

住木・梅澤記念賞受賞講演会記録

2014年10月6日, 学士会館320号室

【2014年度受賞講演, 座長: 中田雅也】

抗生物質の化学構造多様性を生み出す酵素の発見と それら酵素による生物的全合成

渡辺賢二

静岡県立大学薬学部

1. はじめに

これまでに多くの生物活性物質が天然から単離され, それらをリードとした医薬品が市場に送り出されてきた。一方で, 極めて有用な活性を持つ天然物が, 生産起源からの生産量が極めて低いあるいは生産起源が培養できないなどの理由によって必要十分量供給できない場合が存在する。天然物はすべて生合成酵素によって作られるため, こうした酵素遺伝子を入手し発現することができれば, 供給に大きな問題のある有用海洋天然物などを安定に生産できる可能性もある。我々は有用天然物の生合成遺伝子群を大腸菌, 出芽酵母, 糸状菌を発現宿主として用い, 複雑な構造を有する化合物の生産を達成してきたのでそのいくつかを紹介する。また一方で, 現状では新規天然物の獲得が益々難しくなっている。その理由としては, (1) 長い歴史の中で数多くの天然物が探索され, 既に発見されてしまったこと (2) 採集できる生物, 培養できる微生物は限られた一部の種であることから, これらが化合物多様性の限界となっ

ていることなどが挙げられる。最近の研究開発によって難培養微生物の培養技術も着々と向上しつつある。しかしながら, 新規天然物を獲得するためのこういったアプローチは決して真新しいものではなく, どちらかと言えば伝統的な天然物化学の研究手法であると言える。

近年のゲノム解析の目覚ましい進展によって, 多くの生物の遺伝子情報を容易に手に入れられるようになった。例えば糸状菌に関しては, 遺伝子情報およびこれまでの分子生物学的研究結果から, 実験室における一般的な糸状菌の培養法では二次代謝産物生合成遺伝子の転写活性は低いことが明らかとなった。実際に糸状菌 *Aspergillus flavus* では, 55種類の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが染色体上にコードされていることが示されているが, 生成物である天然物が単離され生合成経路が明らかとなっているのは数種類のみである。また, 特定の培養条件に限られるが本菌種のトランスクリプトーム解析の結果からも, 二次代謝産物の生合成を司る遺伝子群の転写活性が低いことも示唆されている。つまり, 糸状菌のゲノム上に生合成遺伝子はコードされているが天然

物として生産を確認できない化合物が多数存在すると考えられる。そこで我々は、糸状菌が持つ潜在的な二次代謝産物生合成能力を活用することで新規天然物の創製および得られる化合物の生合成機構の精密解析が可能となれば天然物化学に新しい方法論を付け加えられると考えた。しかしながら、遺伝子クラスターの転写活性が極めて低い場合、その生合成遺伝子のmRNAを単離しcDNAを合成することは困難である。そこで、転写されていないと推定される目的生合成遺伝子の転写因子を糸状菌菌体内で発現できれば、転写活性を増大させることができるのではないかと考えた。あるいは、こういった生合成遺伝子がエピジェネティクス制御により転写活性が低い場合は、クロマチン構造の改変によって転写活性を増大させることができる。これらの手法を組み合わせることで、新規化合物の単離へと繋がる。さらに、目的生合成遺伝子のcDNAを獲得することができれば、遺伝子工学的な異種発現システムの確立された出芽酵母を用い、精製酵素による*in vitro*合成系で新規化合物の生合成に関する精密機能解析^{1~3)}も達成されるであろう。

現代においても新たな新規天然物を取得するこ

との学術的、産業的な重要性は不変である。このような状況の下、天然物の生合成遺伝子を用いた化合物の獲得を目指す新しい融合研究分野であるシンセティックバイオロジー（合成生物学）による取り組みが行われている。本講演では、休眠型生合成遺伝子クラスターの活性化および天然物生合成遺伝子の異種発現系による生物合成と酵素機能解析に関して得られた我々の研究結果も紹介する。

2. 抗生物質リファマイシンの前駆体生合成

Rifamycin, ansamitocin P-3, geldanamycinはその構造中に芳香環もしくはナフトキノンを持ち、ポリケタイド鎖がアミド結合により環化したラクタム構造を持つアンサマイシン系ポリケタイドに分類される。放線菌が生産するこれらポリケタイドは抗生物質あるいは抗ガン剤のリード化合物として使用され極めて有用である。特にrifamycinの誘導体であるrifampicinは1960年代以来、結核など感染症治療薬として使用されてきた。さらにrifapentine, rifaximinといった主にC-3位に関するrifamycin誘導体が合成され、薬剤耐性病原微

