

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05859

研究課題名(和文) 未利用微生物からのゲノムマイニング法による新規化合物の探索

研究課題名(英文) Discovery of novel natural products from chemically unstudied bacteria by genome mining

研究代表者

上岡 麗子 (Ueoka, Reiko)

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：30592365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：天然資源からの新規化合物の探索は、新たな医薬リード化合物を発見する上で非常に重要である。本研究では、ゲノムマイニング法を用いることで、天然物化学の分野で未利用な細菌を対象に新規化合物の探索を行った。その結果、推定構造と組成の近い化合物の生産が確認され、LCMSのイオンピークを指標に精製を行った結果、新規化合物を単離することが出来た。本化合物は非常に不安定であり、通常の精製方法では分解してしまうことが判明したが、研究の結果その精製法を確立することが出来た。また、二次代謝産物を詳細に解析する過程において、炭素鎖部分にシクロプロパン環を有する新規lysophospholipidを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床薬の5割強は天然由来の化合物あるいはその構造を基に開発されたものであり、創薬において医薬リード化合物として非常に重要な役割を持つ。しかしながら、近年では生物活性を指標とした天然資源からの新規化合物の探索において、既知化合物にあたる確率が非常に高くなり、ユニークな構造を持つ新規化合物を探索することは困難になりつつある。本研究の結果から、これまで比較的探索源として活用されて来なかった微生物種を対象とし、次世代シーケンサーの発展とともに蓄積された膨大なゲノム情報を利用することで、天然資源からの新規化合物の探索が困難となりつつある現在においても新規化合物を見出すことが可能であるといえる。

研究成果の概要(英文)：Natural products have an important role for the development of new therapeutic leads. However, in recent years, known natural products have been rediscovered with high frequency. In this study, we isolated novel natural products from chemically unstudied bacteria by using a genome mining approach. The bacteria with unknown trans-AT PKSs were especially chosen as the targets and the metabolites were isolated by LCMS-based fractionation. During the isolation of the candidates, novel lysophospholipid was also discovered.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臨床薬の 5 割強は天然由来の化合物もしくはその構造をもとに開発されたものであることが知られている通り、創薬において天然化合物は医薬リード化合物として非常に重要な役割を担っている。特に放線菌由来の I 型あるいは II 型ポリケチド化合物は重要な位置を占め、エリスロマイシンやドキシソルピシンなど多くの化合物が医薬品として利用されている。天然化合物は人智を超えた化学構造や生理機能を持つものも多く、例えば決定的な治療薬がない疾患や既存の薬剤に対する耐性の獲得に対抗するためにも、ユニークな新規天然化合物の探索は常に求められている。しかしながら近年では、多くの研究者が似たような天然資源や生物活性を指標として新規天然化合物を探索し続けた結果、長い年月をかけて化合物を単離・構造決定した後に既知化合物であると判明する確率が非常に高くなり、新規天然化合物を探索することが困難になりつつある。そこで、医薬リード化合物となりうるような新規天然化合物の新たな探索方法の確立が求められている。さらに探索源として、これまで天然化合物の宝庫として知られる放線菌や真菌等を用いた研究が活発に行われ、人類にとって有用な天然化合物が多く発見されてきたが、新規化合物をより効果的に探索するためには、これら以外の天然資源を開拓していくことが必要となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、天然物化学の分野においてこれまで比較的未開拓である微生物種を対象に、そのゲノム情報をあらかじめ解析し、生産される化合物の構造情報を予測するゲノムマイニング法を用いることで、より効果的に新規天然化合物を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず、NCBI にゲノム情報が公開されており、天然物化学の分野においてこれまであまり研究がなされていない微生物を対象に、ゲノム中の二次代謝産物の生合成遺伝子を検出する antiSMASH<sup>2)</sup>等の予測ツールを用いてゲノムを解析した。検出された生合成遺伝子クラスターのうち、既知化合物とその生合成遺伝子クラスターのデータベースである MIBiG 中に存在するクラスター情報との相同性が低いものについて、生合成遺伝子がコードする酵素を詳細に解析することで、それらから生合成される二次代謝産物のおおまかな化学構造を予測した。特に、近年発見された新たな I 型ポリケチド生合成遺伝子である *trans*-acyltransferase (AT) polyketide synthase (PKS) とよばれる構造予測の難しい異常ポリケチド生合成遺伝子クラスターを持つものについては優先的に解析を行った。*Trans*-AT PKS はエリスロマイシン等の生合成遺伝子である通常の I 型 PKS (*cis*-AT PKS) と比べて、新規触媒ドメインや、モジュール内でのユニークなドメイン配列、通常のもジュールのように思われるが異なる機能をもつなど、多くの異常な構造を持つ。これらの *trans*-AT PKS からはユニークな構造をもつ化合物が多数報告されており、実際に mupirocin や virginiamycin などは抗生物質として現在使用されている。これら *trans*-AT PKS から生合成される化合物の構造予測については、近年提唱された化学構造予測法<sup>3)</sup>をもとに開発された transATor<sup>4)</sup>とよばれる予測ツールを用いてコアとなる化学構造の予測を行った。それらの推定構造をもとに既知化合物のデータベースである SciFinder<sup>®</sup>を用いて解析し、それぞれの微生物から生産される化合物の新規性を検証した。

