

微生物が生産する生理活性物質研究—生物工学的観点から—

大利 徹

はじめに

日本においては、古くから製薬企業を中心に微生物が生産する多くの天然生理活性物質が単離され実用に供されてきた。その代表例が、北里大学特別荣誉教授の大村智先生が発見されたイベルメクチンであり、その功績により2015年ノーベル生理学・医学賞をご受賞されたことは誠に喜ばしく心よりお祝い申し上げたい。近年多くの製薬会社が天然生理活性物質の探索研究から縮小・撤退する傾向にあることから、今回の大村先生のご受賞が天然生理活性物質に再度目を向ける契機になることを期待したい。本記念稿では、微生物が生産する天然生理活性物質に関して、最近の研究動向と工学的観点からの筆者の研究事例を紹介したい。

「生合成マシナリー」と「分子標的と活性制御」

多様な構造と有用な活性を持つ天然生理活性物質を単離するために、古くから微生物学者が稀少な放線菌や糸状菌を探索する系を独自に考案しスクリーニングに用いてきた。また製薬会社では、より有効な化合物を比較的簡易な方法で評価できるアッセイ系を独自に開発してきた。その結果、複雑で多岐にわたる構造と特異的活性を持つ多くの生理活性物質が単離され上市に至った。また、この構造の複雑さは有機合成化学者の興味を引き、全合成を達成した多くの報告がなされてきた。さらに彼らは、天然生理活性物質の欠点を補うための誘導體(半合成品)の開発も行ってきた。このように、天然生理活性物質の研究分野は、微生物学分野、医薬学分野、有機化学分野がリードしてきた。現在においても、これらの研究分野では精力的な研究が行われているが、本稿では生物工学に関連ある分野について言及したい。

筆者は、微生物生化学を専門とし、民間会社と大学で30年以上、放線菌やカビが生産する天然生理活性物質の生合成研究を行ってきた。しかし、筆者を含む多くの本分野の研究者は、古典遺伝学を駆使した地道な手法による生産性向上に関しては成果を上げてきたものの、上述した他の分野の研究者に比べると天然生理活性物質の研究における貢献は小さかった。たとえば、アミノ酸など一次代謝産物の生産性向上のための有力な手法となっ

た、生合成遺伝子の増幅や転写制御因子の改変技術に関しても、実用化レベルで二次代謝産物の生産性改善に応用された事例は筆者の知る限りない。また個々の生合成酵素が触媒する反応について、組換え酵素を用いた諸性質の解析も行われてきたが、生合成反応を統一的に理解し応用研究に適用するにはほど遠い状況が続いていた。

しかし微生物生化学を専門とする研究者にとって転機となったのは、(1) 2002年に放線菌 *Streptomyces coelicolor*¹⁾、2003年に *Streptomyces avermitilis*²⁾、2005年に麴菌³⁾のゲノム解析が報告されたこと、さらに、(2) その後の技術革新により、現在では安価で短期間に個々の微生物のドラフトゲノムが入手可能になったことがあげられる。少なくとも天然生理活性物質を生合成するための設計図を比較的容易に得ることができるようになったのである。しかしながら、設計図を読み解き自在に使いこなすには、膨大な配列の中から目的遺伝子を探索する生物情報学分野、個々の遺伝子の機能を調べるための遺伝子破壊実験や組換え酵素を用いた機能解析を行う遺伝学・生化学分野、有用天然生理活性物質の実生産に向けたプラットフォーム開発のため応用微生物学分野すべての知識および技術が必要であり、個々の研究者がすべてをカバーすることができなくなった。このような背景の下、2010年度から2014年度まで、北海道大学大学院理学研究院の及川英秋教授を領域代表とした、科研費新学術領域「生合成マシナリー」が実施され、上記の異なる分野の研究者が結集し、設計図を紐解く研究が精力的に行われ、天然生理活性物質の複雑多岐にわたる構造がどのように酵素により組み立てられるかの理解が進んだ⁴⁾。今後は、これら知見を活用し、酵素の特異性改変や、それらを組み合わせることによる自在な新規生理活性物質の創生法の確立が期待される。

また、天然生理活性物質は「活性」という文字を含むことから明らかなように、ヒトの体内では特異的な標的タンパク質と結合することにより生物活性を示す。これまで得られた天然生理活性物質は、動物細胞などを用いたスクリーニングで得られた化合物も多く、真のターゲットタンパク質が不明である場合も多かった。したがって、得られた化合物が副作用も併せ持つ場合も多い。そこで、天然生理活性を有する化合物の真の標的タンパ

ク質同定および相互作用解析, さらに単純で高活性化化合物を用いた生物機能制御を目指して, 2011年から2015年度まで, 東北大学大学院理学研究科の上田実教授を領域代表とした, 科研費新学術領域「分子標的と活性制御」という研究領域も展開され多くの成果が得られた⁵⁾。

このようにアカデミアにおいては, 再び天然生理活性物質に着目した研究が, 専門を異にする研究者が集結・組織され活発化している。今後も上記2領域が両輪となって本分野が一層発展していくことを期待したい。

