

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651243

研究課題名(和文) 潜在的二次代謝の覚醒による亜熱帯微生物からの生物活性物質の探索

研究課題名(英文) Autoregulator addition strategy to awakening cryptic biosynthetic genes

研究代表者

仁平 卓也(Nihira, Takuya)

大阪大学・生物工学国際交流センター・教授

研究者番号：70144441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：

3種の放線菌覚醒物質(virginiae butanolide, IM-2, avenolide)を化学合成し、代表的放線菌50種を用いて検討を加えた。3種類の混合物として、最小有効濃度の10倍量を、対数増殖期に添加し、無添加の場合とその生産する二次代謝物質プロファイルと比較した結果、2種の放線菌(*S. sahachiroi*と*S. narbonensis*)について顕著な変化を認めた。3種類の信号伝達物質のうちいずれが覚醒能を示すのかを、単独添加にて検討した結果、いずれの菌の場合も、新規覚醒物質であるavenolideが原因物質であることが判明し、本手法が二次代謝覚醒に有効であることが実証された。

研究成果の概要(英文)： Three kinds of Streptomyces autoregulators (virginiae butanolides, IM-2 and avenolide) were chemically synthesized and were added as a mixture to 50 representative Streptomyces species at the exponential phase at the concentration of 10 times the minimum effective concentration. By comparing the profiles of secondary metabolites with or without the addition of the autoregulator mixture, two strains (*S. sahachiroi* and *S. narbonensis*) were found to be influenced by the addition of the autoregulator mixture. To decide which of the three autoregulators is responsible for the change, each autoregulator was added alone, resulting to the finding that avenolide was responsible in both cases for the change of the secondary metabolites. These finding confirmed that the external addition of Streptomyces autoregulators can be a tool to awaken the sleeping gene cluster for secondary metabolite in Streptomyces.

研究分野：分子微生物学

キーワード：放線菌 休眠生合成系 信号伝達物質 二次代謝

## 1. 研究開始当初の背景

微生物の中でも、放線菌からは特に多くの重要な臨床応用医薬品が見いだされている。例を挙げると、抗結核剤ストレプトマイシン、抗寄生虫薬エバーメクチン、抗がん剤ダウノマイシン、免疫抑制剤 FK506 等が報告されている (Fig. 1)。2010 年までに微生物由来の生理活性物質は 33,500 近く報告されているが、そのうちの約 40% 放線菌はから単離された生理活性物質である。特に *Streptomyces* 属放線菌は生理活性物質の生産能に優れており、構造上も発揮する生理作用上も、極めて多種多様な化合物を生産することから、生理活性物質探索の主役を担ってきた。一方で、放線菌を対象とした化合物探索が同定する事例が多発している。つまり、放線菌からの新規有用化合物を同定することが困難になってきている。しかし、前述の通り、年々問題となる抗生物質耐性菌の発生や様々な疾患に対応するには、新しい化合物の発見は欠かせない。そこで、これまでの化合物探索とは異なる、新たなアプローチで未知化合物を探索することが必要となっている。

## 2. 研究の目的

近年のゲノム解析から、1 種の放線菌には平均 20-40 種類の二次代謝生成遺伝子群が

存在していることが分かってきた。しかし、そのうち生産が確認されている化合物は数種類に過ぎない。たとえば *S. griseus* のゲノムには 36 個の生成遺伝子群が存在するが、生産が報告されているのはストレプトマイシンの他に黄色色素グリキサゾンなど 10 種類のみである。他の菌株でも生産が報告されている化合物は数種類であり、放線菌ゲノムにコードされる二次代謝生成遺伝子群の約 8 割は“cryptic”であると考えられている。そこで、いかにして眠っている残りの化合物を得るか、が天然物探索研究の大きな流れの一つとなってきた。

放線菌の二次代謝に影響を与える因子として知られているのは、炭素・窒素・リンなどの栄養源、cyclic AMP・GTP・ppGpp といった生理学的因子、菌体密度や信号伝達物質などの環境因子である。放線菌の中でも二次代謝生産能が優れている *Streptomyces* 属放線菌では、オートレギュレーター (Fig. 2) と称される信号伝達物質を介した二次代謝の制御が広く保存されている。

