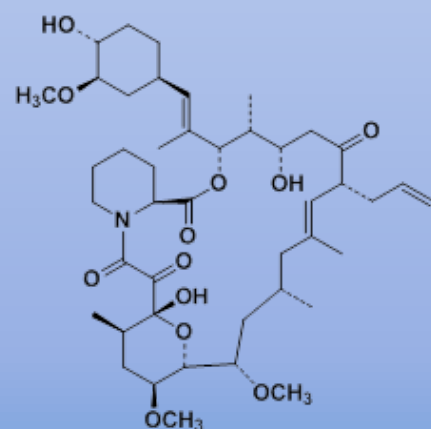


次世代天然物化学技術研究組合 技術紹介パンフレット



次世代天然物化学技術研究組合とは

微生物が生産する天然化合物は、豊富な生物活性と多様な構造を保有しており、新規医薬品候補化合物として大きな魅力があります。また、天然物化学は基礎研究および産業応用の両面において日本が世界に誇る学問分野であり、長年培って来た多くの資源やノウハウなど独自の優れた技術を持っています。しかしながら、天然物ライブラリーは、菌株の管理・培養、ヒット化合物の単離・合成など多くの過程を必要とし、また煩雑な処理が求められるため、その取扱いも独特の経験やノウハウが必要であります。したがって、残念ながら国内企業では天然物による創薬研究体制の見直し(縮小)が進んでいるのが実情です。

このような背景から、各製薬企業等が協力して天然物による創薬研究を推進できるように、優れたライブラリーを保有する企業が集まって2011年に本組合を設立しました。各社が独自に開発したライブラリーは貴重な財産であるため、従来は社内での利用に限定されていましたが、本事業では、これらのライブラリーを組合にて統一的に保管・管理し、他の組合員企業及びアカデミアによる相互利用を推進します。この天然物ライブラリー相互利用により、各社が保有するライブラリーの最大限の活用が図られ、ライブラリー提供者および利用者の両方にメリットが生ずるとともに、これにより、多くの医薬品候補化合物が見出され、我が国の天然物創薬の発展に寄与することが期待されます。

次世代天然物化学技術研究組合が保有する技術概要

プロジェクトリーダー 新家一男

微生物の生産する天然化合物は、現在考えられる最も理想的な中分子化合物ライブラリーリソースですが、有機合成による全合成は不可能ではないものの、極めて困難な場合が多々あり、さらに誘導体展開に関しては出発物質から全合成し直す必要があるため現実的には不可能でした。そこで生合成遺伝子改変により母核を改変し、誘導体展開を行うことが長きに亘り考えられてきました。しかしながら、天然化合物の代表であり臨床薬として多く利用されているマクロライド系化合物や環状ペプチド系化合物に関しては、それらの生合成遺伝子が100 kbを超えるような巨大な遺伝子クラスターからなること、また極めて高い相同性と繰り返し配列から構成されているため、相同組み換えや制限酵素を用いるような既存の遺伝子操作技術では、合目的な遺伝子改変が不可能でした。またこれらの天然化合物は、対象とする化合物の生産菌でしか生産させることが出来なかったため、目的生合成遺伝子以外にも多数の生合成遺伝子が存在する中での正確な遺伝子操作はさらに高いハードルでした。

一方我々はこれまでに、2011年からのNEDOや経産省、AMEDのプロジェクトを通じて技術開発を続けてきました。その中で正確な遺伝子解析技術と200kbを超えるBACライブラリーの作成技術を確立しました。現在では、中分子天然化合物の100 kbを超える生合成遺伝子および配列情報を多数取得しており、これらの遺伝子を利用した異種発現技術も確立しています。我々は、本技術とドメインスワッピング技術とを融合することで、これまでに無い革新的な中分子天然化合物の生合成遺伝子改変技術を開発し、合目的に中分子天然化合物の骨格改変を行う事を可能にすることを目指しています。

一方で、メバロチンやイベルメクチンの臨床開発例に見られるように、たった一つの水酸基あるいは二重結合の還元のみで劇的に薬効や代謝等が改善されることがあります。有機合成では、足場の無い位置からの合成展開、あるいは位置特異的な反応は困難です。そこで、有機合成では不可能な反応を触媒し、かつマクロライド系化合物のような大きな分子量を持つ化合物の修飾が可能な酵素ライブラリーを構築し、実際に化合物修飾を行うと共に、足場を利用した有機合成による誘導体展開を行う技術開発を行っています。また、種々の酵素の活性発現ベクターなどの開発も行っており、放線菌内でのP450その他の酵素の活性発現に多くの実績を蓄積してきています。これまでの修飾酵素は工業原料のような低分子化合物を修飾するものが大半でしたが、我々は幾つかの中分子天然化合物の修飾が可能な酵素を見出しており、それらの酵素-化合物のドッキング情報等を用いて、酵素の特異性改変などのシミュレーション技術開発も行っています。

