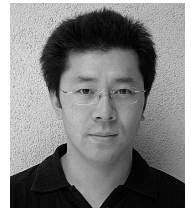


《農芸化学奨励賞》



生合成機能の高度異種発現に基づく次世代物質生産

University of Southern California 薬学部 薬科学科 助教授 渡辺 賢二

はじめに

現在医薬品として用いられている化合物の約半数は天然物誘導体であり、それらはリード化合物と呼ばれる天然物を改変し、さらに高生物活性が付与され、副作用が軽減された化合物である。リード化合物の中には、放線菌由来二次代謝産物として生産された複雑な構造をもつ天然物が多く含まれる。これら化合物の供給法に関しては現在以下の3種の方法が広く知られている。(1)微生物を培養して化合物を得る培養法、(2)有機合成を駆使する全合成、(3)部分構造となる化合物を培養法で得て、これを有機合成化学的に変換して最終生成物へと導く半合成による方法である。しかし、これらの方法には問題点がある。例えば、培養法では生産起源である微生物の培養が困難であったり、目的化合物がごく微量しか得られない場合がある。また、構造が複雑な天然物の有機合成では一般に多段階を要するので、現実的な供給手段とはなりにくく、さらに環境に対する負荷も大きい。そのため、これらに変わる化合物生産法の開発が強く求められており、その一つとして生合成酵素遺伝子の異種発現による生産法に対する期待が高まっている。

1. ポリケタイド合成酵素および非リボソーム依存性ペプチド合成酵素

臨床で重要な薬剤であるエリスロマイシン、リファマイシン、バンコマイシンなどの放線菌由来の抗生物質(図1)は、優れた薬理効果をもつためにさまざまな誘導体が合成され、構造活性相関研究がなされてきた。構造決定後多くの研究者によって全合成研究が行われたが、最近になってこれらを放線菌の菌体内で生合成する酵素遺伝子も特定された。これらの生合成に必要な複数の遺伝子は、遺伝子クラスターと呼ばれ、染色体上のはぼ1カ所に固まって存在する。解析の結果、エリスロマイシン、リファマイシンなどの化合物はモジュラーポリケタイド合成酵素 (type I polyketide synthase; type I PKS), バンコマイシンなどの化合物は非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) によって生合成されていることが示された。PKSとNRPSによって生合成される炭素骨格は脂肪酸合成酵素に類似した反応機構で主鎖が伸長する。PKSの中でもtype I PKSは、モジュール(それだけで酵素活性をもち生成物を与えられる巨大な酵素)が複数個からなる点が特徴である。モジュールには基本ドメインであるケト

