

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名 | しゅう とう 周 韜 |
| 学位の種類 | 博士 (工学) |
| 学位記番号 | 博生第 22 号 |
| 学位授与日 | 平成 28 年 3 月 20 日 |
| 論文題目 | Study on the Polyketides Produced by Marine-derived <i>Streptomyces</i> sp. NPS554 (海洋由来 <i>Streptomyces</i> sp. NPS554 が生産するポリケチドに 関する研究) |
| 論文審査委員 | (主査) 富山県立大学 教授 五十嵐 康弘 教授 伊藤 伸哉 教授 中島 範行 准教授 岸本 崇生 講師 奥 直也 東京海洋大学 教授 今田 千秋 |

内容の要旨

ペニシリンの発見は、それまで治療が困難であった感染症の恐怖から人類を救うと同時に、微生物が医薬品の探索源であるとの認識を初めて人類に与える契機となった。その後、実用的な抗生物質が相次いで微生物から発見され、細菌感染症による死亡数は激減した。また微生物由来医薬品の適用範囲は、癌、寄生虫症、高脂血症、糖尿病など様々な疾病へと広がった。しかし、集中的な探索研究の結果、容易に分離可能な放線菌や糸状菌からの新規物質の発見効率が低下し、20 世紀終盤には微生物からの創薬研究は急激に衰退した。一方で、コンビナトリアル合成は低コストで膨大な数の化合物を供給できることから、天然物に代わる創薬ライブラリーと期待されたが、新薬創出の成果は思いの外上がっていない。これは、合成化合物の構造多様性が天然物に比べて低く、ランダム合成された化合物の構造には本質的に生物学的意味がないことに起因する。それゆえ、天然物こそが最も有望な新規リード探索源であるとの認識は依然強く開発研究者の間に残されている。

現在、新規物質取得のアプローチとして、未研究の新種微生物から探索する方法、あるいはゲノム中から新規物質生合成遺伝子を探索する方法が有力視されている。新種微生物は既知種とは異なる遺伝子を保有することから、二次代謝遺伝子にも違いがあると考えられ、過去に研究対象となっていないことから、結果として新規化合物の生産が期待される。例えば海洋放線菌は、土壌放線菌とは遺伝形質が異なり、保有する二次代謝遺伝子にも差が認められ、実際に海洋放線菌から新規化合物が多数報告されている。放線菌を含む原核微生物においては、分類指標とされる 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が既知種

に対して 97%未満の菌株は新種である可能性が高い。他方、微生物二次代謝物は生合成経路の特徴にしたがい、ポリケチド、ペプチド、テルペノイド、グリコシドの四種に大別でき、さらにポリケチドは脂肪族化合物と芳香族化合物に分類される。実用化された微生物由来医薬品には脂肪族系ポリケチドに属するものが多く、例えばピロリ菌除菌薬クラリスロマイシン、オンコセルカ症治療薬アベルメクチン、免疫抑制剤タクロリムスなどが挙げられる。この群の化合物は、官能基、立体異性、環構造の点から二次代謝物の中でも特に構造多様性が高く、多様な生理活性を期待できるため、医薬品探索源として有望である。また二次代謝物生合成の理解が進み、特に、規則的な酵素反応の組み合わせから作り出される放線菌の脂肪族系ポリケチドでは、遺伝子配列解析により、合成される基本骨格を精度高く予測することが可能である。したがって、ある任意の微生物株のゲノムデータが得られれば、その菌株がどのような物質を生産する能力を有するのかを生合成遺伝子の配列をコンピューター上で解析することにより知ることができる。この手法はゲノムマイニングあるいはゲノムスクリーニングと称され、従来の培養法のみでは得ることが困難であった個々の微生物株の二次代謝能力を正確に評価できるばかりでなく、新規物質を効率的に発見するための重要な手法の一つとなっている。微生物培養混合物からの新規物質探索では HPLC 上で分離した成分を何らかの分光学的方法により検出し、各成分の構造情報を取得し、構造新規性を推定する。紫外可視吸収スペクトル (UV) と質量スペクトル (MS) が最も一般的である。MS が分子量、すなわち分子の大きさに関する情報を与えることに対して、UV スペクトルは化合物の共役系 (不飽和結合系) 構造に関する情報を与える。例えば、芳香族化合物や高度な共役系を有する化合物は 300 nm 以上に吸収極大を持ち、脂肪族系ポリケチドに多く見られる短い共役系は概ね 300 nm 以下に極大を示す。本論文は、微生物種の選択、分光学的スクリーニング法、ゲノムスクリーニング法を融合させることで、微生物創薬の起点となる構造多様性に富む化合物ライブラリーの構築に寄与できる成果を得た。

