

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16023

研究課題名（和文）休眠遺伝子覚醒機構の解明と新規天然物探索基盤の確立

研究課題名（英文）Launching platforms for getting new secondary metabolites and revealing mechanism of activating cryptic BGCs

研究代表者

吉村 彩（Yoshimura, Aya）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：60866416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細菌が生産する天然有機化合物（天然物）は細菌ゲノムにコードされた生合成遺伝子クラスターを設計図として生合成される。細菌が保有する生合成遺伝子のうち80%以上は通常の研究室培養条件では発現しない休眠遺伝子に分類され、休眠遺伝子由来の天然物は未開拓な有用資源として注目されている。本研究では細菌由来の細胞外膜小胞（MVs）によって生産誘導される天然物を複数見出し、それら天然物がMVsと共にメディエーターとして関与する異種菌間相互作用が存在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではMVsで細菌を刺激することで複数の未開拓天然物を発見した。さらに、MVsと天然物を介した異種細菌間コミュニケーションが存在することを見出し、そのメカニズムを明らかにした。我々が発見した天然物の中にはユニークな生物活性を有する新規天然物が含まれており、それらは創薬リード化合物として期待できる。さらに、MVsと化合物を介して細菌が相互作用することは我々が初めて見出した現象であり、本現象は腸内細菌叢でも見られると予想されることから、MVsと化合物を用いて疾患に関与する細菌を変調させる新たな治療戦略にも資すると期待している。

研究成果の概要（英文）：In general, bacterial natural products are biosynthesized from primary metabolites through cascade reactions catalyzed by biosynthetic enzymes encoded in bacterial genomes. Recent significant breakthroughs in sequencing and bioinformatics analyses revealed that bacterial genomes encode many more biosynthetic genes than previously estimated. However, most of them are referred to as cryptic or silent biosynthetic genes that are expressed poorly or not at all in conventional laboratory culture conditions. In this study, we discovered that bacterial membrane vesicles (MVs) can induce natural product production by isolating some natural products from several strains. Moreover, we propose an interbacterial hostile interaction between two distinct Gram-negative bacteria through their own MVs and natural products.

研究分野：天然物化学

キーワード：細胞外膜小胞 休眠遺伝子 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

現在使用されている医薬品の大半は天然物をそのまま、あるいは一部改変して用いられている。しかし、微生物からの新規化学骨格を有する天然物の報告は減少の一途を辿っている。天然物生合成酵素をコードする遺伝子は微生物ゲノム上にかたまっている存在し、生合成遺伝子クラスターと呼ばれる。近年、ゲノムシーケンス・バイオフィンフォマティクス技術の発展により微生物は我々が予想している以上に多くの生合成遺伝子クラスターを保持することが明らかになった。しかし、それらの約 80% は通常の研究室培養条件下では発現しておらず、休眠遺伝子と呼ばれる。現在、構造未知の天然物を生産する休眠遺伝子が微生物 1 種につき 20-40 個存在すると言われている。しかし、休眠遺伝子の覚醒機構が全く解明されていないため、現状では休眠遺伝子を合理的に活用できていない。

2. 研究の目的

本研究では新規天然物を合理的に取得することを目的に休眠遺伝子の覚醒に基づく天然物探索基盤を確立する。すなわち、休眠遺伝子を活性化して天然物の産生を誘導する刺激を明らかにし、その休眠遺伝子覚醒機構を解明することで迅速かつ簡便に天然物を探索できるプラットフォームを創出する。本研究では特にトランスポゾン変異と細菌由来の細胞外膜小胞 (MV_s) に着目して休眠遺伝子活性化を試みる。

トランスポゾンは「動く遺伝子」とも呼ばれ、ゲノム中を自由に出入りできる遺伝子断片である。細菌のゲノムにコードされた天然物生産調節因子をトランスポゾンで変調させられれば、その変異株は休眠遺伝子の発現を活性化することが期待できる。さらに、得られる天然物の生合成遺伝子クラスターとトランスポゾンによって変異させられた遺伝子の関係を明らかにすることで休眠遺伝子の発現を調節するメカニズムが理解できる。

MV_s はほとんどの細菌が放出する細胞外膜小胞で、タンパク質・DNA 断片や小分子化合物を内包する脂質二重膜小胞である。最近の研究により MV_s は細菌間相互作用のメディエーターとして機能することが報告されている。通常の実験室培養条件下では発現しない休眠遺伝子も異種細菌が多数存在する自然環境では発現していると予想できる。研究室培養条件下で MV_s を添加して細菌を培養することで休眠遺伝子の発現が活性化できると期待した。さらに細菌間相互作用に寄与する MV_s によって生産誘導された化合物は MV_s と同様に細菌間相互作用に関与すると予想される。MV_s が天然物生産菌に与える影響と得られる天然物が MV_s 生産菌に与える影響を検証することで、MV_s と天然物を介した異種菌間相互作用メカニズムを理解できる。

3. 研究の方法

まずトランスポゾン変異もしくは MV_s 刺激により細菌が生産誘導する天然物を LC-MS スクリーニングもしくは生物活性を指標に探索する。被検菌には申請者の所属研究室所蔵の約 1000 株の細菌ライブラリーを用いる。ヒットした代謝物を細菌培養液から精製し、化学構造を決定する。その後、トランスポゾン変異もしくは MV_s が天然物生産を誘導するメカニズムを明らかにするために各種生化学実験やケミカルプローブを用いたケミカルバイオロジー的なアプローチを適宜用いて、天然物生産誘導の活性化因子の特定を目指す。さらに当該活性化因子の作用機構解析によってトランスポゾン変異もしくは MV_s が休眠遺伝子を活性化するメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