ぜひ、これらの技術を次世代天然物化学技術研究組合を通じて皆様に活用していただき、天然化合物からの創薬や農薬などの製品開発につながることを期待しています。

正確な遺伝子解析技術

MiseqによるショートリードシーケンスとPacBioによるロングリードシーケンスを併用することで、この複雑な放線菌ゲノムを精密に解析する手法を確立することに成功

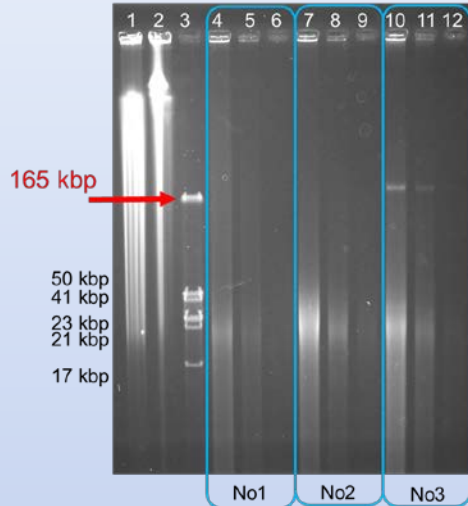
Miseq



PacBio



切断された低分子ゲノム

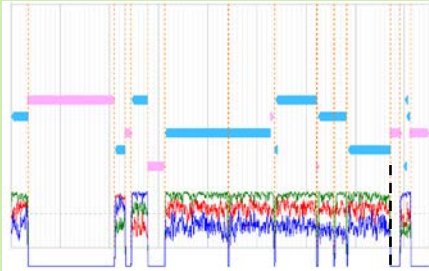


良好なシーケンス結果を得るためには、高分子ゲノムの調製が不可欠

	name	DNA濃度 (ng/μL)	総ゲノム泳動量(ng)
1	con-1 EM52	300	3000
2	con-2 EM52	438	4380
3	マーカー 7-GT		
4	No. 1	7060	35300
5			7060
6			1412
7	No. 2	4870	24350
8			4870
9			974
10	No.3	7155	35775
11			7155
12			1431

高度な繰り返し配列からなるI型ポリケタイド生合成遺伝子の領域のシーケンス結果例

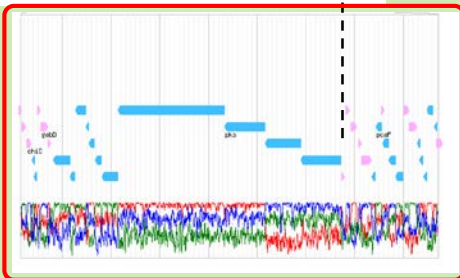
某機関での
解析結果



Scaffold数: 262個

解読したデータに合わせて同領域をプロット
赤線は分断箇所
青帯: 解析取得領域
ピンク帯: 解析未取得領域

天然物組合
解析結果



Scaffold数: 2個

青帯: 右から左の向きの配列
ピンク帯: 左から右の向きの配列

- ✓ 高品質ゲノムと独自のシーケンスデータ処理との組み合わせにより、ほぼ放線菌全長ゲノムの解析が可能
- ✓ 放線菌生合成遺伝子のような、高いGC含量からなり、また高度な繰り返し配列を持つゲノム領域の解析も可能

ヒトなどのほ乳類でも、プロモーター領域は高いGC含量からなり、また多くの疾患に関与する責任遺伝子領域は高度なリピート配列を持つものが多く存在することが知られている。本事業において開発した放線菌ゲノム解析技術と多数の解析の結果得られたノウハウは、今後個別化医療を展開して行く上で極めて貴重なデータを生み出して行けると考えられる。

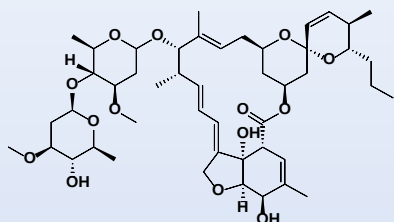
可能な受託業務

シーケンス解析

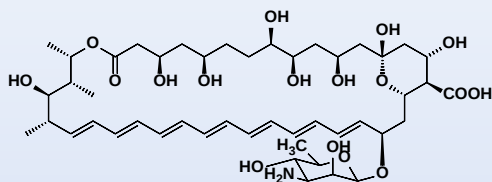
200 kbを超える*BACライブラリーの作成技術

*BAC: bacterial artificial chromosome, 大腸菌人工染色体

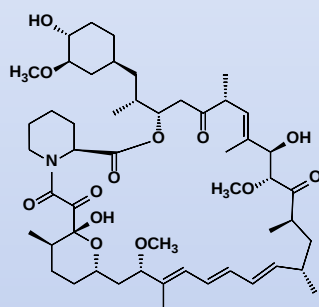
BAC: 300 kbpまでの遺伝子断片をクローニングできる (最大266 kbpのクローンを得ている)