図1. アンサマイシン系ポリケタイドの化学構造

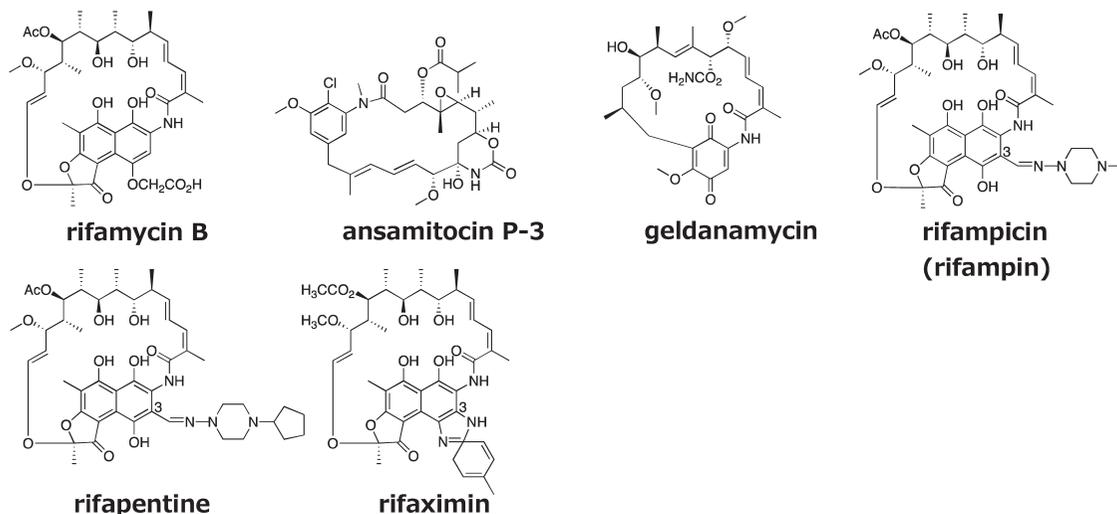


図2. AHBA推定生成経路

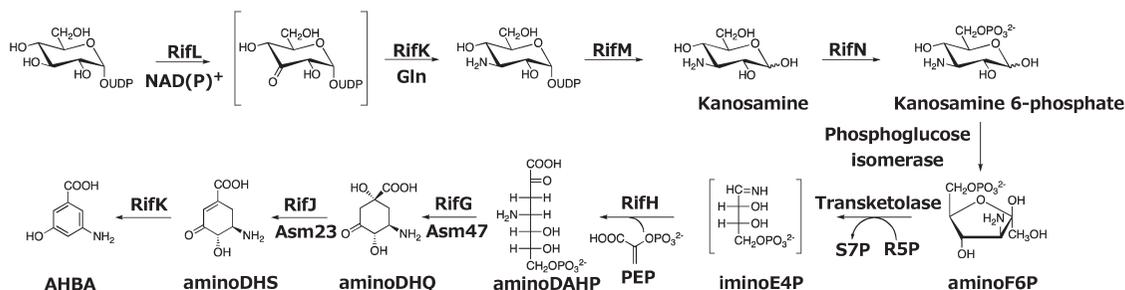
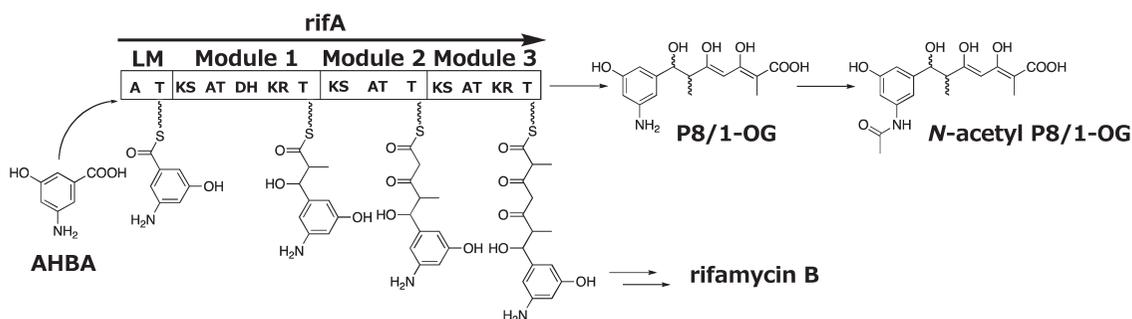


図3. P8/1-OGおよびN-acetyl P8/1-OG生合成



生物に対して使用されてきた (図1)。

Rifamycinのポリケタイド炭素格は、1つのnonribosomal peptide synthetase (NRPS)-like loading moduleと10個のポリケタイド鎖伸長moduleにより生合成され、さらに相同性検索によってamide synthaseと予測されているRifFで環化されると考えられている。我々は、アンサマイシン系ポリケタイドの開始単位である3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA)の生合成に必要な7つの遺伝子(図2)、ならびにrifamycin生合成遺伝子中で最も大きく、発現タンパク質として確認することができなかったrifAを同時に大腸菌で発現し、その生合成産物であるP8/1-OG [2,6-dimethyl-3,5,7-trihydroxy-7-(3'-amino-5'-hydroxyphenyl)-2,4-heptadienoic acid] およびN-acetyl P8/1-OG⁴⁾の生物合成に成功した(図3)。

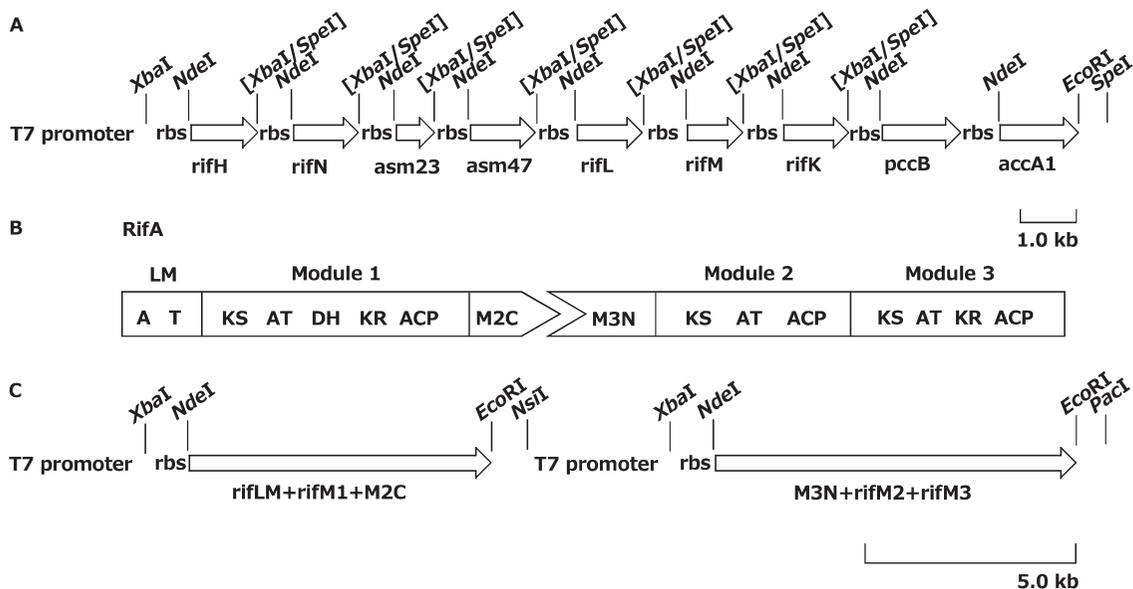
2-1. AHBA生合成遺伝子発現ベクターの構築

AHBAは、UDP-glucoseを出発基質としRifLに

より酸化、RifKによりglutamineからアミノ基を導入された後、RifMによりkanosamineを生合成し、さらにRifNによりリン酸化され、phosphoglucose isomeraseにより3-amino-3-deoxy-D-fructose 6-phosphate (aminoF6P)を、続いてtransketolaseにより1-imino-D-erythrose 4-phosphate (iminoE4P)を生合成すると予測されていた。IminoE4PはRifHにより3,4-dideoxy-4-amino-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate (aminoDAHP)、RifGによる環化反応で5-amino-5-deoxy-3-dehydroquinic acid (aminoDHQ)を、さらにRifJにより5-amino-5-deoxy-3-dehydroshikimic acid (aminoDHS)、そしてRifKによりAHBAを生合成すると予測され(図2)、このiminoE4PからAHBAまでの生合成は、shikimic acid生合成と類似しており大変興味を持たれた。

