

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05385

研究課題名(和文)放線菌由来新規トロイの木馬抗生物質の生合成と作用機構の解析

研究課題名(英文) Biosynthesis and mechanistic analysis of Trojan-horse antibiotic from *Streptomyces* species

研究代表者

浅水 俊平 (Asamizu, Shumpei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任講師

研究者番号：90709057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シデロマイシンはシデロフォアと抗生物質が連結した化合物である。放線菌 *Streptomyces* sp. HOK021はミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596との複合培養特異的に、脂肪酸合成酵素阻害剤であるプラテンシマイシンとカテコール型シデロフォアであるエンテロバクチン様構造がチオエステル架橋によって連結したシデロマイシン様キメラ抗生物質を蓄積した。本研究では、生産菌のゲノム解析からHDMの生合成機構に関する知見、既存のシデロマイシン類の質量分析における物理化学特性に関する知見を得た。新規シデロマイシン系抗生物質の探索研究への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然のシデロマイシン様抗生物質が新たに共培養系から見いだされたことに着想を得た研究を行った。本研究では生産菌のゲノム解析からHDMの生合成機構に関する知見、HDMの他に既存のシデロマイシン類の質量分析における物理化学特性を明らかにすることができたことから、得られた知見を今後の代謝産物未知の微生物培養液からの新規シデロマイシン系抗生物質の探索に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sideromycin antibiotics are conjugant of siderophore and antibiotic. Sideromycin-like antibiotic HDM was isolated from the combined-culture of *Streptomyces* sp. HOK021 and *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596. HDM was a chimeric compound of two units; bacterial FabF inhibitor platensimycin and bacterial siderophore enterobactin, connected through thioester bond. In this study, biosynthetic gene clusters for platensimycin and enterobactin was identified from the complete genome sequence of *Streptomyces* sp. HOK021. Additionally, physicochemical property of sideromycins including HDMs, salmycins, and ferrimycins in LC-MS/MS were elucidated. Obtained knowledge will be applied for further screening to discover novel sideromycin antibiotics.

研究分野：応用微生物学

キーワード：シデロマイシン 放線菌 抗生物質 共培養 ミコール酸含有細菌 二次代謝 生合成 シデロフォア

1. 研究開始当初の背景

シデロマイシンはシデロフォアと抗生物質が連結した化合物である。シデロマイシンは「トロイの木馬」抗生物質ともいわれ、シデロフォアに擬態することで細菌のシデロフォアトランスポーターを介して能動的に細胞内に蓄積し、抗菌効果が強くなることが知られている。近年シデロマイシン系抗生物質であるシデロフォアセファロスポリン抗菌薬セフィデロコル(塩野義製薬)が細菌感染症治療薬としてアメリカ FDA により認可されている。既存の抗生物質に対して病原性細菌細胞に効率的に取り込ませるような機能を付与することの重要性が認識されてきており、シデロマイシンはその一つとして生物の必須元素である鉄の獲得システムを利用する方法となる。

シデロマイシンは元々天然物(grisein(構造未決定)後のアルボマイシン)として Selman A. Waksman らによって 1947 年に *Streptomyces griseus* 発見された。細菌がその代謝産物として生産することから、生物が進化的に獲得してきた分子であることが示唆される。生物が合成するシデロマイシン天然物としては、放線菌 *Streptomyces* sp. ATCC 700974 由来アルボマイシン、*Streptomyces griseoflavus* NRRL 2717 由来フェリマイシン、*Streptomyces violaceus* DSM8286 由来サルマイシン、*Klebsiella pneumoniae* RYC492 由来ミクロシン E492、そしてそれらの構造類縁体などが報告されている。天然物として知られるのはこれまでに 4 例のみで、その数は多くない。特異的な生物活性の発現様式や、生合成機構に関しては、アルボマイシンを中心に明らかにされてきているが、フェリマイシンとサルマイシンに関しては乏しく、抗生物質としてのシデロマイシン群の体系的な仕組みはわかっていない。

本研究では放線菌 *Streptomyces* sp. HOK021 株と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株との複合培養液から既知抗生物質であるプラテンシマイシンと、既知シデロフォアであるエンテロバクチンの鎖状体のキメラ化合物(ハルンドマイシン、以下 HDM)が単離されたことから、本シデロマイシン様の化合物の生物活性の発現様式や生合成機構に興味を持たれたので解析を行った。

