

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02120

研究課題名(和文) 潜在的二次代謝活性化を誘発する複合培養法の作用機構解明

研究課題名(英文) the mode of action in the combined-culture methods that induce potential secondary metabolism

研究代表者

尾仲 宏康 (Hiroyasu, Onaka)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授

研究者番号：80315829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌は多様な二次代謝を行うが、これまでに発見された二次代謝産物はほんの一部であり、未発見の潜在的二次代謝産物が多数存在することが近年明らかとなった。このような潜在的二次代謝産物の発見により新たな医薬品の開発へとつながることが期待できる。これまでに我々は潜在的二次代謝を活性化する方法として「複合培養法」を確立し、これまでに35種類の新規二次代謝産物を発見している。これは、放線菌の生息する土壌環境にヒントを得、ミコール酸含有細菌(MACB)と放線菌を混合培養することによって放線菌の潜在的二次代謝を活性化する方法である。本研究では複合培養の作用機構解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然物は医薬品の供給源として重要である。特に、昨今のコロナウイルスを初めとした多様な感染症被害は依然として人類の脅威であるため、新たな医薬品の開発は重要な研究テーマの一つである。複合培養法は微生物由来天然物の探索に有用な技術である。多様な天然物を生産することが知られている放線菌とミコール酸含有細菌を共培養することにより、従来の純粋培養では生産しなかった様々な天然物を放線菌が生産するようになる。今回の研究では、複合培養の作用機構解明を進めた。また、複合培養を用いた天然物探索も進め、新たに12種類の新規天然物の発見に成功した。

研究成果の概要(英文)：Actinomycetes are known to conduct a wide variety of secondary metabolisms. Many secondary metabolites have been discovered from actinomycetes and have been used as pharmaceutical drugs. However, genome analysis has revealed that only a few secondary metabolites have been discovered in actinomycetes, and that many potential secondary metabolites have not yet been discovered.

The discovery of such potential secondary metabolites is expected to lead to the development of new drugs. Therefore, we have established a "combined-culture" as a method to activate potential secondary metabolisms, and have already discovered over 35 new secondary metabolites. This method was inspired by the soil environment in which actinomycetes generally live, and it activates the potential secondary metabolism of actinomycetes by co-culture of mycolic acid-containing bacteria (MACB) and actinomycetes. In this study, we investigated the mode of action in the combined-culture.

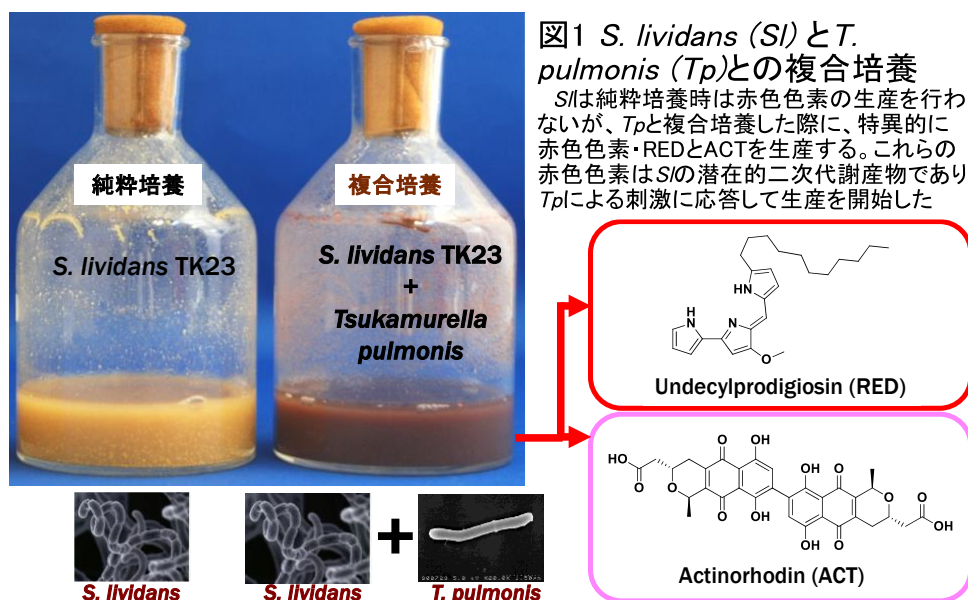
研究分野：応用微生物学、天然物化学

キーワード：共培養 天然物スクリーニング 抗生物質生産 放線菌 ミコール酸 微生物間相互作用 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

