

Summary (ポスター内容を3分間で簡潔に話します)

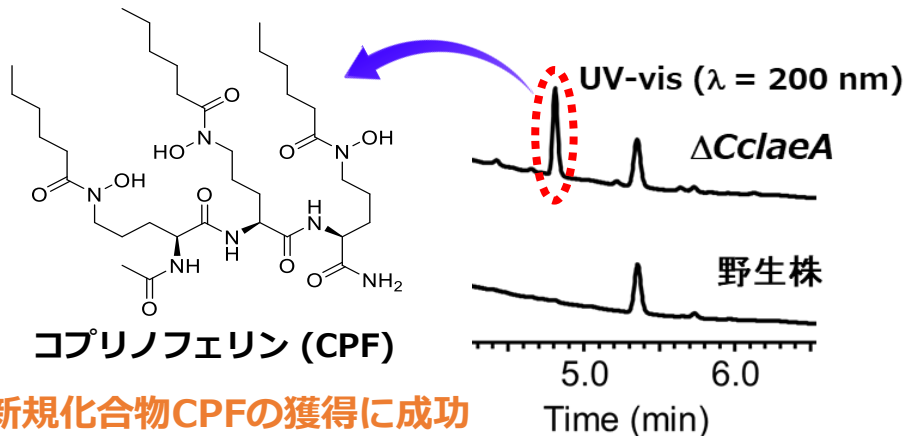
1. 研究目的



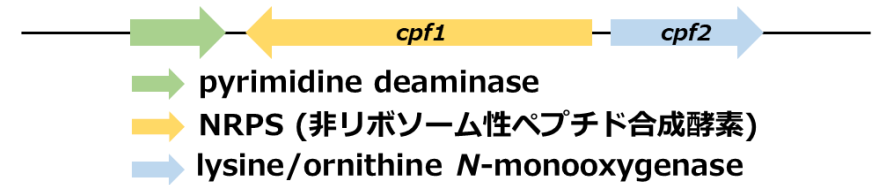
2. 休眠型遺伝子覚醒方法



3. $\Delta CclaeA$ 株の化合物生産

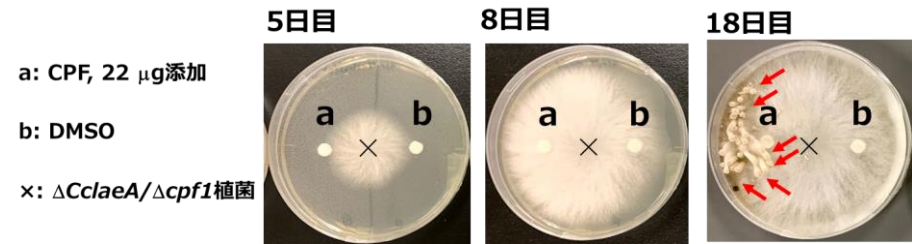


4. CPF生合成遺伝子クラスターの同定



cpf1 遺伝子破壊株はCPFを生産しなくなるとともに、子実体 (キノコ) 形成不全となることが判明

5. キノコ形成不全株に対するCPF投与試験



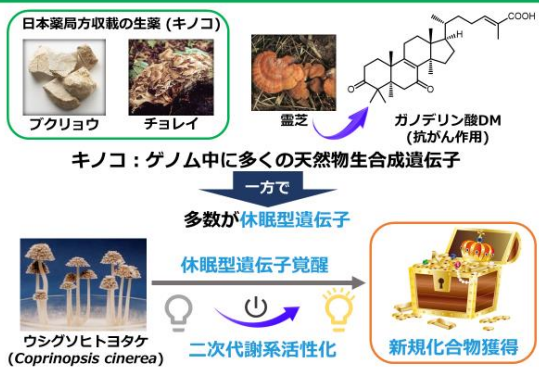
CPF添加側にのみ子実体形成を確認

6. 本研究のポイント

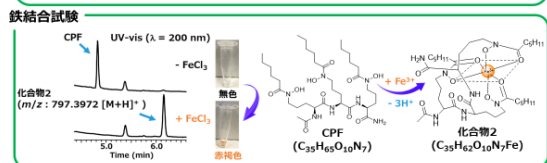
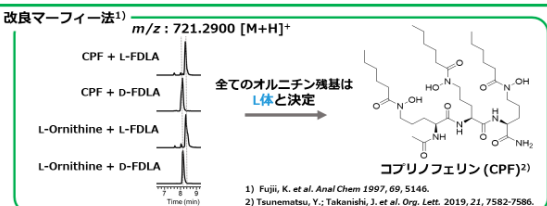
- 休眠遺伝子を覚醒させ、新規化合物CPFの単離・構造決定に成功
- CPF生合成遺伝子クラスターの同定に成功
- CPFがキノコの菌糸成長・子実体形成促進作用を有することを証明
- CPFの生合成遺伝子クラスターがシメジやシイタケを含む200種類以上の担子菌類で普遍的に保存されていることが判明
- CPFは担子菌類共通の成長促進分子である可能性 (マツタケなどの効率生産化のツールとなるか?)

○高西 潤^a、恒松 雄太^a、榎谷 貴洋^a、磯谷 智輝^b、早川 一郎^c、坂倉 彰^b、渡辺 賢二^a
 (静岡県大薬^a、岡山大院自然^b、日大院総合基^c)

