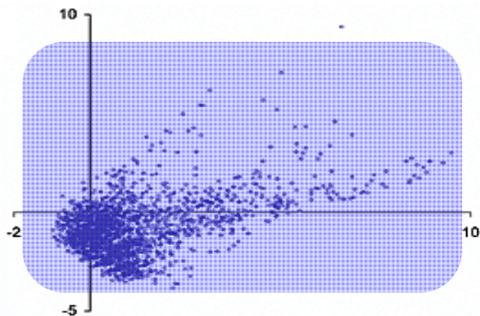


JSPS研究開発専門委員会

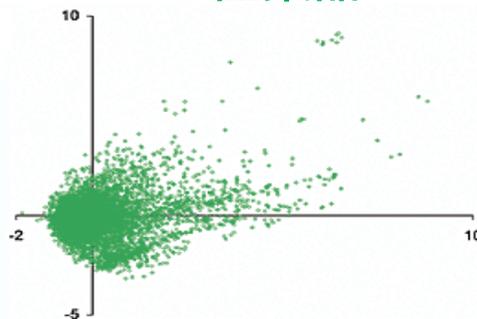
生合成遺伝子を用いた新規物質生産

新家 一男 (産業技術総合研究所)

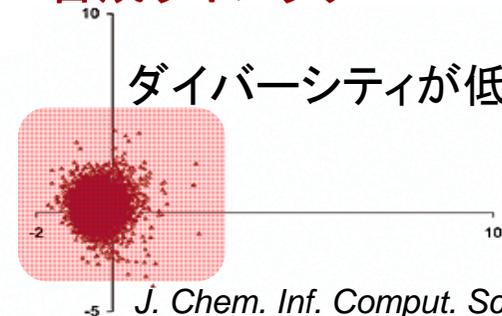
天然物



医薬品



合成ライブラリー



ダイバーシティが低い

J. Chem. Inf. Comput. Sci., **43**, 218 (2003)

天然化合物は、医薬品の5~8割が天然物由来 (特に抗がん剤、抗菌剤は天然物由来が多い)
 医薬品リードのソースとして優秀

Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery?

J. Med. Chem. 2008, **51**, 2589–2599 (Most cited Paper), David Newman (NCI)

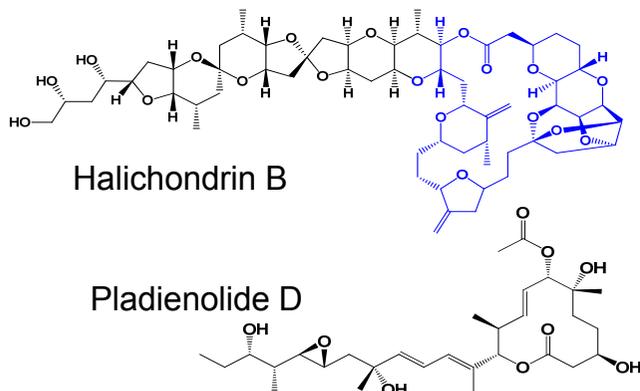


過去26年間の薬剤開発のソースあるいはリード化合物の割合 (1981–2006)

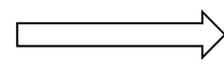
合成化合物でも実際は天然化合物の変換が多い

Syntheses around Privileged Structures (活性が約束された構造), aka the Intrinsic Differences of Natural Products.

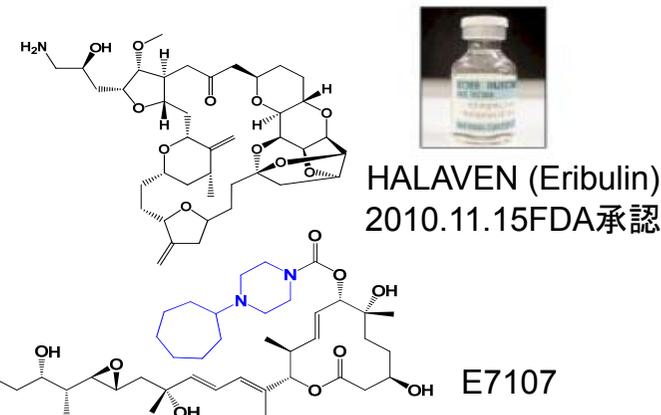
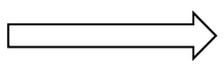
開発中の抗がん剤



活性中心のみを
取り出し合成展開

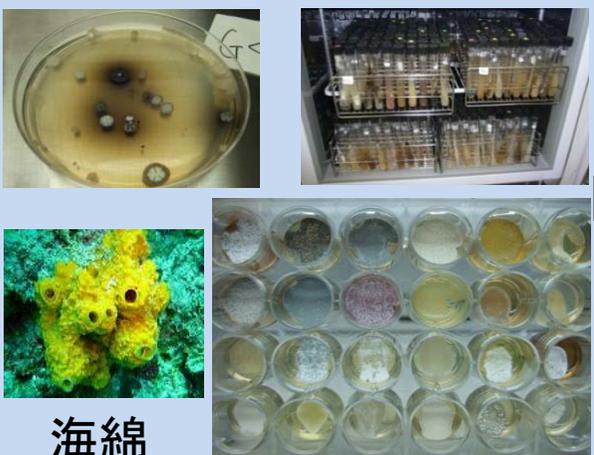


体内動態の改善



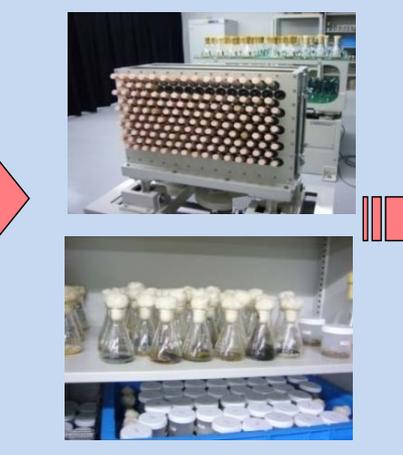
天然物ランダムスクリーニング概要

菌株収集 (土壌、海洋生物)



