

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：32606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20566

研究課題名（和文）放線菌におけるヒ素二次代謝経路の開拓及び新規ヒ素二次代謝産物の探索研究

研究課題名（英文）Researches on arseno-organic secondary metabolites produced by actinobacteria

研究代表者

星野 翔太郎（Hoshino, Shotaro）

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：10962988

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では最初に、放線菌 *Streptomyces lividans* 66 が生産する構造未知有機ヒ素代謝物 (bisenarsan) の単離構造決定を目指した。微量精製物に対する予備的な構造解析から、生合成前駆体を予測・化学合成し、培地添加する事で bisenarsan の生産性を向上させた。これにより詳細なスペクトル解析を経て構造決定に至り、更に抗菌活性に関する知見も得られた。

また bisenarsan 生合成への関与が示唆されており、他の放線菌ゲノムにも広く分布が認められていた2つの酵素遺伝子について、実際に bisenarsan 生合成に関与する事を遺伝子破壊及び遺伝子相補実験により示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、微生物二次代謝によって生産される有機ヒ素化合物に優れた生理活性が見出された一方で、微生物ヒ素二次代謝に関する知見は依然乏しかった。本研究で化学構造が解明された bisenarsan は放線菌二次代謝産物として同定された初の有機ヒ素化合物であった。すなわち、生理活性天然物の主要な生産者である放線菌において、ヒ素二次代謝経路の存在を実験的に立証された点で本研究は大きな学術的意義を持つ。

また、本研究で bisenarsan 生合成への関与が立証された酵素遺伝子は他の放線菌ゲノムにも広く分布する事から、今後多様な代謝経路によって様々な生理活性を備えた有機ヒ素天然物の獲得に繋がる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, we initially attempted to elucidate the chemical structure of a structurally unknown organoarsenic metabolite (named bisenarsan) produced by *Streptomyces lividans* 66 (actinomycetes). Based on the preliminary structural analysis against trace purified material, we predicted the biosynthetic intermediate of bisenarsan and chemically synthesized it. By feeding the predicted biosynthetic intermediate into the culture medium, the production level of bisenarsan was significantly improved, enabling us to perform detailed structural analysis of bisenarsan and determine its chemical structure.

We also carried out gene disruption and genetic complementation of two enzyme genes and showed that they are involved in bisenarsan biosynthesis. These genes have previously been proposed to be implicated in bisenarsan biosynthesis and are widely distributed in the genomes of other actinomycetes.

研究分野：天然物化学

キーワード：有機ヒ素天然物 放線菌 二次代謝 生合成 単離構造決定

1. 研究開始当初の背景

毒物としての印象が強いヒ素であるが、その毒性は C-As 結合を持たない無機ヒ素に依る所が大きく、分子内に C-As 結合を持つ有機ヒ素の毒性は一般的に低いとされる。有機ヒ素は天然物としても報告されているが、大部分は無機ヒ素の普遍的な解毒産物やその関連代謝物であり、特に微生物二次代謝を介した有機ヒ素生産に関する知見は長らく存在しなかった。一方、2016 年に土壌細菌 *Burkholderia gladioli* より有機ヒ素アミノ酸 arsinothricin が単離同定され、更に多剤耐性菌に対する増殖阻害活性が報告された。すなわち、有機ヒ素化合物は微生物二次代謝産物として生産され、更に有用な薬理活性を備えることが近年になって示された。

一方で微生物の有機ヒ素二次代謝に関する知見は依然乏しく、二次代謝産物の主要生産者である放線菌においても、単離構造決定が行われた有機ヒ素二次代謝産物は皆無であった (普遍的な解毒産物と見做されるメチル化代謝物を除く)。一方、先行研究で *Streptomyces lividans* 66 による有機ヒ素化合物の生産が報告されていたが、当該代謝物 (本研究で bisenarsan と命名) の単離構造決定は行われていなかった (分子式のみが報告されていた)。