2. 研究の目的

放線菌 *Streptomyces* sp. HOK021 とミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 との複合培養時に、特異的に新規シデロマイシン様抗生物質 HDM が培養液に蓄積した。HDM は脂肪酸合成酵素 FabF 阻害剤と知られるプラテンシマイシンとカテコール型シデロフォアと知られるエンテロバクチン様構造がチオエステル架橋によって連結したキメラ抗生物質であった。(図 1) 本研究の当初の研究計画では、全 HDM 生合成遺伝子の同定、キメラ化に関する生合成機構の遺伝学的・生化学的解析、HDM 作用機構の解析、マスフラグメンテーションパターンを指標にした新規シデロマイシン類の探索、そしてキメラ化機構を応用した新規アナログ生産を目指し研究を行った。HDM 生産・作用機構の解明は、抗生物質にシデロフォアを連結した新規な「トロイの木馬」型抗生物質の生物生産に応用展開できる可能性がある。

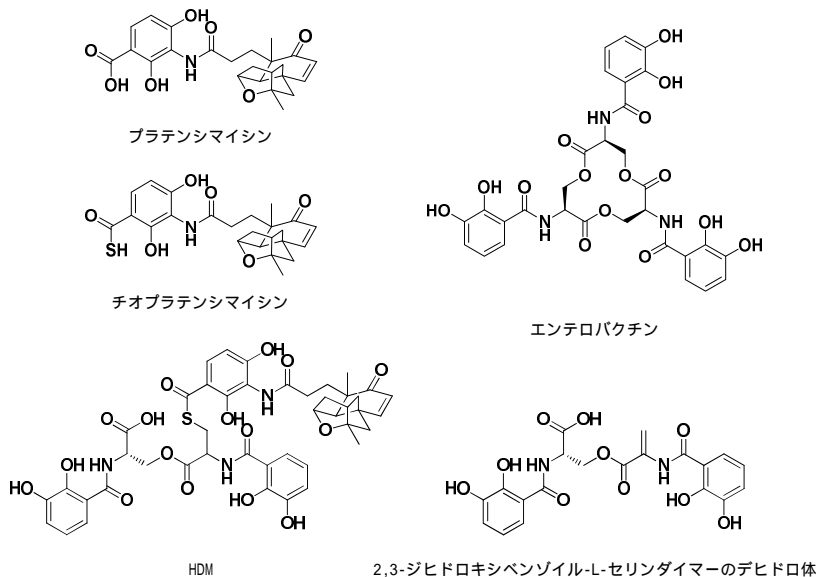


図 1 *Streptomyces* sp. HOK021 が生産する二次代謝産物の化学構造

3. 研究の方法

全 HDM 生合成遺伝子の同定を行うために *Streptomyces* sp. HOK021 ゲノムの PacBio RSII シーケンスとイルミナ HiSeq シーケンスを行い、シーケンスデータのハイブリッドアセンブリ解析を行った。キメラ化に関する生合成機構の遺伝学的・生化学的解析に関しては、今後の課題であるが、現在 HOK021 株における CRISPR-Cas9 とシチジンデアミナーゼを利用したゲノム編集技術を適用した遺伝子破壊に取り組んでいる。HDM 作用機構の解析に関しては、セフィデロコルで用いられた鉄欠乏下での抗菌活性試験を利用して HDM 鉄欠乏下での抗菌活性を評価した。マスフラグメンテーションパターンを指標にした新規シデロマイシン類の探索を行うためにフェリマイシンとサルマイシンの生産菌を寄託菌株から購入し、培養物上清の代謝産物を LC-QTOF-MS を用いて解析し、一般的なシデロフォアとのマスフラグメンテーションパターンの比較解析を行った。

4. 研究成果

・HDM 生合成遺伝子の同定

生合成機構に関する知見を得るために *Streptomyces* sp. HOK021 株のゲノムを PacBio RSII シーケンスと HiSeq シーケンスデータのハイブリッドアセンブリ解析を行い、一つのコンテイングにした。バクテリアの二次代謝遺伝子予測ツールである antiSMASH を用いて HOK021 株のゲノムを解析したところ、既知の *Streptomyces platensis* MA7327 由来のチオプラテンシマイシン生合成遺伝子群と同じ遺伝子構成及び配置の *ptm* クラスターを同定した。(図 3) それぞれの遺伝子も高い相同性を示した。また既知のエンテロバクチン生合成遺伝子 EntA-F と相同性を示す推定 *ent* クラスターを同定した。(図 4) 一方キメラ化合物の生産に関与すると予想されるような特異的な遺伝子は *ptm* クラスターと *ent* クラスター中、またはその近傍に推定できなかった。また両遺伝子クラスターはゲノム中に近接して存在しておらず、同調して発現し、HDM を生産するようなメカニズムは示唆されなかった。(図 2)

