

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510309

研究課題名(和文)新規抗卵菌物質を分子プローブとした卵菌代謝系の解析と応用への基盤研究

研究課題名(英文)Basic studies on activities, action mechanism and application of a new anti-oomycota antibiotic

研究代表者

今村 信孝 (IMAMURA, NOBUTAKA)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：10160061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵菌は動植物に感染し、時に甚大な被害を与えている。微生物生産物の化合物046-Eは、卵菌に選択的な活性を示すことから、応用への検討を行った。046-Eの標的結合分子を解析した所、nucleoside diphosphate kinase Bに結合するが、酵素活性は阻害しなかった。安全性、魚卵を用いた有効性の検討を行い、水棲動植物プランクトンへの安全性が高く、魚卵への卵菌の感染を低濃度で阻害する事を見出した。また、生産菌からアングサイクリン系抗生物質である046-Eの生合成遺伝子クラスターのクローニングと同定を試み、046-Eの生合成に関する遺伝子クラスターを見出した。

研究成果の概要(英文)：Oomycota infect plants and animals and cause severe damage in some situation. Compound 046-E produced by microorganism possess selective activity against oomycota, therefore, it seemed to become a useful preventive agent. We investigated the target molecule of 046-E and identified nucleoside diphosphate kinase B as a binding protein, however, its enzymatic activity was not inhibited by 046-E. We also studied on effects of 046-E to aquatic plankton and preventive effects against oomycota infection on fish eggs, and it was revealed that 046-E is harmless to aquatic plankton and possess potent preventive activity against oomycota infection on fish eggs at low concentration. We attempted to clone and identify a biosynthetic gene cluster for an angucycline-type antibiotics 046-E from Streptomyces sp. TK08046. Finally, we found that a gene cluster involved in 046-E biosynthesis.

研究分野：微生物化学

キーワード：生理活性物質 結合タンパク質 生合成遺伝子

1. 研究開始当初の背景

卵菌類は菌糸など形態的に菌類に類似していることから、歴史的に真菌類の一つとして扱われることが多かったが、近年は分子系統学的な検討から、褐藻や珪藻類に近縁と考えられるようになってきている。卵菌類は独特の性質・生活環を持つ生物で、生理・生態的に不明な点も多く、謎多き生物と考えられる。

人類にとって卵菌類は動植物の病気を引き起こし、多大な被害をもたらす生物でもある。市販薬はあるものの優れた抗卵菌剤の開発が求められている。このような背景のもと魚類に感染し、水産養殖業で多大な被害をもたらすミズカビ(*Saprolegnia parasitica*)を当面の目標に据えて、微生物から高い選択性を示す化合物を探索した結果、選択性の高い放線菌由来の新規アングサイクリン系抗生物質 046-A および E を発見した(図1)。卵菌類、少なくとも *S. parasitica* の生存に不可欠な特有の生体分子に働くと考えた。さらに、本物質自身が蛍光を持つことから、蛍光プローブとして標的分子の解明に応用できると考えた。

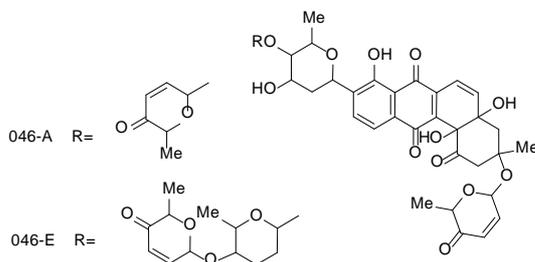


図1. 046-A および E の化学構造

2. 研究の目的

人類の営みに多大な被害を及ぼし、生物学的には謎多き卵菌類を対象生物とし、新たに見出した選択性の高い抗卵菌物質 046-E 自身を蛍光プローブとして用いて、卵菌特有の生存に不可欠な標的分子を明らかにするとともに、卵菌類の生理・代謝系について知見を得る。また同時に、優れた薬剤が渴望されている魚卵の抗ミズカビ予防薬として、046-E を応用展開するための基礎データを集めるとともに、本抗生物質の生合成遺伝子解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 046-E の標的分子の解明と卵菌類の生理・代謝系の解析

