

エピジェネティック制御を利用する新規医薬資源の開拓

浅井 禎吾¹, 大島 吉輝²

1. はじめに

創薬の魅力的な資源である天然物は、一次代謝から供給される原料やエネルギーをもとにしてそれぞれの生物に固有な二次代謝経路で作られる。それゆえ、植物、微生物、海洋生物など、さまざまな環境に生育する多種多様の生物が天然物の探索資源として用いられてきた。ユニークな化学構造や薬理活性を有する新規天然物の発見は、天然物化学分野の研究の大きなモチベーションの一つである。天然物を形づくる情報はDNAに書き込まれていることから、新しい天然物の発見には新しい遺伝子資源の開拓も必要となる。これまで、多くの研究者は未利用生物資源を各地に探し求め、それらを材料に新しい物質の探索を行ってきた。しかし、新しい資源が枯渇してくるにつれ、新しい天然物の発見も難しくなっている。もちろん、資源が豊富な国からは依然として新しい天然物が次々と報告されているし、難培養微生物の活用によりイノベーションをもたらすと期待される *iChip* (*iChip*は小さい格子の集合でそれぞれが多孔膜で覆われた構造をしている。単一の微生物を自然環境で培養可能にしたもの)¹⁾ のように、未利用生物資源の開拓を加速させる技術も開発されるなど、開拓の余地は十分ある。一方で、次世代シーケンサーの登場により、さまざまな微生物のゲノム情報が解読されるにつれ、そのゲノム上には、これまで同定された化合物の数から予想されるよりはるかに多くの生合成遺伝子クラスター^{*1}が存在することが明らかになってきた。既存の生物資源であっても未開拓の遺伝子資源が数多く残されている。これら遺伝子資源は新たな医薬資源として有望であるが従来の培養条件下では大半の生合成遺伝子クラスターが休眠していると言われている。近年、創薬における重要な微生物資源である

糸状菌では、遺伝子の休眠にエピジェネティック制御が深く関わっていることが明らかにされ、またその機構も分子レベルで次々に解明されている。これにより、エピジェネティック制御を人為的に改変させることで休眠型二次代謝物^{*2}にアクセスする新しい天然物のスタイルが誕生した。

2. 糸状菌二次代謝はエピジェネティクスに制御されている

糸状菌が作り出す二次代謝物には、ペニシリンやロバスタチンなど有用な薬理活性を示すものから、アフラトキシンやグリオトキシンなど有害なカビ毒までさまざまなものが存在する。これらの物質の生産をコントロールすることができれば、有用物質の産生増大や有害物質の産生抑制が可能となるため、二次代謝制御に関する研究は盛んに行われてきた。ウィスコンシン大のKellerのグループは、*Aspergillus nidulans*を用いて、アフラトキシンの生合成前駆体であるカビ毒ステリグマトシスチン(ST)の生産制御に関する研究を行うなかで、ST生合成遺伝子クラスター内の転写因子*afIR*の発現を活性化するLaeA (loss of *afIR* expression)を見いだした²⁾。さらに詳細な解析により、LaeAは糸状菌に保存された二次代謝のグローバル制御因子であることが明らかにされた。LaeAは、遺伝子発現制御に関わること、核内に局在すること、S-アデノシルメチオニン結合部位を有することなどから、ヒストンメチル化酵素などと同様にタンパク質メチル化酵素であり、クロマチン構造を変えることにより遺伝子発現制御に関わっていることが予想された。その後の研究で、LaeAはメチル化酵素としては機能しないことが示されたが、この研究により、初めて糸状菌二次代謝とエピジェネティック制御が結びついた。糸状菌の生合成遺伝子クラスターの多くがエピジェネティック制御を受けやすいテロメア近傍の遺伝子座に存在する。このことから、同グループは、エピジェ

¹東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻 (〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1)

²東北大学大学院薬学研究科

The application of epigenetic regulation for natural products discovery

Teigo Asai¹ and Yoshiteru Oshima² (¹Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880643

