

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
(革新的中分子創薬技術の開発)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) モジュール編集を主とする中分子天然化合物の母核改変及び修飾酵素による構造展開に向けた革新的技術開発

(英語) Development of innovative technologies toward alteration of core structure of middle molecular weight natural products based on module editing, and their structural expansion by modification enzymes

研究開発実施期間: 平成30年4月23日～令和3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)

所属機関: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 (次世代天然物化学技術研究組合)

部署: 細胞分子工学研究部門

役職: 研究グループ長

(英語)

Affiliation: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

(Technology Research Association for Next generation Natural Products Chemistry)

Department: Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute

Position title: Group Leader

II 研究開発の概要

(和文)

中分子化合物は、アスピリンのような低分子化合物と抗体あるいは生物製剤のような高分子の間を埋める化合物として、タンパク質相互作用など低分子化合物では制御が困難な創薬ターゲットに適用することが期待されている。しかしながら、優れた中分子化合物ライブラリーは存在しないのが現状であり、豊富な活性を持つ中分子化合物ライブラリーの整備が切望されている。医薬品として開発されている多くの天然化合物は、まさに中分子化合物の代表と考えられるが、その構造の複雑さが故に中分子天然化合物を鋳型とした誘導体展開は、これまでの技術では極めて困難であり、産業応用としては現実的ではない。

そこで、本研究開発では、このような中分子天然化合物の生合成遺伝子を改変することで、種々の誘導体を創製する技術の開発を行うことを計画した。本技術開発により、合目的的に意図した母骨格改変構造

を持つ中分子天然化合物の創製が可能になる技術を開発し、製薬等企業での応用を最終的な目標とした。

一方で、生合成遺伝子の設計図改変では化学修飾出来ない部分構造も存在する。このような部分構造の化学修飾に関しては、有機合成法による修飾はほぼ不可能であり、それに代わる技術の開発が必須である。本課題を解決する手段として、微生物由来の化学修飾酵素の探索と応用が有用であると考えた。微生物中には、有機合成では不可能な位置に、水酸基などを導入することが可能な修飾酵素が豊富に存在することが、これまでの研究でも示されてきている。本研究開発では、低分子のみで無く、中分子化合物への応用も可能な修飾酵素を見出し、その効率的な同定法、および宿主微生物を用いた酵素活性発現システムの構築を行い、製薬等企業へ技術および酵素ライブラリーを導出することを目標とした。

研究開発項目 1：天然化合物の母核改変技術の開発

従来の中分子天然化合物生合成遺伝子クラスターの改変は、制限酵素を用いる方法や、相同組換えを基盤とした方法に依存しており、必ずしも望む位置で正確に遺伝子改変を行うのは不可能であった。この問題を克服するため、CRISPR-Cas9 と Gibson assembly の反応を *in vitro* で行う技術を開発した (*in vitro* モジュール編集技術)。この技術の開発により、制限酵素サイトに依存しない切断と、相同性の高い遺伝子を一塩基のエラー無く遺伝子配列を改変可能になった。

本研究開発では、開発した *in vitro* モジュール編集技術を、高度に相同性の高い繰り返し配列からなる I 型 PKS 生合成遺伝子にも適用可能な技術へとブラッシュアップし、150 kb を超える巨大生合成遺伝子に対して、一塩基のエラーも無く精密に望む位置で遺伝子改変が可能な技術として確立し、rapamycin をはじめ種々の標的化合物を対象に 150 個以上の母骨格改変人工生合成遺伝子クラスターの調製を行った。また、多くの実践研究とシミュレーション解析の結果、ほぼ 100% の確率でデザイン通りの人工生合成遺伝子クラスターの構築が可能になった。本技術は、20 年以上に亘り世界中の生合成、天然物化学者が夢見てきたことを実現することが出来た成果であり、産業応用でも、また基礎研究分野の両分野において、本研究開発の最も大きな成果の一つである。

中分子天然化合物の代表であり、また erythromycin、tacrolimus (FK506)、rapamycin、ivermectin など多くの医薬品となっている、マクロライド系化合物の生合成遺伝子の基本ユニットであり、炭素鎖伸長と骨格の多様性を産むモジュールと呼ばれる酵素複合体に関しては、これまでの十数年の研究により、基質特異性が高く、生合成遺伝子を改変しても化合物生産には至らないと考えられてきた。しかしながら、本研究開発により構築した多くの人工生合成遺伝子の異種発現による生産検証研究において、80 個以上の母核改変化合物の生産に成功した。また、鋳型に用いた標的化合物の構造が類似しているにも拘わらず、母核改変化合物の生産性に大きな差が見られたことから、高い柔軟性を持ったモジュールの存在が示唆される結果を得ることができた。

