

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19139

研究課題名（和文）ヒト共生細菌ゲノムがコードする二次代謝産物の生産とその機能解明

研究課題名（英文）Production and function of secondary metabolites encoded by the human symbiotic bacterial genome

研究代表者

阿部 郁朗（Abe, Ikuro）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授

研究者番号：40305496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、放線菌由来抗腫瘍性化合物の生産系を確立し、他微生物での発現系の構築に向けた準備段階は終了した。また、ヒト感染性細菌代謝物の生理活性を明らかにし、その生合成酵素などのツールも取得している。腸内細菌のC-C結合開裂酵素においては、酵素の立体構造の知見がいくつかすでに得られており、これらを利用することでさらに有効な生理活性化合物を微生物生産することができる。今後、これらの遺伝子、代謝物、生合成酵素の知見を基盤として応用することで、ヒト体内での発現手法の確立、腸内へのドラッグデリバリー手法を発展させることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、将来的にはガン治療のための微生物を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発などが可能になる。ヒト由来嫌気性菌のビフィズス菌Bifidobacteriumを遺伝子組換え技術によって、長大な遺伝子導入が可能な株へと形質転換する。抗ガン化合物の生合成遺伝子クラスターを導入し、抗ガン化合物の生産が可能になる。本研究を土台として、ヒトと微生物間の共生関係における二次代謝産物の役割といった医学薬学的に重要な研究への展開が期待できる。ヒトに関連する複数の学問領域に寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a production system for antitumor compounds from actinomycetes and completed the preparatory steps for the establishment of an expression system in other microorganisms. In addition, the bioactivity of human infectious bacterial metabolites has been clarified and tools such as their biosynthetic enzymes have been acquired. In the intestinal bacterial C-C bond cleavage enzymes, the steric structure of the enzymes has already been determined, and these enzymes can be used to produce more effective bioactive compounds. In the future, the knowledge of these genes, metabolites, and biosynthetic enzymes can be applied as a basis for establishing methods of expression in the human body and developing methods of drug delivery to the gut.

研究分野：天然物化学、合成生物学

キーワード：腸内細菌 ヒト共生菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトの臓器にできる腫瘍への投薬は、困難な場合が多く、簡便、選択的に、活性化合物を届けるドラッグデリバリーシステムの構築が求められている。近年、ヒト由来嫌気性微生物の、固形腫瘍の嫌気環境中で増殖する性質が注目されており、抗ガン治療の為に化合物、遺伝子のベクターとしての応用が注目されている。微生物ホストは、ウィルス等のベクターシステムと比べて、治療後、抗生物質によって除去しやすいという利点がある。また、遺伝子プロモーターのチューニングによって、生体内での発現時期、発現量をコントロールすることが可能である。他の研究グループにおいて、無毒化した *Clostridium* 胞子のガン細胞への投与(Dang *PNAS* 2001, 98, 15155)、*Bifidobacterium* の酵素発現株を用いたプロドラッグ-酵素療法(Hidaka *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007, 71, 2921)など、嫌気性微生物を用いたガン治療の研究がいくつか報告されている。しかし、遺伝子クラスターの発現による複雑な骨格の低分子生産システムが嫌気性菌に応用された例は存在しない。

2. 研究の目的

抗ガン化合物生産を、腫瘍形成マウスに投与する事で、組替え細菌を用いた新規ガン治療の確立に繋がる。そのため、本研究においてガン治療のための微生物を用いた新規ドラッグデリバリーシステムを提案する。ヒト由来嫌気性菌のビフィズス菌 *Bifidobacterium* を遺伝子組換え技術によって、長大な遺伝子導入が可能な株へと形質転換する。モデルとなる化合物生産に関する遺伝子発現を最適化した後、抗ガン化合物の生合成遺伝子クラスターを導入し、抗ガン化合物の生産を試みる。また、構築したビフィズス菌宿主を用いて、ヒト由来微生物の二次代謝産物遺伝子の発現および生成物同定を試みる。そのため、いくつかのガン治療や生理活性の調節に有効な天然物生合成遺伝子発現や酵素の機能解析を行う。本研究によって得られる知見は、「ヒトの体内細菌の二次代謝産物の同定と機能解明」の研究へと応用可能であるため、ヒトに関連する複数の学問領域に寄与する。