© 2016 公益社団法人日本生化学会

^{*1} 微生物では二次代謝物の生産に必要な遺伝子群はクラスターを形成しており、生合成遺伝子クラスターと呼ぶ。

^{*2} 糸状菌のゲノム上には数多くの二次代謝物生合成遺伝子クラスターが存在するが、その大半は通常の培養条件下では発現していない、もしくはほとんど発現していない。これら休眠遺伝子にコードされる未知の二次代謝物のことを休眠型二次代謝物と呼ぶ。

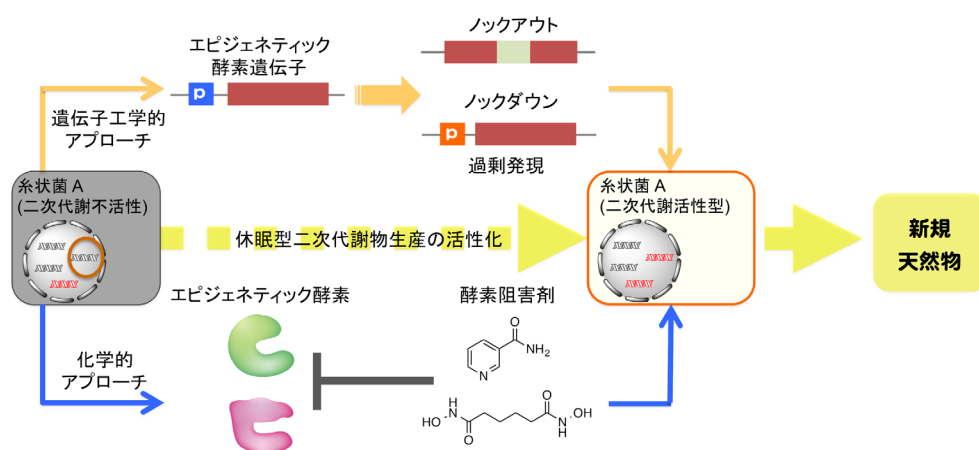


図1 エピジェネティック制御の人為的改変による新しい医薬資源の開拓の概略

ネティック因子の中で最もよく知られているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に着目し, *A. nidulans* を用いて *hdaA* (HDAC の一種) の破壊実験を行い, さまざまな生合成遺伝子の発現が上昇することを明らかにした³⁾。この研究により, エピジェネティック制御の糸状菌二次代謝への関与が初めて分子レベルで明らかにされた。同じ研究の中で, HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A を用いても同様の活性化を引き起こせることが実験的に示された。これらの研究成果により, 人為的にエピジェネティック制御を改変し休眠型二次代謝物の生産を誘導する方法として, 遺伝子工学的なアプローチと化学的なアプローチの両方に道が拓かれた (図1)。

3. 遺伝子工学的なアプローチ

ゲノム情報が利用でき, かつ形質転換法が確立されている菌種においては, エピジェネティック因子のノックアウト, ノックダウンもしくは過剰発現などの遺伝子操作が可能である。モデル糸状菌である *A. nidulans* でさまざまな実験が行われるなかで, ヒストンメチル化酵素をコードする *cclA* の破壊株において, 休眠型生合成遺伝子クラスターの発現が活性化され, 新規ポリケチド化合物の生産が誘導された⁴⁾。CclA と上述の HdaA は糸状菌に高度に保存された酵素であり, さまざまな菌の休眠型生合成遺伝子クラスターの覚醒に利用できる。たとえば植物内生糸状菌である *Pestalotiopsis fici* や *Calcarisporium arbuscula* において, *hdaA* ホモログや *cclA* ホモログの破壊株でも休眠型二次代謝物の生産が誘導され新規天然物の取得に成功している^{5, 6)}。一般に, エピジェネティック制御に関わる酵素の標的は複数存在し, さまざまな機能を発揮する。それゆえ, 破壊すると生育することができない因子もある。たとえば, 糸状菌のクラス1 HDAC である RpdA は, トータル HDAC 活性への寄与は小さいものの生育には必須で

