

遺伝子組換え生物基礎教育機器を用いた生物活性物質の探索

岡田 正弘*

Screening of Biologically Active Compounds Using Fundamental Teaching Equipment for Genetically Modified Organisms

Masahiro OKADA*

1. はじめに

神奈川大学は 2023 年度に化学生命学部が設立される。この新設される化学生命学部は、現在の工学部物質生命化学科を基盤に、理学部生物科学科や化学教室や生物教室、さらに新しく就任される先生方が融合して、化学と生物に関してこれまで以上に幅広く学べる学部である。これまで筆者は工学部物質生命化学科に所属し、天然物化学、もしくは生物有機化学と呼ばれる研究分野において、生命現象に関連する化学（細目で言うと複合領域の生体分子科学、生物分子化学になる）に関する教育、研究を行ってきた。そして、工学部物質生命化学科における生命化学系の研究教育を充実させ、さらに将来の化学生命学部において研究教育の基盤へと展開するために、筆者が中心となって、2019 年度に遺伝子組換え生物基礎教育機器を申請、購入した。今回はそれらの遺伝子組換え生物基礎教育機器を使用して行った、教育、研究の一例として、遺伝子組換え生物基礎教育機器を用いた生物活性物質の探索について現在までの進捗状況について報告する。なお、以下に遺伝子組換え生物基礎教育機器として購入した機器を示す（表 1）。また、最後に付録として写真を載せた。

表 1 遺伝子組換え生物基礎教育機器一覧

品名・型番
バイオハザード対策用キャビネット・MHE-S1301A2-PJ
バイオシェーカー・BR-53FP
バイオシェーカー・BR-43FH・MR
小型嫌気チャンバー・バクトロン EZ
細胞融合装置・ECFG21
CO ₂ インキュベーター・MCO-170AICUVH

2. 天然物化学

天然物化学とはその名前の通り、天然に存在する化学物質を対象とする学問分野であり、その対象となる化学物質、いわゆる天然物

は多くの場合は低分子有機化合物である。天然物化学には 2 つの根源的な命題があると筆者は考えている。一つは原因物質の解明であり、様々な自然現象や生命現象を誘導する天然物を決定するというものである。もう一つは有用物質の発見であり、例えば特定の病気を治す薬のような、筆者らにとって有用となる天然物を探索するというものである。こうした天然物が一度解明されれば、それらを化学合成により供給したり、どうやって生合成されるのかを研究したり、どのようなメカニズムで作用しているのかを解明するなどの、次の段階の基礎研究や、薬の開発などの応用研究へと発展していくことができる。こうした天然物化学研究の大きな魅力の一つが、わかりやすいところであると筆者は考えており、直感的に面白い研究テーマが多いと感じている。それもあってか、特に日本では古くから多くの天然物化学研究が行われ、日本のお家芸と言っても過言ではない研究分野となっている。例えば、下村脩博士はオワンクラゲが光る原因物質は何かという、単純明快に興味をそそられるテーマに挑み、その原因物質の一つとして緑色の蛍光を発するタンパク質、GFP (green fluorescent protein) を 1962 年に発見した [1]。その後、GFP を人工的に生体内で作らせることで、自在に生体組織を光らせることに成功した Chalfie 博士や、緑色だけでなく様々な色を発するように改変した蛍光タンパク質を開発した Tsien 博士らと共に、2008 年にノーベル化学賞を受賞している。また、大村智博士は寄生性線虫に対する駆虫作用を示す有用物質としてバクテリアが生産する Avermectin 類を 1979 年に発見した [2]。その後、Avermectin 類をベースに感染症治療薬である Ivermectin を開発した Campbell 博士や、マラリア治療薬である Artemisinin を発見した屠呦呦氏と共に、2015 年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。

こうした天然物探索の一連の手法は概して以下のようである（図 1 左）。まず、リソースとなる生体試料などを採集、栽培もしくは培養する。例えば、大村智博士の場合はゴルフ場の土に生息していた放線菌を採集し、その培養液から Avermectin 類を発見している。次に、材料の抽出物から目的に応じた指標、例えば、蛍光を発するであったり、駆虫作用を示すなどを指標に、有効成分を分離、精製していく。最終的に得られた純品に対して、質量分析装置や NMR (核磁気共鳴) 装置などを用いた各種分析、解析を行い、化学構造を決定するというものである。

