

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08334

研究課題名(和文) 大腸菌を宿主とした抗結核薬・抗癌剤の実用レベル高生産システムの構築

研究課題名(英文) Construction of high level production system for anti-tubercular agent and anti-cancer drug by Escherichia coli

研究代表者

熊谷 孝則 (KUMAGAI, Takanori)

広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授

研究者番号：70274058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既に構築済みの大腸菌を宿主とした抗結核薬D-サイクロセリン(D-CS)の生産システムへ、ATP再生系を導入することにより、D-CSの生産性を向上させることに成功した。また、D-CSの生合成中間体であり、かつ、抗癌剤であるヒドロキシウレアの合成に必要なDcsAの電子伝達系(フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素)を探索するため、D-CS生産菌のゲノム解析を行い、電子伝達系の候補遺伝子を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果により、抗結核薬D-CSの大腸菌を宿主とした実用レベル高生産が達成できれば、より安全で安価なD-CSの供給につながる可能性があり、意義があると考えられる。また、D-CS生産菌のゲノム解析は、新規なアルギニン水酸化酵素の電子伝達系の解明、および、D-CS以外の新規化合物の発見につながる可能性がある、学術的に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, production level of an anti-tubercular agent, D-cycloserine (D-CS), was improved by introducing a ATP regeneration system to the established D-CS production system using Escherichia coli. In addition, candidate genes of electron transfer system (ferredoxin and ferredoxin reductase) for DcsA, which is necessary for the synthesis of hydroxyurea (an intermediate of D-CS biosynthesis and an anti-cancer drug), were found by genome sequencing of a D-CS-producing microorganism.

研究分野：微生物薬品学

キーワード：抗結核薬 D-サイクロセリン 抗癌剤 異種生産 ATP再生系 ゲノム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

D-サイクロセリン (D-CS, 図1) は、放線菌 *Streptomyces (S.) lavendulae* ATCC11924 により生産される抗生物質であり、結核治療の二次選択薬として用いられている。私はこれまで、ATCC11924 株から D-CS 生合成遺伝子クラスターをクローニングに成功し、その生合成経路 (図1) を明らかにするとともに、大腸菌を宿主とした D-CS 生産系の構築に成功した。しかしながら、構築したシステムによる D-CS 生産は短時間でプラトーに到達し、D-CS 生合成の最終段階に必要な ATP の枯渇が原因であると考えられた。

一方、D-CS の生合成中間体であり、かつ、抗癌剤として使用されるヒドロキシウレア (HU) (図1) 生合成の初発反応は、遺伝子破壊実験から、DcsA が関与することを明らかにしていたものの、その触媒機能は不明であった。そこで、*in vitro* における解析を行った結果、DcsA はヘムを含有する新規のアルギニン水酸化酵素であり、その活性発現には、電子伝達系 (フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素) が必要であることを明らかにした。

