

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23671

研究課題名（和文）ゲノムマイニング法による好極限微生物からの新規有用化合物の探索

研究課題名（英文）Discovery of novel secondary metabolites from extremophiles by genome mining

研究代表者

上岡 麗子 (Ueoka, Reiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：30592365

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）：本研究では、天然物化学の分野においてこれまで比較的活用されて来なかった微生物、特に好塩菌を対象とし、NCBIのデータベースで公開されているゲノム情報を解析した。さらに、新規性の高い化合物を生産しうる細菌について、培養抽出物の解析を行った。また、沖縄県沿岸で採集された海洋細菌のうち、ゲノム中の二次代謝産物の生合成遺伝子が豊富といわれているPseudoalteromonas属細菌について、代謝産物の解析を行った。その結果、海藻から単離されたPseudoalteromonas piscicidaから新規化合物 pseudoalteropeptide Aを単離、構造決定し、生物活性評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然資源からの新規化合物の探索が困難になりつつある現在においても、未利用な天然資源を探索源とし、ゲノム情報を活用することで、より効率的な新規化合物の探索ができる可能性を示すことができた。ゲノム情報が広く公開されている微生物においても、生合成遺伝子を詳細に解析することで、新規化合物を生産しうる微生物が種々存在することが分かり、これらから、今後もさらなる新規化合物が発見されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the halophiles to discover novel secondary metabolites for drug leads. Detailed analysis of the genomes from NCBI database showed the potent halophiles with the orphan biosynthetic gene clusters in their genomes. Selected halophiles were cultured in the different conditions, and the extracts were analyzed to find new natural products. Also, the marine bacteria, especially Pseudoalteromonadaceae, residing in Okinawan waters were studied because of the high number of biosynthetic gene clusters. From those bacteria, the extract from Pseudoalteromonas piscicida showed the presence of a novel metabolite. The mass spectrometry-guided fractionations yielded a new lipopeptide pseudoalteropeptide A, and its bioactivity was evaluated.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然資源からの新規化合物探索は、新たな医薬リード化合物を発見する上で非常に重要である。これまでに様々な活性試験をもとに多数の二次代謝産物が単離されてきた。特に、放線菌由来のポリケチド化合物は重要な位置を占め、エリスロマイシンやドキソルビシンなど多くの化合物が医薬品として使用されている。放線菌は、現在でも新規化合物発見の重要なリソースではあるが、従来の天然分離資源、菌株分離法あるいは発酵培養法では、これ以上放線菌の持つ能力を引き出すのは難しくなっている。しかしながら、天然から人類の想像を超えたユニークな構造を持つ生物活性化合物が依然として発見されて来ていること、またタンパク質相互作用や疾患 iPS などを用いたアッセイ系が創薬スクリーニングの対象となっていて来ていることから、天然化合物のような大きなケミカルスペースを持った化合物が、医薬品リード化合物として期待されるようになって来ている。そのため、医薬リード化合物となりうるような新規化合物のより効率的な探索方法の確立が問われている。

2. 研究の目的

本研究では、天然物化学の分野においてこれまで比較的未開拓である微生物を対象に、そのゲノム情報をあらかじめ解析し生産される化合物の構造情報を予測するゲノムマイニング法を用いることで、より効率的な医薬リード化合物となりうるような新規化合物探索の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、一つには NCBI のデータベースに存在する入手可能な中高度好塩菌を対象にゲノム情報を解析することで、その生産される二次代謝産物の構造を予測する。構造予測の難しい異常ポリケチド生合成遺伝子である *trans*-AT PKS については、近年開発された構造予測法にのっとり詳細な構造予測を行う。さらに、本手法を発展させると共に、塩濃度や有機物が複雑に混合している我が国特有の汽水地域で生育する微生物を対象としたサンプリングを随時行い、未利用な中高度好塩菌を収集し、有用菌株として選抜した菌株に関してはゲノム解析を進め、新規化合物を生産すると見られる微生物を選別する。選ばれた微生物を培養し、菌体および上清をそれぞれ各種溶媒で抽出後、高分解能 LCMS で分析することで、予測された化合物と組成・性質の近いターゲットとなる候補化合物の検出・解析を行う。その後、ODS カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過、HPLC 等に供し、候補化合物を単離する。候補化合物が検出されなかった場合は、ゲノムライブラリー調製、生合成遺伝子クラスタクローニング、各種最適な宿主を用いて異種発現することにより目的化合物を生産させる。得られた化合物は、NMR など各種機器分により化学構造を決定する。最終的には、得られた化合物に対し、抗菌活性、各種がん細胞に対する細胞毒性などの生物活性を評価する。