*教授 物質生命化学科

Professor, Dept. of Material and Life Chemistry

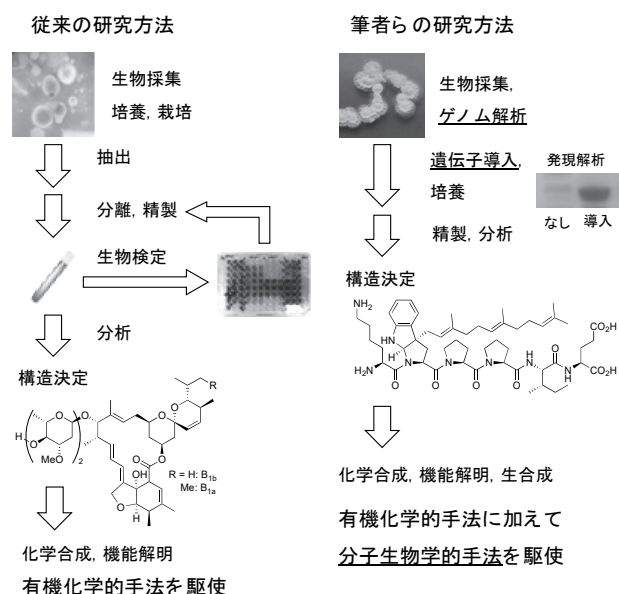


図 1. 従来の研究手法と筆者らの研究手法の比較

その後は、例えば薬の開発の場合では得られたリード化合物に対して、主として化学合成による大量供給や改良が検討される。このように天然物化学研究において行われる一連の作業は主に有機化学的手法によるものであり、分析機器の発達に伴い、様々な原因物質や有用物質が発見されてきた。しかし、下村脩博士や、大村智博士や、屠呦呦氏の発見が 1960~1970 年代であったことからわかるように、こうした研究は進めば進むほど、新規天然物を発見する可能性は減少していき、現在では、よほどの希少なリソースや新規性の高い指標を用いなければ、通常の個体や培養液からは、既知の天然物、もしくは新規物質であったとしても既知の天然物の類縁体が見つかる場合がほとんどである。

一方で、分子生物学の発展によりゲノム解析技術は格段の進歩を遂げ、今やほぼ全ての生物の全ゲノム配列が解析できる時代となった。また、ゲノムに刻まれた遺伝子の発現量も網羅的に測定できるようになり、さらに、一つ一つの遺伝子がどのような働きをするのかも、完全ではないものの、既知の遺伝子と比較することである程度わかる様になりつつある。そうした近年の遺伝子解析の結果から、あらかた採り尽くされた感があった天然物に興味深いことが判明した。それは、微生物のゲノム解析の結果、何らかの天然物を生合成すると予想される遺伝子は当初想定していたよりもかなり多く、また、通常の培養条件下においてはそれらの仮想天然物合成遺伝子(群)はほとんど発現していないということである。すなわち、これまで筆者らが発見してきた天然物は実は全体のごく一部であり、何らかの方法でそれら眠っている遺伝子(群)を目覚めさせることができれば、新規天然物を発見する可能性はまだまだ残されているということになる。

3. 分子生物学的手法を取り入れた生物活性物質の探索

筆者らはこれまで、興味深い生命現象を誘導する天然物を探索したり、新規性に高い複雑な化学構造を有する天然物を探索してきた。先に述べたように、容易に発見できるものは既に報告されているた

め、一筋縄ではいかないものをあえて探索しており、従来の伝統的なやり方ではいずれも解明困難なものばかりである。そこで筆者らは従来の方法に加えて遺伝子情報を取り入れた探索を行っている。それらについて、遺伝子組換え生物基礎教育機器がどの様に使用されているのかを説明しながら、2つの例を挙げて紹介する。

