

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18692

研究課題名(和文) 海洋由来Streptomycesが生産する新規芳香族ポリケタイドに関する研究

研究課題名(英文) New aromatic polyketide produced by marine-derived Streptomyces

研究代表者

春成 円十郎 (Harunari, Enjuro)

富山県立大学・工学部・助教

研究者番号：00750449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：東京湾のホヤから分離した新種の放線菌Streptomyces hyaluromycini MB-P013株から、新規性が期待された6化合物を精製し、その平面構造を決定した。解析の結果、4化合物は新規の化学構造を有しており、そのうち2化合物はrubromycin構造、残りの2化合物はkinamycin構造を有する化合物であった。

研究成果の概要(英文)：Four new aromatic polyketides, konamycins and rubromycins were isolated from the culture extract of a tunicate-derived Streptomyces hyaluromycini MB-P013T. These structures were elucidated by extensive analysis of 1D and 2D NMR spectroscopic data. The absolute configuration was determined by ECD spectrum data.

研究分野：天然物化学

キーワード：海洋細菌 放線菌 Streptomyces 芳香族ポリケタイド rubromycin

### 1. 研究開始当初の背景

過去半世紀以上にわたる微生物創薬の著しい成果にも関わらず、製薬企業での天然物探索は縮小傾向にある。一方で、コンビナトリアル合成化合物や抗体医薬があらゆる疾病の治療薬開発に対応できるわけではなく、過去の成功事例の相当数が天然物の分子構造に起因していることから、製薬業界における天然由来低分子有機化合物への期待は依然として根強くある。しかし従来と同様のアプローチでは天然物の産業利用の実現は容易とは言い難く、天然物のポテンシャルをより強く示す研究成果が求められている。

陸土壌の優占種である放線菌は、*Streptomyces* 属を筆頭に、微生物由来生理活性物質の約半数を生産しており、その二次代謝能力は微生物の中でも群を抜いている。しかしストレプトマイシンの発見以来、医薬探索は土壌放線菌に集中してきたため、新薬開発に通ずるような新規構造の発見は次第に困難になってきた。海洋放線菌は最近まで重視されていなかったが、数千株単位での海洋分離放線菌の系統解析により、陸生放線菌とは異なる、海洋に適応した放線菌群の存在が示されたことから、土壌放線菌に代わる新たな医薬探索源として注目されるようになった。事実、海洋放線菌からは多種多様な新規化合物の発見が相次ぎ、抗がん剤 salinisporamide A に代表されるように臨床試験に進む有望化合物も得られている。

### 2. 研究の目的

先行研究として、海洋放線菌からのヒアルロニダーゼ阻害剤探索をテーマに研究を行い、ホヤから分離した *Streptomyces* sp. MB-PO13 株から新規阻害剤 hyaluromycin を発見、構造決定した。さらに本株の代謝物研究を行い、新規芳香族ポリケタイドを発見した。本研究は、これまでの研究を進展させるべく、hyaluromycin の生合成情報を利用した新規ヒアルロニダーゼ阻害剤の探索、konamycin 生合成における特異な芳香環縮小反応の詳細解析、MB-PO13 株の芳香族ポリケタイド生産能の解析を通じて、海洋放線菌の二次代謝能力ならびに創薬資源としての有効性を明らかにし、将来の微生物創薬へと結び付けていくことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究で用いる *Streptomyces* sp. MB-PO13 株は、申請者が海洋から分離した新規の放線菌であり、生合成的に系統の異なる 2 種類の芳香族ポリケタイドを生産する。Hyaluromycin の有する C<sub>5</sub>N 構造がヒアルロニダーゼ阻害活性に必須であることから、C<sub>5</sub>N 構造を持つ天然物のゲノムマニング、C<sub>5</sub>N 合成酵素を利用した非天然化合物の合成を行い、より強力な阻害剤を探索する。また芳香族ポリケタイド生合成における五員環形成メカニズムを解明し、コンビナトリアル生

成への応用を試みる。さらに、MB-PO13 株が生産する多彩な芳香族ポリケタイドの構造を明らかにし、生合成遺伝子情報と併せて、構造多様性に優れた芳香族化合物ライブラリーの構築を検討する。