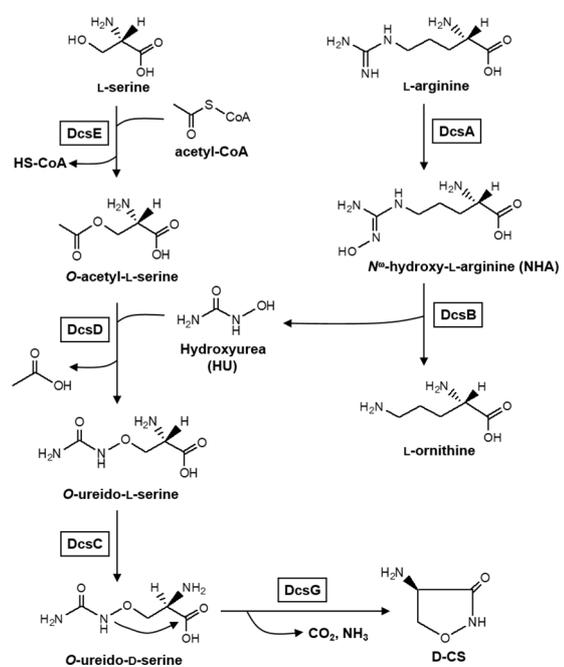


図1 D-CSの生合成経路

2. 研究の目的

(1) ATP 再生系導入による D-CS 生産性の向上

ATP 再生酵素ポリリン酸キナーゼ (PPK) をコードすると考えられる *S. lividans* 由来の *sliv37110* について、大腸菌の宿主ベクター系を用いて発現させ、取得したタンパク質を解析することにより、*Sliv37110* が PPK であることを明らかにする。続いて、これまで構築した D-CS 生産大腸菌 (*desC*, *desD*, *desE* および *desG* を保有する大腸菌) へ *sliv37110* を導入し、D-CS 生産に及ぼす影響を調査する。

(2) 大腸菌を宿主とした HU 生産システムの構築

dcsA, *dcsB*, および、ホウレン草由来のフェレドキシン (FDX) およびフェレドキシン還元酵素 (FDR) をコードする遺伝子を大腸菌に導入し、L-アルギニンを原料とした大腸菌による HU 生産システムを構築する。

(3) L-セリンおよび L-アルギニンを原料とした大腸菌による D-CS 生産

これまで、大腸菌を宿主とし、L-セリンおよび HU を原料とした D-CS 生産システムを構築している。上記(2)の研究により、大腸菌を宿主とした HU 生産システムの構築に成功したならば、既存の D-CS 生産システムと組み合わせることにより、大腸菌を宿主とし、L-セリンおよび L-アルギニンを原料とした D-CS 生産システムを構築する。

3. 研究の方法

(1) *Sliv37110* 発現大腸菌の作製

PCR により *sliv37110* を増幅した後、pET-28a(+)ベクターに挿入することにより、*sliv37110* 発現用ベクターを構築した。*sliv37110* 発現用ベクターおよびシャペロンプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株に導入することにより、*Sliv37110* 発現大腸菌を作製した。

(2) *Sliv37110* の機能解析

Sliv37110 発現大腸菌の無細胞抽出液から、ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより *Sliv37110* を精製し、その機能解析を行った。機能解析は、ADP から ATP の生成を HPLC で分析することにより行った。

(3) *sliv37110* の D-CS 生産系における利用

既存の D-CS 生産大腸菌へ *sliv37110* を導入した後、得られた大腸菌の休止菌体を用い、L-セリンおよび HU を原料として D-CS 生産を行った。D-CS の定量は HPLC を用いて行った。

- (4) ホウレン草由来 FDX および FDR の大腸菌における発現
ホウレン草由来の FDX および FDR をコードする遺伝子をそれぞれ人工合成した後、pET-28a(+)ベクターに挿入することにより、FDX および FDR 発現用ベクターを構築した。発現用ベクターを保有する大腸菌を培養することにより、FDX および FDR の発現を行った。
- (5) ホウレン草由来 FDX および FDR の分析
ニッケルアフィニティークロマトグラフィーにより精製した FDX および FDR について、分光光度計を用い、吸収スペクトルを解析した。
- (6) HU 生産用大腸菌の作製
dcsA, *dcsB*, および、ホウレン草由来の FDX および FDR をコードする遺伝子をデュエットベクター (pETDuet-1, pACYCDuet-1, pRSFDuet-1) に挿入した後、大腸菌 BL21(DE3)株に導入することにより、HU 生産用大腸菌を作製した。
- (7) HU の生産および検出
HU の生産は、L-アルギニンを基質とし、HU 生産用大腸菌の休止菌体を用いて行った。HU の検出は TLC により行った。
- (8) ATCC11924 株のゲノム解析
D-CS 生産放線菌 ATCC11924 株のゲノムシーケンシングは、PacBio RSII シーケンサーを用いて行った。得られたリードのアセンブルは HGAP により行った。また、アノテーションは Prokka v.1.12b により行った。

