

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350964

研究課題名(和文) リボゾーム工学に基づく新規マクロライド抗生物質の創出

研究課題名(英文) Production of new macrolide based on ribosome engineering

研究代表者

小谷 真也 (Kodani, Shinya)

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：20510621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：第一にマクロライド生産放線菌のスクリーニングを行い、生産株の取得を行った。その結果、牧の原茶園土壌より単離したStreptomyces属放線菌より新規16員環マクロライドmakinolide Bを単離した。NMRおよびMSスペクトラムを用いて化学構造の決定を行った。抗菌活性試験の結果、makinolide Bは黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：A new 16-membered macrolide named makinolide B was isolated from Streptomyces sp. MK-19. The structure of makinolide B was determined on the basis of 2D NMR experiments including DQF-COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC methods. As a result of paper disk diffusion method, makinolide B showed weak antibacterial activity against Staphylococcus aureus.

研究分野：生物有機化学

キーワード：マクロライド 抗菌活性 放線菌

1. 研究開始当初の背景

マクロライド系抗生物質は、多様な構造と抗がんなど活性から、重要な抗生物質グループである。その代表格であるエリスロマイシンは感染症治療に用いられているが、不斉中心が多く化学合成が難しいため、微生物発酵で生産されている。このマクロライド系抗生物質は二次代謝産に属する遺伝子群で生産されるため、生産制御が難しく、安定的に高生産する株を得るのは難しい。よって、このマクロライド系の抗生物質の生産制御は、発酵産業上重要な課題であり、微生物育種によって安定した変異株を作り、効率の良い生産方法の確立が求められている。

申請者は、これまで放線菌の形態分化および抗生物質生産システムに関して研究を行い、先駆的成果を挙げた (Kodani et al. PNAS 2004, Kodani et al. Mol. Microbiol. 2005)。これを契機に申請者は、放線菌から2種類の新規シデロフォアの単離・構造決定に成功している (Kodani et al. Eur. J. Org. Chem. 2010, Kodani et al. Nat. Prod. Res. 2011)。さらに放線菌由来の数々の新規抗生物質の単離に成功し、6編の論文を公表している。その中でも申請者の単離したマキノライドは、16員環新規マクロライドであり、顕著な抗カビ作用を有している (Kodani et al. J. Antibiot. 2012)。現在、この物質を産生する株を用いて生産量増大を目的として、申請者らが開発した微生物育種法“リボゾーム工学”(Hosaka, Kodani et al. Nat. Biotechnol. 2009)を適用し遺伝子変異株を作成している。その結果、野生株には見られなかった新規マキノライド類縁体を産生する株を発見した。これら一連の成果に基づき、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

放線菌の産生するマクロライド抗生物質は、その多様な構造と活性から医薬産業上重要な化合物群である。最近の研究で申請者は、

新規マクロライドの単離・構造決定に成功している。さらに、このマクロライド生産放線菌を標的に薬剤耐性を用いた微生物育種を行い、野生株で生産されない新規マクロライドの生産法を確立してきた。本研究は、これらの成果に基づいて計画されたものであり、新規マクロライドの化学構造の決定を行い、新しいマクロライドの発見を目指す。また、薬剤耐性株のDNA配列に基づきどの遺伝子変異がマクロライド生産に有効かを究明する。得られた知見を元にエリスロマイシン生産放線菌の育種を行い、安定かつ多様な類縁体を生産する新規概念“リボゾーム工学”に基づくマクロライド抗生物質生産技術を確立する

3. 研究の方法

第一に、マクロライド生産放線菌のスクリーニングを行い、生産株の取得を行う。さらに得られた生産株をリボゾーム工学等の微生物育種法を用いて変異を導入し、遺伝子変異株を作成する。作成した株は、HPLC、LC-MSなどの化学分析を用いてマクロライド化合物の生産を明らかにする。また新規化合物の生産が見られた場合、大量培養後、各種クロマトグラフィーを用いて分離、純粋な物質を得る。得られた物質に関して、ESI-MSおよび各種NMRの測定を行い、化学構造を明らかにする。

