

# 新たな医薬資源を切り開くポストゲノム型天然物探索

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

浅井 禎吾

## 1. はじめに

あらゆる生物の遺伝子情報が容易に利用可能となったポストゲノム時代において、遺伝子情報から天然物の創生を可能にする合成生物学的手法が脚光を浴びつつある。例えば、ゲノムマイニングと異種発現を組み合わせれば、生物の遺伝情報にプログラムされた天然物だけではなく、天然にはない類縁体であっても生体内システムを用いて天然物と同様な生合成過程によって創生することが可能であり、新たな医薬資源の開拓に有効である。本稿では、様々な有用活性が報告されている糸状菌のジテルペノイドピロン (DP) 類を標的として、麴菌を用いた異種発現による天然型および非天然型を含む多様なDP類を創生した。

## 2. 方法

糸状菌は医薬品シーズとして有用な薬理活性物質を含め、多様な天然物を生産する。糸状菌のゲノム上には、天然物の生合成遺伝子が多数存在し、その多くが未利用であり、21世紀における多様な天然物創生の重要な資源である。これら遺伝子資源を活用する天然物創生法として異種発現が有効である<sup>1)</sup>。例えば、既知物質の生合成遺伝子クラスターを異種発現すれば有用天然物の生物全合成ができ、一方、未知クラスターを異種発現すれば新規天然物を探索できる。さらに、異種発現では任意の組み合わせで遺伝子を発現させられることから、人工生合成経路を設計し発現させることが可能である。このような生合成経路レベルでのコンビナトリアル生合成では、天然には存在しない天然物を創生することができる。糸状菌では、麴菌が異種発現の汎用宿主として利用され、これまでに、複雑な構造のものも含め様々な有用天然物が異種生産されている<sup>1)</sup>。本研究では、麴菌異種発現系を基盤として、生合成経路の再構築と再設計によるコンビナトリアル生合成を行うことで、多様な物質創生を行った (図1)。

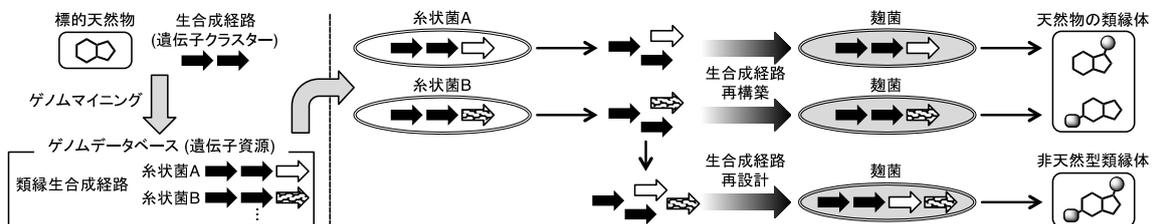


図1. 麴菌異種発現を用いる生合成経路の再構築と再設計

## 3. 結果・考察

### 3-1. ジテルペノイドピロン類共通中間体の生合成遺伝子群の同定と異種生産系の構築

DP類の生合成研究としては最近、静岡県立大学の渡辺教授らのグループにより、*Metarhizium robertsii* ARSEF 23よりsubglutinol類の推定生合成遺伝子クラスター (subクラスター) が見出された<sup>2)</sup>。筆者らは、研究室が保有するクモ内生菌*Arthrinium sacchari* (As) のゲノム上に、subクラスターと相同なDP類生合成遺伝子クラスターを見出した。DP類の母核構築に関わると考えられるpolyketide synthase: PKS、geranylgeranyl pyrophosphate synthase: GGPPs、prenyltransferase: PT、flavin-dependent epoxidase: FMOepおよびterpene cyclase: TCを麴菌NSAR1株にて異種発現することで、これら5遺伝子による共通中間体1 (図2b) の生合成を明らかとした。また、この実験により、共通中間体1を大量に生産する形質転換体 (約90 mg/L) の取得に成功し、以降の異種発現実験のプラットフォームとして用いた。