まずはじめに、これら生合成遺伝子rifG、-H、-J、-K、-L、-M、-Nをそれぞれ単独で発現させ、その発現を確認したところ、rifG、-Jを除く5種生合成遺

図4. (A) AHBA生成遺伝子発現プラスミドマップ; (B) RifAの再構築; (C) 発現プラスミドマップ



伝子の発現は確認された。そこで ansamitocin P-3 開始単位の生合成遺伝子で相同性検索の結果 rifG および rifJ とそれぞれ 71% および 53% の相同性を示した asm47 と asm23 の発現を試みた。その結果、asm47 と asm23 両者はそれぞれ単独で発現することが確認された。大腸菌はポリケチド生合成における伸長単位である methylmalonyl-CoA の生合成経路を持たないため、その生合成に必要なとなる propionyl-CoA carboxylase をコードした pccB および accA1 を発現させるためのベクターを構築し、それらの発現を確認した。次に大腸菌を用い AHBA を生合成させるため、上記 7 つの AHBA 生合成遺伝子と 2 つの methylmalonyl-CoA 生合成遺伝子をつ一つの T7 promoter による制御下で、各生合成遺伝子の上流部に ribosome binding site (rbs) を連結し、一つの T7 terminator で転写を終結させるオペロンを構築した (図 4A)。

2-2. rifA 発現ベクターの構築

RifA は開始単位取り込みに必要な nonribosomal

peptide synthetase-like loading module と三つのポリケチド鎖伸長 module からなり、全長 15 kbp、その翻訳産物である巨大 polypeptide は 530 kDa であることが知られている (図 2)。これまでこの巨大生合成遺伝子の発現は大腸菌による発現は不可能であった。そこで rifA を RifLM+RifM1 と RifM2+RifM3 の二つの別々の polypeptide として発現させた後、その機能の再構築を試みた。

二つの polypeptide として発現させた後、機能を再構築させるため rifamycin 生合成遺伝子と同様に巨大ポリケチド合成酵素を翻訳産物に持ち、詳細な研究がなされてきた erythromycin 生合成における polypeptide linker を用いた。ポリケチド合成酵素は、それぞれの polypeptide 内に存在する intra-polypeptide linker と、特定の polypeptide 間の親和性を上昇させる inter-polypeptide linker の 2 種の linker を持つ。これらの機能により基質とその生成物が module 間を効率よく chain transfer されると考えられている。今回の実験では erythromycin 生合成遺伝子にコードされている一

組の inter-polypeptide linker を用いた (図 4B)。RifA を RifLM+RifM1 と RifM2+RifM3 の二つの polypeptide に分け、前者 C 末端側に erythromycin 生合成 module 2 の C 末端側 inter-polypeptide linker (M2C) を、後者 N 末端側に同じく module 3 の N 末端側 inter-polypeptide linker (M3N) を連結させることで、その一対の inter-polypeptide linker が持つ親和性を利用し、発現された両 polypeptide が互いに親和性を持つように発現ベクターを構築した。以上の操作により、二つの T7 promoter によって発現の制御を受け、二つの rbs, T7 terminator を持つ rifA 発現ベクターを得た (図 4C)。

2-3. AHBA 生合成遺伝子の発現および生合成

得られた発現ベクターを用いた形質転換大腸菌を培養し、培養液から生合成産物を得た。本化合物は ESI-MS より分子量 176 を与え、¹H NMR および ¹³C NMR より AHBA と確認された。従って得られた AHBA 生合成遺伝子発現ベクターは、組み込まれた合計 9 つの ORF 全てが、機能を持つタンパク質として発現されたことを示した。我々の詳細な研究により大腸菌を用いた実験においては、開始単位の類似基質として加えられた benzoic acid および 3-hydroxybenzoic acid は大腸菌の菌体内へ取り込まれるが、AHBA は取り込まれないことが確認されている。AHBA はラクタム環形成において必要不可欠であり、AHBA 生合成を大腸菌で可能にしたことは、以後の rifamycin 生合成研究にとって大きな成果となった。

2-4. rifA の発現 および P8/1-OG と N-acetyl P8/1-OG の生合成

rifA の発現は大腸菌 BAP1 を使用した。BAP1 は apo-acyl carrier protein (apo-ACP) を holo-ACP に変換するために必要な酵素 phosphopantetheinyl transferase をコードした sfp 遺伝子を BL21 (DE3)

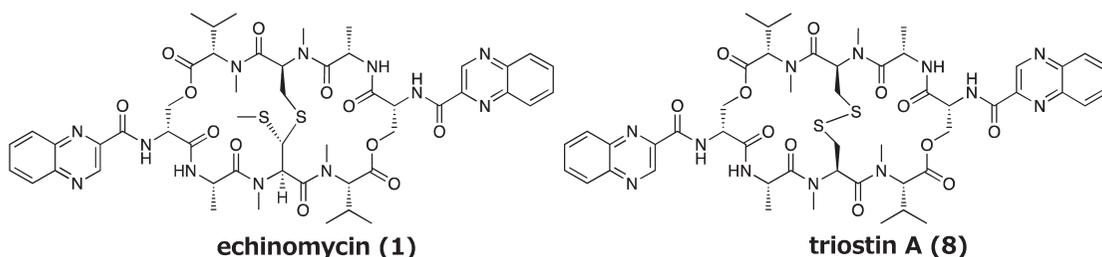
の染色体に組み込んだ大腸菌である。rifA 発現ベクターと AHBA および methylmalonyl-CoA 生合成遺伝子の発現ベクターを共発現し、ファーマンターを用いた培養で 2L の培養液から 2 種の生合成産物を分離精製した。本化合物は ESI-MS より分子量 292 および 357 を与え、¹H NMR より P8/1-OG および N-acetyl P8/1-OG と確認され、二つの別々の polypeptide として発現された RifA は天然に存在するタンパク質と同じ活性を持つことが示された。従って合計 11 個の ORF は全て発現され天然と同様の機能を持ち、これら生合成酵素によって P8/1-OG を生合成することが証明された。

