

放線菌由来二次代謝産物の物理化学的性状による新規天然物の探索

感染制御科学専攻 創薬科学履修コース 細胞機能制御科学

DI-15002 木村徹

【背景・目的】

天然化合物は、その多種多様な構造と生理活性から創薬資源として重要である。なかでも放線菌が生産する二次代謝産物は医薬品、農薬、研究用試薬などとして利用されているものが多い。近年のゲノム解読などの進展から放線菌は多種多様な未知の代謝産物を生産する能力を有していることが明らかになってきている。

従来から行われている化合物探索方法として生物活性を指標としたスクリーニングがある。この方法ではある特定の活性を指標に培養液抽出物を評価し、活性を示したものを分画し再度活性評価を行うという行程を繰り返すことで目的の活性物質の探索を行う。これは目的の活性物質を見つけ出すという点においては有効である。一方、生物活性に依存することなく新規物質を見出す方法として *physicochemical (PC) screening*¹⁾ がある。PC screening は培養液抽出物に含まれる化合物の物理化学的性状を把握することにより新規性を推定し、化合物を取得後、生物活性を見出す手法である。当研究所は含窒素化合物を検出するドラージェンドルフ反応を指標に新規物質を探索し、生化学試薬として汎用されている *staurosporine*²⁾ などを見いだしてきた。近年ではその発展型として、HPLC や高分解能質量分析装置を用いて培養液抽出物に含まれる低分子化合物の物性から、*trehalgulin*²⁾ および *mangromycin*²⁾ などを発見してきた。

以上のことより PC screening は化合物の物性を指標とするため、多くの化合物が検出でき、高確率・短時間で新規物質を発見できる方法である。この方法を用いて、創薬資源となる新規天然物を探索した。

【方法】

1. PC screening による新規物質の推定：放線菌を数種類の培地で培養し、培養液抽出物を作製した。その培養液抽出物を LC/UV-MS で分析し、化合物の物性情報（分子量、分子式、UV 極大吸収など）を取得した。この情報をもとに Dictionary of Natural Products などのデータベースで検索し、新規と推定された化合物を各種クロマトグラフィーを用いて精製した。各種 NMR および MS により取得した化合物の構造決定を行い、様々な生物活性を評価した。

2. 新規物質の探索源

2-1. 土壌由来希少放線菌

放線菌由来の化合物のうち 75% は *Streptomyces* 属由来であり、残りの 25% が希少放線菌 (*Streptomyces* 属以外の放線菌) 由来であると言われている。希少放線菌のゲノム解析から 20 前後の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを含んでいることが知られ、新規二次代謝産物の発掘に有用であると考えられる。よって、新鮮分離希少放線菌 76 株を用いて新規物質の探索源とした。

2-2. 海洋由来希少放線菌

海洋生物は陸上と異なる過酷な環境条件下で生息していることから、陸棲生物とは異なった進化を遂げ、独自の代謝系を有していると考えられる。したがって、海洋放線菌は新規化合物の探索にとって貴重な資源と考え、釜石研究所分離株 23 株を対象とした。

2-3. 北里微生物資源ライブラリー

北里微生物資源ライブラリーとして、新規化合物および既知化合物を生産する 1,000 株が長期間保存されており、*Streptomyces* 属が高い割合を占めている。その培養液を用いた PC screening により、*S. griseus* OS-3601 株より新規物質である iminimycin A および B¹⁾などが発見されている。このことより、過去に化合物が見出された株は物質生産能が高いと考えられ、新規物質が取得できることが期待される。

【結果】

1. 土壌由来希少放線菌

Sagamilactam (Fig. 1)³⁾: *Actinomadura* sp. K13-0306 株は、MS 値より分子量 569、UV 極大吸収は 270, 285 および 333 nm を示す新規物質と推定される化合物を生産していた。そこで、本菌株を 3.3% soybean meal 培地、10 L で培養し、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、目的物質を 8.4 mg 取得した。各種 NMR を用いて構造解析を行ったところ、34 員環のポリエンマクロラクタムと判明し、sagamilactam と命名した。Sagamilactam は、*Trypanosoma brucei brucei* GUTat 3.1 に対し、 $IC_{50}=0.14 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ で、既存薬である suramin や eflornithine よりも強い活性を示した。

Fig. 1 Sagamilactamの構造

2. 海洋由来希少放線菌

Mumiamicin (Fig. 2)⁴⁾: *Mumia* sp. YSP-2-79 株は、MS 値より分子量 250、UV 極大吸収は 324 nm に示す新規物質と推定される化合物を生産していた。そこで、

本菌株をきな粉培地、10 L で培養し、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、目的物質を 7.8 mg 取得した。各種 NMR を用いて構造解析を行ったところ、脂肪酸にフラン環を持つ新規フラン脂肪酸であり、mumiamicin と命名した。Mumiamicin は、ESR 分析より $\dot{\text{C}}\text{OH}$ および $^1\text{O}_2$ 消去活性を有していた。