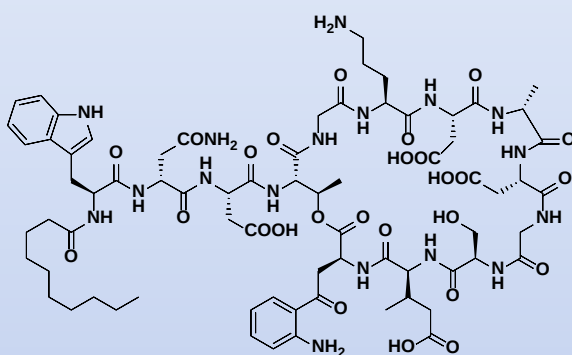
Avermectin
(MW: 858, 81 kb)



Amphotericin B
(MW: 921, 113 kb)

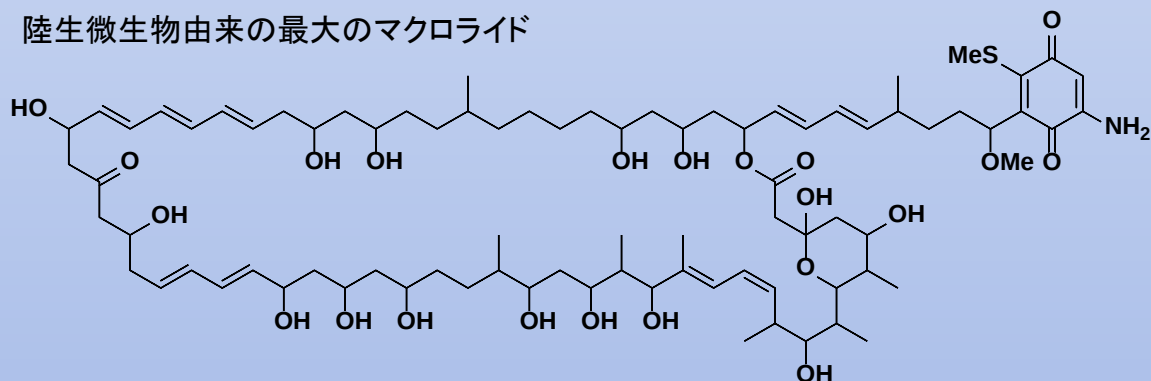


Rapamycin
(MW: 913 107 kb)



Daptomycin
(MW: 1620, 128 kb)

陸生微生物由来の最大のマクロライド



クラスターサイズ: 213.9 kbp
インサート長: 232.2 kbp

Quinolidomicin
 $C_{83}H_{132}O_{23}S$, MW: 1529



参考文献: T. Hashimoto, 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.*, **20** (24), 7996-7999 (2018).