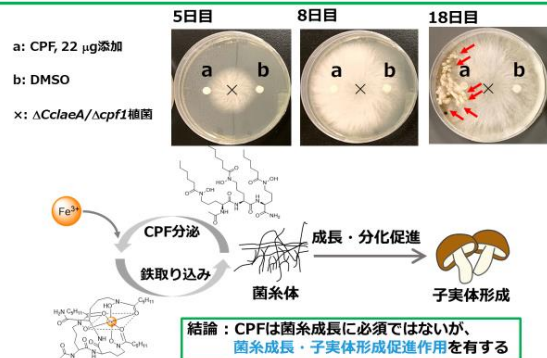
研究背景 1



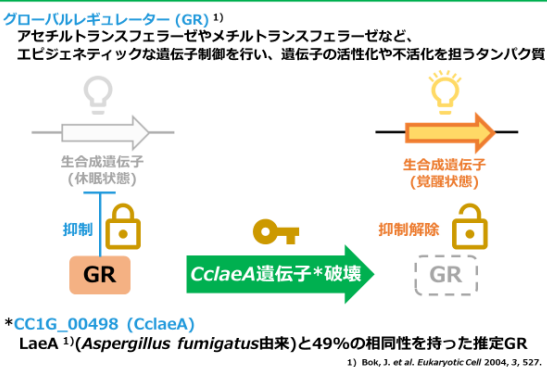
化合物1の立体配置決定と鉄投与試験 4



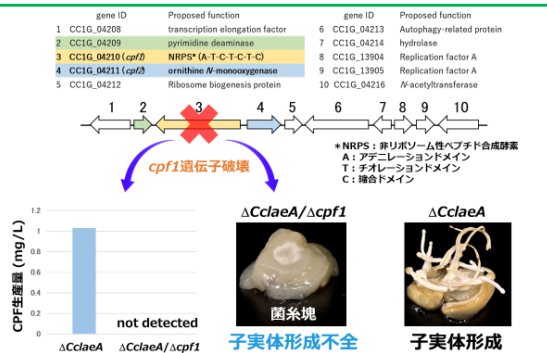
ΔCclaeA/Δcpf1に対するCPF投与試験 7



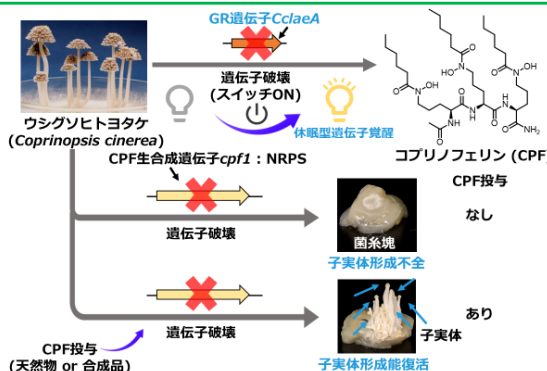
休眠型遺伝子覚醒方法 2



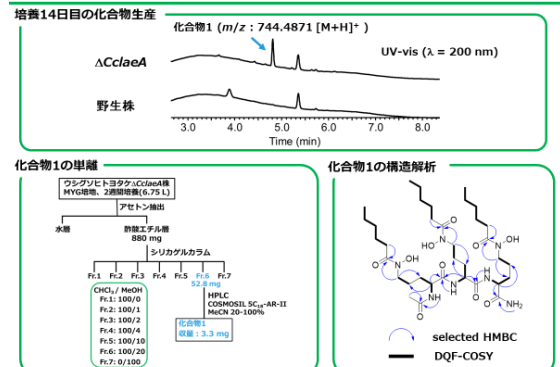
CPF生成遺伝子クラスターの同定 5