Fig. 2 Mumiamicinの構造

Tatemasporine (Fig. 3) : *Actinomycetospira* sp. YM25-058 株は、MS 値より分子量 265、UV 極大吸収は 225, 255, 288, 313, 381, および 401 nm に示す新規物質と推定される化合物を生産していた。そこで、本菌株をきな粉培地、15 L で培養し、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、目的物質を 5.0 mg 取得した。各種 NMR を用いて構造解析を行ったところ、キノリンとインドリジンが結合した新規な骨格であり、tatemasporine と命名した。

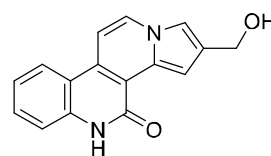


Fig. 3 Tatemasporineの構造

3. 北里微生物資源ライブラリー

Virantmycin B および C (Fig. 6) : *Streptomyces* sp. AM-2504 株は、MS 値より分子量 428、UV 極大吸収は 206, 226, 262, 281 および 307 nm に示す新規物質と推定される化合物を生産していた。そこで、本菌株をファーマメディア培地、60 L で培養し、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、目的物質を 24 mg および 27 mg 取得した。各種 NMR を用いて構造解析を行ったところ、virantmycin²⁾新規類縁体であり、virantmycin B および C と命名した。

Virantmycin B および C は
抗菌活性を示した。

Virantmycin B

Virantmycin C

Fig. 4 Virantmycin B および C の構造図

Pyrizomicin A および B (Fig. 5) : *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株は、MS 値より分子量 364、UV 極大吸収は 220, 241 および 307 nm を示す新規物質と推定される化合物を生産していた。そこで、本菌株を小麦脱脂胚芽培地、15 L で培養し、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、目的物質を 5.9 mg および 1.3 mg 取得した。各種 NMR を用いて構造解析を行ったところ、ピリジン環とチアゾール環をもつ新規物質であった。取得後、生物活性評価を行い、抗菌活性および細胞毒性が見られ、本物質を pyrizomicin A および B と命名した。ピリジン環とチアゾール環が連結する化合物は珍しく、生合成に興味を持たれたことから、生合成研究を行なった。K10-0216 株のドラフトゲノム

Pyrizomicin A

Pyrizomicin B

Fig. 5 Pyrizomicin A および B の構造図

シーケンスを antiSMASH で解析し、pyrizomicin の生合成遺伝子クラスターを推定した。NRPS-PKS ハイブリッド酵素を含む遺伝子クラスター (約 40 kb) が prizomycin の生合成に関わると予想された。Pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの全領域を含むベクターを構築した。さらに、当該遺伝子クラスターに存在する LuxR family 転写制御因子を発現させるベクターを別途構築し、双方のベクターを *Streptomyces lividans* TK24 に導入した。その結果、当該遺伝子クラスターおよび転写制御因子の両方を導入した株でのみ pyrizomicin の生産が確認された。

以上の結果より、pyrizomicin は NRPS-PKS ハイブリッド酵素を含む生合成酵素により脂肪酸をスターターとし、システイン 2 分子、マロニル CoA およびロイシンを基質として合成され、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの発現は LuxR family 転写制御因子によって正に制御されることが示唆された。



ORF	Proposed function
1	Hydrolase
2	Monooxygenase/hydroxylase
3	Monooxygenase/hydroxylase (CrmF)
4	NRPS
5	PKS-NRPS (CrmA, ClnN1)
6	NRPS (CrmB, ClnN2)
7	Dehydrogenase (CrmI, ClnD1)
8	Thioesterase (CrmJ, ClnT)
9	LuxR family transcriptional regulator
10	Amidohydrolase (CrmL, ClnAH)
11	O-methyltransferase
12	TetR family transcriptional regulator
13	ABC family transporter (CrmT2, ClnT2)
14	ABC family transporter (CrmT1, ClnT3)
15	transporter
16	TetR family transcriptional regulator

Fig. 6 Pyrizomicin生合成遺伝子クラスター

【総括】

土壌由来希少放線菌から sagamilactam および pyrizomicin A, B、海洋由来希少放線菌から mumiamicin および tatemasporene、北里微生物資源ライブラリーから virantmycin B, C を発見した。これら物質は、ユニークな骨格を有する化合物が多く、創薬の新たなリード化合物として期待される。

また、筆者らの上記の結果は、新規物質探索における PC screening の有用性を示したと言える。すなわち、virantmycin B および C は dityromycin²⁾生産菌として北里微生物資源ライブラリーに約 40 年間長期保存されていた菌株の培養液から新たに発見されたものであり、PC screening の有用性ととも北里微生物資源ライブラリーが未知化合物の宝庫であることが検証できた。さらに、サイクロペンタデカン骨格の mangromicin 類 9 化合物およびステロイド化合物 KA, KB と同一の生産株 *L. aerocolonigenes* K10-0216 から今回新たにピリジン環とチアゾール環を有する pyrizomicin A および B を発見した。これらはいずれも PC screening によって発見した化合物であり、1 菌株から骨格の異なる 3 種類、計 13 類縁体を発見することができた。

【参考文献】

1) Nakashima, T. *et al.*, *Biochem. Pharm.*, **134**, 42-55 (2017). 2) mura, S. ed., *ōSplendid Gifts from Microorganisms* Fifth edition (2015). 3) Kimura, T. *et al.*, *J. Antibiot.*, **69**, 818-824 (2016). 4) Kimura, T. *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, in press.