

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K15744  
研究課題名（和文）難培養性共生微生物が生産する希少天然化合物の合成生物学による発酵生産技術の開発

研究課題名（英文）Study on the synthetic biological approach toward fermentative production of rare-natural products from unculturable and symbiotic microorganisms

研究代表者  
工藤 慧（Kudo, Kei）  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：80828161  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：safracinおよびsaframycin生産菌のゲノム配列を解読し、各生合成遺伝子クラスターを同定、BACベクターへクローニングすることに成功した。さらに*Pseudomonas putida*を宿主としたsafracinの異種生産に成功し、条件発現系を用いることで生産量の増大が可能であることを明らかにした。難培養性共生微生物であるET-743生産菌の公開ゲノムと取得したsafracinの遺伝子配列を比較し、ET-743生合成に必要な修飾酵素遺伝子を推定した。合成DNAにより人工オペロンを調製し、safracin異種生産系に追加導入したが、新たな化合物の生成を確認することはできなかった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

構築したsafracin異種生産系においては、safracin以外の生合成中間体と思われる化合物ピークが多数観察されたことから、本システムを利用した多様性創出が可能であることが示唆された。一方で、safracin類はDNA損傷を引き起こす薬剤であるため、生産宿主にとっても毒性を発揮する。そのような化合物の高生産に、条件発現系が有効であることが明らかになった。また、単に難培養微生物由来の公開ゲノム配列から抽出した遺伝子配列を用いるのではなく、導入した各遺伝子の発現解析や、ゲノム情報の正確性について吟味することの必要性が今後の課題として明白となった。

研究成果の概要（英文）：The researcher sequenced the genomes of safracin- or saframycin-producing microorganism. The biosynthetic gene cluster of each compound was annotated and successfully cloned into a BAC vector. The BAC containing safracin gene cluster was introduced into a host organism, *Pseudomonas putida*, resulting in the production of safracin heterologously. Then, the researcher employed a conditional expression system to raise the production yield. By comparing the genome sequences between the ET-743 producer, an unculturable and symbiotic microorganism, and the safracin producer, the researcher deduced several unique genes not found in the safracin cluster but the ET-743 cluster. Those candidates were prepared as synthetic DNAs and assembled into an artificial operon. The addition of the artificial operon into the safracin producing system did not give any new compounds as expected.

研究分野：天然物化学

キーワード：難培養性微生物 合成生物学 天然物化学 海洋天然物 ゲノム解析 異種発現 抗がん剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

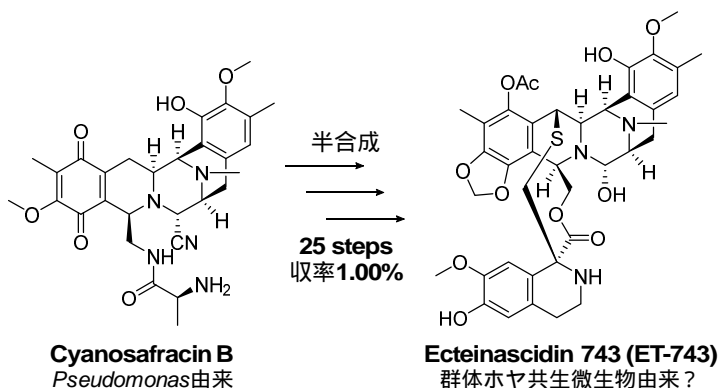
### 1. 研究開始当初の背景

悪性軟部腫瘍のような希少がんに対する抗腫瘍剤はオーファンドラッグであるが故に開発が成されておらず、胃がんや肺がんなどの主要ながんに対する抗腫瘍剤と比べて選択できる薬剤は限定されている。そのような中、群体ホヤ *Ecteinascidia turbinata* から単離された天然テトラヒドロイソキノリン (THIQ) 化合物 ET-743 は、近年日本でも希少がんを対象とした抗がん剤として承認され、適用範囲の拡大を目指す臨床試験が実施されている。

