

ゲノム情報を利用した新規微生物資源の開拓

感染制御科学専攻 創薬科学履修コース 微生物機能科学

DI21002 菊池 雄太

【研究背景】

細菌は天然物探索における微生物資源として古くから利用され、これらから様々な天然物が取得されてきた。しかし、現在 3,000 属以上の細菌属が報告されているにも拘らず、わずか 1 割ほどの細菌属からしか天然物は取得されていない。さらに、細菌由来の天然物は 2 万以上報告されているが、それらの半数以上は *Streptomyces* 属、*Pseudomonas* 属、*Bacillus* 属のいずれかから取得されたものである。このことは、殆どの細菌属は天然物の探索源として未利用であることを示しており、これら未利用微生物資源から天然物を探索することで新たな天然物が取得できると期待される。しかし、全ての細菌属が多様な天然物を生産するとは限らないため、天然物生産能に優れた属を探索することが微生物資源の開拓において重要である。

細菌から得られる有用天然物の多くは細菌の二次代謝産物であり、それらの生産に関与する遺伝子群は二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (sBGC) と呼ばれる。近年、ゲノム解析技術の発展に伴い、細菌が有する sBGC を解析することが可能になった。これにより、未利用微生物資源であった細菌が様々な天然物を生産する能力を有していることが示唆されつつある [1]。上岡らは sBGC の種類や数を菌株間で比較することにより *Gyvuella sunshinyii* YC6258^T が様々な二次代謝産物を生産すると予想し、実際に本細菌より様々な天然物を得ることで予想を実証した [2,3]。以上のことから、ゲノム解析によって天然物生産能に優れた菌株を予測し、これらの菌株から新規天然物を取得することが可能であると考えられる。一方、この手法ではゲノムデータを利用できない菌株の天然物生産能を直接予測することはできないため、全ての細菌株に本手法を適用するためには、それら細菌全てのゲノム配列を決定する必要がある。これは時間や費用の観点から非現実的であるため、この手法に代わる菌株の天然物生産能を予測する手法が求められる。そこで、本研究では、細菌ゲノムを解析し、天然物生産能に優れている細菌属を予測し、これらの中でも天然物探索源として未利用な細菌属から新規天然物の探索を試みた。

【方法及び結果】

1.未利用細菌からの新規微生物資源の開拓

1-1. ゲノム解析に基づく天然物生産能の予測

GenBank より取得した細菌の complete ゲノムに含まれる sBGC を antiSMASH [4] によって解析した。次に、各ゲノムに含まれるポリケチド、非リボソームペプチド及びテルペンの生合成に関与する sBGC (PNT-BGC) の数を集計し、属毎にそれらの平均数を算出し比較した。その結果、PNT-BGC を多数有する細菌の殆どは、天然物の報告が多い放線菌、藍藻及び粘液細菌であった。一方、これらの細菌に匹敵する PNT-BGC を有する有望な未利用微生物資源として *Tumebacillus* 属を見出した (Fig. 1)。

