

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 4 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02898

研究課題名(和文)大腸がん原因物質コリバクチンの化学構造決定および発がんメカニズムの解明

研究課題名(英文)Chemical characterization of colibactin and understanding a mechanism of an onset of colorectal cancer by colibactin

研究代表者

渡辺 賢二 (Watanabe, Kenji)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：50360938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：コリバクチンの構造解明は、10年以上もの間達成されていなかった。そのため、多くの研究者がコリバクチンそのものの単離ではなく、生合成遺伝子の機能解明によるコリバクチンの再構築や、コリバクチンのDNA付加物の詳細な解析を進めることにより、実際にコリバクチンの構造決定が達成されている。この構造決定までに数多くの研究が報告されており、その集合知による構造の解明は非常に興味深いものとなっている。我々のグループもこのコリバクチンの構造解明研究を進めていたが、生合成解析ではなく実際にコリバクチンを単離するというアプローチで実際にコリバクチンの代謝産物を単離して構造を解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は物質科学としての理解が化学のみならず医学に対してもインパクトを与えるものとなったと考えられる。最近MSデータのみ論文もよく見かけるが、NMRを駆使しての精密構造解析の「単離構造決定」が最先端科学であることを改めて示した研究成果と言える。それとは別に、構造解析の研究テーマ自体が、がん治療にまで影響を与えたことになり、これは医学へと直結する。化学構造の解析データそのものは小さいことでゲノム情報に対する知見に化学的なプラスアルファがあれば、合理的な理解から導き出される革新的な治療への道が拓かれると感じている。

研究成果の概要(英文)：In this research, using the high-colibactin-producing wild-type *E. coli* strain isolated from a clinical sample, we were able to identify colibactin 770, along with a more stable derivative, colibactin 788, which was further stabilized by converting the diketone moiety into quinoxaline in situ in the crude culture extract to form colibactin 860. The structure of colibactin 860 determined by NMR revealed a hydrolysis and rearrangement reactions performed to transfer the cyclopropanes in colibactin 770 to cyclobutanes in colibactin 788. Furthermore, colibactin 420 and 430 derived from alcoholysis of colibactin were also isolated and determined. The stereochemistry analysis of colibactin 860, 420, and 430 further confirmed the proposed mechanism of the rearrangement reaction.

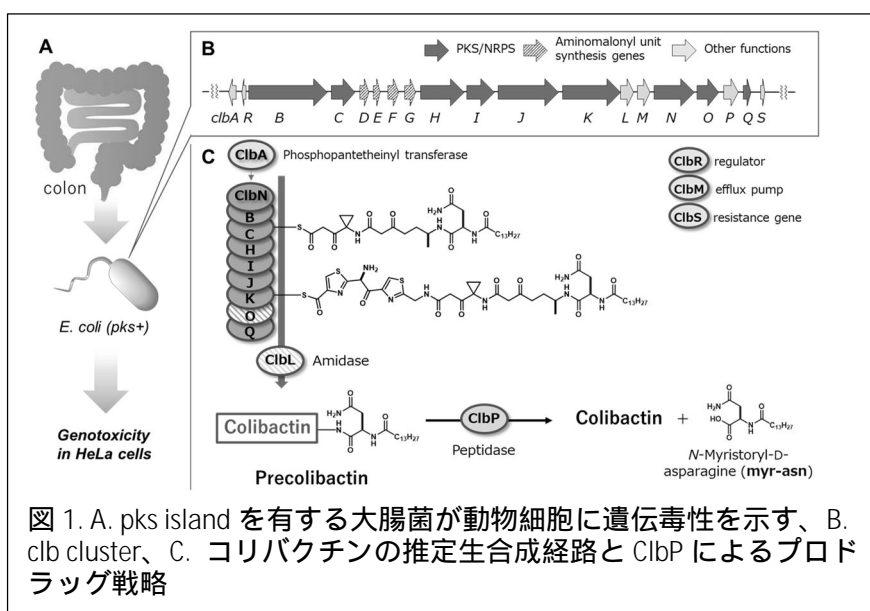
研究分野：天然物化学

キーワード：コリバクチン 天然物 生合成 大腸がん

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは日本では罹患率が最も高く、死者数も肺がんについて二番目に多いがんであり、その対策は急務であるといえる。しかし一方で、肺がんにおける喫煙や胃がんにおけるピロリ菌のような回避や除去が容易なリスク因子が見つかっておらず、また正確性の低い検出方法である便潜血検査以外での簡便な診断方法がないことなどから、大腸がんのリスクの低減や早期発見といった対策が未だ十分に取られていないのが現状である。