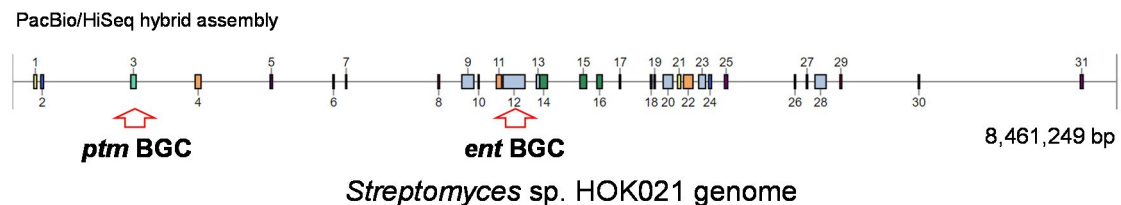


図 2 *Streptomyces* sp. HOK021 ゲノム中の *ptm* クラスターと *ent* クラスターの位置

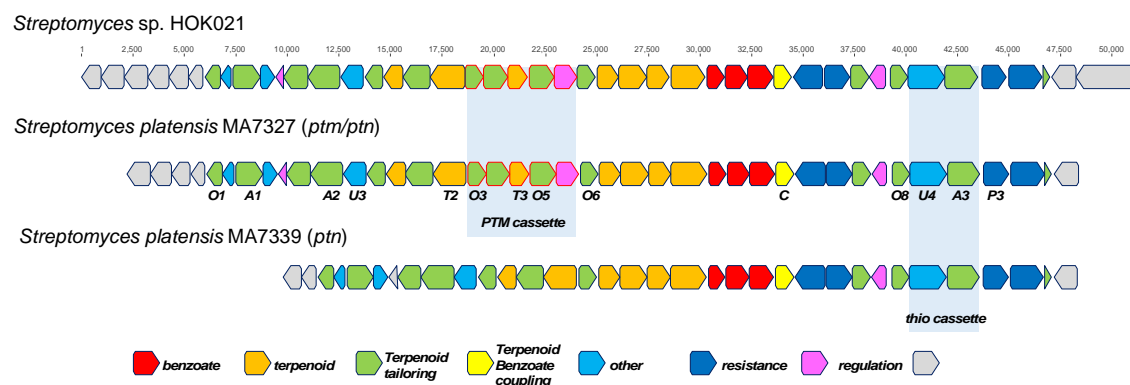


図 3 既知 *ptm* クラスターとの比較

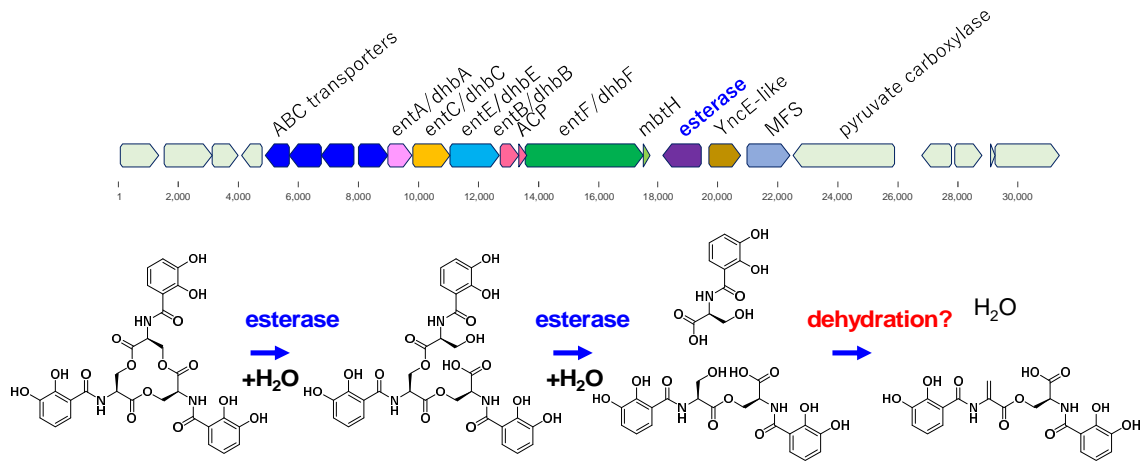


図4 推定 *ent* クラスターとエステラーゼによる推定分解経路

・キメラ化に関する生合成機構の遺伝学的・生化学的解析

HOK021 株のゲノム解析の結果から、キメラ化合物の生産に関与する特異的な遺伝子が予想できなかった。チオプラテンシマイシンのチオカルボン酸基が、鎖状エンテロバクチンのセリン側鎖が脱水したデヒドロアラニン体に生じたエキソオレフィンに対して 1,4 付加反応により生体内でスポンテニアスに合成されることが示唆された。この仮説と検証するために、現在、プラテンシマイシンのチオカルボン酸生合成遺伝子 (*ptmU2* と *ptmA3*) の遺伝子破壊株を作製し、架橋形成反応にチオカルボン酸が関与するかを明らかにする予定である。またエンテロバクチンのデヒドロアラニン体形成に関与すると考えられる脱水酵素遺伝子はクラスター中に同定できなかった。エンテロバクチンは 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) と L-セリンがアミド結合で架橋したユニットが 3 個で分子内環化した構造を有する。エンテロバクチンと鉄は強固に結合するため、エンテロバクチンエステラーゼによって分子内環化が切断される必要がある。通常の分解産物は 3 個の 2,3-ジヒドロキシベンゾイル-L-セリンである。*ent* クラスター中にエステラーゼ遺伝子が存在したことから、HDM における 2,3-ジヒドロキシベンゾイル-L-セリンダイマーのデヒドロ体の生産にエンテロバクチンの分解経路が関与するかを明らかにする予定である。

・HDM 作用機構の解析