本論文は 5 つの部分から構成されており、第一章では研究背景と目的、第二章では分光学的スクリーニングによる新規多環性ポリケチドの発見、第三章では二種類の脂肪族系ポリケチドの生合成、第四章ではゲノムスクリーニングによる新規マクロライド化合物の発見、第五章は結論としてすべての章を総括し、展望を述べている。主な内容は以下の通りである。

第二章では、海洋から分離された *Streptomyces* 属放線菌 NPS554 株からの新規ポリケチド化合物の単離、構造決定、生物活性について述べている。新規脂肪族系ポリケチドを探索するにあたり、探索源となる微生物株には、日本各地の海洋環境から分離され、16S rRNA 遺伝子配列が既知種に対して 97%以下の相同性を示す放線菌 27 株を選択した。それらの菌株を複数の培地で培養し、その抽出物を HPLC による分光学的解析に付した。その結果、宮崎県宮崎港近くの水深 38 m の海底堆積物から分離された NPS554 株が、UV スペクトルで 330 nm と 242 nm にそれぞれ吸収極大を持つ二種類の未知物質を生産することを見出した。またこのとき既知化合物 lomeic acid A の生産も認められた。上記の二化合物のうち、330 nm に極大を示す成分はポリエーテル構造を有すると推定され、一方で 242 nm に極大を示す成分は目的とする脂肪族系ポリケチドと予想された。そこで後者の化合物を単離し、構造解析することとした。培養抽出物を順相および逆相シリカゲルカラムで分画した後、HPLC 分取により目的化合物を単離し、宮崎港の旧名称、赤江 (あかえ) 港に因んで akaeolide と命名した。精密質量分析により分子量を $C_{22}H_{32}O_6$ と決定し、 1H および ^{13}C NMR スペクトル、COSY、HSQC、HMBC 等の二次元 NMR スペクトルを解析することにより平面構造を決定した。本化合物は β -ケト- δ -ラクトン環を含み、15 個の炭素が連結した環構造を持つ新規化合物であった。同様の平面構造を有する化合物として mangromicin B が特許に記載されていたが、旋光度は逆の符号を示し、NMR スペク

トルが一致しなかったため、同一化合物ではないと判定された。次に akaeolide の立体構造の決定を行うにあたり、NMR による 15 員環構造の配座解析は困難と予想され、結晶構造解析が必要と判断した。そこで化合物の結晶性を高めるため、*N*-クロロスクシイミドによりモノクロロ化誘導体を合成し、再結晶により板状晶を作成した。その結晶の X 線回折データから絶対配置を含む全立体構造を確定し、塩素化された箇所の炭素の絶対配置は akaeolide の NOESY スペクトル解析により決定した。Akaeolide はグラム陽性細菌 *Micrococcus luteus* に対して選択的抗菌活性を示し、グラム陰性菌の大腸菌や酵母には活性を示さなかった。