4. 研究成果

本研究では、まず、NCBI のデータベースで公開されているゲノム情報のうち、天然物化学の分野で比較的活用されて来なかった微生物種、特に好塩菌を対象として、そのゲノム上の二次代謝産物の生合成遺伝子の解析を行った。まず、候補となった微生物のゲノムを、antiSMASH¹⁾等の二次代謝産物の生合成遺伝子を検出するための予測ツールで解析した。既知化合物の生合成遺伝子との相同性が低い遺伝子を持つ微生物のうち、入手、培養が可能な細菌について、その生合成遺伝子を詳細に解析し、生産される化合物の構造を解析することで、新規性の高い化合物を生産しうる細菌の選択を行った。特に、*trans*-acyltransferase (AT) polyketide synthase (PKS) とよばれる異常ポリケチド合成酵素をもつ細菌の解析を優先的に行った。バクテリアの生産する複雑な I 型ポリケチドは主に、複数の酵素ドメインからなるモジュールの集合体である modular PKS によって生合成されることが知られているが、*trans*-AT PKS は通常の I 型 PKS (*cis*-AT PKS) と比べ、新規触媒ドメインや、モジュール内のユニークなドメイン配列、通常のモジュールのように思われるが異なる機能を持つなど、多くの異常な構造を持つ。これらの酵素は、分類学的に珍しく今まで科学的研究があまりなされていない微生物に多く見られる。生化学的に通常の I 型 PKS とは異なるこの *trans*-AT PKS からはユニークな構造を持つ化合物が多数報告されていることから、これらの酵素を研究対象とすることは有用な化合物を探索する上で非常に重要である。選択された細菌について、特に新規性の高い化合物を生産しうる細菌数種を実際に入手し、各種条件で培養し、それらの抽出物を liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) で測定し、二次代謝産物の解析を行った。現在、これらの二次代謝産物について、引き続き新規化合物の探索を行っている。

また、沖縄県の沿岸でのサンプリングにおいて、水生生物や土から単離された海洋細菌のうち、ゲノム中の二次代謝産物の生合成遺伝子が豊富といわれる²⁾ *Pseudoalteromonas* 属の細菌群に着目し、これらの細菌を各種条件で培養しその代謝産物の解析を行った。それぞれの培養液を butanol で抽出し、乾固したものを DMSO で溶かし ultra-performance LC-high resolution-electrospray ionization/MS (UPLC-HR-ESIMS) で分析を行った。その結果、海藻から単離された海洋細菌 *Pseudoalteromonas piscicida* SWA4_PA4 の P5 培地に 75%人工海水を添加した条件で培養した抽出物中に、既知化合物データベースに掲載されている天然化合物と比べて Photo Diode Array (PDA) の profile および HR-ESIMS スペクトルが異なる、新規化合物の存在が示唆された。そこで、本細菌 4 L を 28°C で 3 日間培養後、培養液を遠心分離し、上清に Amberlite XAD-16N を加え攪拌し、樹脂を MeOH で抽出した。得られた抽出物を ODS flash chromatography に供し、各画分を UPLC-HR-ESIMS で分析し、候補化合物のピークが観測された画分 (90% および 100% MeOH 溶出画分) を 100% MeOH でゲルろ過した。候補化合物を含む画分をさらに各種条件で HPLC に供した結果、候補化合物を 4.2 mg 単離した。

