

## 〈総 説〉

—住木・梅澤記念賞受賞後の研究—

### ゲノム情報を活用した次世代物質生産系の開発

池田治生

北里大学

(2021年1月27日受付)

*Streptomyces avermitilis*が生産する avermectin はヒトならびに動物の駆虫薬として広く利用されている。20世紀末に avermectin 生合成遺伝子群の配列解析を完了した後、生産菌のゲノム解析を行う機会を得た。*Streptomyces* 属の放線菌は多種多様な生物活性を有する2次代謝産物を生産する微生物として、また主要な医薬品などの生産菌として産業上極めて重要な微生物であるため、そのゲノム解析結果は多くの情報が得られるものと期待された。*S. avermitilis* のゲノムは原核細胞生物の中では極めて大きいこと (9,025,608塩基対, 7,574の遺伝子)、さらに原核細胞生物にもかかわらずその染色体は真核細胞生物と同じ線状構造である。また、ゲノム上には当初の予想を越える数の2次代謝産物の生合成遺伝子群 (少なくとも30種以上) が配置していることが明らかとなったが、これらの多くは休眠状態であった。ゲノム上のそれぞれの遺伝子産物の推定される機能および配置から生育などの必須な遺伝子は線状染色体の中央のおよそ6.5 Mbの領域に配置しており、染色体の両末端には非必須遺伝子 (2次代謝物質生合成遺伝子群を含む) が配置していることが明らかとなった。本菌は avermectin の工業的な生産菌として利用されており、物質生産のための本質的な機能を有している生物と考えられるため、本菌の物質生成能力を利用した異種の2次代謝産物生合成遺伝子群の発現系を構築することを計画した。この目的のため、内在性の主生産物の生合成遺伝子群の除去はもちろんのこと染色体両末端の非必須領域を欠失および編集を行い、野生株のゲノムのおよそ80%の大きさの組換え株を作製した (*S. avermitilis* SUKA; Special Use Kitasato Actinomycetales)。得られたゲノム縮小株を用いてこれまで40種以上の異種2次代謝産物生合成遺伝子群の導入ならびに発現に成功した。多くの場合物質生産が認められ、さらにはそれらの生産量は元株の生産菌よりも多い場合が複数観察された。また、休眠状態の生合成遺伝子群を上記のゲノム縮小株に導入させることによって導入した遺伝子群が覚醒し、物質生産が開始した例も数例確認された。一方、放線菌を含む原核細胞生物からは植物で見出されるテルペン化合物の生産は極めて少ないが、生物情報学的なテルペン合成酵素の解析によって、公的データベースの原核細胞生物起原から多くのテルペン合成酵素の候補を見出し、最終的に上記のゲノム縮小株を用いて強制的に発現させ、13種の新規

な骨格を有するテルペン化合物を発見するに至った。このように上記のゲノム縮小株は異種2次代謝生合成遺伝子群の発現に極めて有用であることが確認されたため、リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (RiPPs) 化合物である prethioviridamide についてその生合成遺伝子の編集によって35種のアミノ酸置換型誘導体の創製法を開発した。得られたアミノ酸置換体のいくつかは元の化合物よりも生物活性が上昇していた。一方、多様な生物活性を有する大環状ラクトン化合物の生合成遺伝子群はポリケチド合成酵素遺伝子を含むため60 kbpあるいはそれ以上の大きさからなるものが多い。我々はこのような巨大な生合成遺伝子群を上記のゲノム縮小株に安定に導入および発現させる系を開発した。この系を用いて rapamycin のポリケチド合成酵素遺伝子の編集を行い、種々の非天然型の誘導体を生産させることに成功した。このように上記のゲノム縮小株を用いた異種発現系は、非天然型の誘導体を創製する新たな革新的技術として有用であることが確認されるとともに今後の創薬展開にも多に期待されるものと思われる。

## はじめに

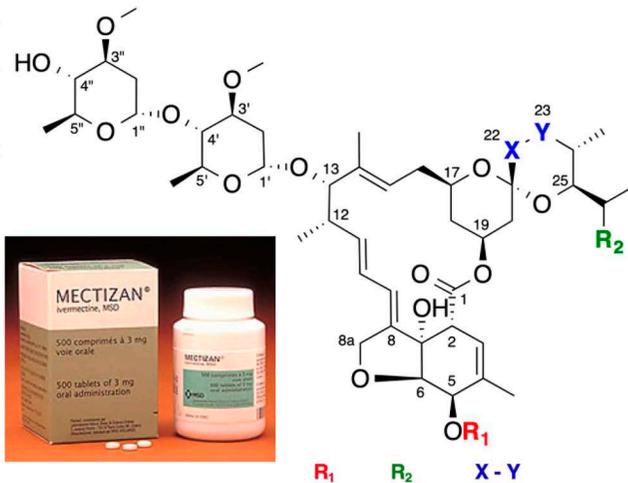
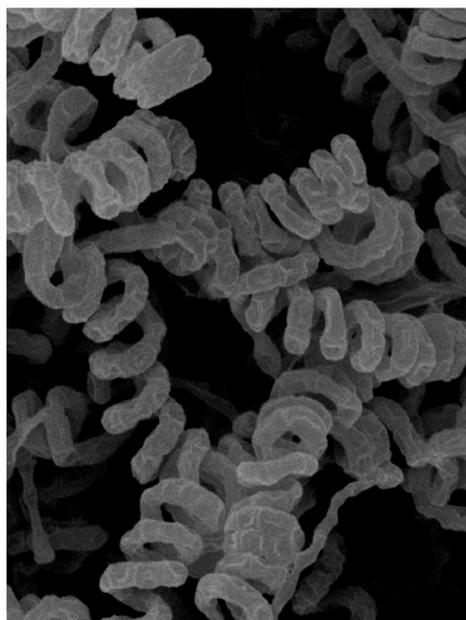
1980年代までの抗寄生虫薬のほとんどは合成薬を中心に展開されていたが、それらの毒性や抗寄生虫スペクトルの狭さなど、解決しなければならない問題点が多く残されていた。1970年代の後半に報告された微生物代謝産物である avermectin (Fig. 1) の発見<sup>1)</sup>は、その優れた抗寄生虫活性のみならず広い抗寄生虫スペクトルおよび毒性の低さなど、それまでには達成できなかった弱点を解決する画期的な抗寄生虫薬の出現であった。このことは発見から40年近くを過ぎた2015年に大村智博士が avermectin の発見とその効果の絶大性からノーベル生理学・医学賞の受賞に至ったことから理解できる。さらに現在、世界的な感染が危惧されている COVID-19 ウイルスの複製過程に avermectin が有効であることが示されており、今後の展開が期待されている。1980年代の後半から著者は avermectin の生合成の研究、特に遺伝学的方法によってその生合成の全貌<sup>2)</sup>とそれらの成果から有効な成分の選択的な生産<sup>3-12)</sup>に至る一連の研究を行い、それらの成果に対し、2000年度の

住木・梅澤記念賞が授与された。特にその当時は極めて困難かつ、世界でも数例しか達成されておらず、本邦では1例も報告がなかったポリケチド化合物の生合成遺伝子群の全長約85 kbp (Fig. 2) を決定<sup>10-12)</sup>できたことは、その後の生合成研究にとっても大きな成果であったとともにこの研究領域の活性化に多に貢献できたものと思われる。これまでの生化学的な研究方法ではポリケチド化合物の骨格形成の基本的な機構を理解することは極めて困難であったが、生合成遺伝子を直接解読し、その配列からそれぞれの生合成酵素のアミノ酸配列、さらに機能ドメインの解析からポリケチド骨格の炭素鎖伸長過程を詳細に理解することができるようになった。このように生物の設計図である遺伝子配列を解読することは多くの情報をもたらすと同時に、その設計図に人為的な改変を加えることによって戦略的な構造改変への途が開かれるものと期待される。

## *Streptomyces* 属放線菌のゲノム解析

Avermectin の生合成およびその生合成に関与する遺伝子解析<sup>10-12)</sup>の後、生産菌 *Streptomyces*

Fig. 1. Avermectin生産菌 *Streptomyces avermitilis* sp. nov. nom. rev. の走査型電子顕微鏡写真と avermectin の構造

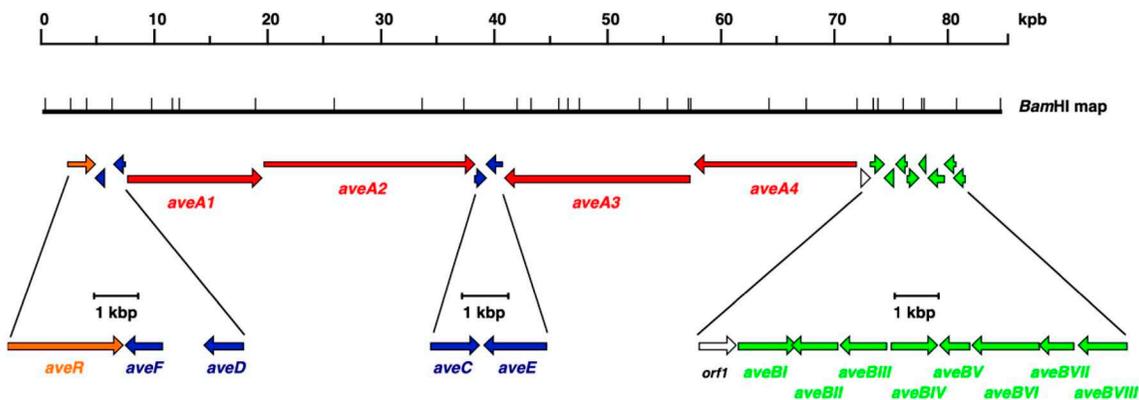


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X - Y
<b>Avermectin</b>			
A1a	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH=CH
A1b	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH=CH
A2a	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
A2b	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
B1a	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH=CH
B1b	H	CH <sub>3</sub>	CH=CH
B2a	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
B2b	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(OH)
<b>Ivermectin</b>			
B1a	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
B1b	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>

Ivermectins are synthesized by hydrogenation at C22, 23

*Streptomyces avermitilis* sp. nov., n. rev.  
Int J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 2011-2014 (2002)

Fig. 2. Avermectin 生合成遺伝子群の物理地図



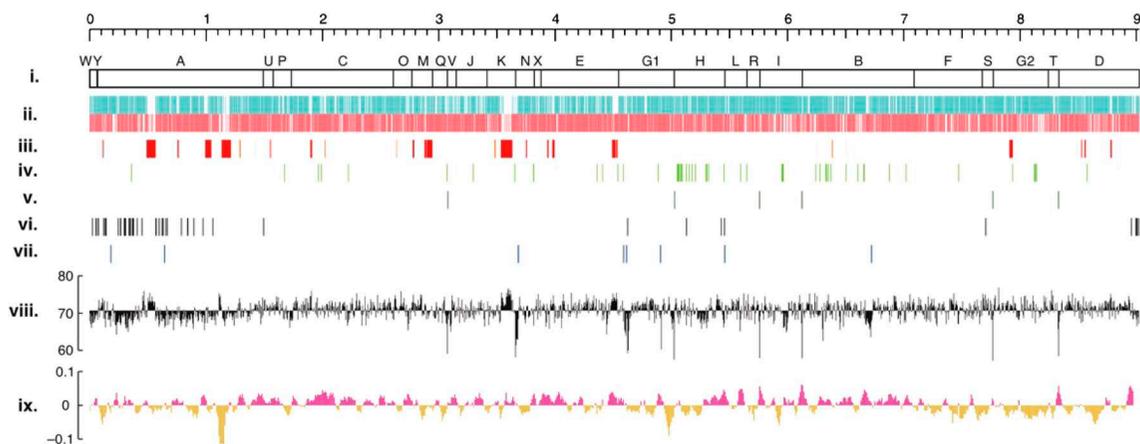
制御遺伝子 (橙), ポリケチド合成酵素遺伝子 (赤), ポリケチド修飾酵素遺伝子 (青), 配糖化および糖合成遺伝子 (緑)。

*avermitilis* MA-4680 (ATCC 31267, NRRL 8165, NCBI 12804 および JCM 5070) のゲノム解析のチャンスを得ることができた。その当時は病原細菌や

極限環境で生育する微生物のゲノム解析が報告されはじめた頃であり、工業生産に供されている産業微生物ゲノムの解析は達成されておらず、その

解析は応用のみならず物質生産に関する基礎的な背景を知る上でも重要であった。なお大腸菌や枯草菌などの一般細菌のゲノムと比べ *Streptomyces* 属の放線菌はそれらの2倍程度の大きさであり、かつ高GC含量であるため通常の配列解析方法では解析しにくいゲノムであった。したがって、これまでこのような配列解析がしにくくかつ、巨大なゲノム解析は達成されていなかったことから、多くの困難さが予想されていた。初期のゲノム解析（ヒトなども）はゲノムの断片を cosmid や BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターに連結し、それらの中から隣り合った整列クローンを選択し、それぞれのクローンを個々に配列解析を行っていく方法であった。一方、米国 J. Craig Venter は20世紀の後半に *Haemophilus influenzae* Rd のおよそ 1.7 Mbp のゲノム解析を、上記の整列クローンを作製せずに、染色体DNAを物理的に 1~2 kbp の断片に分断化したクローンを整列せずにランダムに配列を読み取り、その結果をコンピューターでつなぎ合わせる、という“shotgun sequencing”の方法で読解を成功させていた<sup>13)</sup>。当時、我々よりも先行していた *S. coelicolor* A3(2) のゲノム解析は一般的な方法である「整列クローンを選別し、選別されたクローンを一つ一つ配列解析する」方法で進行していた。我々は種々の情報を精査し、その当時は達成されていなかった 9 Mbp 程度の大きな配列解析を、Venter らが行った“shotgun sequencing”の方法で挑戦することにした。当時の最新の塩基配列解析装置は 96 キャピラリーシークエンサーであったが、*S. avermitilis* の 9 Mbp のゲノムの大きさのおよそ 10 倍量の配列を読む作業に 6 ヶ月程度の月日を要した。前述した整列クローンをを用いる配列解析では、解析途中から部分的な配列情報が正確に得られたが、shotgun sequencing では最終段階に差しかからないと正確な配列情報が得られない。そして先行していた *S. coelicolor* A3(2) のゲノム解析よりも早く、ゲノム配列の 99% 以上を決

定することができた<sup>14)</sup>。しかしながら配列間のギャップ（数 10~100 塩基程度）がまだあり、これらを別の方法によって地道に読解し、最終的に 1 本の配列データとすることができた<sup>15)</sup>。配列が読解できてもその配列上にどのような遺伝子が存在するかといった機能予測（アノテーション作業）をしなければならない。現在のように米国の National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 解析が充実しているわけではなく、また、読み枠フレームの翻訳開始点の判断も十分ではなかったが、9,025,608 bp の線状染色体に 7,582 個のタンパク質コード領域が配置していることを明らかにした (Fig. 3)。大腸菌や枯草菌のゲノムはおよそ 4.6 Mbp の環状染色体に 4,000 個程度のタンパク質コード領域が見出されており、これらの一般細菌と比べても非常に大きなゲノムを有することが判った。7,582 個のタンパク質コード領域の多くのものは ABC transporter などの細胞内外の物質輸送に関わるもの、あるいは遺伝子発現制御に関わる制御タンパク質、さらには分泌型の分解酵素が多く見出された。*Streptomyces* 属の生育環境である土壤中を考慮すると、多様な環境下に即座に対応すること。また、多様な栄養条件下での生育をサポートさせるため栄養源となる高分子化合物（多糖類やタンパク質など）の分解能力など、過酷な環境での生育を達成するためにこのような遺伝子を獲得及び増加させていったものと推察される。一方、*Streptomyces* 属の放線菌は複雑な形態分化や多様な環境での生育を可能にしているだけでなく、特に抗生物質をはじめとする複雑かつ多様な 2 次代謝産物を生産することが知られており、いくつかの代謝産物は医薬、動物薬あるいは農薬として利用されているものも少なくない。我々がゲノム解析を行った *S. avermitilis* は抗寄生虫および抗昆虫活性を有する avermectin の工業的な生産菌として医薬品製造に現在も使われている。これまで、漠然と

Fig. 3. *Streptomyces avermitilis*の線状染色体の構造

(i) 線状染色体の *Asel* 物理地図, (ii) タンパク質をコードする遺伝子 (転写方向: 上が +strand, 下が -strand), (iii) 2次代謝産物生合成遺伝子群, (iv) tRNA, (v) rRNA オペロン, (vi) IS および transposase, (vii) phage あるいは integrated plasmid, (viii) GC % 含量 (5 kb window), (ix) GC skew (50 kb window)。