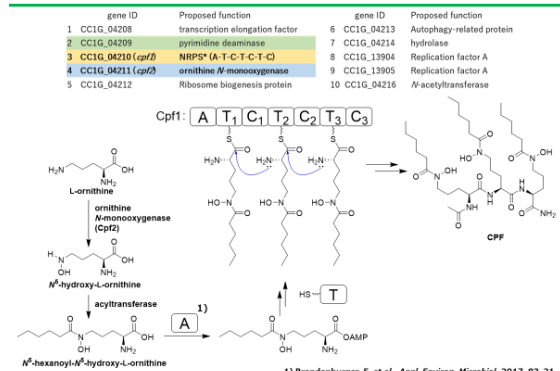
まとめ 8



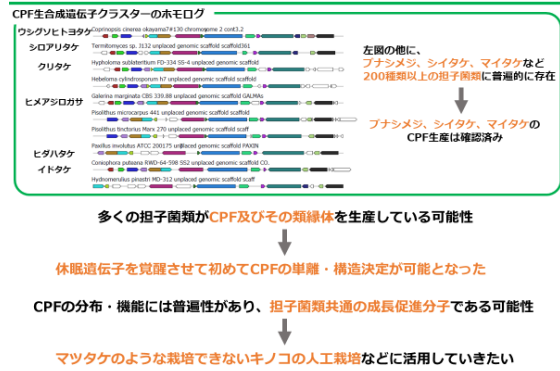
ΔCclaeA株の化合物生産、化合物1の単離・構造決定 3



CPF推定生成経路 6



将来展望 9



日本薬局方収載の生薬 (キノコ)



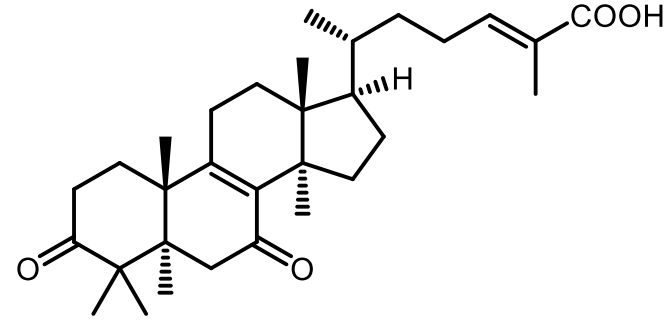
ブクリョウ



チョレイ



霊芝



ガノデリン酸DM
(抗がん作用)

キノコ：ゲノム中に多くの天然物生合成遺伝子

一方で

多数が休眠型遺伝子

休眠型遺伝子覚醒



ウシグソヒトヨタケ
(*Coprinopsis cinerea*)