2006年に、腸内細菌叢を構成する一部の腸菌が動物細胞に接触すると、動物細胞のDNA二重鎖が切断され、遺伝子変化による遺伝毒性が生じることが報告され、これらの菌が大腸がんのリスク因子である可能性が指摘された(図1A)。これらの腸菌は共通してそのゲノム中に pks island と呼ばれる遺伝子群を有しており、遺伝毒性はこの pks island に依存して生じていることが確認された。実際にこの pks island を有する腸菌は健常者では2~3割程度、大腸がん患者では6割以上の保菌率であることが報告されており、pks island と大腸がんとの関わりが示唆されている。この pks island には、polyketide synthase (PKS) や nonribosomal peptide synthase (NRPS) などの二次代謝産物の生合成遺伝子群 (clb cluster) が含まれ(図1B)、この clb cluster によって生合成されている低分子化合物が遺伝毒性物質の本体と考えられ、「コリバクチン」と命名されている。コリバクチンが大腸がんのリスク因子であるならば、大腸がんの診断マーカーとしての活用や、その除去による大腸がんリスクの低減が期待できる。しかし、世界において強い注目を集める化合物でありながら、コリバクチン自体の検出は達成されておらず、化学構造は未決定であった。この事がコリバクチンの発がん作用機序の解明やマーカーとしての応用利用においての障壁となっていた。



## 2. 研究の目的

コリバクチンは生合成遺伝子群 (clb cluster) が特定されているため、相同性検索から clb cluster 中の各酵素の機能を推測し、遺伝子破壊や異種発現、生合成中間体誘導体の単離や合成などによりコリバクチンの構造に迫る研究が、複数のグループから報告されている。近年までに ClbO と ClbL を除く、大半の生合成遺伝子の機能は明らかにされていた(図1C)。コリバクチンの生合成では、プロドラッグ戦略が採用されていることが報告されている。すなわち PKS や NRPS のアセンブリーラインにより構築された非活性型の前駆体 (プレコリバクチン) から、ペプチダーゼである ClbP により N-myristoyl-D-asparagine (myr-asn) が切断されることで、活性型のコリバクチンへと変換されていることがわかっている。

このような背景のもと、我々はコリバクチンの化学構造の解明を目標としてコリバクチンの研究を開始した。まず手始めにコリバクチン生産菌の獲得のために、コリバクチン本体ではなく、生合成機構などを応用した実用的なコリバクチン生産菌の検出方法を確立することを試みた。

### 3. 研究の方法

#### [コリバクチンの生合成経路の解明]

コリバクチンは検出できないが、生合成遺伝子群 (clb cluster) は既知であることから、生合成酵素の機能を解明し、コリバクチンの生合成経路を解明することでその構造を推定する研究が世界中で精力的に進められてきた。相同性検索で clb cluster 中の各酵素の機能を推測し、遺伝子破壊や、生合成中間体やその誘導体の単離構造解明、異種発現と化学合成した基質を用いた生合成遺伝子の機能解明研究などにより、一つ一つの生合成酵素の機能が明らかになっていった。結果として著者が研究を始めた 2017 年には大半の生合成遺伝子の機能は明らかにされていたが、ClbO と ClbL の 2 つの機能がわかっておらず、未だコリバクチンの構造の全容は明らかになっていなかった (図 1)。なお、この時点で明らかになっている興味深い事実として、コリバクチンはその生合成経路でプロドラッグ戦略を採用していることがわかっていった。すなわち ClbN から ClbQ に連なる PKS や NRPS のアセンブリーラインにより構築された骨格が、さらに ClbL による変換を受けて、非活性型の前駆体 (プレコリバクチン) が構築される。その後、ペプチダーゼである ClbP により myr-Asn が切断されることで、活性型のコリバクチンへと変換されると考えられていた。従って clbP 遺伝子を破壊した DclbP 株から非活性型でより安定と推定されるプレコリバクチンを探す試みも行われたが、こちらも見出すことはできていなかった。しかしながら、DclbP 株やそれをベースに更に他の clb 遺伝子を破壊した株からは PKS-NRPS のアセンブリーラインから外れた myr-Asn を有するシャント化合物が多数見いだされており、これらの構造はコリバクチンの生合成経路と部分構造の解明に大きく寄与していた。

