

創薬を目的とした有用天然物の生合成 遺伝子発現による環境低負荷型分子創製

渡 辺 賢 二 [静岡県立大学薬学研究科/准教授]

背景・目的

これまでに多くの生物活性物質が天然から単離され、何段階にもわたる臨床試験を経て、その中からタクロリムス(FK506)、プラバスタチン(メバロチン)、パクリタキセル(タキソール)などの極めて有効な医薬品が市場に送り出されてきた。これら天然物とは異なり、極めて有用な活性を持つ天然物であっても、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出来ないなどの理由によって製品化が困難となる場合が多数存在する。しかし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、自由に大腸菌などの培養が容易である生物で発現できるシステムがあれば、海洋生物由来の代謝産物など供給に大きな問題のある天然物などを安定に生産し、医薬品として用いることが出来る。大腸菌はこれまでモデル生物として研究されてきたため生合成酵素遺伝子の改変が容易であり非天然型の誘導体生産が可能であると考えられてきた。また大腸菌は全ゲノム配列が解読されているため化合物の生産性向上を目的としたメタボリックエンジニアリングを適切に行えると期待されている。

本研究では、大腸菌を発現宿主とし有用天然物を高収量で生産できるモデル生合成システムの構築および、抗腫瘍活性物質テトラヒドロイソキノリン類を目的化合物として、それら生合成遺伝子は大腸菌へ導入し化合物

の大量生合成を目的とした。

内容・方法

サフラシン、サフラマイシン、エクチナサイジン743(図1)に代表されるテトラヒドロイソキノリン類の多くは微生物由来の抗腫瘍性抗生物質として広く知られ、リード化合物として大変期待されている。これらの化合物を供給するため、多くの有機合成化学者が全合成に挑戦し、既にいくつかの全合成が達成されてきた。その後も多くのテトラヒドロイソキノリン類および誘導体合成に関する研究がなされてきた。しかし、複雑な構造を持つ化合物の全合成による供給は採算性および環境に対する負荷を考慮すると、実用性を欠く場合が多いため、サフラマイシンに関してはオリジナルの生産菌による収量は低く、その値は約10 mg/literであり、簡便かつ高収量な生産法の確立が望まれてきた。天然においてこれらの化合物は、非リボソーム依存性ペプチド(nonribosomal peptide synthetase, 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140-180 kDaにもおよぶ巨大ポリペプチドである(図2)。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、少なくとも縮合、アデニル化、チオレーションの3つの触媒ドメインによりアミド結合形成反応を触媒する。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させることにより、様々なNRPSを作製し、さらに構造の複雑な優れた生物活性を持つ非天然型化合物の生合成が期待されている。