我々の知見はポリケタイド生合成研究における、大腸菌を用いた場合の巨大遺伝子の発現、それによって得られる発現タンパク質を用いた酵素化学的研究および生合成産物の取得を可能にした。

3. 抗腫瘍性生物活性物質エキノマイシンの生物全合成

Echinomycin (図 5), vancomycin, bleomycin A2, cyclosporin A, gramicidin S, tyrocidine A 等の化合物は、複雑な構造とその多様性から様々な生理活性を持つ天然物である。天然においてこれらの化合物は、NRPS によって生合成されることが知られている。多くの NRPS は、複数の酵素が繋がったモジュールと呼ばれる基本単位複数個からなる巨大ポリペプチドである。モジュールはアミノ酸が縮合する回数だけ存在し、その機能は L-アミノ酸を基質とし、少なくとも condensation (C), adenylation (A), peptidyl carrier protein (PCP) 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ことにある。遺伝子工学的手法を用い、ドメイン変換あるいは異なった起源のモジュールを組み合わせることで、様々な

図5. Echinomycin と triostin A の化学構造



NRPSを作製し、さらに構造の複雑な優れた生理活性を持つ非天然型化合物の生合成が期待されている。

我々はこれまで遺伝子工学的手法を用いた生合成研究の報告例がなく、depsipeptideの一つで抗腫瘍性抗生物質として広く知られる echinomycin (1) に注目し、その全生合成遺伝子のクローニングおよび生合成に必要な合計16個の生合成遺伝子を同時に大腸菌で発現し、echinomycinの生物全合成を達成した⁵⁻⁹⁾。

3-1. Echinomycin 全生合成遺伝子のクローニング

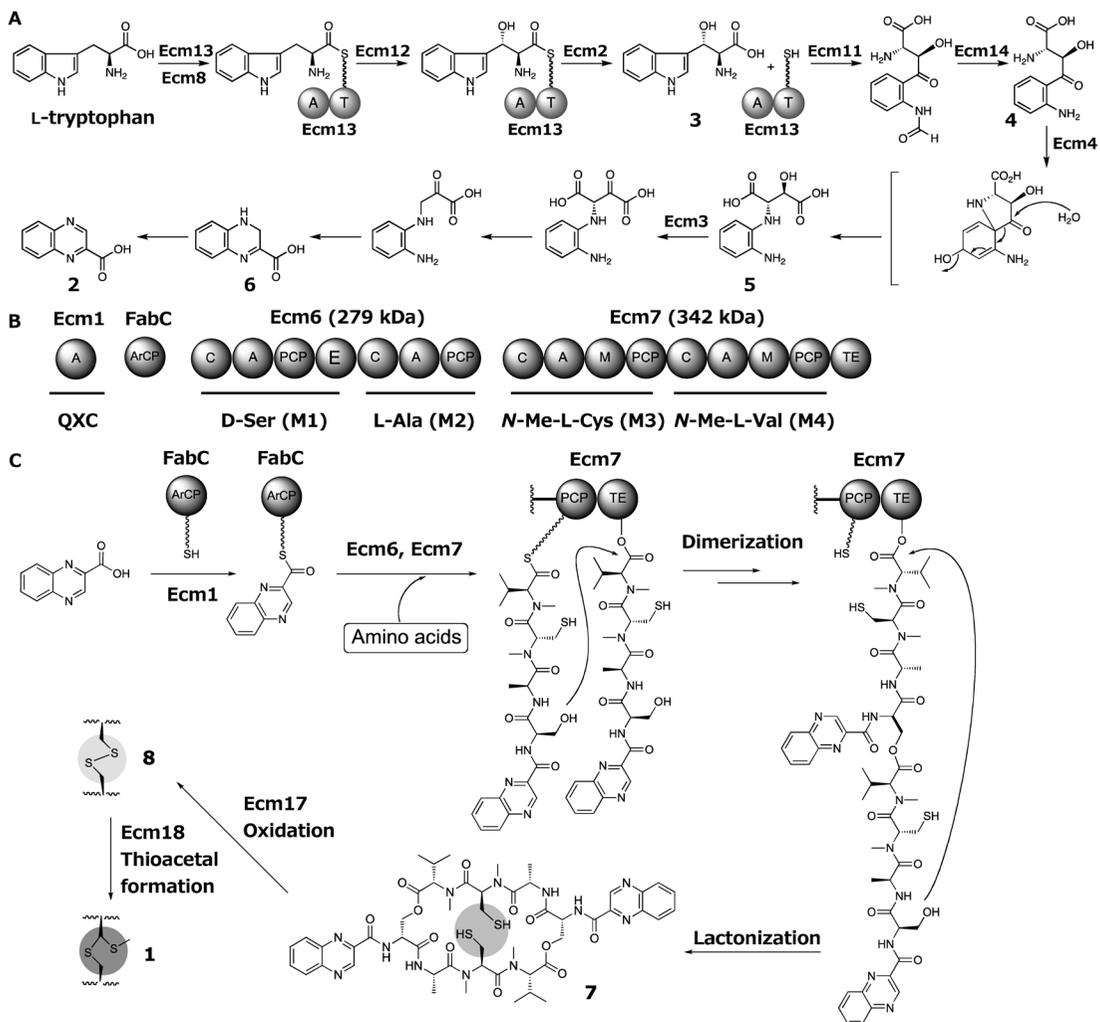
Echinomycin 全生合成遺伝子は *Streptomyces lasaliensis* の全DNAより作製されたコスミドライブラリーをスクリーニングすることによって得られた。それぞれ異なった2個の挿入断片を含むコスミドの解析から、本生合成遺伝子クラスターの全長は約40 kbからなることがわかった。相同性検索の結果、開始単位である quinoxaline-2-carboxylic acid (QXC, 2) は Ecm2, -3, -4, -8, -11, -12, -13, -14によって生合成されることが、また1の二量体型ペプチド骨格は ecm1, -6, -7 および fabCによって形成され、最後に ecm 17 および -18によって特徴的な thioacetal 構造へと変換されると予測された。このほか本クラスターには耐性遺伝子等に加え、合計17個の機能予測可能な open reading frame (ORF) と1個の機能不明ORF および1個の不活性タンパク質をコードした遺伝子を含んでいた。