ET-743 は、1 トンの群体ホヤからわずか 1 g しか得られず、群体ホヤそのものは臨床薬の供給源にはなり得ない。現在は *Pseudomonas* を用いた発酵生産によって得られる cyanosafraclin B を原料とした半合成法で供給されているが、25 段階もの反応を要することから効率および収率が低く、依然大量供給の面で課題を抱えている。さらに、次代の抗腫瘍剤として ET-743 誘導体の開発が進められているが、ET-743 のように複雑な構造を有する中分子化合物は、化学合成による誘導体展開が困難なため、生合成を利用した構造多様性の創出が切望されている。

一方でメタゲノムアプローチにより、ET-743 の生合成遺伝子情報が報告された。本遺伝子情報によれば主骨格部分の生合成遺伝子配列に関しては、safracin、saframycin (それぞれ *Pseudomonas*、放線菌由来の化合物) と高い相同性があることは、THIQ 骨格の相同性を考慮するとリーズナブルであると言える。しかし、ET-743 の生合成遺伝子群は 173 kb の領域にわたって分散して存在すると推定されており、従来の方法では生合成遺伝子クラスター全体をクローニングし、異種発現することは不可能なため生合成遺伝子クラスターの全体像を捉えた直接的な証拠はない。

当研究室では、培養可能な微生物試料からは 200 kb を超える生合成遺伝子クラスターの取得が可能になっているが、メタゲノム試料からは 150 kb 超のゲノムライブラリーを調製することは難しいのが現状である。そこで本研究課題では、ET-743 と同じく THIQ を部分骨格にもつ safracin および saframycin の生合成遺伝子を BAC ベクターでクローニングし、これらのクローンを鋳型として ET-743 生合成に不足している遺伝子群を補充することにより、ET-743 の全生合成が達成出来るのではという着想に至った。BAC ベクターは 300 kb までの遺伝子を搭載することが可能であり、複数の遺伝子を追加しても問題無くコンストラクトを構築することが可能である。



### 2. 研究の目的

研究代表者の所属する研究室では、*Pseudomonas* 由来の化合物の生合成遺伝子クラスターに対して、合成 DNA による人工遺伝子クラスターを構築し、放線菌ホストで異種発現生産することに成功している等、人工遺伝子クラスター構築のノウハウの蓄積および技術・ツールを持っている。そこで本研究では、このノウハウを応用し、ET-743 製造の半合成ステップを人工遺伝子に置き換えることで、*Pseudomonas* あるいは放線菌ホストにおいて ET-743 全合成を達成するという革新的な難培養性微生物由来化合物生産の技術開発を目指した。

このように半合成を生合成経路で置き換えるという試みは、これまでの異種発現による天然化合物生産とは異なるユニークな戦略である。これにより、効率的な ET-743 の製造法を確立することができれば、大幅な薬剤製造コストの縮小が期待されると共に、生合成遺伝子改変による誘導体化を可能にすることから新たなバックアップ化合物の創製も期待される。