*Streptomyces* 属放線菌は抗生物質を生産する能力が長けているものと思われていた。また、多くの場合1菌株からは数個の2次代謝産物の生産が見出されることが多いため、それらの生合成遺伝子群も数個程度であろうと推察されていた。タンパク質をコードする遺伝子の機能予測を進めて行く上で、2次代謝産物の生合成遺伝子群を詳細に解析したところ、予想を遙かに超える数の生合成遺伝子群が見出された。当初は25数個の生合成遺伝子群と推定していたが、その後の解析によって現在では少なくとも38個の生合成遺伝子群が存在すること (Table 1)、さらに今後様々な遺伝子産物の新たな機能の発見などからさらに増加するものと思われる<sup>16)</sup>。解析当初は本菌と *S. coelicolor* A3(2) とのゲノム解析<sup>17)</sup> だけであったため、他の *Streptomyces* 属および放線菌ではどの程度の数の生合成遺伝子群を保有しているのかは不明であったが、*S. coelicolor* A3(2) でも25個の生合成遺伝子群の存在が推定されていたことから、*Streptomyces* 属を含む放線菌では、我々の予想を上回る生合成遺伝子群が染色体に配置しているものと推察された (Fig. 4)。その後、streptomycin 生産菌 *S. griseus* IFO 13550<sup>18)</sup> や

erythromycin の生産菌 *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 のゲノム解析<sup>19)</sup> が報告され、これらの菌株にも30を越える生合成遺伝子群を保有していることが明らかとなった<sup>16)</sup>。「*Streptomyces* 属を初めとする放線菌が何故、多くの抗生物質を含む2次代謝産物を生産することができるか？」といった問いに対して、「これらの菌株が極めて多くの2次代謝産物生合成遺伝子群を保有している」ということが1つの回答であるかもしれない。それではこのように多くの生合成遺伝子群が見出されるが、多くの場合検出される代謝産物は数個程度であるのは何故なのか？ 培養条件は極めて重要であることは経験上理解されていた。実際に *S. avermitilis* では様々な培地で oligomycin の生産は観察されるが、avermectin の生産は特定の培地条件でのみ観察されることが知られている。培養条件の特異性としては鉄のキレーターとして知られている siderophore の生産も鉄イオンに影響を受ける。*S. avermitilis* のゲノム解析から nocardamine の生合成遺伝子群の存在を推定することができたが、それまで本菌からの nocardamine の生産は知られていなかった。鉄イオンを制限した合成培地で培養した

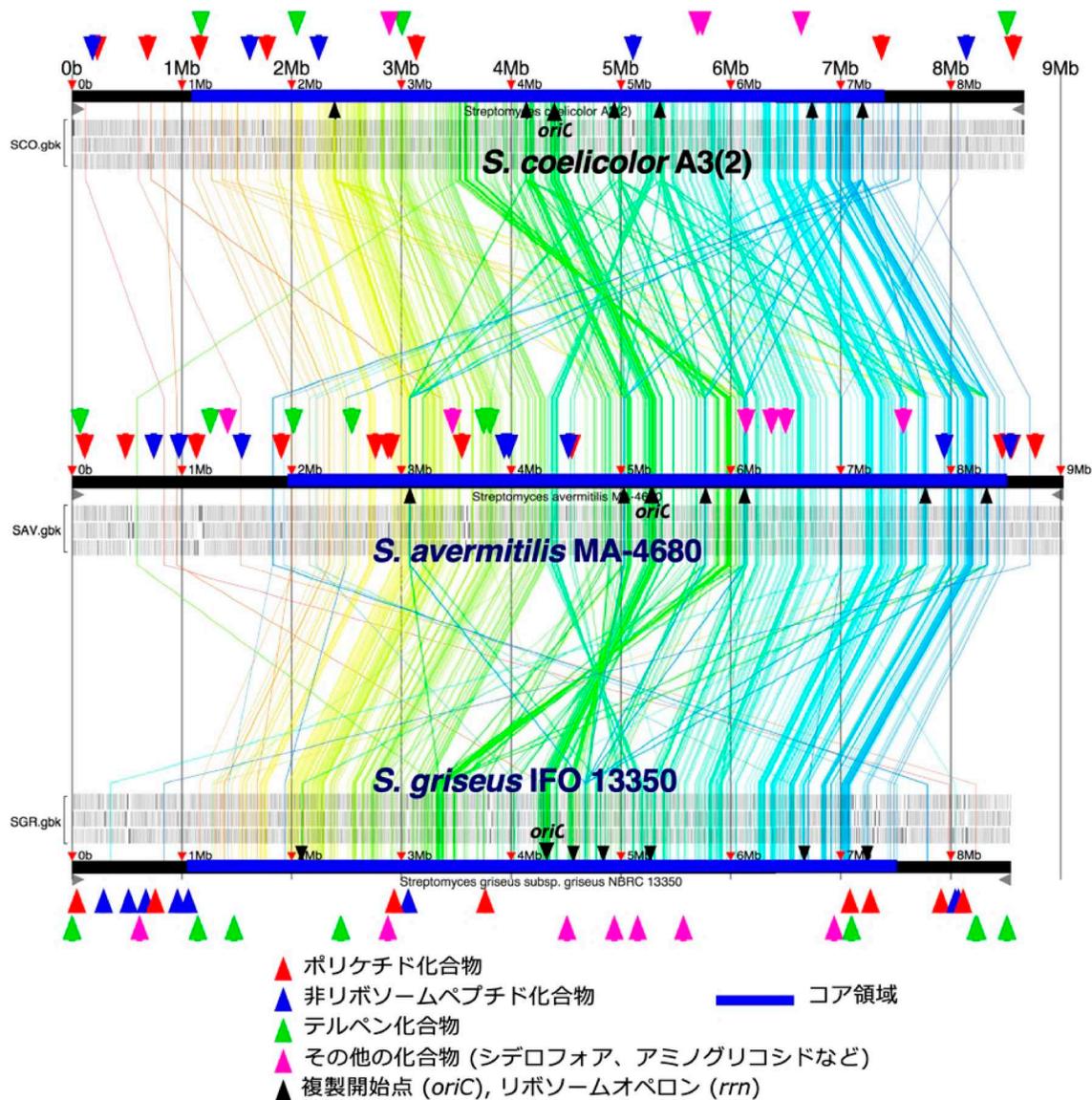
**Table 1.** *S. avermitilis* 染色体上に配置している2次代謝産物生合成遺伝子群 (推定を含む)

No.	Genes	Location (nt)	Actual or predicted product*
1	<i>sav76 (ams)</i>	86,073-87,080	<b>avermilol</b>
2	<i>sav100-101</i>	113,361-118,594	polyketide
3	<i>sav257-259</i>	299,873-303,052	microcin
4	<i>sav407-419 (pte)</i>	486,648-567,017	<b>filipin</b>
5	<i>sav603-609</i>	754,376-763,277	non-ribosomal peptide (siderophore)
6	<i>sav837-869</i>	991,134-1,042,269	non-ribosomal peptide
7	<i>sav935-953 (ave)</i>	1,132,045-1,212,960	<b>avermectin</b>
8	<i>sav1019-1025 (crt)</i>	1,285,187-1,293,904	<b>isorenieratene</b>
9	<i>sav1136-1137 (melC)</i>	1,424,869-1,426,085	<b>melanin</b>
10	<i>sav1249-1251</i>	1,549,424-1,554,224	polyketide-nonribosomal peptide hybrid
11	<i>sav1550-1552</i>	1,893,266-1,912,282	polyketide
12	<i>sav1650-1654 (hop)</i>	2,020,191-2,026,846	<b>squalene</b> (hopanoid ?)
13	<i>sav2163 (geo)</i>	2,635,583-2,637,760	<b>geosmin</b>
14	<i>sav2267-2269</i>	2,765,027-2,768,005	$\gamma$ -butyrolactone ?
15	<i>sav2277-2282</i>	2,775,228-2,784,841	polyketide
16	<i>sav2367-2369</i>	2,878,682-2,894,413	polyketide
17	<i>sav2372-2388</i>	2,896,543-2,914,291	aromatic polyketide
18	<i>sav2465-2467</i>	3,007,876-3,012,729	siderophore
19	<i>sav2835-2842 (spp)</i>	3,480,598-3,487,905	<b>spore pigment</b>
20	<i>sav2890-2903 (olm)</i>	3,534,525-3,634,592	<b>oligomycin</b>
21	<i>sav2989-2999 (ptl)</i>	3,744,875-3,757,141	<b>neopentalenoletolactone</b>
22	<i>sav3031-3032 (ezs)</i>	3,788,761-3,791,219	<b>albaflavenone</b>
23	<i>sav3155-3164</i>	3,930,088-3,942,062	non-ribosomal peptide
24	<i>sav3193-3202</i>	3,977,231-3,994,940	non-ribosomal peptide
25	<i>sav3636-3651</i>	4,494,250-4,526,990	non-ribosomal peptide
26	<i>sav3653-3667</i>	4,527,901-4,541,568	aromatic polyketide
27	<i>sav3704, sav3706</i>	4,583,057-4,587,741	<b>avenolide (autoregulator)</b>
28	<i>sav5149 (hpd)</i>	6,253,610-6,254,755	<b>ochronotic pigment</b>
29	<i>sav5269-5274 (sid)</i>	6,383,181-6,386,774	<b>nocardamine (siderophore)</b>
30	<i>sav5361-5362</i>	6,500,109-6,501,345	melanin
31	<i>sav5686-5689</i>	6,877,533-6,881,873	microcin
32	<i>sav6395-6398 (ect)</i>	7,670,236-7,673,431	<b>5-hydroxyectoine</b>
33	<i>sav6632-6633</i>	7,931,869-7,937,201	non-ribosomal peptide
34	<i>sav7130-7131</i>	8,490,207-8,492,484	<b>tetrahydroxynaphthalene</b>
35	<i>sav7161-7165</i>	8,522,760-8,530,697	non-ribosomal peptide
36	<i>sav7184</i>	8,553,602-8,558,155	polyketide
37	<i>sav7320-7323</i>	8,730,975-8,737,039	vibrioferrin-like siderophore
38	<i>sav7360-7362</i>	8,777,769-8,789,766	polyketide

\* 太字は生産物が確認されているもの

ところ nocardamine の生産が確認されるとともにその生産は鉄イオンの添加によって抑制されることが判った<sup>20)</sup>。さらにゲノム解析から適合溶質として浸透圧ストレスなどから生体を保護する物質, ectoine

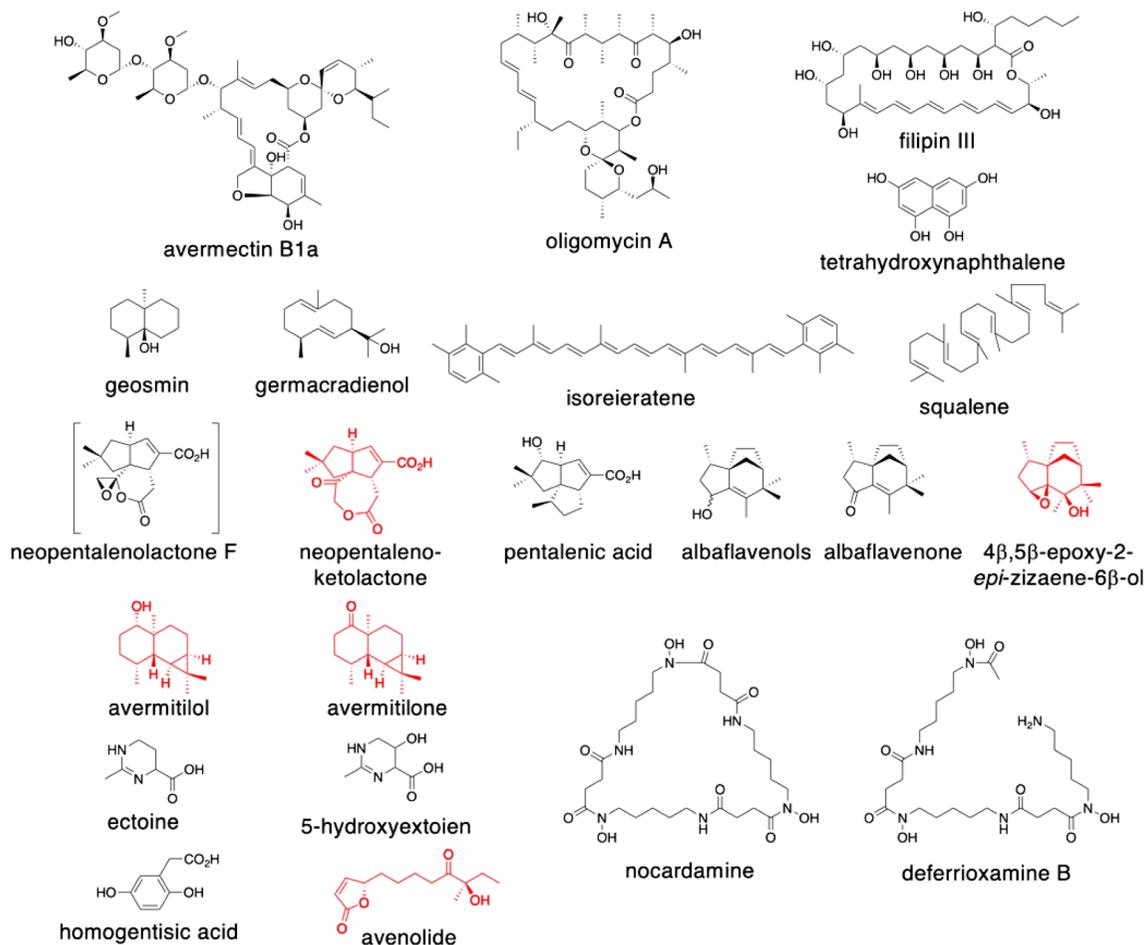
(および hydroxyectoin) の生合成遺伝子群の存在も推定された。通常の培養条件では nocardamine と同様に生産は観察されないが、高塩濃度あるいは高濃度のショ糖存在の高浸透圧下で ectoine の蓄積

Fig. 4. *Streptomyces* 属の線状染色体の比較解析および2代謝産物生合成遺伝子群の分布

上 : *S. coelicolor* A3(2), 中 : avermectin 生産菌 *S. avermitilis* MA-4680, 下 : streptomycin 生産菌 *S. griseus* IFO 13350。

が観察された<sup>21)</sup>。一方, *S. avermitilis* の新規な sesquiterpene 化合物である neopentalenoketolactone は avermectin および oligomycin の生合成遺伝子群を欠失させた変異株でのみ蓄積が観察される<sup>22)</sup>。これはおそらく avermectin や oligomycin の生合成に前駆物質が使われていたが, それら代謝が停止したことで前駆物質が sesquiterpene 化合物の生産に供給

されたものと思われる。また, もう一つの新規な sesquiterpene 化合物である avermitilone と avermitilol の生産に関してはその生合成遺伝子がいかなる条件でも全く発現しておらず, 強制的に発現できるようにプロモーターを入れ換えることによって上記の新規化合物の生産が観察された<sup>23)</sup>。この場合は生合成遺伝子が休眠状態であると結論できる。その他にも *epi*-

Fig. 5. *S. avermitilis*の生産する2次代謝産物

赤で示した代謝産物は新規化合物。Albaflavenols, albaflavenone, 4β,5β-epoxy-2-epi-zizaan-6β-ol, avermitilolと avermitiloneは強制発現プロモーターによって生合成遺伝子を発現させて生成させた。Tetrahydroxynaphthaleneは遺伝子増量効果によって蓄積した。

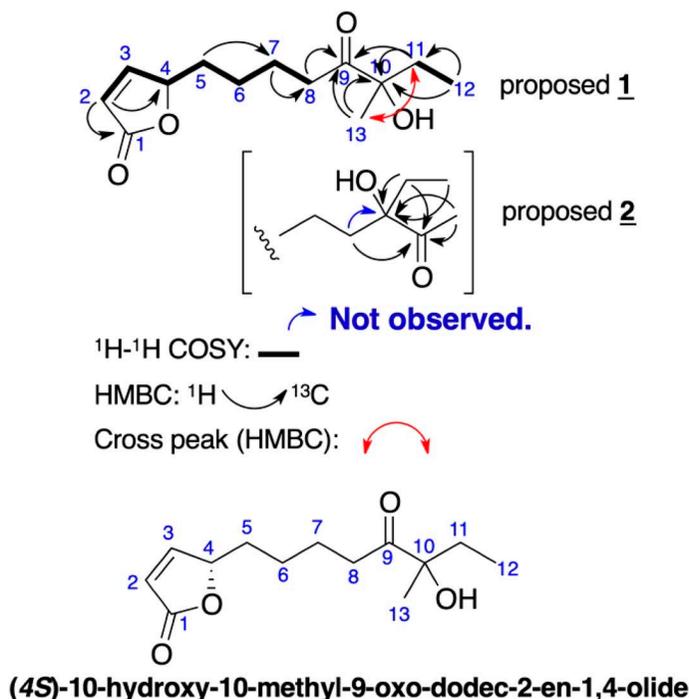
isozizaene 関連化合物<sup>24)</sup>や tetrahydroxynaphthalene<sup>21)</sup>などの生合成遺伝子も休眠状態であることを確認することができた。このように *S. avermitilis*には非常に多くの2次代謝産物生合成遺伝子群が存在するにも関わらず、それらの多くは休眠状態であることが判った (Fig. 5)。このことは他のゲノム解析が行われた *S. coelicolor* A3(2) や *S. griseus* IFO13350でも同様であり (Fig. 4), *Streptomyces* 属放線菌では極めて多くの2次代謝産物生合成遺伝子群を保有するにも関わらず、それらの多くは休眠状態であることが再確認された。微生物が2次代謝産