ある。ウィスコンシン大の Keller とイリノイ大の Kelleher のグループは共同研究において, *rpda* 遺伝子のプロモーターをキシロース誘導型に置換することで *rpda* の発現が抑制された株を作製した。*rpda* 抑制株の代謝物のメタボロミクス解析により, MS イオンレベルでは相当な数の二次代謝物の生産が変動していることが示され, さらに新規ペプチド系二次代謝物 aspercryptin 類の取得にも成功している⁷⁾。遺伝子工学的な手法は, 適応できる菌種が限られるものの, 二次代謝物の探索が網羅的になされているモデル糸状菌の *A. nidulans* であっても新しい天然物を獲得できしており, 新規休眠型二次代謝物を取得する強力な方法の一つであるといえる。また, 特定の因子を選択的に改変できる点も大きな利点である。今後, 二次代謝制御に関わる新たな因子の発見や, さまざまな糸状菌のモデル化が進むことで, この方法を利用した新しい医薬資源の開拓が加速することが期待される。

4. 化学的なアプローチ「ケミカルエピジェネティクス」

オクラホマ大の Cichewicz らは, エピジェネティック制御に関わる酵素の阻害剤を用いて休眠遺伝子を覚醒させる「ケミカルエピジェネティクス」の手法を考案した⁸⁾。いくつかの糸状菌をモデルとした実験では, 数種類の HDAC 阻害剤や DNA メチル化酵素阻害剤が検討され, SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, HDAC 阻害剤) と 5-azacytidine (DNA メチル化酵素阻害剤) に休眠型二次代謝物の生産を活性化する効果が見いだされた。さらに同グループは, 酵素阻害剤処理した *A. niger* の二次代謝生合成遺伝子の発現解析を行い, 多くの遺伝子の発現は数倍から数十倍まで活性化されていることを示した。発現が抑制される遺伝子もあったが, この方法が遺伝子発現パターンを変動させ休眠型生合成遺伝子クラスターを覚醒させるのに十分効果があることが実証された⁹⁾。

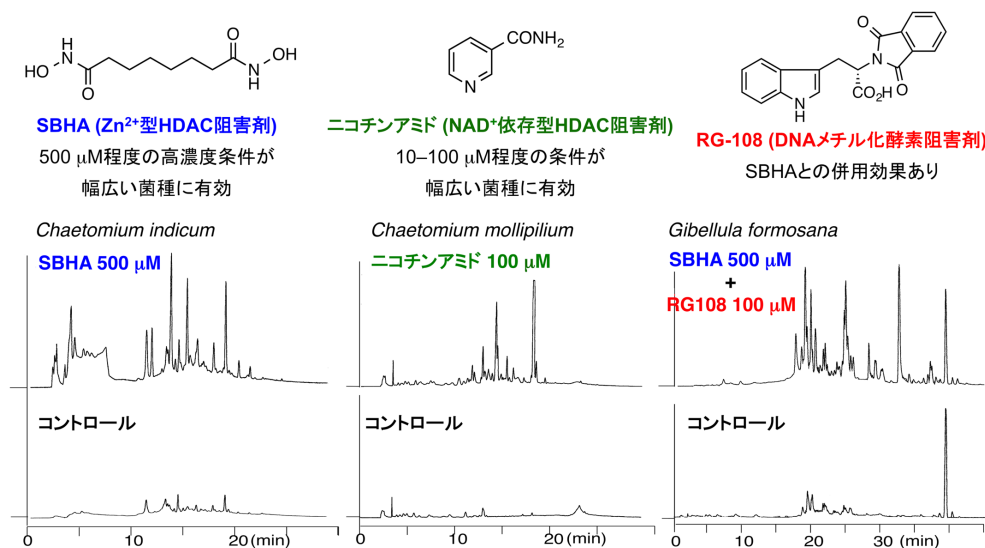


図2 本研究で見いだした二次代謝活性化能を有するエピジェネティック酵素阻害剤 (HPLC 検出波長 215 nm)

エピジェネティック制御に関わる酵素は糸状菌内で高度に保存されていること、また、ゲノム情報の有無に関わらず培養可能なすべての糸状菌に適応可能であることから、糸状菌に潜在する多様な新規二次代謝物の創出を可能にする、汎用性の高い実用的な方法になりうる。しかし、本法を利用した本格的な天然物探索は行われていなかった。そこで、筆者らは、二次代謝活性化に最適な酵素阻害剤の探索や対象とする糸状菌の検討を行い天然物探索に実用的な方法を確立し、多様な新規天然物の獲得を目指した。