主に土壌に生息する放線菌は、多様な二次代謝産物を生産することで知られている。例えば、結核の特効薬であるストレプトマイシン、MRSA にも効くバンコマイシン、免疫抑制剤タクロリムス、大村智博士の発見した抗寄生虫薬イベルメクチンなどの多様な生理活性物質も放線菌の二次代謝産物であり、これらは人類の健康に多大な貢献をしてきた。

しかしながら、近年、放線菌の二次代謝産物からの天然物創薬は難しくなっている。これは、半世紀以上にわたって天然物探索を世界中で続けた結果、新規構造の天然物の発見が非常に少なくなってきたことが一因としてあげられ、それゆえ天然物探索における新規化合物のヒット率を上げることが重要な課題となっている。一方で *Streptomyces* 属放線菌のゲノム情報から二次代謝産物の種類は一菌株あたり 30 種類以上と見積もられるが、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数種類にとどまることから、未発見のユニークな二次代謝産物は膨大な数存在していると推定できる。以上のことは従来の純粋培養法では多数の二次代謝産物が見逃がされてしまっていることを物語っており、実際、培養法も含め様々な潜在的二次代謝活性化手法が多数の研究者によって考案されている。



我々は、こうした放線菌由来潜在的二次代謝産物の探索には共培養が有効であると考え、*Tsukamurella pulmonis* 等のミコール酸含有細菌 (MACB: Mycolic Acid Containing Bacterium) との共培養法である「複合培養法」を考案し(図 1)、これまでに本法を用いて 23 種類の新規二次代謝産物の発見に成功している(図 2)。しかしながら、なぜ MACB との共培養によって *Streptomyces* 属等の放線菌の潜在的二次代謝能が活性化するかに関しては未解明のままである。

さらに複合培養活性の検証過程で、我々は、MACB が直接接触した際にのみ *Streptomyces lividans* の赤色色素抗生物質生産が誘導され、死菌体 MACB では細胞構造を維持した状態であっても色素生産誘導がおこらないことを明らかにした(Asamizu S. *et al.*, 2015 *PLoS One* 10(11): e0142372)。この結果は、*S. lividans* は MACB の生死を何らかの仕組みで認識しており、他者が接触した際にのみ色素生産誘導をしていることを意味している。

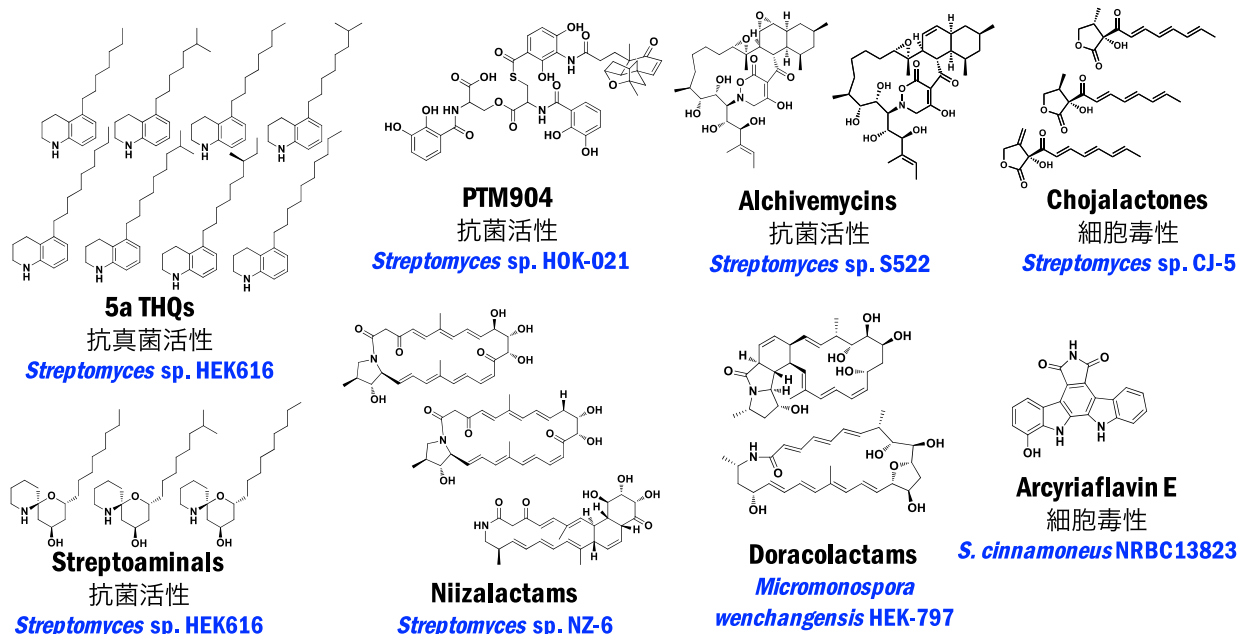


図2 複合培養によって様々な放線菌より新たに見出された潜在的二次代謝産物

2. 研究の目的

本研究では、複合培養法の作用機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。本作用機構には、他微生物からの物理的接触を放線菌が関知する機構が含まれており、これまでに報告されていない新たな機構である可能性が高い。さらに、その機構を応用することによって、これまで見過ごされていた潜在的二次代謝産物を効率的に発見することが期待できる。そこで、本研究では以下の3点について焦点を当てた研究を行った。

