

放線菌が生産する熱ショック代謝物 (HSM) の耐熱性促進機構の解析

齋藤 駿

慶應義塾大学 理工学部

研究の目的

我々は、放線菌を高温で培養すると常温では生産されない高温培養特異的物質が生産される現象を発見し、このような代謝物を「**熱ショック代謝物 (Heat Shock Metabolite: HSM)**」と命名した¹⁾。本研究では、放線菌が生産する HSM は、どのような物質なのか (What), どのように生産されるのか (How), なぜ生産されるのか (Why), 解析することで、新規骨格を有する天然物の探索、および、HSM 生産における制御システムや生理的意義の解明を目指している。本申請課題では、*Streptomyces* sp. JA74 が生産する HSM として見出した Maniwamycin 類の耐熱性促進機構を解明することを目的とした。Maniwamycin 類は、天然物においては 50 例程度の報告例しか存在しないアゾキシ構造を有しており、その生理的意義についての報告例は一切存在しない。

方法・結果

□ Maniwamycin 類の高温での生育に与える影響

はじめに、放線菌 JA74 株はなぜ高温培養により DME を生産するのか、その生理的意義について解析を試みた。まず、Maniwamycin 類である、Dihydromaniwamycin E もしくは Maniwamycin E を含む寒天培地にて JA74 株の培養を行い、Maniwamycin 類が高温での生育に与える影響を評価した。通常 JA74 株は、51℃ で生育が悪化し、52℃ において生育不可となる。

一方 Maniwamycin 類は、51℃ での生育を促進し、52℃ での生育を可能とさせる傾向を示した (図 1)。以上より Maniwamycin 類は、JA74 株の生育限界温度を向上させ、高温での生育を促進することが明らかとなった。現在、Maniwamycin 類の生合成遺伝子を破壊することで、高温での生育に与える影響についての評価に取り組んでいる。以降の解析では、Dihydromaniwamycin E に焦点を当て、化合物名について

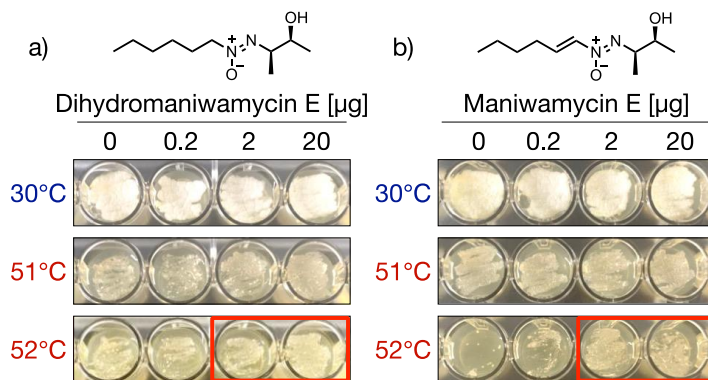


図 1. Dihydromaniwamycin E (a), および Maniwamycin E (b) の生育に与える影響

では DME と記載している。

□ Dihydropyranamycin E の耐熱性促進機構の解析

これまで、アゾキシ構造を有する天然物は、細胞毒性や抗菌活性についての知見はあるものの、生物活性についての情報は非常に少なく、その機能性について理解する手がかりは乏しい。そこで、DME の耐熱性促進機構を解明するため、DME の「結合タンパク質」について、二つの手法により解析を試みた。

・「細胞株パネル解析」による結合タンパク質の解析

まず一つ目として、分子プロファイリング支援活動²⁾により実施されている「細胞株パネル解析」により、DME の結合タンパク質の解析を試みた。がん細胞に対する各種阻害剤の感受性パターンとの比較解析により、DME のヒト細胞における結合タンパク質候補として、① DNA Polymerase, ② p38 MAPK, ③ BCRP/ABCG2, ④ Adenylate Cyclase が予測された。この中で、①の阻害は毒性が生じることが予想され、②③は放線菌に

は存在しないタンパク質であったことから、④に着目することとした。Adenylate Cyclase (AC) は、ATP を cAMP へと変換する酵素であるため、DME による阻害により ATP 量を増加させることで高温での生育に利用していると仮説を立てた。実際に、他の耐熱性を有する微生物においては、その高温耐性にエネルギー代謝の亢進が関与していることが報告されている³⁾。まず、AC の阻害剤の一つとして知られる 2',5'-Dideoxyadenosine の JA74 株の生育に与える影響を評価したところ、DME 同様に高温での生育を促進する傾向を示した (図 2a)。そこで、AC の機能を活性化することで知られる Forskolin について、高温での生育を抑制するの検証を行ったが、目的の活性は見られなかった (図 2b)。Forskolin の機能については、ヒトの細胞において報告されているものであるため、放線菌においては機能しなかった可能性がある。そこで現在は、常温・高温培養時の ATP および cAMP 量を定量するため、これらの測定方法の確立を試みている。

