

生合成遺伝子クラスターの高度強制発現による 合成生物学が拓く有用天然物の創製

中沢 威人・恒松 雄太・石川 格靖・渡辺 賢二*

これまでさまざまな生物種から膨大な数の天然物が単離・構造決定され、その中から多数の医薬品や農薬が生み出され有効利用されてきた。今後も次々と新規有用天然物が発見されることに期待が寄せられている。しかしながら、現状では新規天然物の獲得がますます難しくなってきている。その理由としては、(1) 長い歴史の中で数多くの天然物が探索され、すでに発見されてしまったこと、(2) 採集できる生物、培養できる微生物は限られた一部の種であることから、これらが化合物多様性の限界となっていることなどが挙げられる。最近の研究開発によって難培養微生物の培養技術も着々と向上しつつある一方で、新規天然物を獲得するためのこういったアプローチは決して真新しいものではなく、どちらかと言えば伝統的な天然物化学の研究手法であると言える。

近年のゲノム解析の目覚ましい進展によって、多くの生物の遺伝子情報を容易に手に入れられるようになった。これらの情報およびこれまでの糸状菌に関する分子生物学的研究結果から、実験室における一般的な糸状菌の培養法では糸状菌の二次代謝産物生合成遺伝子の転写活性は低いことが明らかとなった。実際に糸状菌 *Aspergillus flavus* では、55種類の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが染色体上にコードされていることが示されているが、生成物である天然物が単離され生合成経路が明らかとなっているは3種類のみである。また、特定の培養条件に限られるが本菌種のトランスクリプトーム解析の結果からも、二次代謝産物の生合成を司る遺伝子群の転写活性が低いことも示唆されている。つまり、糸状菌のゲノム上に生合成遺伝子はコードされているが、天然物として生産を確認できない化合物が多数存在すると考えられる。そこで筆者らは、糸状菌が持つ潜在的な二次代謝産物生合成能力を活用することで、新規天然物の創製および得られる化合物の生合成機構の精密解析が可能となれば天然物化学に新しい方法論を付け加えられると考えた。しかしながら、遺伝子クラスターの転写活性が極めて低い場合、その生合成遺伝子のmRNAを単離しcDNAを合成することは困難である。そこで、転写されていないと推定される目的生合成遺伝子の転写因子を糸状菌菌体内で発現できれば、転写活性を増大

させることができるのでないかと考えた。転写活性を増大させることができれば、新規化合物の単離へと繋がる。さらに、目的生合成遺伝子のcDNAを獲得することができるようになり、続いて遺伝子工学的な異種発現システムの確立された出芽酵母を用い、精製酵素による *in vitro* 合成系で新規化合物の生合成に関する精密機能解析も達成されるであろう。このように機能未知遺伝子クラスターによって生合成される化合物の化学構造を決定することができれば、さらに多くの天然物の生合成機構を解明することに繋がると考えられる。

現代においても新たな新規天然物を取得することの学術的、産業的な重要性は不变である。このような状況の下、天然物の生合成遺伝子を用い新規天然物の獲得を目指す、新しい融合研究分野である「シンセティックバイオロジー（合成生物学）」による取り組みが行われはじめた。本稿では、休眠型生合成遺伝子クラスターの活性化および天然物生合成遺伝子の出芽酵母を用いた異種発現系による新規天然物生産と生合成機能解析への挑戦について解説する。

不活性（休眠）型生合成遺伝子の活性化

二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの構造 二次代謝産物の生合成には、多数の酵素による触媒反応が関わっている場合がほとんどである。糸状菌では原則として、ある一つの二次代謝産物の生合成に関わるすべての酵素の遺伝子は、ゲノム上に群（クラスター）を形成して配置されている。近年の糸状菌ゲノム解読の結果、特に子のう菌類のゲノム上には、今までに単離してきた化合物の種類よりも遙かに多くの生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかとなってきた。文献¹⁾および筆者らが行った最近の研究結果（未発表）からは、大部分（6割以上）のクラスターの転写発現は、通常の研究室における培養条件では不活性化されていることが明らかとなった。

