

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14798

研究課題名（和文）半人工遺伝子クラスターによる難培養微生物由来有用天然化合物の異属生産技術の開発

研究課題名（英文）Development of Heterogeneous Production Technology for Useful Natural Compounds from Difficult-to-Cultivate Microorganisms by Semi-Artificial Gene Clusters

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：海洋性の難培養微生物が生産する化合物を、培養可能な異属細菌において生産させるため、半人工的な生合成遺伝子クラスターの構築を目指した。宿主微生物で既に機能することが確認されている safracin 生合成遺伝子クラスターを鋳型として、16種21個の遺伝子を含む5種類のベクターを構築しました。これらを宿主である *Pseudomonas putida* に6種類の組み合わせで導入したが、期待する化合物の生産は確認されなかった。今後の課題として、これまで利用が難しかった遺伝資源を活用するために、発現ボトルネックの決定やコドン最適化アルゴリズムの厳密な選択など、基礎的な研究を行うことが必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カイメン由来の tetrahydroisoquinoline 化合物である renieramycin 類の生合成遺伝子を題材として、*Pseudomonas putida* での異種発現生産を目指した。目的物質の生産には至らなかったものの、より詳細な解析を行う材料となる菌株を構築することができた。今後異種生産が達成されれば、ecteinascidin-743 など様々な難培養微生物由来の有用天然化合物の発酵生産へと結びつけることができる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to construct a semi-artificial biosynthetic gene cluster to produce compounds produced by difficult-to-cultivate marine microorganisms in culturable bacteria from another genus. Using the safracin biosynthetic gene cluster, which has already been shown to function in the host microorganism, as a template, we constructed five types of vectors containing 21 genes from 16 putative orthologs. These were introduced into the host, *Pseudomonas putida*, in six different combinations, but the production of the expected compounds was not observed. As future work, it is necessary to carry out basic research, such as determining expression bottlenecks and strictly selecting codon optimization algorithms to utilize genetic resources that have been difficult to use.

研究分野：天然物化学

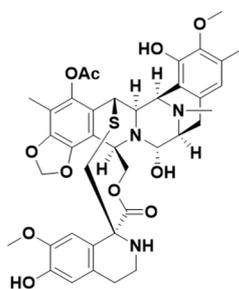
キーワード：天然物化学 異種発現 海洋天然物 生合成 医薬品 物質生産 *Pseudomonas*

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

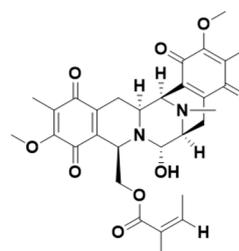
最近 40 年に上市された医薬品のうち、約三分の二の開発に天然化合物が直接的あるいは間接的に応用されている。これらの天然化合物由来の医薬品は、微生物あるいは植物から精製することで調製されるが、中には前駆体からの半合成により供給されているものも存在する。抗がん剤 ecteinascidin-743 はそのような化合物の例であるが、天然からは限られた海域に生息する群体ホヤ 1 トンから 1g しか得ることができない。実際の生産者はホヤに共生する微生物とされているが、培養法が存在しないため供給源とはなり得ない。本薬剤の供給は、培養可能な微生物が生産する類縁体を原料として行われるが、多工程・低収率がネックとなっている。そこで合成生物学的手法による微生物生産が望まれているが、依然として達成されていないのが現状である。

Ecteinascidin-743 は tetrahydroisoquinoline 骨格を有し、生合成機構が類似した一群の天然化合物が多数存在する。現在は、*Pseudomonas* 属が生産する safracin が半合成前駆体として用いられているが、renieramycin の生産が発酵法で達成できれば、ecteinascidin-743 の半合成前駆体として最も適していると考えられる。Renieramycin 生産菌は培養不可能な共生微生物であることから、その生合成遺伝子はそのままで利用不可能である。そのため、遺伝子発現制御機構が全く異なる遺伝子を改変し、異「属」ホストで発現可能な人工遺伝子クラスターを構築し、化合物生産させる技術の開発を行うことが求められる。



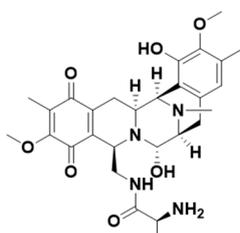
Ecteinascidin 743

Ca. *Endoecteinascidia frumentensis*



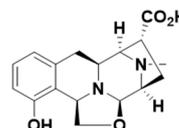
Renieramycin E

Ca. *Endohaliclona renieramycinifaciens*



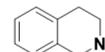
Safracin B

Pseudomonas sp.



Quinocarcin

Streptomyces sp.