3-2. QXC 生合成経路およびQXC 遺伝子発現ベクターの構築

QXC (2) の生合成経路は相同性の高い酵素遺伝子の機能に基づき、図6Aに示したように予想した。まず出発基質である L-tryptophan が一旦 adenylation され、aminoacyl thioester 酵素中間体が形成された後、hydroxylation, 加水分解により 3へと変換される (Ecm2, -8, -12, -13)。続いてインドール環の酸化開裂、アミドの加水分解により β -hydroxykynurenine (4) を与える (Ecm11, -14)。さらに非常に珍しい酸化的アミノ基転移を経て5を与えた後、酸化的脱炭酸、環化が生じ6に変換され、最終的に空気酸化により2を生合成する (Ecm3, -4)。

次に大腸菌を用いて2を生産させるため、上記8個の生合成遺伝子それぞれに T7 promoter, ribosome binding site および T7 terminator を連結し、T7 promoter による制御下で発現する multiple gene polycistronic 発現ベクターAを構築した。これまでに多くの polyketide synthase (PKS) および NRPS の塩基配列が決定されてきたが、その多くは放線菌由来のGC含量の高い塩基配列であることが知られている。そこでこれら生合成遺伝子が大腸菌で高発現させるために、大腸菌において翻訳頻度が低いコドンに対応する tRNA をコードした領域を上記発現システムに加えた。それにより、2生合成遺伝子をさらに高発現できる発現ベクターBを構築した。

図6. Echinomycin 生合成経路



3-3. Echinomycin 生合成における octadepsipeptide 骨格生合成遺伝子および echinomycin 耐性遺伝子発現ベクターの構築

Echinomycin 骨格生合成の詳細な経路は、図 6BC に示したように予想した。NRPS の A ドメインと高い相同性を示す Ecm1 によって 2 が adenylation され活性化された後、ArCP と aryl thioester 酵素中間体を形成する。次いで 2 個の NRPS モジュール (M1, M2) で構成される Ecm6 によって L-Ser および L-Ala が縮合される。この際 M1 には L-Ser 由来の不斉中心をエピメリ化する E

ドメインが含まれている。続いて 2 個の NRPS モジュール (M3, M4) で構成される Ecm7 によって L-Cys および L-Val が順次縮合される。この場合も M3, M4 には N-メチル化を触媒する M ドメインがそれぞれ 1 個ずつ存在した。必要な構成成分がすべて揃ったペプチド鎖は図 6C に示す機構により thioesterase (TE) ドメインの触媒作用で二量体化および環化により 7 を与える。酸化酵素 Ecm17 によりジスルフィド結合が形成されて triostin A (8) に変換された後、メチル化酵素と予想される Ecm18 の作用で S-メチル化後、sulfonium ylide を

經由して thioacetal が生成されると予想した。また、echinomycin 生合成遺伝子クラスターには耐性遺伝子と推定された *ecm16* を確認した。大腸菌菌体内で生合成された echinomycin の DNA 結合活性による宿主大腸菌の死滅を防ぐことを目的として、*ecm16* も合わせて発現ベクターに組み込むことを試みた。そこで上記生合成遺伝子を *ecm1*, -16, -17, -18, *fabC*, *sfp* と *ecm6*, -7 の二つのグループに分け、2 の生合成遺伝子発現ベクター A と同様に multiple gene polycistronic 構造を持つ、2 個の異なる発現ベクター C および D を構築した。得られた合計 4 個の発現ベクターを一つの細胞中で安定に複製し遺伝子発現させ生合成産物を得るため、それぞれ 4 種の異なる複製開始点および薬剤耐性遺伝子を持つ発現ベクターによる発現システムを構築した。

3-4. Echinomycin および triostin A の生物全合成

上記 4 個の発現ベクターを BL21 (DE3) で共発現し、ファーメンターを用いた培養で 2L の培養液から生合成産物 0.3mg を分離精製した。本化合物は ESI-MS より分子量 1139 [M+K]⁺, 1123 [M+Na]⁺, 1101 [M+H]⁺ および 1053 [M-SCH₃]⁺ を与え、¹H NMR より **1** と確認され、発現された合計 16 個の生合成酵素は天然に存在するタンパク質と同じ機能を持ち、大腸菌によって **1** を生産可能であることが証明された。さらに、thioacetal の形成に必須と予測された *ecm18* を含まない triostin A 生合成遺伝子発現ベクターの作製を行った。これを上記と同様に発現させ、ファーメンターを用いた培養で 2L の培養液から生合成産物 0.5mg を分離精製した。本化合物は ESI-MS および ¹H NMR より **8** と確認された。従って、*ecm18* は特異な S-メチル化および転移反応により **8** から **1** へと変換する酵素遺伝子であることが証明された。この結果大腸菌を用いた発現システムが持つ利点によって簡便に誘導体生合成を可能に

することが立証された。最近我々は *Ecm18* の X 線構造解析に成功したので、合わせて紹介する予定である。

本研究成果は echinomycin 生合成の全過程を分子レベルによる変換反応として詳細に解析することを可能とし、一つの複雑な構造を有する生理活性天然物の全生合成遺伝子を発現することで、有機合成化学による全合成とは全く異なる方法論を用いた天然物供給の可能性を示した。