研究開発項目 2：有用微生物酵素を用いた中分子変換技術の開発

放線菌は二次代謝産物生産能が高いのみでなく、化合物修飾酵素も豊富に存在する。例えば、ヒト肝臓の薬物代謝の代表的酵素であるシトクロム P450 は、中分子化合物に対しても修飾反応を触媒する有用な酵素群であるが、放線菌には 30~70 個もの P450 が存在する一方で、大腸菌にはシトクロム P450 をコードする遺伝子は存在しない。一般に、有用酵素の利用は大腸菌を用いて行うことが多いが、宿主が本来保有していないような酵素の活性発現は、当然ながら、元来内在的にそれらの酵素を保有している菌種を宿主とする方が望ましい。したがって、本研究開発では、二次代謝産物のみでなく、有用酵素の活性発現の主たる宿主として放線菌を用いることにした。放線菌は大腸菌と比較するとゲノムツールの整備が少ないのが弱点であり、本研究開発では優れた遺伝子発現ベクターの開発を行った。有用酵素活性発現ベクターとして、2-cistron 型遺伝子発現ベクターを基本に用いることにした。プロモーターには、種々の検討の結果、放

線菌二次代謝産物生産に最適なプロモーターが有用酵素発現にも優位であることを確認し、同様のプロモーターを基本プロモーターとして利用する遺伝子発現ベクターを構築した。

また、シトクロム P450 のように、補因子を要求するような酵素の発現ベクターには、目的酵素と補因子のような複数の遺伝子を、効率良く同一転写単位として発現させることが可能な、人工オペロンを組むベクターを開発した。P450 の反応には、電子の伝達に関わる ferredoxin が必須であるため、P450 と共存して発現させることが効率的である。酵素活性発現用宿主として用いる *S. avermitilis* SUKA 株において、放線菌 P450 に対して汎用性の高い flavodoxin および ferredoxin reductase を組み込んだシトクロム P450 用クローニングベクターを構築した。

一方で、放線菌には内在性の酵素が存在し、それらの中には副反応を誘導するものもある。そのため、酵素活性発現宿主として用いる放線菌では、主たる内在性酵素を欠失させた標的酵素活性発現専用の宿主を開発した。本酵素活性発現宿主は、発現ベクターとセットで利用し、多数の目的酵素発現株を企業へ提供し、創薬に用いられている。

中分子天然化合物の修飾反応において、ある種の放線菌グループが非常に有望であることが示されたが、実用化を目的とした場合には、修飾反応の特異性の担保および変異導入などによるさらなる反応の高度化を考慮すると、実際に反応を担う酵素（責任酵素）の単独使用が望ましい。しかしながら、P450 候補遺伝子は 1 菌株当たり 30~70 個にもものぼることが我々の研究により明らかになっているため、網羅的な探索は極めて非効率である。また、これまで P450 の基質認識に関して全く規則性は見出されておらず、化合物から責任酵素を同定することは配列情報からでは不可能である。

そこで、本プロジェクトでは、製薬企業と共同で効率的な責任酵素同定法の開発を行った。企業選抜の化合物酸化反応有用酵素ヒット菌株について、ドラフトゲノム解析を行い、P450 およびジオキシゲナーゼなどの酸化酵素をピックアップした。薬物代謝と同様のメカニズムが微生物にも存在すると仮定し、化合物添加による mRNA 発現誘導を指標に、発現量が上昇した P450 酵素遺伝子が責任酵素であるかの検証を行った。その結果、目的化合物添加により mRNA レベルでの発現誘導する酵素が、実際にクローニングし活性が観察された酵素であることを明らかにした。本コンセプトの汎用性を検証するため、幾つかのヒット株について、目的化合物添加により mRNA レベルでの発現誘導する酵素のみを選択的にクローニングし、単独酵素発現株を作成、活性検証した結果、ほぼ 100% の確率で化合物変換の責任酵素であることを明らかにし、高効率な責任酵素同定法として確立した。企業提供単独酵素発現株に関しては、ターゲット化合物の臨床開発において誘導體展開に用いられていると共に、種々の合成中間体合成などに用いられている。本研究開発に関しては、今日では企業が論文発表するのは異例になってきているが、大きな成果として企業主体で論文を発表した。