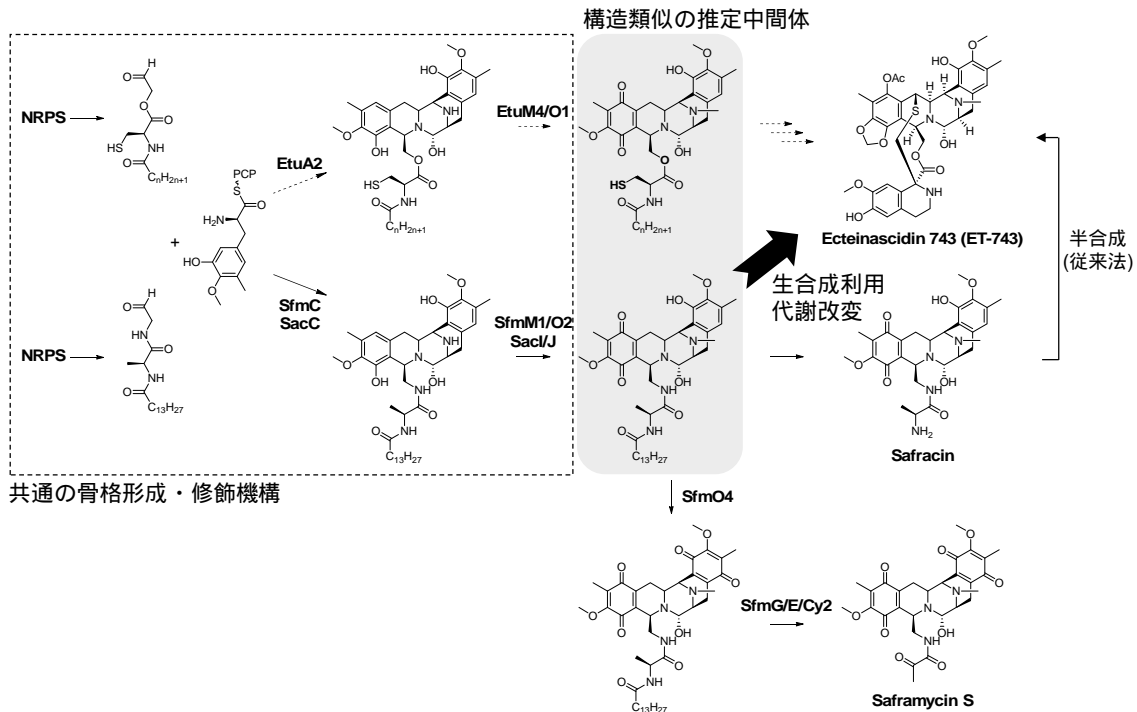
### 3. 研究の方法

#### (1) 生合成遺伝子クラスターの取得

safracin を生産する *Pseudomonas* 属細菌、および saframycin を生産する *Streptomyces* sp. NBRC11002 株の培養液からゲノム DNA を調製し、PacBio Sequel を用いてドラフトゲノム配列を取得した。次いで両菌株をそれぞれアガロースゲルに包埋し、BAC ベクター pKU524 を用いて BAC ライブラリーを調製した。報告されている生合成遺伝子情報を元に特異的プライマーを設計し、PCR スクリーニングによって生合成遺伝子クラスターを含む BAC をスクリーニングした。

#### (2) 生合成遺伝子クラスターの異種発現

safracin 生合成遺伝子クラスターは、ゲノムに *attB* サイトを組込んだ *Pseudomonas putida* KT2440 株に形質転換した。saframycin 生合成遺伝子クラスターは、汎用ホスト *Streptomyces avermitilis* SUKA 株に導入した。各種形質転換体を複数の培地を用いて培養し、生産物を



LC/MS によって測定した。

### (3) safracin 生合成遺伝子クラスターの改変

プロモーター置換には、red recombinase による *in vivo* 遺伝子組換えを用いた。sacB の改変には、モジュール編集技術 (参考文献) を利用した。ET-743 生合成遺伝子は合成 DNA 断片を順次連結して人工オペロンを調製した。

## 4. 研究成果

### (1) 生合成遺伝子クラスターの取得

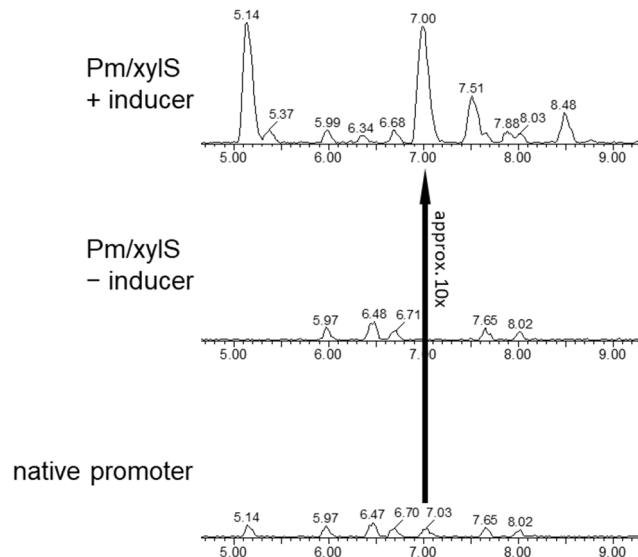
Safracin 生産菌について最長コンティグ 6,368,101 塩基、saframycin 生産菌について最長コンティグ 9,581,901 塩基のドラフトゲノム配列を取得することに成功した。報告されている生合成遺伝子との配列比較から、各最長コンティグに目的の生合成遺伝子クラスターが含まれることを確認した。各菌株の BAC ライブラリーをスクリーニングした結果、safracin 生合成遺伝子クラスターを含む 80 kb のインサートを有するクローンと、saframycin 生合成遺伝子クラスターを含む 110 kb のインサートを有するクローンをそれぞれ選抜することができた。