海綿

培養、サンプル調製



微生物、サンプル保存・管理

スクリーニングライブラリー

スクリーニング

疾患モデル



単離・精製



精製用培養



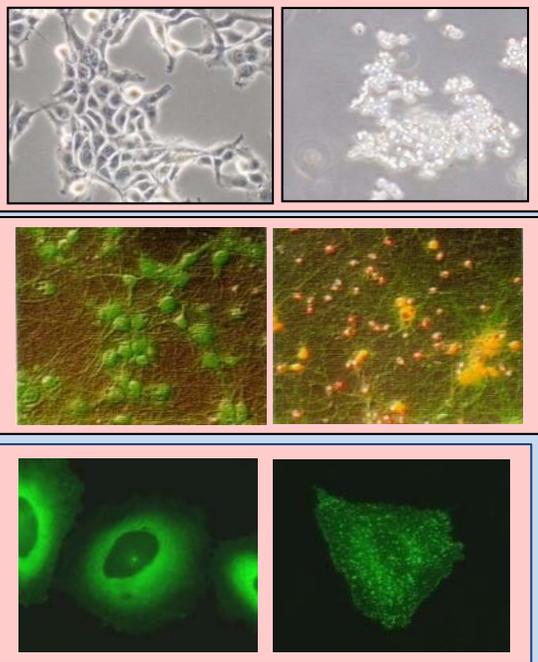
構造決定



抗腫瘍活性

神経細胞保護活性

シグナル伝達阻害活性



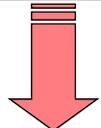
この2ステップは天然物では必須

天然物に適したアッセイ系の構築が必須

天然物スクリーニングが抱えている課題

粗抽出液から目的とする活性物質の単離・構造同定を行わなければならない

単離・精製

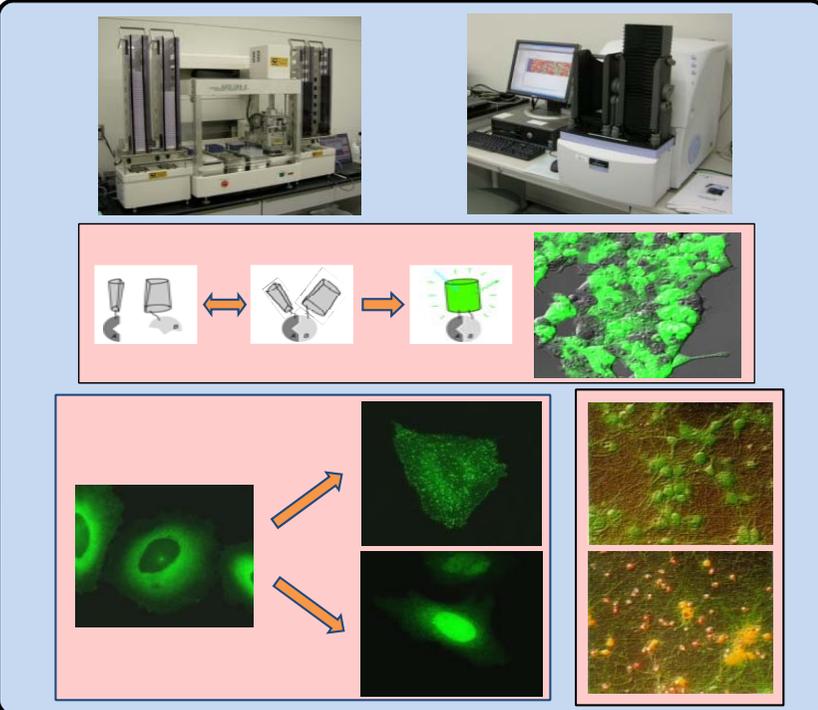


構造同定



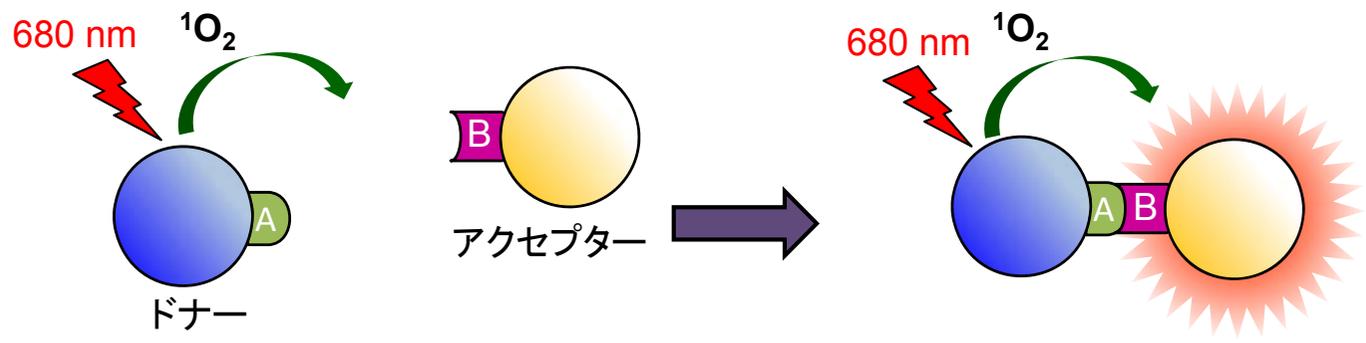
大量培養

スクリーニング



新しいテクニックを利用した革新的アッセイ系には適用出来ないケースがある

Alphaスクリーニング系: タンパク質相互作用検出



ポリフェノール、金属キレーター、ある種のタンパク質がこの系ではヒットとなってしまふ

天然物化学の現在抱えている課題

ヒット後、培養抽出物という夾雑物から活性物質を精製・構造同定を行わなければならない

誰もが
多種多様な
アッセイ系に

使用可能な、単離天然化合物ライブラリーを構築する

天然化合物マススペクトルデータベースの構築 (CB MS データベース)

1,400以上の天然化合物データ

CB library

UPLC-TOF MS 解析 (Acquity UPLC, LCT premier XE, Waters)

