

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18888

研究課題名(和文)抗トリパノソーマ活性物質actinoallolideの遺伝子操作による類縁体合成

研究課題名(英文)Biosynthesis of actinoallolide analogs by genetic manipulation

研究代表者

稲橋 佑起 (Yuki, Inahashi)

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号：70645522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌*Actinoallomurus fulvus* K09-0307が生産する抗トリパノソーマ活性物質actinoallolideの生合成遺伝子を遺伝子操作により改変させることで、抗トリパノソーマ原虫薬として発展可能なactinoallolide類縁体の合成を目的に研究を行った。K09-0307株のゲノムシーケンスよりactinoallolide生合成遺伝子クラスターを同定し、本遺伝子クラスターをベクターにクローニングすることにより、異種発現に成功した。この結果より、ベクター上で遺伝子操作が可能となり、生合成遺伝子改変による類縁体合成の基盤が構築された。

研究成果の概要(英文)：Actinoallolides are anti-trypanosomal macrolides isolated from the endophytic actinomycetes, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036 and K09-0307. A putative actinoallolide biosynthetic gene cluster was predicted from the genome sequence of the strain K09-0307. The gene cluster was assembled in a BAC vector using Gibson Assembly and *ermE** promoter was inserted upstream from the start codon of the polyketide synthase gene. The resulting vector is introduced into *S. coelicolor* M1152. Subsequent LC/MS analysis identified actinoallolide A in the culture broth. Thus, the heterologous expression system for actinoallolide biosynthetic gene cluster was established and it could be used for genetic modification of the gene cluster to synthesis new actinoallolide analogs.

研究分野：微生物薬品化学

キーワード：actinoallolide heterologous expression trypanosoma

1. 研究開始当初の背景

アフリカ睡眠病およびシャーガス病はそれぞれアフリカおよびラテンアメリカの風土病であり、トリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma brucei* および *Trypanosoma cruzi*) の感染によって発症する感染症である。アフリカ睡眠病による年間死亡者数は 1 万 8 千人と推定され、年間感染者数は減少傾向にあるが、既存の治療薬はいずれも副作用が強いこと、耐性原虫が出現していることが問題となっている。一方、シャーガス病の感染者数は年間 7~8 万人 (年間死亡者数 8 千人) と推定されている。シャーガス病の治療薬は 2 種類のみで、いずれも強い副作用や耐性原虫の出現が問題となっている。トリパノソーマ原虫感染症の治療薬は製薬企業にとって採算の合う市場とならないため新薬開発が行われず、現在も 40 年以上前に開発された薬が使用されている。感染患者の治療の質を向上させ、さらなる感染拡大を防ぐために「安全」で「効果的」、「経口投与可能」、「耐性原虫に有効」な薬の開発が早急に求められている。

Actinoallolide A は放線菌 *Actinoallomurus fulvus* MK10-036 および *A. fulvus* K09-0307 が生産する 12 員環マクロライドであり、*in vitro* において既存の治療薬に匹敵する活性を示す一方、細胞毒性を示さず、選択的に優れている抗トリパノソーマ原虫活性物質である (図 1) (Inahashi Y., *et al. Org. Lett.* 17: 864-867, 2015)。しかしながら、トリパノソーマ原虫感染マウスを用いた *in vivo* 実験では actinoallolide A の活性が認められず、薬物代謝実験により actinoallolide A は肝ミクロソームで速やかに代謝されることが明らかとなった。

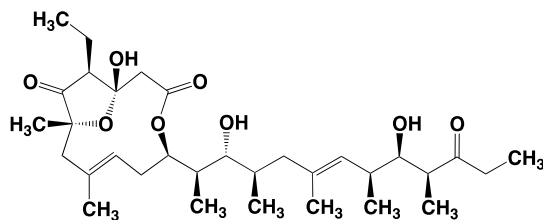


図 1. Actinoallolide A の構造

2. 研究の目的

本研究では、*A. fulvus* K09-0307 のゲノムより actinoallolide 生合成遺伝子クラスターを同定するとともに、その生合成遺伝子を改変させることで、肝ミクロソームでの代謝を抑え、抗トリパノソーマ原虫薬として発展可能な actinoallolide 類縁体を合成することを目指した。

3. 研究の方法

(1) Actinoallolide 生合成遺伝子クラスターの推定

A. fulvus K09-0307 のドラフトゲノムシーケンシングを antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) 等の生合成遺伝子クラスター探索ツールを用いて解析することより、actinoallolide 生合成遺伝子クラスターを推定する。

(2) *A. fulvus* K09-0307 の遺伝子操作

A. fulvus K09-0307 を用いて、推定した actinoallolide 生合成遺伝子を相同組換えにより欠損させる。生合成遺伝子欠損株において actinoallolide が生産されなくなることを確認することで、actinoallolide 生合成遺伝子クラスターを確定させる。

(3) Actinoallolide 生合成遺伝子クラスターの異種発現

A. fulvus K09-0307 の遺伝子操作が困難な場合は、遺伝子クラスターをプラスミド上にクローニングし、異種発現用宿主である *Streptomyces* 属放線菌に導入させる。遺伝子クラスター導入株を用いて異種発現を行い、actinoallolide の生産を確認することで、actinoallolide 生合成遺伝子クラスターを確定させる。

(4) 生合成遺伝子の改変

ポリケチド合成酵素 (PKS) のアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメインを改変し、エステル結合近傍の側鎖を伸長させることにより、エステルの加水分解が受けにくい類縁体を作り出す。