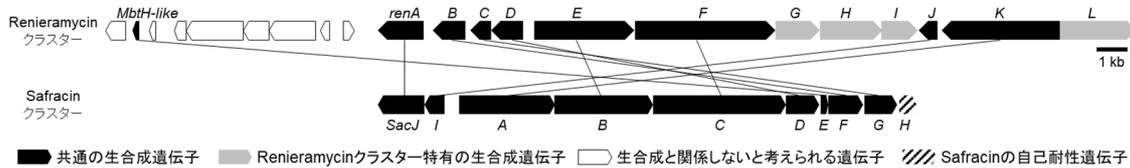
Tetrahydroisoquinoline

2. 研究の目的

本研究では、カイメン由来の tetrahydroisoquinoline 化合物である renieramycin 類の生合成遺伝子を題材として、*Pseudomonas putida* での異種発現生産を目指す。これが達成されれば、強い細胞毒性を示す renieramycin 類を用いた創薬のための化合物供給が容易になり、さらに得られた知見を他の化合物へと応用することで、ecteinascidin-743 など様々な難培養微生物由来の有用天然化合物の発酵生産へと結びつけることができる。難培養性微生物のメタゲノム解析から生合成遺伝子を特定しようとする試みは、多くの場合、配列相同性から明確にオーソログの存在する一つまたは少数の遺伝子を大腸菌等で発現させ、タンパク質の機能を確認することで行われている。しかし物質生産を念頭に置くと、やはり大腸菌ではなく *Pseudomonas* や *Streptomyces* といった菌株をホストとして選ぶべきであると考えられる。個々の遺伝子機能ではなく、複数の異属由来遺伝子または遺伝子クラスターを協調して発現させるための知見は極めて乏しく、本研究により初めて方法論として確立されることが期待される。

3. 研究の方法

報告されている 12 個からなる renieramycin 生合成候補遺伝子と、*Pseudomonas* 由来の tetrahydroisoquinoline 化合物 safracin の生合成遺伝子を比較すると、8 個はホモログの関係にある。加えて、safracin 生合成遺伝子に存在し、非リボソームペプチド合成酵素と協働的に機能すると考えられる MbtH-like タンパク質をコードする遺伝子のホモログが、renieramycin 生合成遺伝子クラスターの 7.7 kb 上流にも存在する。これら合計 9 個の遺伝子を *P. putida* で発現させるため、safracin 生合成遺伝子クラスターを構成する遺伝子を renieramycin 生合成遺伝子で置き換える。Renieramycin 生合成遺伝子のコーディング領域の GC 含量は 34.4%、対して safracin 生合成遺伝子は 58.3% であるため、各遺伝子のコドン最適化を行う。また、遺伝子発現に重要な役割を担う遺伝子間領域については、safracin 生合成遺伝子クラスターのものを用いる。これにより、*Pseudomonas* 細胞内の native な転写調節機構が利用できるため、safracin を生合成する際と同等の発現パターンを得ることができると期待される。宿主において最適化された発現時期や発現



強度を再現することで物質生産に結び付きやすいと考えられる。さらに、renieramycin 生合成の鍵酵素である非リボソーム合成ペプチド合成酵素について、遺伝子上流に薬剤誘導型プロモーター (Pm プロモーター) を配置することで、培養初期のリーク発現を回避する。Safracin を含む tetrahydroisoquinoline は DNA 結合活性を示す細胞毒性物質であるため、培養後期に細胞が十分増えた段階で発現させることで生産効率が上昇すると考えられる。

Renieramycin 生合成遺伝子クラスターにユニークな 4 つの遺伝子 (*renG*, *H*, *I*, *L*) についても、safracin 生合成遺伝子の発現系を利用する。これらの遺伝子のうち、*renH*, *I* はグリコール酸の生合成遺伝子と配列相同性を有する。Renieramycin 類や ecteinascidin-743 は部分構造としてグリコール酸に由来するエステル結合を有するが、これは safracin には見られない構造であるため、異種発現生産のためには必須である。

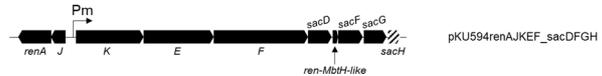
renG は二か所目のキノン形成に関与し、*renL* の機能は不明であるが ecteinascidin-743 の推定生合成遺伝子群の中にホモログが存在する。Safracin の生合成遺伝子は *sacA-H* の向きと *sacJ*, *I* の向きの二方向からなるが、このそれぞれを *renH*, *I* と *renG*, *L* で置き換える。前述の 9 遺伝子とは異なるベクターを用いて発現プラスミドを構築し、*P. putida* を 2 つのプラスミドで形質転換する。形質転換体を safracin の生産培地において培養し、renieramycin 類の生産を抗菌試験と LC/MS によって確認する。

ベクター1: Safracinクラスターの置換

1-1. 全てrenieramycin生合成遺伝子 (*sacH*除く)