まず、先行研究を参考に転写不活性化に寄与するエピジェネティック酵素である HDAC および DNA メチル化酵素の阻害剤について検討した。市販されているもしくは容易に調整できる阻害剤について、糸状菌の二次代謝活性化への影響を詳細に検討した。HDAC には加水分解の様式に関して Zn²⁺ 型とサーチュイン (sirtuin) としても知られる NAD⁺ 依存型がある。NAD⁺ 依存型の HDAC はテロメア近傍のサイレンシングに関わっていることが知られており、NAD⁺ 型 HDAC 阻害剤も休眠型二次代謝物の生産を誘導できると期待して選択した。数種の菌をモデルに種々の酵素阻害剤が糸状菌二次代謝に与える影響を評価した結果、Zn²⁺ 型 HDAC 阻害剤 SBHA (suberic bishydroxamic acid) と NAD⁺ 依存型 HDAC 阻害剤ニコチンアミドに休眠型二次代謝物の生産を誘導する効果があることを見いだした。それぞれについて使用条件を検討したところ、SBHA は 500 μM 以上の高濃度で、ニコチンアミドは 10–100 μM 程度の濃度で幅広い糸状菌に効果を示すことを見だし、両阻害剤を用いる汎用性の高い天然物探索法を確立した (図2)。なお、本研究では積極的には用いていないが DNA メチル化酵素阻害剤と HDAC 阻害剤には併用効果があることも見いだしている。続いて、さまざまな糸状菌の休眠型二次代

謝物の探索を開始した。ケミカルエピジェネティクスによる二次代謝活性化法は、生物に潜在する二次代謝能を引き出すものであり、探索資源の生合成遺伝子の“質”がきわめて重要になる。たとえば、寄生菌や共生菌が宿主内という特殊な環境でのみ何らかの二次代謝物を生産するならば、これらは探索資源として最適であると考えられる。そこで、本研究ではまず昆虫寄生菌と植物内生菌に着目した。また、特徴ある構造や薬理活性を示す化合物を生産する *Chaetomium* 属菌もその高い生合成能を期待して選択した。これらの菌を上記の阻害剤条件下で小スケール培養したところ、およそ 2 割程度の菌で二次代謝物の生産に変化が認められ、1 割弱の菌で顕著に休眠型二次代謝物の生産が誘導されるのを確認した。顕著に休眠型二次代謝物の生産が誘導された菌については、培養をスケールアップし、新たに誘導された二次代謝物の単離および化学構造の決定を行った。その結果、新規骨格を有するもの、ユニークな生合成起源を有するもの、薬理活性を示す化合物などを含め、多様性に富んだ新規天然物を単離することができた^{10–12)} (図3)。たとえば、*C. indicum* では、SBHA 添加により、きわめて構造多様性に富む芳香族ポリケタイドの生産が誘導された。ユニークな縮環構造を持つケトフェノール C や分子内環化付加で形成される特徴的な二量体構造を有するケトフェノール D の単離は、本法が複雑な構造の天然物の生産を誘導できることを示す例である (図4)。さらに、*C. indicum* のドラフトゲノムからケトフェノール類の共通前駆体を生合成する非還元型ポリケタイド合成酵素をコードする遺伝子 *pksCH-2* を同定し、その発現解析およびヒストンのアセチル化レベルの解析を行った。その結果、未利用遺伝子周辺のヒストンアセチル化の上昇に伴うエピジェネティック制御を介して、それら遺伝子が活性化され