UPLC condition

溶媒: 5-100% CH₃CN-0.1% ギ酸

測定時間: 7 min/sample



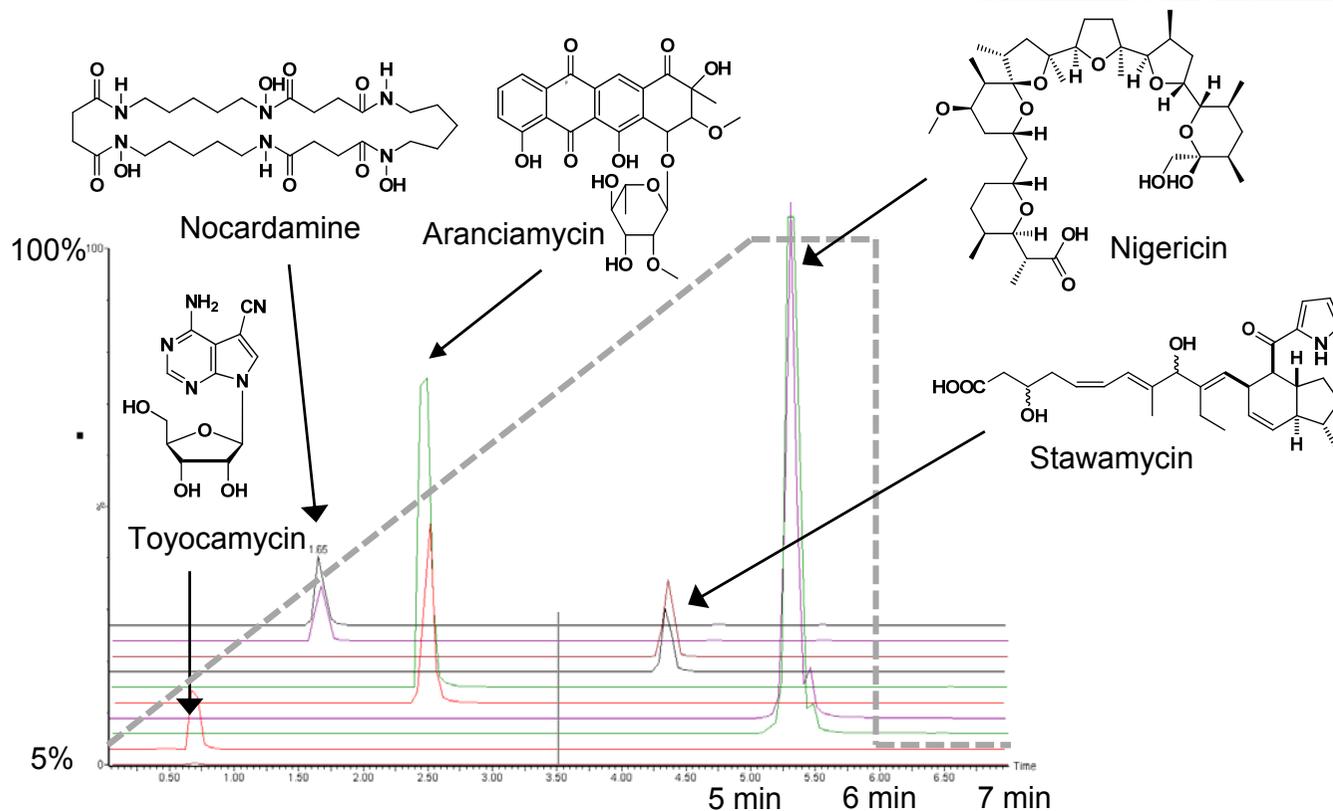
MSデータからの抽出

ChromaLynxソフトウェアへ登録

保持時間
高分解能質量
マススペクトル形状

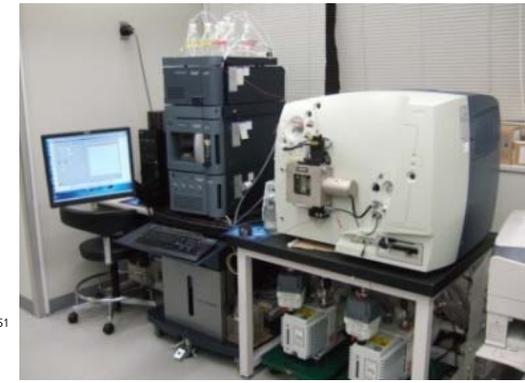
100 analyses/hr.

CB MS library

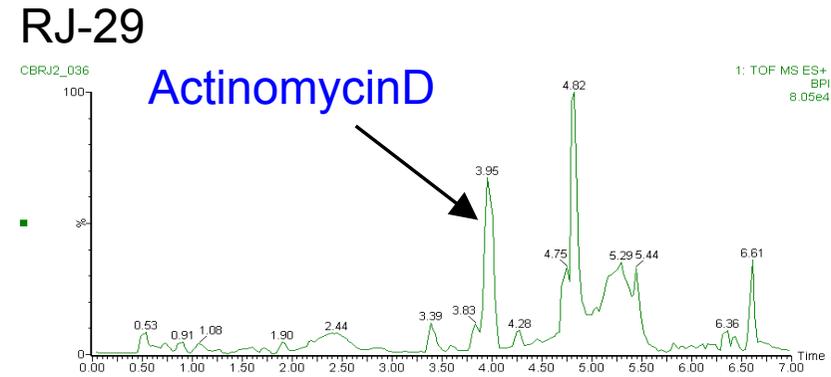
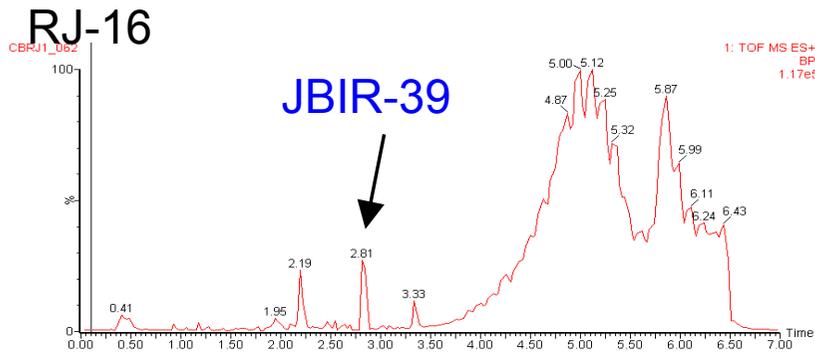
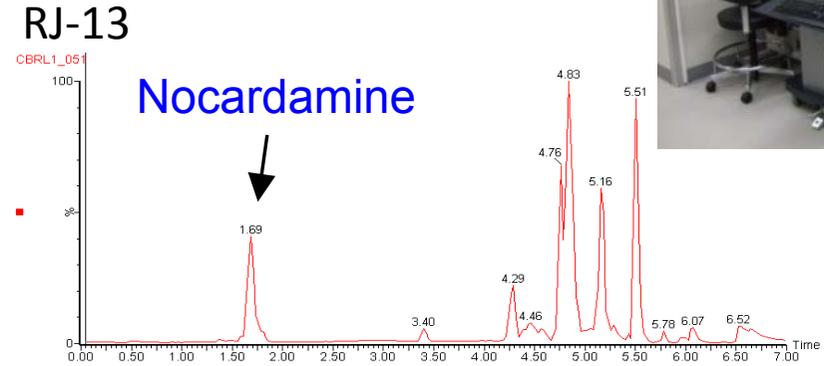
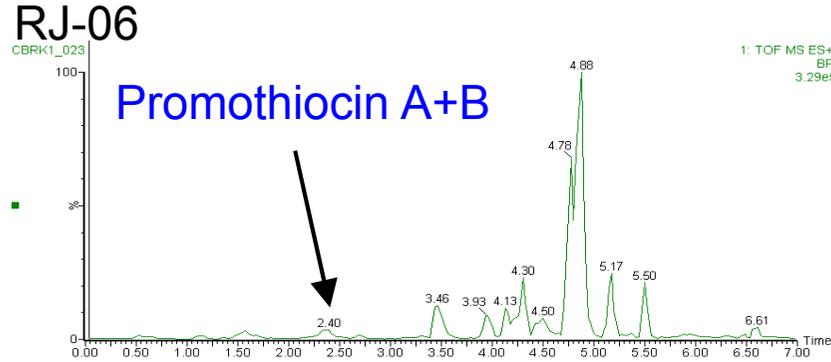