### 3-2. ジテルペノイドピロン類生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング

続いて、共通中間体1の生合成遺伝子5つが全て近傍にコードされることを指標とし、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のゲノムデータベースを用いてゲノムマイニングを行い、DP類生合成遺伝子クラスターを探索した。その結果、新たに4種*Fusarium graminearum* (Fg)、*Macrophomina phaseolina* (Mp)、*Colletotrichum higginsianum* (Ch)、*Metarhizium anisopliae* (Ma) にDP類生合成遺伝子クラスターを見出した (図2a)。Maのクラスターはsubクラスターと同じ遺伝子構成であることから、subglutinol Aの生合成経路をコードすると考えた。Chのクラスターは同菌種IMI349063株からの単離報告に基づき、higginsianin A7)の生合成経路をコードすると推定した。一方、Fg、MpおよびAsからはDP類の単離報告が無かったため、これらのクラスターは新規類縁体の生合成経路をコードすると期待された。なお、実際にAs以外の経路も共通中間体1を経由することを麴菌異種発現実験により確認している。

各クラスターは、共通中間体1の生合成遺伝子の近傍に、1の変換に関わると考えられる修飾酵素遺伝子をそ

それぞれコードしていた (図2a)。そこで次に、これら5種のDP類生合成経路を麹菌異種発現系にて再構築するため、バイオインフォマティクス解析により、各クラスターの修飾酵素による1の変換経路を推定した。まず、推定アミノ酸配列からshort-chain dehydrogenase/reductase (SDR)、methyltransferase (MT)、cytochrome P450 (P450)、flavin-dependent oxidase (FMO)、berberine bridge enzyme-like oxidase (BBE) へと分類した。続いて、アミノ酸配列の一致度60%以上のものを同一の機能を有する相同遺伝子とみなし、そうでないものを機能的に異なるものと仮定することで、最終的に図2aの通り分類した。最後に、同一の機能を有する酵素は同じ基質を受け入れ同じ生成物を与えるという基本的な考えのもと、5種のクラスターがコードする分岐的な生合成経路を推定した (図2b、天然型生合成経路)。

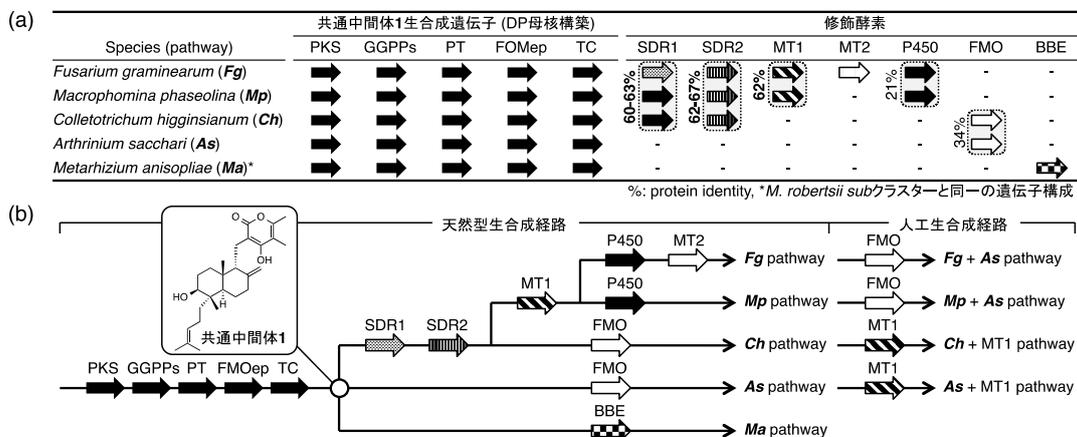


図2. (a) ゲノムマイニングにより見出したDP類生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子、(b) 構築したDP類の天然型および非天然型生合成経路

### 3-3. 天然型DP類生合成経路の再構築と天然型DP類の創生

図2bの推定に基づき、5種類全ての生合成経路を麹菌異種発現系にて再構築した。なお、当研究室にてゲノム解読を行ったAs以外は、データベースに登録されたゲノム解読株でなく、菌株またはゲノムDNAが入手可能であった50218 (Fg)、NBRC 7317 (Mp)、MAFF 305635 (Ch)、NBRC 103233 (Ma) 株をそれぞれ遺伝子供与株として用いた。共通中間体1の生産株に対し、修飾酵素遺伝子を段階的に導入することで、中間体および各々の経路がコードする生合成最終産物 (天然物) の生産系を構築した (図4)。各経路の最終産物としては、subglutinol A およびB (As, Ma経路) やhigginsianin A (Ch経路) のような既知物質以外に、新規物質7 (As経路)、11 (Mp経路)、12および13 (Fg経路) を取得した。また、導入遺伝子と生産された化合物の構造の対応関係から、全遺伝子の機能を含むDP類生合成経路の全容を解明した。