046-E の抗卵菌スペクトルの測定

卵菌類で分子系統的に近縁なミズカビ科に属す *Achlya* 属と、陸上植物病原菌の *Phytophthora* 属とを入手し、これらへの 046-E の効果を検討した。また、淡水養殖場でミズカビに感染したホンモロコからミズカビを単離し、046-E の効果を検討した。検討では、孢子からの発芽阻害、菌糸の伸長阻害に分けて、活性を評価した。

S. parasitica への 046-E の影響評価と染色による結合部位の特定

孢子からの出芽率、菌糸成長速度など、*S. parasitica* の生活環各ステージでの 046-E の影響を評価した。また、孢子、および菌糸を、DAPI および高濃度の 046-E とで染色し、蛍光顕微鏡、レーザー共焦点蛍光顕微鏡で比較検討し、046-E が結合する細胞内の部位を推定した。

046-E 結合分子の単離と機能の推定

上記の染色結果を踏まえ、高濃度の 046-E で処理した *S. parasitica* 菌糸のホモジネートを、SDS-PAGE で展開し、蛍光を示す2つのバンド(16kDaと22kDa)をゲルから切り出して、046-E 結合分子を単離した。これらの nano LC-MS/MS 測定を行い、データベース上の *S. parasitica* CBS223.65 株のデータから、ペプチドフィンガープリント法によりタンパク質の同定、機能の推定を行った。

046-E による結合タンパク質の酵素活性阻害

上記タンパク質2種はいずれも nucleoside diphosphate kinase B と推定された。そこで、*S. parasitica* CBS223.65 株のデータから、プライマーを設計し、N末端に Histag を付与し、ベクターに導入して大腸菌に発現させ、カラムで精製・脱塩して、2種の His タグ付の酵素(His-NDPK1、2)を調製した。常法の酵素活性測定法により、046-E の酵素活性阻害を評価した。

(2) ミズカビ予防薬としての応用展開への基礎的データの取得

魚卵を用いたミズカビ感染予防効果、魚卵発育の測定、安全性評価

養殖場でのマスの産卵は春、秋の年2回のみで、再現実験などが困難だったため、魚毒試験などの実験で一般的に用いられているメダカ有精卵を用いて実験を行った。まず、通常ミズカビが繁茂しやすい魚の死卵を用いて、感染の予防効果を調べた。同時に、受精卵を用いて眼点形成、あるいは孵卵への影響を調べた。魚卵での 046-E の局在場所の検討を、046-E 処理した魚卵をホルマリン固定後、凍結切片を作製し蛍光顕微鏡を用いて行った。

安全性評価、光安定性

初期段階での安全性評価として、水棲動物プランクトン(ミジンコ *Daphnia pulex*、クロレラ *Chlorella vulgaris*、藍藻 *Microcystis aeruginosa*)、動物細胞(Hela細胞)への毒性評価と、*Salmonella enterica* TA100 株を用いて Ames 試験を行った。

また、実験を遂行している中で、光安定性の検討が必要と考えられたので、検討を加えた。

生産菌 TK08046 の生合成遺伝子の解析

放線菌が生産するアングサイクリン系抗生物質の生合成遺伝子解析は、既に幾つかの例 (Appl. Environ. Microbiol. 76, 4201, 2010 など) が知られており、芳香族ポリケチド生合成遺伝子の中で、芳香化酵素と環化酵素が塩基配列の保存性が高く、プローブとして利用されてアングサイクリン系抗生物質の生合成遺伝子が取得されている。例に倣い、生産菌 TK08046 のコスミドライブラリー (ゲノム DNA ライブラリー) を作製後、生産菌 TK08046 のゲノム DNA を鋳型に PCR で増幅したアングサイクリンの環化酵素と相同性を示す遺伝子をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを行い、コスミドの一次選抜を行った。さらに、PCR で芳香化酵素をコードする遺伝子の増幅を指標に生合成遺伝子を含むと考えられるコスミドの二次選抜を行った。続いて、選抜したコスミドの塩基配列を決定し、本アングサイクリン生合成遺伝子の解明を検討した。また、得られた生合成遺伝子を、シャトルベクターを用いて放線菌 *Streptomyces lividans* に導入し、遺伝子導入株が 046-E を生産するかどうかを HPLC 分析することにより、取得した遺伝子が 046-E 生合成遺伝子であるかどうかの確認を行った。