このシステムによって、スクリーニングヒットサンプル中に存在する活性化合物の同定を迅速に行うことが可能である

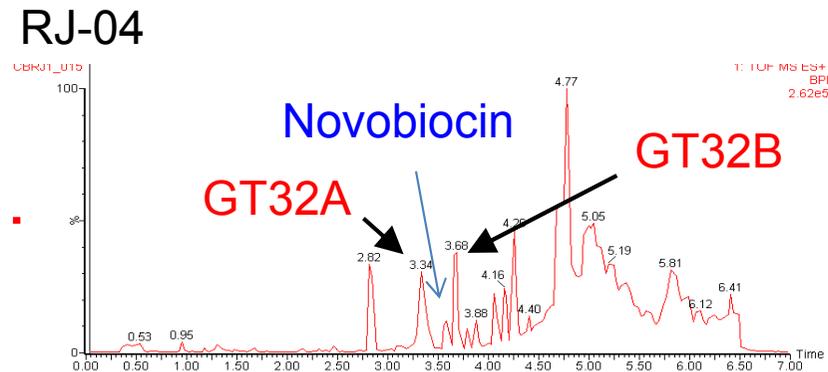
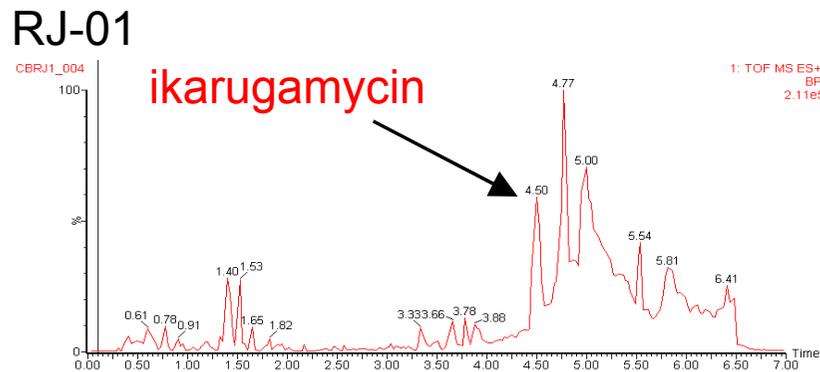
CB MS データベースを用いた単離天然化合物ライブラリー拡充