### 3-4. コンビナトリアル生合成による非天然型DP類の創生

天然型生合成経路の各DP類は、ピロン部または末端C5ユニットのいずれか一方が修飾されていた。そこで次に、各修飾酵素の機能情報をもとに、異なる経路を繋ぎ合わせ、ピロン部分と末端C5ユニットの両方が修飾されるような人工生合成経路を設計し、麹菌にて構築した (図2b、人工生合成経路)。その結果、天然型よりも高度に修飾された非天然型DP類14-22の生産に成功した (図3)。以上、生合成経路の再構築と合わせ、麹菌異種発現系を用いて合計9種の生合成経路 (天然型5種、人工4種) を構築し、多様な修飾様式を有する合計22種のDP類縁体を創生した。

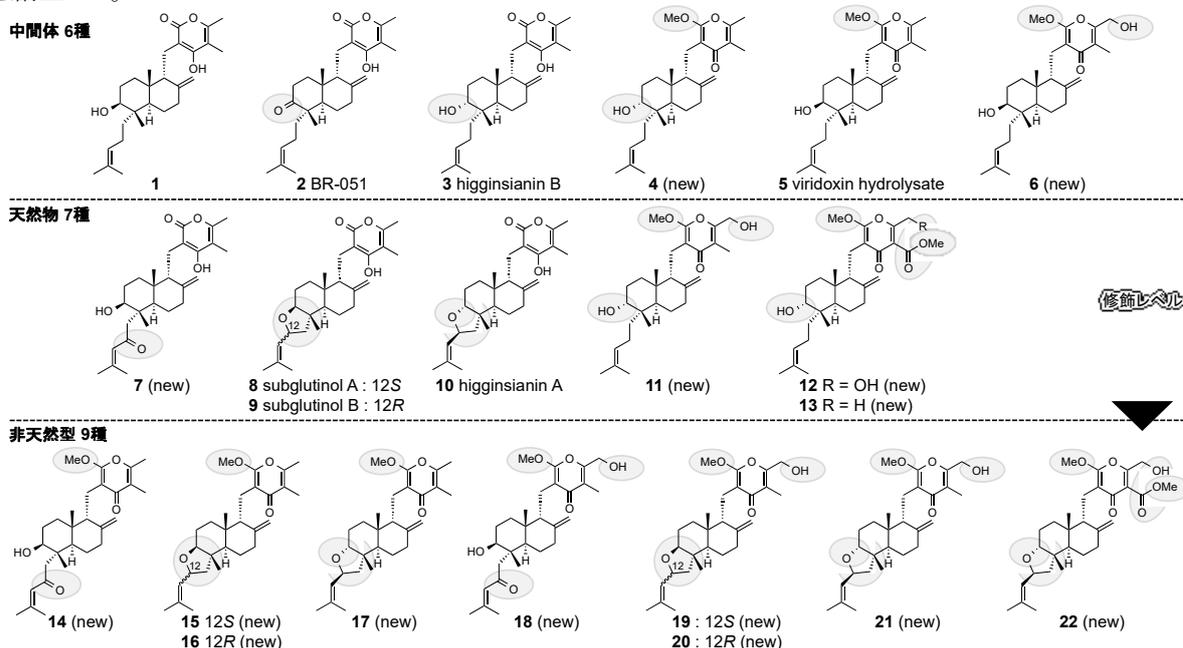


図3. 本研究にて創生したDPライブラリー

#### 4. おわりに

本稿では、糸状菌DP類をモデルケースとし、麴菌異種発現を用いた天然物一群の多様な類縁体の創生法を紹介した。本研究により創生したDPライブラリーは、生合成経路の中間体と最終産物に加え、人工生合成経路による非天然型類縁体からなる。人工生合成経路由来の化合物は確かに天然にはプログラムされていないが、生体内で生合成される過程は天然物と同じであり、天然物同様に医薬品シーズとして好ましい性質を保持していると期待される<sup>8)</sup>。本研究の手法は、天然物ベースの医薬品シーズ探索における弱点である類縁体の作出と再供給の問題を同時にクリアするものである。今後、ポストゲノム時代における新しい天然物創生研究を通じて、天然物創薬分野の発展に貢献したいと思う。最後に、本研究の推進に多大なご支援を賜りました、アステラス病態代謝研究会に深謝致します。

#### 5. 参考文献

- 2) Alberti F., *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 493-500 (2017)
- 6) Kato H., *et al.*, *J. Antibiot.*, 69, 561-566 (2016)