

潜在的二次代謝能の覚醒による高温性放線菌からの 希少天然物の発掘

木谷 茂
青山学院大学 理工学部

研究の目的

放線菌は、多彩な生理活性物質を二次代謝産物とし、天然物探索の中心に位置する微生物である。放線菌ゲノム情報の集積より、1株当たり、30種以上もの二次代謝産物を合成する能力が放線菌に推定されたが、検出される二次代謝産物は数種に留まっており、未発見のユニークな二次代謝産物が多数、存在する。この潜在する二次代謝産物を生産活性化できれば、新規構造を有する天然物を取得できると考えられる。一方、潜在化合物を生産覚醒させる様々な技術が開発されてきたが、いずれも“既存”菌株を対象としており、新規物質の発見数は横ばい状態にある。もし、新たな放線菌探索源を呈示できれば、新規物質ヒット率は向上すると期待される。

従来の物質探索では、28℃前後にて生育する放線菌が使用されているが、50℃付近を生育温度とする“高温性”放線菌の物質生産能は未知数である。近年、放線菌の培養温度シフト（28℃→45℃）により、新規物質が獲得された^{1,2)}。しかし、これらの探索株は、28℃にて分離された菌株であり、既存の放線菌が耐熱化している可能性が考えられる。一方、我々は、50℃前後で分離された高温性放線菌は、上述の耐熱化株とは生育環境が異なるため、従来にない遺伝学的要素を含むと考えた。

本研究では、高温性放線菌に潜在する二次代謝能を、培養温度シフトやリボソーム工学などにより覚醒し、希少天然物を発掘すること、またその生産覚醒機構を解析するツールを開発することを目的とした。

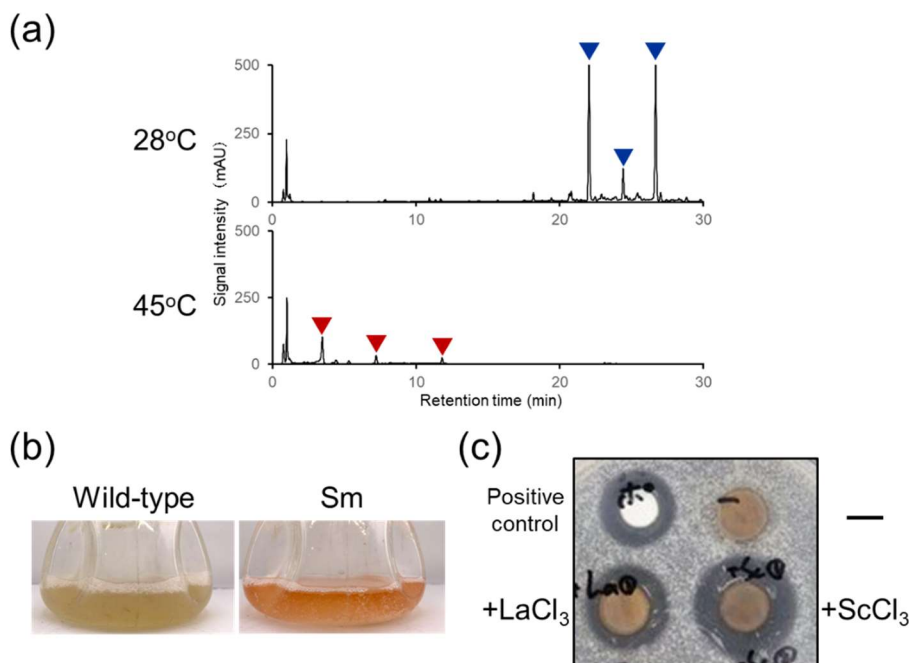
方法

NITE バイオテクノロジーセンター (NBRC) に寄託されている生育温度 45℃以上とする放線菌 (*Streptomyces* 属放線菌 14 種と *Actinomadura* 属放線菌 1 種) を本研究に使用した。培養温度は 45℃と 28℃を選択し、高温性放線菌の代謝物プロファイルや抗微生物活性を解析した。また、高温性放線菌を用いて、リファンピシンもしくはストレプトマイシン、オフロキサシンに対する突然変異耐性株も取得し、これら菌株の代謝プロファイルを比較解析した。さらに、高温性放線菌をスキャンジウムまたはランタンを添加した培地にて培養し、その代謝物を解析した。二次代謝覚醒機構の迅速解析を目指し、CRISPR-Cas9 技術を応用した塩基編集ベクターを構築、放線菌の各種二次代謝遺伝子クラスターを解析した。

