

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：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」
3. 研究開発代表者：産業技術総合研究所 上級主任研究員 新家一男
4. 研究開発の成果

(1) 有用生合成遺伝子取得のための巨大ゲノムライブラリー調製技術の開発

放線菌が生産する代表的な医薬品はマクロライド系化合物と呼ばれる化合物群であり、抗菌剤の erythromycin、抗カビ剤の amphotericin B、免疫抑制剤である FK506、および駆虫薬であり 2015 年度のノーベル生理学・医学賞の受賞対象となった avermectin などが挙げられる。これらの化合物は、モジュールと呼ばれる単位（平均 6 kbp）の酵素群が繰り返された巨大遺伝子クラスター（化合物によっては 100 kbp を超える）によって生合成される。しかもその生合成遺伝子の取得には、モジュールの繰り返し配列のために短い DNA 断片を取得してつなぎ合わせる手法が使えない。そのため、巨大遺伝子クラスター全長を有するゲノムライブラリーの調製が必須となる。本事業では BAC（Bacterial Artificial Chromosome）と呼ばれるベクターを用いて巨大な生合成遺伝子クラスターの取得技術の開発を行った。一般的なレベルでは、およそ 100 kbp 前後のサイズの BAC ライブラリーの調製が限界であるが、本研究開発では、BAC ライブラリー調製プロトコール（全工程で、約 2 週間を要する）において種々の改良を行い、当初の目的であった 150 kbp を遙かに超える 200 kbp 超の BAC ライブラリーの調製法の開発に成功した。この開発に付随して、少ないゲノム量での BAC ライブラリー調製も可能になり、プロジェクト後半の目標であった、土壌等サンプルから直接ゲノムライブラリーを調製する、メタゲノム BAC ライブラリーの構築もできるようになった。実際に、メタゲノムサンプルからも、これまで世界で誰も達成していないような大きなサイズのメタゲノム BAC ライブラリーの調製に成功した。

(2) 巨大ゲノムライブラリーの導入を行うための、形質転換法およびホスト微生物の開発

放線菌巨大生合成遺伝子クラスター導入技術の開発では、外来遺伝子の異種発現用ホスト株として、avermectin 生産菌である *S. avermitilis* の工業生産株を親株とし、内在性の二次代謝産物生合成遺伝子をノックアウトすることにより外来生合成遺伝子による物質生産能を高めた SUKA 株を用いてきた。SUKA 株は、形質転換効率は低い、高い異種発現生産の成功率と高生産性を誇るホストとして確認されている。SUKA 株における形質転換効率の改善を図るため、*S. avermitilis* が保有する 200 kbp 超のゲノムを組み込むことが可能な、伝達性線状プラスミド SAP1 を利用した組み込みベクターを開発し、同時にホスト菌株の改良を行った。具体的には、BAC クローンを SAP1 に組み込み形質転換効率のよい *S. lividans* に導入し、次いで接合により SUKA へ導入する二段階形質転換法である。本手法の開発により、これまで SUKA 株へ直接導入することが出来なかった rapamycin の生合成遺伝子クラスターを SUKA 株に導入すること及び異種発現生産に成功した。

(3) 活性増強、体内動態改善を可能にする、複雑な微生物二次代謝産物の誘導体展開を可能にする技術開発

多様な化合物に最適化した異種発現ホストによる新規化合物の創製として、リボゾーマルペプチド合成経路 (RiPS) によって生合成される化合物の生合成遺伝子群を用いて簡便かつ効率良い発現が達成できるアミノ酸置換体の創製方法を確立した。具体的には、前駆体ペプチド配列において

化合物へと変換される領域の両末端に相同配列を持った人工的に遺伝子改変した断片を調製し、Gibson's assembleによって組み込むという画期的な手法の開発を行った。これにより、極めて効率的に、かつ安価に種々のアミノ酸置換が可能になった。本手法の開発は、化合物製造企業の事業へ大きく貢献した。

(4) 未利用生合成遺伝子および難培養微生物由来の生合成遺伝子を用いた異種発現生産技術の開発

本事業で行う技術開発の大きなアウトプット目標の一つは、未利用生合成遺伝子を用いた新奇化合物の創出と、これまで化合物量を確保出来なかったために開発が不可能だった海洋生物由来の天然化合物を、異種発現システムによって創出することにある。

本事業では、二年間で30個以上の未利用遺伝子クラスターを同定・取得し、異種発現生産を検証した。これらの未利用遺伝子クラスターの中には、インサートサイズが200 kbpを超えるものもあり、また生合成遺伝子クラスターサイズが170 kbpを超えるものもあった。これまでの生合成研究の中で、これほど巨大な遺伝子クラスターを用いた異種発現研究を行った例は無く、世界でも初めての試みである。遺伝子としては未報告である化合物も含め、26種類以上のクローンによる異種発現生産を確認することに成功した。本手法で創出した新奇化合物は、今後種々の創薬スクリーニングへ摘要されることが期待される。

海洋生物由来の生物活性天然化合物については、それらに共生する難培養微生物が生産していると考えられている。これまで、海洋生物中の真の生産者が同定された報告は少なく、異種発現の成功例は未だ無い。我々は、海洋生物中に共生する難培養微生物のモデルとして、群体ホヤに共生する *Prochloron* を対象に、細胞毒性物質の生合成遺伝子クラスターの取得および異種発現生産を検討した。*Prochloron* は群体ホヤに共生しているが、サンプルの処理法などの改良を行った。種々の改良を試みた結果、平均長70 kbp断片のBACライブラリーの調製には成功した。この中から、約60 kbp断片のインサートを持つBACクローンに、本群体ホヤから単離されている細胞毒性物質である patellamide 類縁体の生合成遺伝子を見出した。

(5) 微生物二次代謝産物生産メカニズムの解明とゲノム改変による異種発現生産誘導技術の開発

これまでの異種発現試験の結果、およそ7割の成功率で化合物異種発現生産に成功しているが、残り3割のうち、有用な化合物候補が幾つか含まれていた。また、未利用生合成遺伝子を用いた異種発現生産では、およそ2割のクローンしか化合物の異種発現生産に至っていない。そこで、これらの異種発現生産が困難な化合物を対象に、種々のゲノム改変による、生産性誘導および高生産化技術の確立を目指した。

まず微生物二次代謝生合成遺伝子クラスターの活性化手法として、経路特異的転写制御因子の発現誘導を検討したが、汎用手法としては第一選択ではないという結論に至った。そこで各種プロモーターの影響に関して検討を行ったところ、ある種の条件下で遺伝子の発現を促進するプロモーター群を見出した。これらのプロモーターを遺伝子クラスターの上流に直接導入する手法により、telomestatin 生合成遺伝子クラスターの異種発現生産に世界で初めて達成した。この成果を発展させるために、異なる向きの2つの転写単位で制御される未知の生合成遺伝子クラスターに着目し、双方向の培養後期発現プロモーター導入を検討した結果、異種発現生産を増強できることを確認した。