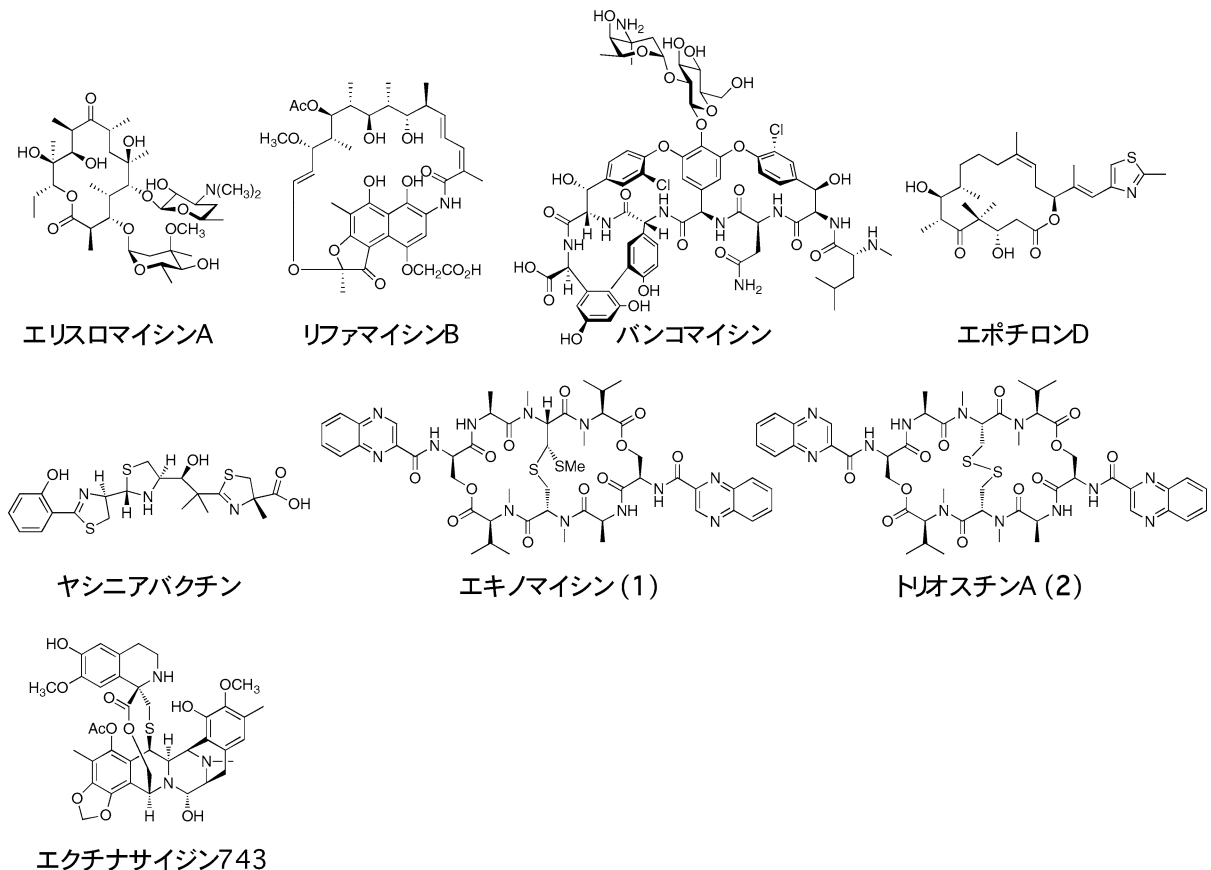


図1 ポリケタイド合成酵素および非リボソーム依存性ペプチド合成酵素によって生合成される有用天然物の化学構造

シンテース (KS), アシルトランスフェラーゼ (AT), アシルキャリアアプロテイン (ACP) の少なくとも 3 個のドメインが存在し、開始単位にプロピオニル-CoA および伸長単位にマロニル-CoA, メチルマロニル-CoA などを用い、アシル側鎖を伸長する機能が備わっている (図 2a). 生合成産物の構造から、各モジュールは異なった鎖長および異なった立体化学の基質を認識することが知られている. 一方, NRPS も type I PKS と同様に、モジュールが複数個からなる巨大な酵素である. モジュールはアミノ酸が縮合する回数だけ存在し、アミノ酸を基質として、少なくとも縮合 (C), アデニル化 (A), チオレーション (T) の 3 個の触媒ドメインによりアミド結合形成反応を触媒する (図 2

b).

これらモジュラー型酵素は、独立した機能をもつモジュールの挿入、除去および入れ換えにより、化学合成の場合と同様最終生成物の構造を予想可能な形で合成できることが反応機構から容易に推定できる. 実際 PKS ではこうした変換が実現している. このような機能改変酵素を自在に作製するには、遺伝子操作法が確立した大腸菌を用いるのが効率的である. しかし、Type I PKS および NRPS の一つのモジュールは 4~5 kb と遺伝子サイズが大きく、さらに複数個存在する場合がほとんどであるため、以前から異種発現は困難であると考えられていた.