4. 研究成果

(1) Actinoallolide 生合成遺伝子クラスターの推定

Actinoallolide は erythromycin 等のマクロライド化合物と同様に I 型 PKS によりマロニル CoA やメチルマロニル CoA を基質として合成されることが推測されたため、*A. fulvus* K09-0307 のドラフトゲノムシーケンシングを antiSMASH で解析した結果、I 型 PKS を含む遺伝子クラスターを actinoallolide 生合成遺伝子クラスターとして推定した。本遺伝子クラスターは 53 kb のサイズを有し、クロトニル CoA レダクターゼ、PKS、シトクロム P450、アシル CoA デヒドロゲナーゼおよび TetR family 転写制御因子をコードする遺伝子が含まれていた (図 2)。

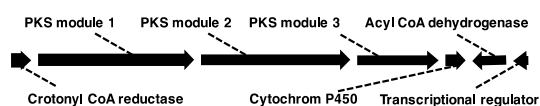


図 2. Actinoallolide 推定生合成遺伝子クラスター

(2) *A. fulvus* K09-0307 の遺伝子操作

Actinoallolide 生合成遺伝子クラスターの同定のため、相同組換えによる生合成遺伝子の欠損を試みた。接合伝達法およびプロトプラスト法 (Kieser T. *et al.* Practical *Streptomyces* genetics, 2000) を用いて *A. fulvus* K09-0307 へのプラスミド導入を試みたが、いずれの方法も成功せず、*A. fulvus* K09-0307 の遺伝子操作は困難であると判断した。

(3) Actinoallolide 生合成遺伝子クラスターの異種発現

A. fulvus K09-0307 の遺伝子操作が困難であったため、推定された actinoallolide 生合成遺伝子クラスターをクローニングし、*Streptomyces* 属放線菌にて異種発現させることを試みた。

A. fulvus K09-0307 のゲノム DNA よりコスミドライブラリーを作製した。本遺伝子クラスターの上流領域 (約 200 bp)、中流領域 (約 500 bp) および下流領域 (約 600 bp) を特異的に増幅させるプライマーを用いて、PCR によりコスミドライブラリーから本遺伝子クラスターの探索を行った結果、本遺伝子クラスターの上流から中流領域 27 kb を含むコスミド (2D5) および中流から下流領域 35 kb を含むコスミド (5C5) を取得した。

取得したコスミドを Gibson Assembly (Gibson *et al.* *Nat. Methods.* 6: 343-347, 2009) を用いて BAC ベクター上に繋ぎ合わせることとした。コスミド 2D5 を XhoI で消化することで 14 kb のフラグメント A (上流-中流領域) を得た。コスミド 5D5 を BstBI および SpeI で消化することで 31 kb のフラグメント B (中流-下流領域) を得た。コスミド 5D5 を BstBI で消化することで 11 kb のフラグメント C (フラグメント A と B の間の領域) を得た。フラグメント C の両端にそれぞれフラグメント A および B とオーバーラップする領域を補足した後、全てのフラグメントを Gibson Assembly を用いて BAC ベクターに連結させることで、本遺伝子クラスター全領域を含むベクターを構築した。構築したベクターに apramycin 耐性遺伝子、*attP* site および integrase 遺伝子を導入することで pYIK3-aal を作製した。大腸菌から接合伝達により pYIK3-aal を異種発現用宿主である放線菌 *Streptomyces coelicolor* M1152、*S. lividans* TK24 および *S. albus* J1074 に導入した。遺伝子クラスター導入株を 5 種類の液体培地で培養し、LC/MS で培養液を解析したが、いずれの培養液においても actinoallolide の生産を確認することはできなかった。

生合成遺伝子クラスターの転写が異種発現用宿主内で起こっていないことが考えられたため、PKS のスタートコドンの上流に *ermE** プロモーターを挿入した pYIK3-aalM を

作製した。pYIK3-aalM を大腸菌から接合伝達により *S. coelicolor* M1152 に導入し、*S. coelicolor* M1152/pYIK3-aalM の培養液を LC/MS で解析した結果、actinoallolide A の生産が確認された。

以上の結果より、*A. fulvus* のゲノムから actinoallolide の生合成遺伝子クラスターが同定され、さらに、異種発現による actinoallolide の生産が可能となった。また、ベクター上の生合成遺伝子クラスターに対して遺伝子操作が可能のため、*A. fulvus* K09-0307 の遺伝子操作を行うよりも容易に生合成遺伝子の改変が行えるようになった。

今後は、ベクター上の生合成遺伝子を改変することにより、肝ミクロソームでの代謝を抑え、抗トリパノソーマ原虫薬として発展可能な類縁体の取得を試みる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Yuki Inahashi “Endophytic actinomycetes and the secondary metabolites -Actinoallolide, a new antitrypanosomal macrolide-” Kitasato University - Mahidol University Joint Symposium *Applied Biological Science for Human Health*, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 2017/7/6

Yuki Inahashi, Taro Shiraishi, Akira Take, Yoko Takahashi, Satoshi Omura, Tomohisa Kuzuyama, Takuji Nakashima “Actinoallolide biosynthesis and heterologous expression of the gene cluster” *Directing Biosynthesis V*, Warwick University, Coventry, UK, 2017/3/22-24

Yuki Inahashi “Bioactive compounds from endophytic actinomycetes and the biosynthesis” NRCT-JSPS joint research Mini-Symposium on Natural Product Discovery and Biosynthesis from Precious Microorganisms, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 2016/12/7

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/souyaku-shigen/TOP.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

稲橋 佑起（INAHASHI, Yuki）

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号：70645522