

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K14721  
研究課題名(和文)クリプティック遺伝子活性化に関するケミカルバイオロジー

研究課題名(英文)Chemical biology on cryptic genes activation

## 研究代表者

掛谷 秀昭 (Takeya, Hideaki)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：00270596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜シグナル制御物質の探索の過程で、*Streptomyces* sp. HEK616と*Tsukamurella pulmonis* TP-80596の2種類の異なる微生物の複合培養によって生産される新規化合物5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines (5aTHQs)を見出し、単離・構造解析を行った。一方、複合培養抽出物に対して14マス・ピーク差のイオンピーク・クラスタ情報を活用することで、新規化合物streptoaminalsを見出し単離・構造解析を行った。本研究成果は、複合培養法が創薬シーズとしての化合物群の構造多様性の創出に寄与することが示された。

研究成果の概要(英文)：During a high-throughput screening for identifying cell membrane modulators, eight novel 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines (5aTHQs) bearing different side chains have been isolated from a combined-culture of *Streptomyces* sp. HEK616 and *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596. The chemical structures including the absolute configuration were determined by spectroscopic analysis and total synthesis. Moreover, stable isotopic feeding experiments with sodium [1-<sup>13</sup>C]-acetate and [1,2-<sup>13</sup>C]-acetate in the combined-culture revealed that 5aTHQs is biosynthesized via a polyketide pathway. In addition, there novel streptoaminals were identified by an extensive mass spectrometry analysis against the combined-culture broth. These results suggest that the microbial combined-culture has a big potential for a range of chemical scaffolds.

研究分野：ケミカルバイオロジー・天然物化学

キーワード：ケミカルバイオロジー 天然物化学 複合培養 生物有機化学 生合成 抗真菌剤 抗生物質 クリプティック遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜はタンパク質、糖質、脂質などからなる構造体で、細胞の内外を仕切るバリアとしてだけでなく、細胞外からの刺激を細胞内に伝える等の重要な機能を有しているが、細胞膜を構成する脂質分子を理解する手段は、遺伝学や X 線結晶構造解析学が利用可能なタンパク質に比べて非常に乏しく、適した分子ツール開発が希求されている。そこで本研究代表者らは、分裂酵母の ergosterol 生合成遺伝子(*erg* 遺伝子)変異株を用いて細胞膜シグナル制御物質の探索研究を展開している。

一方、近年のゲノム解析技術の発展に伴い、多様な二次代謝産物(生物活性物質)を産生する土壌細菌として広く知られている放線菌には、1 株あたり約 40 種類程度の二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在することが判明しつつある。しかし、多くの場合、これら生合成遺伝子クラスターに対応する二次代謝産物の生産数の割合は通常 10~40%と非常に低い。これは、対応する生合成遺伝子クラスターが活性化されず二次代謝産物が生産されていないか、あるいは、生産量が極微量のため検出されていないと推定できる。いずれにしても、ゲノム探索の時代を迎え、クリプティック(*cryptic*) 遺伝子の活性化が新規二次代謝産物の探索・同定にもたらすインパクトは大きい。

## 2. 研究の目的

細胞膜シグナル制御物質の探索の過程で、*Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 の 2 種類の異なる放線菌の複合培養によって生産されるテトラヒドロキノリン骨格を有する新規アルカロイド群 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines (5aTHQs と命名)を見出しつつあった。そこで、1) 本複合培養における新規化合物群を包括的に単離・精製し構造解析を行うこと、2) 放線菌 *Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 のいずれが 5aTHQs 生合成遺伝子クラスターを有しているのかを確定すること、3) 5aTHQs の生合成機構を安定同位体標識実験により明らかにすること、などを目的とした。