この様に各国でコリバクチンの研究が進められている一方で、日本においてコリバクチンについての研究は近年まで殆ど行われていなかった。このような背景の中で、我々のグループではコリバクチン生産菌の日本人での分布や大腸がんへの影響の調査と、その化学構造の解明を目標としてコリバクチンの研究を開始していた。しかしながらコリバクチンの構造解明については、直接的なコリバクチンの単離や、生合成機能解明での化学構造の解明は他の研究者に先駆けたアプローチが困難であると考えられた。そこで視点を変えて、まずコリバクチンの構造が不明でも使用できる生合成機構などを応用した実用的なコリバクチン生産菌の検出方法を確立することを試みた。これはコリバクチンが実際に大腸がんのリスク因子として確立した時に、非常に重要になることが期待された。

#### [コリバクチン高生産株 E. coli-50 の発見]

天然物化学の分野における経験則として、同一属種の微生物においても、各菌株において二次代謝産物の生産量は大きく異なる場合が多い。コリバクチンが大腸がんを誘導していると考えた時に、実際の大腸がん患者には特に毒性の高い、すなわちコリバクチンの生産量が多い大腸菌が存在するのではないかと推定された。そこで大腸がん患者由来の生検組織や糞便より、従来の PCR 法に加え、前述した LAMP 法や Clb probe でのアッセイを用い、500 株を超えるコリバクチン生産菌を特定した。獲得したコリバクチン生産菌のコリバクチン生産量を見積もるために、コリバクチンと対となって生産される myr-Asn の菌株ごとの生産量を LC-MS を用いて調べた。予想通り菌株ごとに生産量は大きく異なり、文献で報告されているコリバクチン生産菌である Nissle 1917 よりも 20 倍以上 myr-Asn を高生産する大腸菌株 E. coli-50 を発見した。実際に E. coli-50 を HeLa 細胞に対する遺伝毒性試験に処したところ、コリバクチンの遺伝毒性に由来する細胞肥大化を Nissle 1917 や JCM5491 などの他の myr-Asn 低生産株より高頻度で引き起こすことが確認され、確かに本株のコリバクチンの生産量が高いことが示唆された。

さらに、myr-Asn の生産量を指標にして培地の組成や振盪、温度などの培養条件の検討を行った。結果、純水を用いた M9 培地で静置中 30 で培養するという条件でさらに myr-Asn の生産量が大幅に増加することを見出した。これをコリバクチン高生産条件と

して以降の培養で用いることとした。

#### 4. 研究成果

##### [コリバクチンの探索]

E. coli-50 をコリバクチン高生産条件下で培養し、コリバクチンの検出と単離を試みた。E. coli-50 と *clbP* 遺伝子を破壊したコリバクチン非生産性の E. coli-50 *clbP* をそれぞれ培養し、菌体ごと培養液を抽出し LC-MS で生産産物の分析を行った。これまでの知見通り、目視で判別できる生成物の違いは *myr-Asn* 以外に見いだせなかった。そこで Thermo 社の Compound discoverer を用いて網羅的な含有成分の比較を行い、再現性のある微細な生産物の差を探索した。結果、非常に微量であるが、*mry-Asn* 以外に分子式  $C_{35}H_{38}O_7N_{11}S_2$  (質量 788) の化合物が野生株では見られるものの、遺伝子破壊株では必ず消失していることを見出した。以降、この化合物を 788 と呼称する。788 はコリバクチン非生産菌では検出されないが、E. coli-50 以外のコリバクチン生産菌からも確認された。またコリバクチンの生合成に直接関与するいずれの遺伝子破壊株からも全く検出されなかった。788 の MSMS のフラグメントピークを確認すると、既知の推定コリバクチン部分構造とよく一致するフラグメントが観測された。加えて、安定同位体ラベルされたアミノ酸の取り込み実験における 788 の質量変化は、コリバクチンの推定生合成経路とよく一致する結果が得られた。なお、コリバクチン生産菌の培養液に二重鎖 DNA を加えて培養すると、二重鎖 DNA 間でコリバクチンが架橋を形成したクロスリンク体を検出できる。しかし、788 を含むフラクションを二重鎖 DNA と反応させてみたところ、このクロスリンク活性は見られなかった。これらの知見から 788 をコリバクチンが培養液中で反応し安定化したコリバクチン由来化合物と推定し、その構造を明らかにするために単離を試みた。