二次代謝系活性化



新規化合物獲得

グローバルレギュレーター (GR) ¹⁾

アセチルトランスフェラーゼやメチルトランスフェラーゼなど、
エピジェネティックな遺伝子制御を行い、遺伝子の活性化や不活化を担うタンパク質



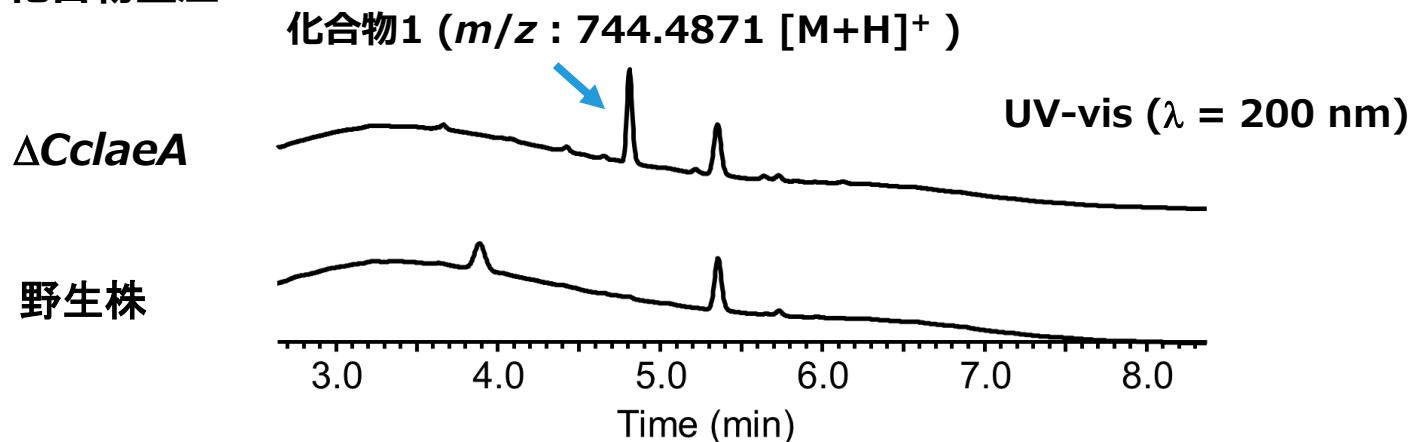
*CC1G_00498 (CclaeA)

LaeA ¹⁾ (*Aspergillus fumigatus*由来)と49%の相同性を持った推定GR

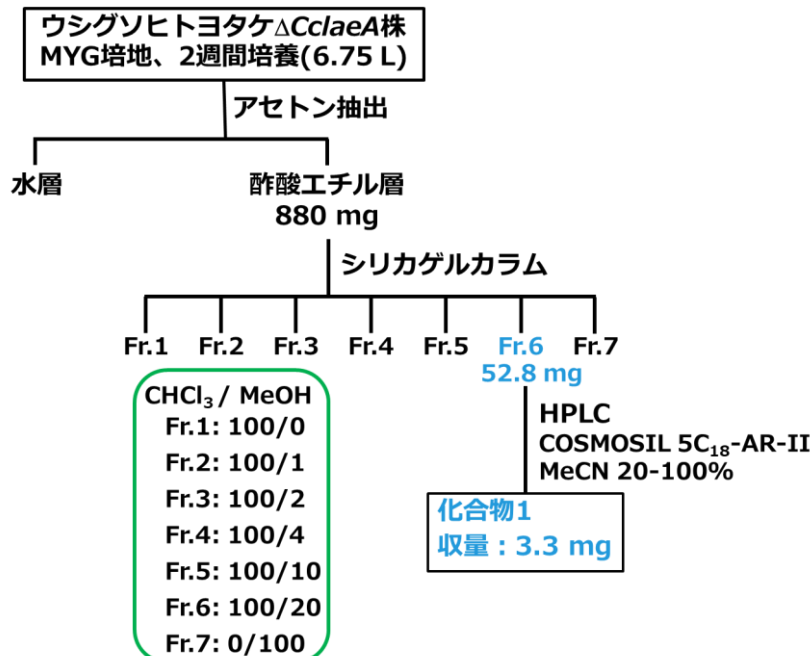
1) Bok, J. et al. *Eukaryotic Cell* 2004, 3, 527.