シデロマイシンの一つであるアルボマイシンは、特異的なシデロフォアトランスポーターを介して能動的に細胞内に取り込まれることが知られている。またシデロフォアセファロスポリン抗菌薬セフィデロコルは、鉄欠乏下において薬剤耐性病原菌に対する生育阻害活性が向上することが報告されている。そこで Iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth (ID-CAMHB) を調製し、鉄の含量に依存した HDM のグラム陽性細菌である *Micrococcus luteus*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性試験 (MIC 測定) を行った。鉄欠乏下において *M. luteus* に対して 2-4 倍活性が向上したが他の細菌に対しては活性が変化しなかった。しかしながら、いずれも場合もシデロフォア分子が結合していないプラテンシマイシンと比較して生育阻害活性は低下した。HDM は大腸菌などのグラム陰性細菌に対しては測定濃度範囲内 (256 μM) では活性は示さなかった。

・マスフラグメンテーションパターンを指標にした新規シデロマイシン類の探索

既存のシデロマイシン類の質量分析における化学特性をまず解析した。グリセイン、アルボマイシン様抗生物質、フェリマイシンの生産菌として登録されている寄託菌株を DSM (ドイツ) または JCM (日本) から購入し、菌の培養液上清解析した。その結果、*Streptomyces griseoloalbus* DSM 40468 がサルマイシン、*Streptomyces griseoflavus* DSM 40698 がフェリマイシンを生産することを確認した。LC-QTOF-MS の CID を用いてサルマイシンとフェリマイシンの MSMS フラグメンテーションパターンを得ることができ、今後、モレキュラーネットワーク法などを利用して、代謝産物未知の放線菌培養液からの新規な類縁シデロマイシン探索を行う予定である。

・計画した研究以外の成果

HDM では 2,3-ジヒドロキシベンゾイル-L-セリンダイマーのデヒドロ体がチオプラテンシマイシンと縮合したキメラ構造を有した。HOK021 株と *T. pulmonis* の複合培養液中の代謝産物を詳