物を生産する生物学的な意義に関しては不明なところが多い。Nocardamineや ectoineのような特定環境下で鉄キレーターとして、あるいは適合溶質として機能する物質はそれぞれの目的をもって利用されることからその生成機構は理解できるが、その他の多くの2次代謝産物の生成の意義は今もって不明である。また、多くの生合成遺伝子群を保有することやそれらの多くが休眠状態であることも、その生物学的な意義は今後の研究を待たなければならない。

## 新たな低分子遺伝子発現調節物質の発見

ゲノム解析の結果は多くの情報をもたらすものである。ゲノム上に配置された遺伝子の産物、即ちタンパク質の相同性解析や機能予測から作業仮説を構築することが可能である。この場合、あくまでも仮説であるので最終的には実験科学的な証明を行わなければならない。2次代謝産物の生成過程に関する制御機構は未だ不明な点が多い。*S. avermitilis*のゲノム解析によって得られた作業仮説から、新たな低分子遺伝子調節物質の発見につながった成果を述べる。*S. griseus*のstreptomycinの生成過程では、生合成遺伝子群の個々の遺伝子の発現は遺伝子群内の調節遺伝子によって制御されているが、その調節遺伝子の発現をさらなる上位の制御系によって支配されている。その上位の制御遺伝子の発現の引き金が低分子遺伝子発現調節物質 (A-factor) によって誘導されることが明らかにされている<sup>25)</sup>。A-factorはnM程度の濃度で、それに特異的なタンパク質 (ArpA) に結合し、以降の制御遺伝子の転写を活性化し、最終的にstreptomycin生合成遺伝子群の制御遺伝子の発現を促し、さらに生合成遺伝子の転写により生成された生合成酵素複合体がstreptomycinを生成する。このような機構は他の*Streptomyces*属でも観察され、*S. virginiae*のvirginiamycin生成におけるvirginiae butanolide<sup>26)</sup>や*S. lavendulae*の青色色素 (indigoidine) 生成におけるIM-2等の $\gamma$ -butyrolactone構造を有する低分子遺伝子調節物質が関与していることが報告されている<sup>27)</sup>。これらはそれぞれに特異的に結合する結合タンパク質 (BarAあるいはFarA) を介して遺伝子制御が行われる。したがって、これらの菌には $\gamma$ -butyrolactone合成酵素と結合タンパク質の遺伝子を保有しているものと推察される。*S. avermitilis*のゲノム上にはいくつかの $\gamma$ -butyrolactone結合タ

ンパク質と推定される ortholog が見出される。ArpA や BarA に最も相同な結合タンパク質と推定される ORF (AvaR1) をコードする遺伝子の上流には *S. griseus* や *S. virginiae* には見出されない acyl-CoA oxidase をコードする遺伝子が隣接して配置しており、その遺伝子 (*aco*) の破壊は avermectin の生成の低下を引き起こすこと、さらにこの状態に *S. avermitilis* の野生株の培養物の酢酸エチル抽出物を添加すると avermectin の生成が回復することが観察された。また、組み換え AvaR1 タンパク質と *avaR1* の上流領域の配列を含むオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイでは AvaR1 がオリゴヌクレオチドと強固に結合し、その結合は野生株の培養液の酢酸エチル抽出物を添加によって解離することが観察されていた。このことは avermectin の生成過程に低分子遺伝子調節物質が関与していることを示唆するものであった。一般に $\gamma$ -butyrolactone構造は塩基性条件下ではラクトン部分の加水分解を生じることが知られている。実際に A-factor や *virginiae* butanolide を塩基性下で処理すると、その遺伝子発現の調節効果が消失する。一方、*S. avermitilis* の酢酸エチル抽出物は $\gamma$ -butyrolactoneとは異なり、塩基性下でもその遺伝子発現調節活性は失われない。したがって、*S. avermitilis* が生成する低分子遺伝子発現調節物質はこれまで報告された $\gamma$ -butyrolactone構造とは異なる物質であることが示唆された。そこで上記のゲルシフトアッセイによって *S. avermitilis* の野生株の培養液 (1,000 L) から目的の低分子遺伝子発現調節物質の単離を試みた。培養液を HP-20 に吸着、溶出、有機溶媒による分別抽出、シリカゲルによるクロマトグラフィー、そして最終的に逆相分取 HPLC を 2 回繰り返すことで、およそ 1.2 mg の目的物質を単離することができた<sup>28)</sup>。各種スペクトルデータから平面構造を推定することができ *avenolide* と命名した。*Avenolide* は  $\gamma$ -butyrolactone 骨格ではなく、全く新規な *butenolide*

Fig. 6. Avenolideの $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$  NMRによる構造解析

赤両矢印で示したC-11とC-13の間のcross peakが観察されたこと、また青矢印で示したHMBCが観察されないことから1の構造が強く示唆された。

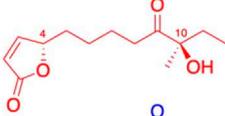
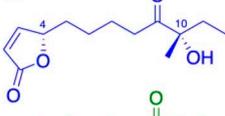
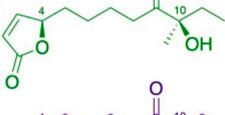
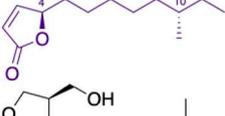
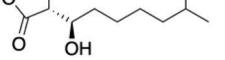
構造を有する化合物であった (Fig. 6)。平面構造には2箇所の不斉点 (4, 10位) があり、立体構造を確認することはできなかった。そこで、これらの立体化合物をすべて全合成することとした。なお、butenolide部分の4位の立体はこの部分の合成品のCDスペクトルを比較することによって4Sであることが明らかとなったが結合活性の比較を兼ねて3種 (4S-10R, 4S-10S, 4R-10R) の化合物を合成した。最終合成品をキラルカラムで分析したところ4S,10R体が培養液から単離したavenolideと一致した<sup>29)</sup>。それぞれの立体は結合活性に非常に重要で、4S,10S体は4S,10R体の50%程度、4R,10R体では4%程度に低下した。このように極めて正確な立体構造を認識してAvaR1タンパク質と結合していることが明らかとなった (Fig. 7)。なお、合成品の4S,10R体を*S. avermitilis*のaco欠失株に添加培養 (最小有効濃度 4 nM) することに

よってavermectinの生成は完全に回復した<sup>28)</sup>。

### 異種発現系による2次代謝産物の生成系の開発

*S. avermitilis*のゲノム解析の後、本菌のゲノム情報をいかに有効に利用することは重要な課題である。休眠状態の2次代謝産物合成遺伝子群を人為的に強制発現させることによって新規な化合物の蓄積が期待できる。また、特定の2次代謝産物合成遺伝子群の各遺伝子の解析などを行う上でも、異種発現が達成できる系は非常に有用であると考えられる。これらの解析には遺伝子の導入や遺伝子破壊などの分子遺伝学的方法が必須であるが、多くの微生物は大腸菌や枯草菌のように効率良くDNAを導入することが可能ではない。*Streptomyces*属のいくつかの種ではDNAの導入

Fig. 7. Avenolideの立体異性体および関連誘導体の組み換え AvaR1 結合タンパク質との結合の比較

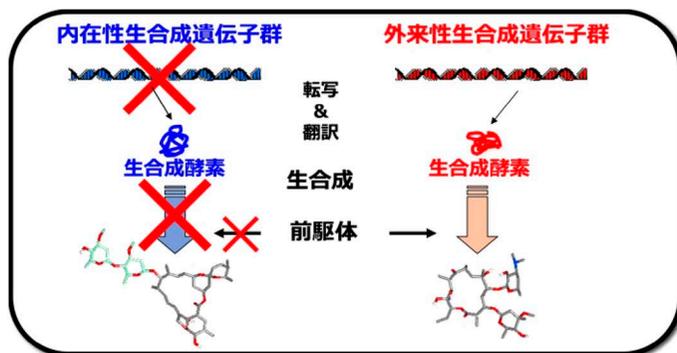
各種化合物(立体)	構造式	比活性 (%)
(4 <i>S</i> , 10 <i>R</i> )		100
(4 <i>S</i> , 10 <i>S</i> )		50
(4 <i>R</i> , 10 <i>R</i> )		4.2
(4 <i>S</i> )-10-deoxy		1.2
SCB1		0.0038

SCB1は *S. coelicolor* A3(2) の生産する低分子遺伝子発現調節物質。

すら出来ないことが多々ある。幸いなことに *S. avermitilis* は遺伝子の導入や遺伝子破壊などの分子遺伝学的解析が可能な数少ない *Streptomyces* 属放線菌の一つである。また、異種の2次代謝産物生合成遺伝子群を発現させるとき、内在性の2次代謝産物が同時に生成されるような場合、前駆物質の競合や生産物の解析のための分離など不都合が生じることが懸念される。実際に、*S. avermitilis* の内在性のポリケチド化合物の avermectin と oligomycin の生産は、avermectin が生産される条件では少量の oligomycin の蓄積が観察される。この条件下、avermectin の生成を停止させるような欠変異株では oligomycin の蓄積が25倍以上も上昇する。これは、avermectin 生合成に利用されていた前駆物質 (malonyl-CoA や methylmalonyl-CoA などのポリケチド化合物の前駆物質) が avermectin の生合成が停止したため、それらが oligomycin 生合成に流れていったものと推察され

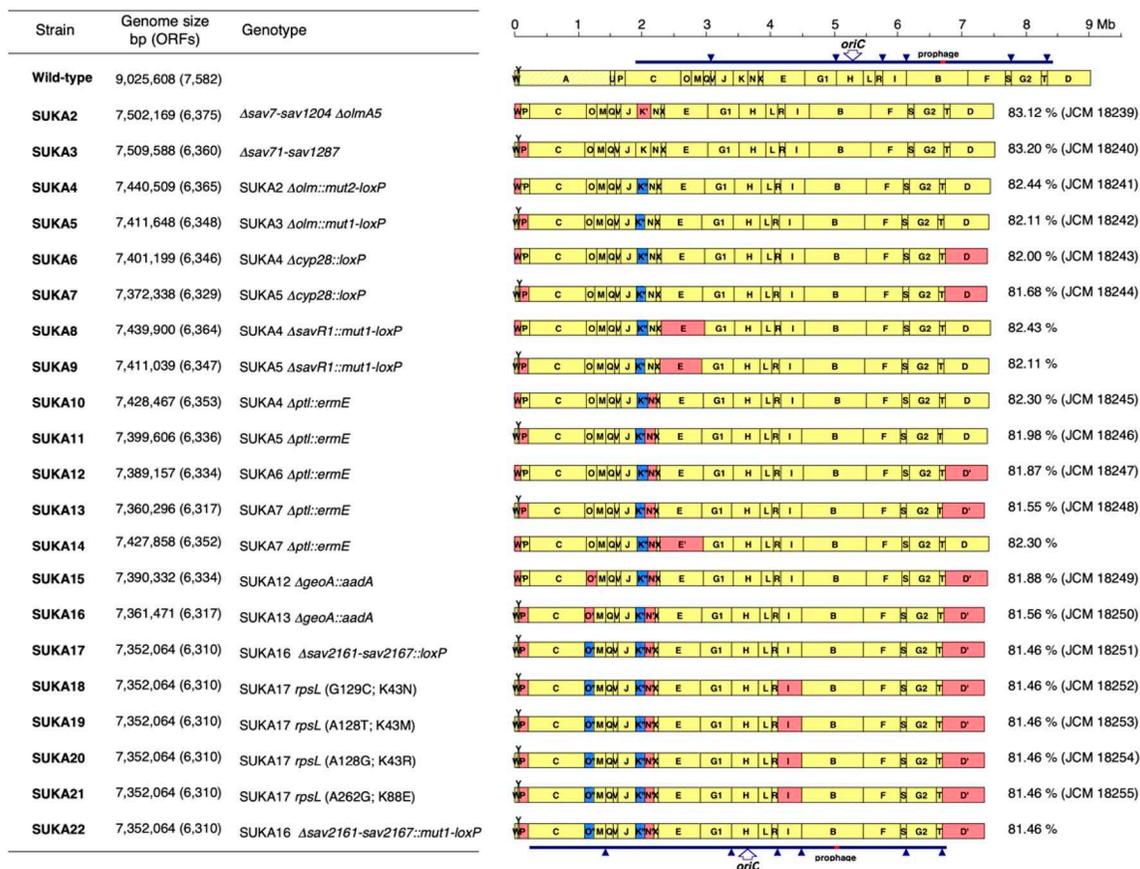
る。したがって、異種発現系では宿主の内在性の2次代謝産物生合成遺伝子群を欠失させて代謝産物の生成を停止させ、外来性の異種生合成遺伝子群によって転写・翻訳されて生成する生合成酵素によって効率よく前駆体が利用されることが望ましい (Fig. 8)。 *S. avermitilis* のゲノム上の各遺伝子にコードされているタンパク質の機能予測の解析から、ゲノムの左末端からおよそ2 Mbp から右末端からおよそ0.5 Mbp までの約6.5 Mbp の領域は他の *Streptomyces* 属の放線菌のゲノムと非常に相同性が高く、かつ複製、転写、翻訳や1次代謝に関与する遺伝子がすべてこの6.5 Mbp のコア領域に配置していることが確認された (Fig. 4)。一方、2次代謝産物生合成遺伝子群の半数以上は上記のゲノムの左末端から2 Mbp および右末端から0.5 Mbp の領域に配置していることが確認されるときに、この領域には多くの転移因子も存在していることが明らかとなった。即ち、この領域

Fig. 8. 最適な異種2次代謝産物生合成遺伝子群発現および代謝産物の生産



は水平伝播によって色々な遺伝子が転移したものと推察される。なお, avermectin や同じくポリケチド化合物である filipin の生合成遺伝子群も左末端から 0.5 Mbp の領域に配置している。一方, *S. avermitilis* は現在も avermectin の工業生産のための産業微生物として利用されている。したがって, 本菌は工業生産のための本質的な機能を有した菌株であると結論することができる。おそらく, 生合成遺伝子群の発現が効率良く行われることと, それらの生合成に利用される前駆物質の供給が効率良いゲノム構成であると推察される。効率良い前駆物質の供給と物質生成に利用されるエネルギーや補酵素は 1 次代謝系によって供給される。したがって, 本菌は物質生産過程における 1 次代謝と 2 次代謝との連携が極めて効率良く稼働している菌株であると思われる。そこで, 内在性 2 次代謝産物生合成遺伝子群のほとんどを欠失させること (発現していない休眠状態の生合成遺伝子群は除く)。複製, 転写, 翻訳および 1 次代謝に関与する遺伝子はすべてそのまま残しておく, というコンセプトで *S. avermitilis* のゲノムの再構成を計画した。先にも述べたようにゲノムの左末端からおよそ 2 Mbp には必至な遺伝子は存在しない。また, この領域には内在性の 2 次代謝産物の生合成遺伝子群が多数配置していることから, 最初にこの領域 1.5 Mbp の欠失を試みた。

*S. avermitilis* では遺伝子破壊の系が効率良く実施できるので, その方法に習って 1.5 Mbp の欠失を検討した<sup>30)</sup>。一般に遺伝子破壊などの欠失を行うには欠失させたい部分の上流および下流の領域, それぞれ 1.5 kbp~2.0 kbp をクローン化しておきその間に選択マーカーを連結し, それを直接欠失させる菌株に形質転換によって導入する。通常, 遺伝子破壊などの欠失は数 kbp 程度であるが 1 Mbp 以上の領域を一度に欠失させた例は殆ど無い。選択培地で欠失体を選択し, そのゲノムを調べてみたところ, ほとんどの欠失体は目的の部分の欠失体ではなく, 欠失領域の小さい不特定の領域で組み換えたものが多かったが, その中から数クローン, 目的の領域が欠失した株を得ることができた<sup>30)</sup>。この方法では非常に効率が悪いことが予想されていたので, もう一つ別の方法を平行して行った。大腸菌の P1 ファージのゲノム DNA がファージの頭部コートタンパク質に収納されるとき, ファージゲノム上の特異的な 2 箇所の配列 (*loxP*) 間で P1 ファージにコードされている部位特異的組換え酵素 Cre によって収納できる大きさに編集される。この機構を利用し, 欠失させたい領域の上流と下流にそれぞれ *loxP* 配列を導入しておいた。この組み換え体に *cre* 遺伝子を *Streptomyces* 属で発現出来るようなプロモーターの支配に連結させ, 上記の組換え体に導入させ

Fig. 9. *S. avermitilis* の大規模欠失株 (SUKA株; Special Use of Kitasato Actinomycetales)