既存化合物同定



未登録化合物の選抜と同定 → ライブラリー追加



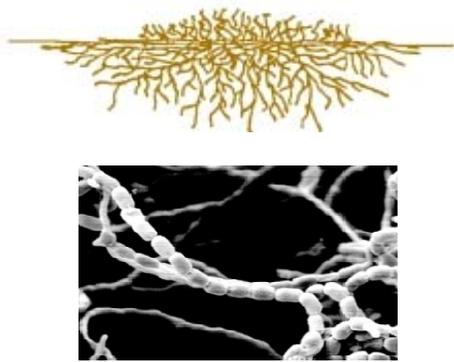
次世代型天然化合物ライブラリー生産技術

培養を継代することにより生産性が低下あるいは消失

生産菌に関しては、不安定な菌株としてではなく、生合成遺伝子として保存

放線菌ゲノム中には休眠生合成遺伝子が多く存在

未利用生合成遺伝子クラスターを、異種発現ホストに導入し化合物生産を行う



放線菌

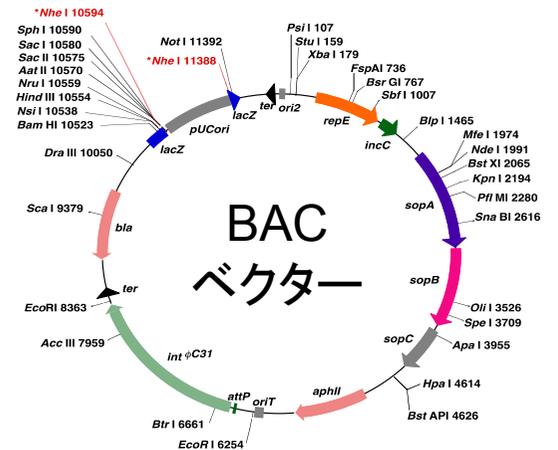
ゲノム
シーケンス



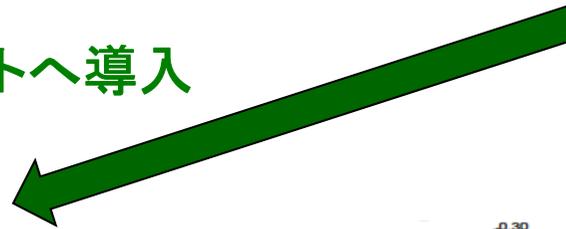
ゲノム解析



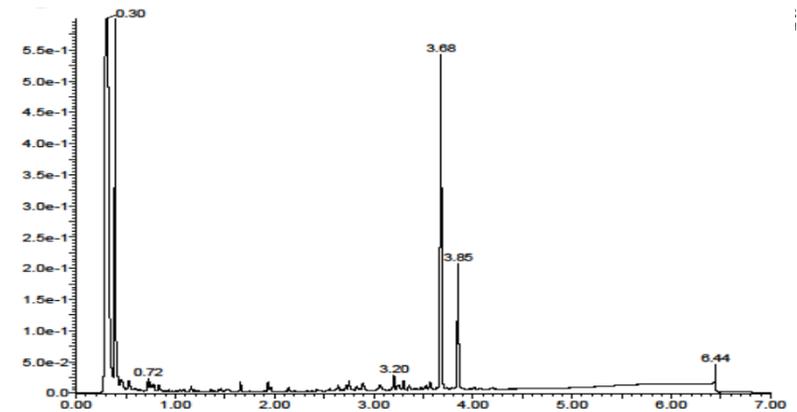
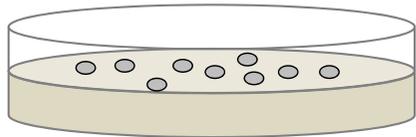
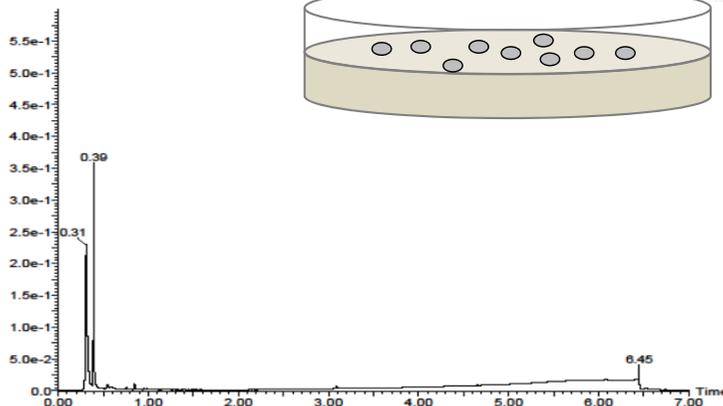
生合成遺伝子
クラスター取得



異種ホストへ導入



異種ホストによる
化合物生産



BACおよびCosmidの特徴

BAC

Cosmid

取得出来る
遺伝子の大きさ

100 kbp以上
(当ラボでは215 kbpが最高)

~ 45 kbp

遺伝子の安定性

極めて安定

遺伝子により不安定

コロニーピッキング
(9.2 Mbpをカバー)

2枚
(平均120 kbpとして)
実際には4 ~ 6枚分取得

6枚
(平均40 kbpとして)
保存スペース問題

テクニカル

難易度が高い

汎用性の高い技術が
確立されている

BAC (Bacterial Artificial Chromosome) によるクローニング技術:
日本は苦手な分野 (諸外国でも限られたラボのみ可能)

BACクローニング系は真核細胞生物でのゲノムライブラリー構築などで開発されたものではない。原核細胞生物、それもtype-I型PKS遺伝子のように極めて高い相同領域を保有し、かつ繰り返し構造を有する巨大DNAのクローニングはこれまでほとんど試されていなかった。

BACを用いた巨大遺伝子クラスターの取得



ゲルに菌
体を埋包



Lysozyme
SDS
Proteinase K



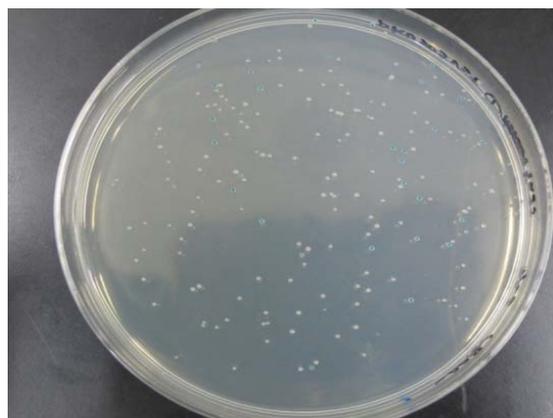
制限酵素によ
る部分分解



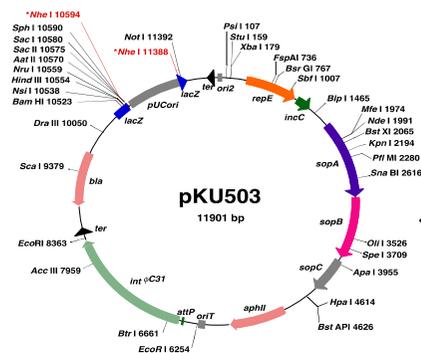
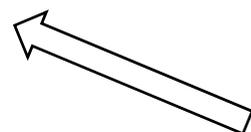
パルスフィールド電気泳
動によりDNAを分離

パルスフィールド電気泳動

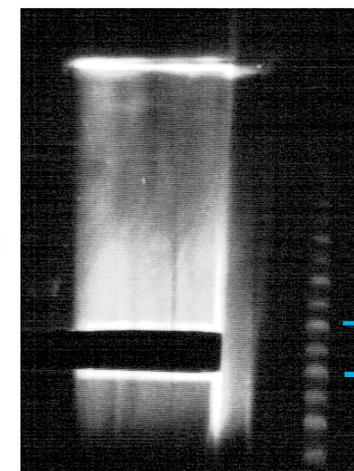
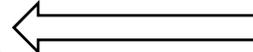
90-120 kbpのDNA
断片をゲルから抽出



大腸菌に
導入

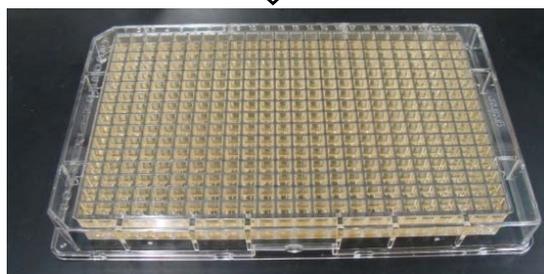


BACベク
ターへ連結



—120 kbp
—90 kbp

白いコロニーをコロニーピッカーでピック
クアップ (384-well)



現在、120 kbpぐらいまでであれば、ほぼ完全に取得が可能
(215 kbpの取得に成功している)

次世代型天然物化学の開発

ゲノム情報が取得できると何が出来るか？

- 有用化合物生産菌のゲノム情報を取得
- ゲノム情報より目的生合成遺伝子クラスターを同定・取得
- 安定に生産させる (かつ産業応用に足る高生産性で生産させる)