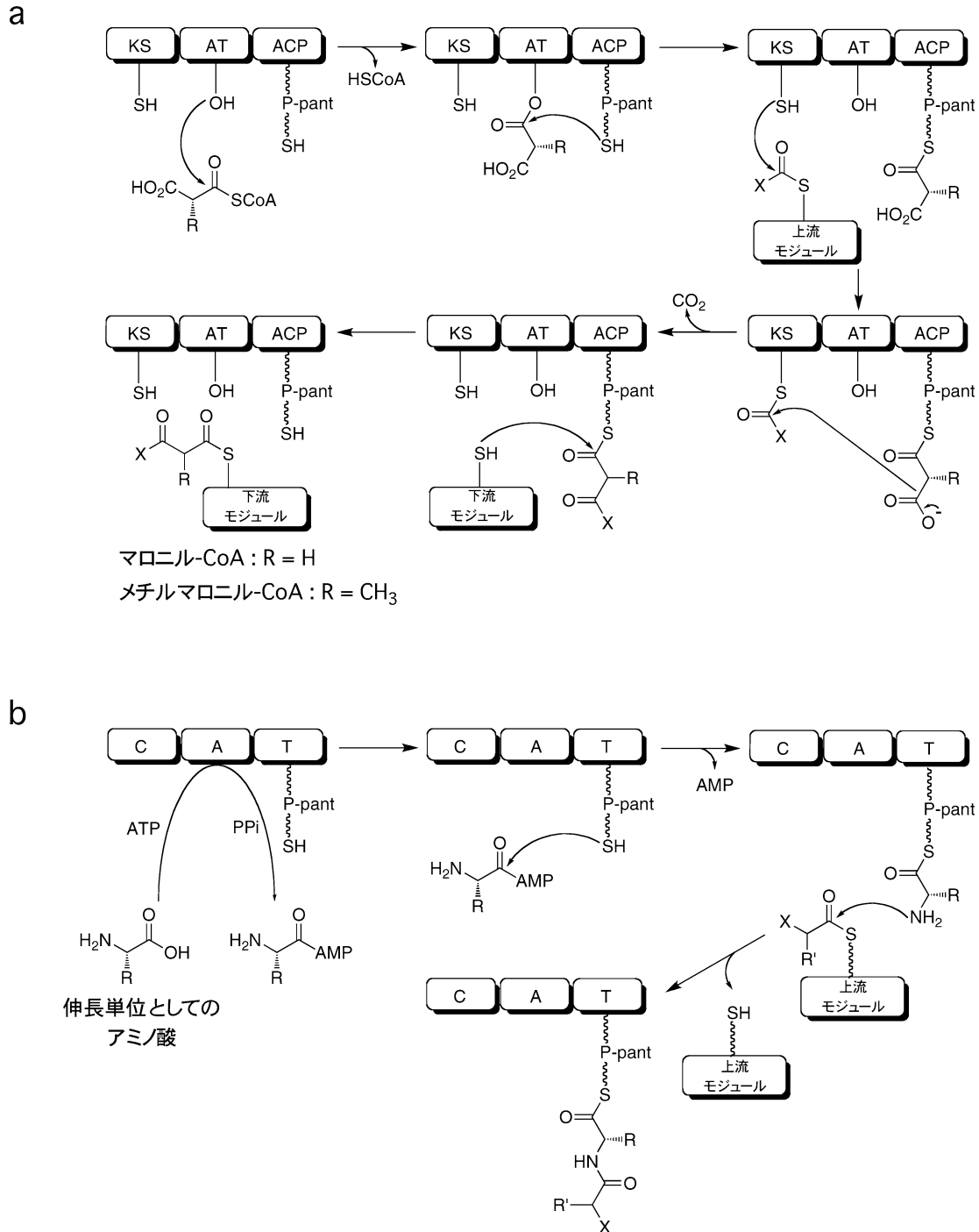


図 2 (a) Type I PKS におけるアシル基伸長反応, (b) NRPS におけるペプチド鎖伸長反応
KS, ケトシンテース; AT, アシルトランスフェラーゼ; ACP, アシルキャリアアプロテイン; C, 縮合ドメイン; A, アデニル化ドメイン; T, チオレーションドメイン.