##### [コリバクチン由来化合物 788 の単離と構造決定]

単離条件を検討した結果、200 L の大スケールで培養し、短時間で精製することで 0.3 mg の 788 を単離することができた。そこで 800 MHz のクライオプローブを用いた NMR で長時間測定を試みたが、 $^1H$  NMR においては類似したシグナルが大量に重なったようなブロードしたピークが観測され、 $^{13}C$  NMR では溶媒以外の一切のシグナルが観測されず、構造解明には至らなかった。測定後の NMR チューブ中の試料を LCMS で分析したところ、溶媒である重メタノールによるメタノリシスで 2 つに分割されたと推定される分子式  $C_{20}H_{19}D_3N_4O_5S$  と  $C_{19}H_{21}D_3N_4O_5S$  の 2 種類の化合物へと分解していることが確認された。このことから 788 が想定より不安定であることがわかったが、この 2 つの分解物が 788 よりも安定で解析が容易であると推定された。そこで、改めて抽出液から抽出の際

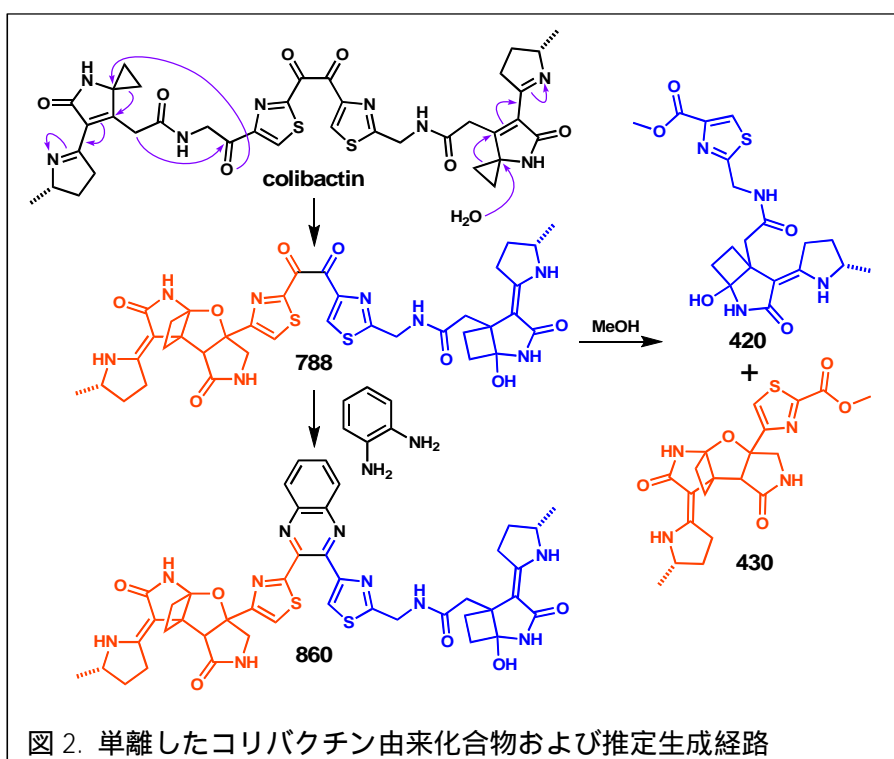


図 2. 単離したコリバクチン由来化合物および推定生成経路

に用いたメタノールによるメタノリシスで 788 が分解された 2 つの分子式  $C_{20}H_{22}N_4O_5S$  (430)と  $C_{19}H_{24}N_4O_5S$  (420)の化合物を探索した。これらの化合物も含有量は少なく単離は難航したものの、200 L の培養液からそれぞれを 0.3 mg と 0.2 mg 単離することに成功した。NMR にて構造解析した結果、これまでに報告されているコリバクチン生合成中間体には見られないユニークなシクロブタン骨格を含む、2 つの類似した化学構造を明らかにすることができた(図 2)。なお、430 と 420 は共にシクロブタンの立体配置に由来する 2 つの異性体の混合物であった。

430 と 420 から 788 の構造を推定すると、-ジケトン構造部分でのメタノリシスにより生成したと考えられる。そこで実際にこの -ジケトン構造を抽出後に 1、2-diaminobenzene により保護した 860 に変換し、単離を試みた。結果 400L の培養からそれぞれシクロブタンの立体配置に由来する 2 つの異性体を含む 860A 1.2 mg と単一の異性体である 860B 0.6 mg と 860C 0.6 mg を単離することができた。それぞれを NMR で解析し、推定したとおりの 788 の構造を確認することができた。