ホスト株

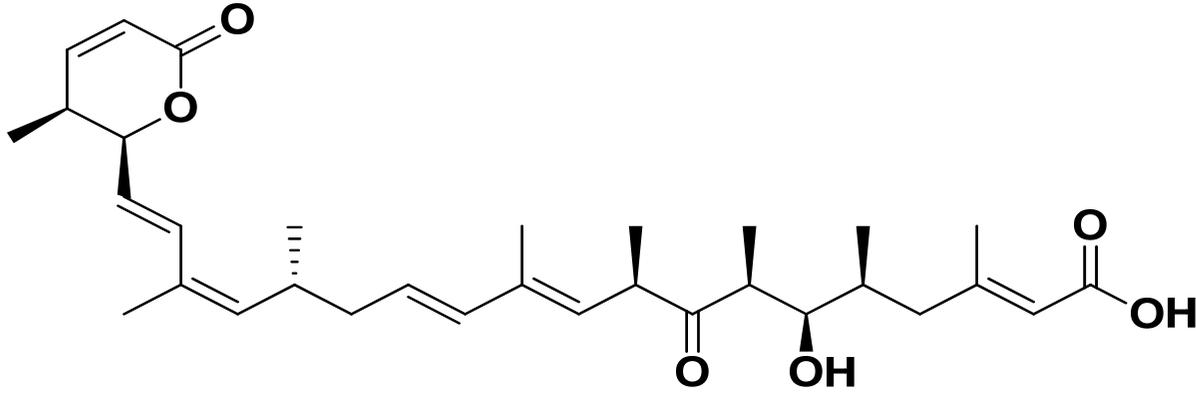
Streptomyces avermitilis: SUKA17

Streptomyces albus J1074: SAL1074

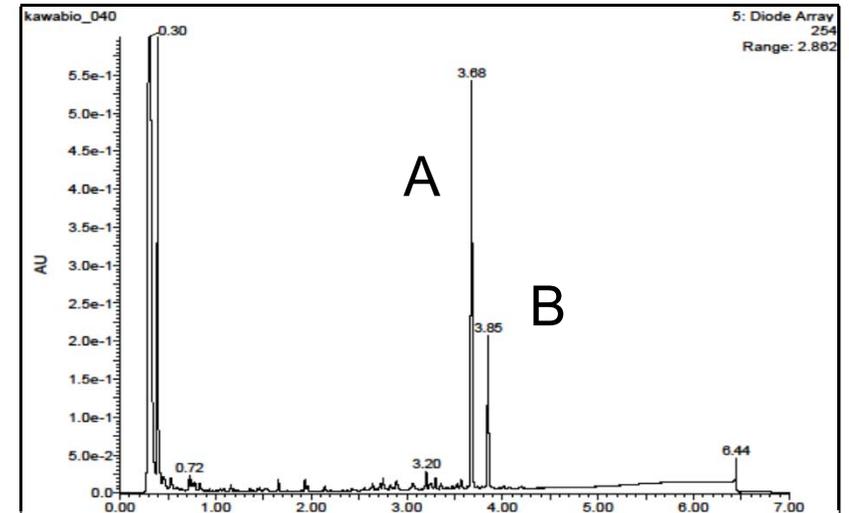
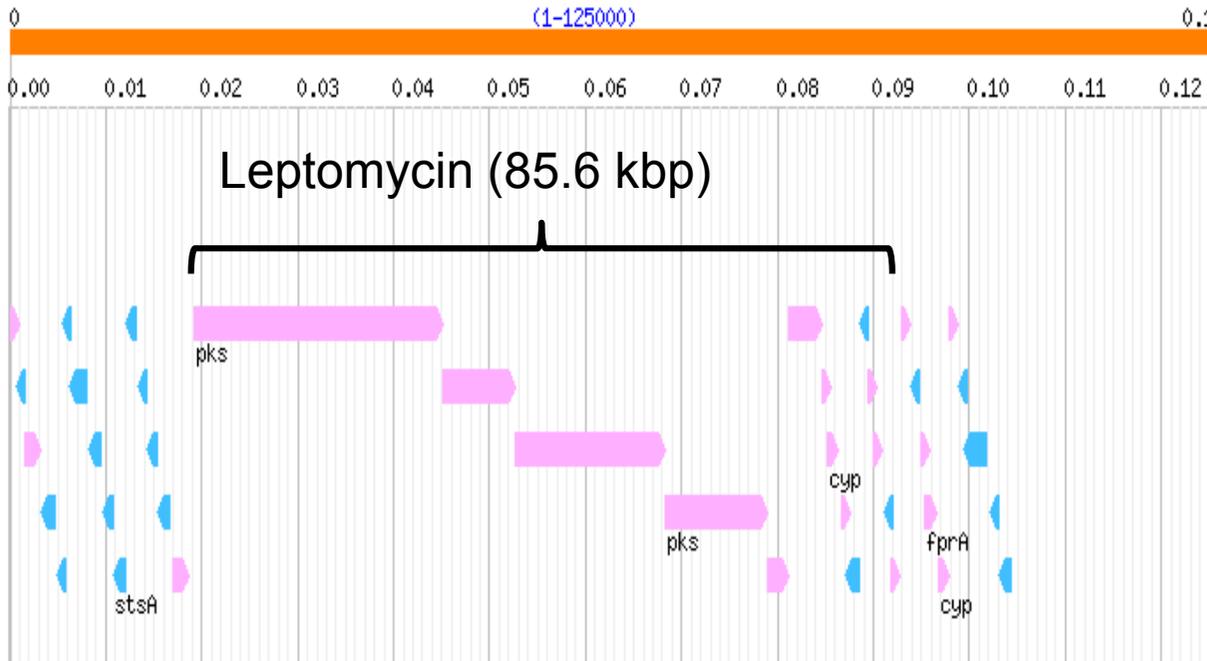
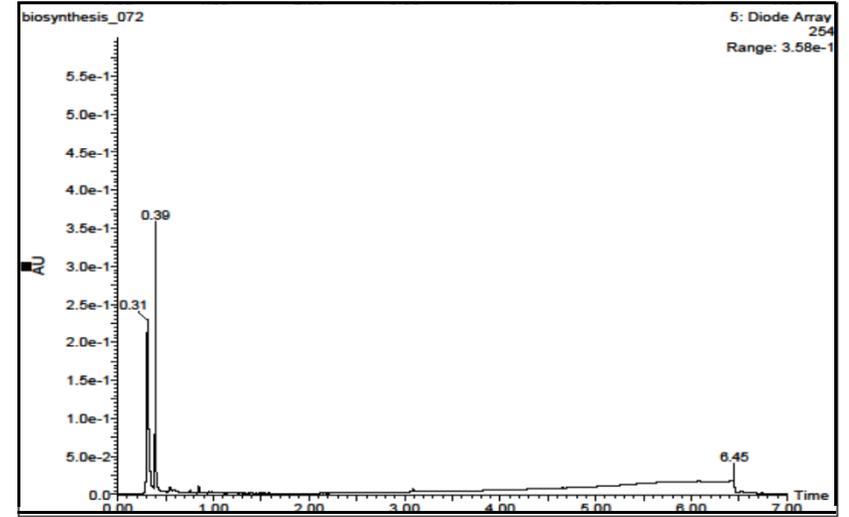
Streptomyces lividans: KASU1