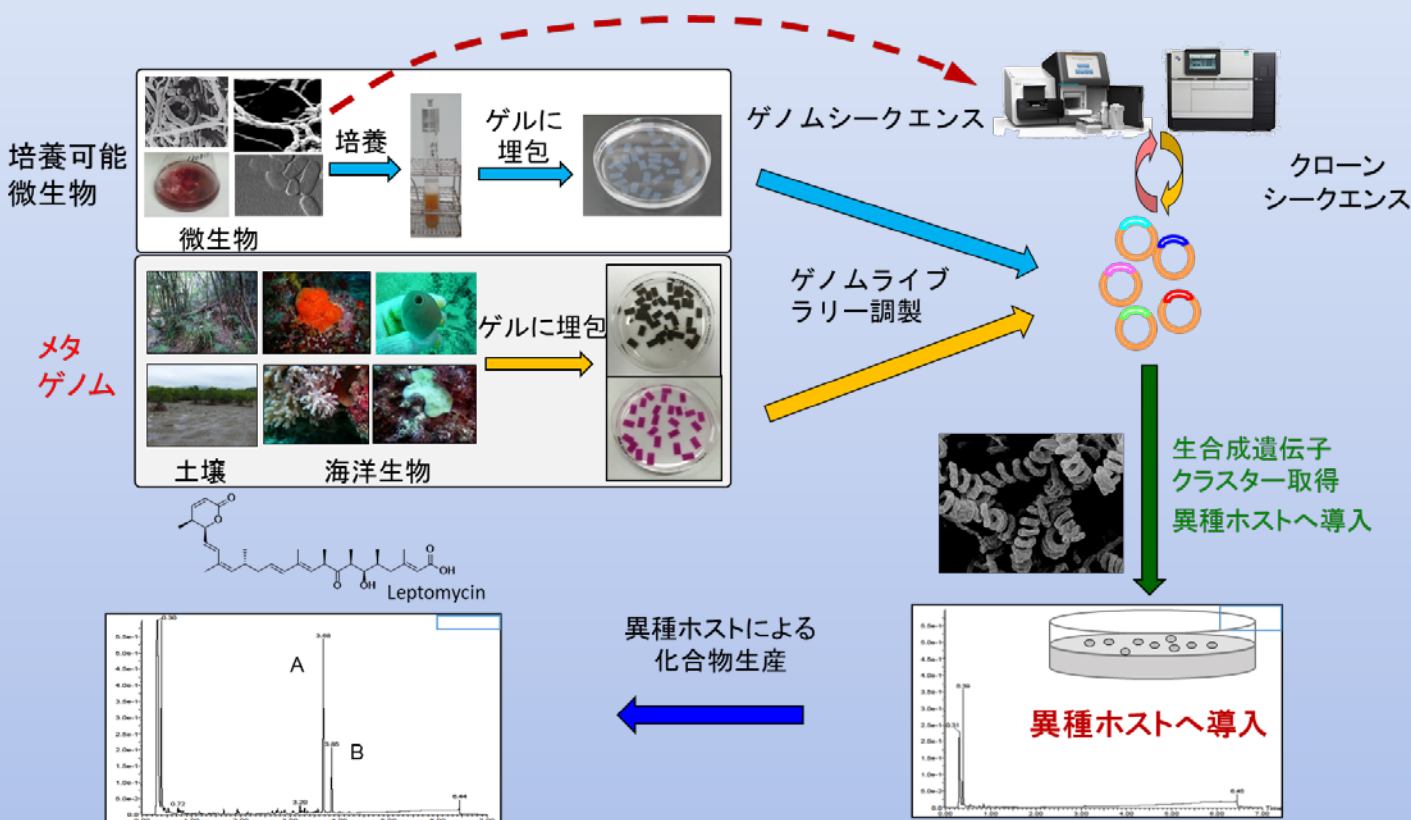
可能な受託業務

BACライブラリー作成受託

依頼ベースで有用天然化合物の生産菌からBACライブラリーの作成
BACでクローニングできるので、長い遺伝子もそのままクローニング

微生物二次代謝産物の異種発現生産技術

- ✓ 培養可能な微生物は培養して、ほぼ全長ゲノムの解析が可能。メタゲノムでも高品質ゲノムの調製法を用いることで長いゲノムライブラリーを調製可能。
- ✓ シーケンス結果から求める生合成遺伝子クラスターを取得したら、高生産能を持つ異種発現用のホストに導入することで、元の生産菌よりも高い生産性を発揮することも可能



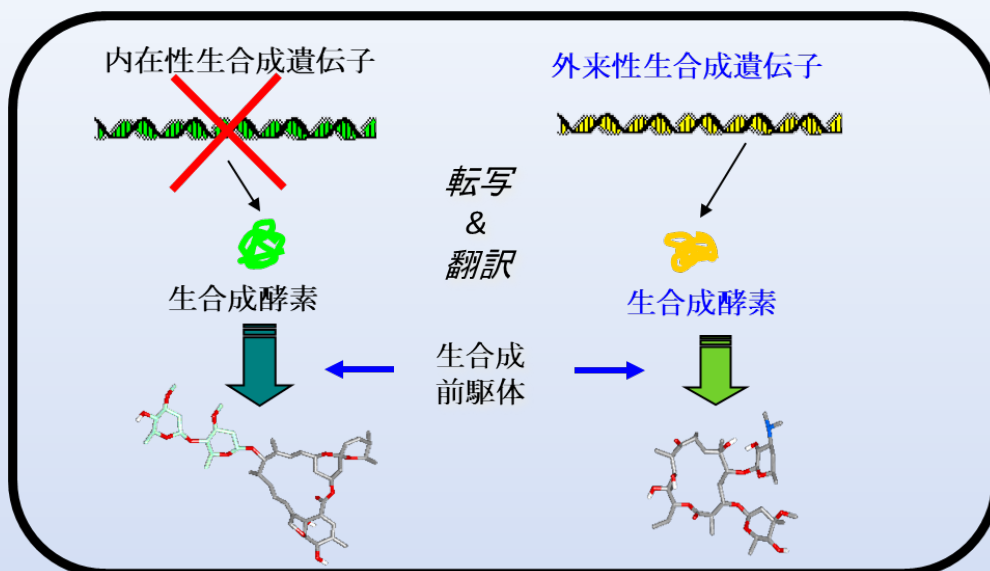
参考文献：新家一男，池田治生，異種発現による天然化合物創製 化学と生物 Vol. 52 (9) 616-621, (2014)

