

論文審査報告書

氏名	り たんたん 李 丹丹
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第29号
学位授与日	令和3年3月20日
論文題目	Exploration of new bioactive compounds produced by bacteria in pathogenic lineages (病原性系統の分類群に属する細菌からの新規生物活性物質の探索)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 五十嵐 康弘 教授 加藤 康夫 教授 西田 洋巳 講師 奥 直也 富山高等専門学校 准教授 篠崎 由紀子

内容の要旨

天然の物質、特に微生物由来の二次代謝産物からは、抗生物質、高脂血症治療薬、抗癌剤、免疫抑制剤など、多くの有用物質が発見されてきた。これらが人類の健康の増進に果たした役割は大きく、関連する分野で6名ものノーベル賞受賞者を生んでいる。今日でも薬剤耐性菌や生活習慣病などの新たな医療ニーズに対応していくため、薬物探査が続けられている。しかし主要な探索資源とされてきた陸上の糸状菌(カビ)や放線菌から「薬の種」となる構造新規性の高い物質を発見することは年々困難となっており、新たな微生物資源の開拓が模索されている。具体的には、糸状菌や放線菌中の休眠生合成遺伝子を何らかの方法で発現させたり、あるいはこれらの新種を海洋や極限環境など調査例の少ない環境から分離するアプローチが取られ、一定の成果を上げている。他方で、実績の高いものとは全く異なる系統を調査する戦略も試みられている。その場合、どの分類群を標的とするかで成果は異なり、粘液細菌などは糸状菌や放線菌には見られない骨格の物質を生産し、その中には医薬となったものも存在することから、本戦略の成功例に数えられている。

ところで糸状菌や放線菌には、動物や植物に病原性を示したり共生する種が多い。例えば糸状菌には動物および植物に感染するものがある一方で、ラン藻や緑藻と共生して地衣類を形成するものもある。また薬物資源として圧倒的実績を誇る *Streptomyces* 属放線菌の中には、ジャガイモ瘡痂(そうか)病など植物病害を引き起こす種がいる一方で、ハキリアリの体表にバイオフィルムを形成して昆虫感染症から宿主を守ると考えられるものもある。近年、こういった微生物の現象に関与する物質が明らかにされつつある。即ち「宿主への定着」、「自由生活から寄生生活への代謝切り替え」、「競争相手の排除」の各段階

が物質分泌を介して制御されており、病原菌や共生菌の物質生産能が極めて高い証拠が集積している。なお、微生物共生は病原的感染を起源とすることから、共生菌と病原菌が同じ分類系統に属していても何ら不思議はない。そこで本研究では、新たな微生物創薬資源の開拓に向けた試みの一つとして、病原性系統の細菌分類群を陸圏と水圏から一つずつ選び、物質生産能を評価することとした。選んだのはいずれもグラム菌である *Burkholderia* 属と *Vibrio* 属である。前者はベータプロテオバクテリア綱に属する土壌細菌の一系統であり、動物・植物の両方に病原性を示す種や、葉粒や根粒を形成して植物の成長を助けるものが含まれる。一方、後者はガンマプロテオバクテリア綱の海洋細菌であるが、コレラ原因菌に代表されるように動物に消化器障害や皮膚感染症を引き起こすものがある一方で、イカや魚などの発光器に共生して擬態・誘引・交信に役立つものもある。両属とも 100 程度の新規物質が得られており、探査対象として有望であることから、両属から計 3 菌株を選んで物質生産を解析し、それらの医薬探索資源としての新規性ならびに有用性の評価を試みた。本論文は全 5 章から構成されており、各章の主な内容は以下の通りである。