単離した化合物は、HR-ESIMS スペクトルから m/z 895.5491 $[M+H]^+$ であり、分子式が $C_{43}H_{74}N_8O_{12}$ であると推定された。¹H, ¹³C, および 2D NMR スペクトルを詳細に解析した結果、本化合物は 1 個の alanine、2 個の *N*⁵-acetyl-*N*⁵-hydroxyornithine、6-amino-3,5-dihydroxy-7-(1'-*H*-imidazol-5'-yl)heptanoic acid 構造 (Aiha) を有し、末端に脂肪鎖構造をもつ新規 lipopeptide であることが分かり、pseudoalteropeptide A と名付けられた (Figure 1)。特に、Aiha 構造は、天然化合物としては初めての部分構造であることが分かった。これらの部分構造の並びは、2D NMR の解析および ESIMSMS スペクトルの解析によって決定した。また、脂肪鎖中の二重結合の位置は、本化合物のエポキシ誘導体の ESIMSMS スペクトルの解析によって決定した。

Pseudoalteropeptide A は、グラム陽性菌 *Micrococcus luteus* およびグラム陰性菌 *Escherichia coli* に対し抗菌活性を示さなかったが、Jurkat human T lymphocyte cells に対し、IC₅₀ 10.6 μM で細胞毒性を示すことが分かった。海洋環境は一般的に鉄の濃度が低く、シデロフォアによる鉄の効率的な取り込は海洋細菌の生存に重要であるということが知られている。そこで、pseudoalteropeptide A においても、鉄キレート活性を解析したところ、本化合物は IC₅₀ 0.56 mM で活性を示した。よって、pseudoalteropeptide A は、海洋シデロフォアとしての役割を持つことが示唆された。

これらの研究から、天然資源からの新規化合物の探索が困難になりつつある現在においても、未利用な天然資源を探索源としたり、それらの天然資源のゲノム情報を活用することで、より効率的な新規化合物探索の可能性を示すことができた。現在ゲノム情報が広く公開されている微生物においても、二次代謝産物生合成遺伝子の解析によって、ユニークな新規化合物を生産する微生物の候補が種々存在することが分かったことから、今後もさらなる新規化合物が発見されることが期待される。

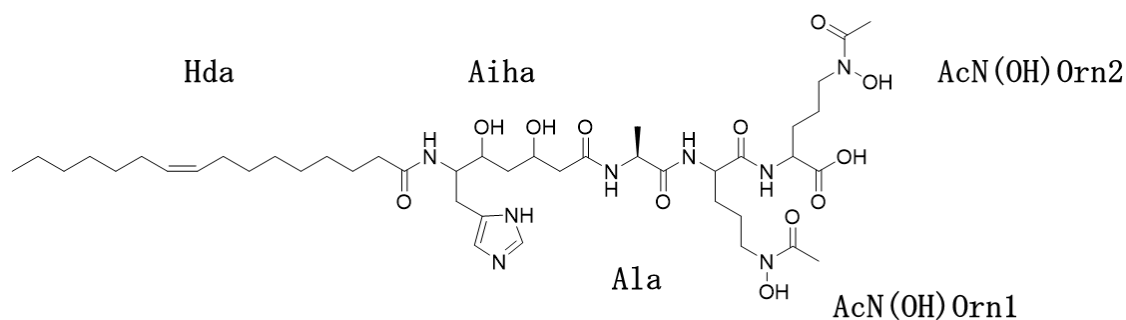


Figure 1. pseudoalteropeptide A の化学構造

<引用文献>

- 1) Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucocoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH, antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 2015;43;W237-W243.
- 2) Machado H, Sonnenschein EC, Melchiorson J, Gram L. Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria. *BMC Genomics* 2015;16;158.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Reiko Ueoka, Naoya Shinzato, Noritaka Kagaya, Hikaru Suenaga, Kazuo Shin-ya	4. 巻 74
2. 論文標題 Pseudoalteropectide A, a novel lipopeptide from the marine bacterium Pseudoalteromonas piscicida SWA4_PA4 isolated from marine seaweed	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 105-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-020-00377-z	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------