4. 研究成果

(1) 046-E の標的分子の解明と卵菌類の生理・代謝系の解析

046-E の抗卵菌スペクトルの測定

18SrDNA による系統樹解析から、比較的近いミズカビの仲間である *Achlya rasemosa* には、胞子発芽阻害が 0.3 µg/ml で、また、菌糸伸長阻害は 50 µg/ml で認められた。一方、比較的遠いジャガイモ疫病菌の *Pytophthora infestans* では、胞子が取得できず、菌糸伸長阻害のみ測定した所、1.25 µg/ml で活性を示した。046-E は両者へ活性を示し、卵菌類に普遍的に生育阻害を起こすと考えられた。一方、琵琶湖の養殖場で罹病したホンモロコから、単離したミズカビ (18SrDNA 解析から *S. parasitica* と同定) へは、胞子発芽を 0.3 µg/ml、菌糸伸長を 25 µg/ml で阻害した。

S. parasitica への 046-E の影響評価と染色による結合部位の特定

046-E の *S. parasitica* への影響を評価した結果、発芽抑制を 0.08 µg/ml、菌糸伸長を 6.3 µg/ml で阻害し、胞子発芽阻害効果が顕著なことが分かった。046-E が蛍光を示すことから、*S. parasitica* の菌糸、胞子を 046-E 並びに DAPI 染色し、共焦点蛍光顕微鏡観察した結果、菌糸では細胞壁内側に、また胞子では核周辺の核膜上、あるいは核膜外近傍に 046-E が局在化していることを見出した (図 2)。

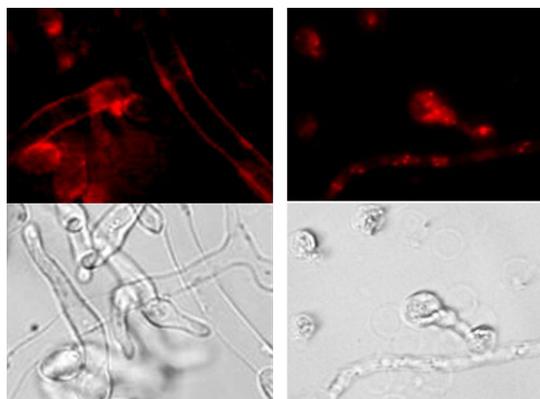


図 2. 046-E 染色後の菌糸 (左) ならびに胞子の蛍光 (上)、明視野 (下) 顕微鏡画像

046-E 結合分子の単離と機能の推定

S. parasitica 菌糸無細胞抽出液から、046-E 結合タンパク 2 種 (16kDa と 22kDa) を単離した。これらのペプチドフィンガープリント法による解析の結果、両者ともに nucleoside diphosphate kinase B (NDPKB) であることが強く示唆された。

046-E による結合タンパク質の酵素活性阻害

精製した His-NDPK1、His-NDPK2 ともに、これまでに報告されている NDPK と同様な V_{max} 、 K_m 値が得られた。しかしながら、046-E の His-NDPK1 に対する阻害 IC_{50} は 64 µg/ml で、His-NDPK2 へは阻害が見られなかった。*S. parasitica* に対する 046-E の MIC は 0.08 µg/ml であり、酵素阻害活性とはかけ離れている。即ち、046-E は NDPK のキナーゼ活性を阻害しているのではなく、その他の作用に関与していると考えられた。NDPK のキナーゼ活性以外の機能性タンパク質としての作用が、重要な意味を持つことが示唆された。

