

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292046

研究課題名(和文)複合培養系の統合深化による新奇抗生物質の探索

研究課題名(英文)Secondary metabolite Screening by combined-culture

研究代表者

尾仲 宏康 (Onaka, Hiroyasu)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80315829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在市販されている抗生物質の約半分は微生物が生産する。ペニシリンの発見以来人類は様々な抗生物質を微生物の培養液から求めている。本研究では複合培養という手法により、抗生物質を生産する微生物(放線菌)が他の微生物(ミコール酸含有細菌)によって刺激を受けることにより、放線菌が生産する抗生物質の種類が増えることが明らかとなったため、この現象がどのようなメカニズムで行われるのか、また、複合培養によって新たな抗生物質を発見することを目指して研究を行った。その結果、複合培養では両菌株が直接接触することが必須条件であり、また、複合培養を用いることにより新たに17種類の新規二次代謝産物を発見した。

研究成果の概要(英文)：Streptomyces have the potential to produce more than 30 secondary metabolites; however, the expression of most metabolite biosynthetic gene clusters is cryptic or silent. Indeed, the expression of these genes is conditional and dependent on culture conditions. To activate such gene clusters, many methods have been developed. Combined-culture which is developed by our group is a coculture method to activate secondary metabolism in Streptomyces. The activator strains are mycolic acid-containing bacteria, and about 90% of Streptomyces species show changes in secondary metabolism in combined-culture compared with pure culture. In this project, we revealed that pigment induction was mediated by cell-to-cell physical contact. In addition, we applied combined-culture to new secondary metabolite screening, and then new secondary metabolites (5-aTHQ, chojyalactone, arcyriaflavin E, niizalactam) are discovered. Thus, combined-culture may have applications in natural product-based drug discovery.

研究分野：応用微生物学

キーワード：複合培養 生合成 放線菌 抗生物質 共培養 ミコール酸 遺伝子発現 二次代謝

1. 研究開始当初の背景

微生物培養時には純粋分離した微生物を用いるのが常套手段であるが、自然環境下では様々な微生物が共存しており、純粋培養状態での生育は極めて希である。微生物の物質生産、特に抗生物質等の二次代謝は他の微生物との共存下で自身が有利に生育するために行う代謝活動である。この点を考慮すると、抗生物質生産においては純粋培養とは異なる共培養法による生産が有利な場合が少なからず存在すると考えられる。実際に、近年様々な放線菌ゲノムが解読され、ゲノム情報から見積もられる二次代謝産物の種類は一菌株あたり30種類以上と算出されたが、そのうち実験室での純粋培養によって生産が確認された二次代謝産物の数は、1菌株あたりせいぜい10種類以下程度である (Ikeda, H. *et al.*, 2003. *Nat Biotechnol* 21: 526-31.)。つまり、従来の培養法では多数の二次代謝産物が見逃されており、培養法の検討が如何に重要であるかを物語っているといえる。

このような観点から、様々な研究者が共培養法による二次代謝生産をこれまで検討し、報告している (Scherlach, K., and C. Hertweck. 2009. *Org Biomol Chem* 7: 1753-60.)。しかしながら、これまで報告された共培養法は1対1対応の共培養法、つまり、ある特定の微生物の二次代謝生産を行うために、ある特定の微生物との組み合わせが必要であるという培養法であり、汎用性に乏しいという欠点が存在していた。

2. 研究の目的

本研究では我々が既に発見した複合培養法に関して、その作用メカニズムおよび、新規二次代謝産物のスクリーニングを行うことを目的としている。複合培養は放線菌とミコール酸含有細菌とを共培養するとミコール酸含有細菌からの刺激により放線菌の二次代謝パターンが純粋培養時から変化する

ことを利用した培養法である。放線菌 *Streptomyces lividans* は赤色色素アクチノロージンおよびウンデシルプロディギオシンを生産することが知られているが、一般的に放線菌を培養する培地 (ベネットグルコース培地など) においては両色素を生産しない。そこで、共培養することにより両色素生産を誘導させる菌株を土壌細菌を中心として約 400 株からスクリーニングした。その結果、*Tsukamurera pulmonis* TP-B0596 が両色素の生産を誘導することが明らかとなった。さらに *T. pulmonis* に近縁な種について *S. lividans* の赤色色素生産を誘導するかどうかを調べたところ、*Tsukamurella* 属および近縁の属、22 株のうち 19 株に赤色色素生産誘導活性が認められた。活性のあった近縁の属には *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Williamsia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* が含まれている。また、活性の生じなかった菌株は放線菌の作る抗生物質によって生育が阻害されてしまったか、培養に使った培地での生育が出来なかった菌株であると考えられている。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによるゲノムワイドの転写シーケンスを用いた複合培養時特異的に発現する遺伝子群の同定

