

研究テーマ:細胞内天然物発現法による新規遺伝子治療の開拓

今回、客員研究員としてドイツ連邦共和国イエナ市に所在する Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology、Christian Hertweck 教授の研究室で研究を行った。本留学助成の研究テーマ以外にも多くの研究プロジェクトに参加させて頂いたので、以下に報告する。

1. 細胞内天然物発現法による新規遺伝子治療の開拓

天然物を由来とする抗がん剤は、例えばパクリタキセルやマイトマイシン C など数多く開発されてきた。しかし、これらの化合物の作用点は微小管や DNA など、多くの生細胞にて機能している生体高分子であり、がん細胞と正常細胞との選択毒性の低さを起因とする副作用が問題となっている。近年、疾患関連タンパク質の立体構造をもとにして開発された薬剤による「分子標的治療」が成功を収めているが、それでもなおオフターゲット作用に起因する重篤な副作用が認められる場合も数多い。このような観点から、がん細胞に対し選択的に細胞傷害を引き起こすための新しい方法が求められている。そこで私は抗がん活性を示す天然物の生合成を司る生合成遺伝子に着目した。このような遺伝子をがん細胞特異的に細胞内に導入し、選択的に発現させることができれば、がん細胞に細胞死を誘導できると考えた。すなわち、がん細胞内に発現させた遺伝子からは天然物生合成酵素が生産される。この酵素がアミノ酸等の一次代謝産物を原料とし、抗がん活性天然物を細胞内にて新生合成する。生合成された天然物は直ちにその細胞内標的分子に作用し、細胞死を誘導することで、最終的にがんの駆逐されることが期待される。

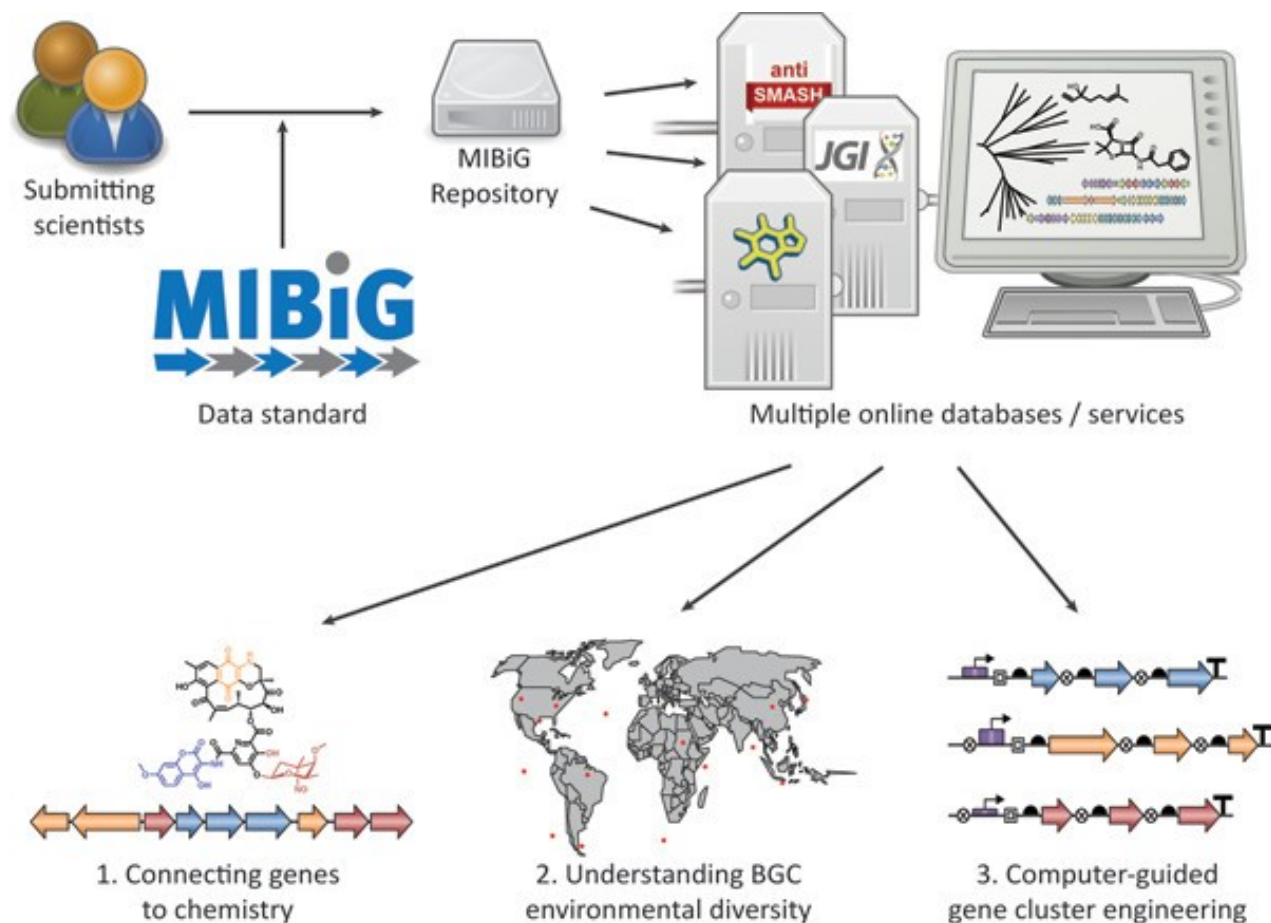
これまでに複数の検討すべき点(例えば天然物生合成遺伝子種の選択、使用するがん細胞種の選択、遺伝子導入法の選択、遺伝子発現に使用するプロモーター配列種の選択など)について評価を行い、どの組み合わせによる細胞死誘導が高活性、高選択的かを見出しつつある。受入先機関との相談の結果、知的財産権の観点から本報告書では得られた具体的な研究成果に関しては伏せさせて頂きたい。