また、bisenarsan の生合成遺伝子の 1 つとして SLI_1096 (ピルビン酸転移酵素ホモログ遺伝子、本研究で *bsnM* と命名) が同定されており、下流遺伝子 SLI_1097 (リン酸ムターゼホモログ遺伝子、本研究で *bsnN* と命名) と共に、放線菌ゲノムに広く分布する事が報告されていた。一方で *bsnN* 遺伝子の具体的な役割に関する知見は存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究では *S. lividans* 66 が生産する構造未知有機ヒ素天然物 (bisenarsan) を単離し、化学構造の解明と生理活性の評価を行う。また *bsnN* の bisenarsan 生合成に関する知見を得るため、*bsnN* 遺伝子破壊株における bisenarsan 生産の有無を確認する。これらにより、放線菌における有機ヒ素二次代謝経路の存在を実験的に立証する事が第一の目的である。

また、ヒ素耐性放線菌株や *bsnMN* オペロン保有放線菌株について、メタボローム解析等による新規有機ヒ素天然物の探索を行い、放線菌における有機ヒ素二次代謝の多様性解明を目指す。

3. 研究の方法

S. lividans 66 をヒ酸塩 (無機ヒ素) を含む培地で大量培養を行い、既報の分子式を手掛かりとして、bisenarsan の単離精製を行う。精製した bisenarsan について、NMR などのスペクトル解析による構造決定を行うとともに、ディスク拡散法によって各種抗菌活性を評価する。また生合成遺伝子に関する知見を得るため、*bsnM* 及び *bsnN* についてゲノム編集や相同組換えによる遺伝子破壊を実施し、LC-MS 解析によって両破壊株における bisenarsan 生産の有無を確認する。破壊株において bisenarsan の生産消失が確認された場合は、強制発現用プラスミドを用いた当該遺伝子の相補を実施する。

また、ヒ素耐性放線菌株や *bsnMN* オペロン保有放線菌株 (*S. lividans* 66 以外) を環境分離株或いは寄託株として入手する。これらの株をヒ素存在下及び非存在下で培養を行い、メタボローム解析等を行う事により、ヒ素存在条件下特異的に生産される有機ヒ素天然物を同定し、単離構造決定・生理活性評価・生合成解析を進める。

4. 研究成果

はじめに、ヒ酸塩を含む液体培地で *S. lividans* 66 を培養し、培養上清を LC-MS にて分析した。その結果、bisenarsan の分子式として報告されていた $C_{14}H_{27}AsO_5$ に対応する質量電荷比のピークが検出され、このピークはヒ酸塩を含まない培養条件では検出されなかった (図 1A)。

そこで、ヒ酸塩を含む液体培地で *S. lividans* 66 の大量培養を実施し (3 L)、 $C_{14}H_{27}AsO_5$ に対応する質量電荷比のピーク強度を指標として、クロマトグラフィーによる bisenarsan の精製を進めた。結果、痕跡量 (0.1 mg 未満) であったものの bisenarsan の精製を達成した。この微量精製物に対する NMR 及び MS/MS 解析の結果、構造決定には至らなかったものの、本化合物が (2-hydroxyethyl)arsonic acid (2-HEA, 図 1A) を部分構造に持つ事が強く示唆された。

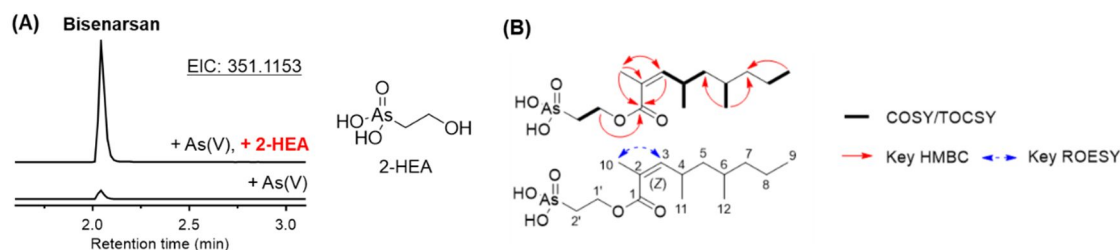


図 1. Bisenarsan の構造決定: (A) 推定生合成前駆体 (2-HEA) の培地添加による bisenarsan 生産向上 (B) 二次元 NMR 解析による bisenarsan の構造決定

