

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23810026

研究課題名（和文）

病原性微生物が生産する天然物の化学構造決定および生合成機構の解明に関する研究

研究課題名（英文）

Engineered biosynthesis of colibactin in *Escherichia coli*

研究代表者

鰐渕 清史 (WANIBUCHI KIYOFUMI)

静岡県立大学 薬学部 助教

研究者番号：00613663

研究成果の概要（和文）：病原性大腸菌 IHE3034 株が生産する毒素 colibactin は、哺乳類細胞に感染しているときのみ生合成される微量成分であるため、その存在は示唆されているにもかかわらず未だに単離報告がない。そこで本化合物の生合成を試みることにした。まず、colibactin 生合成遺伝子の BAC ライブラリーを獲得した。続いて本ライブラリーから目的の生合成遺伝子群をコードしたクローンを取得した後、遺伝子群を発現するためのベクターを構築することに成功した。目的発現ベクターは、酵母の高い相同組換え能力を利用することで巨大な発現ベクターであっても作成することができた。

研究成果の概要（英文）：The target of our heterologous production system is colibactin. Colibactin is a hybrid molecule of a polyketide–nonribosomal peptide isolated from *Escherichia coli* IHE3034, that causes DNA double-strand breaks and activation of the DNA damage checkpoint pathway, leading to cell cycle arrest and eventually to cell death. The colibactin gene cluster was sequenced. The colibactin gene cluster spanned 55-kilobases-long and eighteen open-reading frames were encoded in the cluster. The biosynthetic gene cluster was transcribed by seven promoters. Assembly of biosynthesis genes: For the production of colibactin in *E. coli*, each of the seven operons was individually expressed in *E. coli* to confirm expression. The seven operons were assembled into three separate plasmids with each operon carrying its own T7 promoter, ribosomal binding site and T7 transcriptional terminator. The multimonocistronic arrangement was an important improvement from previous systems for the heterologous production of 6-dEB, yersiniabactin and rifamycin precursor in *E. coli*. The multimonocistronic arrangement simplify the assembly process and also minimize the potential premature terminations and mRNA degradation in transcribing excessively long polycistronic gene. In addition as an improvement of previous systems we used orthogonal origins of replication and antibiotic resistance genes to ensure the stable retention of all three plasmids in *E. coli*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：シンセティックバイオロジー、生合成

## 1. 研究開始当初の背景

生物のゲノム上に化合物の生合成遺伝子はコードされているが、天然物としてこれまでに単離されていない二次代謝産物が数多く存在している。その中には他の生物に感染して初めて生産が始まる毒素化合物がある。これらは感染による特定のシグナルを受けると生合成を開始する。従って、こういった化合物の生合成は厳密に制御されており、実験室における一般的な培養条件下では単離することがしばしば困難である。そこで、これまでに単離することができなかった化合物を新たに獲得することを目的として本研究に着手した。

大腸がんは、日本国内では2番目に、米国では3番目に死亡率の高いがんとして報告されている。それにもかかわらず明確な原因が解明されていないため疾患数、死亡者数ともに増加し続けている。近年、病原性大腸菌の研究報告により大腸菌 IHE3034 株などが生産する colibactin が強い変異原性を示すことが明らかになった。本化合物は実験室における一般的な培養条件下では生合成させることが極めて困難であるため、その化学構造は解明されていない。本化合物の化学構造を決定することができれば大腸ガンの治療、予防研究に貢献することができるかと期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは、病原性グループ B2 に分類される大腸菌 IHE3034 株が生産する毒素の化学構造の決定および本化合物を活用した医薬品開発を目的とする。

単離および構造決定を試みる化合物は、上記の大腸菌が二次代謝産物として生合成するコリバクチンと呼ばれる化学構造の不明な分子である (Nougayrède, J. P., et al., *Science* 2006)。本化合物は、大腸菌 IHE3034 株が哺乳類などの真核生物に感染したときに産生されることが確認されている。また、本化合物は極めて低濃度で DNA に不可逆的な損傷を与え、高い変異原性を持つことが明らかにされた。さらに、最近の研究により、本化合物が大腸ガンを引き起こす原因物質であることが示唆された (Cuevas-Ramos, G., et al., *PNAS* 2010)。しかしながら、目的化合物は上記

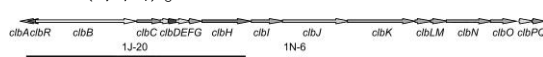
の大腸菌が哺乳類に感染できた時に得られる特定のシグナルを感知しなければ産生されない。従って、実験室における一般的な培養法では目的化合物の生産量が極めて低く、単離することは困難である。ただし、目的化合物の生合成遺伝子はトランスポゾンを用いた変異株作成実験によって既に特定されている (Nougayrède, J. P., et al., *Science* 2006)。この特定された遺伝子の解析結果から、本生合成遺伝子群は全長 53kb からなり巨大かつ複数の酵素遺伝子をコードしていることが明らかとなった。また相同性検索の結果から、ポリケチド合成酵素 (polyketide synthase, PKS) および非リボソーム依存性合成酵素 (nonribosomal synthetase, NRPS) のハイブリッド酵素によって化合物が生合成されると推定された。

上述の通り、分子細胞学的研究によって目的化合物の生合成遺伝子は予測された。しかしながら、未だ化学構造の決定には至っていない。そこで、天然物有機化学と分子遺伝学の融合領域であるケミカルバイオロジーの方法論によって本研究提案期間中にターゲット分子の化学構造を決定する。さらに、得られた化合物を活用することによって大腸ガンの形成メカニズムの解明に貢献できる点は、学術的に大変意義深い研究であると言える。