2. 天然物生合成遺伝子クラスターデータベース(MiBiG)の構築¹

MiBiG(Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster, <http://mibig.secondarymetabolites.org/index.html>) は Marnix H. Medema 博士(Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany)が主導して作成された天然物生合成遺伝子データベースである。本データベースの構築に関し、バイオインフォマティクス、天然物化学、酵素学、微生物学、メタボロミクス、植物生理学等を専門とする100名以上の研究者が参画しており、今回私は Christian Hertweck 教授と共に本プロジェクトに参加した。本プロジェクトの概要を以下に示す。

次世代シーケンサーの開発に伴い、微生物ゲノムの解読が迅速にかつ安価に行われるようになり、医薬品のリードとして重要な役割を担う、天然物を生産する微生物のゲノムが注目されている。なぜなら、微生物のゲノム中にはこれまでに見つけてきた天然物の数をはるかに上回る数の天然物生合成遺伝子、すなわち「天然物の設計図」が刻まれていることがわかってきたためである。またこれらの遺伝子のうちの多くが、通常の培養条件下では発現していない、休眠型遺伝子であることも明らかにされつつある。このような遺伝子を自在に操ることができるようになれば、創薬にとって重要な、幅広いケミカルスペースをもつ化合物ライブラリーを効率的に整備することが可能となることが期待される。

ところで、有機化合物のなかでも天然物は化学構造多様性に富むことが知られている。たんぱく質や核酸はアミノ酸やヌクレオチド等、いくつかの構成成分がポリマー化した生体高分子であり、その生合成方法は比較的単純である。それに対し、天然物はアミノ酸や有機酸、糖など一次代謝産物を原料に、各種天然物生合成酵素によって生合成される。このときに使用される酵素は、生合成される天然物にほぼ特有の構造や性質を持ち、酸化還元、炭素—炭素の結合や分解、プレニル基やメチル基等の転移、幾何異性変換等、触媒する反応は多岐にわたる。加えて天然物の生合成が完遂するまでには一般的に 10-30 個程度の酵素反応が必要である。これが、天然物の高い構造多様性を生み出す一因となっている。多くの天然物の生合成機構が爆発的に明らかになりつつある近年、ゲノム上に存在する天然物生合成遺伝子(天然物の設計図)の配列情報を読み解くだけで、その遺伝子産物である天然物の化学構造式を予測することが可能になりつつある。言い換えれば、既存の知見で読み解けないような設計図からは構造的に新しい化合物の発見が期待できる上、新しい生合成経路を解明することは挑戦的な課題でありサイエンスとしても重要である。このような未解読の設計図を効率良く発見するためには、研究者自身が既知の各種天然物の設計図を良く理解しておく必要がある。しかしながら、これまでに各種天然物の設計図を知るためには、報告された文献・総説を地道に調査するしか方法が無かったといえる。そこで、本研究において Medema 博士らは、天然物生合成遺伝子とその遺伝子産物である天然物の化学構造式、加えてその生合成機構を結びつけたデータベースを構築した。本データベースの構築に関わるデータ入力には世界中の天然物生合成研究者が協力し、現在 1300 を超える化合物数の生合成遺伝子情報が収録されている。本データベースにより、興味ある天然物名を検索するだけでその生合成遺伝子の配列情報や生合成酵素機能、文献情報へ簡単にアクセスが可能となった。もちろん、その逆もまた可能である。また、特筆すべきなのは、同じく Medema 博士らによって先に開発されていたプログラム「AntiSMASH」との連携である。AntiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) は、入力したゲノム配列の中から天然物生合成に関与すると予測される遺伝子クラスターを自動的に抽出するプログラ