3. 研究の方法

本研究によって、新たなグラム陽性細菌遺伝子発現系が構築された場合、これまでの発現系では適応できなかった微生物種の二次代謝産物遺伝子クラスターの生産物の開拓にもつながる。本研究では、本研究では、遺伝子発現のターゲットとして、海洋細菌由来の抗腫瘍性スルホンアミド化合物 *altemicidin*、その類縁体である *isoleucyl-tRNA synthetase* 阻害活性抗生物質である SB-203207, SB-203208 に注目する。また、ヒト感染性放線菌であり、ノカルディア症の原因菌である *Nocardia* 属細菌の代謝物解析を行い、その生合成遺伝子の利用を検討する。さらに、腸内細菌の生合成酵素の解析とその触媒コントロールを目指して、C-配糖体であるプエラリンのC-配糖体のC-C結合切断による脱配糖体化の機構を構造機能解析する。本研究で構築された発現系をラット等のモデル生物に投与した場合、その代謝物の生理的機能をも調べる事ができる。よって、本研究を土台として、ヒトと微生物間の共生関係における二次代謝産物の役割といった医学・薬学的に重要な研究への展開が期待できる。

4. 研究成果

Altemicidin, SB-203207, SB-203208 に存在する sulfonamide、6-azatetrahydroindane 骨格は新奇骨格であり、その生合成を研究し、生合成酵素の機能改変を行うことで、新規な活性化合物の創出が見込まれた。また、化合物の水溶性より、生体内での機能性にも大いに期待が持たれた。これら化合物は海洋放線菌 *Streptomyces* sp. NCIMB40513 から単離されるアルカロイド化合物であるが、アルテミシジンは既存のポリケタイド、ペプチドなど、どの二次代謝物ファミリーにも属さないアルカロイド化合物であったため、その生合成に関する先行研究はこれまでに存在しなかった。

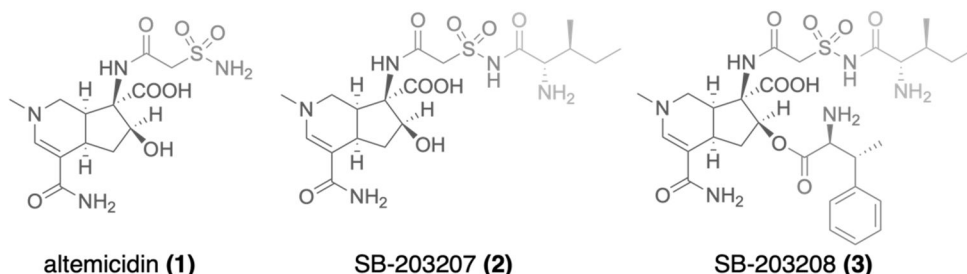


図1 天然由来スルホンアミド抗生物質の化学構造

そこで、生合成遺伝子クラスターをクローニングし、それを異種発現系に導入することで、抗腫瘍化合物の微生物生産系を構築することを計画した。生産菌と報告された菌体は既報の生産培地においても *altemicidin*, SB-203207, SB-203208 を生産せず、その生合成遺伝子は発現していない“休眠遺伝子”であると考えられた。これら化合物は新規骨格であるため、常法通り類似骨格を合成する生合成酵素の相同性に基づくゲノム探索は困難である。その一方、近年、糸状菌におい