本研究では、このオートレギュレーターを活用し、*Streptomyces* 属放線菌の休眠化合物を探索する研究を行った。

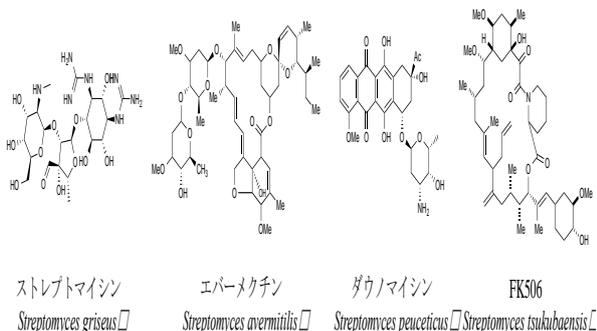


Fig. 1 放線菌が生産する生理活性物質

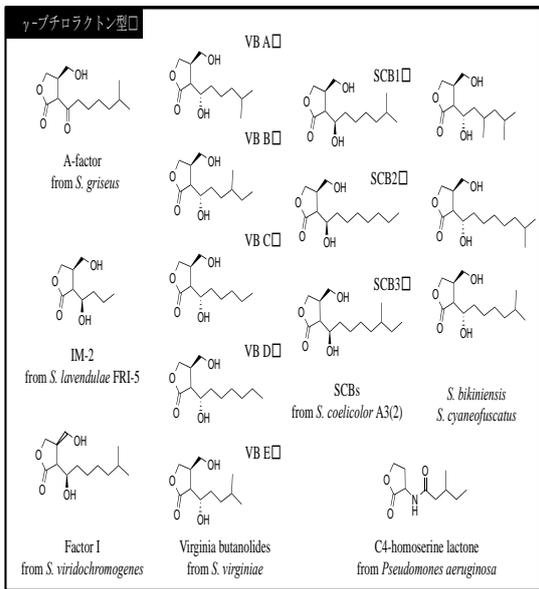


Fig. 2 代表的な放線菌信号伝達物質

### 3. 研究の方法

以下に示した *Streptomyces* 属放線菌 48 菌株を用い、VB・IM-2・エバノライド添加による二次代謝生産能の変化を解析した。

添加には当初、3種信号伝達物質の混合物を用いた。

菌株名	NBRC	菌株名	NBRC
<i>Streptomyces antibioticus</i>	3126	<i>Streptomyces varsoviensis</i>	13093
<i>Streptomyces griseus</i>	3430	<i>Streptomyces griseus</i>	13189
<i>Streptomyces cuspidosporus</i>	12378	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	13190
<i>Streptomyces eurythermus</i>	12764	<i>Streptomyces viridifaciens</i>	13352
<i>Streptomyces hawaiiensis</i>	12784	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	13385
<i>Streptomyces lanatus</i>	12787	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	13396
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	12790	<i>Streptomyces cirratus</i>	13398
<i>Streptomyces murinus</i>	12799	<i>Streptomyces rameus</i>	13399
<i>Streptomyces narbonensis</i>	12801	<i>Streptomyces coriofaciens</i>	13403
<i>Streptomyces niveus</i>	12804	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	13413
<i>Streptomyces lamulosus</i>	12812	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	13414
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	12820	<i>Streptomyces ostreogriseus</i>	13423
<i>Streptomyces virginiae</i>	12827	<i>Streptomyces vinaceus</i>	13425
<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	12828	<i>Streptomyces erythraeus</i>	13426
<i>Streptomyces aburaviensis</i>	12830	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	13428
<i>Streptomyces antibioticus</i>	12838	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	13780
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	12843	<i>Streptomyces lividus</i>	13787
<i>Streptomyces matensis</i>	12889	<i>Streptomyces brunneogriseus</i>	13824
<i>Streptomyces nodosus</i>	12895	<i>Streptomyces jumonjinensis</i>	13869
<i>Streptomyces niveus</i>	12917	<i>Streptomyces sahachiroi</i>	13928
<i>Streptomyces karnatakensis</i>	13051	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	14251
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	13054	<i>Streptomyces sclerogranulatus</i>	14301
<i>Streptomyces griseus</i>	13069	<i>Streptomyces bikiniensis</i>	14598
<i>Streptomyces polychromogenes</i>	13072	<i>Streptomyces avermitilis</i>	14893

