

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560450

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) Characterization of genotoxins, colibactin, facilitating inflammation-induced colorectal cancer

研究代表者

渡辺 賢二 (Watanabe, Kenji)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：50360938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：16種類の大腸菌株を培養し分析を行った。コリバクチンを生産することが確かめられているNissle1917も入手し分析に供した。また、これらすべての菌株に対して全ゲノム解析を行った。解析の結果、Nissleをはじめとし、菌株番号3および4にコリバクチン全生合成遺伝子群がコードされていることを確認した。続いて、コリバクチンの検出方法を確立すべく、培養液をLCHRMSで分析したところペプチダーゼClbPによって加水分解されたプロドラックモチーフの質量を菌株番号3, 4およびNissleのみから観測することに成功した。これによってコリバクチンの間接的観測方法を確立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Colibactins are natural products produced by select commensal, extraintestinal, and probiotic *Escherichia coli*. Strains of *E. coli* possessing *clb* gene cluster induce DNA damage in eukaryotic cells and are thought to promote colorectal cancer formation. However, the chemical structure of colibactin as a final product has been covered yet. In this study, we tried to isolate and characterize colibactin and biosynthetic precursor of colibactin from mutated *E. coli* Nissle 1917, which is colibactin producing strain. Spectroscopic analysis of chemical structures of precursors by using NMR, myristol-CoA connected with peptide has been isolated from deficiency of *clbP* (peptidase as a proposed function) mutant of *E. coli* Nissle 1917. Based on the biosynthetic gene cluster responsible for the formation of colibactin, these chemical structures were partially anticipated due to coding for the hybrid polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase in *clb*.

研究分野：天然物化学

キーワード：大腸がん 生合成 遺伝性毒素 大腸菌 腸内細菌層 診断マーカー 脂質 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

大腸がんの患者数は全がん患者のうち日本では2番、米国では3番目に多く、加えて死亡者数の多いがんとして知られている。それにもかかわらず有効な治療法や予防法が確立されていないことが挙げられる。しかし近年、本疾患の原因として病原性大腸菌 IHE3034 の感染が疑われるようになった (Cuevas-Ramos, G., et al., PNAS, 2010)。この病原性大腸菌は強力な毒素コリバクチンを産生し、これが腸上皮細胞のがん化を誘発すると報告された (Arthur, J. C., et al., Science, 2012)。しかしながら、この大腸がん原因物質であるコリバクチンは大腸菌 IHE3034 が哺乳類細胞に感染してはじめて生産されるため、単離は困難とされ、未だ部分構造すら明らかにされていない。化学構造が不明な現状ではコリバクチンによる詳細な大腸がん発症メカニズムの解明や、治療法および予防法の確立は困難と言える。

大腸菌 IHE3034 が生産するコリバクチンは、**大腸菌 O-157 が生産するペロ毒素と治療および予防法を考える上で類似している。つまり、コリバクチンが体内から検出された場合、大腸がんになるリスクがあると診断できる点でバイオマーカーとなる。**一方で PCR によって大腸菌 IHE3034 を検出し抗生物質などによって死滅させることができればリスクを軽減できるが、コリバクチンが体内に残存する可能性がある。従って、**本化合物を有機化学的に明らかにした後、この化合物を不活化させる方法を見出す必要がある。**本化合物の存在を報告したグループによってコリバクチン生合成遺伝子群を特定するに至ったが (Nougayrède, J. P., et al., Science, 2006)、本生合成遺伝子は全長 54kb を超える巨大な遺伝子群を形成しており、従来までの発現方法では目的化合物を生合成させることはできないであろう。そこで我々は、これまでの知見 (Watanabe, K., et al., PNAS, 2003, Nature Chemical Biology, 2006, JACS, 2009) を活用し立体化学を含む化学構造の決定を試みる。本化合物と同様に微量成分であるため単離構造決定されていない化合物が数多く存在している。本来はこういった高い生物活性を有する化合物こそ有望な医薬品リードとなり得るのだが、従来手法では目的化合物を獲得することは困難であり、現在、微量天然物の新規生産方法の開発が求められている。

2. 研究の目的

大腸がん原因物質と予測されているコリバクチンの立体化学を含む化学構造を決定し、効果的なバイオマーカーとする。コリバクチンは大腸菌 IHE3034 株が哺乳類細胞に感染した後、哺乳類細胞からの何らかのシグナル物質によって誘導される化合物であると予測

されている。従って、本化合物の単離は困難であり、未だ部分構造すら明らかにされていない。しかしながら、大腸がん発症患者の 66.7% から本菌が検出されている (Arthur, J. C., et al., Science, 2012)。そこで我々は、本化合物の正体を有機化学的に明らかにし、大腸がん形成メカニズムの解明および予防のためのバイオマーカーとする。

3. 研究の方法

我々はコリバクチンの化学構造を推測し、その合成物を既に取得している。採取した糞便試料中のコリバクチンを正確に定量する目的で、LC-MS を用いた分析法の精度・感度を検証し、次年度以降の定量分析へと繋げる。具体的には、化学合成によって調製したコリバクチンを用いて、糞便試料からの回収率、分析の変動係数、検出限界・定量限界、保存条件による安定性などを確認し、最適な LC-MS 定量分析条件を確立する。PCR 法にてコリバクチン生合成遺伝子を検出するプライマーについては既に設計済みであり、関連研究で使用している。