1-2. 前駆体供給はsafracin生合成遺伝子



ベクター2: Renieramycinにユニークな生合成遺伝子の補充

2-1. Renieramycin生合成遺伝子をsafracinクラスターと同様に発現



2-1. Quinocarcin生合成遺伝子 (前駆体供給) を追加



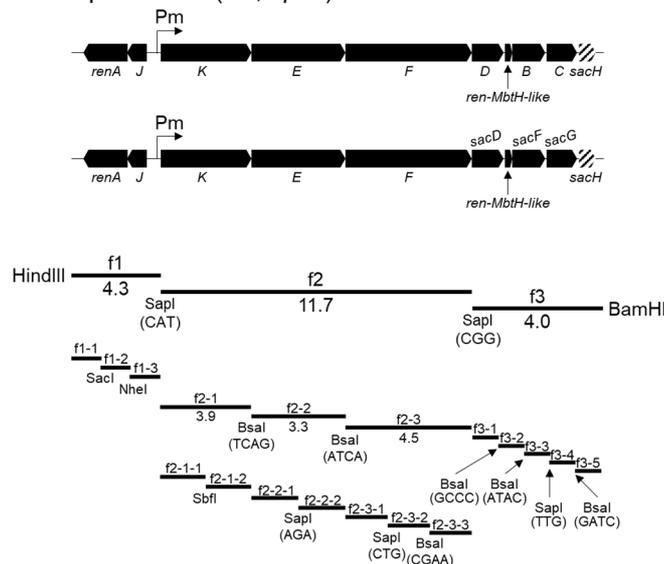
2-1. Quinocarcin生合成遺伝子 (前駆体供給) で置換



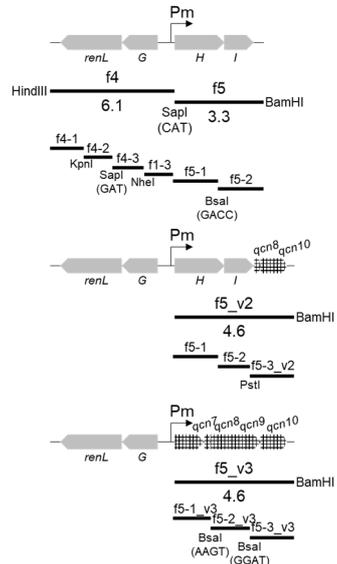
4. 研究成果

方法に示したベクター 1、2 をそれぞれ構築するため、合成遺伝子在设计した。Renieramycin 生合成遺伝子のコドン最適化により 54.0%まで GC 含量を増加させた遺伝子を用いた。図のように制限酵素サイトを設計し、多数の DNA 断片を段階的に組み上げることで、5 種全てのプラスミドを構築した。

vector: pKU594AT (*bla*, *aphII*)



vector: pKU592AT (*aac(3)/IV*)



構築したプラスミドを全ての組合せ (2x3=6 通り) で *Pseudomonas* 宿主へと導入した。これまでの研究において safracin の異種生産に成功している生産培地を用い、発現誘導剤である m-toluic acid を終濃度 1 mM 添加した。5 日間の培養後、培養上清を NaOH により塩基性に調整した後に酢酸エチルで抽出し、抽出物を LC/MS により分析した。いずれの条件においても renieramycin またはその生合成中間体、あるいは加水分解物に由来する質量は観測されなかった。今後は遺伝

子発現解析を行い、発現がボトルネックとなっている遺伝子がないかを調べる必要があると考えられる。本研究期間中には、mRNA の調製条件まで検討した。

遺伝子クラスターの異種発現と並行して、NRPS による骨格形成の基質となる tyrosine 誘導体を生合成する酵素の *in vitro* 機能解析を試みた。本研究には renieramycin ではなく ecteinascidin-743 の生産菌ゲノムにコードされた酵素を用い、大腸菌発現に最適化した配列を合成した。*Escherichia coli* BL21(DE3)を用いてタンパク質の生産を試みたが、可溶性のタンパク質を取得することができなかった。

本研究期間中は renieramycin 遺伝子異種発現用のベクター調製に時間を要したものの、最終的には当初計画の通りに人工遺伝子クラスターを構築することができた。しかしいずれの組合せでも化合物生産が観測できなかったため、本戦略による異種生産を実現させるためには以下のような検討が必要と考える。まず上述の通り発現解析によりボトルネックを明らかにすること、次にコドン最適化した遺伝子がタンパク質生産に結び付いているか確認することが課題である。特に後者は、20%以上 (ET-743 生合成遺伝子を用いる場合は 30%以上) の GC 含量差を克服しなければならない。複数のコドン最適化アルゴリズムを比較することで、難培養微生物由来の低 GC 遺伝子異種発現に適した手法を明らかにできると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------