る。このことによって *loxP-loxP* 間に夾まれる領域が Cre によって部位特異的な組換えによって切り出される。この方法は非常に効率良く達成でき、ほぼ確実に目的の欠失株を得ることができた。以後はこの方法を用いてその他の領域の欠失を行った<sup>30)</sup>。内在性の2次代謝産物生合成遺伝子の中には上記で述べた6.5 Mbpのコア領域に配置しているものもいくつかあり、正確に目的の領域のみを欠失させることができるので近傍の1次代謝に参与する遺伝子などに影響なく行えた。現在までにいろいろな組み換え体を取得しているが、野生株のゲノムのおよそ80%程度まで切り縮めた欠失株を利用している (Fig. 9)。ゲノムが80%程度になったことによって、形態分化が野生株よ

りも若干旺盛になった。また、生育が若干早くなったことと定常期における菌体量の増加が観察された<sup>31)</sup>。なお、増殖の変化と欠失させた遺伝子の関連性に関してはいまのところ不明ではあるが、菌体量の増加は物質生産にとっても好都合であるかも知れない。このような組み換え体を生産培地で培養し、培養物を HPLC に供しても代謝産物のピークは確認することはできない (内在性の2次代謝産物の生合成遺伝子群を欠失させているため)。この状態に異種の2次代謝産物生合成遺伝子群を発現させ、代謝物が生成した場合、確認される化合物は導入した生合成遺伝子によって翻訳された生合成酵素によって生成された代謝物であると結論することができる。また、内在性の2

次代謝産物を生成しないため、前駆物質が目的の代謝物の生合成に効率良く取り込まれること、さらに培養物から効率良く目的代謝物を分離精製することも可能である。なお、異種発現に関しては生合成遺伝子のみならず有用な変換酵素の遺伝子も評価ができるように *S. avermitilis* の反応性の高いシトクロム P450 の遺伝子のいくつかも欠失させた系列も作製した。特に *S. avermitilis* の CYP105D7 は多くの化合物の酸素添加反応を触媒するため、このような酵素の遺伝子の欠失は異種の変換酵素反応を評価する上でも有用である。

## 異種2次代謝産物生合成遺伝子(群)の発現による物質生産

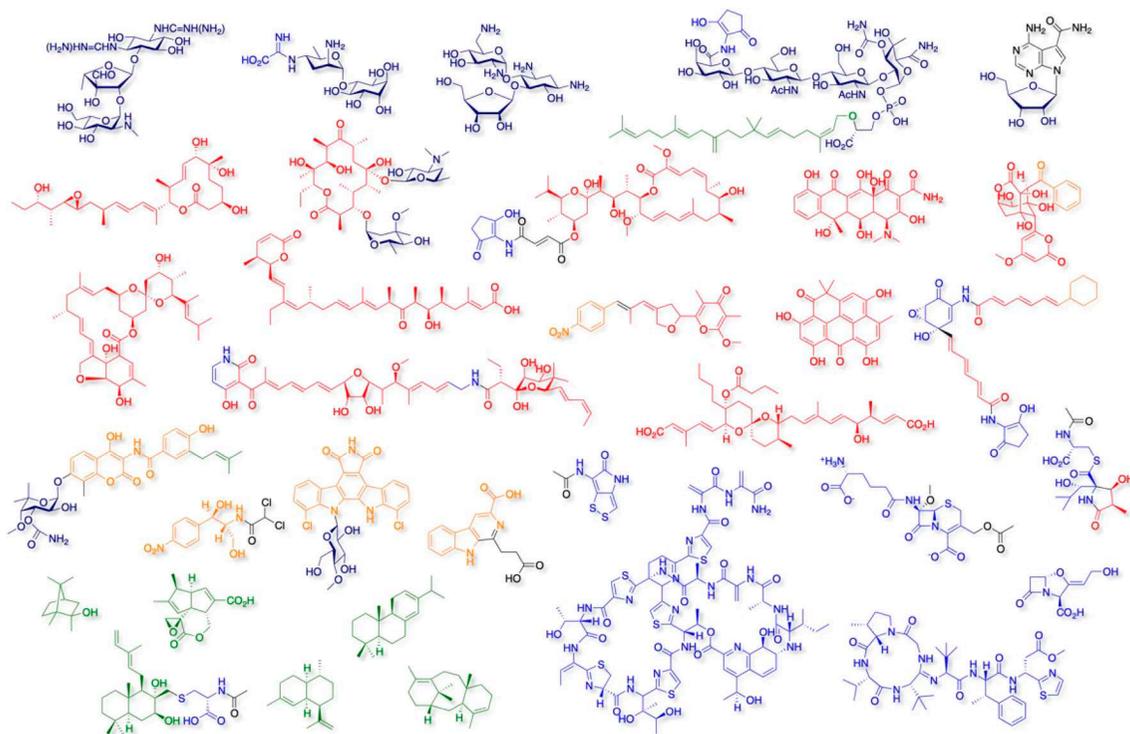
上記で作製した異種遺伝子(群)発現のための組み換え体を用いて、異種の2次代謝産物生合成遺伝子(群)を導入し、目的の代謝産物を生成することができるのかを確認した。1944年に S. A. Waksman が *S. griseus* から見出した抗結核薬 streptomycin の生合成遺伝子群はおよそ 33 kbp の領域に 28 個の遺伝子が配置している。この領域全体を含む cosmid クローンを *S. avermitilis* SUKA4 あるいは SUKA5 に効率良く導入することができた<sup>30)</sup>。*S. avermitilis* は通常、streptomycin に感受性を示すが、上記の生合成遺伝子群を導入した形質転換体は streptomycin に耐性を示すとともに streptomycin を生産し、菌体外に排出していることが確認された。一方、*S. avermitilis* には少なくとも 8 種の非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)の遺伝子を含む遺伝子群の存在が確認されていたが、いずれの培養条件でも NRPS から合成されるペプチド化合物は見出すことはできなかった。したがって、本菌は NRPS 由来のペプチド化合物の生合成を行うことができない可能性も示唆されていた。抗菌薬の中で最も使用されている抗生物質は  $\beta$ -lactam 系の抗菌薬である。本邦で

は cephem 系の抗菌薬が最も良く使用されている。*Streptomyces* 属放線菌が生産する  $\beta$ -lactam 系抗生物質として *S. clavuligerus* が生産する cephamycin C は 7 位のメトキシ基の存在によって  $\beta$ -lactamase に抵抗性示す優れた抗菌薬である。Cephamycin C の生合成遺伝子群は 1 つの NRPS の遺伝子を含む全長およそ 34 kbp の領域に配置している。この領域を含む cosmid クローンを *S. avermitilis* SUKA 株に導入したところ、cephamycin C を生産し菌体外に排出することが確認された<sup>30)</sup>。したがって、*S. avermitilis* では NRPS によって生成される代謝産物の生成にはなんら問題無いことが判った。前述した 2 つの抗生物質の生合成遺伝子群には遺伝子群全体の発現を調節する制御遺伝子が配置しているが、それよりも上位の制御遺伝子によってさらに制御されていることが明らかにされた数少ない生産菌である。*S. avermitilis* においても streptomycin の生合成遺伝子群の制御遺伝子(*strR*)を制御する遺伝子は AraC-family に属する制御遺伝子であることが明らかとなっている。*S. avermitilis* においても同様な AraC-family の制御遺伝子が streptomycin 生合成遺伝子群の制御遺伝子(*strR*)の発現を調節していることが確認された<sup>30)</sup>。一方、cephamycin C の生合成遺伝子群を制御する遺伝子(*ccaR*)の発現は anti-sigma 因子と anti-sigma antagonist によって調節されていることが明らかにされている。*S. avermitilis* でも同様な ortholog 遺伝子が配置しており、これらの遺伝子の欠失の結果は *S. clavuligerus* での解析結果と一致した<sup>29)</sup>。このように、それぞれの2次代謝産物生合成遺伝子群内の制御遺伝子の上位の制御系は生産菌が異なっても同様な制御遺伝子が存在すれば元株と同様に、代謝産物を生成することが可能であった。一方、上位の制御系が存在しない場合も予想される。Avermectin と同様なポリケチド化合物 pladienolide はマクロライド骨格を有する、極めて特異な作用機構(真核細胞の splicing 阻害)を

有する12員環マクロライド化合物である。ポリケチド化合物はラクトン型のマクロライドのような大環状ラクトン構造を有する一群である。これらの化合物の生合成はI型ポリケチド合成酵素 (type I PKS) によってラクトン部分が生成される。また、ラクトン骨格は低級脂肪酸が縮合し、 $\beta$ -位のカルボニルの還元様式によって多様な構造が形成される。また、縮合には基本モジュール構造を有するユニット毎に行われるため、縮合回数分のモジュール構成が酵素分子の中に配置している多機能酵素である。したがって、その酵素は巨大で、その遺伝子も非常に大きい。例えば avermectin のラクトン骨格を形成する type I PKS をコードする領域はおおよそ 65 kbp である。Pladienolide のラクトン部分の合成をおこなう type I PKS の遺伝子の領域もおおよそ 60 kbp 程度の大きさであった<sup>32)</sup>。このような巨大な DNA は cosmid ベクターでクローン化することは不可能である。したがって、我々は pladienolide 生合成遺伝子群全体を BAC ベクターでクローン化することにした。Pladienolide 生合成遺伝子群を含むおおよそ 70 kbp の DNA 断片を含む BAC クローンを *S. avermitilis* SUKA 株に導入を試みた。*S. avermitilis* への cosmid クローンのような 45 kbp 程度までの形質転換は問題無く行うことができたが、BAC クローン級の巨大な DNA ではそのような効率で導入することはできなかったが、非常に効率は悪かったが目的クローンを得ることができた。しかしながら、得られた形質転換体の培養物から pladienolide を検出することはできなかった。詳細に調べたところ、pladienolide 生合成遺伝子群内の遺伝子群全体を調節する制御遺伝子が発現していないことが明らかとなった。この場合、streptomycin や cephamycin C の生合成遺伝子群とは異なり、生合成遺伝子群の制御遺伝子を調節する上位の制御遺伝子が *S. avermitilis* には存在しないことが示唆された。そこで、pladienolide 生合成遺伝子群の制御遺伝子

(*pldR*) を *S. avermitilis* で発現が確認されているプロモーターに連結して、上記の形質転換体に導入したところ、著量の pladienolide の生産を確認することができた<sup>30)</sup>。

多くの2次代謝産物は生産菌の生育が定常期に差しかかる直前あたりから開始されることが多い。このことは生合成遺伝子群全体の発現を調節する制御遺伝子はその遺伝子群内に配置していることが即座に対応するには都合が良い。おそらくこのような制御タンパク質は生合成遺伝子群の各オペロンの上流領域に作用して転写を活性化する様式で生合成遺伝子全体の転写を開始させるものと思われる。一方、生育とともに細胞内環境の変化に対応して2次代謝産物生合成のマスタースイッチを「オン」にするには生合成遺伝子群全体を調節する制御遺伝子の発現を上位で調節するといった、単純な方法が最も効率良く細胞内環境の変化に対応できる方法であると推察される。しかしながらこのような各2次代謝産物生合成遺伝子群の制御遺伝子を上位で調節する機構は全てが理解されているわけではなく、むしろ理解されている例のほうが極めて少ない。したがって、異種発現ではこのように上位の制御系は不明であるが、それと同様の ortholog 遺伝子が配置していることを期待するか、あるいはそのような ortholog 遺伝子が存在しない場合は、pladienolide 生合成遺伝子群の発現のように、生合成遺伝子群内の制御遺伝子を強制発現させることによって異種発現を達成させることが可能である。また、生合成遺伝子群内に遺伝子群全体を制御する制御遺伝子が存在しない場合も稀ではあるがいくつかそのような生合成遺伝子群も見受けられる。このような場合、当該遺伝子群内のオペロンを強制的に発現させることが第一の選択である (オペロン構造が複雑であると導入するプロモーターの箇所が多数となるため)。プロテアソームの特異的な阻害剤である lactacystin は NRPS-PKS hybrid 構造を有する化合

Fig. 10. *S. avermitilis* SUKA株で異種発現が達成された代謝産物

藍色：糖質経路，赤色：ポリケチド経路，橙色：シキミ酸経路，青色：ペプチド経路，緑色：メバロン酸経路あるいはMEP経路由来の代謝産物。

物であり，その生合成遺伝子群はtype I PKSとNRPS遺伝子の両者を含む。幸いなことにlactacystinは5つの遺伝子によって生合成されること，さらにこれらの遺伝子の全てが同一方向に転写される1つのオペロンを形成していることが明らかとなった。したがって，生合成遺伝子群の先頭の遺伝子の上流に*S. avermitilis*で発現が確認されているプロモーターを配置することによって*S. avermitilis* SUKA株で安定にlactacystinを生産することを確認することができた<sup>30)</sup>。これまでに40種を越える異種発現を行い，多くの場合その遺伝子群を導入することによって蓄積する代謝産物を確認することができた (Fig. 10)<sup>21,30,31)</sup>。

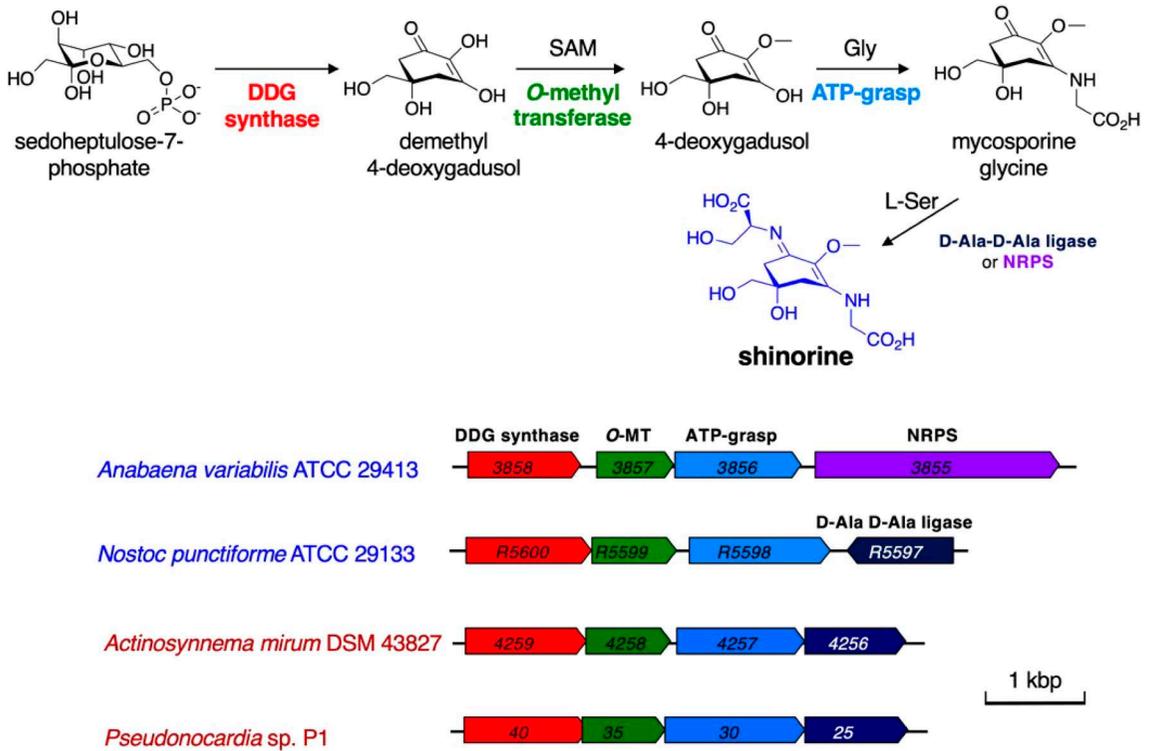
ところで異種発現では代謝産物の生産性は元株と比べていかなるものであるかも興味の一つであった。先にも述べた，streptomycinの*S. avermitilis* SUKA株

での異種発現はDNAを抽出した元株の生産菌*S. griseus*と比べて3倍程度高く，一方*S. clavuligerus*のcephamycin Cの生産は元株の2～3倍程度高かった<sup>30)</sup>。また，*S. venezuelae*のchloramphenicolの*S. avermitilis* SUKA株での生産は非常に効率良く，元株のおよそ10倍程度も効率であった。なお*S. avermitilis* SUKA株での異種発現はすべてが良好なわけではなく，ribostamycinやtetracyclineの異種発現は元株よりは低いものであった<sup>31)</sup>。

### 休眠遺伝子の覚醒による物質生産

前述したようにStreptomyces属放線菌は，一菌株のゲノムに少なくとも20以上の2次代謝産物生合成遺伝子群を保有していること。さらにそれらの多くは休眠状態であることがこれまでの

Fig. 11. Shinorineの生合成経路および *Cyanobacteria* 門 (*Anabaena variabilis* 及び *Nostoc punctiforme*) と *Actinomycetales* 目 (*Actinosynnema mirum* 及び *Pseudonocardia* sp.) の生合成遺伝子群