遺伝子操作による活性化 そのような不活性型クラスターを人為的に活性化させて生合成産物を得る個々の手法に関しての解説は、本稿引用文献2)を参考にして頂きたい。活性化の手法は、大きく2つに分類できる。

*著者紹介 静岡県立大学大学院薬学研究科薬学専攻（准教授）

E-mail: kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp

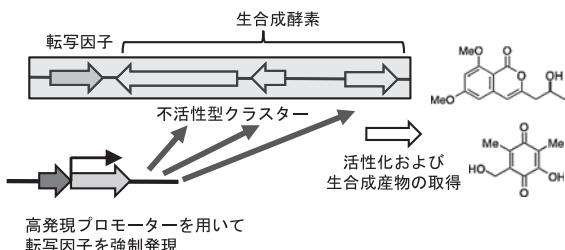


図1. 特定の狙った休眠型生合成遺伝子クラスターの活性化実験概略図

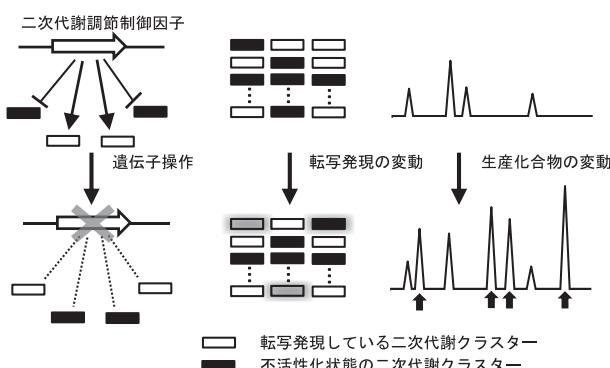


図2. 不特定多数の休眠型生合成遺伝子クラスターの網羅的活性化実験の概略図

一つは、ある特定のクラスターを狙って活性化させる方法である。たとえば筆者らが行ったこととして、*Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *Chaetomium globosum*などの糸状菌の不活性型クラスター内に存在する転写因子を強制発現させることにより、そのクラスターを活性化させ、生合成産物の獲得を行った(図1)。

二つ目は、不特定多数のクラスターを一挙に活性化させる手法である(図2)。光受容シグナルの下流で働くLaeA³⁾および、それと協調して機能するvelvet複合体の構成因子⁴⁾をコードする遺伝子の破壊および強制的高発現によって、幅広い糸状菌において二次代謝産物生合成量の変動および未知代謝物の生産が報告されている⁵⁾。また、ヒストン修飾およびクロマチン構造変換に関与する遺伝子を操作することでも同様の結果が得られている⁶⁾。

遺伝子操作によらない活性化 一方で遺伝子操作を行わずに不活性型クラスターを活性化させ、生合成産物の獲得に成功した例も報告されている^{7,8)}。これらは、不活性化は“エピジェネティック制御”が主な要因であることに着目し、そういう制御を抑制させることで達成された。すなわち、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤およびDNAメチル化酵素阻害剤という低分子化合物を糸状菌に投与することで、不活性型クラスターが生合成

する多数の二次代謝産物の生産を可能とした。

糸状菌由来微量天然物の酵母宿主系による生産

スピロトリプロスタチン類の生物合成 次に糸状菌*Aspergillus fumigatus*が産生する超微量成分スピロトリプロスタチンの生物全合成を目指した筆者らの研究を紹介する。