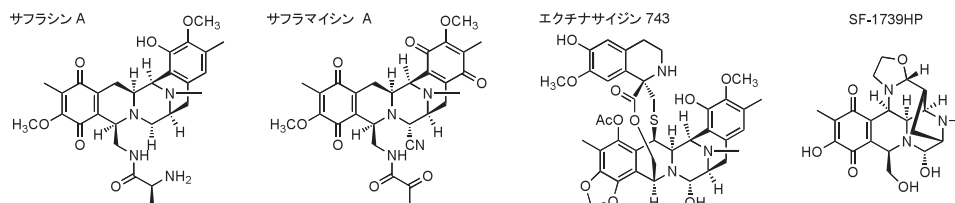


図1 テトラヒドロイソキノリン類の化学構造

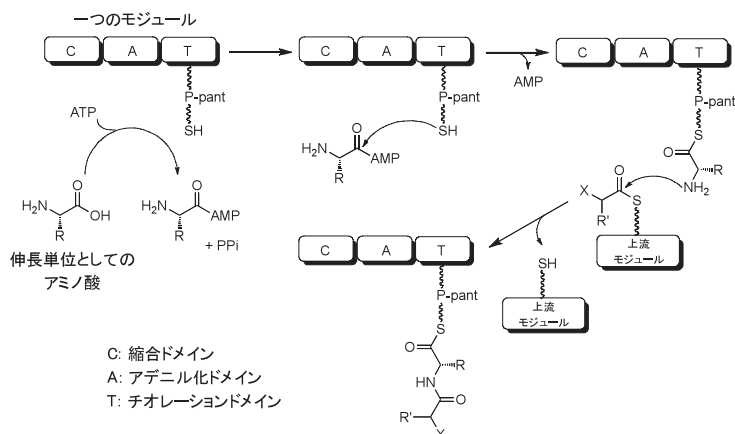


図2 非リボソーム依存性ペプチド合成酵素の基本反応

結果・成果

サフラシン生合成遺伝子の大腸菌発現

多くの生物活性物質が放線菌より単離されてきたが、放線菌由来生合成遺伝子は一般に、GC 含量の高い塩基配列であることから、大腸菌での高発現は困難であると考えられている。つまり、GC 含量の高いコドンによって構成されたオープンリーディングフレーム(ORF)は、複雑な二次構造を形成し転写されにくく、また高 GC 含量のコドンによってコードされたアミノ酸は、大腸菌の翻訳機能においてそれらに対応する tRNA が少ないため、翻訳されにくい可能性が高い。そこで今回我々はサフラシン生合成に注目し、生合成の機能は失わず、大腸菌での発現が可能となるよう遺伝子配列を設計し、全塩基配列を化学合成することで合成オリゴとして全生合成遺伝子を得た。

サフラシンは取り込み実験の解析結果から L-アラニンを開始単位としグリシンおよび2個のチロシン誘導体から構成される、テトラヒドロイソキノリン構造を持つ非リボソーム依存性ペプチドであると予測されている。この2個のチロシン誘導体は、取り込み実験および生合成遺伝子の解析結果からメチル基転移酵素および酸化

酵素によって生合成されると推定された。2個のテトラヒドロイソキノリン構造は C 末端領域に還元ドメインを含む NRPS とタンパク質相同性検索の結果から、SacI, -J および H の機能によって図3に示したように生合成されると推定されている。サフラシン骨格生合成における伸長単位の一つであるチロシン誘導体生合成に必要と考えられる SacD, -E, -F, -G を上記で得た ORF を用い、それぞれ一つずつ発現できるベクターを構築した後、大腸菌を用い発現させ、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーにより組換え酵素を精製した。次に、骨格生合成に関わる3個の発現タンパク質を Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを用い精製した。さらに、サフラシン生合成遺伝子中でもっとも大きな分子量を持つ2個の NRPS をそれぞれ別々に発現させ、同様に組換え酵素として得られることを確認した(図4)。これら2個の NRPS および SacD, -E, -F, -G, -H, -I, -J の合計9個全てのタンパク質の分子量は、それら遺伝子翻訳産物から推定された分子量と一致することが示された。以上の実験結果より、これらの生合成遺伝子は大腸菌で発現可能であることが明らかとなった。そこで現在、化学合成によって得られた上記全生合成遺伝子をそれぞれ異なる複製開始点および薬剤耐性遺伝子を有する2種の発現ベクターに組み込み、大腸菌によるサフラシン生合成システムの構築を試みている。