4. 研究成果

- (1) ATP 再生系導入による D-CS 生産性の向上
まず、*sliv37110* の機能解析を行った。シャペロンタンパク質の共存下、*Sliv37110* は可溶性のタンパク質として良好に発現した。そこで、*Sliv37110* を精製した後、鎖長 6 のポリリン酸および Mg^{2+} イオンの存在下、*Sliv37110* と ADP を反応させたところ、ATP の生成が認められた。この結果から、*Sliv37110* は PPK であることが判明した。続いて、ATP 生成反応の特性解析を行った結果、至適温度は 37°C、至適 pH は 9.5 であった。また、鎖長 3, 4, 6 のポリリン酸のうち、鎖長 6 のポリリン酸が *Sliv37110* の最も良好な基質であった。
Sliv37110 は PPK であることが明らかになったため、*sliv37110* 遺伝子の D-CS 生産システムにおける利用を試みた。その結果、*sliv37110* を共存させると、非共存下と比べ、D-CS の生産が上昇し、大腸菌を宿主とした D-CS 生産性の向上に、*sliv37110* の利用が有効であることを明らかにすることができた。
- (2) 大腸菌を宿主とした HU 生産システムの構築
大腸菌を宿主とした HU 生産システムを構築するにあたり、まず、*DcsA* の電子伝達系として利用するホウレン草由来の FDX および FDR について、大腸菌における発現を試みた。大腸菌のドロンに最適化した人工合成遺伝子を用いた結果、両タンパク質は可溶性のタンパク質として良好に発現した。そこで、両タンパク質を精製した後、吸収スペクトル解析を行った。その結果、FDX は鉄—硫黄クラスタを有するタンパク質に特徴的なスペクトル、FDR はこのファミリーに特徴的なスペクトルを示し、両タンパク質は活性を保持した状態で発現するものと考えられた。
そこで、*dcsA*, *dcsB*, および、FDX および FDR をコードする遺伝子を大腸菌に導入し、L-アルギニンを原料とした大腸菌による HU 生産を試みたが、HU 生産は認められなかった。この原因として、ホウレン草由来の FDX および FDR は、*DcsA* の電子伝達系として機能するものの、活性が微弱なため、活性体として大腸菌内で発現しても、*DcsA* による十分なアルギニン水酸化が起こらなかったためではないかと考えられた。大腸菌を宿主とした HU 生産システムの構築が達成できなかったため、L-セリンおよび L-アルギニンを原料とした大腸菌による D-CS 生産研究は実施できなかった。
- (3) *DcsA* の電子伝達系をコードする遺伝子の探索
D-CS 生産放線菌である ATCC11924 株においては、*DcsA* の電子伝達系が必ず存在するはずである。そこで、ATCC11924 株のゲノム解析を実施し、*DcsA* の電子伝達系をコードする遺伝子の探索を行った。ゲノム解析の結果、3 つのコンティグ (総計 8.06 Mb) が得られ、7,235 個のコーディングシーケンス (CDS) が存在することが推定された。CDS の詳細な解析の結果、FDX の候補遺伝子を 8 個 (*sla_0278*, *sla_0637*, *sla_0824*, *sla_0899*, *sla_1629*, *sla_2082*, *sla_4744*, *sla_5718*)、および、FDR の候補遺伝子を 4 個 (*sla_0455*, *sla_1205*, *sla_3051*, *sla_5535*) 見出すことができた。

Kumagai, T., Koyama, Y., Oda, K., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M., Molecular cloning and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster for the antitubercular agent D-cycloserine produced by *Streptomyces lavendulae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2010, 1132-1139.

Kumagai, T., Takagi, K., Koyama, Y., Matoba, Y., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M., Heme protein and hydroxyarginase necessary for biosynthesis of D-cycloserine, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2012, 3682-3689.

Uda, N., Matoba, Y., Kumagai, T., Oda, K., Noda, M., and Sugiyama, M., Establishment of an *in vitro* D-cycloserine-synthesizing system by using *O*-ureido-L-serine synthase and D-cycloserine synthetase found in the biosynthetic pathway, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2013, 2603-2612.

Uda, N., Matoba, Y., Oda, K., Kumagai, T., and Sugiyama, M., The structural and mutational analyses of *O*-ureido-L-serine synthase necessary for D-cycloserine biosynthesis, *FEBS J.* 282, 2015, 3929-3944.