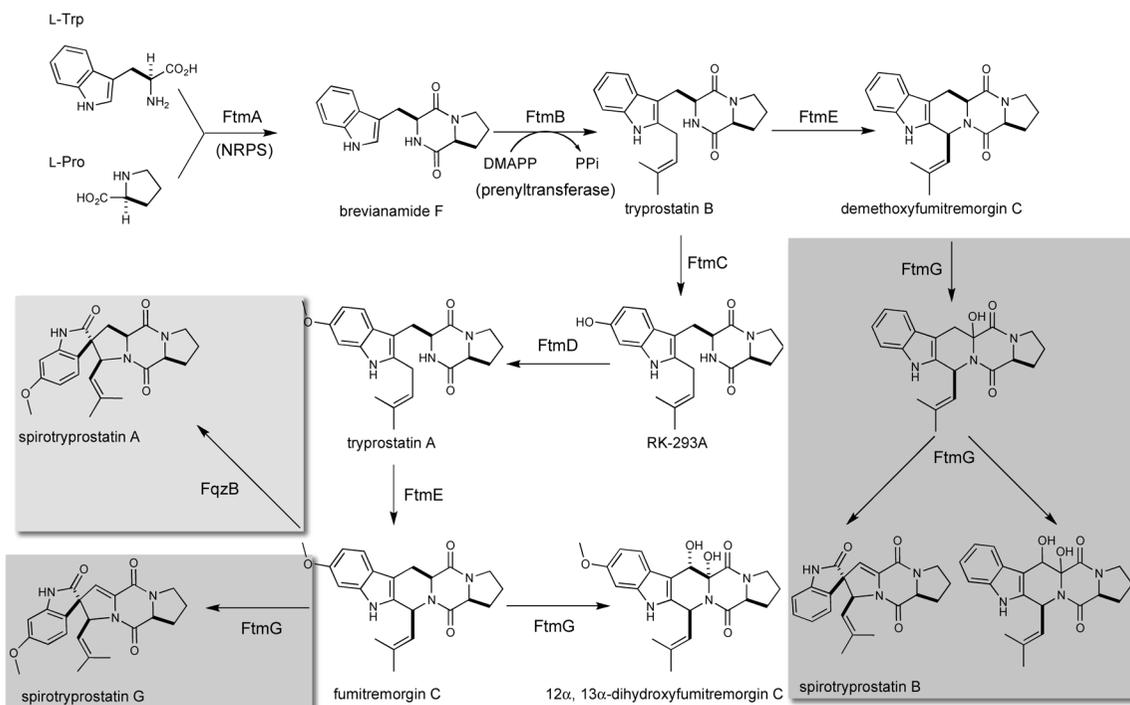
4. Spirotryprostatin の生物全合成

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が産生する超微量成分 spirotryprostatin の生物全合成を目指した我々の研究成果を報告する。

Spirotryprostatin 類は糸状菌 *A. fumigatus* BM939 株より発見された化合物である¹⁰⁾。同糸状菌をはじめとした *Aspergillus* 属や近種である *Penicillium* 属糸状菌からは spirotryprostatin と同様に L-tryptophan と L-proline からなる diketopiperazine 骨格を有した数多くの類縁化合物が発見されており、これらの化合物は 5 員環もしくは 6 員環が 4 ないし 5 つ連続した共通骨格を有している。その生物活性としては、動物細胞に対する細胞周期阻害活性などが知られている¹¹⁾。

Spirotryprostatin A および B は *A. fumigatus* の約 400L もの培養液中からそれぞれ、1.2mg および 11mg 程度しか得られない超微量成分である。有望な薬剤リード化合物の候補であるにも関わらず、さらなる詳細な生物活性の評価を行うには化合物量が絶対的に不足している。その興味深い生物活性と特徴的なスピロ環構造から、多くの合成化学者の興味を引き、それぞれの研究グループにおいて各種独創的な方法論に基づく全合成が達成されてきた¹²⁾。そこで我々は、spirotryprostatin 生合成に関与する遺伝子を取得し、出芽酵母および *Aspergillus niger* を用いた異種宿主による発現系

図7. Spirotryprostatin類の生合成経路



にて spirotryprostatin 生合成経路を再構築することで生物による全合成をおこない、本化合物の効率的な供給を目指すとともに、その特徴的なスピロ環構造の形成機構を解明することを目的とした。

Spirotryprostatin の類縁化合物である tryprostatin 類, fumitremorgin 類, verruculogen の生合成については、いくつかのグループにより多くの遺伝子の機能が明らかにされている¹³⁾。それによると、これらの化合物の骨格構造は NRPS である FtmA により構築され brevianamide F を生合成し、さらにプレニル基転移酵素 (FtmB) により tryprostatin B が、続いてシトクロム P450 酵素 (FtmC) およびメチル基転移酵素 (FtmD) が働くことで tryprostatin A が生成する (図7)。続いて、シトクロム P450 酵素 (FtmE) により indole 環と diketopiperazine 環が縮環し fumitremorgin C を生成し、もう一つ別のシトクロム P450 酵素 (FtmG) が働くことで 12 α ,

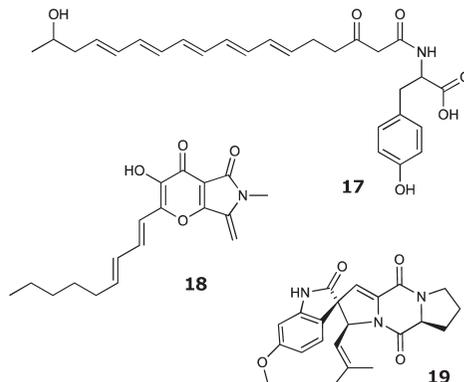
13 α -dihydroxyfumitremorgin C が、さらにプレニル基転移酵素 (FtmH) が働くことで fumitremorgin B が生成する。最後に α -ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ (FtmF) が働くことで verruculogen が生成する。このように、主骨格を形成する一つの NRPS 酵素と多くの種類の修飾酵素が働くことで、数多くの関連化合物が生産されている tryprostatin 類であるが、ほぼすべての生合成遺伝子の機能解析が行われているにも関わらず、spirotryprostatin 類に至る生合成経路やスピロ環形成に関与する生合成遺伝子については同定されていなかった。そこで、まずは出芽酵母により spirotryprostatin 類の推定前駆体を生産させるシステムを構築することとし、その候補化合物として demethoxyfumitremorgin C の生産を検討した。Demethoxyfumitremorgin C を生合成する遺伝子は、*A. fumigatus* IFO4057 株のゲノム DNA からクローニングし、自律複製可能な出芽酵母用シャト