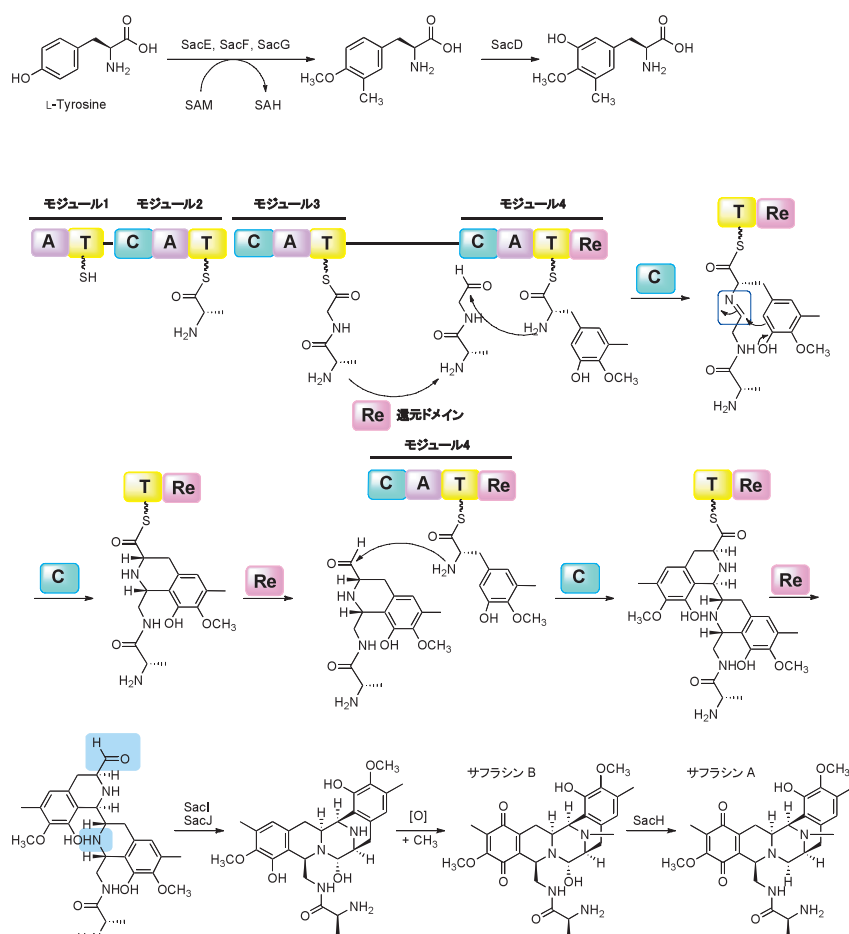


図3 サフラシン推定生合成経路

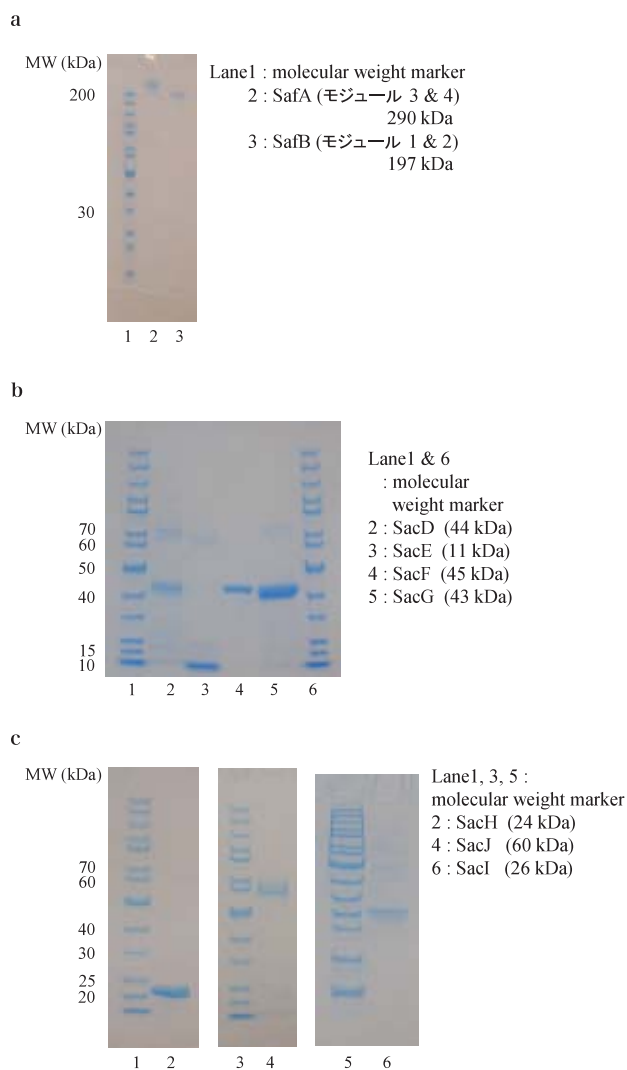


図4 大腸菌発現による組換え精製酵素
a, NRPS ; b, SacD-G ; c, SacH-J

サフラマイシンおよびSF-1739HP生合成遺伝子のクローニング

さらに多種類のテトラヒドロイソキノリン類の生合成およびそれら生合成遺伝子の融合によるハイブリッド化合物の生産を目的として、いくつかのテトラヒドロイソキノリン類生合成遺伝子をオリジナルの生産菌よりクローニングすることを試みた。その結果、サフラマイシンおよびSF-1739HPの生合成遺伝子を放線菌よりクローニングすることに成功した。サフラシンおよびサフラマイシンの化学構造および生合成遺伝子群の解析結果から、サフラマイシン生合成経路は図3に推定したサフラシン生合成経路と酷似していると予測された。SF-1739HP生合成経路に関しては、いくつかの機能予測出来ない生合成酵素を含んでおり、現在酵素活性の確認と平行して推定中である。生合成経路に関する予測を基に、それぞれの化合物を生合成するために必要となる遺伝子の大腸菌による発現を試みている。

今後の展望

この研究を実用化する鍵は2つあると考えられる。一つ目は、天然では微量しか生産されないテトラヒドロイソキノリン類を大腸菌を宿主として、それら生合成遺伝子群を発現させることで生産可能にすることである。サフラシン、サフラマイシンおよびSF-1739HPはNRPSによって生合成されるわけだが、これら酵素遺伝子は塩基数が4-10 kbと非常に大きくまた、これら化合物を全生合成させるために必要となるORFの数も十数個と非常に多い。従って、これまでは複雑な構造を持った一つの天然物を生合成するために必要となる遺伝子を全て大腸菌に導入した後、発現させることで化合物を得ることは困難とされてきた。しかしながら、最近、我々はそのような困難を克服し同じくNRPSによって生合成される抗腫瘍性抗生物質であるエキノマイシンの全生合成を達成した。