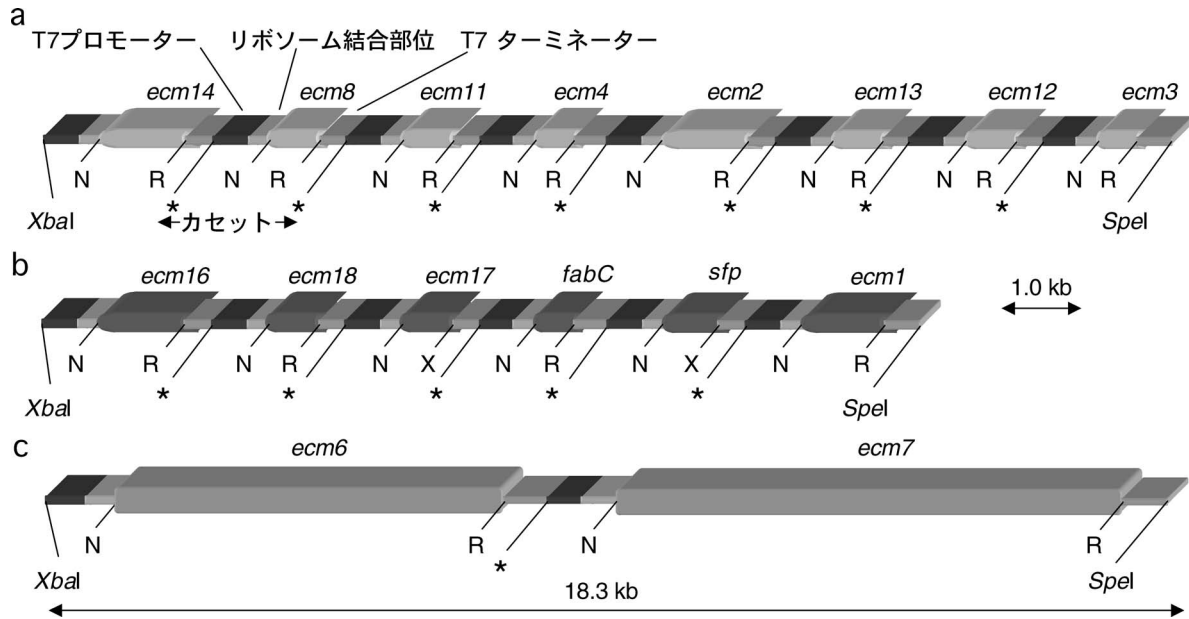


図5 発現ベクター制限酵素地図

(a) キノキサリン-2-カルボン酸生成遺伝子発現ベクター. (b) 修飾酵素遺伝子発現ベクター. (c) NRPS 遺伝子発現ベクター. *sfp*, ホスホパンテテニル基転移酵素遺伝子; *ecm16*, 耐性遺伝子; N, *NdeI*; R, *EcoRI*; *, *XbaI/SpeI*; X, *XhoI*.

デル生物として研究され続けてきたために、多くのプラスミドベクターやさまざまなゲノタイプをもった大腸菌が容易に入手できる。それらの中から適切な発現システムを選び出し、上記生成遺伝子すべてを発現ベクターに組み込むために互換性制限酵素連続ライゲーション法を開発した(図5)。この手法は、放線菌の読み枠のGC含量が極めて高いことに着目して考案された。その読み枠には、制限酵素 *NdeI* (CATATG), *EcoRI* (GAATTC), *XbaI* (TCTAGA), *SpeI* (ACTAGT) の認識部位がまれにしか存在しない。したがって生成遺伝子のほぼ全ての読み枠に対して *NdeI* を開始コドン側, *EcoRI* を終止コドン側に作成し、個々の読み枠を含む発現ベクターを作成することができる。次に、プロモーターのさらに上流部に *XbaI*, またターミネーターのさらに下流部に *SpeI* を導入し、*XbaI-SpeI* をカセットとする発現ベクターを作成する。*XbaI* と *SpeI* の切断部位がライゲーション可能であり、いったんライゲーションすると両制限酵素によって切断されないことを利用し、個々の読み枠を含んだ *XbaI-SpeI* カセットを繰り返しライゲーションすることで、複数の読み枠を一度に発現することができるベクターの構築が可能となった。得られた発現ベクターは各読み枠に対してプロモーター、リボソーム結合部位およびターミネーターを連結させているので、すべての遺伝子を安定に発現させることができる。