細な LS/MS/MS 分析を行ったところ、2,3-ジヒドロキシベンゾイル-L-セリントリマー体とモノマー体の生産も確認できた。培養条件を検討したところ、通常 30、200 rpm で振盪培養するところを 26、160 rpm で振盪培養するとトリマー体の蓄積量が上がった。現在、トリマー体である HDM-B の精製、構造分析を終了し、ダイマー体との生物活性の比較などを行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiyama Ryosuke, Nakatani Takahiro, Nishimura Shinichi, Takenaka Kei, Ozaki Taro, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu, Kakeya Hideaki	4. 巻 58
2. 論文標題 Chemical Interactions of Cryptic Actinomycete Metabolite 5 Alkyl 1,2,3,4 tetrahydroquinolines through Aggregate Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 13486 ~ 13491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201905970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onaka Hiroyasu, Asamizu Shumpei	4. 巻 -
2. 論文標題 Metabolite Induction via Microorganism Symbiosis and Co-Culturing: A Potential Way to Enhance Chemical Diversity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Comprehensive Natural Products III	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-409547-2.14692-X	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hoshino Shotaro, Wong Chin Piow, Ozeki Masahiro, Zhang Huiping, Hayashi Fumiaki, Awakawa Takayoshi, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu, Abe Ikuro	4. 巻 71
2. 論文標題 Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of Umezawaea sp. and mycolic acid-containing bacterium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 653 ~ 657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-018-0040-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ozaki Taro, Sugiyama Ryosuke, Shimomura Morito, Nishimura Shinichi, Asamizu Shumpei, Katsuyama Yohei, Kakeya Hideaki, Onaka Hiroyasu	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification of the common biosynthetic gene cluster for both antimicrobial streptoaminals and antifungal 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2370 ~ 2378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob02846j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kozakai Ryosuke, Ono Takuto, Hoshino Shotaro, Takahashi Hidenori, Katsuyama Yohei, Sugai Yoshinori, Ozaki Taro, Teramoto Kazuya, Teramoto Kanae, Tanaka Koichi, Abe Ikuro, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 Acyltransferase that catalyses the condensation of polyketide and peptide moieties of goadvionin hybrid lipopeptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 869 ~ 877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41557-020-0508-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vinogradov Alexander A., Shimomura Morito, Goto Yuki, Ozaki Taro, Asamizu Shumpei, Sugai Yoshinori, Suga Hiroaki, Onaka Hiroyasu	4. 巻 11
2. 論文標題 Minimal lactazole scaffold for in vitro thiopeptide bioengineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16145-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Vaario Lu-Min, Asamizu Shumpei, Sarjala Tytti, Matsushita Norihisa, Onaka Hiroyasu, Xia Yan, Kurokochi Hiroyuki, Morinaga Shin-Ichi, Huang Jian, Zhang Shijie, Lian Chunlan	4. 巻 81
2. 論文標題 Bioactive properties of streptomycetes may affect the dominance of Tricholoma matsutake in shiro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Symbiosis	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13199-020-00678-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shumpei Asamizu
2. 発表標題 Intergeneric cell-cell contact dependent conversion of bioactive natural products in combined-culture between Streptomyces sp. HEK616 and Tsukamurella pulmonis
3. 学会等名 The 4th A3 Foresight Symposium on Chemical & Synthetic Biology of Natural Products
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅水 俊平, 尾崎 太郎, 西村 慎一, 掛谷 秀昭, 尾仲 宏康
2. 発表標題 Streptomyces sp. HEK616 と Tsukamurella pulmonis との複合培養での二次代謝活性化機構の解析
3. 学会等名 2019年度 (第34回) 日本放線菌学会北海道大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅水 俊平, 石塚 匠, 柳澤 昌臣, 佐藤 勝也, 大野 豊, 尾仲 宏康
2. 発表標題 放線菌の重イオンビーム照射二次代謝非応答性変異株に生じた変異点の遺伝学的解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 愛美, 浅水 俊平, 尾仲 宏康
2. 発表標題 自然共分離放線菌とミコール酸含有細菌の生態学的相互作用の解析
3. 学会等名 2019年度 (第34回) 日本放線菌学会北海道大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅水 俊平, 尾崎 太郎, 西村 慎一, 掛谷 秀昭, 尾仲 宏康
2. 発表標題 複合培養におけるStreptomyces sp. HEK616による5aTHQの生産機構
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka
2. 発表標題 Combined-culture to activating the production of secondary metabolites in Streptomyces species
3. 学会等名 2nd China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅水 俊平、アプロリ アグス チャヤ プラマナ、尾仲 宏康
2. 発表標題 放線菌とミコール酸含有細菌の複合培養 ~抗生物質のトロイの木馬戦略~
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shumpei Asamizu
2. 発表標題 Toward the molecular mechanism of mycolic acid-containing bacteria induced actinomycetes specialized metabolism
3. 学会等名 The 3rd A3 Foresight Symposium on Chemical & Synthetic Biology of Natural Products
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅水俊平、レイユクン、石塚匠、柳澤昌臣、大野豊、佐藤勝也、尾仲宏康
2. 発表標題 放線菌複合培養において接触依存性RED 産生に関与するTetR型転写制御因子の解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------