### 4. 研究の成果

放線菌ホルモン未添加と添加の場合の培養液より各々代謝物を溶媒抽出し、逆相 HPLC にてそのプロファイル解析した結果、*S. narbonensis*、*S. sahachiroi*、*S. xanthochromogenes*、*S. lividus*、*S. sclerogranulatus* の 5 菌株で、放線菌ホルモン（3種の混合）を添加した場合に明確な代謝物プロファイルの変化が観察された。特に *S. narbonensis* と *S. sahachiroi* の場合に顕著であった。

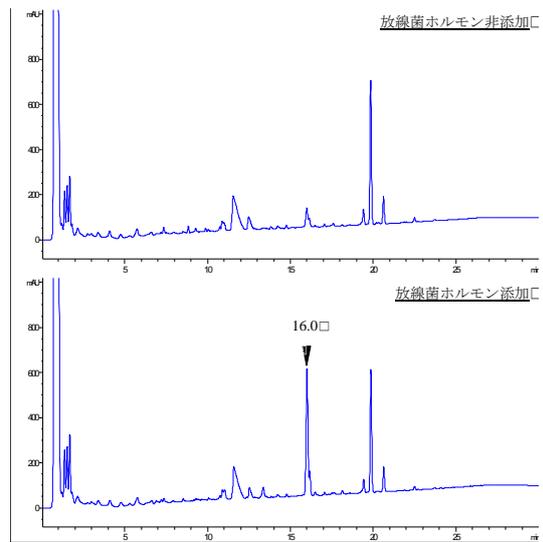


Fig. 3. *S. narbonensis* 代謝物の HPLC 解析

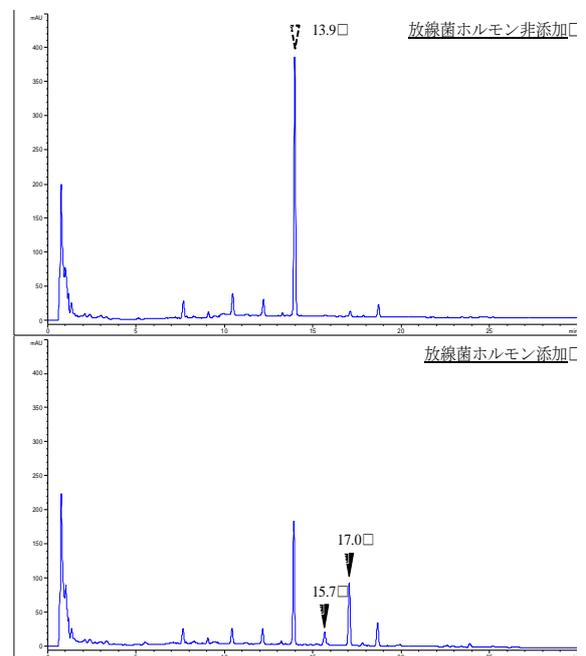


Fig. 4. *S. sahachiroi* 代謝物の HPLC 解析

その後、3種類の放線菌ホルモンのうち、いずれのホルモンが誘導能を示すのかを判定するため、単独で添加した場合の結果から、*S. sahachiroi* および *S. narbonensis* のいずれにおいても VB や IM-2 は効果がなく *avenolide* が代謝物プロファイルの変化をもたらすことを確認している。

以上のことから、放線菌信号伝達物質、特に近年我々が *S. avermitilis* より発見した新規の放線菌信号伝達物質 *avenolide* が、放線菌の休眠化合物を覚醒させる可能性が高いことが結論される。

本研究では、検討した菌株は48菌株であり、また使用した培地条件も2種類である。今後より広い菌株を対象とし、また異なる培地条件での効果を調べることで、休眠化合物が覚醒されるケースが多く発見できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

特になし。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

仁平 卓也 (NIHIRA, Takuya)  
大阪大学・生物工学国際交流センター・  
教授

研究者番号：70144441

### (2)研究分担者

木谷 茂 (KITANI, Shigeru)  
大阪大学・生物工学国際交流センター・  
准教授

研究者番号：10379117

木下 浩 (KINOSHITA, Hiroshi)  
大阪大学・生物工学国際交流センター・  
助手

研究者番号：20294035