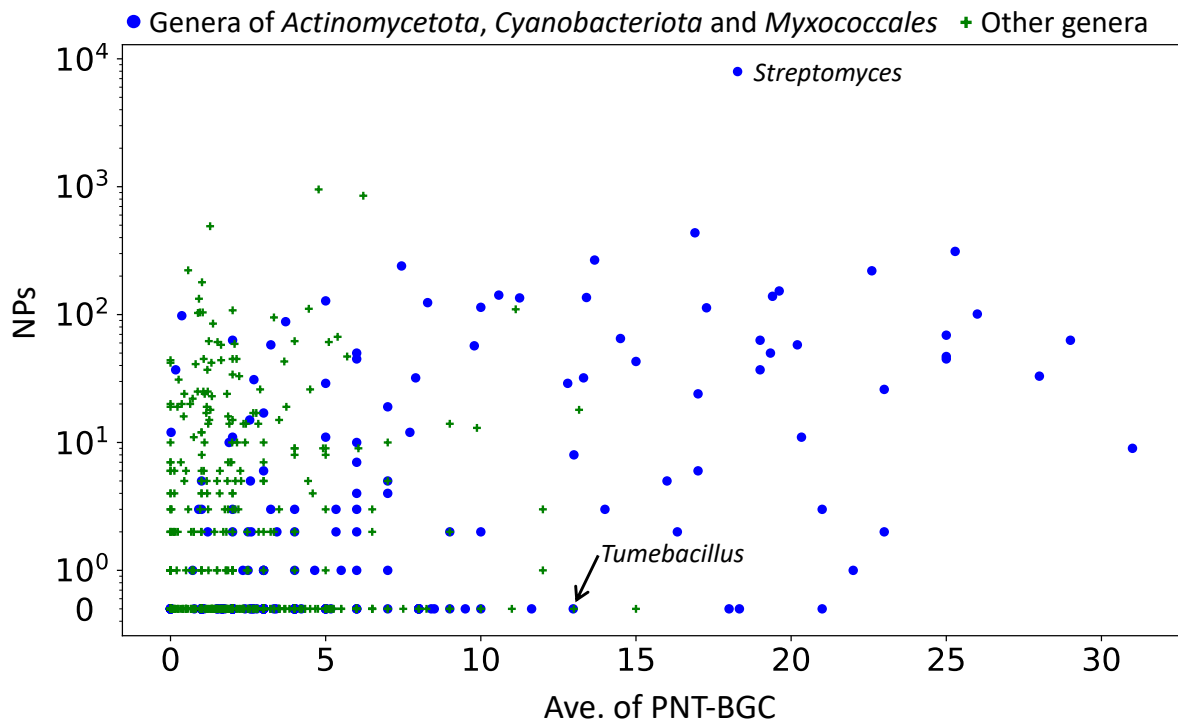


Fig. 1. 細菌各属における報告天然物数と平均 PNT-BGC 数

1-2. *Tumebacillus* 属細菌の代謝産物解析

1-1 にて見出した *Tumebacillus* 属細菌から新規天然物探索を試みた。まず、本属細菌を 8 種類の培地で培養し、作製した培養液の抗菌活性を試験した。その結果、*T. permanentifrigoris* JCM14557^T のスターチ-脱脂小麦胚芽 (SD) 培地培養液は *Bacillus* に対して抗菌活性を示した。また、培養液を LCUV で分析した結果、本菌株は SD 培地やオートミール-綿実粉 (OC) 培地で多数の代謝産物を生産することが分かった。

1-3. *T. permanentifrigoris* JCM14557^T が生産する天然物の取得と構造解析

T. permanentifrigoris JCM14557^T の SD 培地培養液上清について液液抽出及び固液抽出を行い、新規抗 *Bacillus* 物質 tumebacin (Fig. 3) を得た。また、液液抽出の有機層について各種カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、抗真菌物質 4-(2-nitroethyl)phenol (Fig. 3) を得た。次に、同菌株の OD 培地培養液上清について各種カラムクロマトグラフィーで精製を行い、Le-pyrrolopyrazine B (Fig. 3) 及び新規天然物 tumepyrazine (Fig. 3) を得た。

2. 天然物生産能に優れた希少放線菌 (*Actinomycetota* 門細菌) の予測と天然物探索

2-1. ゲノム解析に基づく天然物生産能の予測

RefSeq より取得した *Actinomycetota* 門細菌の complete 及び scaffold ゲノムに含まれる sBGC の数を 1-1 と同様に属毎に集計した。今回は、PNT-BGC にリボソーム翻訳後修飾ペプチドの生合成に関与する sBGC も加えた PNTR-BGC の数を集計した。その結果、PNTR-BGC を多く有する属の殆どは *Pseudonocardiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科及び *Streptosporangiaceae* 科であった。続いて、BiG-SCAPE [5] を用い、科毎に見出された PNTR-BGC を BGC 間の類似性に基づいてクラスタリングした。その結果、それら 3 科はそれぞれ、科内における PNTR-BGC の多様性が高いことが分かった。

2-2. 分子ネットワーク解析を応用した新規天然物の探索

Pseudonocardiaceae 科の希少放線菌は豊富に PNTR-BGC を有し、PNTR-BGC の多様性が高いことが予想された。そこで、本科に属する分離株 8 株をそれぞれ 20 種類の培地で培養し、分子ネットワーク (MN) 解析 [6] により培養液に含まれる代謝産物を網羅的に解析した。その結果、全ての培養液から合計 10,494 化合物が検出された (Fig. 2)。また、種々の MSMS スペクトルライブラリーを参照することで、2,814 化合物を培地成分化合物、既知の代謝産物及びそれらの類縁化合物に、残る 7,680 化合物を未知代謝産物に判別した (Fig. 2)。さらに、同一菌株に固有な未知代謝産物のみで構成される MN (固有 UMN) を複数見出した (Fig. 2)。