(1) C<sub>5</sub>N ユニット含有新規ヒアルロニダーゼ阻害剤の探索

a. *Saccharothrix espanaensis* NBRC 15066 株による C<sub>5</sub>N 化合物の生産

ゲノムマイニングにより三個の C<sub>5</sub>N 生合成クラスターの保有が判明した *Saccharothrix espanaensis* NBRC 15066 株による C<sub>5</sub>N 含有化合物の生産を試みる。培養条件の検討、HPLC をはじめとする各種機器分析による目的化合物の生産確認、単離・精製、構造解析へと進め、ヒアルロニダーゼ阻害活性の評価を行う。発酵による生産が困難な場合は、異種発現を検討する。データベース中のゲノムデータは不完全なため、まずは C<sub>5</sub>N 生合成クラスター周辺の配列を解析し、全長と想定されるクラスターを *Streptomyces lividans* 1326 株や *Streptomyces albus* J1074 株に導入し、目的化合物の生産を試みる。

b. C<sub>5</sub>N 生合成酵素を利用した新規化合物生産 Hyaluromycin の構造活性相関から明らかのように、ヒアルロニダーゼ阻害活性には C<sub>5</sub>N ユニットが必須の役割を果たす。本ユニットは化学合成可能であるが収率が低く、汎用性に乏しい。そこで、C<sub>5</sub>N 含有化合物を柔軟性高く合成するために、C<sub>5</sub>N 生合成酵素反応を利用することを計画した。C<sub>5</sub>N ユニットの異種生産、amide synthase の発現と反応性の解析、さらにはポリケタイドのみならず、ペプチドやテルペンとのカップリング反応の検討を行い、非天然型 C<sub>5</sub>N 化合物群を合成し、より活性の強力な新規ヒアルロニダーゼ阻害剤を探索する。

(2) 芳香族ポリケタイド生合成における六員環から五員環への環縮小反応

Konamycin 芳香環骨格の生合成では、type II PKS により四環性骨格(angucycline 構造)が構築された後に、六員環の一つが酸化開裂、脱炭酸を経て五員環へと変換されるが、最終反応である環縮小を触媒する生合成遺伝子は特定されていない。Konamycin タイプの骨格を有する化合物は数少ないことから、その環縮小酵素を angucycline 系化合物に作用させることができれば、新規な五員環含有芳香族化合物を作り出すことが可能になる。本研究では五員環の縮環化に関する生合成機構を明らかにするために、konamycin 生合成遺伝子クラスターの同定、遺伝子破壊、環縮小酵素の発現と機能解析を行い、最終的に angucycline 系化合物での骨格変換の応用を検討する。

(3) MB-PO13 株が生産する芳香族ポリケタイド構造多様性の解析

MB-PO13 株は、新規化合物 hyaluromycin、konamycin 以外にも多数の芳香族ポリケタイドを生産することが HPLC 分析により示され

ている。それらの UV スペクトルはいずれの新規化合物のスペクトルとも一致しないため、単純な類縁体構造ではなく、共役構造の異なる化合物であることが推測される。本株は C<sub>5</sub>N ユニットや C-グリコシド結合などの特殊なサブユニットを有する新規芳香族ポリケタイドを生産することから、それら未知化合物の構造と活性の多様性に期待が持たれる。可能な限り単離・構造決定を行い、本株の二次代謝多様性を構造の観点から解析する。また同時に、本株のドラフトゲノム解析を行い、type II PKS 遺伝子を探索する。クラスターが見つければ遺伝子機能のアノテーションを行い、まずは二つの新規化合物の生合成遺伝子クラスターを特定する。さらにそれ以外に芳香族化合物の生合成を担う遺伝子を探索し、上述の単離・構造研究で明らかにされる構造との整合性を検討し、本菌株における芳香族ポリケタイド生合成の多様性発現のメカニズムを解明する。この研究で得られてくる多様な芳香族ポリケタイドは、創薬ライブラリーとしても有用な化合物群と期待される。先に述べたヒアルロニダーゼ阻害活性以外に、抗菌性、抗がん活性などさまざまなアッセイ系での生理活性評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) C<sub>5</sub>N 構造を生合成するための遺伝子セットを有する菌株をデータベースから特定し、様々な種類の液体培地にて培養したが、生産を確認することができなかった。

(2) MB-PO13 株の C<sub>5</sub>N 合成酵素を利用した非天然化合物の創出は、六員環から五員環への環縮小反応における生合成のメカニズムが解明されたため中止した。