まずは、納豆菌や枯草菌(枯草菌と納豆菌は同一と言っても良いくらい近い種である)由来の ComX フェロモンを例に挙げて説明する。納豆は、特に日本人にとっては大変なじみ深い発酵食品で、健康食品としても人気があり、また、古くは香豉(こうし)の名前で薬としても用いられていた。納豆は、大豆を発酵させて作られるが、その際に用いられるのが納豆菌である。納豆の大きな特徴がそのネバネバにあり、納豆菌はポリガンマグルタミン酸やポリ多糖を主成分とするバイオフィルムを形成し、これらが納豆独特のネバネバの原因物質となる。このポリガンマグルタミン酸の生産を制御するスイッチの様な役割を果たす天然物が ComX フェロモンと命名したペプチドである [3, 4]。これまでの研究から、ComX フェロモンを納豆菌体内で生合成するために必要な遺伝子群は解明されていたものの、実際に分泌されるペプチドは解明されておらず、間違ったペプチドが ComX フェロモンとされていたり、本当にその様な物質が分泌されているのか疑われたりもした。そこで、筆者らは、この納豆菌のネバネバ誘導物質である、ComX フェロモンの構造決定を開始した。従来のやり方に則れば、納豆菌を培養してその抽出液を納豆菌に加えてみて、実際にネバネバを誘導する有効成分を分離、精製していくのであるが、そのやり方は全く通用しない。なぜなら、まず、納豆菌や枯草菌は ComX フェロモンをほとんど分泌していないからである。後で分かったことではあるが、1 mg の ComX フェロモンを得ようとすれば、納豆菌の培養液が 1 t 以上必要となる。なお、ComX フェロモンは 1 nM 程度で活性を示す。分子量が 1000 程度であるので、約 1 mg/t となり、これで十分というわけである。さらに、ComX フェロモンは不安定であるため、1 t 以上培養したとしても満足に ComX フェロモンが精製できるかどうかは疑わしい。考えてみれば当たり前のことだが、スイッチとして機能するためには適度な不安定性が必要で、いつまでも安定に存在する、すなわち、スイッチがオンのままでは都合が悪い。さらに付け加えれば、納豆菌の培養液は当然ながらネバネバしており、物理的にも操作が大変である。

そこで筆者らは遺伝子組換え生物を用いて ComX フェロモンの構造決定を試みた(図 1 右)。具体的には、培養が容易な大腸菌に対して、ComX フェロモンの生合成遺伝子群を含んだプラスミドを導入した。この遺伝子組換え大腸菌に ComX フェロモンを大量に人為的に作らせた。この遺伝子組換え大腸菌を扱う際は、遺伝子組換え生物基礎教育機器として購入したバイオハザード対策用キャビネット内で作業を行い、遺伝子組換え大腸菌の拡散を防ぎ、また、外部からの雑菌などの混入を防いでいる。また、遺伝子組換え大腸菌を培養する場合は遺伝子組換え生物基礎教育機器として購入したバイオシェーカーを用いて行った。それぞれ、低温もしくは室温の場合はバイオシェーカー BR-53FP を、室温もしくは高温の場合はバイオシェーカー BR-43FH・MR を用いて培養した。詳細は省略するが、この様にして ComX フェロモンの生合成遺伝子群を組み込んだ大腸菌から ComX フェロモンを精製した結果、10 L 程度の培養液から得られた ComX フェロモンを用いてその構造を決定することができた

(図2)。実際に、ComX フェロモンは 1 nM で活性を示し、100 nM の濃度で ComX フェロモンを加えて納豆菌を培養した場合にはネバネバ物質であるポリガンマグルタミン酸の生産が 2 倍以上になることが明らかとなった。なお、この活性試験を行う場合は、遺伝子組換え生物基礎教育機器として購入した CO₂ インキュベーターを用いて CO₂ を含む自然界の生育条件に近い条件で行うことで、再現性の高い結果を得ることができた。もし ComX フェロモンを加えて納豆を作れば従来よりもネバネバする納豆ができることになり、逆に ComX フェロモンを取り除いた場合は、全くネバネバしなくなる。

さらに、現在進行中の研究ではあるものの、ComX フェロモンの生合成遺伝子群とほぼ同じ遺伝子群が、他の種類の細菌にも存在することがほぼ確実であることが筆者らの調査で明らかとなった。それらの細菌の中には空気を極端に嫌い、大気レベルの濃度の酸素に暴露することによって死滅してしまう偏性嫌気性菌が含まれるため、遺伝子組換え生物基礎教育機器として購入した小型嫌気チャンバーを用いて培養して、実際に ComX フェロモン様の物質が分泌されているかを現在分析しているところである。さらに、ComX フェロモン様の物質は、おそらく納豆菌同様に何らかのスイッチになっているはずなので、それが何なのか、物質の構造とともに明らかにできれば卓越した成果になることが期待できる。具体的には、例えば、偏性嫌気性菌で構成される腸内細菌叢に ComX フェロモン様の物質を投与してスイッチを入れた場合、腸内細菌叢はどうなるか、それによりヒトはどのような影響を受けるのか、といったことが明らかになる可能性があり、今後大きな進展が望める研究課題となっている。