て、抗生物質化合物の自己耐性遺伝子に注目し、それらとクラスターを組む遺伝子群に注目し、新規生成酵素をコードする遺伝子群を発見する研究が報告されつつある(Yan Y. et al. Nat. Prod. Rep. (2020) epub)。例えば、糸状菌の除草剤化合物の自己耐性遺伝子に注目し、それと遺伝子クラスターを組むテルペン合成酵素群が見出され、新規骨格を合成する酵素とその自己耐性遺伝子が発見され、高いインパクトの学術誌に掲載されたように、同様のアプローチは世界的に注目を集めている(Yan Y. et al. *Nature* **559**, 415–418 (2018))。そこで、本研究では、まず生産菌のゲノムシーケンスを行い、そのシーケンス情報より、耐性遺伝子と考えられる isoleucyl tRNA synthetase 遺伝子を含む生成遺伝子クラスターを見出した。このクラスターは、14kb、5kb の二つのオペロンからなり、側鎖合成に関わるメチル基転移酵素ホモログを含むため、SB-203207 合成に関わる可能性が高いと考えられた。そこでこれら遺伝子を発現し、その生成物を調べるべく、異種発現実験を行った。形質転換体を A3M 培地にて培養し、HPLC にて分析した所、水溶性画分に新たな化合物が生産されたことが確認された。この化合物を大量調製し、ODS、Hilic カラムでの精製の後、NMR、HR-MS 分析を行った。その文献値との一致から本化合物を *altemicidin* と同定した。また、5 kb のオペロンをクローニングし、完成したベクターを追加して発現することで、新たに複数の化合物が生成することを確認した。これらのうちの一つを MS、NMR 分析を行い、SB-203208 と構造決定した。この結果より、二つのオペロンの発現により、目的化合物が生成され、ターゲット化合物異種発現系の構築が達成されたことが示された(Hu, Z. & Awakawa, T. et al. *Nat. Commun.* **10**, Article number: 184 (2019))。

また、遺伝子クラスター中、耐性遺伝子として注目した isoleucyl tRNA synthetase ホモログ *SbzA* を *in vitro* にて活性評価した所、驚くべきことに、*altemicidin* のスルホンアミドに isoleucyl 基の転移を行い、アミド生成を行う SB-203208 生成酵素であることが判明した。*SbzA* は一次代謝酵素と同様に多ドメイン型の isoleucyl-tRNA 合成酵素ホモログであるものの、一次代謝酵素としての活性はわずかであり、isoleucyl-tRNA を基質として受け入れ、スルホンアミド基にイソロシル基を転移する新規二次代謝酵素であることを明らかにした。その一方で、パルク tRNA、イソロイシン、*altemicidin* を用いて反応を行ったところ、SB-203207 の生成が検出され、本酵素は tRNA synthetase の本来の反応であるアミノ酸の AMP エステル化、tRNA へのエステル交換も触媒し、自己耐性遺伝子としても機能する可能性が示された。その他に、GNAT 酵素 *SbzI*、*SbzC* による、AMP ligase、キャリアープロテインを介した 2 種のアシル転移反応を明らかにした(図 2)。キャリアープロテインを介した GNAT 酵素のアミノアシル基転移は前例がなく、新規性の高い報告となった。