$\Delta CclaeA$ 株の化合物生産、化合物1の単離・構造決定 3

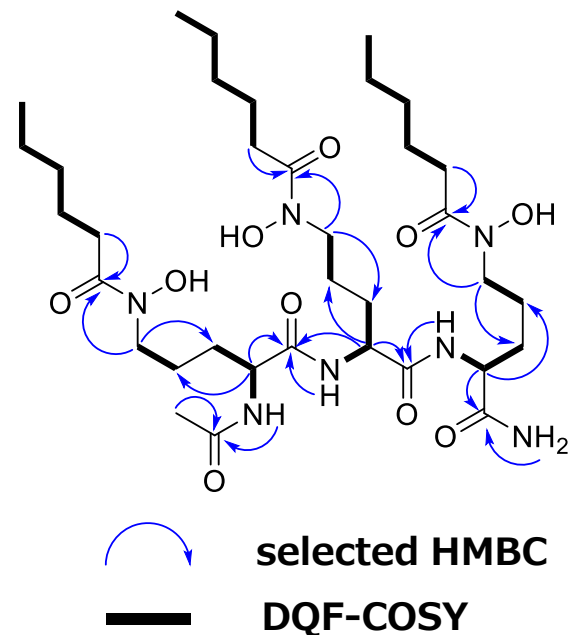
培養14日目の化合物生産



化合物1の単離

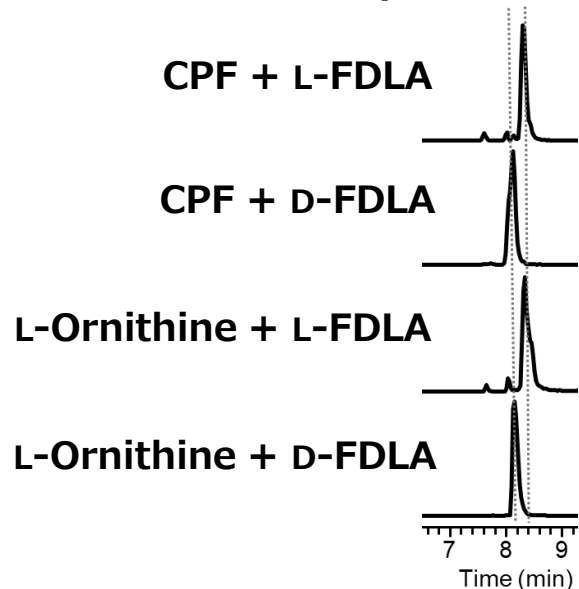


化合物1の構造解析

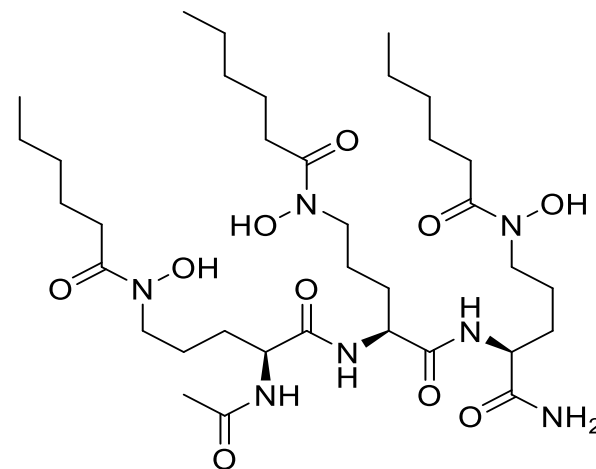


改良マーフィー法¹⁾

$m/z : 721.2900 [M+H]^+$



全てのオルニチン残基は
L体と決定

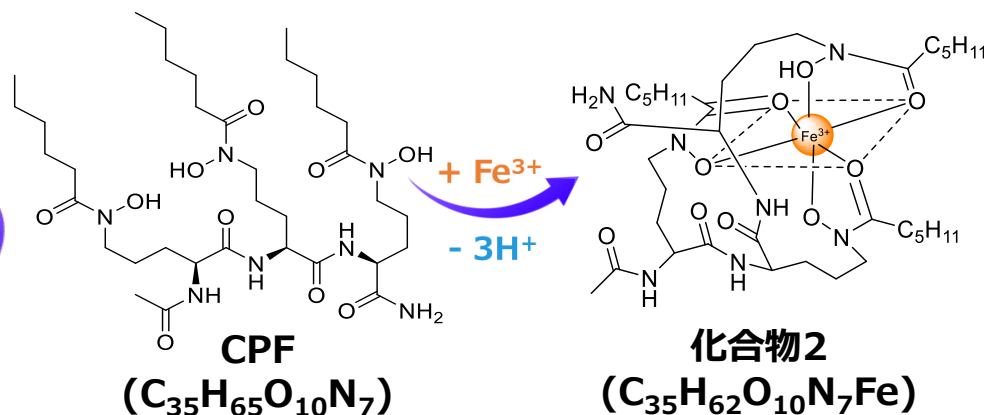
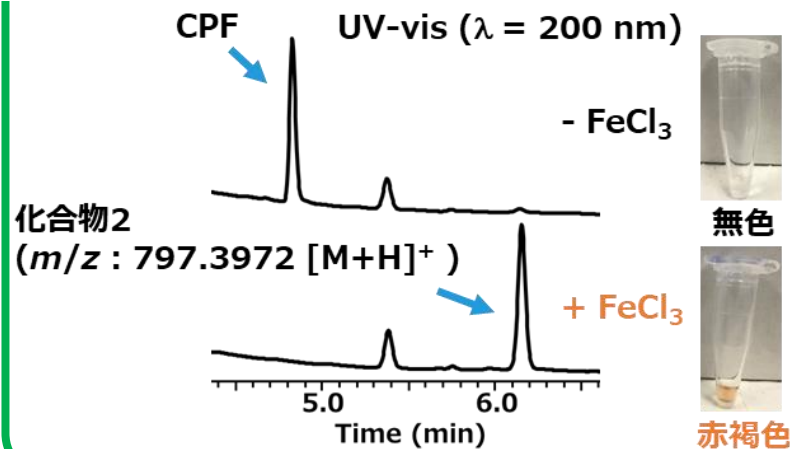