第三章では、NPS554 株が生産する akaeolide と lorneic acid A の生合成、ならびに NPS554 株ゲノム中の二次代謝遺伝子の解析結果について述べている。これまでの研究により、NPS554 株は特異な構造を有する二種類の肪族系ポリケチド akaeolide と lorneic acid A を生産することが明らかとなった。環状の脂肪族ポリケチドでは、炭素鎖がエステルあるいはアミド結合を介して環構造を形成している場合がほとんどであり、akaeolide に見られる炭素原子のみから成る環構造は極めて数が少ない。また lorneic acid A のように、直鎖脂肪酸の炭素鎖中にベンゼン環を含む化合物は、lorneic acid B, C, D, lorneamide A, B, ならびに BE52211 類以外には知られておらず、生合成機構も解明されていなかった。そこで生合成前駆体と予想される酢酸とプロピオン酸の ¹³C 標識化合物を添加培養し、標識炭素の取り込み位置を調べた。その結果、akaeolide には酢酸 5 分子とプロピオン酸 4 分子が取り込まれ、アセチル CoA がスターターとなり、3 分子のマロニル CoA, 3 分子のメチルマロニル CoA, 1 分子の *n*-プロピル CoA の縮合により炭素骨格が形成されることを明らかにした。また lorneic acid A には酢酸 7 分子とプロピオン酸 1 分子が取り込まれ、アセチル CoA がスターターとなり、6 分子のマロニル CoA, 1 分子のメチルマロニル CoA が縮合することを明らかにした。次に本菌株のゲノム解析を行い、8 個の脂肪族ポリケチド生合成遺伝子 (I 型ポリケチド合成酵素, type I PKS) クラスターの存在が確認された。次いで、各クラスターの遺伝子配列およびドメイン配列から、生産されるポリケチドの構造を推定し、akaeolide と lorneic acid A の生合成遺伝子クラスターを特定した。Akaeolide の生合成遺伝子クラスターは 4 つの PKS 遺伝子を含み、その下流には akaeolide の骨格形成に関与すると推定される P450 遺伝子が 2 つと nogalamycin 生合成においてアルドール反応を触媒する cyclase に高い相同性を示す遺伝子が存在していた。このうち P450 は末端メチル基のアルデヒド基への酸化を、cyclase がアルドール反応により炭素環の形成を行うことを推定した。同様に lorneic acid A のクラスターには 4 つの PKS 遺伝子が存在し、そのドメイン配列からこの PKS の生産するポリケチドは共役ペンタエン構造を含むポリエン化合物であると推定された。これは、これまでに知られているポリケチド生合成における芳香環形成機構とは異なり、lorneic acid A のベンゼン環が鎖状ポリエンから形成されることを示唆していた。PKS 遺伝子の下流には P450 をコードする遺伝子が存在し、芳香環形成への関与が推定された。

第四章では、ゲノムスクリーニングによる NPS554 株からの新規ポリケチドの単離、構造決定、生物活性について述べている。上述のように NPS554 株のゲノムには 8 個の type I PKS 遺伝子クラスターが存在し、そのうち 2 個が akaeolide と lorneic acid A の生合成遺伝子と特定されたが、残り 6 個のクラスターについてもドメイン解析を行い、それぞれの PKS により合成されるポリケチドの構造を予測した。3 個の PKS からは炭素鎖数 10 以下の小分子が生産物と予想されたが、残り 3 つの PKS からはそれぞれ炭素鎖長が 23 個、24 個、35 個のポリケチドが生産され、UV スペクトルの吸収極大波長はそれぞれ約 200 nm, 約 240 nm, 約 330 nm と推定された。この情報に基づき、NPS554 株培養混合物の HPLC データを再解析したところ、第二章で述べたように 330 nm に吸収極大を持つ未知化合物が生産されており、これが炭素鎖長 35 のポリケチドに相当すると考えられた。遺

伝子情報から新規構造と推定されたため、UV スペクトルを指標に、培養抽出物を順相および逆相シリカゲルカラムで分画し、逆相系 HPLC カラムによる最終精製により目的物質 akaemycin を単離した。本化合物の分子量を精密質量分析により $C_{36}H_{56}O_{10}$ と決定し、一次元および二次元 NMR スペクトルデータの解析により平面構造を明らかにした。本化合物は、4 つの二重結合とカルボニルが共役したポリエン構造、スピロケタール構造、ポリヒドロキシン鎖を含む新規大環状ラクトンであった。配座が固定されたスピロケタール部位の立体構造は NOE 相関により決定し、残りの不斉炭素の絶対配置は PKS 中のケトレダクターゼとエノイルレダクターゼのアミノ酸配列に基づき推定した。本化合物は構造的に希少であり、類似化合物は海洋放線菌から単離された marinisporolide A の一例しか存在しない。また本化合物は細菌、酵母には活性を示さず、*Penicillium* や *Rhizopus* などの糸状菌に選択的な抗菌作用を示した。

以上、第二章から第四章に詳述されているように、海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. NPS554 株から UV スペクトルを指標にした分光学的スクリーニングにより akaeolide を、二次代謝生成遺伝子の配列情報に基づくゲノムスクリーニングにより akaemycin を発見することに成功した。これらの新規化合物は生物活性スクリーニングのみで得ることは困難であった。得られた化合物はいずれも類縁構造の報告がない高い新規性を有するか、単離報告の例数が少ない希少な構造的特徴を有するものであった。加えて、安定同位体の標識実験と生成遺伝子の *in silico* 解析により、akaeolide と lomeic acid A の生成経路を提唱するに至った。いずれも前例のない炭素—炭素結合形成過程を含む。NPS554 株が生産する 3 種の脂肪族ポリケチド akaeolide, akaemycin, lomeic acid A はいずれも構造的に希少な化合物であり、いずれの生成遺伝子もこれまで報告されておらず、DNA データベース中においても類似の遺伝子は登録されていない。このことは、冒頭に述べたように、分類学的に新種の微生物は新規な二次代謝遺伝子を有し、新規化合物の探索源として優れていることを証明する一例となっている。本研究で示したように、未研究の新種微生物を分離し探索源とすること、生物活性指標のスクリーニングに加えて、分光学的スクリーニングとゲノムスクリーニングを併用することが、活性スクリーニングのみでは得られない新規骨格化合物を取得する上で有効に機能することを結論づけている。