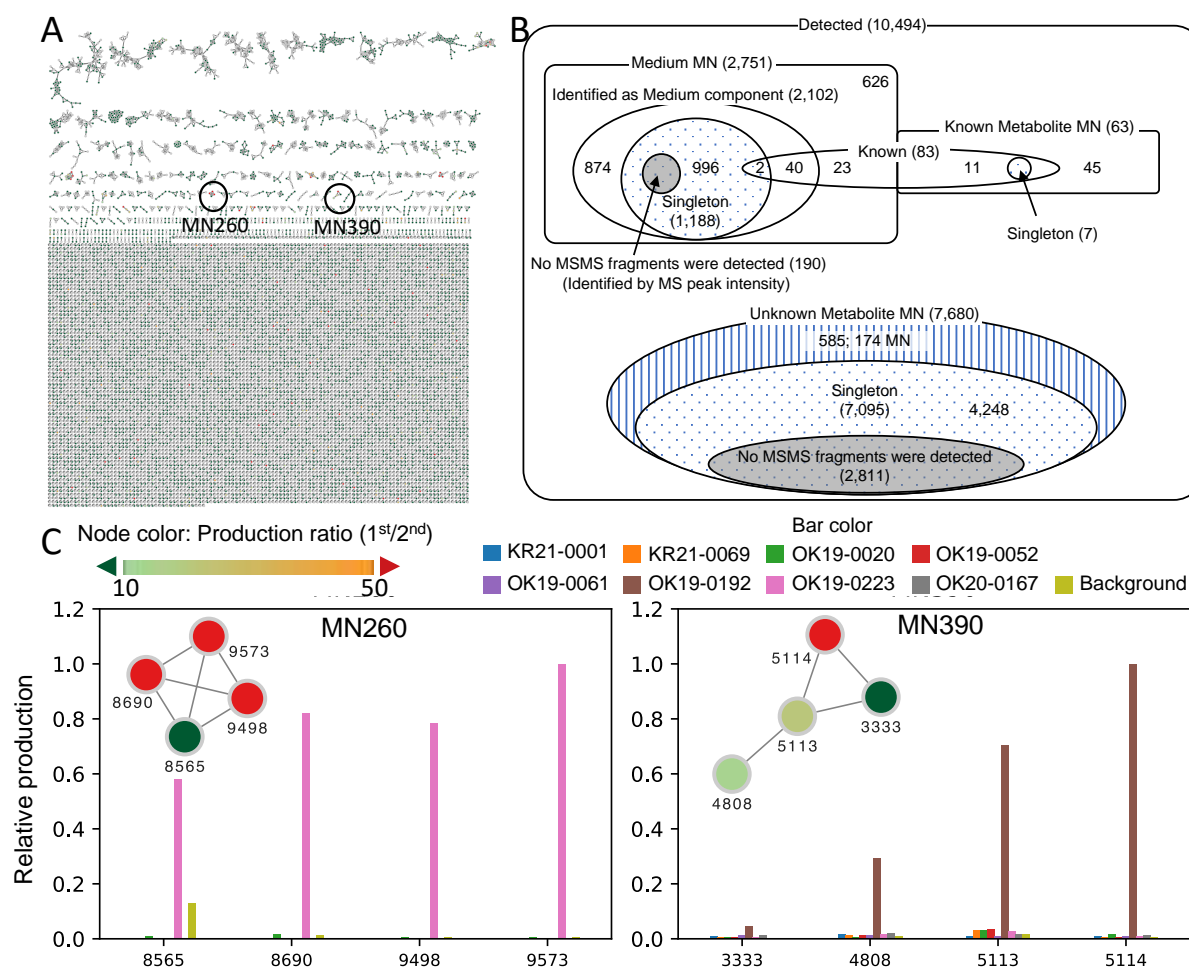


Fig. 2. 分子ネットワーク解析の結果 (A: 分子ネットワークの全容、B: 検出された化合物の分類、C: 単離した天然物が含まれる菌株固有 UMN)