第一章では、天然物創薬の歴史と成功事例、現状と問題点、研究計画の立案に至るまでの経緯について概説し、本研究の目的と意義を論じている。

第二章では、ネギ栽培土壌より分離した *Burkholderia* 属細菌からの 2-アルキル-4-キノロン系新規化合物の単離、構造決定、生物活性について述べている。ネギとウリ科植物の混植栽培は栃木県や北海道などで行われており、ウリ科植物の病害防除に役立つことが知られている。岐阜大学の清水将文はネギ属の根圏に *Burkholderia* 属をはじめとする幾つかの特徴的な分類群が優先しており、これらが植物病原性フザリウム属糸状菌の生育を顕著に阻害することを示した。清水より提供された *Burkholderia* 属細菌株を独自に設計した 4 種類の培地に培養し、抽出物を抗微生物試験で評価したところ、多くが顕著な生育阻害作用を示した。この中で、特に強い作用を示す抽出物を与えた MBAF1239 株は 16S rRNA 遺伝子配列の解析結果より、*B. cepacia* 菌群に属することが判明した。抽出物中の抗微生物成分を各種クロマトグラフ法にて分画、精製したところ、既知の 2-アルキル-4-キノロン類 1 化合物、2-アルキル-3-メチル-4-キノロン類 3 化合物、ピロールニトリン、*N*-ヒドロキシピリドン類 BN-227 と共に、2 つの新規物質を得たことから、これらの構造を解析した。分子式は精密質量分析により $C_{18}H_{23}NO$ および $C_{16}H_{19}NO$ と決定され、 1H NMR スペクトルの類似性から、互いにアルキル鎖長が 2 炭素分異なる類縁物質であることが予想された。さらに 310 nm 付近の特徴的な二連山型の吸収極大が観測され、8 の不足水素指標および ^{13}C NMR、COSY、HMQC スペクトルの解析によりカルボニル基、二置換オレフィン結合、1,2-二置換ベンゼン、孤立したオレフィン性メチンシグナルが確認できたことから、両物質ともアルキル置換キノロンであると予想された。最終的に HMBC、NOESY などの二次元 NMR スペクトルを解析した結果、一つの二重結合を持つアルキル基が 2 位に置換した 2-アルケニル-4-キノロンであると決定した。二重結合の幾何異性はオレフィン 1H シグナルの分裂パターンからは解析できなかったため、アリル位炭素のケミカルシフト値を文献値と比較し、*Z* 体であると結論した。以上の結果から、二つの新規物質は、(*E*)-2-(hept-2-en-1-yl)quinolin-4(1*H*)-one および (*E*)-2-(non-2-en-1-yl)quinolin-4(1*H*)-one と決定した。いずれの物質も過去に LC-MS 分析にて存在は検出されていたものの、二重結合の位置等、精密な構造解析は本研究にて初めてなされたものである。得られた物質の抗菌活性を海洋細菌 *Tenacibaculum maritimum* にて評価したところ、いずれも 10 μg にて顕著な生育阻害活性を示した。*T. maritimum* は海産養殖魚に対して重篤な体表の潰瘍を引き起こす病害菌であることから、MBAF1239 株由来の物質は治療薬のリード化合物として活用できる可能性がある。

第三章では、前章とは分離経緯の異なる *Burkholderia* 属細菌を共同研究者より入手し、その生産物を調査することで、本属細菌の有用性評価を進めた。金属イオンを選択圧に用いて集積培養を行い、得られた3株の代謝産物を調査したところ、*B. cepacia* 群に属する3Y-MMP株が複数の物質を生産していた。このうち、主要な二次代謝産物は spoxazomicin C と pyochelin であると推定されたが、HPLC-UV 分析にて保持時間の短い画分中に特徴的な UV 吸収パターンを示す物質があったため、これを精製したところ、4-hydroxy-3-methyl-2(1*H*)-quinolone を得た。本物質は1920年代より繰り返し合成されてきた古典的化合物であるが、天然からは2019年に染料植物ホソバタイセイ (*Isatis tinctoria*) から初めて報告されている。しかし、報告論文には構造決定の議論および根拠となる物性値が示されておらず、不十分な物性情報を記載した先行論文を引用するのみであった。そこで詳細な二次元 NMR 解析を行い、本物質の ¹H および ¹³C NMR シグナルを初めて完全帰属した。本物質は4-ヒドロキシ-2-ピリドン環部分に複数の互変異性体を有するが、幾つかの類似物質では2,4-ジヒドロキシピリジン構造にて報告されていた。そこで互変異性を起こさない *O*-メチル化体および *N*-メチル化体の化学シフトを文献調査したところ、窒素に隣接する炭素原子のケミカルシフト値で互変異性構造を区別できることを見出し、本物質の構造が正しいことを確認するとともに、二つの誤った提唱構造を訂正した。本物質は抗酸化活性を有していたが、これは *Burkholderia* 細菌の生態を考えた場合、感染時に植物宿主細胞が免疫反応として放出する活性酸素を消去する役割を担う可能性があることを指摘した。

第四章では、*Vibrio* 属細菌 SI9 株の生産する4種類の3-アシロキシ脂肪酸の単離、構造決定、生物活性について述べている。SI9 株はシライトイソギンチャクから分離され、16S rRNA 遺伝子解析により *Vibrio nereis* に近い種類であることが同定された。本株がマリネブロス培地中で複数の末端 UV 吸収を持つ化合物を生産したため、培養抽出物を精製したところ、4つの物質を得た。うち1つは、特許論文に報告された *O*-isocrotonyl-3-hydroxybutyric acid であり、残りは精密質量分析と NMR スペクトル解析から、鎖長の異なる新規3-アシロキシ脂肪酸であることが判明した。いずれの化合物もアシロキシ基中に α,β -不飽和結合を持つが、その幾何異性は不飽和炭素上の水素間の結合定数が 11.5 Hz であったことから *Z* と決定し、楠見らの PGME 誘導化を適用することで、不斉炭素の絶対立体配置をいずれも *R* 配置と決定した。これらの物質はラット胎仔由来 3Y1 繊維芽細胞に対し細胞毒性を示さない一方で *T. maritimum* に対し弱い抗菌活性を示した。細菌類は、炭素過剰な栄養条件下で3-ヒドロキシ脂肪酸のポリエステルであるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)をエネルギー貯蔵物質として蓄積することが知られており、近年プラスチック原料として実用化されている。 α,β -不飽和アシロキシ基が3-ヒドロキシ基の脱水により生じたとすると、今回得られた物質は3-ヒドロキシ脂肪酸2分子からなる短い PHA と見做すことが出来る。上記の特許論文には、isocrotonyl 基を有する 3-hydroxybutyrate の2量体から5量体が報告されていること、また新規物質の構成脂肪酸と目される物質は PHA の構成単位としても報告されていることから、PHA の末端も脱水による修飾を受けていることを予想している。

