

日本医療研究開発機構  
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術  
研究開発項目②「次世代型有用天然化合物の生産技術開発」  
(英語) Development of core technologies for innovative drug development  
based upon natural products and IT  
Theme 2: Development of production technology for useful next-  
generation-type natural products

研究開発実施期間: 2013年8月7日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 新家 一男  
(英語) Kazuo Shin-ya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 次世代天然物化学技術研究組合  
/国立研究開発法人産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 研究グループ長  
(英語) Technology Research Association for Next generation Natural Products Chemistry  
/Group Leader, Department of Life Science and Biotechnology  
Research Institute for Drug Discovery,  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

## II 研究開発の概要

### (1) 研究開発の目的と概要

天然化合物は人類の叡智を超えた構造を持ち、1928年のペニシリン発見以来、抗菌剤、抗カビ剤、抗がん剤、高脂血症剤、免疫抑制剤など多様な疾患領域で数多く医薬品となっている。現在上市されている医薬品の6割強が天然化合物あるいは天然化合物の構造を模倣して開発されている。その中でも、放線菌が生産する二次代謝産物は微生物医薬品の7割を占める。しかしながら、長年の研究により、多くの化合物が単離されてきた代償として、新規化合物の取得が困難になってきている。また、多くのノウ

ハウの蓄積がある放線菌であっても、医薬品開発に必要となる化合物量を安定的に生産するためには、未だに多くの課題が残っている。

一方で、最近のゲノム解析の結果から、放線菌中には、人類がこれまで利用出来なかった多くの未利用生合成遺伝子が存在することが明らかになってきた。生合成遺伝子を用いた異種発現生産技術は、天然化合物を安定に生産させること、および未利用生合成遺伝子を用いた新規化合物の取得を可能にする、強力な技術・ツールとなると考えられる。生合成遺伝子を用いた異種発現生産研究は、この20年間に世界中で精力的に行われてきたが、小さな生合成遺伝子サイズで生産されるような分子量の小さな化合物を対象に行われてきたに過ぎない (RiPPs 生合成経路で生合成されるペプチド系化合物は除く)。それに対し、医薬品となっている多くの天然化合物は、分子量の大きな化合物であり、これまでの技術では生合成遺伝子を用いた異種発現では生産することが出来なかった。この理由は、これらの化合物の生合成遺伝子が 100 kb、時には 200 kb にもおよぶ巨大な遺伝子クラスターであるため、生合成遺伝子クラスター全体のクローニングおよび宿主微生物への遺伝子導入が、現在の技術レベルでは困難であるためである。欧米では、今後予想される安価かつ大量ゲノムシーケンスに対応した、効率的な天然化合物生産システムの開発が進められているが、例えば遺伝子の配列が判明しても、この巨大遺伝子クラスターを扱う技術が無ければ、これらの遺伝子を応用した化合物生産は出来ない。そこで、医薬品開発を主目的とした天然化合物の異種発現技術の開発は、安定的かつ効率的な生産を可能にすると共に、新規化合物の創出が期待されるなど、今後の天然化合物の医薬品として応用していくには必須である。

本研究開発では、我が国が強みとする微生物ライブラリーや、天然物化学に対する知識・ノウハウ等を最大限に活用し、優れた医薬品候補となりうる天然化合物を安定的かつ効率的に生産するための技術開発を行った。具体的には、放線菌を中心として、有望な医薬品候補となりえる天然化合物の生合成遺伝子クラスターの中でも 120 kb を超える巨大な生合成遺伝子クラスターの取得技術と導入技術、生産に適した宿主菌株の開発を行った。また、放線菌同様多くの生合成遺伝子を保有する *Pseudomonas* 属などの真正細菌、引いては海洋生物に共生する難培養微生物等の二次代謝産物生産へも適用可能な技術の多様化を図った。

## (2) 5年間の主な成果の要約

### ①有用天然化合物生産の高度化・高品質化

- ・これまで培ってきた正確なシーケンス解析技術をさらに高度化し、放線菌のように GC 含量が高く、繰り返しの多いゲノム配列についてもより正確にシーケンスできるようになった。その技術の高さは参画企業からも認識されており、自社化合物の異種発現生産に向けた生合成遺伝子クラスター情報の取得、遺伝子情報を用いた生産性向上あるいは生産性向上の因子解明といった目的のゲノム解析依頼は全部で 83 件あった。

- ・有用天然化合物を生産する放線菌 67 株について 150 kb 以上の BAC ライブラリーを調製し、そのうち 27 菌株の放線菌に対しては 200 kb 超サイズの BAC ライブラリーの調製を行い、全て成功した。最大 BAC クローンは 266 kb であった。

- ・SAP 法という線状染色体を用いるこれまでに無い画期的な新技術を開発することにより、生産性が高いもののこれまで遺伝子導入が困難であった *S. avermitilis* 由来の SUKA 株に対して 200 kb 以上の種々の生合成遺伝子クラスターを導入することができることを確認した。

- ・制御因子導入による化合物生産増強については、既知の臨床応用抗生物質など数個の化合物についてはその効果が確認できたが、未利用生合成遺伝子を含め多くの生合成遺伝子発現誘導あるいは生産性向上への汎用性はなかった。プロモーターに関しては、培養時期依存プロモーターを発見・開発し、放線菌における二次代謝生産における遺伝子発現誘導における、これまでに無い最も強力なツールになる