(3) MB-PO13 株が生産する化合物のうち、UV、MS および NMR スペクトルにより新規芳香族ポリケタイドであると考えられる 6 化合物を単離した。このうち 2 つは rubromycin 類、2 つは kinamycin 類の新規化合物であったが、残る 2 化合物は 4 級炭素が非常に多く、溶解性が極めて悪いことから定法による構造解析が困難であった。次に平面構造を決定した 4 化合物について、絶対立体配置の解析を行った。Rubromycin 構造を有する 2 化合物は、スピロ炭素を共通の不斉中心として有しており、2 つの等価な発色団が本炭素によって結合していることから、ECD スペクトルを用いた励起子キラリティー法による決定が可能であると考えた。測定の結果、いずれの化合物も第一コットン効果は負、第二コットン効果は正を示したことから、2 つの発色団は負のキラリティー、つまりは反時計回りのねじれを有することが判明したため、絶対立体配置を S と決定した。これらの結果は、これまで報告されている rubromycin 類の ECD スペクトルと絶対立体配置の関係に一致するものであった。これら 2 つの rubromycin 類の 1 つは、スピロアセタールを形成する 5 員環上

の二級水酸基 (3'-OH) の絶対立体配置は、ECD スペクトル解析により決定したスピロ炭素の絶対立体配置を基準として、ROESY および J-HMBC を用いたロングレンジカップリングによって決定した。はじめに ROE の情報から 3 位と 3' 位の空間情報を取得し、これらのシグナル強度から、3 位のメチレンプロトン (3a, 3b) の識別が可能であることが判明したため、これらと C-4a とのカップリングによる解析が可能であると考えた。J-HMBC スペクトルによって観測された H-3 と C-4a の相関を解析したところ、2 つのプロトン H-3a, H-3b と C-4a とのカップリング定数はそれぞれ large および small であったことから、これらの配座は anti および gauche であると決定し、決定済みであるスピロ炭素との相対立体配置の解析により、絶対立体配置を S と決定した。6-6-5-6 員環システムの benzo[*b*]fluorene 骨格を有する kinamycin 類縁体の 2 化合物については、はじめに C-グリコシド結合した amicetose の立体を二級水酸基を MPA エステル化することによって決定した。続いて高度に酸素官能基化された 6 員環構造の立体を CD スペクトルの分子理論計算による解析を試みたが決定には至らなかった。次にアシル基および水酸基に発色団を付加し、ECD スペクトル解析による決定を計画した。はじめに、標的となる 3 位と 4 位にジオール構造を有する 1, 2-cyclohexanediol をモデル化合物として用いて、ベンゾイル、ナフトイル、アズレンカルボン酸による誘導体化を行い、良好なコットン効果が得られることを確認した。次に、同様のジオール構造を有する kinamycin 化合物を用いて反応を行ったが、目的とする化合物のスペクトルを確認することができず、本手法による絶対立体配置の決定が困難であると判断した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Harunari, E.; Komaki, H.; Ichikawa, N.; Hosoyama, A.; Hamada, M.; Ishikawa, A.; Igarashi, Y. Draft genome sequence of *Streptomyces hyaluromycini* MB-PO13T, a hyaluromycin producer. *Stand. Genomic Sci.* 査読有, 13, 2018.

Harunari, E.; Komaki, H.; Igarashi, Y. Biosynthetic origin of butyrolactol A, an antifungal polyketide produced by a marine-derived *Streptomyces*. *Beilstein J. Org. Chem.* 査読有, 13, 2017, 441-450.

Harunari, E.; Komaki, H.; Igarashi, Y. Biosynthetic origin of anthracimycin, a tricyclic macrolide from *Streptomyces*

sp. *J. Antibiot.* 査読有, 69, 2016, 403-405.

Harunari, E.; Hamada, M.; Shibata, C.; Tamura, T.; Komaki, H.; Imada, C.; Igarashi, Y. *Streptomyces hyaluromycini* sp. nov., isolated from a tunicate (*Molgula manhattensis*). *J. Antibiot.* 査読有, 69, 2016, 159-163.

(4)研究協力者

( )

〔学会発表〕(計1件)

春成 円十郎、五十嵐康弘、ホヤ由来 *Streptomyces hyaluromycini* MB-PO13 株が生産する新規芳香族ポリケチド化合物、2016 年度日本放線菌学会大会、2016 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

春成 円十郎 (Harunari Enjuro)

富山県立大学工学部助教

研究者番号：00750449

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：