サフラシン生合成遺伝子に関しては、すでに大腸菌を宿主とした発現に成功している。従って、テトラヒドロイソキノリン類の生合成でも、エキノマイシン生合成における経験を生かし、複製開始点および薬剤耐性遺伝子の異なる複数の高発現ベクターを用いることで必ずや生産に成功すると思われる。

二つ目は、目的化合物の生産収量を商業的に用いることができるレベルにまで向上させることである。この目的を達成するために現在、生合成された化合物を菌体外へ迅速に排出させるための多薬剤耐性を司る排出ポンプをコードした *acrA* および *acrB* を発現ベクターに組み込み、共発現させるシステムの構築を試みている。NRPSをラクトースオペロンによって転写制御するpETシステムを用いた発現を予定している一方で、排出ポンプを正確な調節機構をもつPBAD promoterを用いアラビノースを加えることによって転写が開始されるpBADシステムを用い発現させる。これらを用いることによって化合物の生合成と排出機能を個別に制御することが出来ると考えられる。抗生物質を中心とする上記生物活性物質の生合成は、宿主大腸菌の死滅を意味し、生産収量の向上には多くの困難があると予想される。しかし、このポンプシステムが機能すれば多くの生物活性物質の生産に対する有効な発現システムとなり得る。また、エキノマイシン生合成と同様に遺伝子群に耐性遺伝子が見出されかつ、その機能が大腸菌発現において有効な場合、耐性を獲得し、宿主の死滅を回避出来ると考えられる。実用化にあたってはファーマンターを用いた培養により化合物を生産することになると考えられる。ファーマンターを用いた培養では大腸菌の急速な生育を伴うため、発現ベクターの安定性が問題となることが予測される。これも発現ベクターとして構築された遺伝子群を大腸菌染色体上へ導入することによって、生合成遺伝子の維持と安定な発現が可能になると考えられる。これらの試みによって高収量生産システムへの道を拓き、実用化へ一歩近づくと思える。