放線菌とミコール酸含有細菌が接触時にどのような遺伝子発現の変化が起きているかを明らかにするために、複合培養時と純粋培養時の放線菌を回収し、mRNAを抽出して次世代シーケンサーを用いてRNAシーケンスを行ない、両者において発現量の異なる遺伝子の特定を試みた。

(2) 複合誘導非応答変異株の作出と変異点解析
Streptomyces coelicolor A3(2)は複合培養時に赤色色素生産を行うが、複合培養時に赤色色素を生産しない変異株の取得を行い、その変異点より、複合培養に関連する遺伝子の特

定を行った。変異処理は重イオンビームを当てることにより実施し、*T. pulmonis*との接触によっても赤色色素生産を行わないものを選抜した。さらに、赤色色素の生合成遺伝子の欠損株は本実験においては目的の変異株ではないので除外せねばならないが、そのような株を除くために、純粋培養時においても赤色色素を生産する培地を用いて、色素生産を行うことを確認した。

(3)複合培養はミコール酸含有細菌が生菌の時のみ二次代謝誘導が行われる

ミコール酸含有細菌はその表面にミコール酸を成分とする厚い脂肪酸の層が存在しており、複合培養においては、ミコール酸含有細菌が放線菌の菌糸に絡みついていることが電子顕微鏡観察によって明らかになっている。そこで、ミコール酸含有細菌のこのような特殊な細胞構造が複合培養に関与しているかどうかを明らかにするために、ミコール酸含有細菌の細胞構造を損なわない形で殺菌して、*S. lividans*と接触させて、赤色色素生産を行うかどうかを確認した。死菌体の作製にはホルマリン固定による手法とガンマ線殺菌による手法を行い、得られた死菌体を*S. lividans*と固体培地、液体培地の両方で混合培養を行った。また、その際に両菌株が絡み合っていることを確認するために電子顕微鏡による観察も行った。

(4)複合誘導時に特異的に誘導される二次代謝生合成遺伝子プロモーターの転写調節機構の解明

Streptomyces sp. HEK616は*T. pulmonis*との複合培養時特異的に

5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5a-THQ)の生産を行うことが明らかとなっている。そこで、HEK616株のドラフトゲノムシーケンスを行い、5a-THQ生合成遺伝子群の特定を行った、得られた情報を元に、qPCRによって複合培養

時と純粋培養時の転写量の違いを明らかにした。

(5)複合培養の統合深化による効率的な新奇抗生物質の探索

複合培養時に特異的に生産する二次代謝産物を同定し、単離精製して化学構造の決定を行った。菌株は自然環境から分離した。特に日本各地の土壌を分離源とした。定法に従い、滅菌水で希釈した土壌サンプルを放線菌分離用寒天プレート上にまき、形態を指標として放線菌を分離した。得られた放線菌と*T. pulmonis*との複合培養を行い、併せて放線菌のみの純粋培養も行い、両サンプルより菌体抽出液を作製し、HPLCにて代謝物のプロファイルをUV吸収もしくはMS (TIC)を測定した。その際に、両サンプル間で差異の認められる代謝物に関して同定し、分離精製を行い化学構造の解析を行った。以上のような手法により、*Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823、*Streptomyces* sp. CJ-5、*Streptomyces nigrescens* HEK616、*Streptomyces* sp. NZ-6の4株から、新規化合物の同定を行った。

4. 研究成果

(1)次世代シーケンサーによるゲノムワイドの転写シーケンスを用いた複合培養時特異的に発現する遺伝子群の同定

*S. lividans*の近縁種で完全長のゲノム情報が明らかになっている*Streptomyces coelicolor* A3(2)をモデル放線菌とし、ミコール酸含有細菌である*Corynebacterium glutamicum*(Cg)もしくは*Rhodococcus erythropolis*(Re)との複合培養を行い、次世代シーケンサーによるランダムシーケンスにより純粋培養時との間で転写量の増減を比較した。複合培養36時間目の菌体を集菌してmRNAを調製後、シーケンスを行った。その結果、Cg、Reとの複合培養によって転写量が3倍変化している遺伝子はそれぞれ995個、311個であり、そのうち