以上により選抜された菌株を入手し、様々な条件で培養後、培養液中の菌体および上清をそれぞれ各種溶媒で抽出後、高分解能 LCMS で分析した。培地成分のデータと比較することで、対象となった菌株が生産した天然化合物のイオンピークを抽出し、予想された化合物と組成・化学的性質の近いターゲットとなりうる候補化合物の探索を行った。予想構造および候補化合物のイオンピークの値をもとに既知化合物データベースで検索を行い、新規化合物である可能性が高いものについて、化合物の取得を目指し菌株の大量培養を行った。得られた抽出物を、ODS カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過、HPLC 等に供し、各フラクションを LCMS で解析することで、イオンピークを指標に精製を繰り返し行い、候補化合物を単離した。単離した化合物について、NMR 等の各種光学機器で解析を行い構造決定を行った。

### 4. 研究成果

NCBI のデータベースに登録されている細菌のゲノム情報を二次代謝産物の生合成遺伝子検索ツール antiSMASH を用いて解析した結果、大韓民国光陽市沿岸の土壌から単離された  $\alpha$ -プロテオバクテリア綱に属するグラム陰性細菌である *Kordiimonas gwangyangensis* のゲノム中に、ホモセリンラクトン生合成遺伝子、未知のリボソーム型ペプチド生合成遺伝子 2 個、および未知の

*trans*-AT PKS と非リボソーム型ペプチド生合成遺伝子 (NRPS) のハイブリッド型の生合成遺伝子クラスターが存在することが分かった。それらのうち、*trans*-AT PKS-NRPS ハイブリッドの生合成遺伝子クラスターについて生産される化合物の化学構造を予測した結果、NRPS 部分の 2 か所の A ドメインは NRPS predictor<sup>25)</sup> による解析によりそれぞれグリシンおよびセリンを基質として用いることが推測された。また、*trans*-AT PKS 部分は transATor を用いたケトン合成酵素 (KS) ドメインの基質特異性を基にした解析によりコアとなるポリケチド鎖の修飾様式を推定したところ、本化合物はメチル基や二重結合を複数有する C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> からなる化合物であることが推定された。さらに、生合成遺伝子クラスター周辺には複数の機能未知な修飾酵素が存在していることから、本化合物はさらに修飾を受けた構造であることが示唆された。推定構造を SciFinder<sup>®</sup> で部分構造検索したところ、類似性の高い既知化合物が存在しなかったため、本化合物の探索を行うこととした。

得られた推定構造を指標として、各種条件で培養した細菌の抽出物を高分解能 LCMS で解析し候補となる化合物の探索を行った結果、推定構造の組成式と非常に近いイオンピークが見られることが分かった。そこで、細菌の大量培養を行い、本化合物の精製を行った。培養液上清から XAD16N を用いて抽出を行い、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび複数回の HPLC による精製を行った結果、本化合物は精製が進むにつれ溶媒によって非常に分解されやすくなり、天然化合物に用いる通常の精製法では単離することができないことが分かった。しかしながら、細菌の培養条件や精製法および各フラクションの乾固法を改良することで、最終的に本化合物を単離することに成功した。単離した化合物について、DMSO-*d*<sub>6</sub> を用いて <sup>1</sup>H NMR スペクトルを測定した結果を図 1 に示した。改良した精製法において、本化合物を単離できることが分かったため、2D NMR スペクトルを測定し構造決定を行うために現在さらに増量を行っている。

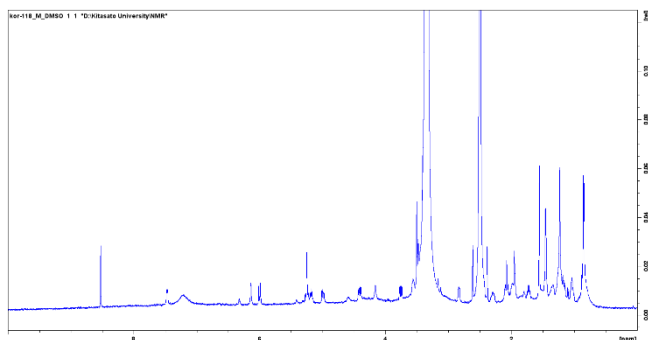


図 1. *K. gwangyangensis* 由来の化合物の <sup>1</sup>H NMR スペクトル (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