可能な受託業務

微生物二次代謝産物の異種発現生産

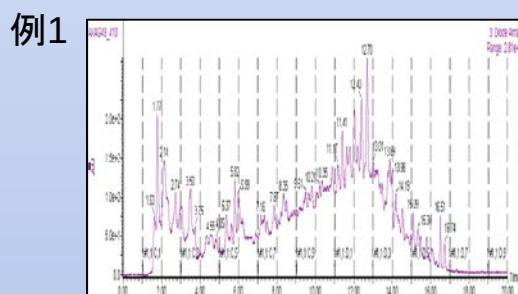
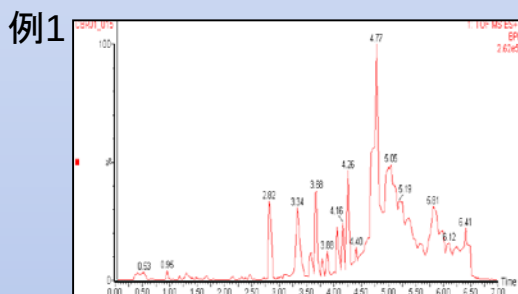
1. 微生物ゲノム解読
2. BACベクターを用いたゲノムライブラリー調製
3. 目的生合成遺伝子のクローニング
4. クリーン宿主株での異種発現生産
5. 生合成遺伝子改変による母核改変

異種発現を行うためのホスト株の特徴



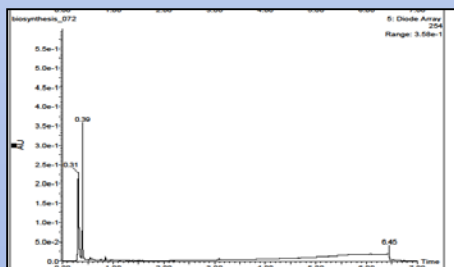
二次代謝産物異種発現のための“クリーンホスト”
生合成前駆体を取り合いする内在性の生合成遺伝子を除去してあるため、外来性の生合成遺伝子が発現しやすくなっている

自然界から採集した微生物 (野生株) の培養液の中には、無数の化合物が含まれている

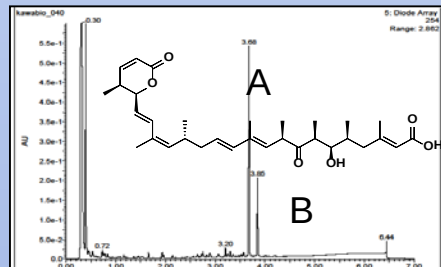


天然物組合で使用しているホスト株例

ホスト株 (遺伝子導入無し)



ホスト株 (遺伝子導入有り)



導入された遺伝子により生合成される化合物のみが検出される

参考文献 : H. Ikeda, K. Shin-ya, and S. Omura. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 41: 233, (2014) .