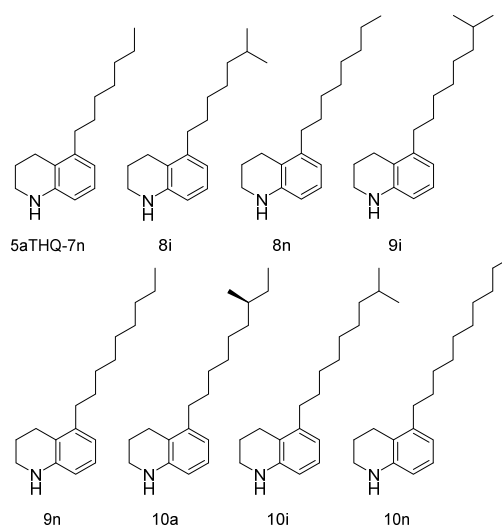
## 3. 研究の方法

5aTHQs の 5 位に有するアルキル基の多様性を把握するために、本複合培養によって生

産される 5aTHQ 類縁化合物を包括的に単離・精製後、各種 NMR スペクトル解析、LC-MS/MS 解析などによって構造解析を行った。また、5aTHQs の生合成機構の化学的解析においては、複合培養時に[1-<sup>13</sup>C]-酢酸ナトリウムおよび[1,2-<sup>13</sup>C]-酢酸ナトリウムを用いた安定同位体標識実験を行った。さらに、5aTHQs 関連化合物の探索・同定研究においては、分子量ピークの差が 14 マスユニットのイオンピーク・クラスタ情報を活用することで新規化合物の探索を行った。

## 4. 研究成果

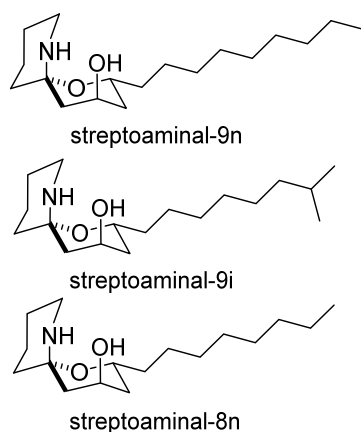
*Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 の 2 種類の異なる微生物の複合培養抽出物を 90%メタノールとヘキサンで二層分配を行った。活性が確認できたヘキサン層をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC により順次生成することで、新規アルカロイド群 5aTHQ-7n, 8i, 8n, 9i, 9n, 10a, 10i, 10n の 8 成分を得た。それぞれの化学構造は、各種 NMR スペクトル解析、LC-MS/MS 解析などによって確定した。なお、5aTHQ-10a の 7'位の立体化学は、大類-赤坂法により決定したが、本法を光学活性アミンの立体化学決定に適用したのは初の事例である。



続いて、5aTHQs の生合成機構の化学的解析を行った。すなわち、[1-<sup>13</sup>C]-酢酸ナトリウムあるいは[1,2-<sup>13</sup>C]-酢酸ナトリウムを含む培地を用いて複合培養を行い、産生された 5aTHQs を単離・精製後、詳細な <sup>13</sup>C-NMR スペクトル解析を行った。その結果、5aTHQs はポリケチド生合成経路で生合成されることが示唆された。

5aTHQs は、*Streptomyces* sp. HEK616 あるいは

は *Tsukamurella pulmonis* TP-80596 のいずれかの菌の純粋培養では産生されない。詳細は割愛するが、*Streptomyces* sp. HEK616 のドラフトゲノム解析の結果、5aTHQs 生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかになった。一方、本複合培養時には、クリプティック遺伝子の活性化が誘導されている可能性が高いと考え、5aTHQs のアルキル側鎖の多様性にヒントを得て、分子量ピークの差が 14 マスユニットのイオンピーク・クラスタ情報を活用することで新規化合物の探索を行った。



その結果、微生物代謝産物では極めて稀なアミナル骨格を含有する新規化合物群 streptoaminals-9n, 9i, 8n の 3 成分の単離・精製・構造解析に成功した。なお、絶対立体化学の決定は、streptoaminals-9n の全合成により明らかにした。また、5aTHQs 類および streptoaminal 類の推定生合成機構から、両者の生合成には *Streptomyces* sp. HEK616 内の共通の遺伝子クラスターが必要であることが示唆された。

以上、本研究課題においては、*Streptomyces* sp. HEK616 と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 の複合培養によって産生される新規アルカロイド群 5aTHQ 類および streptoaminal 類を見出し、複合培養法が創薬シーズとしての化合物群の構造多様性の創出に寄与することが示された。

本研究は、尾仲宏康先生（東大）らとの共同研究である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件、すべて査読有)

- 1) Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Takeya, H. Discovery and total synthesis of streptoaminals, antimicrobial

[5,5]-spirohemiaminals from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 10278-10282, 2016. DOI: 10.1002/anie.201604126.