天然生理活性物質のライブラリー化

新規で有用な天然生理活性物質を同定・開発するには, 大村先生のご研究のように微生物を単離するところから行うのが王道である。しかし, 菌株の管理, 化合物の単離と構造解析, 生物活性試験をすべて一から行うには膨大な費用と手間がかかる。そこで近年, これらを軽減する試みも始まっている。理化学研究所では, 天然物の収集と保管, 機器分析スペクトルなどをデータベース化し, これらを提供するシステムの構築が精力的に行われてきている⁶⁾。また産業界では, 近年, 個々の会社が持つ天然生理活性物質をライブラリー化し共有する試みがなされ, 25社と3機関の参画により, 「次世代天然物化学技術研究組合」が設立され⁷⁾, 天然生理活性物質ライブラリーの相互利用による最大限の活用が図られている。このように多様な天然化合物にアクセスできる環境が整ってきていることから, 近い将来にイベルメクチンのような画期的医薬品が開発されることを期待したい。

工学的アプローチによる研究例

筆者は, 工学部に所属し微生物生化学を専門とするが, 天然有機化合物討論会などで有機合成を専門とする方と話す機会も多く, そこから始まった天然生理活性物質の実用化に向けた共同研究について紹介したい。

糸状菌が生産するジテルペン配糖体であるコチレニンは, 分化誘導活性を基盤とし, 新規作用機序による良質の抗がん剤としてきわめて有望であったが, その産生菌体が継代培養の過程で絶え供給不可能となった。そこで大阪大学・産業科学研究所・加藤修雄教授は, コチレニンの構造類似体であるフシコクシン A (FC A(1), 図1) を用いて構造活性相関試験を行った結果, FCの12位の水酸基を除去した化合物がコチレニン様活性を有することを見いだした。そこで, フシコクシン産生菌 *Phomopsis amygdali* 染色体上の12位水酸化酵素遺伝子を同定・破壊することで, 直接分化誘導活性を有するフシコクシン類縁体を生産する変異株を取得することを最終目的に共同研究を行った。

最初に, 山形大学農学部の豊増知伸教授らがFC産生菌からPCRで取得した, FCの基本骨格フシコッカジエン (FD (2), 図1) を生成する環化酵素遺伝子 (ORF1) の近傍に関連遺伝子が存在するか検討した。当時, 糸状菌が生産する天然物の生合成遺伝子が染色体上でクラスターを成しているか否かの知見はほとんどなかったが, ジオキシゲナーゼ (ORF2), P450 (ORF3), 還元酵素 (ORF4) の合計四つからなるクラスターを同定できた。

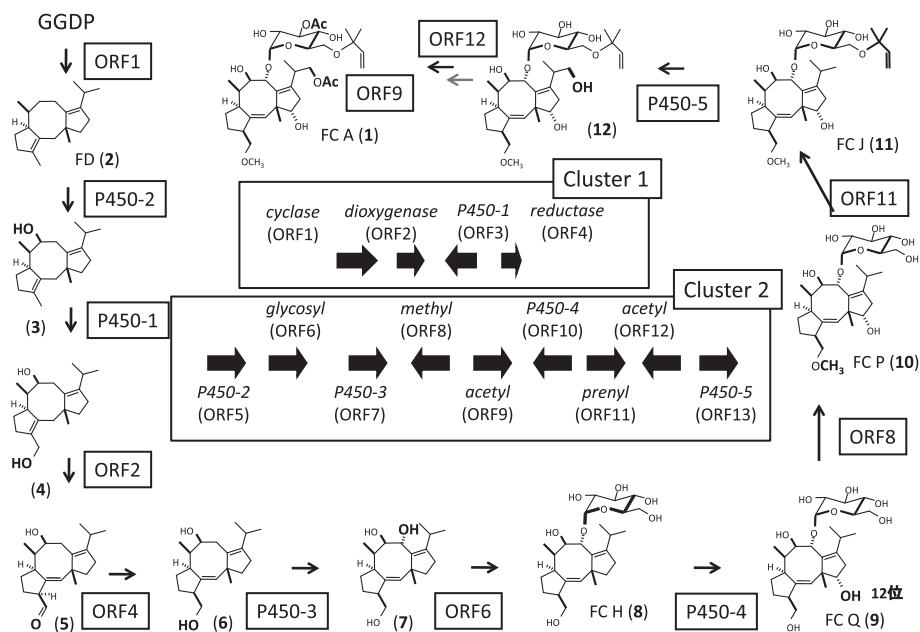


図1. フシコクシン生合成経路と生合成遺伝子クラスター

しかし他の生合成遺伝子は存在しなかった(クラスター1, 図1).

そこでFC生産菌のドラフトゲノム解析を行った. その結果, 約21 KbのDNA断片内に, 四つのP450遺伝子(P450-2 (ORF5), P450-3 (ORF7), P450-4 (ORF10), P450-5 (ORF13)), 糖転移 (ORF6), メチル基転移 (ORF8), アセチル基転移二つ (ORF9とORF12), プレニル基転移遺伝子 (ORF11) の合計9個の遺伝子からなる推定生合成遺伝子クラスターを同定できた(クラスター2, 図1).