可能な受託業務

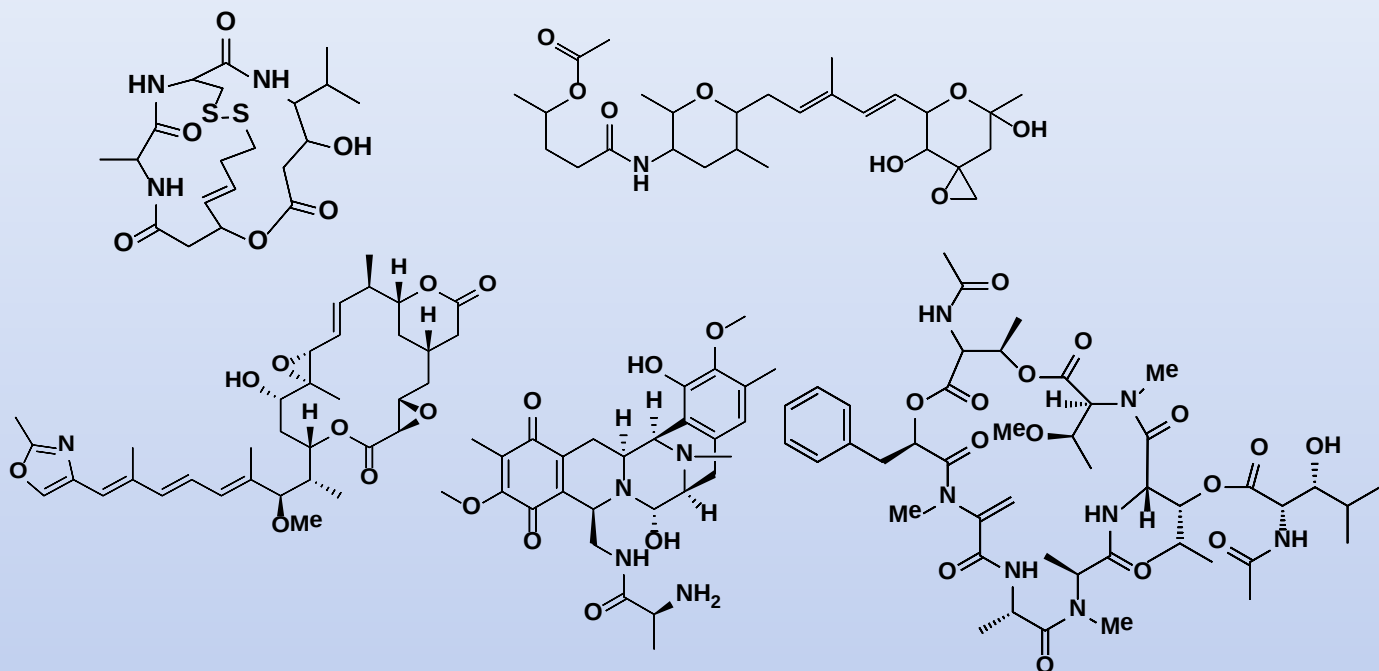
微生物二次代謝産物の異種発現生産

1. 微生物ゲノム解読
2. BACベクターを用いたゲノムライブラリー調製
3. 目的生合成遺伝子のクローニング
4. クリーン宿主株での異種発現生産
5. 生合成遺伝子改変による母核改変

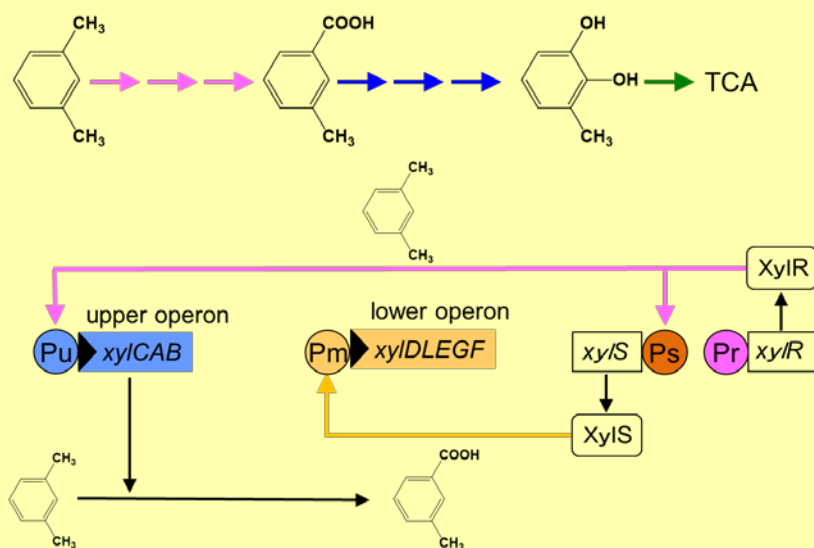
Pseudomonas異種発現システム

- ✓ 通常の発現系では、毒性の強い化合物を異種発現させると生産菌が死んでしまうが、トルエン分解菌由来の条件発現系プロモーターを用いた*Pseudomonas*の異種発現用ホストも開発し、毒性物質の効率的な異種発現をさせることができるようにした。

Pseudomonas putida B1株を用いた異種発現



条件発現系を含む各種*Pseudomonas*用プロモーター

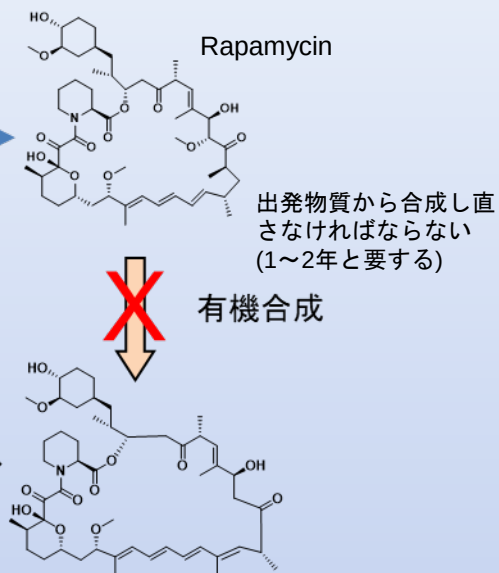
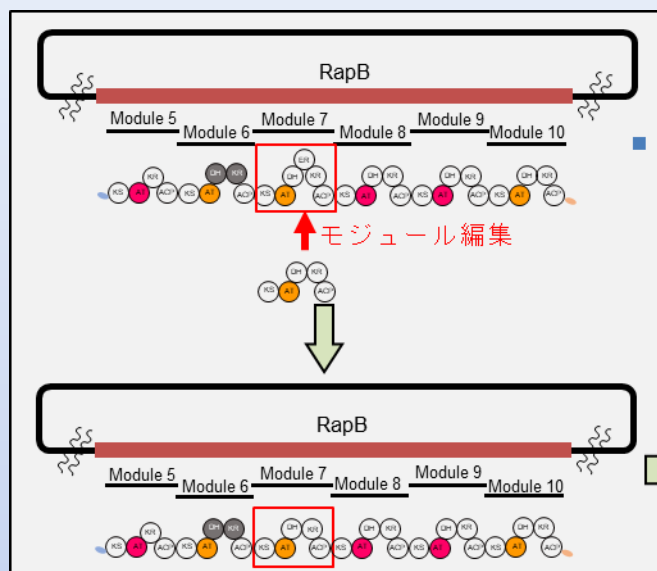