Leptomycin生合成遺伝子クラスターの異種発現生産

SUKA17株

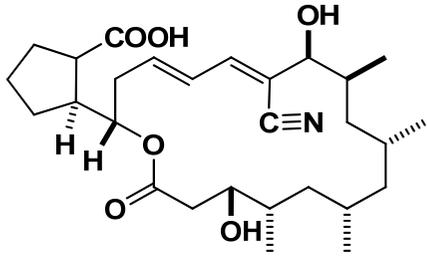


Leptomycin A

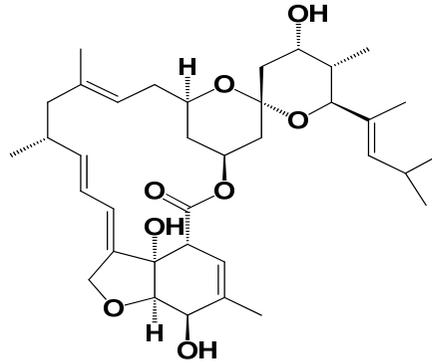


生産量: 5 mg/L

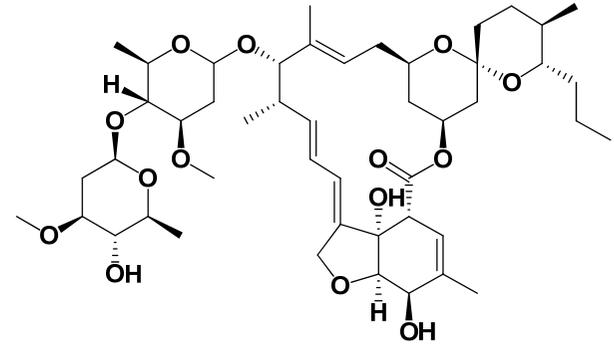
主な異種発現生産確認化合物



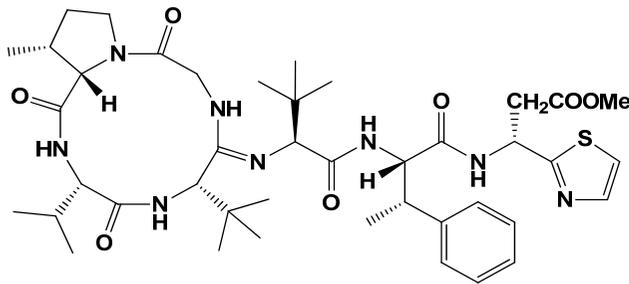
Borrelidin
(抗マラリア抗生物質)



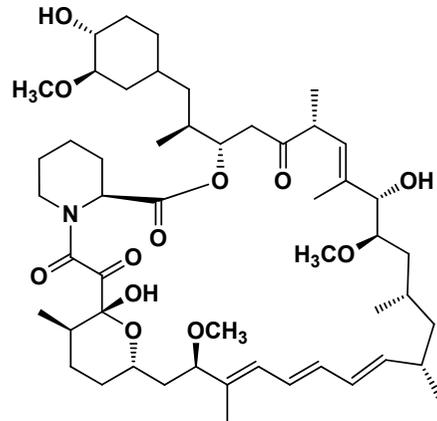
Nemadectin (駆虫薬)



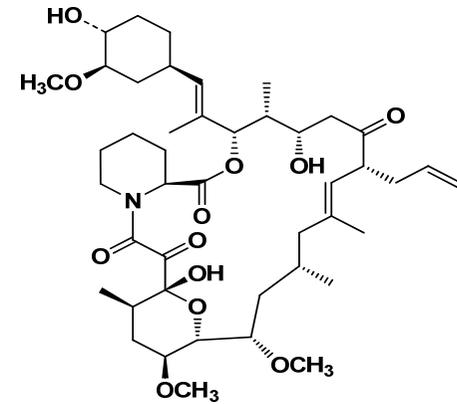
Avermectin (駆虫薬)



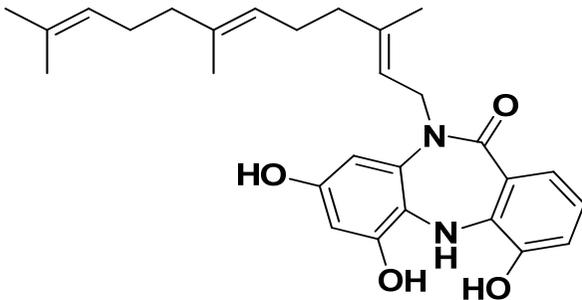
Bottromycin
(抗MRSA抗生物質)



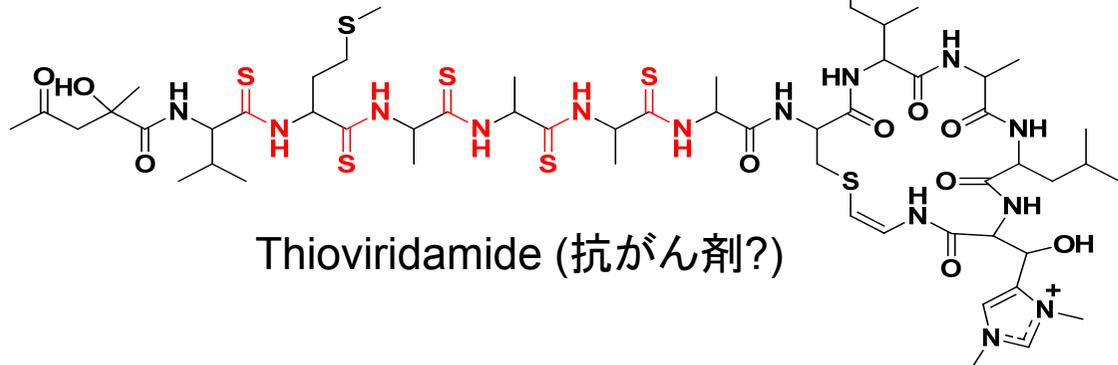
Rapamycin
(抗がん剤、免疫抑制剤)