おそらく, 見いだした五つのP450遺伝子のいずれかが12位の水酸化に関与すると推定されたため, 機能解析を試みた. 当初, 大腸菌を用いた組換え酵素の調製を試みたが, 糸状菌のP450は膜酵素であり, 発現不可能であった. また, 膜貫通領域を欠失させた酵素も構築したがまったく活性を検出できなかった. そこで, FCの基本骨格を生成する酵素遺伝子 (ORF1), P450遺伝子, およびP450レダクターゼ遺伝子を出芽酵母のミクロソームで共発現させ, 生成する代謝産物を構造解析する方法, あるいはP450遺伝子とP450レダクターゼ遺伝子を発現させて酵素源に用いる *in vitro* アッセイで機能解析を試みた. その結果, P450-2 (ORF5) が(2)の8位を水酸化し(3)を生成し, ついでP450-1 (ORF3) が16位を水酸化し(4)が生成することを明らかにした. 生成した(4)は, ジオキシゲナーゼ (ORF2) によりアルデヒド体(5)へ変換され, ただちに還元酵素 (ORF4) により(6)へ再還元された(一連の反応で2, 3位の二重結

合が1, 2位へ移動する). さらに(6)は, P450-3 (ORF7) により9位が水酸化された(7)に変換された. したがって, 残るP450-4 (ORF10) あるいはP450-5 (ORF13) のいずれかが12位の水酸化を触媒すると考えられた. しかし, 残る二つのP450に関しては同様の手法で活性検出できなかったため, 相同組換えによる遺伝子破壊を行った結果, P450-5 (ORF13) 破壊株はFC J (11)を蓄積し, P450-4 (ORF10) 破壊株は12位が水酸化されないFC H (8)を蓄積した. 両中間体の生産性は良好であり, たとえば後者の場合, 野生株が生産する(1)以上の生産性が認められ, 他のFC関連化合物の副生もほとんど見られなかった(図2, 95%以上). FC H (8)からは, コチレニンと同等以上の活性を有する誘導体が比較的容易に合成できることから当初の目標を達成することができた⁸⁾. 今回行ったように, 半合成に有利な中間体の直接発酵生産菌の育種, あるいは機能解明された酵素遺伝子に関連化合物生産菌に導入することによる最終生成物の構造改変は, 生物工学にかかわる研究者にとって得意な分野であり, 今後も本領域に貢献できる機会も多々あると思われる.

おわりに

これまで多くの微生物起源の薬剤が上市されてきたにもかかわらず, 最近は多くの企業が本分野から撤退あるいは規模縮小したと報道されている. 実際, ヒトの疾患については, 抗体医薬やiPS細胞を用いた新しい技術による治療法が注目されている. しかし, これまで実用化されている6-7割の薬剤は微生物代謝産物関連化合物であること, さらに結核菌や多剤耐性菌に代表されるように, 新規な作用を持つ抗菌剤はいまだに必要不可欠であることから, 大村先生のご受賞を契機に今後再び微生物起源の天然生理活性物質研究が活発化することを期待したい.

文献

- 1) Bentley, S. D. *et al.*: *Nature*, **417**, 141 (2002).
- 2) Ikeda, H. *et al.*: *Nat. Biotech.*, **21**, 526 (2003).
- 3) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 4) 生合成マシナリー: <http://machinery.sci.hokudai.ac.jp/machinery/> (2016/01/29).
- 5) 天然物ケミカルバイオロジー: <http://chembiochem.jp/outline/> (2016/01/29).
- 6) 理化学研究所化合物バンク: <http://www.npd.riken.jp/npd/ja/> (2016/01/29).
- 7) 次世代天然物化学技術研究組合: <http://www.natprodchem.jp/> (2016/01/29).
- 8) Noike, M. *et al.*: *PLoS ONE*, **7**: e42090 (2012).

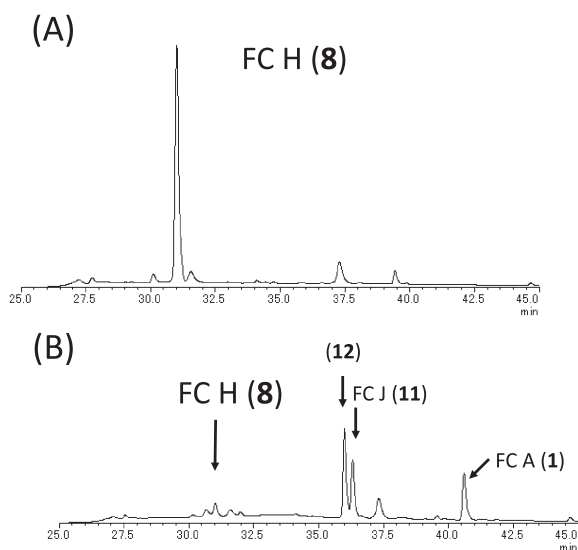


図2. P450-4 (ORF10) 破壊株 (A) と野生株 (B) の培養液のHPLC分析チャート