・「磁気ビーズ」による結合タンパク質の解析

次に二つ目として、磁気ビーズを用いて DME の結合タンパク質の同定を試みた。

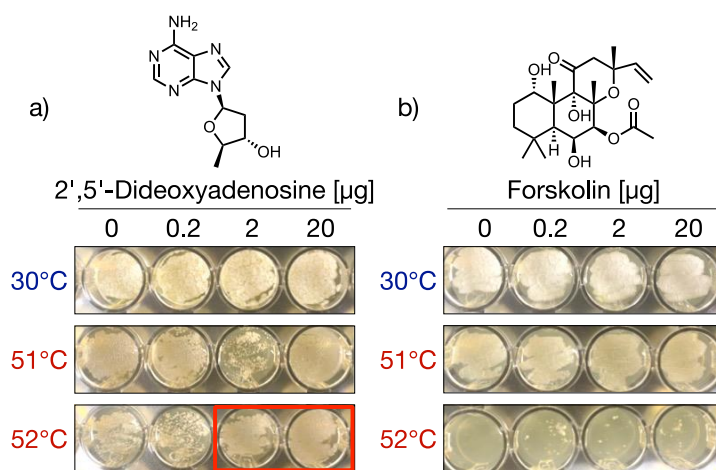


図 2. Adenylate Cyclase 阻害剤 (a), および活性化剤 (b) の生育に与える影響の評価

まず、DME の水酸基が耐熱性促進活性において必須であるのか確認を行った。水酸基部分をベンゾイル基で保護した化合物の活性を評価したところ、DME 同様に高温での生育の促進活性を示した。そこで、水酸基部分を磁気ビーズへと固定化し、JA74 株の抽出液から結合タンパク質の同定を試みた。まず、DME 固定化後の上清を HPLC により解析し、DME の大部分が検出されないことを確認した。続いて、作製した磁気ビーズを使用し DME に結合するタンパク質のプルダウンを行ったが、DME に結合するタンパク質バンドは検出されなかった (図 3)。そこで現在は、タンパク質溶液や磁気ビーズの調製方法等の検討を行っている。

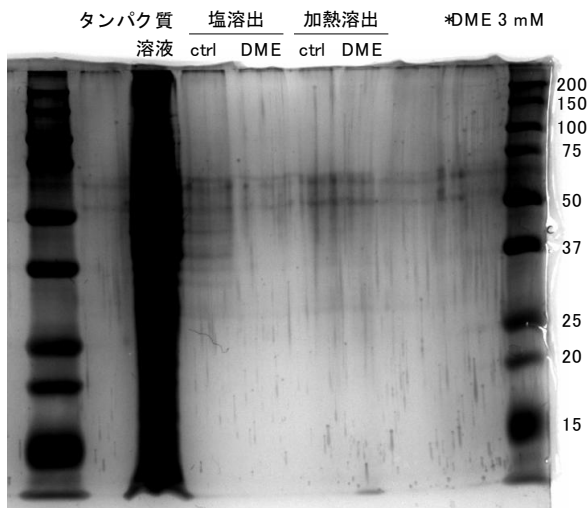


図 3. DME 結合タンパク質の解析

□ 今後の予定

今後は、DME の AC 阻害および磁気ビーズによる解析を継続するとともに、DME の「生物活性」にも着目し、耐熱性促進機構の解析を実施する。これまで、その他の HSM については、ヒト細胞への生物活性から耐熱性促進機構の理解へ結びついた例がいくつか存在している。本申請課題とは別に、DME の生物活性を評価したところ、抗ウイルス・抗がん幹細胞活性を示すことがわかった (図 4)⁴⁾。現在、細胞膜表面のタンパク質に焦点を当て解析を行っているため、その作用機序についても耐熱性促進活性の理解に結びつけていきたいと考えている。

結論

Streptomyces sp. JA74 が生産する HSM として見出した Maniwamycin 類に、生産菌の高温での生育を促進する活性を見出した。

文献

- 1) Saito, S., Kato, W., Ikeda, H., Katsuyama, Y., Ohnishi, Y., Imoto, M. (2020) Discovery of “heat shock metabolites” produced by thermotolerant actinomycetes in high-temperature culture. *J. Antibiot.* **73**: 203-210.
- 2) 分子プロファイリング支援活動 (<https://www.molpro.jp>).
- 3) 山田守、赤田倫治、高坂智之、東慶直、星田尚司、松下一信 (2015) 耐熱性発酵微生物の耐熱性を賦与する分子機構. *化学と生物*. **53**: 763-773.
- 4) Saito, S. *et al.* (2022) Dihydromaniwamycin E, a heat-shock metabolite from thermotolerant *Streptomyces* sp. JA74, exhibits antiviral activity against influenza and SARS-CoV-2 viruses. *J. Nat. Prod.* **85**: 2583-2591.