転写因子遺伝子であったものは46個、44個であった。この結果は培養36時間ではすでに多くの遺伝子の発現量が変化していることを示しているため、さらに培養時間を短くし、前培養後、両菌を同じフラスコに投入後、約10分におけるサンプリングにおいても遺伝子発現に差が生じることが明らかになった。16SrRNAを除去したmRNA調製に手間取ったが、精製行程を工夫することにより、混入の少ないmRNAの調製ができるようになった。本調製サンプルを用いて次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、複合培養と純粋培養における遺伝子発現の差を明らかにする予定である。2015年度は、昨年度に引き続き、次世代シーケンサーによるゲノムワイドの転写シーケンスを用いて、複合培養時に特異的に発現する遺伝子群の同定をおこなったが、遺伝子の発現パターンの有意な差を検出することが出来なかった。

(2)複合誘導非応答変異株の作出と変異点解析

(1)のRNAseqの結果では複合培養時に多数の遺伝子の発現パターンが変化することがわかったが、経時変化において同調的に変化し、かつ機能が複合培養に関与していそうな遺伝子の特定までは至らなかった。そこで、変異株を用いた順遺伝学による解析を行うこととした。*S. coelicolor* A3(2)と*T. pulmonis*の組み合わせの複合培養においては*S. coelicolor* A3(2)の赤色色素生産が誘導される。*S. coelicolor* A3(2)に重イオンビームを照射することにより、赤色色素生産誘導を行わない変異株を取得し、その変異点を解析することにより複合培養に関与する遺伝子の同定を行った。現在約50株の変異株を取得することに成功しており、順次変異点解析のためにゲノムシーケンスを行う予定である。

(3)複合培養はミコール酸含有細菌が生菌の時のみ二次代謝誘導が行われる

複合培養時の電子顕微鏡観察から、放線菌とミコール酸含有細菌はお互いに直接物理的に接触していることが明らかとなった。両菌株は絡みついており、その物理的接触が刺激となり放線菌の二次代謝に影響を与えているのではないかと考えられた。そして、接触時のミコール酸含有細菌において、細胞表面にあるミコール酸層が重要な役割をしているのではないかという仮説が考えられた。その仮説を検証するために、ミコール酸含有細菌の細胞構造を維持した状態、つまり溶菌させない状態で殺菌させた死菌体を作製し、*S. lividans*と混ぜて培養して赤色色素生産が誘導されるかどうかを観察した。その結果、ホルマリン処理および γ 線殺菌処理による二種類の異なる殺菌方法で調製された死菌体との混合ではいずれの場合も*S. lividans*の赤色色素生産は誘導されなかった。また、その際の電子顕微鏡観察から、死菌体では放線菌に絡みつことができないことが確認された。このことから、ミコール酸含有細菌が放線菌へ直接物理的接触による物理的刺激により二次代謝の誘導をしていることが強く示唆された。また、ミコール酸含有細菌は生菌でなければ放線菌に絡みつことができないことも明らかになった。おそらくミコール酸層も絡みつくと対して必要な条件であると考えられるが、生菌でなければ得られない別の代謝機能も併せて放線菌との絡みつきに必要なのではないかと考えられた。

(4)複合誘導時に特異的に誘導される二次代謝生成遺伝子プロモーターの転写調節機構の解明

Streptomyces nigrescens HEK616と*T. pulmonis*との複合培養により5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5a-THQ)が複合培養特異的に発現することが明らかにな

ったため、複合培養によって5a-THQ生合成遺伝子群の転写が活性化しているかどうかについて解析を行った。HEK616株のドラフトゲノム解析より5a-THQの生合成遺伝子群を同定、クローニングした。*S. lividans*を用いた異種発現より5a-THQの生産を確認した。本クラスター内に存在するプロモーター領域においてRT-PCRを行った結果、複合培養特異的に転写が活性化することが明らかになった。