4. 研究成果

1. *Streptomyces* sp. Mk-19 株からの新規マクロライドの単離

静岡県牧之原市の茶園土壌から単離した放線菌34株のうち、抗酵母活性のあった5株(MK-2,3,5,19,30株)についてISP2寒天培地にて7日間培養した。プレート1枚分(培地約17ml)の菌体および寒天をアセトン10mlで約10分抽出し、遠心(4,000rpm、5min)した。上清を100μl取り、HPLCで分析した。検出UV波長をマクロライド系物質の特徴的な吸収波長

である 245 nm に設定し、それぞれの株で主要なピークを分取した後、ESI⁺-TOF-MS 測定に供した。これ以降、MK-19 株の培養日数は 14 日間に設定した。

MK-19 株から抗酵母物質の単離を行った。MK-19 株を ISP2 寒天培地で 30、14 日間培養後、約 600 ml のアセトンで 10 分抽出した。抽出液を減圧濃縮し、疎水性樹脂 CHP-20P (三菱化学) を用いた逆相オープンカラムに供した。H₂O : MeOH = 90 : 10、40 : 60、0 : 100 の 3 つのフラクションに分画した。各画分 1 ml ずつを 1.5 ml マイクロチューブに移し、凍結乾燥させた。その後 DMSO に溶かし込み、*Saccharomyces cerevisiae* を植菌した ISP2 寒天培地に直接 1 μl 添加する方法で抗酵母活性を調べた。活性の見られた 100 % MeOH 画分を逆相カラムである ODS を用いて分析することにより、4 つの大きなピークを単離した。MS や NMR 測定により、そのうち 1 つのピークが新規 bafilomycin 類縁体であることがわかり、これを makinolide B と名付けた。

Makinolide B をさらに HR-ESI⁺-TOF-MS にかけたところ、*m/z* 611.3906 にイオンピークを与えた。分子式は C₃₅H₅₆NaO₇ と推定され、この物質は分子式 C₃₅H₅₆O₇ で分子量 588.40 Da であると示唆された。この分子量の bafilomycin 類縁体は報告が無く、makinolide B は新規 bafilomycin 類縁体であることが示唆された。Makinolide B の構造を決定するために ¹H NMR、COSY、HMBC、HMQC、TOCSY を測定し、構造決定を行った。溶媒は acetone-*d*₆ で測定を行った。その結果、makinolide B は図に示すような化学構造を有した、新規 16 員環マクロライドであることが明らかとなった。

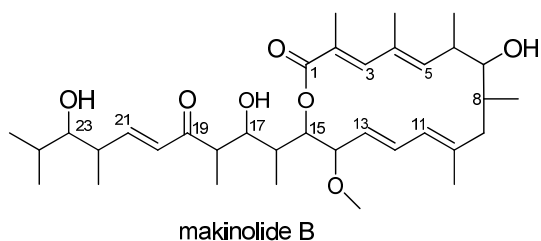


図 1. Makinolide B の化学構造

ペーパーディスク抗微生物活性試験の結果、makinolide B は黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対し、抗菌活性を有することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. S. Kodani*, H. Komaki, M. Suzuki, F. Kobayakawa, H. Hemmi (*corresponding author)
Structure determination of a siderophore peucechelin from *Streptomyces peucetius*
Biomaterials, 28(5), 791-801, 2015 査読有
2. S. Kodani*, H. Komaki, M. Suzuki, H. Hemmi, M. Ohnishi-Kameyama (*corresponding author)
Isolation and structure determination of new siderophore albachelin from *Amycolatopsis alba*
Biomaterials, 28(2), 381-9, 2015 査読有
3. S. Kodani*, K. Sato, H. Hemmi, M. Ohnishi-Kameyama (*corresponding author)
Isolation and structural

determination of a new hydrophobic peptide venepptide from *Streptomyces venezuelae*

