

異種菌間相互作用を模倣した合理的な二次代謝産物探索系の創出

吉村 彩

北海道大学薬学部

研究の目的

細菌が生産する二次代謝産物はゲノム上にコードされた生合成遺伝子クラスターを設計図として生合成される。近年のゲノムシーケンス・バイオインフォマティクス技術の飛躍的な発展により、細菌が保有する生合成遺伝子クラスターが概算できるようになった。さらに、その 80%以上が産物未知のまま手付かずであることが示され、休眠遺伝子と呼ばれるようになった。それら休眠遺伝子を活性化することができれば、新たな二次代謝産物を取得できる。これまでに、細菌培養液に低濃度の抗生物質や異種細菌を添加することで休眠遺伝子を活性化する方法が報告されてきた。それらのアプローチは、自然環境を模倣した条件で細菌を培養することで休眠遺伝子が活性化することを示唆している。

最近、海水中から細胞外膜小胞 (MVs) が検出され、環境中で細菌が MVs に曝されていることが示唆された。MVs はほとんどの細菌が放出する脂質二重膜小胞で、タンパク質・核酸断片や小分子化合物を内包する。MVs の機能として、遺伝子の水平伝播や栄養獲得、細菌間相互作用に関与する。そこで我々は MVs を細菌培養液に添加すれば、休眠遺伝子を活性化し、新規二次代謝産物が得られると着想した。実際に、*Burkholderia multivorans* の MVs を約 100 細菌種に添加し、MVs で生産誘導される二次代謝産物を探索した結果、複数の新規化合物を得ている¹。さらに *Burkholderia multivorans* と *Xenorhabdus innexi* 間において、MVs で生産誘導された二次代謝産物と MVs を介した競争的な相互作用が存在することを提唱した²。本研究では、本手法の適用範囲を検証するため、MVs と細菌種を総当たりで培養し、生産誘導される二次代謝産物を探索した。

方法

まず、本研究に用いる MVs の生産菌を探索する。本研究では多種類の細菌種に MVs を添加するため、生産量が多く、かつ二次代謝誘導活性を有する MVs を取得する。一般的に MVs 生産量が多いグラム陰性菌を探索対象とし、所属研究室保有の環境分離株 400 株を探索源とする。

得られる MVs と生合成遺伝子クラスターを多く保有する細菌種を総当たりで培養し、培養液抽出物を調製する。それら抽出物を LC-MS で測定し、得られる質量分析データをもとに、MVs 添加時にのみ生産される代謝産物をメタボローム解析により選抜する。選抜結果から、MVs が一般に二次代謝誘導活性を有する可能性と、MVs

ごとのヒット代謝産物のプロファイルを検証する。さらに、MVs を添加して大量培養した細菌種の培養液抽出物からヒット代謝産物を得る。MS、NMR などの分析化学的手法を用いて、当該代謝産物の化学構造を決定する。

結果

定法では、細菌培養液の上清から MVs を採取する。そこで、約 400 種類の環境分離株を 96 ウェルプレートで培養し、その上清の濁度が高い細菌を約 20 種類選抜した。それら細菌種をあらためて培養し、定法に従って、超遠心分離により MVs を採取した。その濁度によって MVs 高生産株を選抜した。ヒットした MVs 高生産株の二次代謝誘導活性を検証した。*B. multivorans* の MVs に最も感受性の高かった *X. innexi* を被検菌として、3 種の代謝産物のいずれかを 3 倍以上生産誘導させた MVs を選抜した。その結果、複数の *Pseudomonas* 属細菌を含む 9 種の MVs がヒットした。

当該 9 細菌種のうち 3 細菌種から採取した MVs と、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを多く保有する約 50 細菌種を総当たりで培養した。培養液抽出物をメタボローム解析に供し、得られた質量分析データから MVs 添加時にのみ生産誘導される代謝産物を選抜した。その結果、いずれの MVs も多様な細菌種に対して様々な代