*Streptomyces* 属放線菌のゲノムから共通した解析結果であった。したがって、このような休眠状態の生合成遺伝子群を確実に、かつ再現性良く覚醒させることができれば新規な構造を有する代謝産物の探索に貢献できることが期待される。特に異種発現によって休眠遺伝子が覚醒させることが可能であれば非常に興味深い。*S. clavuligerus* の cephamycin C に異種発現の検討を行うにあたり、本菌の cosmid ライブラリーを構築し全てを保存してあった。その後、オランダのグループから本菌のゲノム解析の論文および配列データが報告された。本菌も極めて多くの2次代謝産物生合成遺伝子群を保有しており、かつて cephamycin C や clavulanic acid が非生産になった変異株から holomycin の生成が確認されていた。事実、ゲノム配列上には holomycin の生合成遺伝子群が配置

しており、*S. avermitilis* の neopentalenoketolactone の生成と同様、主生産物の生成が停止することによって、前駆物質が他の生合成へ供給され holomycin が生成されたものと思われる。一方、*S. clavuligerus* には glycolipid 系化合物の生合成遺伝子群と推定されるおよそ 26 kbp の領域の存在が確認された。しかしながら、過去の文献を検索しても本菌から glycolipid 化合物の生成に関する記述は一切無く、実際に菌を培養しても当該化合物の生産はいずれの培地でも観察されなかった。Cosmid クローンから当該領域を含むクローンを選抜し、さらにこれから生合成遺伝子群の最小単位を再クローン化し、*S. avermitilis* SUKA 株に導入した。得られた形質転換体を適当な培地で培養し、その培養液を解析した結果、glycolipid 系化合物である pholipomycin を生成していることが明ら

かとなった<sup>31)</sup>。これは休眠遺伝子群を異種発現系に導入させることによって休眠状態だった生合成遺伝子群が発現し、さらにそれらの遺伝子産物からの生合成によって代謝産物を生成させた初めての例であった。このような異種発現用の菌株に導入するだけで代謝産物を生成する例は極めて少ないが、我々は最近、この方法によって thioamide を含むペプチド化合物 neothioviridamide の生成に成功した<sup>33)</sup>。これらの例は恐らく、元菌では生合成遺伝子群を転写する時期に最適な sigma 因子が、あるいは転写活性化因子が発現していない、あるいはゲノムにそのような因子の遺伝子が存在しないため、生合成遺伝子群は休眠状態のままであると推定できる。一方、*S. avermitilis* SUKA 株にはこれらの遺伝子群の転写のための sigma 因子あるいは転写活性化因子の遺伝子が配置および発現することでこれらの生合成遺伝子群を転写・翻訳し、生合成酵素群が形成されそれぞれの化合物が生合成されたものと思われる。このことは休眠遺伝子(群)の多くは遺伝子が壊れているのではなく転写することができないため休眠状態であるものと推察される。実際に生合成遺伝子が壊れているため(欠失その他によって)発現していない遺伝子は *S. avermitilis* の monoterpene 化合物 2-methylisoborneol (2-MIB) 合成遺伝子が唯一の例である<sup>34)</sup>。2-MIB は geranyl diphosphate (GPP) を GPP methyltransferase によって methyl GPP を生成し、それを脱二リン酸化および環化を触媒する 2-MIB 合成酵素によって生成する。我々は世界に先駆けて、2-MIB の生合成遺伝子を同定することができた<sup>34)</sup>。その過程で *S. avermitilis* のゲノムを詳細に解析した結果、ゲノムの左末端から 1.25 Mbp の領域に GPP methyltransferase の完全長の遺伝子を、さらにその隣(上流側)に IS (挿入配列)挿入すると共に 2-MIB 合成酵素の C-末端側の Mg<sup>2+</sup> 結合モチーフ以降をコードしている領域が欠失した遺伝子配列を見出すことができた。即ち、*S.*

*avermitilis* は過去に 2-MIB を生成していたがその後、水平伝播などによって IS が転移し、その 1つが 2-MIB の構造遺伝子領域に挿入し、さらに欠失が起こり現在に至ったものと推察される。

## 休眠遺伝子の強制発現による物質生産

### 1. Mycosporine 様アミノ酸

2次代謝産物の生成は *Actinobacteria* 門の *Actinomycetales* 目の菌株では旺盛であることが知られており、その中でも *Streptomyces* 属は生産量も効率的であるため、医薬品などの生産用の産業用の微生物として利用されている。一方、真正細菌の中でも *Cyanobacteria* 門あるいは *Deltaproteobacteria* 網に属する微生物の一群も 2次代謝産物の生成が確認されているが、種類および生産量は *Streptomyces* 属には及ばず、工業的な生産菌としての用途はほとんど無い。これらのうち、*Cyanobacteria* 門の *Anabaena* 属や *Nostoc* 属は紫外線吸収物質である shinorine を生産することが知られている。Shinorine は *Cyanobacteria* 門などの原核細胞生物のみならず、糸状菌や微細藻類あるいは海藻からも生成が確認されており、実際に海藻から抽出した shinorine が化粧品に使用されている。これまで、*Actinomycetales* 目の放線菌から shinorine 生産の詳細な報告はなく、学会発表の抄録のようなものに記載があるが詳細は全く不明であった。上記のように *Cyanobacteria* 門や *Deltaproteobacteria* 網、さらには糸状菌、微細藻類や海藻で生産が確認されているにも関わらず、放線菌からの生産の詳細な報告例が無いので *Actinomycetales* 目の放線菌では shinorine 生合成遺伝子群が休眠状態であると推察されていた。そこで我々は生物情報学的な検索を *Actinomycetales* 目の放線菌で行った結果、*Actinosynnema mirumi* DSM 43827 と *Pseudonocardia* sp. P1 の 2 菌株で shinorine の生合成遺伝子群と推察される領域を見出した。解析が

完了した同時期に米国のWalshらから *Anabaena* 属などの *Cyanobacteria* 門からの生合成遺伝子の解析結果の論文が発表され (Fig. 11), さらにその中の記述に放線菌 (*A. mirum* DSM 43827) にも同様な ortholog があるらしい, との記述があった<sup>35)</sup>。我々は直ちにこれらの菌株を培養し shinorine の生成を各種の培養条件で確認した。*A. mirum* DSM 43827 はいかなる培養条件でも shinorine を蓄積しなかったので当該遺伝子群は本菌で休眠状態であると結論された。一方, *Pseudonocardia* sp. P1 は高窒素源の培養条件でのみ極めて少量の shinorine を蓄積したが *Anabaena* 属の生成量よりも遙かに少量であった。そこで *A. mirum* DSM 43827 および *Pseudonocardia* sp. P1 株から shinorine 生合成遺伝子群 (およそ 5.5 kbp) と推定される領域をそれぞれ菌の染色体から *in vivo* cloning で取得した。幸いなことに両菌の生合成遺伝子群は *Nostoc* 属とは異なり 4 つの遺伝子がすべて同一方向にオペロンを形成していた。そこで, *S. avermitilis* SUKA 株での安定な発現を期待して, 同菌株で転写が確認されているプロモーターを同オペロンの先頭に挿入したのも作製した。*A. mirum* DSM 43827 および *Pseudonocardia* sp. P1 から得た生合成遺伝子群をそのまま *S. avermitilis* SUKA 株に導入しても shinorine の生成は確認することができなかった。一方, プロモーターを連結したクローンでは shinorine の生成が確認することができ, 特に *A. mirum* DSM 43827 から得た生合成遺伝子群を強制発現させた形質転換体からは 154 mg/L 以上の shinorine の生成が確認された<sup>36)</sup>。なお, 同じプロモーターを使用した *Pseudonocardia* sp. P1 からの生合成遺伝子群から得た形質転換体では非常に少なく, 0.38 mg/L 程度の shinorine を検出した。なお, *A. mirum* DSM 43827 から得た生合成遺伝子群の強制発現株の shinorine 生産量は *Cyanobacteria* 門や実際に化粧品の製造のために抽出に使われている海藻と比較した場合 (海藻との比較なので乾燥

菌体あたりで比較), 10 倍以上も効率良く生成することが判った。また, 上記の生産量は合成培地での生産量であり, その後培地および培養検討によってさらに蓄積量が上昇している。

## 2. 細菌由来の terpene 化合物の分布および新規 terpene 化合物の生産

多くの 2 次代謝産物の中で, mevalonate pathway あるいは MEP (MethylErythol-4-Phosphate) pathway から生成される isoprenyl diphosphate (IPP) および dimethylallyl diphosphate が縮合した prenyl diphosphate から生成する terpene 化合物は, 植物などの精油成分に含まれるものが多く, さらに医薬品 (menthol, taxol や artemisinin) として利用されている代謝産物も少なくない。一般的にこれらの terpene 化合物は植物や菌類特有の代謝産物として知られており, 放線菌を含む細菌からの terpene 化合物の生産は非常に稀であり, 異臭物質の geosmin や前述した 2-MIB 程度が知られているに過ぎなかった。しかしながら, 我々が世界で初めて 2-MIB 合成酵素の遺伝子を同定したとき, 細菌の terpene 合成酵素と植物由来の同酵素のアミノ酸配列の間には相関性は極めて低く, さらに植物の terpene 合成酵素は N-末端側のアミノ酸配列に特徴があり, この領域が多くの植物由来の terpene 合成酵素で高い相同性を有するため, BLAST などの配列の相同検索などで植物などから容易に新たな terpene 合成酵素を見つけ出すことが可能であった。このような背景で植物由来の terpene 合成酵素の研究は進展していった。一方, 放線菌を含む細菌由来の terpene 合成酵素は全体的に相同性が低く, さらに植物由来の terpene 合成酵素に見出される N-末端側の特徴ある配列は存在しないため, 一般的な配列相同性で検索する BLAST 解析では新たな terpene 合成酵素を見出すことが出来なかった。これが細菌での terpene 化合物研究の進展を遅らせた要因であった。タンパ

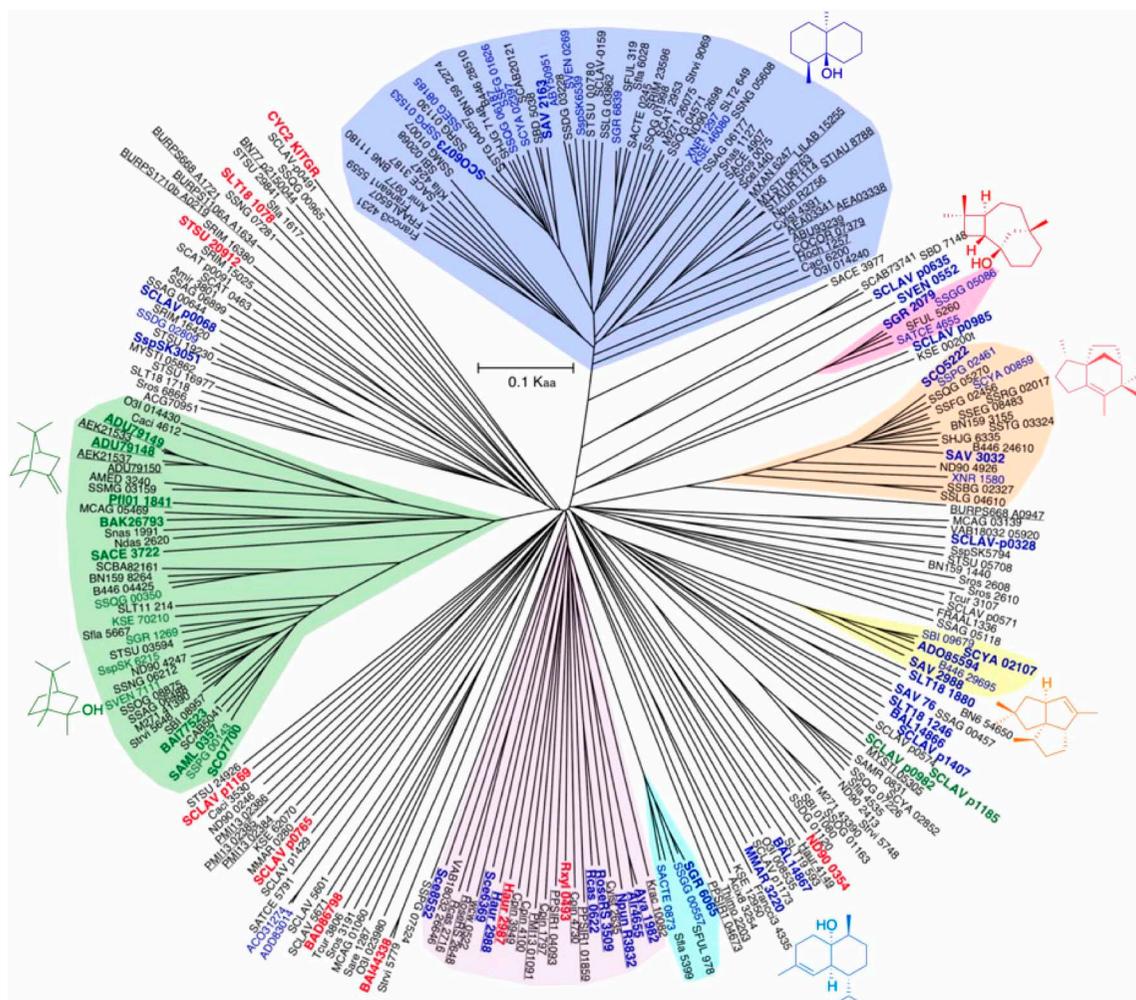
ク質の機能解析を行う場合、相同性で検索する方法以外にモチーフ配列の相同性などを検索する方法もあるが、これらにも限界がある。一方、互いに相同性が低い配列同士を比べるときに統計モデルを用いた隠れマルコフモデルによる検索方法は非常に有効な場合が多い。我々は2-MIB合成酵素を細菌から見つけだすため、その当時アミノ酸配列が決定されていた数少ない細菌由来のterpene合成酵素(pentalenene synthase, geosminおよびepi-isozizaene synthases)のアミノ酸配列から、Mg<sup>2+</sup>結合領域と下流の高度に保存された3つのアミノ酸を含む配列(NSE triad)までのアミノ酸配列から統計モデルを作製し、それを当時(2007年)のNCBIに登録されていた細菌のゲノムデータベースのタンパク質(1,922,990タンパク質)に対して検索を行ったところ、41個のタンパク質が選択され、その中から2-MIB合成酵素を見つけだし、最終的に実験科学的に証明することができた<sup>34)</sup>。先にも述べたように、この成果から*S. avermitilis*の新規terpene合成酵素遺伝子を見出し、強制発現によってavermitiloneおよびavermitilolの発現につながった<sup>23)</sup>。一方、これらの成果から細菌にもterpene合成酵素が広く分布していること推察されたため、さらに精度の良いモデルを上記の41種の細菌由来のterpene合成酵素と推定された配列から作製した。新たに作製した細菌terpene合成酵素の隠れマルコフモデル(2<sup>nd</sup> version)を用いて再度、細菌のタンパク質を検索したところ140種のタンパク質の配列が選択された<sup>37)</sup>。得られた140種のタンパク質の配列のアラインメントを行い、さらに上記の保存された領域間のアミノ酸配列を集め、再度モデルを作製した(3<sup>rd</sup> version)。このモデルを用いて、その当時NCBIに登録されていた細菌のタンパク質(8,759,463個)を用いて検索を行ったところ、262種のterpene合成酵素と推定されたタンパク質が得られた(Fig. 12)<sup>38)</sup>。得られたタンパク質のアミノ酸配列からアラインメン

トを行い、その結果から系統樹を作製した。その結果、細菌のterpene合成酵素は、大きくgeosmin/germacradienol, 2-MIB, pentalenene, (+)-caryolan-1-olおよびepi-cubenol合成酵素に分けることができ、かつこれらの分岐群(clade)に当てはまらない合成酵素の多くは新たな環化反応を触媒するものと推察された。上記の分岐群に属さない29種を選択し、それぞれをPCRで増幅あるいはコドンを用いた*Streptomyces*属の使用頻度に最適化した人工遺伝子を作製した後、上流に*S. avermitilis*で発現可能なプロモーターとprenyl diphosphate synthase(geranyl diphosphate, farnesyl diphosphateあるいはgeranylgeranyl diphosphate synthase)遺伝子を配置したベクターに連結してオペロンを形成させたカセットを*S. avermitilis* SUKA22に導入した。得られた培養物を解析したところ多くの場合、植物から報告されているterpene化合物を見出すことができたが、13種の新規な骨格のterpene化合物を得ることができた<sup>39)</sup>。なおこれらの新規terpene化合物の単離および構造解析の論文は2018年度のThe Journal of Antibiotics, Ōmura Awards for excellenceに選定された。このようにterpene化合物は植物や菌類特有の代謝産物と認知されていたが、ゲノム解析と*S. avermitilis*を用いた異種発現系によって、細菌にもterpene化合物の合成酵素遺伝子が広く存在していることが明らかになった。日々ゲノム解析データベースは蓄積しており、最近のタンパク質データベースを検索することによって更なる新規骨格を有するterpene化合物およびその合成酵素を見出すことが期待できる。