可能な受託業務

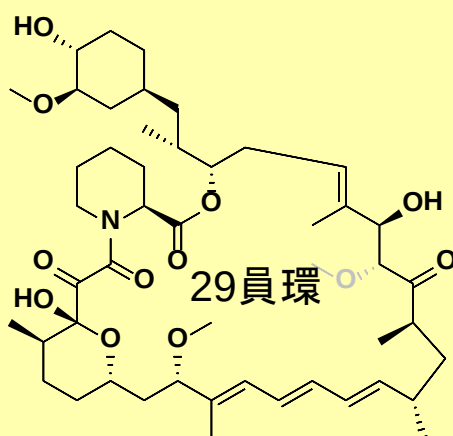
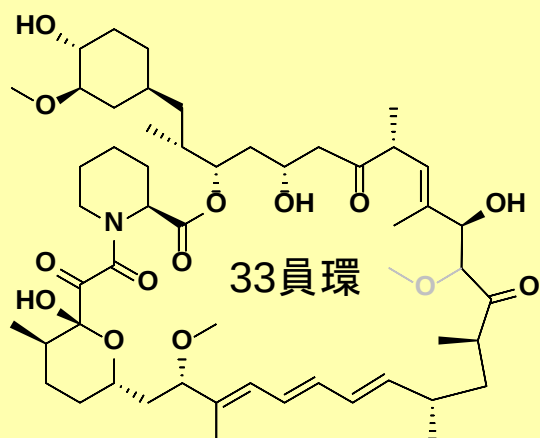
微生物二次代謝産物の異種発現生産

1. 微生物ゲノム解読
2. BACベクターを用いたゲノムライブラリー調製
3. 目的生合成遺伝子のクローニング
4. クリーン宿主株での異種発現生産
5. 生合成遺伝子改変による母核改変