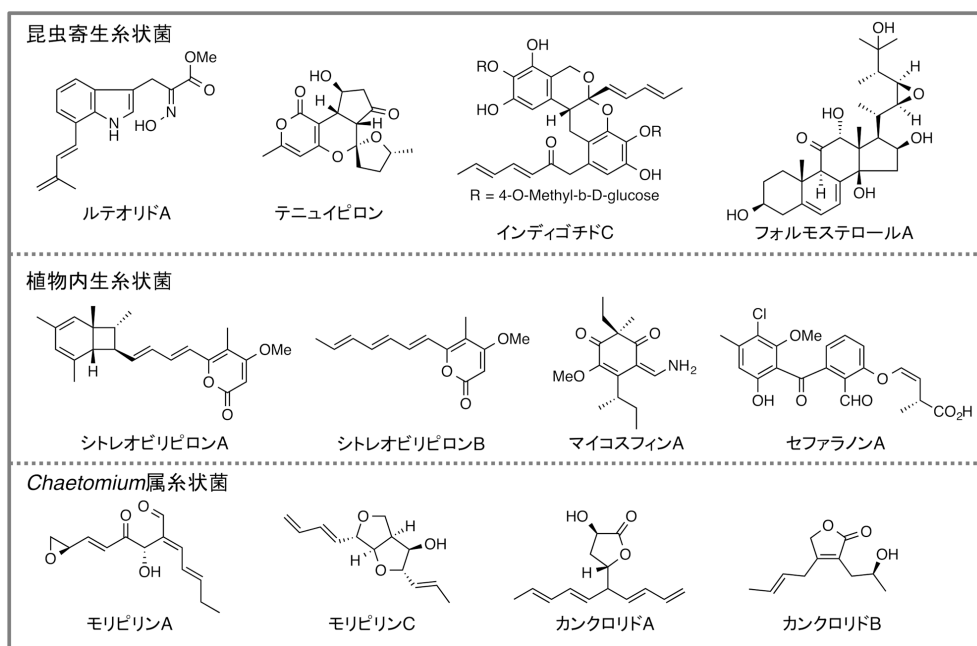


図3 ケミカルエピジェネティクスを用いて獲得した新規天然物の例

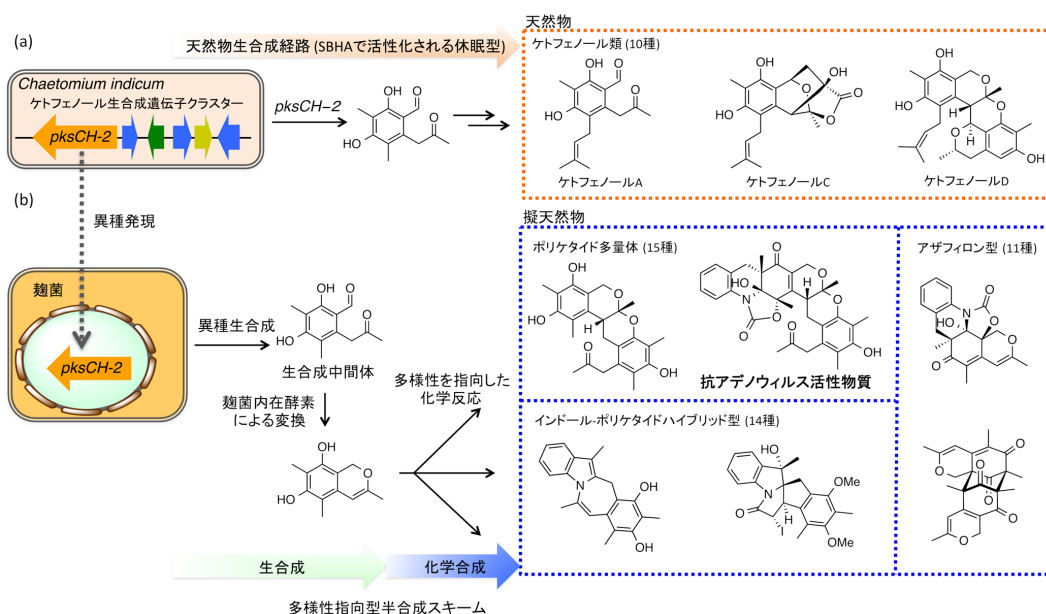


図4 休眠型ポリケタイド遺伝子pksCH-2にコードされる生成中間体を起点する多様性の創出

(a)ケミカルエピジェネティクスにより誘導される多様なケトフェノール類, (b)生成中間体を活用する多様性指向型半合成による多様な非天然型ポリケタイド化合物の創出。