### 遺伝子編集による生物活性の 改変のための非天然型誘導体の創製

生物活性を有する化合物が医薬品などとして用いられるようになると、さらなる効果の増強、副作用の軽減、生物活性スペクトルの拡大など天然

Fig. 12. 細菌のタンパク質データベースから隠れマルコフモデルを用いた統計解析によって選別された推定 terpene 合成酵素アミノ酸配列からの系統分類

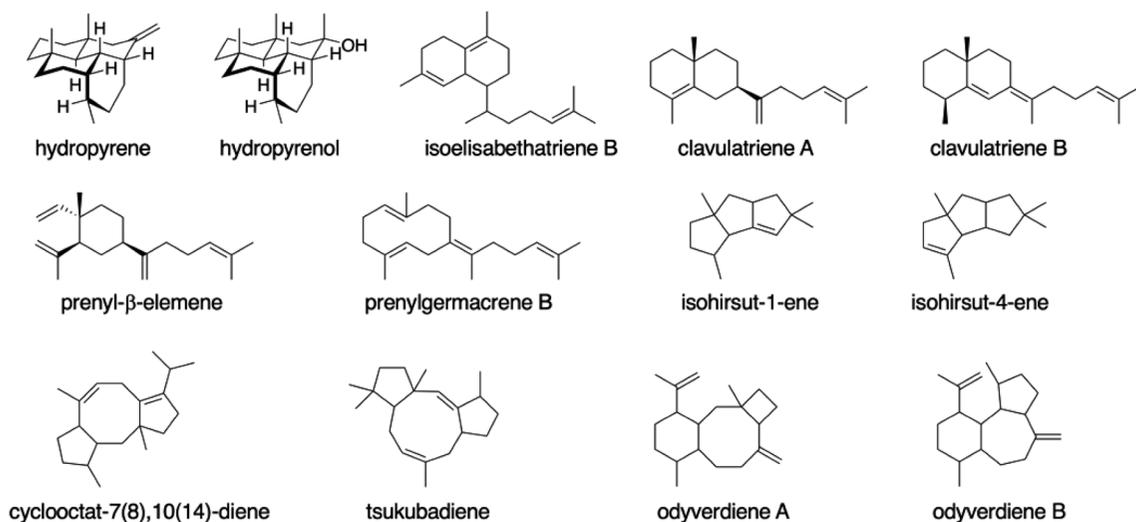


緑色：monoterpene 合成酵素，青色：sesquiterpene 合成酵素，赤色：diterpene 合成酵素，紫色の分岐束はグラム陰性菌由来の terpene 合成酵素。なお，Firmicutes 門および始原菌界の微生物からのタンパク質データベースからは得られなかった。

物の作用を越える誘導体の創製が試みられる。極めて単純な構造修飾で生物活性が改変できれば効率的ではあるが，多くの場合，単純な構造改変では期待される生物活性の改変は困難な場合が多い。また，天然物は構造が複雑なことから，有機合成で構造修飾を行う過程で反応性の高い官能基の修飾，さらにそれらの脱保護といった複雑な化学反応を必要とする。また，ポリケチド化合物のポリケチド骨格の炭素鎖の伸長あるいは縮小などC-

C結合を改変する合成は極めて困難な有機合成を展開しなければならない。また，ペプチド化合物ではアミノ酸残基の交換も極めて困難な場合もあり，全合成を行う工程数が要求されることが多く，容易にそのような構造変換は達成できていない。これまで述べてきたように，*S. avermitilis* SUKA株を宿主とする異種生合成遺伝子群の発現は極めて効率良く達成できることが多く，さらにtype I PKsによって生成されるポリケチド化合物や

Fig. 13. 細菌由来の terpene 合成酵素遺伝子を強制発現によって得た新規 terpene 化合物



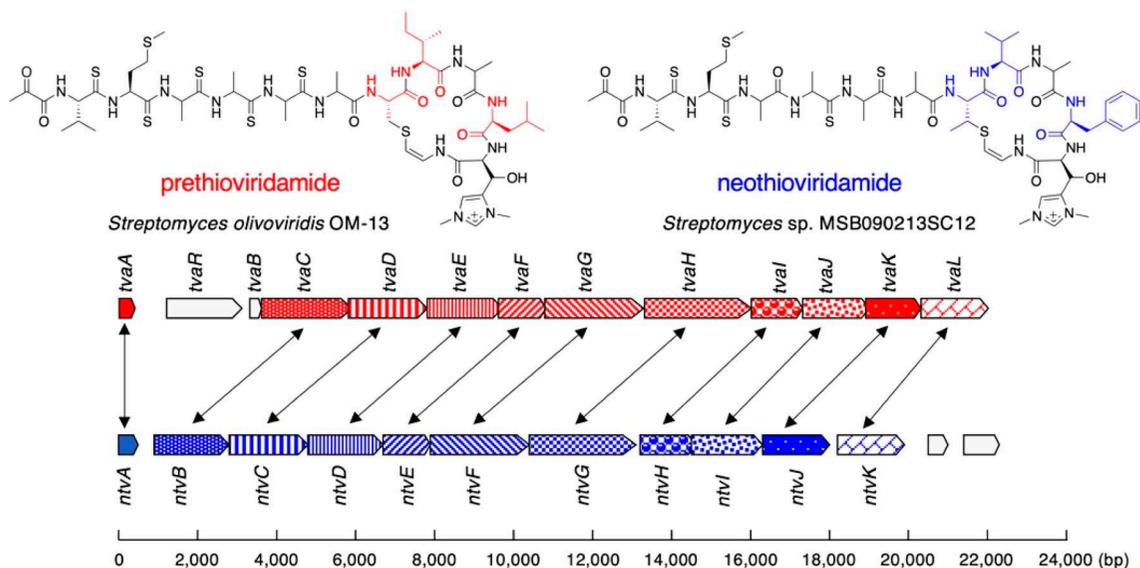
Isohirsut-1-ene と isohirsut-4-ene は sesquiterpene 化合物, その他は diterpene 化合物。

NRPSによって生成されるペプチド化合物の再現性ある異種発現は我々の異種発現系以外は報告例が無い。前述したように *S. avermitilis* SUKA 株は多くの異種生合成遺伝子群の発現が効率良く達成できる。したがって、生産菌から取得した完全長の当該生合成遺伝子群を我々の異種発現用のベクターに連結し、さらに試験管内で遺伝子編集した後、*S. avermitilis* SUKA 株に導入し、生成物の解析を行うことを計画した。

ペプチド化合物の生合成に関しては21世紀になって、NRPSによるアミノ酸の活性化によるペプチド結合の形成以外に ribosome で翻訳された短いペプチドを基質として修飾、そして最終的に signal peptide 部分の切断によって代謝産物が生成する機構が明らかにされた (これらは Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides; RiPPs と呼ばれる)。かつて本邦で飼料添加薬として利用されていた thiopeptide や nosiheptide はこのような生合成機構によって生成されることが、今世紀になって明らかになった。これらの化合物の基本骨格は数アミノ酸から10数アミノ酸残基

から構成されている。したがって、その基本骨格のペプチド部分をコードする遺伝子にアミノ酸置換変異を導入し、その遺伝子を単独発現させることによって基本骨格部分を大量供給することによって、新規なアミノ酸置換型の非天然型ペプチド化合物の創製が行えるものと当初思われた。しかしながら基本骨格ペプチドの構造遺伝子は骨格のアミノ酸をコードしているだけの単純構造ではなく、leader peptide などがC末端側あるいはN末端側に連結している precursor peptide として翻訳され生成されることが明らかとなった。さらに precursor peptide をコードする構造遺伝子を、構造修飾などを行う遺伝子を含む生合成遺伝子群とは別に発現させることによって precursor peptide を供給することの試みは極めて効率が悪いことが明らかになった。おそらく、precursor peptide のような小分子のペプチドは内在性の peptidase などによって速やかに分解されるようで、precursor peptide が生成すると同時に同じ生合成遺伝子群内にコードされている修飾酵素によって修飾されることによって内在性の peptidase から

Fig. 14. Prethioviridamide 及び neothioviridamide の構造およびそれらの生合成遺伝子群



<i>tva</i>	aa	ID%	SI%	<i>ntv</i>	aa	Predicted function
TvaA	75	60/73		NtvA	87	precursor peptide
TvaR	309		-			LuxR family transcriptional regulator
TvaB	41		-			hypothetical protein
TvaC	378	37/52		NtvB	319	hypothetical protein
TvaD	329	30/46		NtvC	334	hypothetical protein
TvaE	308	33/46		NtvD	313	hypothetical protein
TvaF	197	42/61		NtvE	200	decarboxylase
TvaG	407	48/62		NtvF	405	methyltransferase
TvaH	452	54/70		NtvG	450	hypothetical protein
TvaI	218	55/69		NtvH	229	hypothetical protein
TvaJ	280	34/48		NtvJ	292	phytanoyl-CoA dioxygenase
TvaK	235	32/40		NtvJ	275	peptidase
TvaL	282	33/50		NtvK	280	hypothetical protein (regulator ?)

それぞれの遺伝子のハッチパターンは同一機能を有する遺伝子産物をコードする遺伝子を示す。

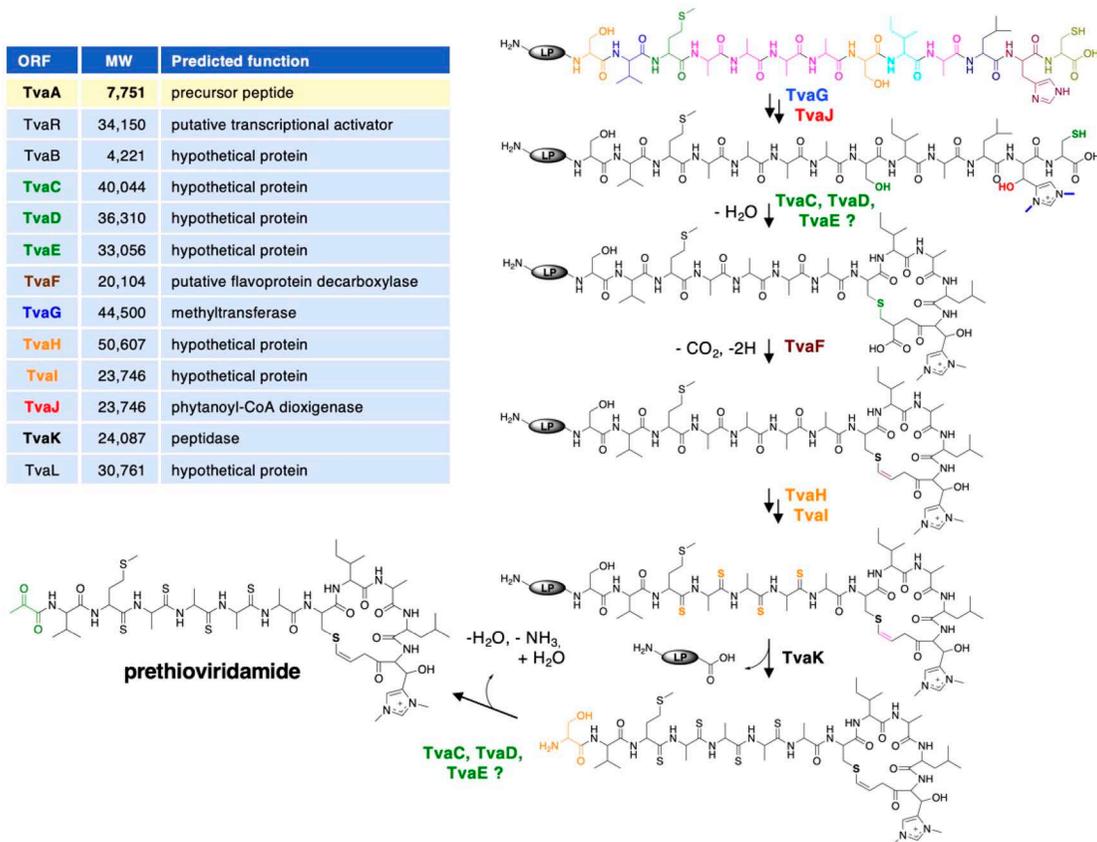
の分解を防いでいると思われる。したがって、改変 precursor peptide 遺伝子は正確に元の生合成遺伝子群の正しい位置に再構成させなければならない。RiPPs の生合成遺伝子群は NRPS と異なり、それほど巨大でなく、cosmid ベクターで収納できる大きさである。前述したように我々は休眠状態の thioamide を有する neothioviridamide の生合成遺伝子群の異種発現に成功している。これと類似の prethioviridamide は thioamide 結合を有する非常に強力な殺細胞活性を有する化合物である。これらの化合物の生合成遺伝子群は既に *S. olivoviridis* OM-13 ならびに *Streptomyces* sp. MSB090213SC12

それぞれの菌株からクローン化され詳細な配列解析が行われてた (Fig. 14)。さらにそれぞれの遺伝子産物の機能からその生合成過程が推定されている (Fig. 15)。通常、遺伝子の特定のアミノ酸置換は部位特異的変異導入によって行われる。しかし、この方法では一度に隣接した複数箇所のアミノ酸置換を行う場合は極めて効率が悪い。また、precursor peptide のアミノ酸 75 残基のうち、構造に反映している残基 (core peptide) は 12 残基である。この precursor peptide 遺伝子断片 (後の Gibson assemble を行うため start codon および stop codon からそれぞれ上流および下流の配列を含む) に

Fig. 15. Prethioviridamideの推定生合成経路

TvaA アミノ酸配列: H<sub>2</sub>N-MTEKTQITDVQAFEDLVAKVQEMDGPAAQASSTVAALAGLDAAELQNFLEEKSGISPDEEAQG-SVMAAAASIALHC-CO<sub>2</sub>H

ORF	MW	Predicted function
<b>TvaA</b>	<b>7,751</b>	precursor peptide
TvaR	34,150	putative transcriptional activator
TvaB	4,221	hypothetical protein
<b>TvaC</b>	40,044	hypothetical protein
<b>TvaD</b>	36,310	hypothetical protein
<b>TvaE</b>	33,056	hypothetical protein
<b>TvaF</b>	20,104	putative flavoprotein decarboxylase
<b>TvaG</b>	44,500	methyltransferase
<b>TvaH</b>	50,607	hypothetical protein
<b>TvaI</b>	23,746	hypothetical protein
<b>TvaJ</b>	23,746	phytanoyl-CoA dioxigenase
<b>TvaK</b>	24,087	peptidase
TvaL	30,761	hypothetical protein

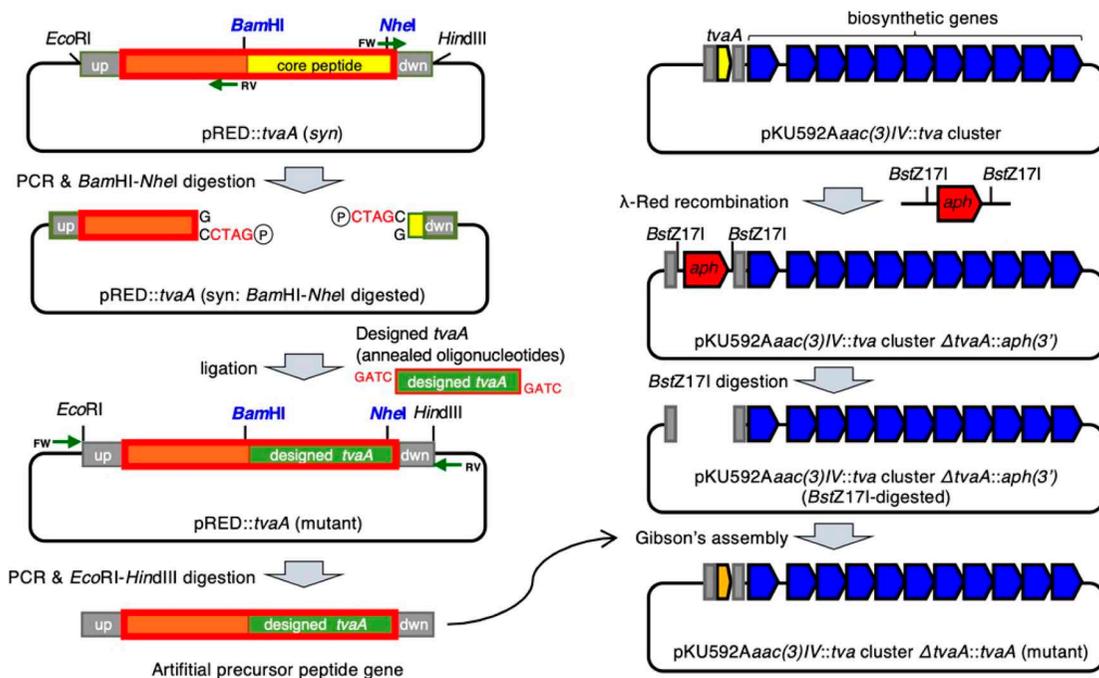


LPは leader peptide を示す。TvaA アミノ酸配列中の黒で示した62個のアミノ酸部分。

silent mutation を導入し、prethioviridamide の core peptide に対応する遺伝子の部分に新たな制限酵素切断部位を付加した。このことによって core peptide 部分の12アミノ酸残基に相当する部分だけをオリゴヌクレオチド (+/-鎖による2重鎖オリゴヌクレオチド) で入れ替えることによってアミノ酸置換が可能となり、効率的にアミノ酸置換(複数の隣接置換を含む)が行える。さらに prethioviridamide の生合成遺伝子群の precursor peptide 遺伝子部分を正確に切断し、人工的にこの部分のみを切断する制限酵素切断部位を導入した。上記のアミノ酸置換を施した core peptide 部分をコードする DNA 断片と precursor peptide 遺