Kumagai, T., Ozawa, T., Tanimoto, M., Noda, M., Matoba, Y., and Sugiyama, M., High level heterologous production of D-cycloserine by *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2015, 7881-7887.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Noda, M., Shiraga, M., Kumagai, T., Danshiitsoodol, N., and Sugiyama, M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived <i>Lactobacillus plantarum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 536-545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00840	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 Panthavee, W., Noda, M., Danshiitsoodol, N., Kumagai, T., and Sugiyama, M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Characterization of exopolysaccharides produced by thermophilic lactic acid bacteria isolated from tropical fruits of Thailand	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 621-629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-00856	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 Noda, M., Miyauchi, R., Danshiitsoodol, N., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M.	4. 巻 84
2. 論文標題 The expression of bacteriocin production and self-resistance in <i>Lactobacillus brevis</i> 174A is mediated by two regulatory proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Appl. Environ. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e02707-02717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.02707-17	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 Toba, S., Minato, Y., Kondo, Y., Hoshikawa, K., Minagawa, S., Komaki, S., Kumagai, T., Matoba, Y., Morita, D., Ogawa, W., Gotoh, N., Tsuchiya, T., and Kuroda, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive analysis of resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) efflux pumps from <i>Serratia marcescens</i> , Db10	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-41237-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本美也子, 中村和音, 黒田照夫, 森田大地, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 Streptomyces achromogenes subsp. stretozoticusのゲノムおよび二次代謝の解析
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢尾井健人, 黒田照夫, 森田大地, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 D-サイクロセリン生産菌Streptomyces lavendulae ATCC11924のゲノム解析
3. 学会等名 2018年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村和音, 山本美也子, 黒田照夫, 森田大地, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 ゲノム解析により明らかになったNBRC14001株による抗真菌化合物の生産
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢尾井健人, 黒田照夫, 森田大地, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 Streptomyces lavendulae ATCC11924のゲノム解析と二次代謝産物の顕在化
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷本桃子, 青田達明, 黒田照夫, 森田大地, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 sliv37110の機能解析とD-サイクロセリン生産系における利用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本美也子, 黒田照夫, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 ストレプトゾトシン (STZ) 生産菌 <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>streptozoticus</i> のゲノム解析
3. 学会等名 第29回微生物シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本美也子, 黒田照夫, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 ストレプトゾトシン (STZ) 生産菌 <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>streptozoticus</i> のゲノム解析と生合成遺伝子の探索
3. 学会等名 2017年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 折川明日美, 山本美也子, 黒田照夫, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 大腸菌を宿主としたNG-ヒドロキシ-L-アルギニン生産系構築の試み
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 折川明日美, 山本美也子, 黒田照夫, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 大腸菌を宿主としたNG-ヒドロキシ-L-アルギニン生産系の構築を指向した基礎研究
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村和音, 山本美也子, 黒田照夫, 杉山政則, 熊谷孝則
2. 発表標題 <i>Streptomyces achromogenes</i> subsp. <i>streptozoticus</i> のゲノム解析による抗真菌化合物の発見
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢尾井 健人, 黒田 照夫, 森田 大地, 熊谷 孝則
2. 発表標題 D-サイクロセリン生産性放線菌のゲノム解読と二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢尾井 健人, 黒田 照夫, 森田 大地, 熊谷 孝則
2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC 11924のゲノムマイニング
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷 孝則, 谷本 桃子, 黒田 照夫, 森田 大地, 杉山 政則
2. 発表標題 SliV37110はポリリン酸キナーゼである-機能解析とD-サイクロセリン生産系での利用-
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 和音, 西村 祥, 山本 美也子, 黒田 照夫, 森田 大地, 熊谷 孝則
2. 発表標題 NBRC14001株はポリエンマクロライド系抗生物質を生産する
3. 学会等名 2019年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢尾井 健人, 黒田 照夫, 森田 大地, 熊谷 孝則
2. 発表標題 D-サイクロセリン生産性放線菌のゲノムマイニング
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村 祥, 中村 和音, 山本 美也子, 黒田 照夫, 森田 大地, 熊谷 孝則
2. 発表標題 ゲノムマイニングにより見出したNBRC14001株によるポリエンマクロライドの生産
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----