J S M *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco

Elucidation of variability of secondary metabolism in filamentous fungi by comparative genomics

Daisuke Hagiwara

JSM Mycotoxins, **68**(2):89-92 (2018)

<http://doi.org/10.2520/myco.68-2-2>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, Notes, and Letters), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

Japanese Society of Mycotoxicology
(http://www.jsmyco.org/MYCONTENTS/Eng/index_eng.html)

糸状菌ゲノムから紐解く二次代謝の多様性

萩原 大祐¹

¹筑波大学生命環境系 (〒305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1)

キーワード

二次代謝；比較ゲノム；
*Aspergillus*属

連絡先

萩原 大祐，筑波大学生命環境系
糸状菌相互応答講座，〒305-8577
茨城県つくば市天王台1-1-1
電子メール：
hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp

(2018年2月9日受付，
2018年2月11日受理)

要旨

近年のゲノム解析の進展により，糸状菌は多数のそして多様な二次代謝関連遺伝子を保有することが明らかになった．これらの遺伝子のほとんどは未解析であり，創薬リード化合物の探索源として魅力的な資源として注目を集めている．ゲノム情報が提供されることにより，遺伝子ベースの化合物探索や構造多様性創出が，これまでの化合物ベースの探索にとって代わるパラダイムシフトを引き起こしている．筆者らの研究も，網羅的遺伝子発現解析を頼りにしたアクティブな二次代謝遺伝子クラスターの同定や，近縁種間の比較ゲノム解析から二次代謝遺伝子の普遍性と多様性を明らかにすることを目指している．

はじめに

私たちの身の回りには様々な糸状菌が存在しており，個々の糸状菌は多様な生理活性を示す二次代謝化合物を産生する能力を持つ．「ペニシリンの発見」に端を発した抗生物質時代から今日まで，天然化合物の資源として糸状菌の果たした功績は計り知れない．2000年代前半のゲノム解析を経て，糸状菌の成り立ちが遺伝子レベルで明らかになると，これまで考えられてきた以上に，糸状菌が二次代謝のポテンシャルを備えていることがわかった．近年の応用微生物学の潮流の一つとして，未利用の潜在的な微生物機能を探索し，発見し，利用に繋げることが，糸状菌の二次代謝研究でも活況となっている．

1. 糸状菌ゲノムに見出される二次代謝遺伝子

未利用二次代謝を解析するうえで利用可能な糸状菌ゲノム情報は，NCBIデータベース上で酵母を含む“Fungi”で検索すると1203件ヒットする(2018年1月時点)．データ精度の違いもあるが，*Aspergillus*属で44種，*Penicillium*属で36種，*Fusarium*属で35種が，ゲノムデータを利用可能な状況である．二次代謝産物の生合成に関与する因子は，特徴的な配列をもとに検索することができる．例えば，non-ribosomal peptide synthase (NRPS) やpolyketide synthase (PKS) などが代表的な骨格(コア)遺伝子となる．多くの二次代謝産物は修飾酵素によって最

終産物へと変換されるため，コア遺伝子と修飾遺伝子が並んだ遺伝子クラスターとしてゲノム中に存在する場合が多い．このような特徴をもとに，糸状菌が潜在的に持つ二次代謝を体系的に明らかにすることができる．良く解析された化合物であるが，ペニシリンを例にとって生合成遺伝子についてゲノム情報を活用して俯瞰してみると，ペニシリンは主として3つの反応ステップを経て生合成される．これらの反応を担当する酵素はAcvA: NRPS (Δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-L-valine synthase)，IpnA: Isopenicillin-N synthase，AatA: Isopenicillin-N, N-acyltransferaseとなるが，*Penicillium*属菌でこれらの遺伝子をすべて保有する種は，実は半分にも満たない．こういった遺伝子的な観点から，*Penicillium*属菌のうち限定された種においてのみがペニシリンを産生することができるかと理解することができる．同様に，これらの生合成遺伝子セットが見つかる*Aspergillus nidulans*や*Aspergillus oryzae*などが，ペニシリンを産生する能力を有すると推測することも可能となる．

2. *Aspergillus fumigatus*胞子に特異的に蓄積するトリパシジン

化合物ベースで探索を行う場合，通常は液体培養した菌培養液から化合物の有無をチェックする．この際，菌は菌糸体として成長し，二次代謝化合物の多くを細胞外に分泌している．従来はこのような培

養系で糸状菌由来の化合物探索が行われているが、糸状菌の胞子における二次代謝についての情報は非常に限られている。そこで、糸状菌の胞子を対象とした網羅的遺伝子発現解析を行い、胞子で特異的に産生し蓄積されている物質の発見を試みた。ここでは、深在性真菌症の病原菌*Aspergillus fumigatus*と*A. niger*, *A. oryzae*を解析対象とし、休眠胞子において一定の転写レベルを示し、菌糸体と比べて5倍以上の発現量を示す二次代謝コア遺伝子をRNA-sequencingにより明らかにした。その結果、それぞれ4, 3, 2個の二次代謝コア遺伝子が見つかり、これらの遺伝子により産生される二次代謝化合物が胞子に蓄積されていると推測された¹⁾。また、培養温度を25°Cから45°Cまで変化させて着生させた胞子について、それぞれ同様に網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、PKS遺伝子を含む13個の遺伝子からなるクラスターが、25°Cで着生した胞子においてのみ、非常に高い発現を示すことが明らかになった(図1)。当該PKS遺伝子の破壊株を作製し、消失する化合物を構造解析すると、細胞傷害性や抗原虫活性などが報告されているトリパシジン(Trypacidin)であることが解った(図2)。以上、遺伝子ベースの解析を遂行することで、トリパシジンの生合成遺伝子クラスターが見出された²⁾。