ことを明らかにした。これにより、通常の異種発現では全く生産しなかった化合物が生産できることが判明した。

## ②有用天然化合物生産の多様化

・*Pseudomonas* 属 およびその近縁種と、*Pseudomonas* 属以外では、*Paenibacillus* 属 (グラム陽性)、*Bacillus* 属 (グラム陽性)、*Mycobacterium* 属 (グラム陰性)、*Lysobacter* 属 (グラム陰性)、*Sorangium* 属 (グラム陰性) と、グラム陰性・陽性と多岐にわたり、生合成遺伝子クラスターの取得を行った (目的化合物生合成遺伝子 10 個、未利用遺伝子 5 個)。

・難培養海洋微生物及び土壌微生物について、ゲノムを分解させずに BAC ライブラリー化する技術を開発した。土壌サンプルからは 120 kb を超える BAC クローンの開発が可能となった。この中から 7 個以上の生合成遺伝子クラスターを取得した。

・*Pseudomonas* 属においては、*Pseudomonas putida* KT2440 株および BAC ベクターの改良を行う事により、異種発現可能なホストの開発を行うことができた。

・79 個の未利用生合成遺伝子クラスターについて異種発現生産の検証を行い、11 個の化合物 (誘導体を除く) の異種発現に成功した。また、これとは別に未利用テルペン合成酵素 7 種を選抜し、異種発現の検討を行った結果、13 個の新規化合物の創製に成功した。

以上のように、研究成果については、プロジェクト開始当初に設定したほぼすべての目標を 100% あるいはそれ以上に達成する成果を得ることができた。また、その成果の水準は、例えば BAC を用いた長鎖の生合成遺伝子クラスターのクローニングにおいては、223 kb (最終的には 213.9 kb と同定) の生合成遺伝子クラスターの取得に成功するなど、世界的にみてもこのグループでしかなし得ないような成果を多く出している。また、放線菌を用いた異種発現においては、100 kb を超える生合成遺伝子クラスターを用いての報告例は数えるほどしか無く、物質生産と言う、医薬あるいは工業的な応用研究に必須な技術を確立することが出来た。

Natural products are attractive because of their unique structures beyond the human intelligence, and of their potent biological activities. Among those natural products, large circular compounds such as antibiotic erythromycin, antitumor agent rapamycin, immunosuppressant FK-506 and so on, which are so called macrolide compounds, are one of the most important compounds in industrial field including clinical use. Preparation of these compounds by organic synthesis is usually difficult and it takes long time such as 1 or 2 years for the accomplishment of complete synthesis. Therefore, these clinical drugs are industrially produced by fermentation even at present. Since the biosynthetic genes of macrolide compounds consist of over 100 kbp, it is also difficult to be biosynthesized by heterologous expression. Especially, the size of biosynthetic gene of halichondrin B, which is one of the final targets of heterologous expression research, is estimated beyond 200 kbp. Therefore, we tried to develop the BAC library preparation technique for over 200 kbp genome sizes. After various improvements, we succeeded to obtain the biosynthesis gene cluster of quinolidomicin, which is the largest macrolide compound produced by *Streptomyces* strain isolated from terrestrial soil sample (biosynthesis gene cluster: 223 kbp).

By employing this advanced BAC technology, we have prepared large-size BAC libraries from many strains to obtain large biosynthesis gene clusters. We selected cryptic large biosynthesis gene clusters from these BAC libraries and performed heterologous expression to produce novel natural compounds. As a result, we succeeded in the production of a novel compound designates as neomediomycin, of which biosynthesis gene cluster

is 173 kbp (insert size: 205.4 kbp). This compound was biosynthesized by type I PKS, and possesses large molecular weight of 1193 (molecular formula  $C_{68}H_{107}NO_{16}$ ). Even there are few reports concerning the production of novel compounds by using cryptic biosynthesis genes, this is the first example in the world about novel compound production by the heterologous expression of such giant cryptic biosynthesis gene cluster.

One of another large purpose of this project is to increase the effective transformation ratio of large genes into *Streptomyces* host strains. To conquer this problem, we tried to establish the stable transformation protocol by using integrating vectors involving bacteriophage *attP/int*. This novel *attP/int* sequence effectively acted on the establishment of stable transformant of our main host strain, *S. avermitilis*. To confirm the generality concerning transformation efficacy not only for *S. avermitilis* but also other *Streptomyces*, this integrating vector showed more general features to many *Streptomyces* strains.

Our effort to establish heterologous expression in *Streptomyces* resulted in the higher success ratio. To the contrary, heterologous expression of useful compounds of *Pseudomonas* origin still has bottlenecks and there are only a few success reports so far. Genus *Pseudomonas* involves opportunistic infection bacteria of *Pseudomonas aeruginosa*, and *Burkholderia* genus, which is known as infectious bacteria against both animals and plants, is also known as related species of *Pseudomonas*. These bacteria frequently produce bioactive compounds, but have a hurdle to apply for industrial production. To overcome this problem, we developed the heterologous expression technique in *Pseudomonas putida* KT2440 which is approved as authorized host by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. We developed heterologous expression system by applying a variety of promoters which raised the success rate of heterologous expression in *Pseudomonas putida* KT2440 remarkably.

In summary, we succeeded in developing advanced BAC technology for obtaining large (over 200 kbp) biosynthesis gene clusters from microbes like *Streptomyces*. Using this BAC technology, we succeeded in the heterologous expression of biosynthetic gene clusters of industrially useful natural compounds in *Streptomyces* and also in other bacteria like *Pseudomonas*. Many pharmaceutical companies already started to industrial applications of these techniques for their own natural compounds.