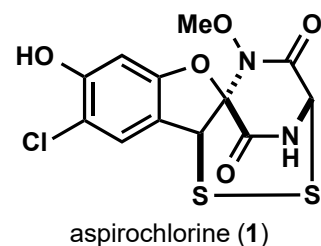
ムである。従って、次世代シーケンサーによって得られたゲノム情報からまず AntiSMASH にて天然物生合成遺伝子クラスター情報が抽出され、抽出された各遺伝子クラスター情報を MIBiG

プログラムにて解析することで、既知の天然物生合成遺伝子クラスターを排除し、新規性の高い生合成遺伝子クラスターのみを迅速に同定することが可能になった。現在、各種微生物やメタゲノム等、膨大な量のゲノム情報が比較的容易に入手可能であり、そのような膨大な情報から、無駄な情報を取り除き、真に有用な情報を迅速に得られる点で MIBiG プログラムは多くの研究者にとって有益なツールになり得ると言える。

3. コウジ菌 *Aspergillus oryzae* の生産するマイコトキシン様物質の生合成研究

コウジ菌 *Aspergillus oryzae* は清酒、味噌、醤油等の製造に用いられていることから、我が国の発酵産業界にとって重要な糸状菌の一種である。本糸状菌は強力なマイコトキシン(カビの産生する生物毒素)である aflatoxin を生産する *Aspergillus flavus* と近縁種であるが、そのゲノム中に含まれる aflatoxin 生合成遺伝子には一部欠失が認められ、遺伝子レベルでその安全性が証明されている。加えて、日本における長年の食経験からもその安全性が信じられていた。ところが近年、Hertweck 教授の研究グループはゲノム解読株 *A. oryzae* RIB40 株を様々な条件にて培養し、本株より別のマイコトキシン様物質である aspirochlorine (1) が生産されていることを見出した。本化合物の化学構造は、アスペルギルス肺症の原因となる病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が生産する gliotoxin と類似している。Gliotoxin はアスペルギルス感染症の感染因子との報告もされている、著名なマイコトキシンであるため、ここに今一度、糸状菌 *A. oryzae* の安全性を科学的に評価する必要性が生じていた。本研究では、aspirochlorine の化合物生産機構、aspirochlorine 生合成中間体や類縁化合物の生物毒性を明らかにすることを志向し、まずはその生合成機構の化学的解明を目指した。

研究前任者による遺伝子破壊実験、同位体標識実験、大腸菌にて調製した精製酵素による *in vitro* 実験等から、aspirochlorine の生合成遺伝子クラスターが特定されていた。本化合物は NRPS (nonribosomal peptide synthetase) によるフェニルアラニンの二量化を皮切りに、炭素—炭素結合開裂、炭素—硫黄結合生成、炭素—硫黄結合の転位、FAD 依存型ハロゲン化酵素 AclH による芳香環塩素化を含む種々の変換反応を経て生合成されることが



推測されている。ところで、aspirochlorine 類は 100 L の培養液中から生産量約 1 mg 程度しか得られない微量成分であり、これが Hertweck 研究室における研究プロジェクト上の長年のボトルネックであった。そこで、aspirochlorine 生産を司ると推測された転写因子遺伝子に着目した。AclZ と命名した本転写因子遺伝子の破壊株は aspirochlorine 生産能が認められなかったことから、AclZ が確かに aspirochlorine 生合成を正に制御していることが確認された。なお、本変異体を作成する上で、*A. oryzae* の形質転換を効率的に行う必要があった。そこで、効率的な形質転換が可能となり、かつ二種の栄養要求性マーカーが使用可能な *A. oryzae* AOKW7 株(□*ligD*, □*pyrG*, □*adeA*)を樹立することに成功した。本株を基に、*aclZ* を恒常的に強制発現させた株 AOKW8 を樹立し、その aspirochlorine 生産能を評価したところ約 100 倍程度の生産性の向上が認められた。このように、以降の解析を円滑に進行させるための基盤が構築できたと考えている。続いて、aspirochlorine の生合成を解析するために各種遺伝子破壊株を作成し、その代謝産物を抽出したのちに LCMS にて分析した。Aspirochlorine の生合成遺伝子クラスターは約 50 kb の領域に約 25 の遺伝子が存在している。これらのうち、aspirochlorine 生合成に必須な遺伝子は 21 個であることをこれまでに明らかにしている。なお、aspirochlorine 生産能が失われた各種遺伝子破壊株に関して、aspirochlorine の生合成中間体と予想される化合物の蓄積が認められ、その化学構造について高分解能質量分析を始めとする各種機器分析により決定した。一方、各種生合成酵素について、大腸菌・出芽酵母・あるいは *Aspergillus* 属糸状菌を異種発現の宿主として用い、精製酵素を獲得した。得られた精製酵素に対し、遺伝子破壊株から得られた生合成中間体を作用されると、化学構造の変換が認められた。本方法により、生合成酵素の機能を明らかにすると共に、aspirochlorine 推定生合成経路を提唱することが可能となった。その生合成の詳細について一例を挙げると、(1) シトクロム P450 酸化酵素と相同性を示す AclO はジケトピペラジン環上のアミド窒素上を酸化