さらに、これら一連の操作によって生成可能となったエキノマイシンは、宿主である大腸菌に対して毒性を示すため、これを克服することが必要であった。一般に抗生物質生産菌は自らが生産した抗生物質に対して何らかの耐性機構をもち合わせていることが知られているが、エキノマイシン生成遺伝子クラスターの中にも耐性遺伝子と推定される遺伝子を見いだすことができた。そこでこの遺伝子も合わせて大腸菌に導入したところ、得られた大腸菌の培養によりエキノマイシンの生成が確認された。したがって発現された合計16個の生合成酵素は天然に存在する生合成酵素と同じ機能をもつこと、大腸菌内で前

駆体を添加することなくエキノマイシンの *de novo* 合成に成功したことが証明された。こうした取り組みを「化学と生物」誌の2006年9月号にて解説する機会を与えられましたので、ご一読いただければ幸いです。

おわりに

天然からではごく微量しか得られない希少化合物の供給には有機合成が大きな役割を果たしてきたが、構造の複雑な天然物に限って言えば、有機合成での供給はコストが高い、環境に対する負荷が重い、高度な知識と技術が要求されるといった問題がある。一方、大量供給が困難な天然物の生合成酵素遺伝子が特定され、大腸菌などの培養の容易な微生物で発現させることができれば、現在よりもはるかに容易に生合成産物を得ることが可能となるであろう。例えば海洋生物は培養が困難であるが、エクチナサイジン743(図1)のように海洋生物から単離される天然物の中には優れた生物活性をもつものが含まれる。それらの生合成遺伝子が明らかにされれば、その発現による化合物生産の道が拓かれるであろう。また、リード化合物としての生物活性物質はさらに優れた薬効の獲得あるいは副作用の低減を目的として有機合成的に構造を変換させた後、実際の医薬品となる場合が多い。もし変異導入により生合成酵素を自在に改変できれば、当該遺伝子が大腸菌などの適切な宿主で発現させることによって、天然には存在しない上記目的にかなったさまざまな誘導体を生産することも容易となる。さらに、交換可能な部品であるモジュールで構成されるPKSやNRPSなどの酵素の場合、さまざまなモジュールを人工的に組み合わせることにより、多種多様な非天然型天然物を作製することも可能である。また、個々の生合成反応の順序を入れ換えたり、水酸基、アシル基や糖鎖の導入などを行うことで、官能基の位置や種類が天然物とは異なる誘導体の生合成もできると期待される。有機合成と比較して発酵法の大きな利点の一つは、いったん生合成システムが構築されれば、もはや特別な知識と技術を必要とすることなく、数日間培養するだけでこれらの希少化合物を得

られることにある。さらに有機合成と異なり、特別な工夫せずとも生合成産物はすべて光学活性体であることも大きな利点である。これまでのところ生合成遺伝子発現による効率的な物質生産には至っていないが、近い将来に生産収量の向上およびさらに多数の化合物の生合成が達成され、一つの物質生産法に発展すると考えられる。

本研究は、南カリフォルニア大学薬学部薬科学科で行われたもので、また北海道大学大学院理学研究院の及川英秋教授との共同研究であります。及川教授には私が学部生以来ご指導ご鞭撻を賜り、さらには本奨励賞にご推薦くださいましたことに、深甚なる感謝の意を表明いたします。私をこのような研究分野

にお導きくださいました元 北海道大学大学院農学研究科教授の本間 守先生、同大学名誉教授の市原耿民先生に謹んで御礼申し上げます。昼夜を問わず一緒に実験に励んでくれた学生の皆様に心より御礼申し上げます。本研究において必要となる知識と技術をお与えくださり、論文作成時には貴重なご意見をいただきました、スタンフォード大学 Chaitan S. Khosla 教授、ウイスコンシン大学マディソン校名誉教授 Charles Richard Hutchinson 博士、ハーバード大学 Christopher T. Walsh 教授、ブラウン大学 David E. Cane 教授、ワシントン大学名誉教授 Heinz G. Floss 博士に心より感謝申し上げます。最後に、ご支援をいただきました選考委員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。