(5)複合培養の統合深化による効率的な新奇抗生物質の探索

複合培養を用い、環境より分離した放線菌との複合培養を行い、新規二次代謝産物の探索を行った。その結果、*Streptomyces cinnamoneus* NBRC 13823 と *T. pulmonis* との複合培養によってインドロカルバゾール骨格を有する Arcyriaflavin E の特異的な生産を確認した。Arcyriaflavin E は動物細胞に対して細胞毒性を有していた。また、*Streptomyces* sp. CJ-5 と *T. pulmonis* との複合培養により chojyalactone A, B, C を特異的に生産ことを確認した。Chojyalactone 類は γ -butyrolactone 骨格を有しており、抗がん活性が認められた。5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline 類(5a-THQ) は tetrahydroquinone 骨格を有する化合物であり、*Streptomyces nigrescens* HEK616 と *T. pulmonis* の複合培養時にのみ特異的に生産する。5a-THQ は酵母に対して抗菌活性を有する。*Streptomyces* sp. NZ-6 は *T. pulmonis* との複合培養時にのみ多環マクロラクタム化合物・Niizalactam を生産することを明らかにした。このように複合培養を行うことにより純粋培養では生産が認められずこれまで発見できなかった新規骨格を有する化合物を発見することが出来た。また、複合培養によって生産が誘導される二次代謝産物の骨格は多岐にわたっており、特定の骨格を母核とした化合物のみが特異的に生産誘導されるわけではないことが明らか

かになった。このことは、新規二次代謝産物のスクリーニングに複合培養が有効であることを示している。また、二次代謝産物の生産量を増大させる効果も認められ、ゴードスポリン、スタウロスポリン、レベッカマイシン生合成遺伝子群を有する *S. lividans* 異種生産株においては、複合培養を行うことにより生産量が増大することも確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. Sugiyama R, Nishimura S, Ozaki T, Asamizu S, Onaka H, Kakeya H. Discovery and Total Synthesis of Streptoaminals: Antimicrobial [5,5]-Spirohemiaminals from the Combined-Culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 55(35): 10278-10282 (査読有)
2. 尾仲宏康、複合培養による放線菌抗生物質生産の覚醒 Combined-culture: the new method for secondary metabolism activation in actinomycetes. *バイオインダストリー* 3月号 vol. 33 (2016) 4-10 (査読無)
3. Hoshino S, Okada M, Wakimoto T, Zhang H, Hayashi F, Onaka H, Abe I. Niizalactams A-C, Multicyclic Macrolactams Isolated from Combined Culture of *Streptomyces* with Mycolic Acid-Containing Bacterium. *J Nat Prod*. 2015; **78**(12):3011-3017. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00804. (査読有)
4. Asamizu S, Ozaki T, Teramoto K, Satoh K, Onaka H. Killing of Mycolic Acid-Containing Bacteria Aborted Induction of Antibiotic Production by *Streptomyces* in Combined-Culture. *PLoS*

One 2015 Nov 6;10(11):e0142372. doi:
(査読有) 10.1371/journal.pone.0142372.

5. Hoshino S, Wakimoto T, Onaka H, Abe I.,
Chojalactones A-C, Cytotoxic Butanolides
Isolated from *Streptomyces* sp. Cultivated
with Mycolic Acid Containing Bacterium.
Org Lett 2015;17(6):1501-1504. doi:
10.1021/acs.orglett.5b00385. (査読有)
6. Sugiyama R, Nishimura S, Ozaki T,
Asamizu S, Onaka H, Kakeya H.
5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, New
Membrane-Interacting Lipophilic
Metabolites Produced by Combined Culture
of *Streptomyces nigrescens* and
Tsukamurella pulmonis. **Org Lett**
2015;17(8):1918-1921. doi:
10.1021/acs.orglett.5b00607. (査読有)
7. H. Onaka, T. Ozaki, Y. Mori, M. Izawa, S.
Hayashi, and S. Asamizu. Mycolic
acid-containing bacteria activate
heterologous secondary metabolite
expression in *Streptomyces lividans*. **J**
Antibiot (Tokyo) 2015; 68: 594-597 doi:
10.1038/ja.2015.31. (査読有)
8. Hoshino S, Zhang L, Awakawa T, Wakimoto
T, Onaka H, Abe I. Arcyriaflavin E, a new
cytotoxic indolocarbazole alkaloid isolated
by combined-culture of mycolic
acid-containing bacteria and *Streptomyces*
cinnamoneus NBRC 13823. **J Antibiot**
(Tokyo) 2015; 68: 342-344 doi:
10.1038/ja.2014.147. (査読有)
9. 尾仲宏康、生合成遺伝子覚醒—外部刺激
による新規天然物生産の活性化—共培

養法を中心に。化学と生物 vol. 52 No. 10.
685-692 (2014) (査読無)

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾仲 宏康 (ONAKA Hiroyasu)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特
任教授
研究者番号：80315829

(2)研究分担者

宮本憲二 (MIYAMOTO Kenji)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：60360111