し、*N*-hydroxyamide 構造を形成する役割を担うこと、続いて(2)メチル基転移酵素 AcIU が *N*-hydroxyamide 構造に対してメチル化を触媒し *N*-methoxyamide 構造が形成されることを明らかにした。他にも興味深い幾つかの成果が得られてきたが、本研究分野は近年非常に競争的であること、現在論文投稿作業中であることを加味し、Hertweck 教授と相談した結果、具体的な成果については本報告書では公表を控えさせて頂きたい。以上の成果について、現在論文を作成中である。

研究業績

1. **Medema, M. H.**; Kottmann, R.; Yilmaz, P.; Cummings, M.; Biggins, J. B.; Blin, K.; de Bruijn, I.; Chooi, Y. H.; Claesen, J.; Coates, R. C.; Cruz-Morales, P.; Duddela, S.; Dusterhus, S.; Edwards, D. J.; Fewer, D. P.; Garg, N.; Geiger, C.; Gomez-Escribano, J. P.; Greule, A.; Hadjithomas, M.; Haines, A. S.; Helfrich, E. J. N.; Hillwig, M. L.; Ishida, K.; Jones, A. C.; Jones, C. S.; Jungmann, K.; Kegler, C.; Kim, H. U.; Kotter, P.; Krug, D.; Masschelein, J.; Melnik, A. V.; Mantovani, S. M.; Monroe, E. A.; Moore, M.; Moss, N.; Nutzmann, H. W.; Pan, G. H.; Pati, A.; Petras, D.; Reen, F. J.; Rosconi, F.; Rui, Z.; Tian, Z. H.; Tobias, N. J.; **Tsunematsu, Y.**; Wiemann, P.; Wyckoff, E.; Yan, X. H.; Yim, G.; Yu, F. G.; Xie, Y. C.; Aigle, B.; Apel, A. K.; Balibar, C. J.; Balskus, E. P.; Barona-Gomez, F.; Bechthold, A.; Bode, H. B.; Borriss, R.; Brady, S. F.; Brakhage, A. A.; Caffrey, P.; Cheng, Y. Q.; Clardy, J.; Cox, R. J.; De Mot, R.; Donadio, S.; Donia, M. S.; van der Donk, W. A.; Dorrestein, P. C.; Doyle, S.; Driessen, A. J. M.; Ehling-Schulz, M.; Entian, K. D.; Fischbach, M. A.; Gerwick, L.; Gerwick, W. H.; Gross, H.; Gust, B.; **Hertweck, C.**; Hofte, M.; Jensen, S. E.; Ju, J. H.; Katz, L.; Kaysser, L.; Klassen, J. L.; Keller, N. P.; Kormanec, J.; Kuipers, O. P.; Kuzuyama, T.; Kyrpides, N. C.; Kwon, H. J.; Lautru, S.; Lavigne, R.; Lee, C. Y.; Linquan, B.; Liu, X. Y.; Liu, W.; Luzhetskyy, A.; Mahmud, T.; Mast, Y.; Mendez, C.; Metsa-Ketela, M.; Micklefield, J.; Mitchell, D. A.; Moore, B. S.; Moreira, L. M.; Muller, R.; Neilan, B. A.; Nett, M.; Nielsen, J.; O'Gara, F.; Oikawa, H.; Osbourn, A.; Osburne, M. S.; Ostash, B.; Payne, S. M.; Pernodet, J. L.; Petricek, M.; Piel, J.; Ploux, O.; Raaijmakers, J. M.; Salas, J. A.; Schmitt, E. K.; Scott, B.; Seipke, R. F.; Shen, B.; Sherman, D. H.; Sivonen, K.; Smanski, M. J.; Sosio, M.; Stegmann, E.; Sussmuth, R. D.; Tahlan, K.; Thomas, C. M.; Tang, Y.; Truman, A. W.; Viaud, M.; Walton, J. D.; Walsh, C. T.; Weber, T.; van Wezel, G. P.; Wilkinson, B.; Willey, J. M.; Wohlleben, W.; Wright, G. D.; Ziemert, N.; Zhang, C. S.; Zotchev, S. B.; Breitling, R.; Takano, E.; Glockner, F. O. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat. Chem. Biol.* 11, 625-631, 2015.