3. *Aspergillus fumigatus* 関連種の二次代謝遺伝子に関する比較ゲノム解析

次に我々は、糸状菌ゲノムに存在する二次代謝関連遺伝子を体系的に探索し、二次代謝の普遍性と多

様性を明らかにしたいと考えた。そこで、幾つかの*Aspergillus*属菌のゲノム情報を基に解析したところ、NRPSやPKSの二次代謝コア遺伝子を各菌30-60個見つけることができた。そこで、*A. nidulans*や*A. oryzae*と*A. fumigatus*の遺伝子リストを比較してみると、高い相同性(>80% Identity)を有するコア遺伝子は見つからなかった。このことは、同じ属においても種が異なると二次代謝が劇的に相違することを意味している。また、同種の*A. fumigatus*の異なる株間(Af293株とA1163株)で比較してみると、共通のコア遺伝子が31個見つかり、ユニークな遺伝子はそれぞれ2-3個となる。同種であっても、必ずしも全ての二次代謝が同じと言えないことは、留意すべき点である。

次に、属(Genus)の一段下の分類区分である節(Section)レベルにおいて、二次代謝遺伝子の比較を試みた。*A. fumigatus* section *Fumigati*に属する、*A. fumigatus*関連種(*Aspergillus lentulus*, *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus viridinutans*, *Aspergillus fischeri*)4菌種のゲノム情報を用いて、二次代謝コア遺伝子を体系的に同定した(未発表データ)。その結果、各菌において、39, 67, 66, 45個の推定二次代謝コア遺伝子が見出された。これらの遺伝子と*A. fumigatus*のコア遺伝子を比較すると、高い相同性を示すものが16-23個(47-68%)存在し、このうち14個が*A. fumigatus*を含む全ての関連種に共通に保有されている二次代謝コア遺伝子であった。以上のことから、同属内の菌種間ではほとんど共通遺伝子が無かったことに比較して、同

図1 25°C培養で着生した胞子で特異的に高い発現を示した遺伝子クラスター領域

RNA-sequencingにおいて算出された各遺伝子の発現量(FPKM値)を縦軸に示す。本遺伝子クラスターは13遺伝子で構成され、トリパシジンの生合成に機能する。文献¹⁾より転載。

図2 トリパシジンの化学構造式

section内の菌種間では多様化の程度は低く抑えられていると言える。しかし一方で、*A. fischeri*と*A. fumigatus*の比較を参考にすると、ゲノムレベルでは約90%の遺伝子が保存されているのに対して、共通する二次代謝コア遺伝子は約68%にとどまっており、二次代謝遺伝子は進化的多様化の速度が早かったことが推測される。

それでは、同section内において多様化せずに保存されてきた二次代謝には何が含まれているのだろうか。上述のように、14個のコア遺伝子が関連種全種で保存されていたが、関与する二次代謝産物が明らかになっている遺伝子が比較的多いと言える。例えば、前出のトリパシジンや、強力な細胞傷害性を示すグリオトキシン、胞子色素のDHN-メラニン、鉄欠乏時の鉄獲得に機能するシデロフォアなどが含まれており、比較的生理作用が明らかで、なおかつ病原性など菌の生理生態に重要な機能を有するものが多い。このような文脈から、複数残されている機能が判明していない共通コア遺伝子についても、重要な化合物の生合成に寄与している可能性が考えられる。今後、優先的に解析すべき対象であると言える。

おわりに

関連種の二次代謝遺伝子の比較を通して、糸状菌の二次代謝の普遍性と多様性の一端を垣間みることができた。現在、*A. fumigatus*関連種における二次代謝物の産生や発現について解析を続けており、近い将来に、近縁種間での比較ゲノム、比較メタボローム、比較トランスクリプトーム的概観を提示できるものと考えている。これらの情報から、種分化の過程で糸状菌の二次代謝がどのような足跡を辿って多様化して来たのか、手掛かりが得られると期待している。特に、遺伝子の有無で語られる比較ゲノム解析のみならず、発現情報を加味して多層的に捉えることで、新しい視点を提供できるものと考えている。糸状菌の二次代謝の多様性の理解を深めることが、未利用化合物の発見につながり、これらの蓄積が新しい創薬リード化合物の創出へとつながることを期待している。

参考文献

- 1) Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gonoi T, Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: An essential role for AtfA in conidial dormancy. **BMC Genomics**, **17**: 358 (2016)
- 2) Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gonoi T, Kamei K: Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and trypacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, **12**: e0177050 (2017)

Elucidation of variability of secondary metabolism in filamentous fungi by comparative genomics

Daisuke Hagiwara¹

¹Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan

Recent advances in genome determination provided an insight that filamentous fungi have many and much varied genes involved in secondary metabolism. Most of them remain unstudied, which provides room for investigation of potential drug lead compounds. We studied secondary metabolism in filamentous fungi by using transcriptome data and comparing newly obtained genome sequences among closely related species. These works resulted in discovery of a gene cluster involved in biosynthesis of conidia-specific accumulated compound trypacidin, and shed light on complex evolution of secondary metabolism in filamentous fungi.

Keywords: *Aspergillus*; comparative genomics; secondary metabolism