伝子のみを除去した prethioviridamide 生合成遺伝子群を含んだ染色体組込型 plasmid とを試験管内で Gibson assemble を利用してシームレスに両断片を連結した後、*S. avermitilis* SUKA 株に導入した (Fig. 16)。上記の方法によって42種の非天然型 prethioviridamide を設計し、その内35種から代謝産物の生成を確認した (生産量0.56~106 mg/L)。これらの非天然型 prethioviridamide の殺細胞活性を各種の培養細胞を用いて比較した結果、2番目の Met, 6番目の Ala, 9番目の Ala あるいは10番目の Leu を他のアミノ酸に変換した誘導体は天然型の prethioviridamide よりも高活性であった。特に2番目の Met を分枝アミノ酸に変換

Fig. 16. Prethioviridamideのアミノ酸置換変異体の作製方法



\*

*tvaA* (wild type) 5'...CAGGGCAGCGTCATGGCCGCGCTGCGTCGATCGCTCTTCACTGCTGACAGGCACTGGGC...3'  
 \*\*\*\*\*  
*tvaA* (syn) 5'...CAGGGATCCGTCATGGCCGCGCTGCGTCGATCGCTCTTCACTGCTAGCAGGCACTGGGC...3'  
 Q G S V M A A A A S I A L H C \* (stop)  
 | BamHI | NheI  
*VII*-mutant (+strand) 5'-GATCCATCATGGCCGCGCTGCGTCGATCGCTCTTCACTG-3'  
 |||  
*VII*-mutant (-strand) 3'-GTAGTACCGCGCGCGACGCGAGCTAGCGAGAAGTGACGATC-5'  
 S I M A A A A S I A L H C \*

*syn*はsilent mutationによってprecursor peptide遺伝子*tvaA*に新たに*Bam*HIと*Nhe*I切断部位を導入。*tvaA* (*syn*) 遺伝子を*Bam*HI/*Nhe*Iで切断後、40-merからなるオリゴヌクレオチドの+strand/-strandをアニールさせた変異断片と連結させる。変異を導入した*tvaA* (*mutant*) 遺伝子はPCRで増幅した後*Eco*RI/*Hind*IIIで切断する。一方、完全長のprethioviridamide生合成遺伝子群の*tvaA*遺伝子部分を*aph* (アミノグリコシドリン酸化酵素遺伝子)と交換した組換えplasmidを*Bst*Z171で切断し*aph*を除去後、変異を導入し増幅・制限酵素処理した*tvaA* (*mutant*)断片と混合した後、Gibson assembleの方法で連結させた。

\* prethioviridamideのアミノ酸置換体を作製するための人工precursor peptide遺伝子 (*tvaA syn*) の骨格部分の配列。

した誘導体はいずれも天然型のprethioviridamideの活性を越えていた (Table 2)。一方、高活性となったアミノ酸置換を統合した場合は期待される相乗効果は認められなかったが、いずれも天然型よりも高活性を示した<sup>40)</sup>。

我々は*S. avermitilis* SUKA株での異種発現系を構築する過程でバクテリオファージのintegraseによる部位特異的組換えによって*Streptomyces*の染色体上に組み込まれるcosmidおよびBAC

vectorを構築してきた<sup>30,41)</sup>。特にBACベクターは100 kbpを超えるDNA断片を収納することができ、cosmidベクターではクローン化できない巨大な生合成遺伝子群を完全長でクローン化することが可能である。これまで我々は、マクロライドなどのtype I PKSによって生成されるポリケチド化合物やNRPSによって生成されるペプチド化合物などいずれも全長100 kb程度あるいはquinolidomicinのように全長200 kbpの生合成遺伝子群を完全長で

**Table 2. 非天然型prethioviridamide 誘導体の殺細胞活性<sup>a</sup>**  
IC50 (μM)

化合物	SKOV-3	MESO-1	Jurkat
Prethioviridamide (TVA)	2.10	2.00	0.80
TVA_V11	10.0	18.59	13.78
TVA_M2I	0.94	0.70	0.52
TVA_M2L	0.62	0.77	0.38
TVA_M2V	0.28	0.36	0.23
TVA_A6V	0.63	0.73	0.20
TVA_I8A	3.89	10.2	1.07
TVA_I8A(A5-mide)	4.33	5.81	1.24
TVA_I8H	n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>
TVA_I8H(A5-amide)	n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>
TVA_I8L	2.46	2.11	0.79
TVA_I8L(A5-amide)	2.89	4.59	0.77
TVA_I8V	2.11	2.26	0.76
TVA_A9V	0.49	0.72	0.16
TVA_L10F	1.70	1.51	0.89
TVA_M2I-I8V	0.62	0.38	0.21
TVA_M2I-L10F	0.49	0.39	0.28
TVA_I8V-L10F	1.31	1.52	0.51
TVA_M2I-I8V-L10F	1.06	0.64	0.39
NTV (neothioviridamide)	5.9	5.3	0.7
NTV_F10Y	n/a <sup>b</sup>	n/a <sup>b</sup>	3.2
NTV_F10Y (dOHdMe)	n/a <sup>b</sup>	20.3	13.9

<sup>a</sup> 太字で示した誘導体は殺細胞活性の向上が確認された。  
<sup>b</sup> n/a = 殺細胞活性がほとんど認められなかった。

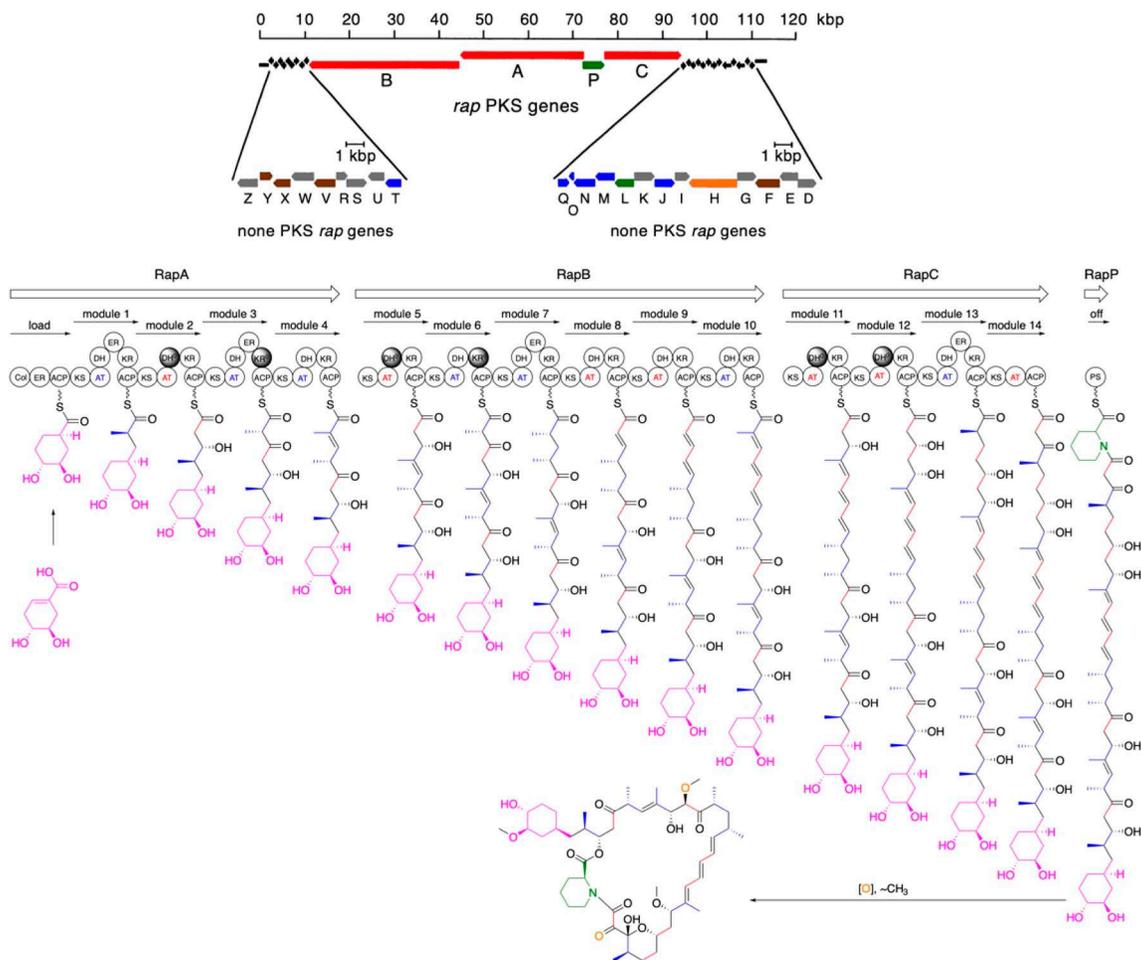
BACベクターにクローン化し、さらに異種発現によって代謝産物の生成を達成してきた<sup>42)</sup>。特にポリケチド化合物の生合成遺伝子群はtype I PKSをコードするため巨大である。また、アシル側鎖伸長反応に関与する各モジュールから構成されるため、特に縮合反応の機能ドメインのDNA配列は互いに相溶性が極めて高い。このことによって生産菌のtype I PKS領域を分子遺伝学的方法である相同的組換えによって改変することは極めて難しい。実際に、このような相同組み換えは目的の部分のみならず相溶性の高い他の部分と容易に組み換わることが多く、目的の改変体を確実に得

ることは極めて困難である。したがって、type I PKSを有する生合成遺伝子群の改変は、BACベクターなどでクローン化した完全長の生合成遺伝子群を含むDNA断片を、試験管内で相同的組換えを利用せずに改変編集し、それを異種発現系に導入し、評価する方法が現実的であると考えられる。そこで遺伝子編集で利用される「特定の配列を正確に切断するエンドヌクレアーゼ」であるCRISPR/Cas9のシステムを用いて、編集したい領域の特定の部位を正確に切断し、さらに切断断片をGibson assembleの方法によってシームレスに繋ぎ合わせる一連の方法を試験管内で行った。最

最終的に我々が構築した異種発現用の宿主に導入して目的の代謝産物を生産させる系を構築した。なお *Streptomyces* 属は原核細胞生物であるため真核細胞性で利用されているような *in vivo* での切断・結合ができない（真核細胞生物には non-homologous end joining の機構によって切断DNA断片を連結することが可能である）こと、また type I PKS はモジュール単位の縮合に関与する領域は極めて高い相同性を有するため、相同組換えによる連結が *in vivo* では不可能であるためである。このような方法で type I PKS によって生合成される rapamycin をモデルに各種の非天然型の rapamycin の創製を試みた<sup>43)</sup>。Rapamycin は *S. hygroscopicus* あるいは *S. rapamycinicus* によって生産される 31 員環ラクトン並びにラクタム構造を有する化合物であり、発見当初は抗真菌活性を有する化合物として開発された。その後、本化合物が mammalian Target of Rapamycin (mTOR) 阻害能を有することから、強力な免疫抑制作用と抗増殖作用を示すことが発見された。したがって、rapamycin は抗真菌薬としてではなく、tacrolimus と同様に免疫抑制薬として、さらに抗増殖作用から抗悪性腫瘍薬として近年使用されている。Rapamycin の生合成遺伝子群は非常に大きく、全長 110 kbp を越す領域に 26 遺伝子からなる遺伝子群を構成している。さらに rapamycin の基本骨格である 31 員環骨格の生成には少なくとも 4 つの遺伝子産物 RapA, RapB, RapC および RapD が関与していることが明らかにされている。なおこの基本骨格の生成のため 4 つの酵素遺伝子は生合成遺伝子群の 70% 以上を占めている (Fig. 17)。ポリケチド合成酵素はアシル側鎖の伸長並びに  $\beta$ -位カルボニルの修飾反応（還元反応）によって構造の多様性が示される。また、アシル側鎖伸長は基本反応である伸長回数分の伸長ユニット（修飾も含むのでモジュールと呼ばれる）が配置しており、rapamycin の基本骨格形成には 14 のモジュール

が関与している。それぞれのモジュールには AT ドメインによって決まった長さの低級脂肪酸の CoA エステルが取り込まれ、C-C 結合（KS による縮合反応）によってアシル側鎖を伸長していく。また、縮合時に生成する  $\beta$ -位のカルボニルはモジュール内の修飾ドメイン、KR, DH あるいは ER, によって修飾される。このような反応を経て rapamycin の基本骨格は形成されるが、それぞれのモジュール内に配置されている機能ドメインを人為的に交換、欠失あるいは挿入を行うことによって rapamycin の基本骨格の改変が期待できる。例えば、モジュール内の AT の基質特異性の異なる AT の入れ替え、 $\beta$ -位のカルボニルの修飾に関与する KR, DH, ER ドメインの入れ替え、欠失あるいは挿入によって基本骨格の改変が可能となる。また、モジュール単位を欠失あるいは挿入することで形成される員環数を変化させることも期待できる。このような改変には 1 塩基の読み枠のズレなどを生じることなく設計しなければならない。何故ならば、type I PKS は多機能酵素であるので酵素遺伝子の塩基のフレームずれは翻訳されるポリペプチドに大きな影響を及ぼすことになる。また、type I PKS 遺伝子の決められた部位を正確に切断し、さらに切断後には新たに調製した改変 DNA 断片を翻訳フレームのズレを生じないように連結させなければならない。このような目的には rapamycin 生合成遺伝子群の全長を含む BAC クローンを *in vitro* で sgRNA と Cas9 ヌクレアーゼを用いて、sgRNA 配列の一部と相補な BAC clone の特定の位置で切断する（2 種類の sgRNA を使い、2 箇所切断）。切断した断片は反応ドメインを改変したモジュールをコードする DNA 断片を加え、T5 exonuclease を用いた 5' 側の消化による Gibson assemble によって連結する。連結した BAC クローンは一度大腸菌で増やし、最終的に *S. avermitilis* SUKA 株に導入して生産物を解析する (Fig. 18)。Rapamycin の基本骨格の生

Fig. 17. Rapamycin 生成遺伝子群の構造 (上段) および type I PKS による rapamycin 骨格の形成様式 (下段)

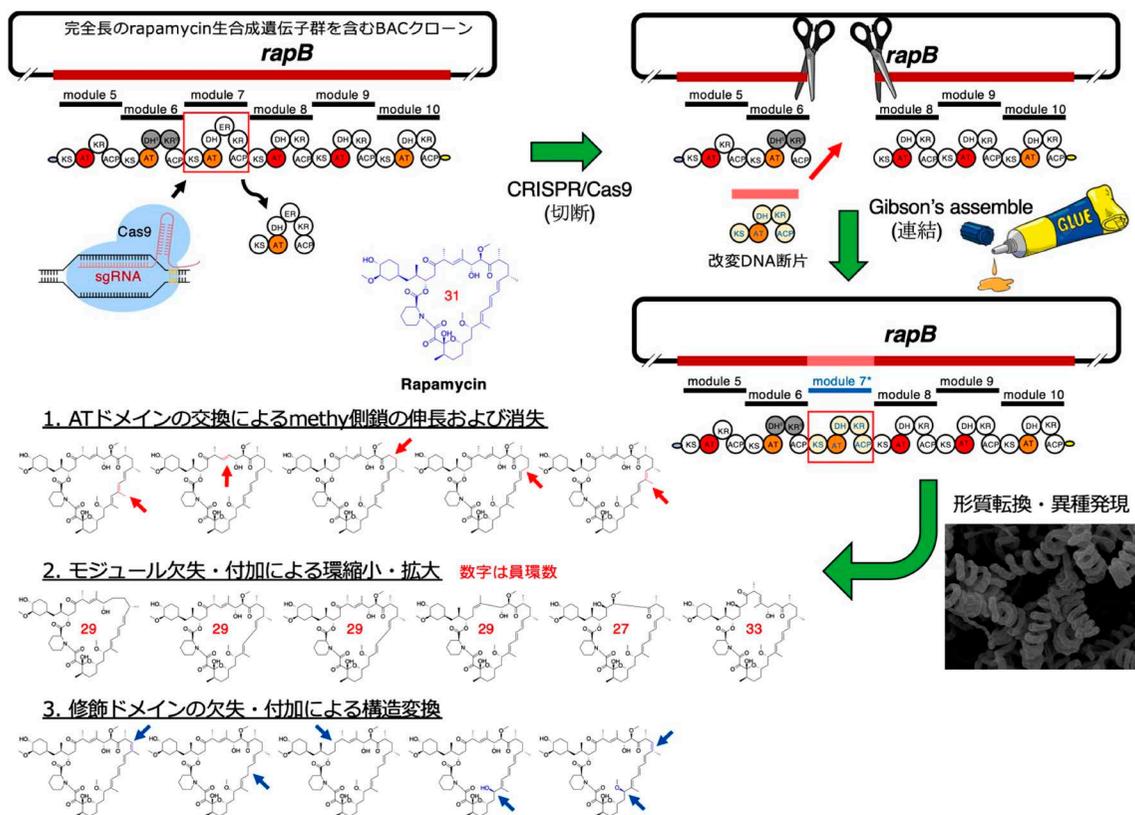


遺伝子群の構造の中で、赤で示した遺伝子領域は type I PKS をコードしている。青で示した遺伝子は骨格修飾に関与している酵素をコードしている。緑で示した遺伝子は pipecolinate (下図の緑で示した部分構造) の生成並びに取り込みに関与する酵素をコードしている。○は機能ドメインを示す。●のドメインは機能が失われているか、ポリケチド伸長反応にあずからぬドメイン。赤で示した AT ドメインは malonyl-CoA を取り込む。青で示した AT ドメインは methylmalonyl-CoA を取り込む。