1. 複合培養法の作用機構を分子レベルで明らかにする。
2. 1で明らかにした作用機構に基づいた探索方法を確立し、効率的に新規二次代謝産物を発見する。
3. 複合培養活性には、物理的接触を介した微生物相互作用により他者を認識している機構が存在している。本機構の分子レベルでの解明を通して微生物が持つ他者認識機構を解明する。

3. 研究の方法

1. 複合培養非感受性変異株の解析による複合培養作用機構の解明

複合培養現象は物理的接触によって引き起こされることを、これまでの研究で明らかにしているが、その分子レベルでの解明は前例がないため困難を極めている。そこで、今回は放線菌側に変異処理を施し、ミコール酸含有細菌と接触させても二次代謝を活性化しない変異株を作製し、その変異遺伝子の同定から、複合培養作用機構の遺伝子レベルでの解明を目指した。変異株の親株には *Streptomyces coelicolor* JCM4020 を用い、変異原には重イオンビームを用いた。 *S. coelicolor* JCM4020 はその近縁種である *S. lividans* と同様に *T. pulmonis* との複合培養により赤色色素生産が誘導される。重イオンビームは、UV や化学処理による変異に比べ、変異に偏りが少ないためランダム変異を誘発するのに優れているが、照射装置が国内数カ所に限られているという問題がある。我々は既に装置を保有する量子科学技術研究開発機構と共同研究契約を結び、重イオン照射の実験を開始しており、候補株の取得に成功している。既に得られている有望変異株のゲノム解析を進め、変異点を特定した後に相補株の作出をすることにより複合培養活性に関与する遺伝子を特定した。

2. 網羅的転写解析による複合培養時特異的に転写される遺伝子の特定

複合培養時特異的に転写される遺伝子の特定を目指し、既に RNAseq 解析を実施している。その結果、複合培養開始後 7.5 時間で全体の 1 割近くの遺伝子に転写量の変化が現れることが明らかとなった。これは、放線菌が二次代謝開始と同時に形態分化も行うために、形態分化に関わる遺伝子の発現も多数変動したためと考えられ、複合培養にどの遺伝子が関与しているかを同定するには至っていない。そこで、これまでに色素生産誘導に関与すると報告されている既知レギュロンとの比較を行い、複合培養時に色素生産が活性化する制御系の同定を試みた。

3. 複合培養を用いた潜在的二次代謝産物の探索

自然環境中より分離した放線菌株を用い、複合培養を行うことによって新規二次代謝産物探索を行った。

4. 研究成果

1. 複合培養非感受性変異株の解析による複合培養作用機構の解明

約 15 万個の *S. coelicolor* JCM4020 胞子に重イオンビームを照射し、*T. pulmonis* との複合培養時に赤色色素を生産しない、生産遅延がおきる。生産が早まる、*T. pulmonis* との接触前に生産が始まる、4 種類の表現系を示す変異株を計 59 株取得した。これらのうち、44 株についてゲノムを精製し、ショートリードによる次世代シーケンサーゲノム解析を行い、変異点の同定を行った。同定を行った株のうち、*sco1718* 遺伝子の 34 番目の T が欠失し、フレームシフトを起こした変異株 Mt.25_1 において、野生型 *sco1718* の相補により形質が回復した。*sco1718* は TetR 型転写調節因子をコードしており、本遺伝子の欠損により、変異株 Mt.25_1 は生産遅延を起こしていた。

また、その他の変異株については、50S リボゾーム蛋白 L4、グルタミン酸合成酵素大サブユニット *glbB*、elongation factor G、モリブドプテリン合成酵素 *moeA* に変異点を持つ株がそれぞれ 1 株ずつ同定できた。しかしながら、これらの遺伝子は一次代謝に関与する遺伝子やエッセンシャルな遺伝子であるため、これらの遺伝子の変異により、生育そのものに影響が出て、その結果、赤色色素生産をしなくなったり、生産遅延がおきていると結論された。また、残りの変異株のうち、12 株は赤色色素合成遺伝子の変異であり、8 株は *sco4069* 遺伝子に変異が入っていた。*sco4069* は欠損により赤色色素を生産しなくなることが既に他研究者によって明らかになっているため、複合培養現象とは直接の関連性は現段階では考えられないので、それ以降の解析は進めなかった。