審査の結果の要旨

微生物二次代謝物は感染症、癌、糖尿病等の治療薬、農薬など様々な用途で利用されているが、新規物質発見頻度の低下に伴い、微生物からの新薬開発は衰退している。一方で放線菌ゲノムにはこれまで発見された化合物数を上回る数の生合成遺伝子が存在し、相当数の新規物質が未発見のまま残されていると考えられる。したがって、新規物質生産候補株の効果的な選別理論と培養混合物の中から未知物質を探索する方法論の確立が、新薬開発においては重要な技術的課題となっている。本論文では、分類同定の基準となる 16S rRNA 遺伝子を指標として候補株の選別を行い、化合物の紫外可視吸収スペクトル情報と二次代謝遺伝子の配列情報に基づくスクリーニングを通じて新規物質を取得し、さらにそれらの構造新規性と生合成上の特異性を示すことにより、遺伝子情報を指標とした候補株の選別が有効な手段となりうること、また分光学的情報とゲノム情報を併用することにより、従来の活性スクリーニングのみでは得られない多様な新規構造の取得が可能であると結論づけている。主な内容は以下の通りである。

第二章では、16S rRNA 遺伝子が既知種に 97%以下の低い相同性を示す海洋由来放線菌を対象に、紫外可視吸収スペクトルを指標とした分光学的スクリーニングを行い、宮崎県沿岸の海泥から分離された *Streptomyces* 属放線菌 NPS554 株から新規多環性化合物 *akaeolide* を得ることに成功した。

第三章では、生合成前駆体の取り込み実験、ゲノム解析による生合成遺伝子の解析を通じて、NPS554 株が生産する二種類のポリケチド *akaeolide* と *lorneic acid A* の生合成経路を解明し、その過程に前例のない炭素-炭素結合反応が関与することを提唱するに至った。

第四章では、NPS554 株のゲノム解析から、本菌株には上記 2 種類の化合物以外にも新規ポリケチド化合物を生産するための生合成遺伝子が存在することが判明した。遺伝子配列から予測される構造に基づき培養混合物の分光学的解析を行い、予測構造に一致する新規化合物 *akaemycin* を発見、構造決定することに成功した。

以上、第二章から第四章に詳述されているように、海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. NPS554 株から分光学的スクリーニングと、二次代謝生合成遺伝子の配列情報に基づくゲノムスクリーニングを行い、新規物質 *akaeolide* と *akaemycin* を発見した。いずれも希少な構造的特徴を有する新規物質であり、生物活性スクリーニングのみで得ることは困難であった。加えて、安定同位体の標識実験と生合成遺伝子の *in silico* 解析により、*akaeolide* と *lorneic acid A* の生合成経路を提唱するに至った。いずれも前例のない炭素-炭素結合形成過程を含む。NPS554 株が生産する 3 種の脂肪族ポリケチド *akaeolide*, *akaemycin*, *lorneic acid A* はいずれも構造的に希少な化合物であり、いずれの生合成遺伝子もこれまで報告されておらず、DNA データベース中においても類似の遺伝子は登録されていない。このことは、分類学的に新種の微生物は新規な二次代謝遺伝子を有し、新規化合物の探索源として優れていることを証明する一例となっており、未研究の新種微生物を探索源とすること、生物活性指標のスクリーニングに加えて、分光学的スクリーニングとゲノムスクリーニングを併用することが、活性スクリーニングのみでは得られない新規骨格化合物を取得する上で有効に機能することを結論づけている。化合物の構造多様性は医薬探索において最も重要な要素の一つであることから、本研究で得られた知見が微生物創薬に与える影響は大きく、生物工学の応用微生物学分野における価値が認められると同時に本研究の将来の発展性が期待できる。

平成 28 年 2 月 4 日に博士論文の審査および最終試験を行った結果、申請者は学術研究にふさわしい発表、討論ができ、本研究で用いられた研究手法と得られた結果を十分に理解していること、当該分野に

関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有していると判定されたことより、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。