コプリノフェリン (CPF)²⁾

1) Fujii, K. *et al. Anal. Chem.* 1997, 69, 5146.

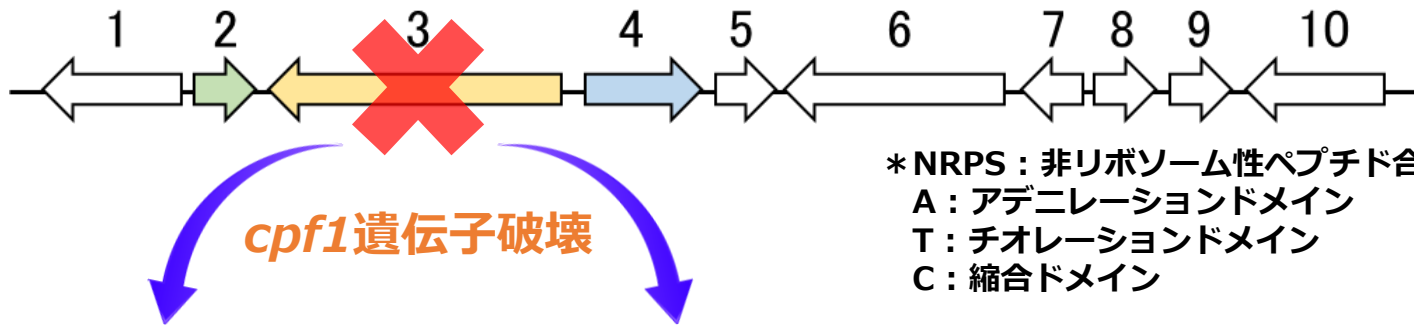
2) Tsunematsu, Y.; Takanishi, J. *et al. Org. Lett.* 2019, 21, 7582-7586.

鉄結合試験

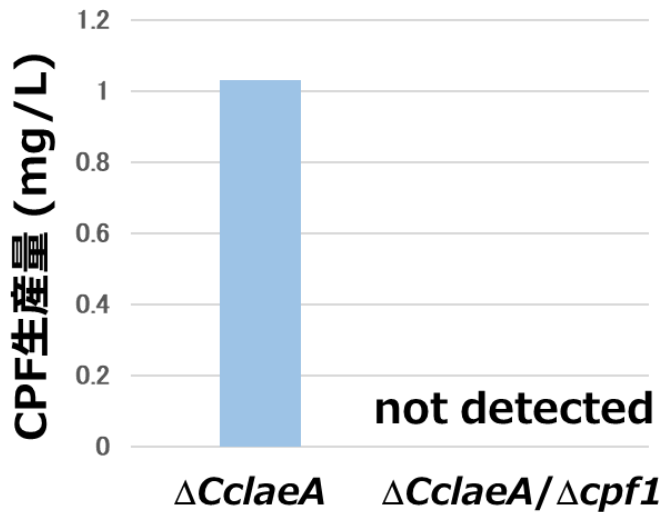


CPF生合成遺伝子クラスターの同定

gene ID	Proposed function	gene ID	Proposed function
1 CC1G_04208	transcription elongation factor	6 CC1G_04213	Autophagy-related protein
2 CC1G_04209	pyrimidine deaminase	7 CC1G_04214	hydrolase
3 CC1G_04210 (<i>cpf1</i>)	NRPS* (A-T-C-T-C-T-C)	8 CC1G_13904	Replication factor A
4 CC1G_04211 (<i>cpf2</i>)	ornithine <i>N</i> -monooxygenase	9 CC1G_13905	Replication factor A
5 CC1G_04212	Ribosome biogenesis protein	10 CC1G_04216	<i>N</i> -acetyltransferase