Journal of Antibiotics, 67(12), 839-42, 2014 査読有

4. S. Kodani, J. Bicz, L. Song, R. J. Deeth, M. Ohnishi-Kameyama, M. Yoshida, K. Ochi, G. L. Challis
Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel iron-chelating metabolite of the plant pathogen *Streptomyces scabies* 87.22
Organic and Biomolecular Chemistry, 11 (28), 4686-4694, 2013 査読有
5. S. Kodani*, K. Sato, T. Higuchi, B.E. Casareto, Y. Suzuki (*corresponding author)
Montiporic acid D, new polyacetylene carboxylic acid from scleractinian coral *Montipora digitata*
Natural Products Research, 27 (20), 1859-1862, 2013 査読有
6. S. Kodani*, F. Kobayakawa, M. Hidaki (*corresponding author)
Isolation and structure determination of new siderophore tsukubachelin B from *Streptomyces* sp. TM-74
Natural Products Research, 27 (9), 775-781, 2013 査読有
7. M. Hidaki, M. Yoshida, N. Ogawa, S. Kodani* (*corresponding author)
Isolation and structural determination of makinolide B from *Streptomyces* sp. MK-19
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77 (9), 1964-1966, 2013 査読有

[学会発表](計9件)

1. ゲノムマイニングに基づく *Streptomyces cattleya* の新規ラソペプ

チドの単離

日本農芸化学会大会 2016 年度大会

小谷 真也, 菅井 翔吾, 亀山 眞由美

平成 28 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

2. Isolation and structure determination of new lasso peptide sphaericin from *Planomonospora sphaerica*

第 52 回ペプチド討論会

Yuto Inoue, Hikaru Hemmi, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Shinya Kodani
平成 27 年 11 月 17 日、平塚市中央公民館 (平塚市)

3. Isolation and structure determination of new lasso peptide cattlecine from *Streptomyces cattleya*

第 52 回ペプチド討論会

Shogo Sugai, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Shinya Kodani
平成 27 年 11 月 17 日、平塚市中央公民館 (平塚市)

4. Isolation and structure determination of new lasso peptide actinokineosin from *Actinokineospora spheciospongiae*

第 52 回ペプチド討論会

Norimasa Takasaka, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Shinya Kodani
平成 27 年 11 月 16 日、平塚市中央公民館 (平塚市)

5. *Amycolatopsis alba* の生産する新規シデロフォア albachelin の構造決定

第 67 回日本生物工学会大会

小谷 真也, 小牧 久幸, 鈴木 雅博, 逸見光, 亀山 眞由美

平成 27 年 10 月 28 日、城山観光ホテル(鹿児島市)

6. 新規シデロフォア albachelin の構造決定とその生合成遺伝子

2015 年度日本放線菌学会大会

小谷 真也, 小牧久幸, 鈴木雅博, 逸見光,
亀山眞由美

平成 27 年 9 月 8 日、富山国際会議場（富
山）

7. 放線菌 *Planomonospora sphaerica* か
ら得られた抗菌ペプチドの単離と構造決定

2015 年度日本農芸化学会大会

小谷 真也, 井上 雄斗, 逸見 光, 亀山 眞
由美

2015 年 3 月 29 日、岡山大学津島キャンパ
ス（岡山市）

8. 放線菌 *Streptomyces* sp. OCTN84 株由
来ペプチドの化学分析

2014 年度日本生物工学会大会

小谷 真也, 鈴木 雅博, 田中 幸徳, 越智
幸三

2014 年 9 月 10 日、札幌コンベンションセ
ンター（札幌市）

9. 新規疎水性ペプチド *venepptide* の構
造決定

2014 年度放線菌学会大会

小谷 真也, 佐藤 和紀, 逸見 光, 亀山 眞
由美

2014 年 6 月 19 日、エポカルつくば（つく
ば市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 真也 (KODANI, Shinya)

静岡大学農学部・助教

研究者番号：20510621