

令和 5 年 6 月 2 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：20K07105

研究課題名（和文）発酵工学を利用した抗嫌気性菌活性物質ルミナミシンの非天然型誘導体の創製

研究課題名（英文）Producing the luminamicin analogs by genetic engineering

研究代表者

稲橋 佑起（Inahashi, Yuki）

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号：70645522

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：抗*C. difficile*活性物質ルミナミシン生産菌のゲノム解析によりその生合成遺伝子クラスターを推定した。無水マレイン酸部位とマクロライド部位の結合を担うと予想された酵素の遺伝子について欠損株を作製した。野生株と欠損株の代謝産物を解析することで、それら酵素がルミナミシンの生合成に関与することが示された。さらに、それら遺伝子欠損株からルミナミシンの生合成中間体またはシャントプロダクトを単離した。単離した化合物はいずれも*C. difficile*に対して活性を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ルミナミシンは放線菌*Streptomyces* sp. OMR-59の培養液より発見された強力かつ選択性に優れた抗*C. difficile*活性物質である。本研究よりルミナミシンの生合成遺伝子クラスターが特定され、いくつかの遺伝子についてその機能が推定された。また、取得されたルミナミシン類縁体より僅かではあるが構造活性相関の情報が得られた。今後、本研究より得られた結果を基に、遺伝子組換え株からの類縁体取得やその誘導化を行い、より活性の強いルミナミシン類縁体の取得が期待される。

研究成果の概要（英文）：The biosynthetic gene cluster of luminamicin, an anti *C. difficile* agent, was predicted from the genome sequence of OMR-59. The deletion mutant of each gene, which may involve the coupling of the northern and southern parts, was generated. The LC/UV analysis of the metabolites indicated that those genes were important for the biosynthesis. Furthermore, the intermediates (or shunt products) of luminamicin biosynthesis were isolated from the culture broths. We evaluated the antibiotic activity of those compounds against *C. difficile*, but they did not have the activity. This result gave the information of structure and activity relationship.

研究分野：天然物化学

キーワード：ルミナミシン *Clostridioides difficile* 生合成 放線菌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

嫌気性細菌である *Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) は下痢や偽膜性大腸炎などを症状とし、重症化を引き起こす事とその予後の悪さから、日本を含めヨーロッパや欧米など世界的に問題となっている。現在、その有効な治療薬は少なく、より効果的な薬の開発が求められている。ルミナミシンは北里研究所で放線菌 *Streptomyces* sp. OMR-59 の培養液より発見された強力かつ選択性に優れた抗 *C. difficile* 活性物質である。その構造には、無水マレイン酸含有 14 員環ラクトン (ノーザンパート) とシスデカリン含有 10 員環ラクトン (サザンパート) が結合した複雑でユニークな骨格を有している。近年、*S. seoulensis* A01 が生産するルミナミシン類縁体であるストレプトセオマイシンの生合成遺伝子が Zhang らにより報告され (Zhang B., et al., *Org. Lett.* 2018, 20, 2967; Zhang B., et al., *Nature*. 2019, 568, 122.)、そのシスデカリン形成機構が明らかとなった。しかし、シスデカリン部位のエーテル架橋やマレイミドからの共役エノールエーテル形成等、その生合成経路には未解明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

ルミナミシンの生合成におけるノーザンパートとサザンパートのカップリングの反応機構を解明することと、生合成遺伝子改変や有機合成を組み合わせて、CDI 治療薬としてより有望なルミナミシン誘導体を創製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ルミナミシン生合成遺伝子欠損株の作製

ルミナミシン生産菌 *Streptomyces* sp. OMR-59 のゲノムシークエンスを antiSMASH で解析し、ルミナミシン生合成遺伝子クラスターの推定を行った。推定された生合成遺伝子クラスターよりルミナミシンのノーザンパートとサザンパートのカップリングに関与すると考えられる遺伝子について欠損株の作製を行った。欠損株の作製には CRISPR/Cas9 システムを有する温度感受性プラスミドを用い、大腸菌からの接合伝達により作製したプラスミドを放線菌に導入させた。また、放線菌用遺伝子発現プラスミドを用いて、欠損させた遺伝子の相補株も作製した。

#### (2) 欠損株の代謝産物解析

野生株および作製した遺伝子欠損株を種培地で 3 日間振盪培養後、生産培地に 1% 植菌し、5 日間振盪培養した。培養液に等量のアセトン添加して抽出後、遠心し、上清を回収した。得られた上清を LC/UV で解析した。

#### (3) 欠損株の培養液添加によるルミナミシンの生産

遺伝子欠損株を生産培地で 4 日間培養後、その上清を 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで滅菌した。別途、他の遺伝子欠損株を生産培地で 2 日間培養した後、上述のフィルター滅菌した培養液を添加し、さらに 3 日間培養した。培養液のアセトン抽出物を LC/MS で解析した。

#### (4) 欠損株の代謝産物の単離精製

欠損株を生産培地で 3 日間培養し、上清を HP20 および ODS カラムクロマトグラフィーで粗精製後、HPLC で精製することで代謝産物の単離精製を行った。単離した化合物については NMR 解析や高分解能質量分析を行い、その構造解析を行った。