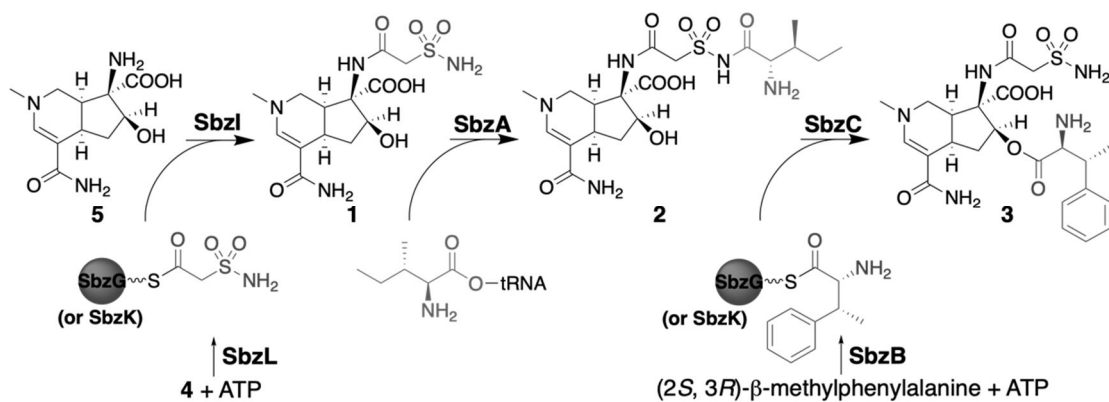


図 2 SB-203208 生合成中の特異なアミノアシル基転移反応

その生合成機構の改変による生理活性分子の創出のため、さらに生合成酵素の機能解析を行った。遺伝子破壊により、遺伝子クラスターとして存在する cupin dioxygenase *SbzM*、aldehyde dehydrogenase *SbzJ* が、スルホンアミド構造の生合成に関わることを示した。その反応生成物を同位体ラベル基質、生成物ラベル化反応を用いて *in vitro* で詳細に解析し、*SbzM* が L-システインから二段階の酸化を経て S-N 結合形成までの反応を導き、スルホンアミド形成を行う新奇な金属酸化酵素であることを示した(図 3)。*SbzM* の脱炭酸、酸化を含む一次反応、続く二次反応は興味深く、その制御による新規活性物質生産の可能性を調べるべく、現在、その結晶構造解析を進めている (unpublished data)。今後、これらの生合成の知見を元に、多様な構造の類縁生理活性化合物の創出が期待される。

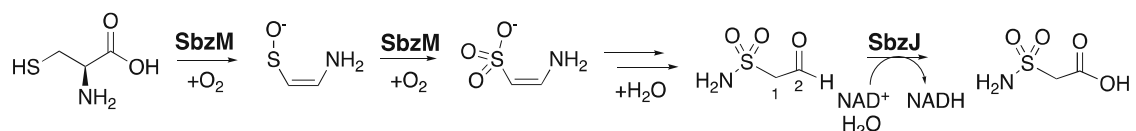


図 3 スルホンアミド生合成に関わる酸化反応

ヒト感染性放線菌であり、ノカルディア症の原因菌である *Nocardia* 属細菌の代謝物解析を行い、その中から、新規芳香族化合物 4 種(図 4)、不飽和脂肪酸 1 種の単離構造決定を行った。

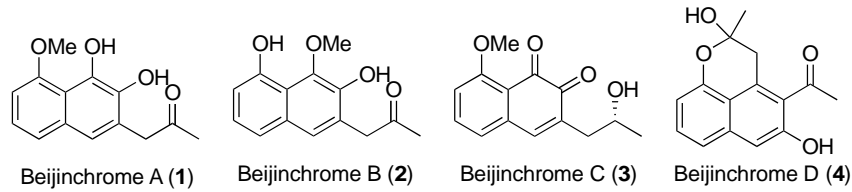


図4 Nocardia 属細菌より単離された化合物

これらの化合物 1, 2 は、DPPH を用いたラジカルスカベンジャー活性試験において $IC_{50} = 15.6$ mM, 12.8 mM の抗酸化活性を持ち、何らかの生理的機能を担っていると考えられる。また、その推定生成は下図のようにポリケチド合成酵素とその修飾酵素によって触媒されると予想できる。これに関わる生合成遺伝子は、37 種の *Nocardia*, 2 種の *Mycobacterium* に保存されており、普遍的な生物機能が予想される。今後、これらの代謝物の生理作用について精査し、*Nocardia* が人に感染する際の、これら化合物の役割について試験する。