ルベクターへ導入し目的の発現ベクターを構築した。導入した生合成遺伝子群は, *ftmA*, *ftmB*, *ftmC*であり, それぞれ酵素の機能はNRPS, プレニル基転移酵素およびシトクロムP450である。また, 生合成遺伝子群に含まれるシトクロムP450酵素活性の効率的な再生のため, 出芽酵母由来NADPH-シトクロムP450還元酵素遺伝子(NCP1)を合わせて導入した。上記プラスミドを用い目的化合物を出芽酵母発現系で高収量にて合成するために, 宿主染色体中に基質供給系遺伝子群を導入することとした。酵母宿主SCKW5を上記で構築した適切な発現ベクターで形質転換した後, 液体培養によって2%ガラクトースを加え15°Cで発現誘導し, 得られた培養液から各種クロマトグラフィーによって目的化合物を分離精製した。その結果, brevianamide Fを22mg/L, tryprostatin Bを4.0mg/L, demethoxyfumitremorgin Cを2.6mg/Lの収量にて得ることに成功した。続いてspirotryprostatin Aの生物合成を達成すべく出芽酵母に*ftmA*, -B, -C, -D, -Eおよびフラビン依存型モノオキシゲナーゼ(*fqzB*)を導入したが目的化合物の生成を確認することができなかった。また, *ftmA*, -B, -E, -Gを導入した場合においてもspirotryprostatin Bの生成を確認できなかった。そこで宿主を生産菌と近縁な糸状菌*A. niger*を用い再度生合成を試みた。これらの遺伝子に強発現promoterをそれぞれ連結し異種発現させたところ, 目的としたspirotryprostatin AおよびBの生産を確認し, 生物全合成を達成した。

5. 休眠型生合成遺伝子群の活性化による天然物探索法の確立

機能不明の休眠型生合成遺伝子群を活性化させ天然物を生物合成させるため, 以下に示す4種類の方法を用い天然物の生産を試みた。(1) プロモーターを天然のものから強発現型へと変換する

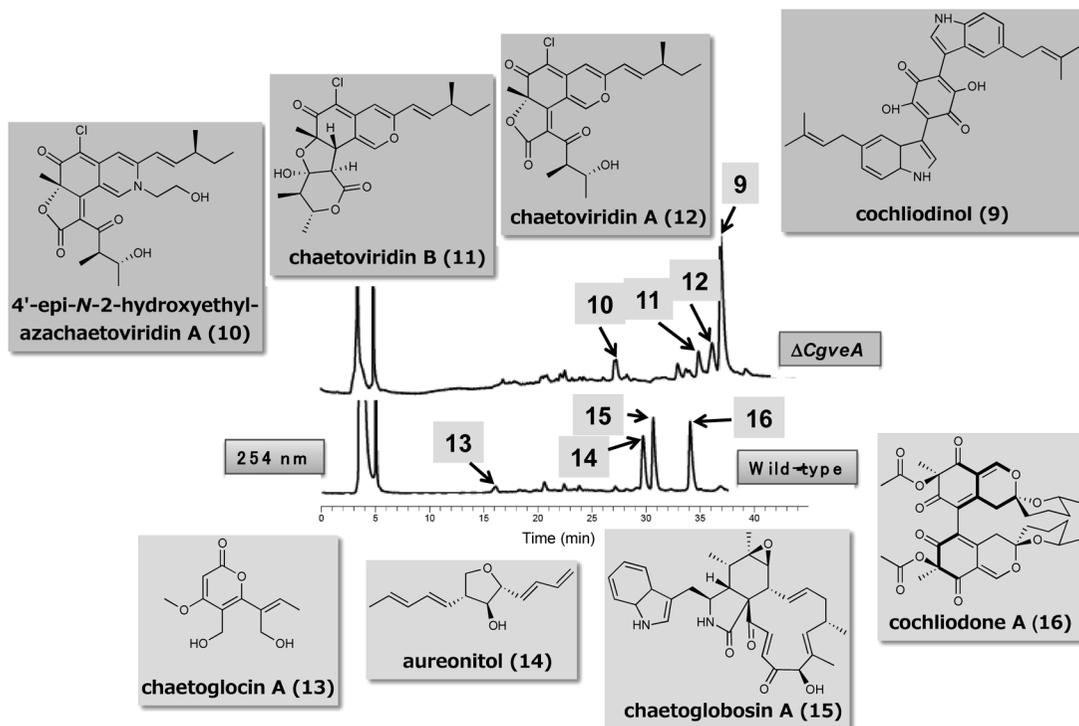
図8. 休眠型生合成遺伝子群の活性化により得られた天然物



ことで, 転写活性を増加させこれまでに生産の確認できなかった分子を生物合成する方法。成功例として我々は, 糸状菌*Chaetomium globosum*にコードされるCHGG_05358(推定PKS-NRPS, 全長12kb)のpromoterを変換して化合物17を得ることに成功した(図8)。(2) 転写因子を高発現させるかあるいはノックアウトすることで休眠型生合成遺伝子群を活性化させ天然物を生物合成する方法^{14~16})。成功例として生合成遺伝子群の中に存在する推定転写因子を高発現させ, *A. niger*から化合物18および多くの類縁体を得ることに成功した(図8)。(3) 異種発現宿主に休眠型遺伝子を導入し異種発現によって天然物を生物合成させる方法¹⁷)。成功例として*A. fumigatus*にコードされた合計6個の生合成遺伝子群を高発現させ, 天然の生産菌からはこれまでに単離されていない化合物19の生物合成に成功した(図8)。上に示した成功例から, これら3種類の手法は休眠型生合成遺伝子群を活性化させる上で有効であることが実験的に証明された。