FK506
(免疫抑制剤)



Diazepinomicin
(抗生物質、抗がん剤、抗炎症)

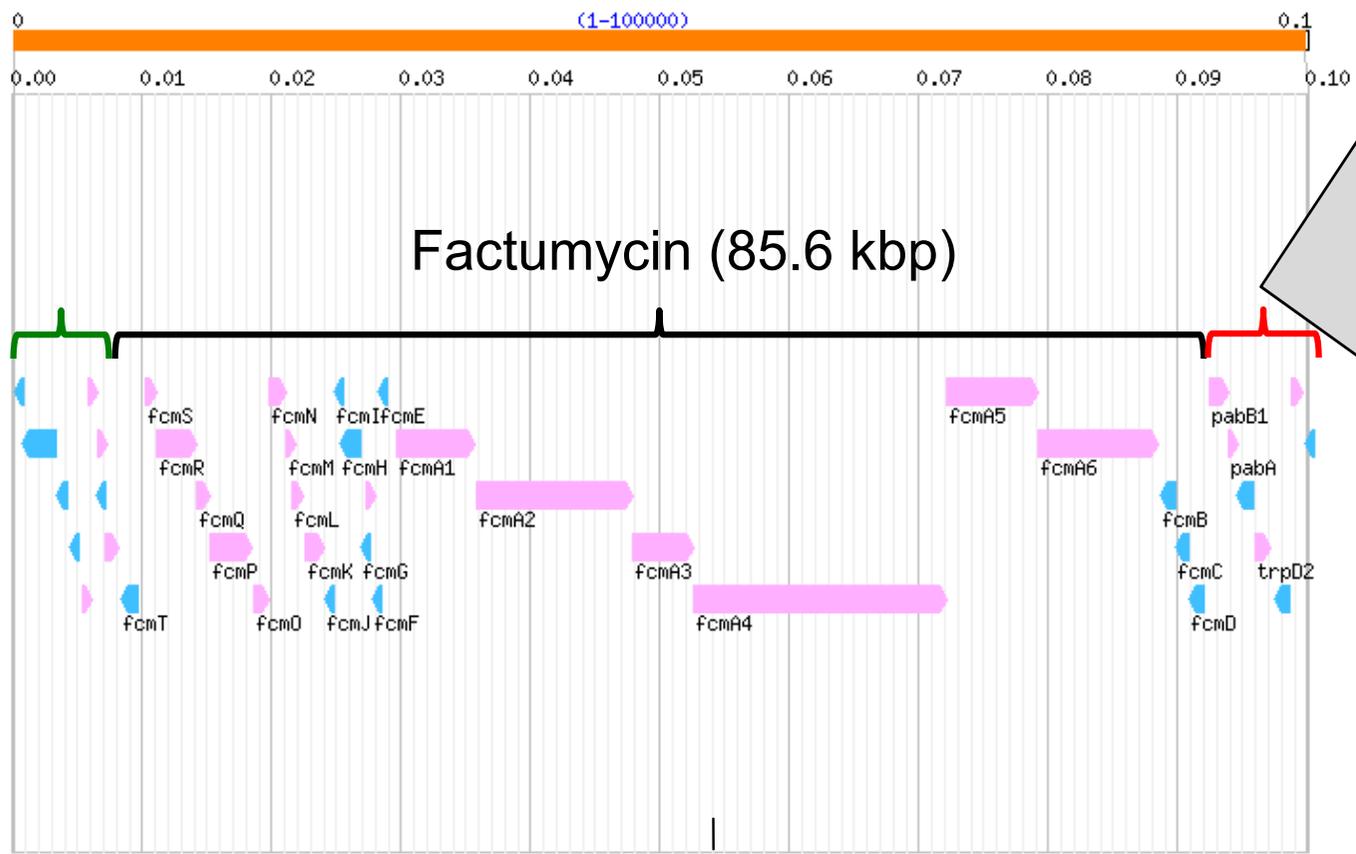


Thioviridamide (抗がん剤?)

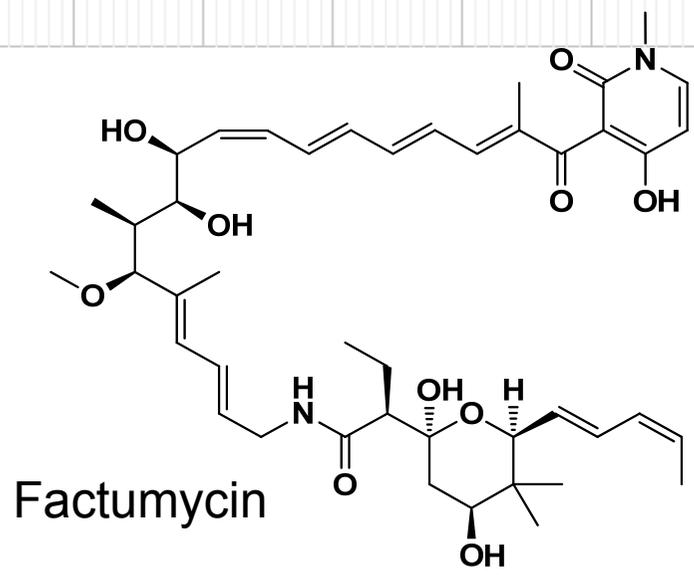
その他の化合物例

生合成遺伝子クラスター導入異種発現生産による
新規化合物生産

未知利用生合成遺伝子を活用した新奇物質生産



Factumycin (85.6 kbp)



4 mg/L
Kitasetaline

6 mg/L

22 mg/L

β-Calboline系化合物

完全にcrypticな生合成遺伝子
Appl. Environ. Microbiol. **78**, 8015, (2012)