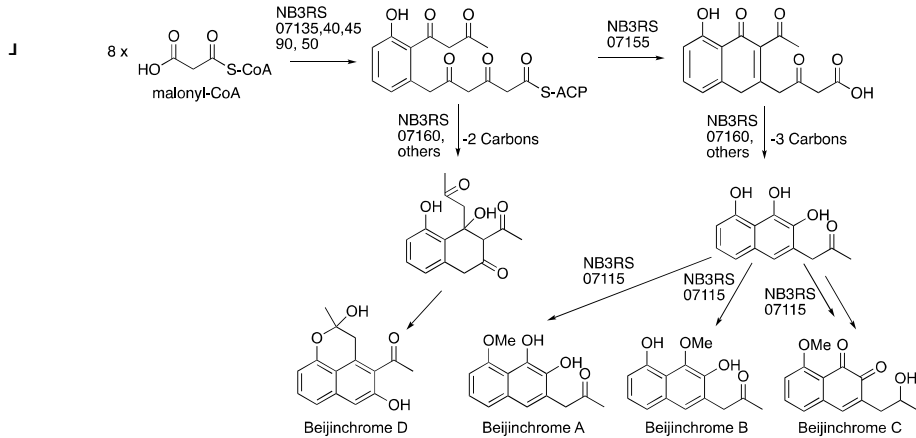


図5 Beijinchrome 推定生合成経路

Senoside 類は腸内細菌により、還元的開裂を受けて真の活性成分である rheinanthrone に変換されることが知られており、腸内細菌の生合成酵素の解析とその触媒コントロールを行うことによって、ヒトの健康状態のコントロールにつなげることができる。C-配糖体である puerarin の C-配糖体結合は *Bacteroides* sp. によって開裂することがこれまでに判明していたが、その詳細な触媒メカニズムは未知であり、今後のヒト体内での阻害剤などの活性コントロール、酵素の構造解析、酵素の基質エンジニアリングによる新規物質生産のために、酵素の立体構造解析を試みた。現在、本酵素を精製し、結晶化、クライオ電子顕微鏡解析により、その反応機構、酵素の構造解析を進めている。これまで、様々な C-配糖体に対する基質特異性試験、酵素の構造情報から、以下の反応スキームでの還元的 C-C 結合開裂の反応機構を推定している(図6)。

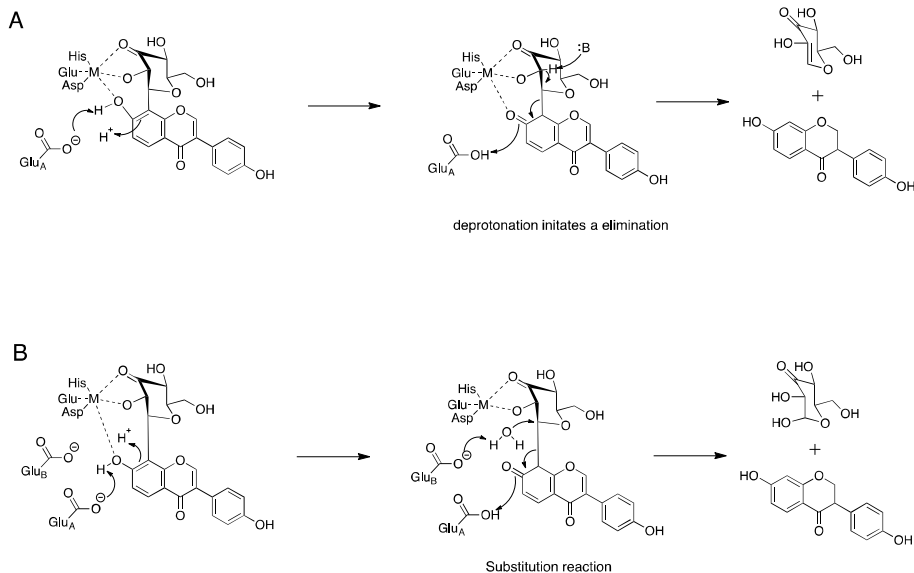


図6

フラボノイド類の予想 C-C 結合開裂経路

糖化

細菌を用いた新規ドラッグデリバリー手法の確立のために、ヒト共生細菌を用いた二次代謝産物生産法とその機能解明が重要となる。これまでの研究において、放線菌由来抗腫瘍性化合物の