て二次代謝物の生産が誘導されていることが示された¹³⁾。本研究により、ケミカルエピジェネティクスが多様な新規天然物を獲得するのに有効であること、休眠遺伝子が新しい医薬資源として有望であることを実証した。なお、我々が確立した条件は、他の多くの天然物探索研究グループによって利用されている。

5. 休眠型生成遺伝子を活用する医薬資源の開拓

休眠遺伝子をもととの宿主内で活性化させることで医薬資源として有望な新規天然物の獲得を効率よく行うことができることを概説した。天然物の化学構造は、多段階の酵素反応過程を経て作られるため、潜在的にタンパク質との親和性が高く、そのため新薬開発における魅力的な

資源であり続ける。最近、天然物の化学構造を部分的にとどめたものや天然物を想起させる化合物など、いわゆる擬天然物が医薬資源として注目されるようになり、それらの多様性を効率よく拡大させる方法が盛んに研究されている¹⁴⁾。筆者らは、こうした時流に乗り、ケミカルエビジェネティクスで発見した休眠遺伝子を利用した多様な擬天然物の創出方法を模索した。上述のように、*C. indicum*では、SBHAを作用させるとケトフェノール類の生産が誘導される。これらの化学構造の多様性は、休眠型ポリケタイド遺伝子*pksCH-2*にコードされる生合成中間体を起点に広がっている。多様な天然物の生合成の起点となる化学構造は、潜在的に優れた分子展開力を有している可能性がある。すなわち、生合成中間体の多能性を人為的に活用することで効率よく多様な擬天然物ができる。そこで筆者らは、ケトフェノール類の生合成中間体を合成する遺伝子を麹菌(*Aspergillus oryzae*)で異種発現させる方法と単離した中間体を化学変換する方法を組み合わせた半合成的なアプローチにより40種以上の多様性に富む非天然型ポリケタイド化合物の創生に成功した(図4)。それら化合物から、現在有効な治療薬がないアデノウイルスに対する抗ウイルス作用を示す化合物が見いだされた。このことは、本法が新しいケミカルスペースの開拓に有効であることを強く示している¹⁵⁾。休眠型生合成経路は糸状菌に数多く存在し、その中にはさらに多くの多能性中間体が潜んでいる。麹菌異種発現システムを用いれば、これら休眠型生合成経路内の多能性中間体にアクセス可能である。それらに対して筆者らが提案する多様性指向型半合成を適応すれば、未踏のケミカルスペースを占有する新たな医薬資源を開拓できる。

6. おわりに

最近、天然物は創薬の主役の座から遠のいている。しかし、天然物の有する3次元的な構造多様性や分子サイズの多様性は、さまざまなタイプの創薬シーズの探索源としてまだまだ魅力的である。本稿では、最近の生命科学分野において目覚ましい発展を遂げているエビジェネティック制御を天然物化学に取り入れることで、新しい医薬資源を開拓する方法を解説した。他にも、糸状菌と放線菌の共培養など、もともとの宿主内で休眠型二次代謝物の生産を誘導する試みが行われている。しかしながら、こうした方法でアクセスできる休眠型二次代謝物はまだほんの一部に限られている。いまだ数多く残された休眠型二次代謝物をいかにして取得しそれらを薬理活性評価にまわすかが天然物創薬を活性化する一つの鍵となる。エビジェネティクスは転写制御機構であるが、たとえば翻訳制御など、生命科学分野で明らかにされるさまざまな制御機構を天然物化学に取り入れることが新しい方法の開発、そして新たな休眠型二

次代謝物の獲得への近道かもしれない。一方で、モデル微生物内で生合成遺伝子クラスターを再構成することで、標的クラスターにコードされる二次代謝物を異種生産する方法も発展している。未知の生合成遺伝子クラスターの再構成には解決しなければならない課題も多いものの、休眠型二次代謝物の獲得の強力な方法になりうる可能性がある。現在、筆者らも、麹菌異種生産系を用いた休眠型新規天然物の探索研究を势力的に展開している。従来の生物資源に依存する天然物探索に加え、未利用遺伝子資源を利用する天然物探索が発展することで、新しい創薬研究を立ち上げるような魅力的でインパクトの強い天然物の発見につながると信じている。そのような化合物を我々の手で発見し、天然物創薬の活性化に貢献したいと強く思っている。