生合成遺伝子改変による骨格改変技術



作成したRapamycin 母核改変化合物例



参考文献：母核改変された化合物の製造方法 特許出願中

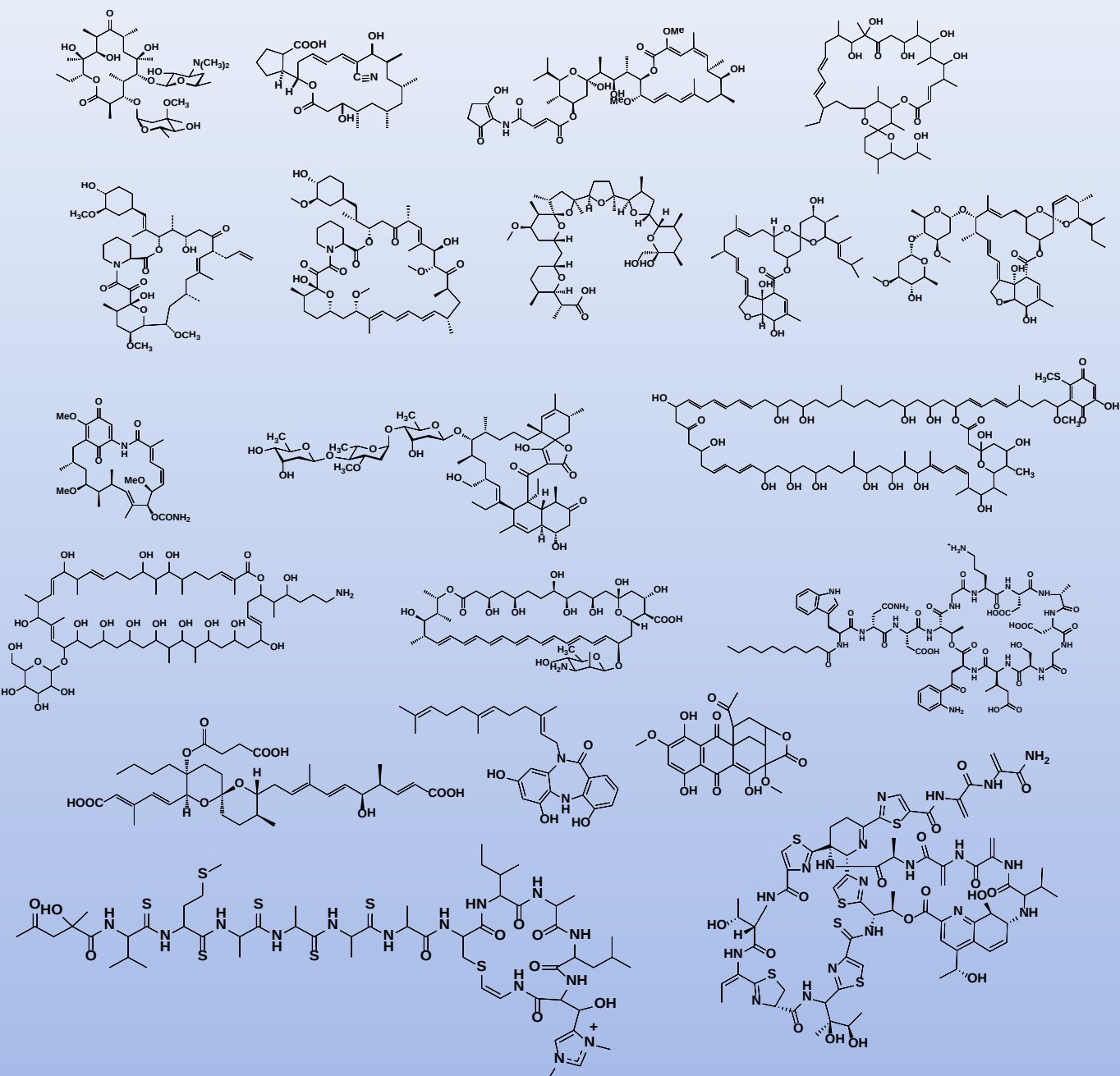
可能な受託業務

モジュール編集

有用天然化合物の類縁体作成

生合成遺伝子クラスターおよび発現ベクター等

巨大生合成遺伝子クラスターを含むBACクローン (一例)



放線菌発現最適化ベクター (P450等各種酵素、転写制御因子等)

可能な受託業務

微生物二次代謝産物の異種発現生産

1. 微生物ゲノム解読
2. BACベクターを用いたゲノムライブラリー調製
3. 目的生合成遺伝子のクローニング
4. クリーン宿主株での異種発現生産
5. 生合成遺伝子改変による母核改変

沿革

2006年4月	●	バイオ産業情報化コンソーシアム及び産業技術総合研究所が、NEDO「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」プロジェクトにて、製薬企業等が保有している天然物ライブラリーの提供を受けて世界最大級の天然物ライブラリーを構築
2011年4月	●	プロジェクトの成果である世界最大級の天然物ライブラリーを継続して保管・管理し、ライブラリーの相互利用を推進することにより医薬品開発等の産業応用を図るため、技術研究組合を設立 NEDOプロジェクト「有用天然化合物の安定的な生産技術開発(2011～2012年度)」を受託
2013年8月	●	経産省プロジェクト「個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発(天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術)」を受託
2014年4月	●	2014年1月の基本計画改定により、「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発(天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術)」にプロジェクト名が変更
2015年1月	●	医薬基盤研究所より「創薬支援ネットワーク」における天然物ライブラリー利用に関連する業務を受託
2015年4月	●	国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の発足に伴い、「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発(天然化合物及びITを活用した革新的医薬品創出技術)」は、AMEDプロジェクトとして受託
2018年4月	●	AMEDより「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発(革新的中分子創薬技術の開発)」を受託

受託可能な事業（気軽にお問い合わせください）

■ シーケンス解析

■ BACライブラリー作成受託

依頼ベースで有用天然化合物の生産菌からBACライブラリーの作成

BACでクローニングできるので、長い遺伝子もそのままクローニング

■ 微生物二次代謝産物の異種発現生産

1. 微生物ゲノム解読

2. BACベクターを用いたゲノムライブラリー調製

3. 目的生合成遺伝子のクローニング

4. クリーン宿主株での異種発現生産

5. 生合成遺伝子改変による母核改変

■ モジュール編集

有用天然化合物の類縁体作成

次世代天然物化学技術研究組合

Technology Research Association

for Next generation natural products chemistry

〒135-8073 東京都江東区青海2丁目4番32号 TIME24ビル 10 F

TEL: 03-5531-8554

FAX: 03-5531-1560

Homepage:

<http://www.natprodchem.jp/>

E-Mail:

natprodchem@jbic.or.jp