そこで、2-HEA を化学合成によって調製し、*S. lividans* 66 の培養培地にヒ酸塩と共に添加した。その結果、ヒ酸塩単独添加時と比較して、2-HEA を添加した場合に bisenarsan の大幅な生産向上が認められた (図 1A)。2-HEA を用いた改良条件を用いて、*S. lividans* 66 の大量培養を再度実施し (3.5 L)、最初と同様の手順でクロマトグラフィー精製を実施した結果、今回は 3.1 mg の精製化合物を得た。これにより、微量精製物に対しては困難であった二次元 NMR を用いた構造解析が可能となり、bisenarsan の構造決定に至った (図 1B)。

当初の推測通り、bisenarsan は 2-HEA の誘導体であり、2-HEA の水酸基と分岐脂肪酸がエステル縮合した新規化合物であった。また、本化合物は放線菌二次代謝産物として単離構造決定が達成された最初の有機ヒ素化合物であった。現在の所、bisenarsan に抗菌活性は認められていないが、生合成中間体と考えられる 2-HEA は黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対する特異的な抗菌活性を示した。

次に bisenarsan 生合成に関する知見を得るため、推定生合成遺伝子である *bsnM* 及び *bsnN* について、遺伝子破壊株を作製した。両遺伝子破壊株をヒ酸塩添加培地にて培養し、培養上清を LC-MS で解析した所、野生株で確認されていた bisenarsan 生産が消失した (図 2A)。そこで各遺伝子破壊株に対し、強制発現用プラスミドを用いて各遺伝子の相補を行った所、いずれの相補株においても bisenarsan 生産の回復が認められた (図 2A)。すなわち、*bsnM* 及び *bsnN* は bisenarsan 生合成において必須であることが示唆され、特に *bsnN* の関与を実験的に示した最初の例であった。また *bsnM* については過去の遺伝子破壊実験により bisenarsan 生合成への関与が既に示唆されていたが、本研究で実施した遺伝子相補実験によって更に補強された。

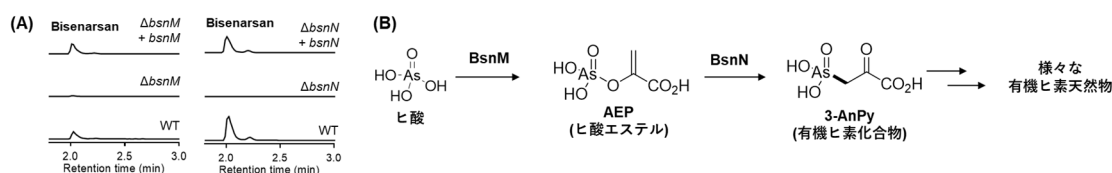


図 2. Bisenarsan の生合成研究: (A)*bsnM* 及び *bsnN* 遺伝子の破壊実験と遺伝子相補実験 (B) BsnM 及び BsnN の推定機能

BsnM 及び BsnN は無機ヒ素であるヒ酸を不安定なヒ酸中間体 arsenoenolpyruvate (AEP) を経由して、有機ヒ素 3-arsenopyruvate (3-AnPy)へと変換すると推測されており、*S. lividans* 66 では 3-AnPy が更なる代謝変換を受けて bisenarsan が生合成されると推測される (図 2B)。興味深い事に、*bsnM* 及び *bsnN* は互いに隣接する形で放線菌ゲノムに広く分布しており、放線菌では 3-AnPy を共通中間体とする多様な有機ヒ素二次代謝経路が存在する事が強く示唆された。