## 3. 研究の方法

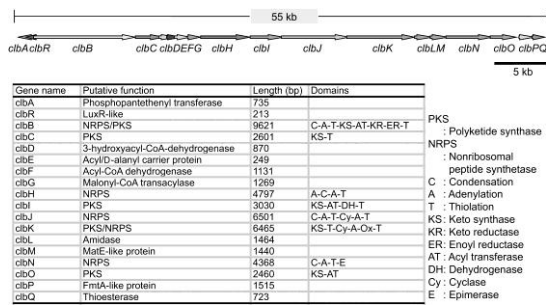
[BAC ライブラリーの構築]

大腸菌 IHE3034 株の染色体を用い BAC ライブラリーを作成した。1J-20 と 1N-6 の二つの領域を含む BAC を取得することに成功した (下図)。



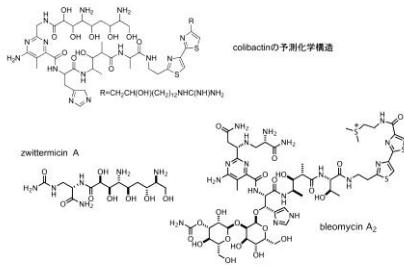
[生合成遺伝子クラスター]

得られたクローンを解析した結果、全長約 55kb、18 種類の読み枠を有していることが推定された。また、colibactin の炭素骨格生合成に関与すると予測される、ポリケチド合成酵素およびペプチド合成酵素群を見出すことができた (下図)。



[生合成遺伝子群から予測した colibactin の化学構造]

相同性検索を用い、本化合物を生合成する遺伝子とすでに報告されている二次代謝産物生合成遺伝子を比較検討することで代謝産物を推測した。その結果、leomycin や zwittermicin 生合成遺伝子と高い相同性を示すことが明らかとなった。また、本化合物は DNA の二重らせん構造を切断する活性があると推測されているが、これは bleomycin の生物活性と同様である。従って、colibactin もフリーラジカルの生成によって DNA を切断すると考えられる(下図)。

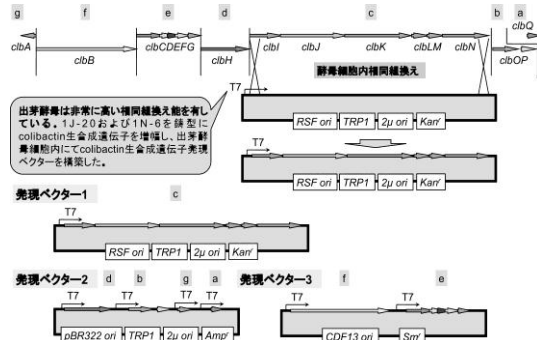


#### 4. 研究成果

[誘導性プロモーターを持つ発現ベクターの作成]

本化合物の生合成には 55 kb を超える巨大な生合成遺伝子群が必要となる。しかし一般的には多数の遺伝子を含んだ巨大遺伝子群を発現させるためのベクターを構築することは難しいとされている。そこで、酵母相同組換えを利用したクローニング法を用いることによって、30 kb を超す巨大な発現ベクターであっても容易に構築可能であると考えた。本方法を用いて互いに異なる抗生物質耐性マーカーおよびオリジンを有した 3 種のプラスミドに、強制発現可能な系で colibactin 生合成遺伝子群をクローニングした。また、先行研究によって本化合物生合成は 7 つのオペロンを形成していることが報告されている。これを参考に

して、オペロン毎にクローニングすることで容易に発現ベクターが作成できると考えた。構築した colibactin 生合成遺伝子発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換した。本形質転換体培養液に isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside を添加して強制発現を行い、現在 colibactin の生産を確認中である。また、培養および誘導条件も合わせて検討中である(下図)。

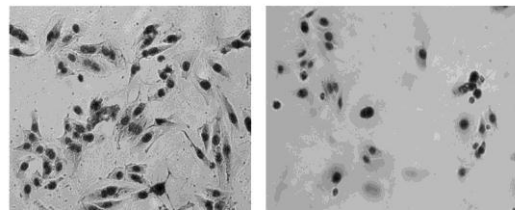


[HeLa 細胞への感染実験]

上で得られた colibactin 全生合成遺伝子を持つ BAC クローンで大腸菌 XL1-Blue を形質転換した後、Hela 細胞へ感染させることで colibactin の生産を試みた。Colibactin 生合成遺伝子を含まない BAC ベクター (control) および colibactin 全生合成遺伝子を含む BAC クローンで大腸菌 XL1-Blue をそれぞれ形質転換した。これらを、5%二酸化炭素下 37°C で 72 時間培養した Hela 細胞に感染させ 4 時間後に細胞の形態を観察した。Colibactin が明確に生産されたとは言えないが、細胞が肥大化し核が変質しているいくつかの細胞を観察することができた(下図)。

Control

BACクローン



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

① 石川格靖、鰐淵清史、野口博司、渡辺賢二

「天然物生合成遺伝子の発現による大腸ガン原因物質の生合成および化学構造の決

定」  
静岡県立大学 USフォーラム、静岡県立  
大学  
2012年09月25日～2012年09月26日

②鰐淵清史  
「サフラマイシン生合成酵素の機能解析」  
日本薬学会 132 年会、北海道大学、札幌市  
2012年03月29日

③鰐淵清史  
「サフラマイシン生合成酵素の機能解析」  
日本農芸化学会 2012 年度大会、京都女子大  
学、京都市  
2012年03月23日

④鰐淵清史  
「サフラマイシン生合成酵素の機能解析」  
生合成若手勉強会、東京工業大学、東京  
2011年12月26日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鰐淵 清史 (ワニブチ キヨフミ)

研究者番号：00613663

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：