トランスポゾン変異による休眠遺伝子活性化については、複数の環境分離株を対象に変異株ライブラリーを作製した。さらに抗菌活性評価と CAS assay によって特定の変異株のみで生産誘導される天然物を探索した。その結果、いくつかの一次代謝産物を見出したものの、天然物の取得には至っておらず、引き続き探索を進める。

MV_s による休眠遺伝子活性化法の確立には *Burkholderia multivorans* 由来 MV_s を使用した。当該 MV_s は細菌培養液上清を 2 度の超遠心分離に供することで採取した。得られた MV_s は形態観察、生化学・物理化学的解析により一般的な MV_s の特徴を有することを確認した。次に *B. multivorans* 由来 MV_s を約 100 株の細菌種に添加・培養し、MV_s によって生産誘導された代謝物を LC-MS にて探索した。この際、探索を簡便かつ迅速に行うために MZmine2 と自作の Python スクリプトを用いたメタボローム解析を行った。その結果、多様な細菌種から多くのヒット代謝物を見出した。

そのうち放線菌から 8 の新規化合物を含む 13 の天然物を、Bacteroidetes 属細菌から 1 つの新規天然物を取得した。なかでも *Streptomyces niveoruber* が生産誘導した etamycin とその新規類縁体はグラム陽性菌に対して強力な抗菌活性を示した。さらに *S. niveoruber* もグラム陽性菌であるにも関わらず etamycin によって生育が阻害されなかった。そこで etamycin 生合成遺伝子クラスター中の遺伝子がコードするリアーゼの機能解析を行った結果、本酵素がデブシペプチド etamycin を直鎖状ペプチドに変換することで etamycin に対する自己耐性を獲得していることを示唆する結果を得た。

さらに *Xenorhabdus innexi* から 5 つの新規化合物を含む 8 つの天然物を取得した。さらに、MV_s 添加・非添加での *X. innexi* 由来転写産物の RT-qPCR、RNAseq 実験により MV_s はクオラムセンシングを介して天然物の生産量を上昇させることを見出した。さらに *B. multivorans* 由来

MVs によって生産誘導された天然物の一部は *X. innexi* 由来 MVs に内包されており、*X. innexi* 由来 MVs は *B. multivorans* の生育を抑制した。そこで性質が類似している一方で当該天然物を内包しない MVs を *X. innexi* 近縁種から採取した。得られた MVs は *B. multivorans* の生育に影響を与えなかった。さらに、*B. multivorans* 由来 MVs は *X. innexi* の MVs 生産量を増加させ、その MVs にはより多くの当該天然物が内包されていた。以上の結果から *B. multivorans* と *X. innexi* 間に MVs と天然物を介した競争的相互作用が存在することを示した。今後はメタボローム解析により見出した MVs によって生産誘導された天然物の単離・構造決定を引き続き行い、より多くの新規天然物の獲得を目指す。さらに、得られる天然物と MVs を介した新たな異種菌間相互作用の解析を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 吉村彩 |
| 2. 発表標題 細菌間相互作用様式の解明を目指した天然物研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Aya Yoshimura |
| 2. 発表標題 Studies on natural products induced by bacterial membrane vesicles |
| 3. 学会等名 The 53rd Korean Annual Meeting Society for Pharmacognosy（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉村彩、佐伯梨緒、中田隆介、富本将汰、松田研一、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細菌が放出する細胞外小胞による二次代謝産物生産誘導に関する研究 |
| 3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本田拓巳、吉村彩、中田隆介、松田研一、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細胞外小胞が生産誘導する放線菌由来新規抗菌性天然物の探索 |
| 3. 学会等名 第36回日本放線菌学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 本田拓巳、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細菌由来細胞外膜小胞によって生産誘導された抗菌性天然物に関する研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中田隆介、吉村彩、本田拓巳、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 LCMSによる細胞外膜小胞が生産誘導する新規天然物の網羅的探索 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 本田拓巳、中田隆介、吉村彩、松田研一、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 休眠遺伝子活性化による新規抗菌性天然物の取得 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐伯梨緒、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 Xenorhabdus innexi由来天然物と細胞外小胞を介する異種微生物間相互作用メカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 中田隆介、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細胞外小胞によって生産誘導される天然物の網羅的探索 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会北海道支部第45回支部例会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐伯梨緒、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 微生物間相互作用により生産誘導される天然物に関する研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉村彩、佐伯梨緒、冨本将汰、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 微生物由来メンブレンベシクルが生産誘導する天然物の探索 |
| 3. 学会等名 第23回 天然薬物の開発と応用シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐伯梨緒、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細菌の放出する細胞外小胞を利用した休眠遺伝子活性化と新規天然物探索 |
| 3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐伯梨緒、吉村彩、松田研一、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細菌が放出する細胞外小胞を利用した休眠遺伝子活性化と新規天然物探索 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐伯梨緒、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 細菌の放出する細胞外小胞を利用した休眠遺伝子活性化と新規天然物探索 |
| 3. 学会等名 第68回 北海道薬学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本田拓巳、富本将汰、Jabal Rahmat Headar、吉村彩、脇本敏幸 |
| 2. 発表標題 環境分離株Cryseobacterium属細菌が外部刺激に応答して生産誘導する天然物の単離・構造決定 |
| 3. 学会等名 第68回 北海道薬学大会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|