

腸内細菌由来ポリケチド合成酵素遺伝子の探索

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

修士課程 2 年 先端生命科学 (BI)

山本碩満

1. はじめに

本実験の申請書執筆時点で注目していた *Lactobacillus* 属のポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子は類似性の高い別のタンパク質 (hydroxymethylglutaryl-CoA synthase) であることが判明したため、候補から除外した。その後は大腸がん関連因子であるとされているコリバクチンというポリケチドを対象とした実験を実施している。コリバクチンは腸内細菌の一種である一部の腸菌により産生されることが示唆されている。

2. 背景

現在大腸がん (CRC) は、世界で 3 番目に多いがん死亡の原因であり、年間 185 万人以上が発症し、85 万人が死亡しています。日本においても 15 万人以上が罹患しており、5 万人以上が死亡している。また結腸及び直腸の悪性新生物の年間医療費は国民全体で 5827 億円 (2017 年) にも登っている。以上のことから大腸がんの予防には社会的関心が寄せられている。大腸がん罹患すると考えられる要因の中には喫煙、飲酒、肥満、運動不足など生活習慣と深い関連が示されるものが多い。しかし、大腸がんなどの生活習慣が原因となる生活習慣病の予防には個人の認識が重要であり、且つ長期に渡る認識の維持が必要になるため、**長期の生活習慣の改善は困難である**。そこで私は生活習慣を変えることなく大腸がんを予防できる薬の開発を目指したいと考えた。大腸がんの約 70% は加齢や生活習慣、環境因子などの影響で大腸の正常な粘膜細胞に様々な遺伝子異常 (遺伝子変異) が積み重なって発生する散発性大腸がんである。散発性大腸がんの約 2% は炎症性腸疾患から発生することが知られており、そのような症例では腸内細菌の *Bacteroides fragilis* や *Escherichia coli* NC101 株の関与が報告されている。中でも *E. coli* NC101 が産生するコリバクチンという**遺伝毒性物質が大腸がんに関連があることが知られており、コリバクチン合成酵素遺伝子を持つ菌が大腸がん患者の 60~70% で確認されている**。現在までのコリバクチン研究は①産生菌の大量培養、②遺伝子欠損株の活性評価によって行われているが、①はコリバクチンが不安定であるために研究に必要な量を取得できず、②は生合成遺伝子の一部を欠損しているのみであるため、正確な評価ができていないか疑問が残る。そこで本研究ではコリバクチンを *in vitro* で合成し、大腸がんとの関連を特定した後にコリバクチンを標的とした大腸がん予防薬の開発を目指

す。

3. 手法

コリバクチンを用いた実験を行うためには、コリバクチンの精製が必要となるがコリバクチンの構造は不安定であるため、直接菌体から抽出するには大量の菌体が必要となり非常に労力がかかるのが現状です（培養液 360L から取れる抽出物は 9.3g のみ。さらにそこから精製する必要がある）。そのため我々はコリバクチンを生産するために *in vitro* 合成に注目した。*In vitro* 合成とはコリバクチン合成酵素をコリバクチンの合成に必要な基質と反応させることで、試験管内でコリバクチンを合成するという手法になります。おおまかな手順としては、①合成酵素遺伝子のクローニング、②タンパク質の精製、③コリバクチンの *in vitro* 合成、④コリバクチンの機能性評価の 4 段階となる。

4. 結果

先行研究より 10 個のコリバクチン合成酵素に注目し、遺伝子のクローニングを行った。その結果 10 個中 6 個の遺伝子のクローニングに成功した。残りの 4 つに関しては現在条件を変えて試行中である。クローニングが成功した 6 個の遺伝子に関してはタンパク質の過剰発現まで実施した。その結果 4 つにおいてタンパク質の過剰発現は見られたが、精製に問題があったため、試験の条件を検討している。先行研究よりコリバクチン合成酵素の過剰発現に成功している報告が一部あるので、そちらを参考に条件を検討している。今後は修士課程の卒業までにコリバクチン合成酵素の精製まで終え、一部 *in vitro* 合成まで実施したいと考えている。修士卒業後は博士課程に進学する予定であるので、コリバクチンの機能解明を通して阻害剤の開発に着手していきたいと考えている。

5. 謝辞

森泰吉郎記念研究振興基金は、データの解析に必要な機器・ソフトウェアの購入費用、必要参考書、リモート環境の整備に使用させていただきました。ご支援に感謝申し上げます。誠にありがとうございました。

6. 参考

<http://www.seikatsusyukanbyo.com/statistics/2019/010055.php>

<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/17/index.html>

https://www.eiken.co.jp/uploads/modern_media/literature/P11-16.pdf

Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *Lancet* **383**, 1490–1502 (2014).

Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–258 (2012).

Billir, L. H. & Schrag, D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review.

- JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **325**, 669–685 (2021).
- Zha, L., Wilson, M. R., Brotherton, C. A. & Balskus, E. P. Characterization of Polyketide Synthase Machinery from the pks Island Facilitates Isolation of a Candidate Precolibactin. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1287–1295 (2016).
- Brotherton, C. A. & Balskus, E. P. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3359–3362 (2013).
- Volpe, M. R. *et al.* In Vitro Characterization of the Colibactin-Activating Peptidase ClbP Enables Development of a Fluorogenic Activity Probe. *ACS Chem. Biol.* **14**, 1097–1101 (2019).
- Xue, M. *et al.* Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science (80-.)*. **365**, (2019).