第五章では、前章までの内容を総括するとともに *Burkholderia* 属および *Vibrio* 属が薬物資源として有望であるとの結論を述べている。

審査の結果の要旨

多くの重要な医薬が微生物から開発されてきた。今日でも薬剤耐性や生活習慣病等の新たな医療ニーズに対応していくため、現在も微生物を対象とした薬物探索が続けられている。しかし長年に及ぶ活動の結果、主要な薬物資源であったカビや放線菌から新しい母核を有する生物活性物質を見つけることは困難になっており、これらに代わり得るものを求めて微生物遺伝資源の開拓が進められている。

微生物遺伝資源の活用に向けて様々なアプローチが考えられる中、申請者はカビや放線菌の中には動植物に感染するものや共生するものが多くあること、それらの生態が物質を介して制御されることが明らかにされつつあることから、病原性系統の分類群が物質生産に長けており、カビや放線菌に代わり得る次世代の創薬資源たり得るのではないかと洞察した。そこで病原性種、共生種を多数有する分類群として、陸圏からは *Burkholderia* 属を、水圏からは *Vibrio* 属を選定し、これらから新規生物活性物質を取得することを通じて、本薬物探索戦略の有用性を評価する研究を着想した。実際の研究では、*Burkholderia* 属からは分離経緯の異なる2種を、また *Vibrio* 属からは1種を共同研究先から入手して、物質生産と生物活性を解析している。

即ち、第一章では、微生物由来医薬の代表例と天然物創薬の現状および問題点について概説し、本研究の目的と意義を論じた。

第二章では、ネギ根圏由来 *Burkholderia* 属細菌の培養産物から抗微生物活性を指標に8化合物を得、うち新規2-アルキルキノロン2種類の構造決定を詳述している。得られた化合物がいずれも海産養殖魚に深刻な被害をもたらす魚病菌の生育を顕著に阻害することから、魚病薬のリード化合物となり得ることを指摘している。

第三章では土壌試料の亜鉛負荷による集積培養にて得た *Burkholderia* 属細菌株を調査している。特徴的なUVスペクトルをたよりに2-キノロン誘導体を単離し、丁寧な文献渉猟から優勢する互変異性構造の判定に役立つ物性値を見出すとともに、それに基づき既知物質の構造の誤りを正した。さらに本物質が活性酸素抑制作用を示すことを明らかにし、培地中の生産量との比較から本物質に感染時に活性酸素を介した宿主の免疫反応を中和する役割を予想している。

第四章ではシライトイソギンチャクから分離した *Vibrio nereis* からの物質検索の結果を述べている。得られた α,β -不飽和アシロキシ脂肪酸は魚病菌に対し弱い増殖阻害効果を示した。また、微生物の貯蔵物質 PHA と共通するヒドロキシ脂肪酸を構成単位とすること、両者をつなぐオリゴマーが存在することから、PHA の非カルボキシ末端が本物質群同様、3-ヒドロキシ基の脱離により不飽和化されている可能性を指摘している。

以上のとおり、天然物創薬資源の中核を為す放線菌および糸状菌と共通する「病原性」という形質を手掛かりに、陸圏、水圏それぞれから1属ずつ病原性系統の細菌分類群を選び、物質生産を解析し、海産養殖魚に深刻な被害をもたらす魚病菌に有効な物質や、活性酸素抑制効果を持つ物質などを得ることに成功した。以上の結果から、病原性系統の分類群に属する細菌が新たな有用生物活性物質の探索資源となり得ることを結論づけている。

得られた化合物はいずれも特徴的な構造を有し、抗菌活性や活性酸素消去能など、創薬リード化合物として有望な性質を示した。構造多様性の高い薬物資源は創薬研究において不可欠な要素の一つであり、新たな医薬探索源となり得る細菌の分類系統を見出した点において、本論文が今後の有用微生物探索に与える影響は大きく、生物工学的価値が認められる。

研究成果は、申請者が全て筆頭著者となっている3件の査読付き国際学術誌に掲載されている。2020年11月2日に予備検討委員会を開催、2021年1月27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討論ができ、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するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。