生産系を確立し、他微生物での発現系の構築に向けた準備段階は終了した。これらの遺伝子、発現手法を応用することで、Bifidobacteria での発現手法の確立を可能にする。また、ヒト感染性放線菌 Nocardia の代謝物解析を行い、芳香族化合物、不飽和脂肪酸を単離した。これら化合物の生理機能は未知であり、非常に興味深い。Nocardia 族放線菌のゲノムシーケンスより、候補生合成遺伝子をすでに見出し、これらを解析することで、その生合成経路に関する知見を取得している。芳香族化合物については、II 型ポリケチド合成酵素によって合成されることが予想されるが、これらの生合成遺伝子は Nocardia 細菌ゲノムに広く分布しており、重要な生物機能を有することが予想される。これらを物質生産に用いることで、生合成経路を用いた生物、生理活性化合物の生産を試みる。腸内細菌の C-C 結合開裂酵素においては、これまで、酵素の立体構造の知見がいくつかすでに得られており(未公開データ)、これと in vitro 反応において調べられた基質特異性の情報を元に生合成反応スキームを構築した。今後、すでに当研究室によって構築が終わっている altemicidin の発現ベクターに遺伝子組換えを行うことで、容易に Bifidobacterium 発現ベクターの構築を行う。得られた形質転換体の代謝物を HPLC 分析することによって、物質生産を試験する。他の細菌由来抗腫瘍化合物ファミリーについても異種発現物質生産系を構築し、ドラッグデリバリーの系に応用する。Nocardia 代謝産物の生合成について、異種発現、遺伝子破壊の遺伝子操作系を用いて、その生合成酵素を同定する。得られた代謝物、中間体について、ヒト細胞や病原性微生物などへの生理、生物活性を調べ、そのヒト感染への影響を試験する。その他、ヒト共生微生物の二次代謝クラスターを運搬するベクターやトランスポゾンに注目し、その DNA 配列をプローブとした二次代謝遺伝子の探索や機能解明について取り組む。C—C 結合開裂酵素においては、酵素機能改変や阻害剤による活性制御、ヒトへの生理機能の解明を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hoshino Shotaro, Awakawa Takayoshi, Zhang Huiping, Hayashi Fumiaki, Abe Ikuro	4. 巻 67
2. 論文標題 Beijinchromes A-D, Novel Aromatic Compounds Isolated from Nocardia beijingensis NBRC 16342	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 775 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00364	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 Hu Zhijuan, Awakawa Takayoshi, Ma Zhongjun, Abe Ikuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Aminoacyl sulfonamide assembly in SB-203208 biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41467-018-08093-x	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ikuro Abe
2. 発表標題 Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products
3. 学会等名 3rd International Conference on Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikuro Abe
2. 発表標題 Engineered Biosynthesis of Medicinal Natural Products
3. 学会等名 Fusion Conference, 2nd Synthetic Biology for Natural Products Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部郁朗
2. 発表標題 天然有機化合物の生合成に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会 第139回年会、薬学会賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部郁朗
2. 発表標題 微生物由来薬用天然物の生合成リデザイン
3. 学会等名 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構、微生物ウィーク2019、オープニングシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部郁朗
2. 発表標題 放線菌由来生物活性二次代謝産物の生合成研究
3. 学会等名 第34回日本放線菌学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm</p>

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
連携 研究者	淡川 孝義 (Awakawa Takayoshi) (80609834)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授 (12601)	