3 種のコリバクチン生産菌 (Nissle1917、菌株 3、菌株 4) についてマウス投与による発がん解析を検討する準備を行った。

[検討 1] コリバクチンの配列 (クラスター全長、各 gene 等) のデータベースを入手し、プライマー設計を行った。また、コリバクチンの配列を大腸菌以外の菌および種における相同性検索を実施中である。大腸菌以外に存在する場合は、大腸菌のみにしぼった研究から、対象を広げるべく研究計画の追加を提案する予定である。

[実験 2] In Vivo の検討の前に、個体における腸管上皮細胞の状態を反映していると考えられる、マトリゲルを用いた 3 次元培養の実験系を構築した。Min マウス腸ポリープ由来細胞の 2 次元における培養に成功し、現在も継代中である。この細胞を 3 次元培養したところ、細胞一層からなるオルガノイドを作成することに成功した。今後は腸管内腔を示すと考えられるオルガノイド内部にコリバクチン生産菌およびコリバクチンそのものを投与することにより、形態や mRNA 発現の変化を検討する予定である。

[実験 3] 最終的には三種のコリバクチン生産菌をマウスに生着させ、大腸発がんへの影響を観察することを目的としているため、まずは腸ポリープの多発する家族性大腸腺腫症のモデルマウス、Min マウスの糞便にコリバクチン産生菌がいるかを 20 週齢になるまで検討することにした。毎週、糞便を採取し、解析するためにサンプルを三好班員に郵送した。コリバクチン産生菌がいない場合は、菌やコリバクチンそのものをマウスに投与する理想的な実験系になると思われる。また、コリバクチン産生菌がいた場合も腸ポリープ数とコリバクチン産生量との比較や、除菌

した場合の腸ポリープ数とコリバクチン産生量との比較ができると考えている。

4. 研究成果

16種類の大腸菌株を購入した。また、コリバクチンを生産することが確かめられている Nissle1917 も入手した。これらすべての菌株に対して全ゲノム解析を行った。解析の結果、Nissle をはじめとし、strain3 および 4 にコリバクチン全生合成遺伝子群がコードされていることを確認することができた。続いて、コリバクチンの検出方法を確立すべく、培養液を LCHRMS で分析したところ右図に示したようにペプチダーゼ CibP によって加水分解されたプロドラックモチーフ (m/z+343.2591) を strain3, 4 および Nissle のみから観測することに成功した。これによってコリバクチンの間接的観測方法を確立することができた。

[マウス投与による発がん解析結果]

コリバクチン生産菌が生着するかを検討するために、生後1日目の仔鼠の肛門に菌を塗り付ける検討および口周囲に塗り付ける検討に代表される感染経路の検討を行った。生着の評価は糞便解析で行う予定であるため、コリバクチン生産菌に GFP を発現させるプライマーの設計を行った。個体としての評価であるが、表現系(マウスの生死、健康状態(便の状態・体重変化など)、腸管におけるがん化の評価、等々)の違いを現在観察している。

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 6件)

1. 佐々侑寿香、石川格靖、小山ふみ、福富愛実、野口博司、渡辺賢二：大腸がん原因物質コリバクチンの生合成機構の解明、日本薬学会第135年会(神戸市)、2015年3月25-28日
2. 佐々侑寿香、石川格靖、小山ふみ、福富愛実、野口博司、渡辺賢二：大腸がん原因物質コリバクチンの生合成機構の解明、日本農芸化学会2015年度大会(岡山市)、2015年3月26-29日
3. Kenji Watanabe, "Genetic indoctrination of Escherichia coli for finding genotoxins colibactin facilitating inflammation-induced colorectal cancer" US-Japan Cooperative Medical Sciences Program Cancer Panel Meeting, Seoul, Republic

of Korea, 02/07-02/10/2017.

4. 恒松雄太、平山裕一郎、榎谷貴洋、松崎信生、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、若林敬二、武藤倫弘、村上晴香、宮地元彦、石川秀樹、渡辺賢二：腸内細菌叢を起源とする遺伝毒性物質コリバクチンの科学分析手法の確立と日本人コホートにおける発がんとの関連性の解析、第24回日本がん予防学会(大阪)、2017年6月16-17日
5. 恒松雄太、平山裕一郎、榎谷貴洋、松崎信生、佐藤道大、吉川悠子、三好規之、若林敬二、武藤倫弘、村上晴香、宮地元彦、石川秀樹、渡辺賢二：Characterization of genotoxins "colibactin" facilitating inflammation-induced colorectal cancer, 第76回日本癌学会(横浜)、2017年9月28-30日
6. 渡辺賢二：腸内細菌叢を起源とする遺伝毒性物質コリバクチンの科学分析手法の確立と日本人コホートにおける発がんとの関連性の解析、第90回日本生化学会大会(神戸)、2017年12月6-9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

<http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺賢二 (WATANABE, Kenji)

研究者番号 : 50360938

静岡県立大学・薬学部・教授

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()