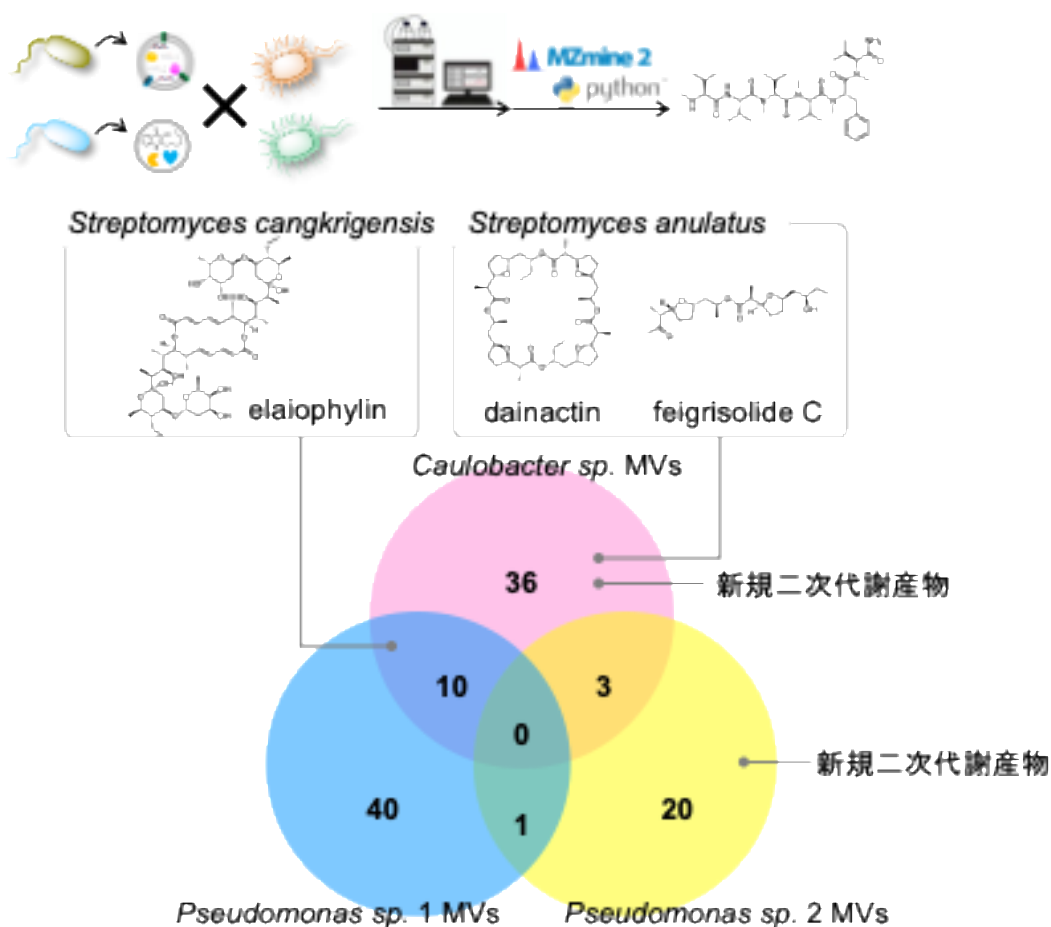


図 1. 本研究の結果.

謝産物を生産誘導させた（図 1）。さらに、そのプロファイルは MVs ごとに異なっていた。

ヒット代謝産物のうち、*Pseudomonas* 属細菌 1 由来の MVs が *Streptomyces cangkrigensis* に対して生産誘導させた二次代謝産物を単離した。MS、NMR 解析から、得られた化合物は既知二次代謝産物 elaiophylin と決定した。同様に、*Caulobacter* 属細菌の MVs が生産誘導した二次代謝産物として、dainactin と feigrisolide C を *Streptomyces anulatus* から得た。同 MVs は *Mycobacterium* 属細菌に対して新規二次代謝産物も生産誘導させていた。さらに、*Pseudomonas* 属細菌 2 由来の MVs が *Streptantibioticus cattleyicolor* に対して生産誘導した新規二次代謝産物は、従来の構造決定手法では化学構造を決定できなかった。そこで、近年、二次代謝産物の化学構造を決定できる新たな手法として注目されつつある microED を適用した。すなわち、当該化合物の微結晶に電子線を照射し、得られる結晶回折データを分析することで、立体化学を含む当該化合物の化学構造を決定した。

結論

B. multivorans の MVs に限らず、複数の MVs が二次代謝誘導活性を示すことを明らかにした。さらに、生産誘導された代謝産物のプロファイルは MVs ごとに異なっていた。実際に、ヒット代謝産物のうち、いくつかの二次代謝産物を単離・構造決定した。今後、MVs と細菌種の組み合わせを増加させることで、さらなる新規二次代謝産物の獲得が期待できる。

文献

- 1) Yoshimura A., Honda T., Wakimoto T. (2024) Five new analogs of streptogramin antibiotic viridogrisein isolated from *Streptomyces niveoruber*. *Chem. Pharm. Bull.* **72**: 80-85.
- 2) Yoshimura A., Saeki R., Nakada R., Tomimoto S., Jomori T., Suganuma K., Wakimoto T. (2023) Membrane-vesicle-mediated interbacterial communication activates silent secondary metabolite production. *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**: e202307304.