結果

1. 培養温度依存性物質の探索

高温性放線菌 15 菌株の抗微生物活性を培養寒天片を用いたバイオアッセイにより解析した結果、高温性放線菌 A の抗大腸菌活性が 45℃ 培養により誘導されることが分かった。次に、同菌株を液体培養に供し、培養温度が本菌株の代謝物生産に与える影響を解析した。その結果、45℃ 培養で生産誘導される物質が複数、検出された一方、28℃ 培養でしか生産されない化合物もあることが分かった (図 a)。したがって、高温性放線菌を各種温度で培養することにより、その二次代謝能が変化することが示唆された。



2. リボソーム工学による休眠二次代謝覚醒

リボソーム工学は、転写系や翻訳系を抗生物質を用いて改変し、放線菌の休眠二次代謝を覚醒させる技術である。そこで、高温性放線菌 B のストレプトマイシン (Sm) 耐性株を取得し、45℃ にて液体培養したところ、培養液がオレンジ色に呈色した (図 b)。そこで、その培養抽出物を検出波長 500 nm にて逆相 HPLC 解析したところ、カラム保持時間 9.4 分付近にピークが検出されたことから、この化合物がオレンジ色素であると推察した。また、異なる検出波長にて HPLC 解析したところ、複数の化合物の生産が Sm 耐性に伴い増強されていることが分かった。同様の現象は、他の高温性放線菌においても見出されており、高温性放線菌の休眠二次代謝がリボソーム工学により覚醒したと考えている。

3. 希土類元素添加技術による休眠二次代謝覚醒

希土類元素添加技術は、放線菌の培養液に希土類元素を添加することにより、その休眠二次代謝を覚醒させる手法である。そこで、高温性放線菌に塩化スカンジウム

ムまたは塩化ランタンを投与し、抗微生物活性や代謝プロファイルを解析した。その結果、高温性放線菌 C では、固体培養において、その抗大腸菌活性が塩化スカンジウムまたは塩化ランタンの添加により誘導され（図 c）、また液体培養では、複数の化合物が希土類元素により生産誘導されることが分かった。同様の生産誘導現象は他の高温性放線菌でも観察されており、現在、その物性を解析している。

4. 塩基編集ベクターの開発

上記において、高温性放線菌の潜在的二次代謝能が各種手法により活性化され、希少天然物を発掘できる可能性が高まった。45℃培養にて生産される化合物は耐熱性の二次代謝酵素により生合成されることから、その酵素機能にも興味を持たれる。そこで、酵素の迅速な機能解析を目指し、塩基編集ベクターを開発することにした。CRISPR-Cas9 技術を応用した C-to-T 塩基置換を可能とする Target-AID ベクター pLK101 を構築し、*Streptomyces coelicolor* A3(2)株のアクチノロージン生合成遺伝子や *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株の青色色素合成遺伝子の不活化に成功した。さらに、*S. lavendulae* FRI-5 株の未解明であったポリエン系マクロライド化合物生合成クラスターを同定するに至った³⁾。この pLK101 の活用により、高温性放線菌の二次代謝機構を迅速に解明できると考えている。

結論

これまでに注目されていなかった「45℃培養が可能な高温性放線菌」を物質探索源とし、その潜在的二次代謝能の顕在化を試みたところ、多数の休眠化合物が生産覚醒されることを見出した。生産覚醒化合物の化学構造を同定する必要性はあるが、高温性放線菌に潜在的二次代謝能の覚醒を掛け合わせることで、希少天然物を発掘できる可能性は飛躍的に高まると考えられる。

文献

- 1) Saito, S., Kato, W., Ikeda, H., Katsuyama, Y., Ohnishi, Y., and Imoto, M. (2020) Discovery of "heat shock metabolites" produced by thermotolerant actinomycetes in high-temperature culture. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **73**: 203-210.
- 2) Saito, S., Suzuki, S., and Arai, M.A. (2022) Noaoxazole, a new heat shock metabolite produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. HR41. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **75**: 509-513.
- 3) Otsuka, R., Sato, Y., Okano, K., Okamura, E., Tomita, H., Honda, K., and Kitani S. (2025) Identification of a critical gene involved in the biosynthesis of the polyene macrolide lavendicin in *Streptomyces lavendulae* FRI-5 using the Target-AID (activation-induced cytidine deaminase) base editing technology. *Appl Environ Microbiol*. In press.