### [コリバクチンの構造]

これらの化合物の単離と構造解析を行っている間に、海外の 2 つのグループからほぼ同時にコリバクチンの化学構造(分子式  $C_{37}H_{38}O_6N_{11}S_2$ 、質量 770)が報告された。彼らは最後の機能未知酵素であった CibL の機能解明や、安定同位体標識されたアミノ酸の取り込み実験での質量変化などから、全く同じコリバクチンの構造を報告している。図 3 に解明されたコリバクチンの全生合成経路を示す。機能未知であった CibL は興味深いことに CibO までのアセンブリーラインで構築された骨格に対し、アセンブリーラインの中間体である CibI の基質に相当する部位をアミド縮合させる酵素であることを報告している。結果として、両端に myr-Asn を有する対称性の高いプレコリバクチンが構築される。そこから 2 分子の myr-Asn が CibP で除去されてコリバクチンの構造が構築される。我々が見出した 788 は、この報告されたコリバクチンに対し、水分子の付加と分子内のヒドロキシ基の巻き込みにより変換されていると推定された(図 2)。さらに 430 や 420 は 788 の ジケトン構造のメタノリシスにより生じたと考えられる。この様に我々の見出したコリバクチン代謝化合物は、報告されたコリバクチンの構造を矛盾なく説明できるものであった。すなわち単離された化合物のスペクトルデータからも、コリバクチンの構造を改めて確認することができた。