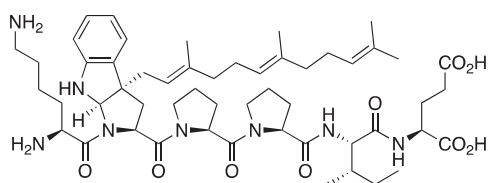


図2. 納豆菌由来の ComX フェロモンの化学構造。

もう一つの例が細胞融合株由来の新規二次代謝産物の探索である。細胞融合とは文字通り 2 つ (以上) の細胞同士が融合して 1 つの細胞となることであり、自然界では生殖細胞などに見られる現象である。この細胞融合を人為的に引き起こすこともでき、その方法は主に二つある。一つは適切な酵素処理によって細胞壁などを取り除いた細胞膜のみで覆われたプロトプラストと呼ばれる球状の細胞か、もしくは、もともと細胞膜のみで構成されている動物細胞などに対して、ポリエチレングリコール (PEG) を処理することで細胞膜を緩めて細胞融合を誘導する PEG 方と呼ばれる方法である。もう一つは電気パルス法で、高圧の電気パルスを細胞に与えることで一時的に細胞膜を破壊し細胞融合を誘導する方法である。PEG 法はプロトプラストの作成において詳細な条件検討が必要なことや、PEG 処理にある程度の技術が必要とされ、また、細胞誘導率もそれほど高くない。それに対して、電気パルス法はプロトプラストを必要とせず、専用の装置を必要とするものの、それほど厳密な条件設定は必要なく、誘導効率も通常では PEG 法の十倍以上の高効率である。この細胞融合において興味深い報告があった。それはカビ (糸状菌) 同士を PEG 法を用いて細胞融合させた融合株から、両親株から生産

しない新規二次代謝産物が得られたというものである [5, 6]。すなわち、細胞融合により眠っていた二次代謝産物合成遺伝子 (群) が目覚めたことで新規二次代謝産物が得られたと考えられた。しかし、細菌を用いた細胞融合株からの新規二次代謝産物の探索や、電気パルス法を用いた細胞融合株からの新規二次代謝産物の探索については報告例がなかった。そこで、筆者らは、遺伝子組換え生物基礎教育機器として細胞融合装置を購入し、抗寄生虫活性を有する Avermectin 類を生産する細菌である放線菌と、放線菌の近縁に分類され、抗生物質である Aurachin 類を生産する細菌であるロドコッカス属細菌を用いて、細胞融合装置を使用した電気パルス法を用いた細胞融合を行い、得られた異種細胞融合株から両親株が生産しない二次代謝産物の探索を行うことにした (図3)。

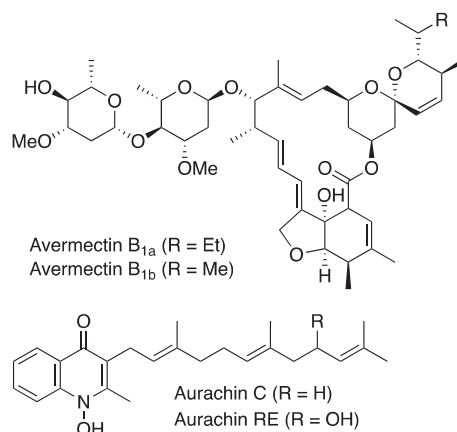


図3. Avermectin 類と Aurachin 類の化学構造。

結果のみを簡単に述べるが、まず、両親株の培養液を混合した懸濁液を細胞融合装置につなげて、初期のデフォルト電気パルス条件で細胞融合を誘導した。その後、放線菌が生育しない栄養飢餓状態、かつ、ロドコッカス属細菌が死滅するスペクチノマイシンを加えた寒天培地に、細胞誘導処理後の培養液を塗布して培養したところ、両親株の性質を併せ持つ、スペクチノマイシン含有の貧栄養培地で生育可能な、異種細胞融合株 8 種類が得られた。さらに、両親株の場合では Avermectin 類や Aurachin 類などの二次代謝産物を生産しない培養条件で、得られた融合株をそれぞれ培養したところ、両親株では生産することのない様々な二次代謝産物を、全ての融合株が顕著に生産することが明らかとなった (図4)。