### (2) 生合成遺伝子クラスターの異種発現

各種培地において safracin または saframycin、およびそれらの類縁体の生産を検証した結果、safracin の生産を確認することができた。safracin 以外の生合成中間体と思しき化合物も多数検出されたことから、本異種発現システムが多様性創出にも応用可能であることが示唆された。また、外来修飾酵素を追加するという本戦略においては一度に多数の基質を検証することが可能である点で有利に働くことが考えられた。一方で saframycin の生産は、4 種類の培地を検討したものの、いずれの条件でも確認できなかった。

### (3) safracin 生合成遺伝子クラスターの改変

Safracin の異種生産を確認することができたものの、その生産量は乏しく、以降の研究を効率よく進めるために生産量を向上させる必要があると判断した。そこで safracin 骨格形成の鍵となる sacA 遺伝子上流に条件発現型プロモーターシステム (Pm/xylS) を挿入した。その結果、誘導剤 *m*-toluic acid を 2 mM 添加した条件において、safracin 生産能が約 10 倍に向上することを明らかにした。また、本システムにより初めて、safracin の条件生産系を確立することができた。後述するように safracin は宿主自身にとっても毒であるため、生産量増大のために有用な戦略であると考えられる。



構築した safracin 生産系に改変を施すため、safracin 生合成遺伝子クラスターと推定 ET-743 生合成遺伝子 (JGI Analysis Project ID: Ga0072939) を詳細に比較した。その結果、8 つの safracin 生合成酵素遺伝子の全てについてホモログが存在することが確認され、共通の骨格形成機構を持つことが強く示唆された。一方で、acetyltransferase、flavoprotein、radical SAM enzyme をコードする遺伝子、およびグリコール酸ユニットの生合成遺伝子の一部は ET-743 生合成遺伝子クラスターにのみ見出された。そこでこれらの遺伝子の *Pseudomonas* における発現を試みた。*Pseudomonas* の GC 含量は 60.3%、ET-743 生産菌の GC 含量は 23.1% であるため、各遺伝子をコドン最適化した合成 DNA を設計し、8 kb にわたる人工オペロンを搭載したプラスミドを調製した。グリコール酸ユニットの生合成遺伝子に関しては、ET-743 の生合成遺伝子は不完全のように思われたため、別の類縁化合物 quinocarcin を生産する *Streptomyces* 由来の遺伝子配列を用いた (4 kb)。また、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) がアラニンではなくシステインを取り込むよう改変するため、基質選択を担う A ドメイン (adenylation ドメイン) を含む 4 kb の領域を正確に置換した。NRPS の遺伝子改変デザインは、参考文献 を参考に行った。以上の人工オペロン、および改変 safracin クラスターを組み合わせることで *Pseudomonas* ホストへ導入し、生産物を分析したが、ET-743 や新たな safracin 誘導体の生産を確認することはできなかった。

今後は導入した各遺伝子の発現解析を行い、プロモーター位置の最適化を行うことで、各生合成ステップを確認しつつ生合成システム全体を構築していく必要があると考える。

#### 参考文献

Kudo, K., et al., In vitro Cas9-assisted editing of modular polyketide synthase genes to produce desired natural product derivatives, *Nat. Commun.*, 11, 2020, 4022

Bozhuyuk, K. A. J. et al., Modification and de novo design of non-ribosomal peptide synthetases using specific assembly points within condensation domains, *Nat. Chem.*, 11, 2019, 653-661

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤 慧、西田 みち代、酒井 紀子、末永 光、池田 治生、新家 一男
2. 発表標題 海洋性難培養微生物が生産する有用物質の異種生産技術に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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