- 2) Takeya, H. Natural products-prompted chemical biology: Phenotypic screening and a new platform for target identification. *Nat. Prod. Rep.* 33, 648-654, 2016. Doi: 10.1039/c5np00120j.
- 3) Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Takeya, H. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites, produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Org. Lett.* 17, 1918-1921, 2015. DOI: 10.1021/acs.orglett.5b00607.
- 4) 掛谷秀昭. 創薬ケミカルバイオロジー：シード分子開発と分子プロファイリング. 生体の科学, 66, 119-125, 2015.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) 掛谷秀昭. アカデミア創薬における表現型スクリーニングと次世代天然物化学. 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都, 3 月, 2017. (招待講演)
- 2) 掛谷秀昭. 創薬ケミカルバイオロジー研究方略：表現型スクリーニングとシード分子開発. ビッグデータ駆動型創薬システム研究拠点(慶應義塾大学) 第 3 回シンポジウム, 横浜, 3 月, 2017. (招待講演)
- 3) 西村慎一, 杉山龍介, 仲谷崇宏, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康, 掛谷秀昭. 微生物の複合培養で得られる 5aTHQ と streptoaminal の構造と機能. 第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 千葉, 10 月, 2016. (招待講演)
- 4) 掛谷秀昭. 「新しい抗真菌薬シード開発と適応拡大戦略」 抗真菌薬開発のためのケミカルバイオロジー研究方略：シード分子開発とメカニズム解析. 技術情報協会セミナー, 東京, 8 月, 2016 年. (招待講演)
- 5) Takeya, H. Microbial metabolites-prompted chemical biology: Phenotypic screening and a new platform for target identification. The 5<sup>th</sup> symposium of RIKEN-Max plank joint research center for system chemical biology. Berlin, Germany, Apr. 2016. (招待講演)
- 6) 杉山龍介, 西村慎一, 尾崎太郎, 浅水俊平, 尾仲宏康, 掛谷秀昭. 脂質結合性天

然物の活用 放線菌複合培養より見出した新規アルカロイド群に関する研究. 日本薬学会第136年会. 横浜, 3月, 2016(招待講演)

- 7) Takeya, H. Natural products-prompted chemical biology: Phenotypic screening and target identification. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM 2015), Hawaii, USA, Dec. 2017. (招待講演)
- 8) Sugiyama, R., Nishimura, S., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H., Takeya, H. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines (5aTHQs), new membrane-interacting lipophilic metabolites, produced by combined-culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM 2015). Hawaii, USA, Dec. 2015.
- 9) 掛谷秀昭. シンポジウム「創薬の将来」: 創薬ケミカルバイオロジー: シード分子開発と分子プロファイリング. 第63回日本化学療法学会総会, 6月, 2015. (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 「くすりをつくる研究者の仕事 薬のタネ探しから私たちに届くまで」(京都大学大学院薬学研究科編, 化学同人, 2017年) [第3章“創薬ケミカルバイオロジー: 自然に学ぶ薬づくり” 分担執筆]

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

該当なし

取得状況 (計 件)

該当なし

〔その他〕

・研究室 HP

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/sc-molsci/>

・ストレプトアミナルに関する報道発表: 「質量情報を取り入れた新たな天然有機化合物の探索手法により、放線菌が産生する新規抗生物質ストレプトアミナル類を発見 - 医薬品シーズとなる化合物の多様性の拡充に期待 - 」

[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research\\_results/2016/160721\\_2.html](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160721_2.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

掛谷 秀昭 (KAKEYA, Hideaki)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 00270596