2-3. *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌が生産する天然物の取得と構造解析

新規二次代謝産物を効率的に探索するため、固有 UMN を構成する化合物の単離を試みた。[redacted] のペプトン-食塩培地培養液上清から、各種カラムクロマトグラフィーで精製することにより、MN390 (Fig. 2) を構成する化合物である [redacted] A、G、HD (構造未決定) 及び lentindole (Fig. 3) を得た。また、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の麦芽糖-ゼラチン培地培養液から得た菌体残渣より、溶媒抽出及び各

種カラムクロマトグラフィーで精製することで、MN260 (Fig. 2)を構成する化合物である saccharocarcin A 及び B (Fig. 3) を得た。

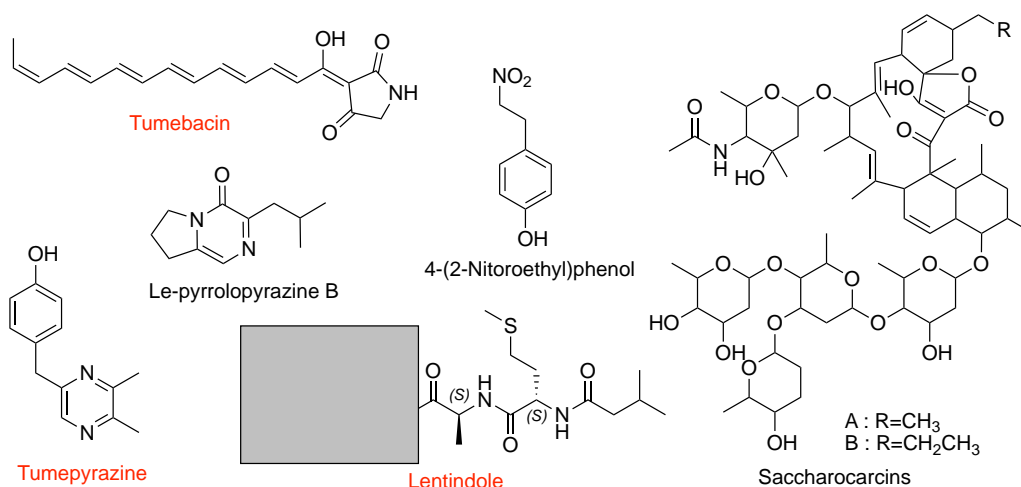


Fig. 3. 本研究で得られた天然物 (赤字は新規化合物)

【総括】

細菌ゲノム中に含まれる PNT-BGC の数を集計し属毎に平均数を算出することで、天然物探索に未利用な *Tumblebacillus* 属が二次代謝産物の生産能に優れると予測した。続いて、本属細菌の *T. permanentifrigoris* JCM 14557^T から天然物を探索し、新規抗 *Bacillus* 物質 tumblebacin と新規ピラジン系天然物 tumeptyrazine を含む 4 つの天然物を得た。次に、*Actinomycetota* 門の PNTR-BGC について同様の解析と評価を行い、さらにそれらの多様性についても評価することで、*Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌が多様な二次代謝産物を多数生産すると予測した。続いて、本科の放線菌 8 株の培養液について MN 解析を応用することで、固有 UMN を複数見出した。また、それら固有 UMN を構成する化合物の取得を試み、XXXXXXXXXXからはXXXXXXXXXX構造を有する初の天然物であるペプチド系化合物 lentindole 及びその類縁体と推定される 3 化合物を、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 からはスピロテトロネート系抗生物質 saccharocarcin A 及び B を得ることができた。以上の結果から、全ての細菌ゲノムを解析せずとも、一部の細菌ゲノムの sBGC 数を解析することで天然物生産能の高い細菌を属や科レベルで選出でき、これらから天然物を探索することにより新規化合物を取得できることが示された。本研究で見出された天然物生産能に優れた分類群について天然物を探索することで更なる新規化合物の取得が期待される。

【参考文献】

1. Pidot SJ., et al., *Int. J. Med. Microbiol.*, (2014), **304**, 14–22.
2. Ueoka R., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, (2018), **57**, 14519–23.
3. Ueoka R., et al., *Nat. Chem.*, (2022), **14**, 1193–201.
4. Medema MH., et al., *Nucleic Acids Res.*, (2011), **39**, W339–46.
5. Navarro-Muñoz JC., et al., *Nat. Chem. Biol.*, (2020), **16**, 60–8.
6. Nothias LF., et al., *Nat. Methods.*, (2020), **17**, 905–8.