文 献

- 1) Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jpnas, M., Lazarides, L., Dteadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., & Lewis, K. (2015) *Nature*, **517**, 455–459.
- 2) Bok, J.W. & Keller, N.P. (2004) *Eukaryot. Cell*, **3**, 527–535.
- 3) Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., & Keller, N.P. (2007) *Eukaryot. Cell*, **6**, 1656–1664.
- 4) Bok, J.W., Chiang, Y.-M., Szweczyk, E., Dominguez, Y.R., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B.R., Wang, C.C.C., & Keller, N.P. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 462–464.
- 5) Wu, G., Zhou, H., Zhang, P., Wang, X., Li, W., Zhang, W., Liu, X., Liu, H.-W., Keller, N.P., An, Z., & Yin, W.-B. (2016) *Org. Lett.*, **18**, 1832–1835.
- 6) Mao, X.-M., Xu, W., Li, D., Yin, W.-B., Chooi, Y.-H., Li, Y.-Q., Tang, Y., & Hu, Y. (2015) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 7592–7596.
- 7) Henke, M.T., Soukup, A.A., Goering, A.W., McClure, R.A., Thomson, R.J., Keller, N.P., & Kelleher, N.L. (2016) *ACS Chem. Biol.*, **11**, 2117–2123.
- 8) Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Joyner, P.M., & Cichewicz, R.H. (2009) *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 435–438.
- 9) Fisch, K.M., Gillaspay, A.F., Gipson, M., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Jackson, L., Najar, F.Z., Wägele, H., & Cichewicz, R.H. (2009) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1199–1213.
- 10) 浅井慎吾, 大島吉輝 (2013) 化学と生物, **51**, 13–21.
- 11) Asai, T., Yamamoto, T., & Oshima, Y. (2012) *Org. Lett.*, **14**, 2006–2009.
- 12) Asai, T., Morita, S., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Sakurai, H., Ozeki, T., & Oshima, Y. (2012) *Org. Lett.*, **14**, 5456–5459.
- 13) Asai, T., Yamamoto, T., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Fujii, I., Gomi, K., & Oshima, Y. (2013) *Org. Lett.*, **15**, 3346–3349.
- 14) Balthaser, B.R., Maloney, M.C., Beeler, A.B., Porco, J.A. Jr., & Snyder, J.K. (2011) *Nat. Chem.*, **3**, 969–973.
- 15) Asai, T., Tsukada, K., Ise, S., Shirata, N., Hashimoto, M., Fujii, I., Gomi, K., Nakagawara, K., Kodama, E.N., & Oshima, Y. (2015) *Nat. Chem.*, **7**, 737–743.

著者寸描

●浅井 禎吾（あさい ていご）

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻准教授。博士（理学）。

■略歴 1981年愛知県に生る。2005年東京工業大学理学部卒業。07年東京工業大学大学院理工学研究科物質科学専攻修士課程修了。09年7月東北大学大学院薬学研究科助手。11年4月同助教。16年3月より現職。

■研究テーマと抱負 ポストゲノム型天然物探索。微生物のゲノムに書き込まれた設計図をもとに、抗生物質や抗がん剤の開発に役立つ独創的な天然物を創り出したい。

■ウェブサイト http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/lab_asai.html

■趣味 スポーツ全般（するとみる、する方が好き）。

●大島 吉輝（おおしま よしてる）

東北大学大学院薬学研究科教授。薬学博士。

■略歴 1952年新潟県に生る。75年東北大学薬学部卒業。77年東北大学大学院薬学研究科博士課程前期課程修了。77年東北大学助手。82～84年イリノイ大学に留学。92年青森大学工学部助教授。96年より現職。

■研究テーマと抱負 多様な構造をもつ有用天然物の創出。低分子医薬品開発に役立つ天然物を新たな切り口で見つけない。

■ウェブサイト <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/lab/index.html>

■趣味 スポーツ観戦。