#### (5) 欠損株が生産するルミナミシン類縁体の活性評価

欠損株より得られたルミナミシン類縁体 (生合成中間体またはシャントプロダクト) について寒天平板希釈法により *C. difficile* に対する抗菌活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ルミナミシン生合成遺伝子欠損株の作製

OMR-59 のゲノム解析よりポリケチド合成酵素遺伝子を含む約 50 個の遺伝子からなるクラスター (約 80 kb) をルミナミシン生合成遺伝子クラスターと推定した。それら遺伝子のうち、シトクロム P450 (LumP3 および LumP4)、エステラーゼ (LumI) および無水マレイン酸部位の生合成に関与すると推定した LumR/S の遺伝子について欠損株を作製した。また、欠損株にそれら遺伝子を相補させた株も作製した。

## (2) 欠損株の代謝産物解析

作製した遺伝子欠損株を生産培地で培養し、培養液のアセトン抽出物を LC/UV 解析した。その結果、各遺伝子欠損株ではルミナミシンの生産が消失し、*lumP3* 欠損株および *lumP4* 欠損株では野生株ではみられない代謝産物のピークがみられた (図 1)。*lumI* 欠損株および *lumR/S* 欠損株ではルミナミシンに関連するような代謝産物のピークは確認できなかった。また、いずれの遺伝子相補株もルミナミシンの生産が回復したことより、それら遺伝子はルミナミシンの生合成に関与していることが示された。

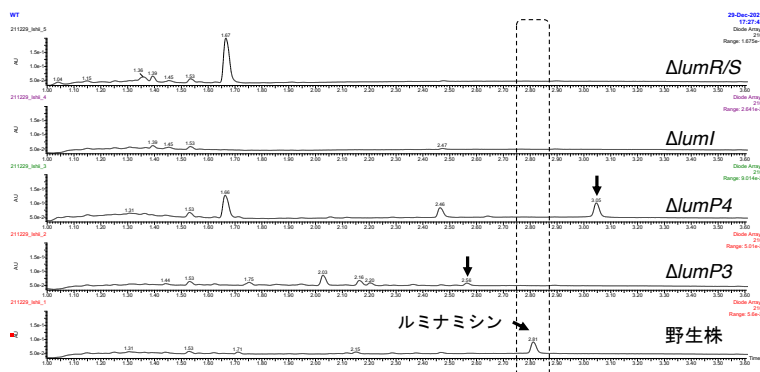


図 1. 遺伝子欠損株培養液の LC/UV クロマトグラム

## (3) 欠損株の培養液添加によるルミナミシンの生産

フィルター滅菌した欠損株の培養液を別の遺伝子欠損株に添加して培養した結果、*lumP4* 欠損株の培養液を *lumP3* 欠損株の培養液に添加した時に、ルミナミシンが生産された。一方、*lumP3* 欠損株の培養液を *lumP4* 欠損株の培養液に添加してもルミナミシンは生産されなかった。このことより、ルミナミシンの生合成において、LumP3 が LumP4 よりも先に反応することが示唆された。

## (4) 欠損株の代謝産物の単離精製

欠損株の代謝産物解析において *lumP3* 欠損株および *lumP4* 欠損株の培養液で確認された代謝産物の単離精製を行った。*lumP3* 欠損株を生産培地で 3 日間培養し、上清を HP20 および ODS カラムクロマトグラフィーで粗精製後、HPLC で精製することでその代謝産物を単離した。*lumP4* 欠損株も同様に、生産培地で 5 日間培養し、上清を HP20 および ODS カラムクロマトグラフィーで粗精製した。粗精製物を酢酸エチル抽出後、HPLC で精製することで、その代謝産物を単離した。単離した化合物について NMR を用いて、その構造解析を行なった。それら化合物の構造はルミナミシンと比較して、サザンパートの一部と、ノーザンパートに大きな違いが見られた。

## (5) 欠損株が生産するルミナミシン類縁体の活性評価

取得した化合物について *C. difficile* 活性を測定したが、いずれの化合物も 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度においても活性を示さなかった (ルミナミシンの MIC は 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。 *C. difficile* 活性にはノーザンパートとサザンパートを合わせた全体構造が重要であることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kimishima Aoi, Ando Hiroyasu, Sennari Goh, Noguchi Yoshihiko, Sekikawa Shogo, Kojima Toru, Ohara Motoyoshi, Watanabe Yoshihiro, Inahashi Yuki, Takada Hirokazu, Sugawara Akihiro, Matsumaru Takanori, Iwatsuki Masato, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki	4. 巻 144
2. 論文標題 Chemical Degradation-Inspired Total Synthesis of the Antibiotic Macrodiolide, Luminamicin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 23148 ~ 23157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c10856	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井皓大, 小牧彩乃, 関川章悟, 小嶋透, 堤隼馬, 廣瀬友靖, 砂塚敏明, 稲橋 佑起
2. 発表標題 無水マレイン酸とポリケタイド骨格を特徴とした luminamicin の生合成研究
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	廣瀬 友靖 (Hirose Tomoyasu)  (00370156)	北里大学・感染制御科学府・教授  (32607)	
研究分担者	松井 秀仁 (Matsui Hidehito)  (80503797)	北里大学・大村智記念研究所・講師  (32607)	

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
---------	---------