最後に本研究では、*bsnMN* ホモログ含有放線菌や環境中由来のヒ素耐性放線菌株について、ヒ酸存在下及び非存在下で培養を行い、培養上清のメタボローム解析を実施した。しかしながら、ヒ素によるストレス自体が放線菌に対する大幅な代謝変化をもたらした事から、含ヒ素化合物の特異的な検出が難しく、現時点では bisenarsan 以外の新たな有機ヒ素天然物を同定には至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Horwitz Samantha M., Blue Tamra C., Ambarian Joseph A., Hoshino Shotaro, Seyedsayamdost Mohammad R., Davis Katherine M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Structural insights into inhibition of the drug target dihydroorotate dehydrogenase by bacterial hydroxyalkylquinolines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 420 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cb00255d	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 Mori Takahiro, Nakashima Yu, Chen Heping, Hoshino Shotaro, Mitsunashi Takaaki, Abe Ikuro	4. 巻 58
2. 論文標題 Structure-based redesign of Fe(<i>oxoglutarate</i>)-dependent oxygenase AndA to catalyze spiro-ring formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5510 ~ 5513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc00736c	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 Asamizu Shumpei, Ijichi Shinta, Hoshino Shotaro, Jo Hansaem, Takahashi Hidenori, Itoh Yuko, Matsumoto Sohkiichi, Onaka Hiroyasu	4. 巻 17
2. 論文標題 Stable Isotope-Guided Metabolomics Reveals Polar-Functionalized Fatty-Acylated RiPPs from <i>Streptomyces</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2936 ~ 2944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00601	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 Han Esther J., Lee Seoung Rak, Hoshino Shotaro, Seyedsayamdost Mohammad R.	4. 巻 17
2. 論文標題 Targeted Discovery of Cryptic Metabolites with Antiproliferative Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 3121 ~ 3130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00588	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 Ijichi Shinta, Hoshino Shotaro, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu	4. 巻 89
2. 論文標題 SolS-catalyzed sulfoxidation of labionin to solabionin drives antibacterial activity of solabiomycins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & medicinal chemistry letters	6. 最初と最後の頁 129323 ~ 129323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2023.129323	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 Hoshino Shotaro, Ijichi Shinta, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu	4. 巻 145
2. 論文標題 Insights into Arsenic Secondary Metabolism in Actinomycetes from the Structure and Biosynthesis of Bisenarsan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 17863 ~ 17871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.3c04978	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 Do Kiep Minh, Hoshino Shotaro, Kodama Takeshi, Nguyen Hien Minh, Van Le Son, Ikumi Naotaka, Onaka Hiroyasu, Morita Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A new 3,4-seco-isopimarane and three new isopimarane diterpenoids from <i>Kaempferia champasakensis</i> collected from Vietnam and their cytotoxic activities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	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) 10.1007/s11418-024-01789-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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 星野 翔太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康
2. 発表標題 放線菌が生産する有機ヒ素二次代謝産物に関する研究
3. 学会等名 2022年度(第36回) 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 星野 翔太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康
2. 発表標題 放線菌におけるヒ素二次代謝経路に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 翔太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康
2. 発表標題 放線菌に分布する有機ヒ素二次代謝経路の開拓
3. 学会等名 2023年度(第37回)日本放線菌学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 翔太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康
2. 発表標題 新規C-As結合形成反応を基盤とした 放線菌ヒ素二次代謝経路の開拓
3. 学会等名 第65回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 翔太郎
2. 発表標題 放線菌における未利用二次代謝経路を活用した新規天然物の探索
3. 学会等名 第24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 2023年

1. 発表者名 星野 翔太郎
2. 発表標題 放線菌におけるヒ素二次代謝に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度 関東支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shotaro Hoshino, Shinta Ijichi, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka
2. 発表標題 Actinomycetes expand the diversity of organoarsenic natural products
3. 学会等名 2023 The 1st Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Natural Products Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 翔太郎
2. 発表標題 新規炭素 - ヒ素結合形成反応を基盤とした未開拓天然物生合成経路の集積
3. 学会等名 学術変革領域研究(A) 「予知生合成科学」 第3回公開シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 星野 翔太郎
2. 発表標題 放線菌が拓く有機ヒ素天然物の世界
3. 学会等名 日本薬学会第144年会 (横浜) (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本農芸化学会 2023年度トビックス賞受賞
日本薬学会生薬天然物部会 令和5年度奨励賞受賞

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
---------	---------