以上、研究開発項目 1：天然化合物の母核改変技術の開発、および研究開発項目 2：微生物酵素を用いた中分子変換技術の開発の二つの技術に関しては、多くの成果が既に企業にて応用されており創薬開発へ貢献している。

モジュール編集技術に関しては、企業との共同研究において、母核改変化合物生産株を作成し、パイプライン化合物創製のために使われている。本母核改変化合物異種発現株は、親株よりも生産性が高く、かつ望む化合物のみを生産する。また、本技術の有効性が企業に浸透することで、本技術の導出依頼があり、技術指導を行った。今後は、各企業にてそれぞれの目的とする化合物生産へ応用される予定である。

また、微生物酵素を用いた中分子変換技術に関しては、数社より高い評価を受けており、多くのニーズに応える形で、酵素活性発現株の供与を行っている。これらの酵素活性発現株に関しては、一化合物の開発に止まらず、代謝物解析用化合物調製という形で、あらゆる開発薬へ応用されている。さらに、最近では有機合成では調製困難な薬剤合成の出発物質の調製にも応用され始めている。また、共同研究により開発

した責任酵素同定法に関しては、複数の標的酵素に対して汎用性の高さが明らかになってきており、今後益々利用が増えると考えられる。

(英文)

Recently, middle-molecular-weight (MMW) compounds have attracted increasing attention as new compounds to fill the gap in molecular weight between macromolecules such as antibodies, and low-molecular-weight compounds. However, at the current scientific level, there are no strategic guidelines for constructing biologically active MMW compounds.

On the other hand, many clinically used MMW natural compounds such as macrolides, FK506, erythromycin, ivermectin, and macrocyclic peptides cyclosporin, are synthesized by type-I PKSs and NRPS, respectively, and are considered to be the most ideal resource of MMW compound library. The most characteristic feature of natural compounds is that they consist of complicated structures, which are beyond human intellect, but conversely since their derivatization is significantly difficult, it would become negative factor of side effects reduction or metabolism improvement during drug development. Thus, this bottleneck becomes one of the big problem that screening for natural compounds has declined.

In view of this point, conversion of core skeletal frame of natural compounds by modification of biosynthetic genes has been desired. But ordinal genetic engineering techniques such as homologous recombination performed in microorganisms are not applicable for type-I PKS genes, since they are huge gene clusters exceeding 100 kb consisting of extremely high homology and repeat sequences. In order to overcome these problems, we developed a methodology that employs the CRISPR-Cas9 reaction *in vitro* to avoid unnecessary off-target reactions and simplify sequence analyses of edited constructs. To precisely engineer against highly repetitive modular PKS genes, the establishment of a precise DNA digestion and subsequent seamless cloning method that does not depend on recombination or restriction digestion is of great importance. The combination of *in vitro* Cas9-digestion of the DNA and Gibson assembly can be applied to 100 kb of targeted biosynthetic gene cluster. Then we applied this *in vitro* module editing technique to produce the desired rapamycin derivatives. We demonstrated that our *in vitro* module editing could introduce target DNA fragments from endogenous and/or exogenous PKS genes into desired sites precisely even when the BAC exceeds 160 kb and produced over 80 derivatives.

However, some kinds of chemical structures are very difficult to be modified even by module editing of biosynthetic genes. In such cases, a different kind of methodology is required. For this purpose, we planned screening and utilization of microbial modifying enzymes which can modify MMW compounds. Actinomycetes are known to possess 30 - 70 P450 genes and also have many redox partner system. Therefore, these wild strains sometimes show additional reaction which are not desired to produce purpose compounds. To escape this problem, we developed actinomycetes host systems which only express exogenous modifying enzyme cloned from wild strains. We aimed to collect several species of modifying enzymes of microbial origin that can catalyze modification (oxidation, hydroxylation and so on) of MMW natural compounds, of which reaction hardly be done by organic synthesis. We finally constructed P450 gene expression strain library comprising more than 200 modifying enzymes. We also established an actinomycetes library (240 strains) which can show enzymatic activities to modify MMW compounds with high ratio. We further developed the methodology for the determination of the responsible modifying enzyme among a lot of P450 genes in the actinomycetes strain which shows the ability of target MMW modification.

By using this method, we can clone the responsible modifying enzymes effectively and rapidly. By developing these technologies, we established innovated technologies to construct MMW natural compound library that fills the missing piece of drug discovery library, and it is expected that it will be

applied to various drug development including new phenotypic and PPI screening for drug discovery in the future.

[ここまでを総括報告としてAMEDのホームページに掲載](#)