SCO1718 は TetR 型転写リプレッサーであることが推定され、そのゲノムにおける下流には 2 個の ABC トランスポーターがコードされていたため、SCO1718 は下流の ABC トランスポーターの発現を抑制していることが示唆された。ゲルシフトアッセイの結果、SCO1718 は ABC トランスポーターのプロモーター領域に結合することが示されたが、SCO1718 に結合するリガンドの同定には至っていない。ABC トランスポーターは薬剤排出機構として二次代謝との関連性が高いため、今回発見した SCO1718 を介した ABC トランスポーターの発現調節が複合培養現象と関連している可能性は高い。引き続き、SCO1718 の機能解明について、研究を進めている。

2. 網羅的転写解析による複合培養時特異的に転写される遺伝子の特定

S. coelicolor JCM4020 株(Sc)と *T. pulmonis* との複合培養時の RNA-seq 解析により複合培養時に有意に転写が増大、もしくは減少している遺伝子を解析した。その結果、*T. pulmonis* との複合培養では *S. coelicolor* のリン酸飢餓応答系に関与する PhoP レギュロンに含まれる遺伝子の多くが活性化されていることを明らかにした。そこで、複合培養時のリン酸濃度を経時的に測定したところ、*Streptomyces lividans* TK23 と *T. pulmonis* との複合培養において培養開始 12 時間でリン

酸濃度が 0.1 mM 以下となりリン酸飢餓状態となることが明らかとなった。そこでリン酸濃度の影響を調べるために、複合培養にリン酸を 2.87mM 添加したところ、赤色色素生産は誘導されなかった。以上の結果、接触を介した刺激と同時にリン酸飢餓状態であることが赤色色素の誘導生産に必要な条件であることが強く示唆された。

3. 複合培養を用いた潜在的二次代謝産物の探索

複合培養によって得られた放線菌培養液を生理活性物質スクリーニングに活用することによって、これまでに 23 種類の新規化合物を発見している。今回、さらに新規天然物スクリーニングを進め、dracolactam A, B, mirilactam C, D, E, umezawamide A, B, catenulobactin A, B, desferrioxamine 誘導體、saccharothriolide C, C₂を発見した。今回新規天然物を 12 種類発見できたことから、これまでに複合培養法によって新たに発見された二次代謝産物は 35 種類となった。以上のことから、複合培養法は多様な天然物を生産させるために有用な手法であることを改めて示すことが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugiyama Ryosuke, Nakatani Takahiro, Nishimura Shinichi, Takenaka Kei, Ozaki Taro, Asamizu Shumpei, Onaka Hiroyasu, Kakeya Hideaki	4. 巻 58
2. 論文標題 Chemical Interactions of Cryptic Actinomycete Metabolite 5 Alkyl 1,2,3,4 tetrahydroquinolines through Aggregate Formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 13486 ~ 13491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201905970	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 Ozaki Taro, Sugiyama Ryosuke, Shimomura Morito, Nishimura Shinichi, Asamizu Shumpei, Katsuyama Yohei, Kakeya Hideaki, Onaka Hiroyasu	4. 巻 17
2. 論文標題 Identification of the common biosynthetic gene cluster for both antimicrobial streptoaminals and antifungal 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2370 ~ 2378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8ob02846j	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, Onaka Hiroyasu, Abe Ikuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology	6. 最初と最後の頁 363 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10295-018-2100-y	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, Ozeki Masahiro, Awakawa Takayoshi, Morita Hiroyuki, Onaka Hiroyasu, Abe Ikuro	4. 巻 81
2. 論文標題 Catenulobactins A and B, Heterocyclic Peptides from Culturing Catenuloplanes sp. with a Mycolic Acid-Containing Bacterium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2106 ~ 2110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b00261	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石塚 匠、浅水 俊平、柳澤 昌臣、佐藤 勝也、尾仲 宏康
2. 発表標題 複合培養における赤色色素生産非応答性変異株の解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyasu Onaka
2. 発表標題 Combined-culture: Potential secondary metabolism is promoted by co-culture with mycolic acid containing bacteria
3. 学会等名 2nd China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyasu Onaka
2. 発表標題 Combined-culture: potential secondary metabolism is promoted by co-culture with mycolic acid containing bacteria
3. 学会等名 The Japanese-German Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------