

放線菌由来シデロマイシン系抗生物質の生合成及び作用機作解析

浅水 俊平

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究の目的

多剤耐性菌による感染症がこの先30年の内に主要な死因となることが予想される中、新規作用機序を有する抗生物質の開発が強く求められている。放線菌などの微生物は抗生物質の重要な生産資源であり、それらの代謝産物はこれまで80年近く人類の感染症との戦いに貢献している。さらに2000年以降のゲノム解析技術の急速な発展に伴い、微生物の未利用の二次代謝能力が膨大な数存在することが強く示唆されている。

放線菌の潜在的二次代謝能力を活性化するアプローチとして、現在、微生物間相互作用（共培養）が有効であるという知見が少しずつ蓄積されてきている。本研究では、放線菌とミコール酸含有細菌の複合培養液中に、特異的に生産される抗生物質のスクリーニングを行い、得られた新規シデロマイシン系抗生物質について解析を行った。

方法及び結果

2014年に北海道富良野市の東京大学北海道演習林で土壌を採取し、59種の放線菌株を分離した。それらの菌株と *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 との複合培養を行い、複合培養時特異的に誘導される *Staphylococcus aureus* に対して生育阻害を示す培養抽出物の探索を行った。スクリーニングの結果、16S rDNA 解析により *Streptomyces hygroscopicus* と同定した HOK021 株が、複合培養時特異的に *S. aureus* に対してその生育阻害を示す物質を生産することが明らかになった。

UPLC-QTOF-MS/MS 分析により得られたデータをもとに複合培養抽出物に含まれる活性物質の推定を行ったところ、細菌脂肪酸合成阻害剤である platensimycin (PTM)¹⁾ をその中に同定した。更に MS ネットワーク解析により、多くの PTM 未知類縁体が含まれることが明らかになったことから、質量情報を指標に新規類縁体の単離・精製を行った。10.8 L の複合培養液から、酢酸エチル抽出により 8.7 g の粗抽出物を獲得し、粗抽出物中に含まれる目的化合物を低圧 ODS カラム、分取 HPLC により 16.7 mg 精製した。

各種 NMR を用いた構造解析を行った結果、精製した化合物は抗生物質である PTM

が、シデロフォアである enterobactin (ENT)²⁾ の脱水 2 量体 (DED) とチオエステル架橋で連結した物質であることが明らかになった。この新規シデロマイシン様の抗生物質を harandomycin (HDM) と命名した。³⁾

HDM の生成機構、特に PTM と DED を連結するチオエステル結合形成に関する知見を得るために、新たに単離精製した thioPTM⁴⁾ と DED を生理条件下でインキュベートしたが、HDM の生成は確認できなかった。このことから細胞内の何らかの触媒が結合形成に要求されることが示唆された。また HOK021 株のドラフトゲノムシーケンスを取得し、解析を行った。既知の特異的な PTM 生合成遺伝子及び ENT 生合成遺伝子と高い相同性を有する遺伝子が HOK021 ゲノム中に発見された。今後はより精度の高いゲノムシーケンスデータを新たに取得し、RNA-seq 解析などを用いて結合形成機構に関与する生体内因子の同定を行う予定である。

名古屋大学大学院医学系研究科の荒川宜親先生のご協力の下、HDM の抗菌スペクトルを明らかにするために種々細菌に対する MIC 測定を行った。HDM はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性エンテロコッカス (VRE) に対して 16~32 μM で MIC を示した。一方 ENT をシデロフォアとして生産する *E. coli* や、他のグラム陰性細菌に対して抗菌作用は示さなかった。これは活性の本体である PTM がグラム陰性細菌に対して抗菌作用を示さないことと一致した結果であった。また、ENT 二量体を持つ HDM の他に ENT の一及び三量体と結合した新規類縁体を新たに単離した。現在、培地から鉄を枯渇させた条件でのこれら類縁体の MIC 測定を予定しており、鉄欠乏状態での MRSA などのグラム陽性細菌に対しての抗菌作用に変化があるかを調べる予定である。

結論

本研究では、*S. hygroscopicus* HOK021 株と *T. pulmonis* 株との複合培養液から新規シデロマイシン類である抗生物質 HDM を発見し、生成機構及び生物活性について解析を行った。「トロイの木馬」抗生物質は、標的細菌のトランスポーターを利用して細胞内に侵入し、加水分解などによる抗生物質部位の切り離しを介し、抗菌作用を発揮する抗生物質の一群である。中でもシデロマイシン類と呼ばれる抗生物質群は、シデロフォアが「運び屋」になり、albomycin などでは連結した抗生物質弾頭をシデロフォア特異的トランスポーターを介して細胞内へ取り込ませ、結果として抗菌作用が強化されることが知られている。⁵⁾

「トロイの木馬」系天然抗生物質の存在は、自然界において敵を積極的に攻撃しようとする天然ロジックが存在することを反映していると考えられ、本系における

HDM は複合培養特異的に生産されることから、その生産制御機構も興味を持たれる。HDM の生合成機構及び作用機構について分子レベルでより詳細に解析を行い、新たな研究を展開していきたい。また今後、MS ネットワーク解析などの手法を用いて、放線菌複合培養液抽出物の中に新たなシデロマイシン系抗生物質を探索し、天然に由来する特異的なシデロフォアと抗生物質が連結された化合物を探索し、新しい創薬の方向性を生み出したいと考えている。

文献

- 1) Wang, J. *et al.* (2006) Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*. **441**: 358-361.
- 2) Reitz, ZL., Sandy, M., Butler, A. (2017) Biosynthetic considerations of triscatechol siderophores framed on serine and threonine macrolactone scaffolds. *Metallomics*. **9**: 824-839.
- 3) Asamizu, S., Sugai, Y., Onaka, H. (2018) A new sideromycin-like antibiotic from combined-culture of *Streptomyces hygrosopicus* HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*. *IFO Res. Commun.* **32**: 117-127.
- 4) Dong, LB. *et al.* (2018) Biosynthesis of thiocarboxylic acid-containing natural products. *Nat Commun.* **9**: 2362.
- 5) Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M., Bohn, E. (2009) Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals*. **22**: 3-13.