成には malonyl-CoA あるいは methylmalonyl-CoA が利用されている。また、それぞれの CoA エステルの内どちらを取り込むかはモジュール内の AT によって決定されている。したがって、この AT の基質特異性を異なる AT と交換することによって、側鎖の炭素鎖長を変化させることが期待できる。Fig. 18-1 に示した構造はそれぞれモジュール内の AT を異なる基質特異性の AT と交換した時に生成する化合物である。例えば methylmalonyl-

CoA を取り込むモジュールの AT を malonyl-CoA を取り込む AT と交換した場合、鎖長が 1 炭素短くなった骨格が形成された。反対に malonyl-CoA を取り込む AT を methylmalonyl-CoA を取り込む AT と交換した場合は 1 炭素伸長した骨格が形成された。一方、特定のモジュールを欠失させた場合、最終的な伸長反応の回数が減少し、それに伴い骨格の員環数が 1 モジュール当たり 2 減少すると推察される。Rapamycin は 31 員環骨格を有し

Fig. 18. Rapamycin PKS 遺伝子の遺伝子編集方法および各種遺伝子編集によって生成された非天然型 rapamycin の構造



ているが1モジュールの欠失は29員環骨格を形成する。また、欠失させるモジュールの位置によって、最終的な骨格はそれぞれ異なっていた (Fig. 18-2)。また2モジュールを欠失させた場合、27員環骨格が、反対に1モジュール付加した場合、33員環骨格が形成された (Fig. 18-2)。モジュール内にはアシル側鎖伸長に関わる機能ドメインの他に $\beta$ -位のカルボニルの修飾 (還元反応) に関わるドメインが配置している。これらの修飾ドメインの構成を改変すると、それに対応して骨格の構成も変化した。 $-\text{ER}-\text{DH}-\text{KR}-$ の修飾によって炭素骨格は完全に還元され $sp^3$ 混成軌道のC-C結合が形成される。このERを消失させた場合、 $-\text{KR}-\text{DH}-$ で形成された2重結合の還元が起らず2重結合が残った骨格が形成された。反対

に $-\text{DH}-\text{KR}-$ で構成されているモジュールにERを付加することによってDH-KRで形成された2重結合がERによって還元され $sp^3$ 混成軌道のC-C結合が形成された。またモジュール内のKRは $\beta$ -カルボニルを還元して水酸基を形成するが、この水酸基はKRの種類によって立体の異なる方向に水酸基を形成することが知られている。 $S$ 配位の水酸基を形成するKRを $R$ 配位の水酸基を形成するKRと交換した場合、生成される骨格は天然型の配位とは逆の配位の骨格が形成された。また、これらは組み合わせによる改変も可能であった (Fig. 18-3)。

以上のようにtype I PKS 遺伝子の正確な改変が *in vitro* でのCRISPR/Cas9による切断、並びにGibson assembleを用いたシームレスな切断断片

の修復結合によって、骨格変換を実現させることができた。なお、遺伝子編集によって全ての骨格変換に成功したわけではない。いくつかの遺伝子編集による異種発現では、おそらくPKS内での伸長反応にとって都合の悪い構造となる場合もあるものと推察される。今後、他のポリケチド化合物での生合成に関与するtype I PKSの遺伝子を用いて上記と同様な遺伝子編集を行うことは重要である。また、CRISPR/Cas9とGibson assembleを*in vitro*で組み合わせた遺伝子編集方法は、type I PKS遺伝子のみならず、NRPS遺伝子にも適用可能である。いずれの場合もこれらポリケチドやペプチド化合物生合成遺伝子群の完全長クローンを*S. avermitilis* SUKA株で異種発現に利用できることが確認されることが重要である。

## 終わりに

これまで微生物は一般的に培養が可能であるとの理解がされてきたが、実際は極めて多くの培養不可能な微生物が環境中に生息していることが明らかになってきた。近年、このような培養不可能な微生物による物質生産が注目されてきている。海洋生物などから見出される生物活性物質の多くは培養が不可能な共生微生物が生産していることが明らかとなってきた。一説では「我々は地表などに生育している微生物の1%も培養することができてないのでは？」とも言われている。このような微生物は現時点では、単離して純粋培養させることができないので生産菌のゲノムDNAを純粋に取り出すことができない。したがって、目的代謝産物の生合成遺伝子(群)の解析などが行えないため以降の研究が進展しない。そこで、このような培養不可能な微生物が生息していると考えられる環境の試料から直接DNAを抽出し、得られたDNAをcosmidあるいはBACベクターを使って比較的長鎖のDNAのライブラリーを構築

する。このようなライブラリーには培養可能な微生物はもちろんのこと、培養不可能な微生物のゲノムも含まれると考えられる。そして得られたライブラリーから、目的の生合成遺伝子(群)を取得するという方法が期待される。この場合、DNAの分解が少なく長鎖DNAを単離する方法が重要である。また、このようなライブラリーの評価は目的の生合成遺伝子群が効率良く発現させることのできる宿主の整備が必須である。また、異種発現においては種の障壁などが考えられるため、複数の異種発現用の宿主を準備することも重要である。我々は土壌に広く生息しているActinomycetales目のStreptomyces属で異種発現用の宿主を構築したが、グラム陰性細菌のいくつかの属も2次代謝産物の生産が比較的多いので、グラム陰性菌においても異種発現系の宿主の構築が望まれる。なお、グラム陰性菌の大腸菌は遺伝子操作が最も整備された菌株ではあるが、type I PKSやNRPSの翻訳後修飾(phosphopantetheinyl transferase)の系が十分でない。また2次代謝産物の生合成にはシトクロムP450による酸素添加反応が多いが大腸菌はシトクロムP450の遺伝子を保持していないため、この反応に必須な電子供与体(ferredoxinおよびferredoxin reductase)が十分でないため異種シトクロムP450遺伝子の発現にはこれらの電子供与体を導入しなければならない。したがって、物質生産の旺盛な上記の問題を解決できるようなグラム陰性菌から異種発現用の宿主を開発することが重要と思われる。このようにいずれの種の遺伝子も包括的に発現できるように、複数の宿主で異種発現系を構築していくことが重要であろう。

*S. avermitilis*のゲノム解析結果から染色体の欠失および再構成によって異種2次代謝産物生合成遺伝子(群)発現系を開発し、その後多くの2次代謝産物の生合成遺伝子群のクローニング、そしてそれらの異種発現、さらには遺伝子編集による非天然型の代謝産物の誘導体化に関する一連の研

究は2006年度住木・梅澤記念賞を受賞された新家一男博士との共同研究によって達成された成果である。新家博士との共同研究によって極めて有用な成果を得ること並びに革新的な物質生産系の技術を開発することができたことに関して改めて同博士に感謝を申し上げたい。

### 参考文献

- 1) Burg RW, Miller BM, Baker EE, *et al.*: Avermectins, new family of potent antihelminthic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 15: 361–7.
- 2) Ikeda H, Kotaki H, Omura S: Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol.* 1987; 169: 5615–21.
- 3) Omura S, Ikeda H, Tanaka H: Selective production of specific components of avermectins in *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot.* 1991; 44: 560–3.
- 4) Ikeda H, Takada Y, Pang C-H, Tanaka H, Omura S: Transposon mutagenesis by Tn4560 and applications with avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol.* 1993; 175: 2077–82.
- 5) Pang C-H, Matsuzaki K, Ikeda H, Tanaka H, Omura S: Production of 6,8a-seco-6,8a-deoxy derivatives of avermectins by a mutant strain of *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot.* 1995; 48: 59–66.
- 6) Pang C-H, Matsuzaki K, Ikeda H, Tanaka H, Omura S: Production of a new methylated 6,8a-seco-6,8a-deoxy derivatives of the avermectins by a transformant strain of *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot.* 1995; 48: 92–4.
- 7) Ikeda H, Takada Y, Pang C-H, Matsuzaki K, Tanaka H, Omura S: Direct production of 5-oxo derivatives of avermectins by a recombinant strain of *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot.* 1995; 48: 95–7.
- 8) Ikeda H, Pang C-H, Endo H, Ohta T, Tanaka H, Omura S: Construction of a single component producer from the wild type avermectin producer *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot.* 1995; 48: 773–5.
- 9) Ikeda H, Omura S: Avermectin Biosynthesis. *Chem Rev.* 1997; 97: 2591–609.
- 10) Ikeda H, Wang RL, Ohta T, Omura S: Genetic analysis of avermectin B *O*-methyltransferase in avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. *Gene.* 1998; 206: 175–80.
- 11) Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, Omura S: Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 9509–14.
- 12) Ikeda H, Nonomiya T, Omura S: Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: Analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *J Ind Microb Biotech.* 2001; 27: 170–6.
- 13) Fleischmann RD, Adams MD, White O, *et al.*: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269: 496–512, 1995.
- 14) Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, *et al.*: Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 25: 12215–20.
- 15) Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, *et al.*: Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 526–31.
- 16) Nett M, Ikeda H, Moore BS: Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep.* 2009; 26: 1362–84.
- 17) Bentley SD, Chater K, Cerdeño-Tárraga AM, *et al.*: Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 2002; 417: 141–7.
- 18) Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, *et al.*: Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 2008; 190: 4050–60.
- 19) Oliylyk M, Samborsky M, Lester JB, *et al.*:

- Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol.* 2007; 25: 447–53.
- 20) Ueki M, Suzuki R, Takamatsu S, *et al.*: Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetologica.* 2009; 23: 34–9.
  - 21) Ikeda H, Shin-ya K, Omura S: Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2014; 41: 233–50.
  - 22) Tetzlaff CN, You Z, Cane DE, Takamatsu S, Omura S, Ikeda H: A gene cluster for biosynthesis of the sesqui-terpenoid antibiotic pentalenolactone in *Streptomyces avermitilis*. *Biochemistry.* 2006; 45: 6179–86.
  - 23) Chou WKW, Fanizza I, Uchiyama T, Komatsu M, Ikeda H, Cane DE: Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: cloning and characterization of SAV\_76, the synthase for a new sesquiterpene, avermitilol. *J Am Chem Soc.* 2010; 132: 8850–1.
  - 24) Takamatsu S, Lin X, Nara A, Komatsu M, Cane DE, Ikeda H: Characterization of a silent sesquiterpenoid biosynthetic pathway in *Streptomyces avermitilis* controlling *epi*-isozizaene and albaflavenone biosynthesis and isolation of a new oxidized *epi*-isozizaene metabolite. *Microb Biotechnol.* 2011; 4: 184–91.
  - 25) Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, Horinouchi S: The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol.* 1999; 34: 102–11.
  - 26) Nihira T, Shimizu Y, Kim HS, Yamada Y: Structure-activity relationships of virginiae butanolide C, an inducer of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J Antibiot.* 1988; 41: 1826–37.
  - 27) Kitani S, Yamada Y, Nihira T: Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a Novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J Bacteriol.* 2001; 183: 4357–63.
  - 28) Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, *et al.*: Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 16410–5.
  - 29) Uchida M, Takamatsu S, Arima S, *et al.*: Total synthesis and absolute configuration of avenolide, extracellular factor in *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot.* 2011; 64: 781–7.
  - 30) Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H: Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 2646–51.
  - 31) Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, *et al.*: Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol.* 2013; 2: 384–96.
  - 32) Machida K, Arisawa A, Takeda S, *et al.*: Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide antitumor macrolide, Pladienolide, in *Streptomyces platensis* Mer-11107. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72: 2946–52.
  - 33) Kawahara T, Izumikawa M, Kozono I, *et al.*: Neothioviridamide, a polythioamide compound produced by heterologous expression of a *Streptomyces* sp. cryptic RiPP biosynthetic gene cluster. *J Nat Prod.* 2018; 81: 264–9.
  - 34) Komatsu M, Tsuda M, Omura S, Oikawa H, Ikeda H: Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 7422–7.
  - 35) Balskus EP, Walsh CT: The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science.* 2010; 329: 1653–6.
  - 36) Miyamoto KT, Komatsu M, Ikeda H: Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from *Actinomycetales* microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 5028–36.
  - 37) Yamada Y, Cane DE, Ikeda H: Diversity and

- analysis of bacterial terpene synthases. In: Hopwood DA (ed.) *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part A, Methods in Enzymology* Vol. 515. Academic Press, Burlington; 2012. p. 123–62.
- 38) Yamada Y, Kuzuyama T, Komatsu M, *et al.*: Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112: 857–62.
- 39) Yamada Y, Arima S, Nagamitsu T, *et al.*: Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. *J Antibiot*. 2015; 68: 385–94.
- 40) Kudo K, Koiwai H, Kagaya N, *et al.*: Comprehensive derivatization of thioviridamides by heterologous expression. *ACS Chem Biol*. 2019; 14: 1135–40.
- 41) Kim J, Komatsu M, Shin-ya K, Omura S, Ikeda H: Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in *Actinomycetales* microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115: 6828–33.
- 42) Hashimoto T, Hashimoto J, Kozono I, *et al.*: Biosynthesis of quinolidomicin, the largest known macrolide of terrestrial origin: identification and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster over 200 kb. *Org Lett*. 2018; 20: 7996–9.
- 43) Kudo K, Hashimoto T, Hashimoto J, *et al.*: *In vitro* Cas9-assisted editing of modular polyketide synthase genes to produce desired natural product derivatives. *Nat Commun*. 2020; 11: 4022.
-

## Development of the next-generation system for the production of secondary metabolites using heterologous expression of genes encoding secondary metabolite biosynthesis

Haruo Ikeda  
Kitasato University

After analysis of gene cluster for avermectin (used as a group of antiparasitic agents in human and veterinary medicine) biosynthesis was completed, we got the chance to analyze the genome of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. Species of the genus *Streptomyces* (order *Actinomycetales*) of major pharmaceutical interest because they synthesized a variety of bioactive secondary metabolites. The linear chromosome of *S. avermitilis* contains 9,025,608 bases and 7,574 potential open reading frames. Furthermore, more than thirty gene clusters related to secondary metabolite biosynthesis were identified, but almost gene clusters were cryptic state. Comparison with a couple of *Streptomyces* genomes revealed that an internal 6.5-Mb region in the *S. avermitilis* genome was highly conserved with respect to gene order and content, and contained all known essential genes, but the terminal regions in both ends were not conserved and preferentially contained nonessential genes, including genes concerning secondary metabolite biosynthesis. In consideration of the genome information, *S. avermitilis* was constructed as a versatile model host for heterologous expression of genes encoding secondary metabolite biosynthesis. More than forty of the entire biosynthetic gene clusters for secondary metabolites were successively cloned and introduced into an engineered versatile host of *S. avermitilis* SUKA (Special Use of Kitasato Actinomycetales) series. The production of metabolites in some transformants containing exogenous biosynthetic gene clusters was higher than that of the original producers, and some cryptic biosynthetic gene clusters in the original producer were also expressed in an engineered host SUKA strains. By using our versatile host and bioinformatics of enzymes, many terpene synthases were discovered from bacterial origin and 13 previously unidentified cyclic sesquiterpenes and diterpenes were isolated. Our innovative system concerning an engineered host and a couple of useful vectors was applied to create a new technology for the derivatization of peptide products (ribosomally synthesized and modified by post-translationally) and polyketide compounds synthesized by type I modular polyketide synthases (PKSs). Heterologous expression of many constructs in an engineered host SUKA strain gave 35 designed prethioviridamide derivatives, along with several unprecedented analogues. Cytotoxicity assay revealed that several derivatives showed more potent activities than those of natural product. The strategy can become one of the potential ways to produce supreme unnatural products. Although intense studies have established various methodologies for protein engineering of type I modular PKSs, the accurate targeting of desired regions in the PKS gene is still challenging due to the high sequence similarity between its modules. We developed an innovative technique to edit a target region of the gene encoding type I modular PKS. Proof-of-concept experiments using rapamycin PKS as a template showed that heterologous expression of edited biosynthetic gene clusters produced almost all the desired derivatives. Our technique will provide a platform to generate rationally designed natural product derivatives for future drug development.