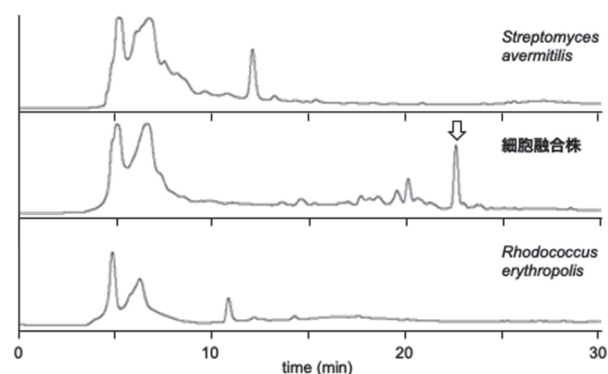


図4. 両親株と細胞融合株の二次代謝産物のプロファイル。

図中の矢印のシグナルに相当する天然物を精製した。

それぞれの融合株における二次代謝産物のプロファイルは異なっていたため、その中の1株を選択して、その株の中で最も顕著な代謝産物の単離、構造決定を行った結果、Aurachin REのN位のOHがHに置換されたAurachin還元体であることが明らかとなった(図5、未発表)。このAurachin還元体の生産量については、まず、親株であるロドコッカス属細菌は貧栄養状態でのみAurachin REを生産するが、細胞融合株では通常の培養条件でAurachin還元体を生産する。また、その生産量も親株でのAurachin RE生産量と比較して、同等もしくはそれ以上の生産量であった。以上の結果から、細胞融合装置を使用した電気パルス法による細菌の細胞融合の有効性、および、融合株からの新規二次代謝産物の有用性を示すことができた。

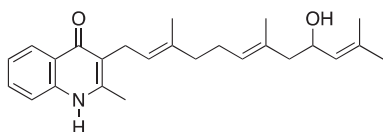


図5. 融合株から単離したAurachin RE還元体の化学構造。

4. まとめ

以上のように、購入した遺伝子組換え生物基礎教育機器を使用して実施した教育、研究の最新の結果、成果について簡単ではあるが紹介した。ご存知のように、2020年4月7日に新型コロナウイルス感染症緊急事態宣言が出され、それ以降大学が立ち入り禁止となった。現在ではこれまで通り立ち入ることができるようにはなっているが、やはり、完全に以前のように戻ったと言えないと筆者は感じている。神奈川大学はオンラインで講義を行うなど、コロナ禍の影響を最小限にとどめるように努力はしたのだが、やはり実験のような実地が必須な内容については大幅な遅れ、損失が生じてしまったし、また、今になって明らかになったことであるが、これまで現場で引き継がれていった知識や経験の積み重ねが絶たれたために、想定以上に苦戦を強いられている。遺伝子組換え生物基礎教育機器を使用した教育研究においても、進捗状況については遅れていると言わざるを得ない。特に小型嫌気チャンバーを利用した研究に関しては設置に時間がかかり、使用可能となった矢先に立ち入り禁止となってしまった。それでも、研究室のスタッフや学生たちの努力もあり、成果を挙げることもできた。来年度からは新学部が設置されることもあり、これまでの遅れを取り戻すべく、より一層教育、研究に推進していきたいと考えている。

5. 参考文献

- [1] O. Shimomura, et al. J. Cell. Comp. Physiol. 1962, 59: 223-239.
- [2] R. W. Burg, et al. Antimicrob. Agents Chemother. 1979, 15: 361-367.
- [3] M. Okada and S. Sumimoto. ACS Symp. Ser. 2020, 1374: 201-217.
- [4] K. Hirooka, S. Shioda, and M. Okada. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2020, 84, 347-357.
- [5] T. Nakada, et al. Tetrahedron Lett. 1999, 40: 6831-6834.
- [6] T. Nakada and S. Yamamura. Tetrahedron 2000, 56: 2595-2602.

6. 付録

購入した遺伝子組換え生物基礎教育機器の画像を一覧で示す。



バイオハザード対策用キャビネット・MHE-S1301A2-PJ (左) とCO₂インキュベーター・MCO-170AICUVH (右)



バイオシェーカー・BR-43FH・MR (左) とバイオシェーカー・BR-53FP (右)



小型嫌気チャンバー・パクトロンEZ



細胞融合装置・ECFG21