(2) ミズカビ予防薬としての応用展開への基礎的データの取得

魚卵を用いたミズカビ感染予防効果、魚卵発育の測定

実験生物とした広く用いられているメダカ有精卵を用い、046-E の毒性、*S. parasitica* 感染予防効果を検討した結果、25 µg/ml までの濃度では、有精卵、また孵化後の摂餌開始までの稚魚の期間で、眼点形成や体の異系 (催奇性) などの影響は見られず、また、*S. parasitica* の感染予防効果は 0.39 µg/ml で確認できたことから、優れたミズカビ予防薬となり得る物質であることが確認できた。また、魚卵での 046-E の局在を、046-E の蛍光を用いて観察した所、死卵では卵内部にまで 046-E が浸透していたが、生卵では卵膜のみに局在しており、卵内部には浸透していなかった (図 3)。この局在性が、高いミズカビ予防性能と魚卵への低い毒性を創り出していると考えられるが、局在性を生む要因については不明である。

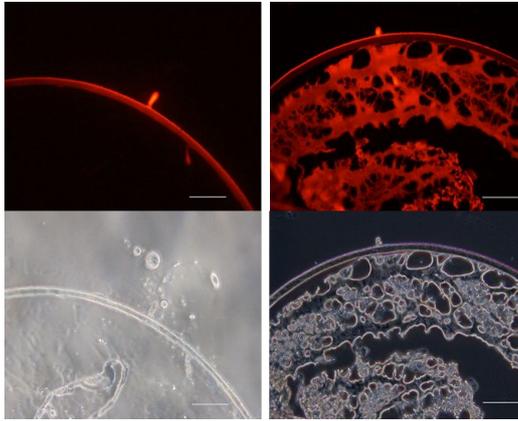


図3 . 046-E 染色後の生卵（左）ならびに死卵の蛍光（上）、明視野（下）顕微鏡画像

安全性評価、光安定性

安全性評価として、046-E の水環境への放出を想定して、水環境中に生息する動植物プランクトンへの影響を検討した結果、ミジンコ (*D. pulex*) へは 48.7 $\mu\text{g/ml}$ で半数の個体の遊泳を阻害したが、魚卵のミズカビ感染予防効果と比べれば、約 100 倍の濃度差があり、ミジンコへの影響は問題の無いレベルと考えられた。クロレラ (*C. vulgaris*)、藍藻 (*M. aeruginosa*) へは 100 $\mu\text{g/ml}$ でも生育に影響は与えなかった。また、一般的な初期毒性評価に用いられる HeLa 細胞へは、72 $\mu\text{g/ml}$ で毒性を示し、比較的弱いものと考えられる。*S. enterica* TA100 株を用いた Ames 試験では、50 $\mu\text{g/plate}$ で菌の生育を阻害したが、それ以下の濃度では変異原性は認められなかった。これらの結果から、046-E は水棲環境生物には影響を与えず、また、魚卵への負荷も少ない物質である事が明らかになった。

また、実験過程で 046-E の光安定性に懸念が持たれたため、メタノール中 25 に置いた 046-E の安定性を、HPLC 分析によって調べた。その結果、046-E を明所(光強度 30 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$)に置いたものは、低濃度のものほど分解速度が速く、試験した中で最も低い濃度の 20 $\mu\text{g/ml}$ では、6 時間で約 50% の残存率となった。しかしながら暗所では安定しており、取扱いには注意が必要ではあるが、光に配慮すれば使用可能なことが判明した。046-E の効力を十分に活かすためには、暗所での使用が望まれるが、養殖場での有精卵の孵化は暗所で行われるのが通例であることから、実用上は大きな障害とはならないと考えられた。

生産菌 TK08046 の生合成遺伝子の解析
 アングサイクリン系の化合物である 046-E の生合成遺伝子の全容を解明するために、046-E 生産菌由来のコスミドライブラリーを作製し、アングサイクリン系化合物の骨格形成に関わる環化酵素と芳香化酵素(図4)をコードする遺伝子を含むコスミド#36 を取得した。次いで、取得したコスミド#36 の塩基配列決定と解析を行った結果、アングサイクリン系抗生物質である urdamycin(図5)の生