次に, *Chaetomium*属糸状菌を分子遺伝学的に容易に取り扱うことができるように改変された変異株^{18,19})を用い, (4) 二次代謝産物生合成のエピジェネティクス制御因子と予測される遺伝子(*veA*, *laeA*, *sptJ*)を欠損させた。これら遺伝子の

図9. veAノックアウトによる代謝産物の変化



推定機能は、光感受性タンパク質で有性胞子形成過程において機能する VeA および DNA のメチル化に関与するタンパク質 (LaeA)、ヒストンアセチル化に関与するタンパク質 (SptJ) であると考えられている。これらの遺伝子を欠損させ、ヘテロクロマチン構造を改変することで、新しい天然物の創出を試みた。野生株と改変された株を同じ条件下で培養した後、HPLC を用い分析することで得られる UV-Vis クロマトグラムを比較したところ野生株には無いピークを観測した。これらを単離し構造決定した結果を図9に示す。本実験で比較した野生株と改変された株の代謝産物に大きな変化を観察することができたが、得られた化合物の新規性としては期待通りの結果とはならなかった。ゲノムが解読された菌種では、その菌種が生合成できる二次代謝産物（生合成中間体を除く）の個数を推測できる。すなわち、我々は目的とした菌株一種類に関して、化合物の探索にお

ける上限を設定することができる。つまり、もうこれ以上探索をしても新しい化合物をこの菌種からは得られないと見極めができることを意味する。天然物探索におけるゲノム解読の重要性はこの点にあると我々は考えている。従って上でも述べた通り、複数の手法を組み合わせることによって今後新しい化合物の探索を効率的に進められると期待できる。

謝辞

北海道大学大学院理学研究院 及川英秋教授には私が学部生以来ご指導ご鞭撻を賜り、深甚なる感謝の意を表します。Echinomycin 生合成研究において共同で研究を行って頂きました北海道大学大学院理学研究院 大栗博毅准教授、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。今回講演させて頂いた研究を遂行するために必要となる基礎的な理論、知識お

よび技術をご教授して下さい、多くの助言を頂きましたスタンフォード大学 CHAITAN S. KHOSLA 教授, ウィスコンシン大学マディソン校名誉教授 CHARLES R. 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。最後になりますが、貴重な試料である spirotryprostatin A, tryprostatin A を快くご供与頂きました名古屋大学創薬科学研究科 福山 透教授, 下川 淳助教に深謝致します。

参考文献

- 1) WATANABE, K.; T. MIE, A. ICHIHARA, *et al.*: Detailed reaction mechanism of macrophomate synthase: extraordinary enzyme catalyzing five-step transformation from 2-pyrones to benzoates. *J. Biol. Chem.* 275: 38393~38401, 2000
- 2) OSE, T.; K. WATANABE, T. MIE, *et al.*: Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. *Nature* 422: 185~189, 2003
- 3) WATANABE, K.; C. C. C. WANG, C. N. BODDY, *et al.*: Understanding substrate specificity of polyketide synthase modules by generating hybrid multimodular synthases. *J. Biol. Chem.* 278: 42020~42026, 2003
- 4) WATANABE, K.; M. A. RUDE, C. T. WALSH, *et al.*: Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9774~9778, 2003
- 5) WATANABE, K.; K. HOTTA, A. P. PRASEUTH, *et al.*: Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* 2: 423~428, 2006
- 6) WATANABE, K.; K. HOTTA, M. NAKAYA, *et al.*: *Escherichia coli* allows efficient modular incorporation of newly isolated quinomycin biosynthetic enzyme into echinomycin biosynthetic pathway for rational design and synthesis of potent antibiotic unnatural natural product. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 9347~9353, 2009
- 7) WATANABE, K. & H. OIKAWA: Robust platform for *de novo* productions of heterologous polyketides and nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Org. Biomol. Chem.* 5: 593~602, 2007
- 8) WATANABE, K.; H. OGURI & H. OIKAWA: Genetic indoctrination of *Escherichia coli* for innovative drug discovery by way of heterologous expression of the echinomycin biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 189~196, 2009
- 9) WATANABE, K.; A. P. PRASEUTH, M. B. PRASEUTH, *et al.*: Assembling nonribosomal peptide gene cluster in a heterologous host. Complex enzymes: overview and peptides. *Methods in Enzymol.* 458: 379~399, 2009
- 10) CUI, C.-B.; H. KAKEYA & H. OSADA: Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron* 52: 12651~12666, 1996
- 11) ALLEN, J. D.; A. VAN LOEVEZIJN, J. M. LAKHAL, *et al.*: Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter *in vitro* and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer Ther.* 1: 417~425, 2002
- 12) EDMONDSON, S. D.; S. J. DANISHEFSKY: The total synthesis of spirotryprostatin A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1138~1140, 1998
- 13) LI, S.-M.: Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J. Antibiot.* 64: 45~49, 2011
- 14) BOK, J. W.; Y. M. CHIANG, E. Szewczyk, *et al.*: Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chem. Biol.* 5: 462~464, 2009
- 15) NAKAZAWA, T.; K. ISHIUCHI, A. PRASEUTH, *et al.*: Overexpressing transcriptional regulator in *Aspergillus oryzae* activates a silent biosynthetic pathway to produce novel polyketide. *ChemBioChem* 13: 855~861, 2012
- 16) TSUNEMATSU, Y.; S. ICHINOSEKI, T. NAKAZAWA, *et al.*: Overexpressing transcriptional regulator in

- Chaetomium globosum* activates a silent biosynthetic pathway: evaluation of shanorellin biosynthesis. *J. Antibiot.* 65: 377~380, 2012
- 17) ISHIUCHI, K.; T. NAKAZAWA, T. OOKUMA, *et al.*: Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics. *ChemBioChem* 13: 846~854, 2012
- 18) WINTER, J. M.; M. SATO, S. SUGIMOTO, *et al.*: Identification and characterization of the chaetoviridin and chaetomugilin gene cluster in *Chaetomium globosum* reveals dual functions of an iterative highly-reducing polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 17900~17903, 2012
- 19) ISHIUCHI, K.; T. NAKAZAWA, F. YAGISHITA, *et al.*: Combinatorial generation of complexity by redox enzymes in the chaetoglobosin A biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 135: 7371~7377, 2013