次に、NCBI のデータベースに登録されている細菌のゲノムをさらに解析した結果、ドイツのバーデンにある泥炭地で採取された細菌 *Rouxiella badensis* のゲノム中に、*trans*-AT PKS-NRPS ハイブリッドである生合成遺伝子クラスターを含む計 8 個の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することが分かった。そこで、この *trans*-AT PKS-NRPS ハイブリッド生合成遺伝子クラスターについてゲノムマイニング法による解析を行った結果、末端にある NRPS 部分の A ドメインはそれぞれグリシン、セリンおよびバリンであることが示唆された。さらに *trans*-AT PKS 部分を transATor を用いて構造予測した結果、本化合物は C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> からなる化合物であることが推定された。得られた推定構造を指標に、各種条件下で培養した細菌の培養液抽出物を高分解能 LCMS で解析した結果、特定の培養条件において候補となる化合物のイオンピークが強くみられることが分かったため、大量培養を行い現在化合物の単離を進めている。さらに、本細菌が生産するその他の二次代謝産物の解析を進めた結果、R2A 培地での液体培養において、菌体のアセトン抽出物中に、既知化合物データベースには存在しない、新規化合物と思われるイオンピーク (*m/z* 466.2933 [M+H]<sup>+</sup>) が存在することが分かった。そこで、本化合物についても大量培養を行い、化合物の精製を行った。大量培養によって培養した計 10 L の培養液から得られた菌体を 80% アセトンで抽出し、得られた抽出物を ODS フラッシュクロマトグラフィーに供した。20%, 40%, 60%, 80%, 100% メタノールで溶出した画分をそれぞれ LCMS で解析した結果、本化合物は 100% メタノール画分に含まれていることが分かった。そこで、本画分をさらに HPLC を用いて繰り返し精製を行った結果、化合物を 0.8 mg 単離することができた。単離した化合物について、CD<sub>3</sub>OD を用いて <sup>1</sup>H NMR スペクトルを測定したところ、-0.3 ppm のシグナルを含む高磁場領域に特徴的なシグナルが存在することが分かり、本化合物はシクロプロパン構造を持つことが示唆された (図 2)。

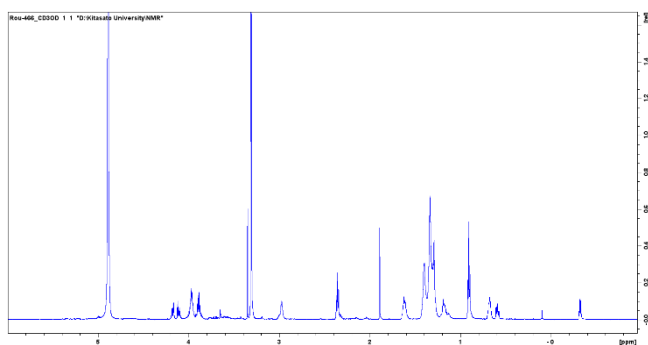


図2. *R. badensis*由来の化合物の<sup>1</sup>H NMR スペクトル (CD<sub>3</sub>OD)

そこで、本化合物をさらに増量し、2D NMR スペクトル (COSY, HSQC, HMBC) を測定した結果、図3に示す構造をとることが分かり、本化合物は新規 lysophospholipid であることが分かった。現在、長鎖炭素鎖中のシクロプロパンの位置を決定するとともに、得られた化合物の生物活性を解析している。

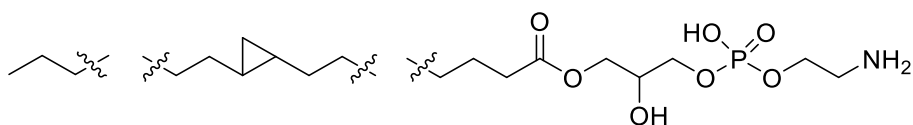


図3. *R. badensis*由来のその他の二次代謝産物の化学構造

以上の研究結果から、天然資源からの新規化合物の探索が困難となりつつある現在においても、ゲノム情報を活用し、既知化合物の生合成遺伝子クラスターとの相同性が低い生合成遺伝子クラスターを持ち、天然物化学の分野において未利用な天然資源を開拓することで、より効果的に新規天然化合物を探索できる可能性を示すことができた。次世代シーケンサーの発展とともに現在も増え続けている微生物のゲノム情報を解析することで、今後もさらなる新規化合物が見いだされることが期待される。

#### 参考文献

- 1) Newman, D. J., Cragg, G. M., *J. Nat. Prod.*, **2020**, *83*, 770–803.
- 2) Blin, K. et al., *Nucleic Acids Research*, **2023**, doi: 10.1093/nar/gkad344.
- 3) Nguyen, T. et. al., *Nat. Biotechnol.*, **2008**, *26*, 225–233.
- 4) Helfrich, E. J. N. et. al., *Nat. Chem. Biol.*, **2019**, *8*, 813–821.
- 5) Rottig, M. et. al., *Nucleic Acids Research*, **2011**, *39*, W362–W367.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------