合成に関わるポリケチド合成酵素や環化酵素(UrdF)、芳香化酵素(UrdL)と相同性を示す遺伝子やデオキシ糖の生合成遺伝子を含む 046-E の生合成に関与が考えられた遺伝子クラスターの存在が明らかとなった。そこで、046-E の生合成遺伝子を含むと考えられるコスミド#36 を放線菌 *Streptomyces lividans* へ導入することで、046-E が生産されるかどうかの検討を行った。コスミド#36 を導入した *S. lividans* の培養液を HPLC (図6) と LC-MS で分析した結果、046-E を生産していることが判明し、取得した遺伝子クラスターが 046-E の生合成遺伝子クラスターであることが明らかとなった。

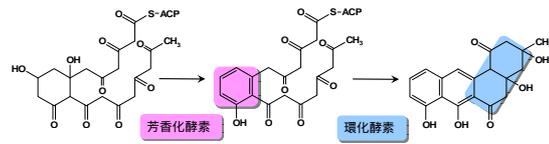


図4 . アングサイクリン合成に関与する酵素

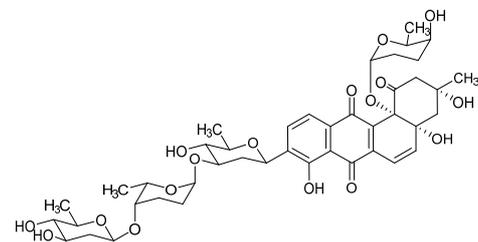
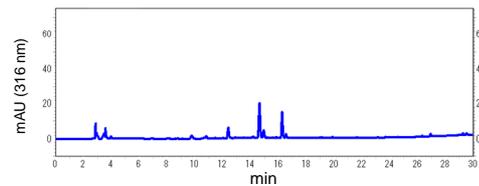
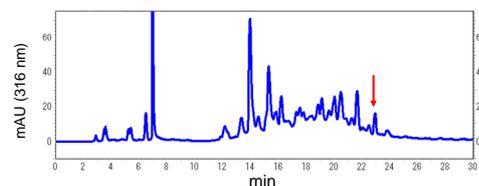


図5 . Urdamycin A の構造

(A) 空コスミド



(B) コスミド #36



(C) 046-E

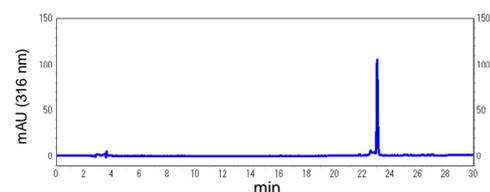


図6 . コスミドの導入を行った *S. lividans* の培養液の HPLC 分析

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 1件)

1. Kazuya Nakagawa, Choko Hara, Shinji Tokuyama, Kentaro Takada and Nobutaka Imamura, Saprolmycins A-E, new angucycline antibiotics active against *Saprolegnia parasitica*. *J. Antibiot.* 査読有, **65**, 599-607 (2012) DOI:10.1038/ja.2013.12

[学会発表](計 4件)

1. 川崎 崇、森山 亜沙子、渡邊 あゆみ、中川 和也、今村 信孝: Saprolmycin 生合成遺伝子クラスターの解析. 日本放線菌学会大会 (2014年6月19日、つくばカピオ(茨城県))

2. 川崎 崇、森山 亜沙子、渡邊 あゆみ、中川 和也、今村 信孝: Saprolmycin 生合成遺伝子のクローニング. 日本放線菌学会大会 (2013年9月5日、メルパルク広島(広島県))

3. 川崎 崇、渡邊あゆみ、中川和也、今村 信孝: Saprolmycin 生合成遺伝子の取得. 第133年会日本薬学会 (2013年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県))

4. 中川和也、松尾洋孝、角谷幸一郎、川崎 崇、今村 信孝: 新規抗卵菌物質 saprolmycinE の作用機作研究. 第133年会日本薬学会 (2013年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 信孝 (IMAMURA NOBUTAKA)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号: 10160061

(2) 研究分担者

川崎 崇 (KAWASAKI TAKASHI)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号: 00408733