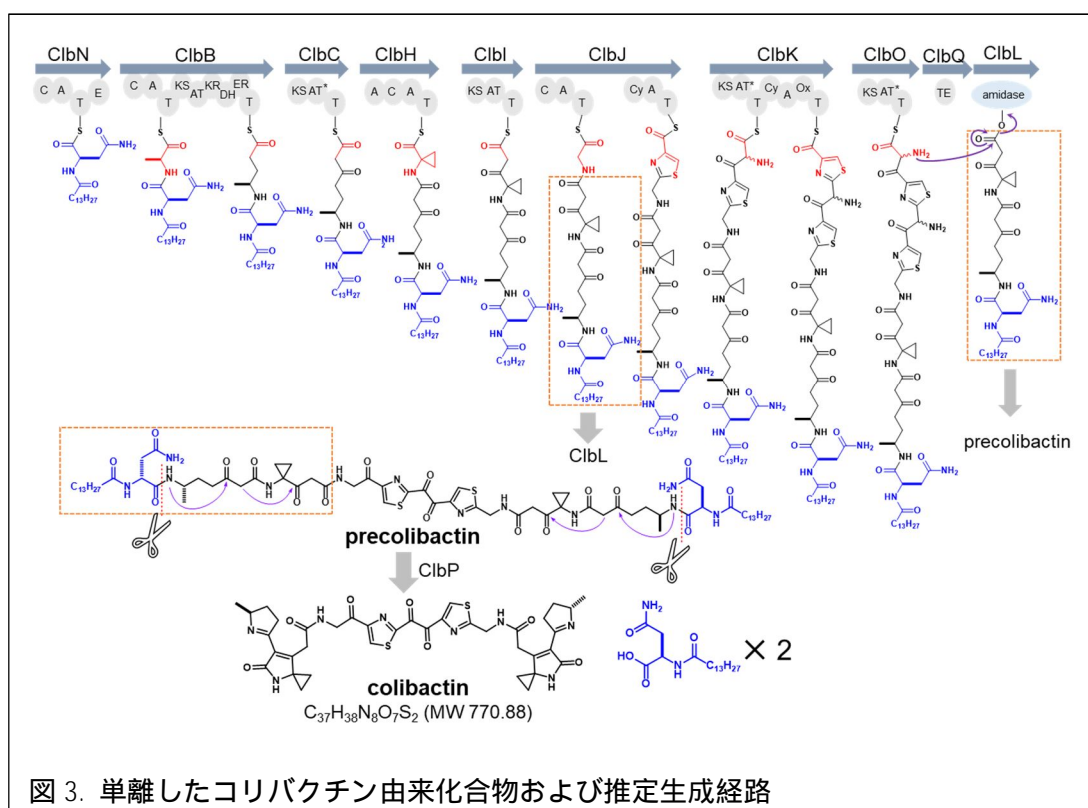


図 3. 単離したコリバクチン由来化合物および推定生成経路

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 平山裕一郎、渡辺賢二	4. 巻 60
2. 論文標題 大腸菌が産生する発がんリスク因子「コリバクチン」の化学構造の全容解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 123-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto Shinji, Matsubara Yuya, Watanabe Kenji	4. 巻 144
2. 論文標題 Alkaloid Biosynthetic Enzyme Generates Diastereomeric Pair <i>via</i> Two Distinct Mechanisms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5485 ~ 5493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.1c13621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Takuma, Toyoda Takeshi, Tajima Yuya, Kishimoto Shinji, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Matsushita Kohei, Yamada Takanori, Shimamura Yuko, Masuda Shuichi, Ochiai Masako, Ogawa Kumiko, Watanabe Kenji, Takamura-Enya Takeji, Totsuka Yukari, Wakabayashi Keiji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 912 ~ 919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrestox.0c00536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamoya Takahiro, Fujii Gen, Iizumi Yosuke, Narita Takumi, Komiya Masami, Matsuzawa Yui, Miki Kohei, Kondo Tadashi, Kishimoto Shinji, Watanabe Kenji, Wakabayashi Keiji, Sakai Toshiyuki, Toshima Jiro, Mutoh Michihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Artesunate inhibits intestinal tumorigenesis through inhibiting wnt signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 148 ~ 158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi Masanobu, Shimohara Chiaki, Oda Yoshimitsu, Hisatomi Yuuta, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Hirayama Yuichiro, Miyoshi Noriyuki, Iwashita Yuji, Yoshikawa Yuko, Sugimura Haruhiko, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Wakabayashi Keiji, Yagi Takashi, Watanabe Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of Escherichia coli strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00149-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirayama Yuichiro, Tsunematsu Yuta, Yoshikawa Yuko, Tamafune Ryota, Matsuzaki Nobuo, Iwashita Yuji, Ohnishi Ippei, Tanioka Fumihiko, Sato Michio, Miyoshi Noriyuki, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Sugimura Haruhiko, Wakabayashi Keiji, Watanabe Kenji	4. 巻 21
2. 論文標題 Activity-Based Probe for Screening of High-Colibactin Producers from Clinical Samples	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4490 ~ 4494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b01345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi Masanobu, Hisatomi Yuuta, Oda Yoshimitsu, Shimohara Chiaki, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Hirayama Yuichiro, Miyoshi Noriyuki, Iwashita Yuji, Yoshikawa Yuko, Sugimura Haruhiko, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Wakabayashi Keiji, Yagi Takashi, Watanabe Kenji	4. 巻 44
2. 論文標題 <i>In vitro</i> genotoxicity analyses of colibactin-producing <i>E. coli</i> isolated from a Japanese colorectal cancer patient	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 871 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.44.871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi Masanobu, Shimohara Chiaki, Oda Yoshimitsu, Hisatomi Yuuta, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Hirayama Yuichiro, Miyoshi Noriyuki, Iwashita Yuji, Yoshikawa Yuko, Sugimura Haruhiko, Mutoh Michihiro, Ishikawa Hideki, Wakabayashi Keiji, Yagi Takashi, Watanabe Kenji	4. 巻 42
2. 論文標題 Genotyping of a gene cluster for production of colibactin and in vitro genotoxicity analysis of Escherichia coli strains obtained from the Japan Collection of Microorganisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 12 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41021-020-00149-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenji Watanabe
2. 発表標題 Structural elucidation of natural product colibactin isolated from Escherichia coli in tumor tissues of clinical samples
3. 学会等名 Pacifichem2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 周 韜、平山 裕一郎、恒松 雄太、鈴木 七海、佐藤 道大、田中 誠司、内山 奈穂子、合田 幸広、渡辺 賢二 渡辺賢二
2. 発表標題 反応メカニズムの理解に基づく天然物生合成リデザイン
3. 学会等名 新学術領域研究「生合成リデザイン」取りまとめ公開シンポジウム(招待講演)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 周 韜、平山 裕一郎、恒松 雄太、鈴木 七海、佐藤 道大、田中 誠司、内山 奈穂子、合田 幸広、渡辺 賢二
2. 発表標題 大腸がんリスク因子コリバクチンの化学構造解析
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺賢二
2. 発表標題 大腸がんリスク因子コリバクチン産生菌の増殖抑制を目的としたパイロット介入試験
3. 学会等名 日本がん予防学会学(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年



〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PCT出願	発明者 周韜、渡辺賢二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PH-8798-PCT	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<https://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------