スピロトリプロスタチン類は静岡県大井沖海底土壤より分離された糸状菌*A. fumigatus* BM939株より発見された化合物である⁹⁾。同糸状菌をはじめとした*Aspergillus*属や近種である*Penicillium*属糸状菌からはスピロトリプロスタチンと同様にトリプトファンとプロリンからなるジケトピペラジン骨格を有した数多くの類縁化合物が発見されており、これらの化合物は5員環もしくは6員環が4ないし5つ連続した共通骨格を有している。その生物活性としては、動物細胞に対する細胞周期阻害活性などが知られており、特に近年では、フミトレモルジンCが乳がん細胞に特異的に過剰発現している薬剤耐性膜タンパク質BCRPを阻害することが明らかとなり、新たな抗がん化学療法剤の候補として注目されている¹⁰⁾。

スピロトリプロスタチンAおよびBは*A. fumigatus*の約400 lもの培養液中からそれぞれ、1.2 mgおよび11 mg程度しか得られない超微量成分である。有望な薬剤リード化合物の候補であるにも関わらず、さらなる詳細な生物活性の評価を行うには化合物量が絶対的に不足している。その興味深い生物活性と特徴的なスピロ環構造から、多くの合成化学者の興味を引き、それぞれの研究グループにおいて各種独創的な方法論に基づく全合成が達成してきた¹¹⁾。しかしながら、効率的な化合物供給に関して言えば、合成にかかる労力と時間、費用の観点から十分といえる合成ルートが開発されたとは言い難い。そこで筆者らは、スピロトリプロスタチン生合成に関与する遺伝子を取得し、出芽酵母を用いた異種宿主による発現系にてスピロトリプロスタチン生合成経路を再構築することで生物による*de novo*全合成をおこない、本化合物の効率的な供給を目指すとともに、その特徴的なスピロ環構造の形成機構を解明することを目的とした。超微量成分の生合成機構の解明は非常に挑戦的な課題となる。これまでの生合成研究では、化合物生産を司ると推定された生合成遺伝子を欠損させ、得られた変異体の培養液から単離された生合成中間体の化学構造に基づいてその生合成経路を解析する手法がほとんどであった。ところが、超微量成分を研究対象とした場合、目的化合物が微量成分であるため、遺伝子変異体から生合成中間

体を単離することが格段に困難となる。したがって、その生合成経路を証明するためには生合成遺伝子の発現による物質生産確認が最適であると考えられる。また、異種発現による天然物生合成経路の特定は、欠損株の作製により得られた実験結果と比較して明確であり、学術的に意義深い成果となる可能性が高い。つまり、二次代謝産物に関して言えば異種発現では、宿主となる菌株には多くの場合存在しない生合成遺伝子の導入を試みることになる。したがって、そこで得られる化合物は、導入された遺伝子による合成産物であることが直接的に証明される。さらに、異種発現ではいったん目的の生合成遺伝子をクローニングし発現系を構築するための分子生物学的操作が必要不可欠となる。そこで得られた発現系を活用し、化合物の合理的な設計に基づき生合成遺伝子を改変した後、望む誘導体を合成するための実験を効率的かつ迅速に行うことができる。

スピロトリプロスタチンの類縁化合物であるトリプロスタチン類、フミトレモルジン類、ベルクローゲンの生合成については、いくつかのグループにより多くの遺伝子の機能が明らかにされている¹²⁾。それによると、これらの化合物のトリプトファンとプロリンからなるジケト

ピペラジン骨格は非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) であるFtmAにより構築されブレビアナミドFを合成し、さらにプレニル基転移酵素(FtmB)によりトリプロスタチンBが、続いてシトクロムP450酵素(FtmC)およびメチル基転移酵素(FtmD)が働くことでトリプロスタチンAが生成する(図3)。続いて、シトクロムP450酵素(FtmE)によりインドール環とジケトピペラジン環が縮環しフミトレモルジンCを生成し、もう一つ別のシトクロムP450酵素(FtmG)が働くことで12 α ,13 α -ジヒドロキシフミトレモルジンCが、さらにプレニル基転移酵素(FtmH)が働くことでフミトレモルジンBが生成する。最後に α -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ(FtmF)が働くことでベルクローゲンが生成する。このように、主骨格を形成する一つのNRPS酵素と多くの種類の修飾酵素が働くことで、数多くの関連化合物が生産されているトリプロスタチン類であるが、ほぼすべての生合成遺伝子の機能解析が行われているにも関わらず、スピロトリプロスタチン類に至る生合成経路やスピロ環形成に関与する生合成遺伝子については同定されていなかった。そこで、まずは出芽酵母によりスピロトリプロ