*NRPS : 非リボソーム性ペプチド合成酵素
 A : アデニレーションドメイン
 T : チオレーションドメイン
 C : 縮合ドメイン

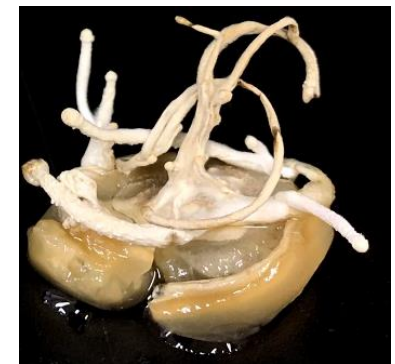


$\Delta CclaeA/\Delta cpf1$



子実体形成不全

$\Delta CclaeA$

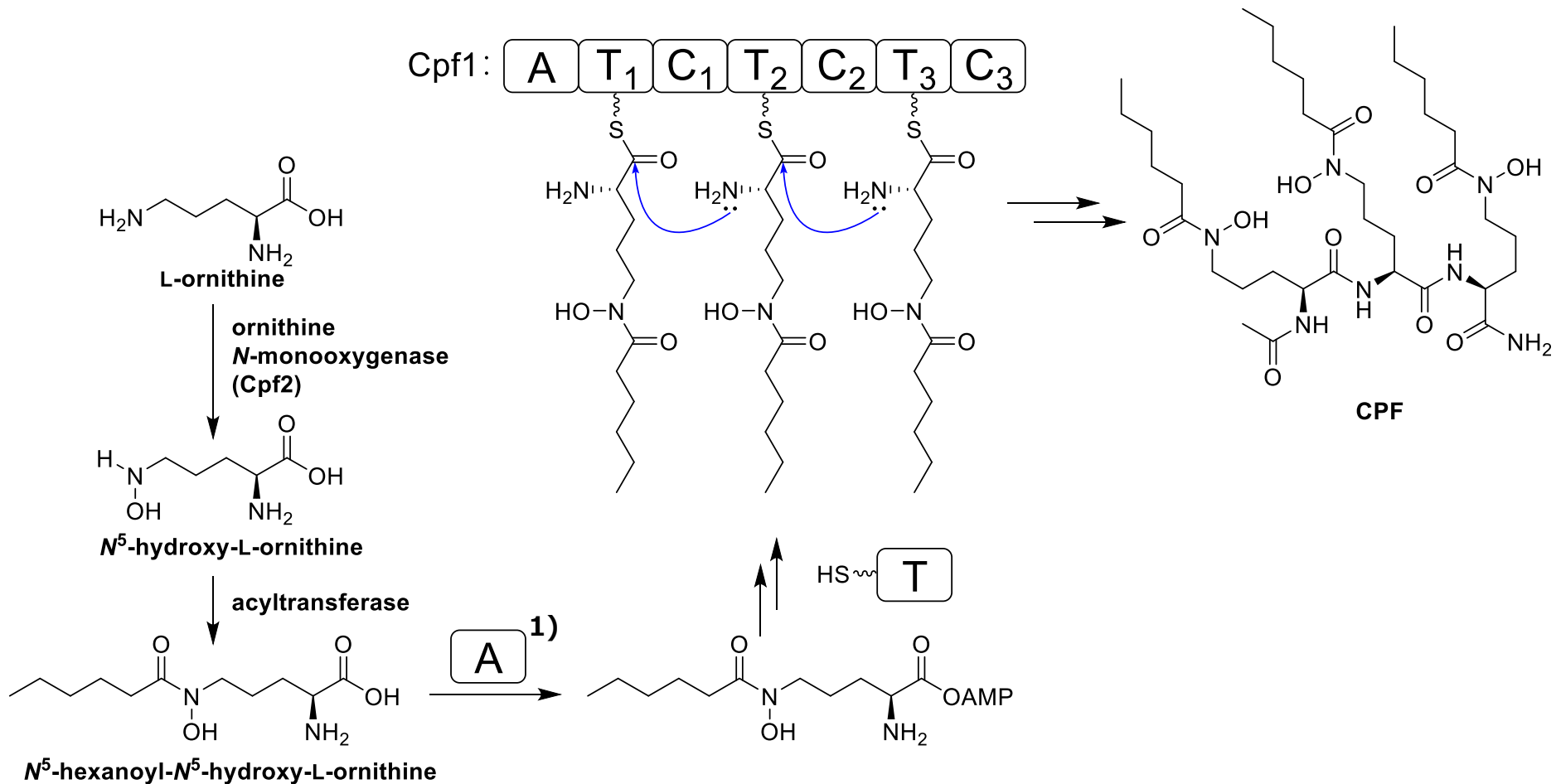


子実体形成

CPF推定生合成経路

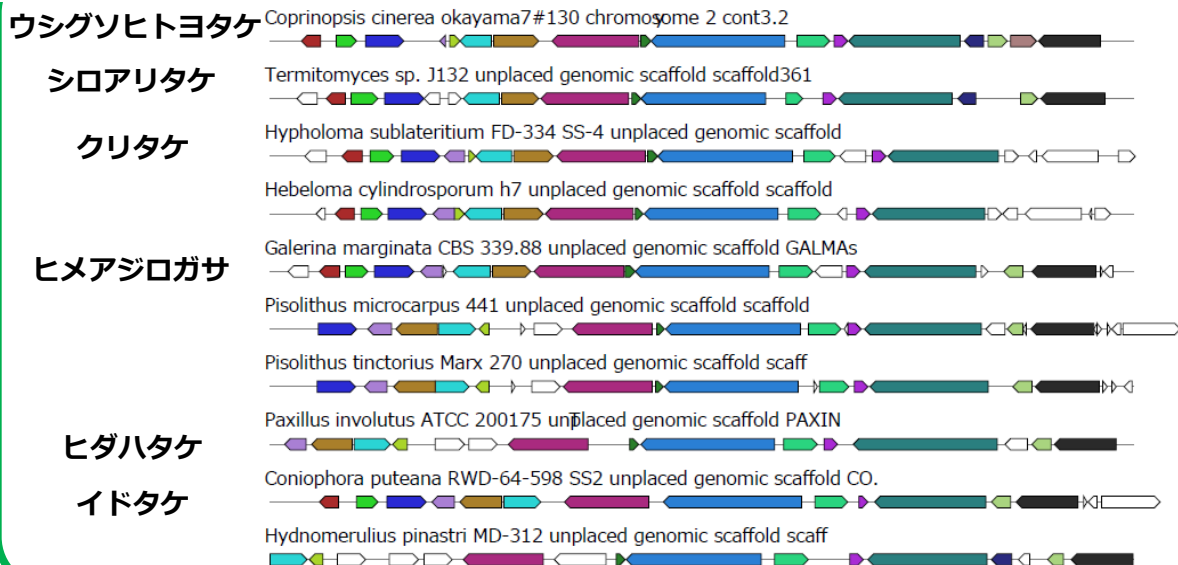
6

	gene ID	Proposed function	gene ID	Proposed function	
1	CC1G_04208	transcription elongation factor	6	CC1G_04213	Autophagy-related protein
2	CC1G_04209	pyrimidine deaminase	7	CC1G_04214	hydrolase
3	CC1G_04210 (<i>cpf1</i>)	NRPS* (A-T-C-T-C-T-C)	8	CC1G_13904	Replication factor A
4	CC1G_04211 (<i>cpf2</i>)	ornithine <i>N</i> -monooxygenase	9	CC1G_13905	Replication factor A
5	CC1G_04212	Ribosome biogenesis protein	10	CC1G_04216	<i>N</i> -acetyltransferase



1) Brandenburger, E. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017, 83, 21.

CPF生合成遺伝子クラスターのホモログ



左図の他に、
ブナシメジ、シイタケ、マイタケなど
200種類以上の担子菌類に普遍的に存在



ブナシメジ、シイタケ、マイタケの
CPF生産は確認済み

多くの担子菌類がCPF及びその類縁体を生産している可能性



休眠遺伝子を覚醒させて初めてCPFの単離・構造決定が可能となった

CPFの分布・機能には普遍性があり、担子菌類共通の成長促進分子である可能性



マツタケのような栽培できないキノコの人工栽培などに活用していきたい