biosynthesis of lovastatin and other secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *Journal of biotechnology*, 162(2-3), 253-261.

90. Bizukojc, M., & Gonciarz, J. (2015). Influence of oxygen on lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 quantitatively studied on the level of individual pellets. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(7), 1251-1266.
91. Flaherty, J. E., & Payne, G. A. (1997). Overexpression of aflR leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3995-4000.
92. Chen, Y. P., Yuan, G. F., Hsieh, S. Y., Lin, Y. S., Wang, W. Y., Liaw, L. L., & Tseng, C. P. (2009). Identification of the *mokH* gene encoding transcription factor for the upregulation of monacolin K biosynthesis in *Monascus pilosus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 287-293.
93. Zheng, Y., Cao, S., Huang, Y., Liao, G., & Hu, C. (2014). Overexpression of LaeA enhances mevastatin production and reduces sporulation of *Penicillium citrinum*. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 54(12), 1438-1445.
94. Lee, S. S., Lee, J. H., & Lee, I. (2013). Strain improvement by overexpression of the *laeA* gene in *Monascus pilosus* for the production of Monascus-fermented rice. *J Microbiol Biotechnol*, 23(7), 959-965.
95. Baba, S., Kinoshita, H., & Nihira, T. (2012). Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. *Current genetics*, 58(1), 1-11.

96. Palonen, E. K., Raina, S., Brandt, A., Meriluoto, J., Keshavarz, T., & Soini, J. T. (2017). Transcriptomic complexity of *Aspergillus terreus* velvet gene family under the influence of butyrolactone I. *Microorganisms*, 5(1), 12.
97. Laera, L., Guaragnella, N., Ždravlević, M., Marzulli, D., Liu, Z., & Giannattasio, S. (2016). The transcription factors ADR1 or CAT8 are required for RTG pathway activation and evasion from yeast acetic acid-induced programmed cell death in raffinose. *Microbial Cell*, 3(12), 621.
98. Yoshimi, A., Yamaguchi, S., Fujioka, T., Kawai, K., Gomi, K., Machida, M., & Abe, K. (2018). Heterologous Production of a Novel Cyclic Peptide Compound, KK-1, in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in microbiology*, 9, 690.
99. Awakawa, T., Fujioka, T., Zhang, L., Hoshino, S., Hu, Z., Hashimoto, J., ... & Abe, I. (2018). Reprogramming of the antimycin NRPS-PKS assembly lines inspired by gene evolution. *Nature communications*, 9(1), 3534.
100. Matsui, M., Yokoyama, T., Kumagai, T., Nemoto, K., Terai, G., Machida, M., ... & Aburatani, S. (2016). Genomic analysis of fungal species No. 11243 mutant strains provides insights into the relationship between mutations and high productivity. *Br. Biotechnol. J.*, 10, 1-13.

## 付記

本学位論文は、下記に示す原著論文をもとに作成された。また、本研究の一部は下記に示す学会において発表された。

## 原著論文

1. Hiroya Itoh, Makoto Matsui, Toshitaka Kumagai, Masanori Arita, Masayuki Machida, Takashi Shibata: Genome sequence of the fungal strain 14919 producing 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor FR901512. *Genome Announcements*, 2017, 5: e00129-17.
2. Hiroya Itoh, Ai Miura, Makoto Matsui, Takayuki Arazoe, Keiji Nishida, Toshitaka Kumagai, Masanori Arita, Koichi Tamano, Masayuki Machida, Takashi Shibata: Knockout of the SREBP system increases production of the polyketide FR901512 in filamentous fungal sp. No. 14919 and lovastatin in *Aspergillus terreus* ATCC20542. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, 102:1393-1405.
3. Hiroya Itoh, Makoto Matsui, Yuki Miyamura, Itaru Takeda, Jun Ishii, Toshitaka Kumagai, Masayuki Machida, Takashi Shibata, Masanori Arita: Biosynthesis of Novel Statins by Combining Heterologous Genes from *Xylaria* and *Aspergillus*. *ACS Synthetic Biology*. In Press.

## 学会発表

1. 伊東 広哉、松井 真、熊谷 俊高、町田 雅之、柴田 孝  
Mutational analysis of fungus No. 14919 producing HMG-CoA

reductase inhibitor

第 68 回日本生物工学会 (2016 年 9 月)

2. 伊東 広哉、宮村 由紀、竹田 至、松井 真、石井 純、熊谷 俊高、町田 雅之、有田 正規、柴田 孝

酵母を用いた HMG-CoA reductase 阻害剤 FR901512 生合成遺伝子クラスター解析と新規物質生産の可能性

第 11 回ゲノム微生物学会 (2017 年 3 月)

3. 伊東 広哉、松井 真、三浦 愛、荒添 貴之、熊谷俊高、西田 敬二、玉野 孝一、町田 雅之、柴田 孝

SREBPs play an important role for HMG-CoA reductase inhibitor FR901512 high production

日本農芸化学会 2017 年度大会 (2017 年 3 月)

## 謝辞

本論文の作成に当たり懇切なるご指導を賜りました筑波大学生命環境科学研究科生物機能科学専攻 高谷直樹教授に謹んでお礼を申し上げます。また適切なご助言とご教示を賜りました、同 萩原大祐准教授、橋本義輝准教授、竹下典男助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行する機会と多大なるご便宜を賜りましたアステラス製薬株式会社 製薬技術本部 松田充功技術本部長、同 大畑暢敬氏、同 バイオ技術研究所 伴和敏所長、同 培養プロセス開発研究室 江頭章室長に深く感謝をいたします。また直接のご指導、ご鞭撻を賜りました柴田孝氏に心より御礼を申し上げます。また本研究の遂行にあたり様々なご協力を頂きました出向の前任者である横山達也氏、松井真氏に深く感謝いたします。

本研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施されました。本研究の遂行にあたり金沢工業大学大学院工学研究科 教授 町田雅之博士、産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 主任研究員 玉野孝一博士、国立遺伝学研究所 有田正規教授、株式会社ファームラボ 熊谷俊高氏、神戸大学 科学イノベーション研究科 西田敬二教授、同 石井純准教授、東京理科大学 理工学部応用生物科学科 荒添貴之助教、前東京農工大学／産業技術総合研究所 竹田至博士に多大なるご助言とご指導を賜りました。深く感謝をいたします。また諸実験の遂行にあたりましては高機能遺伝子デザイン技術研究組合 宮村由紀氏、産業技術総合研究所 三浦愛氏より多くのご協力を頂きました。心より御礼を申し上げます。お世話になりましたすべての皆様に重ねて御礼を申し上げるとともに、皆様の益々のご活躍をお祈りします。