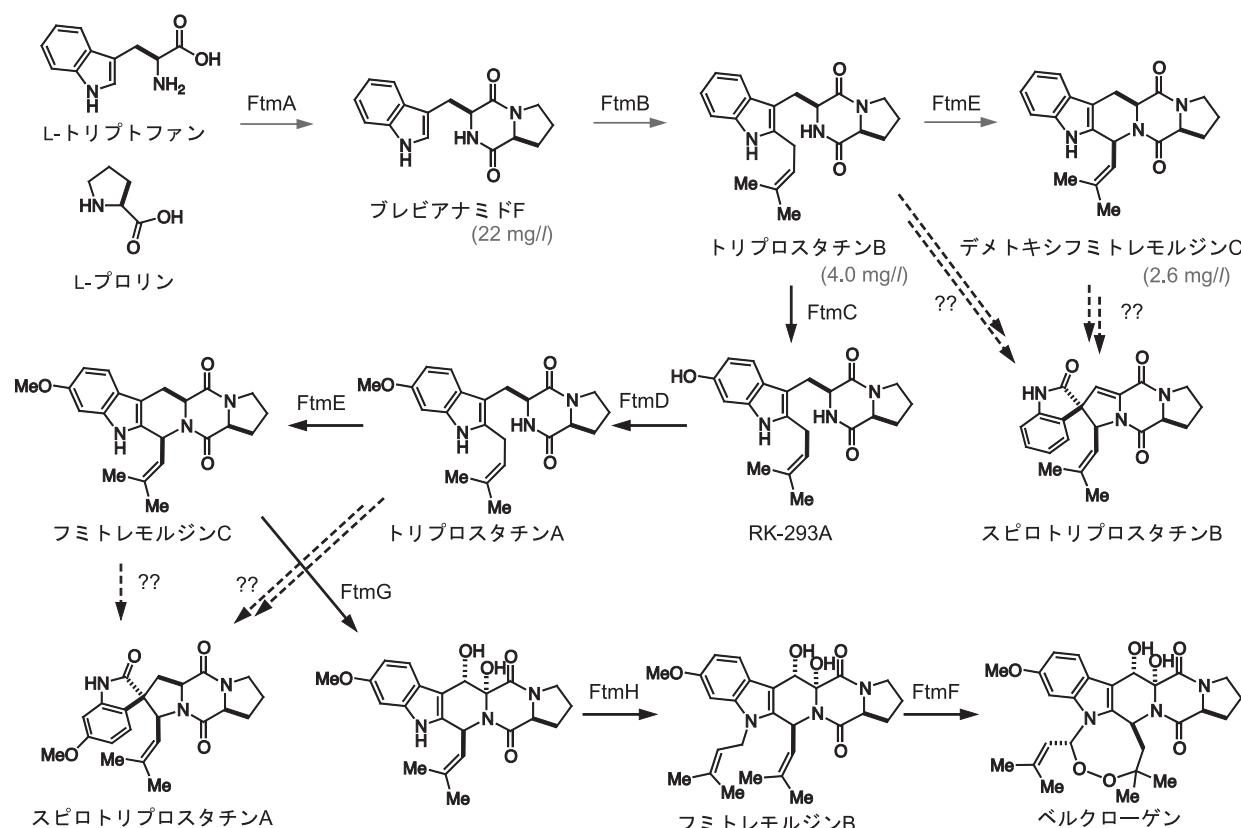


図3. スピロトリプロスタチン類の推定生合成経路

スタチン類の推定前駆体を生産させるシステムを構築することとし、その候補化合物としてデメトキシフミトレモルジンCの生産を検討した。デメトキシフミトレモルジンCを合成する遺伝子は、*A. fumigatus* IFO4057株のゲノムDNAからクローニングし、自律複製可能な出芽酵母用シャトルベクターへ導入し目的の発現ベクターを構築した。導入した合成遺伝子群は、*ftmA*, *ftmB*, *ftmC*（遺伝子名は長田らによる*A. fumigatus* BM939株の命名¹³⁾に準拠した）であり、それぞれ酵素の機能はNRPS、プレニル基転移酵素およびシトクロムP450である。また、合成遺伝子群に含まれるシトクロムP450酵素活性の効率的な再生のため、出芽酵母由来NADPH-シトクロムP450還元酵素遺伝子(*NCPI*)を合わせて導入した。上記プラスミドを用い目的化合物を出芽酵母発現系で高収量にて合成するために、宿主染色体中に基質供給系遺伝子群を導入することとした。まずは、NRPSが適切にホロ化されるよう、*A. nidulans*由来ホスホパンテニル基転移酵素遺伝子(*npgA*)を導入し、一方でプレニル基を大量に供給するため、メバロン酸経路の初期段階であるマロン酸を基質としてマロニル-CoAを合成する酵素遺伝子(*MatB*)を酵母染色体へ挿入した出芽酵母株SCKW5を作成した。上記で示したベクターおよび染色体に導入された遺伝子は、ウエスタンブロッティングによってそれぞれ酵母細胞内で発現することが確認された。続いて、酵母宿主SCKW5を上記で構築した適切な発現ベクターで形質転換した後、液体培養によって2%ガラクトースを加え30°Cで発現誘導し、得られた培養液から各種クロマトグラフィーによって目的化合物を分離精製した。その結果、プレビアナミドFを22 mg/l、トリプロスタチンBを4.0 mg/l、デメトキシフミトレモルジンCを2.6 mg/lの収量にて得ることに成功した。スピロトリプロスタチン類を高収量で得るために、今後さらなる遺伝子導入や培養条件の検討が必要である。

まとめ

上記の研究は生物を利用したモノづくりであり、依然として有機合成による精密なモノづくりには至らない部分も多いが、場合によっては有機合成で必須な煩雑な反応操作や極度の強酸・塩基性、酸化・還元条件、高価な基質や金属触媒などのレアメタルを必要とすることなく、単純な糖類を加えた培養液を振とう培養するだけでの目的の化合物を得ることが可能である。加えて、基質認識能の高い生体酵素でさえ、その基質特異性を拡大するような変異を導入するなどして、より柔軟に変換反応が達成されるように進化させれば、新たな化合物を創製することも期待できる。

文 献

- 1) Georgianna, D. R. *et al.*: *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 213 (2010).
- 2) Brakhage, A. A. and Schroeckh, V.: *Fungal Genet. Biol.*, **48**, 15 (2011).
- 3) Bok, J. W. and Keller, N. P.: *Euk. Cell*, **3**, 527 (2004).
- 4) Kim, H. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **37**, 72 (2002).
- 5) Bayram, Ö. and Braus, G. H.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **36**, 1 (2012).
- 6) Bok, J. W. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 462 (2009).
- 7) Shwab, E. K. *et al.*: *Euk. Cell*, **6**, 1656 (2007).
- 8) Cichewicz, R. H.: *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 11 (2010).
- 9) Cui, C.-B. *et al.*: *Tetrahedron*, **52**, 12651 (1996).
- 10) Allen, J. D. *et al.*: *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 417 (2002).
- 11) Edmondson, S. D. and Danishefsky, S. J.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1138 (1998).
- 12) Li, S.-M.: *J. Antibiot.*, **64**, 45 (2011).
- 13) 鈴木宏和ら：第50回天然有機化合物討論会講演要旨集、p. 137 (2008).