

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 27 年度博士課程進学

氏名 二宮 章洋
指導教官 松永 茂樹

論文題目

Studies on structures and physiological function of surugamides produced by marine streptomycetes
(*Streptomyces* 属海洋放線菌が生産するスルガミド類の構造と生理機能に関する研究)

Streptomyces 属放線菌は多様な二次代謝産物を生産することから、創薬リード化合物の探索源として利用されてきた。例えば、結核の治療薬 streptomycin, 臓器移植後の拒絶反応抑制に用いられる免疫抑制剤 FK-506, 熱帯の風土病オンコセルカ症の治療薬 ivermectin 等, 多くの医薬が *Streptomyces* 属放線菌から開発されてきた。しかしながら, 長年にわたる探索研究の結果, *Streptomyces* 属陸上放線菌から新規有用物質を発見することが困難になりつつある。この現状を打破するために, 1) 新たな生物資源の探索, 2) ゲノム配列に基づく新規二次代謝産物の探索 (ゲノムマイニング), 3) 二次代謝誘導因子の利用, という, 大きく分けて 3 つのアプローチが採られている。これらのアプローチを組み合わせることで, 近年においても多様な構造を有する生物活性物質が発見されている。

Streptomyces 属放線菌からは数千に及ぶ二次代謝産物が報告されているが, それらの生産者における生理機能が明らかになっているものは極めて少ない。一般的に環境中の微生物の生育を抑制すると考えられている抗生物質でさえ, 実際に生産者が生育する環境中に, 他の微生物に対して有効な濃度で存在しているか定かではないため, 生理機能は不明である。

このような背景の下, 著者は探索源として未開拓の海洋放線菌から新規生物活性物質ス

ルガミド A-E を単離し、化学構造を決定した。次に、スルガミド A-E の生合成遺伝子クラスターを同定した上で、当該遺伝子クラスターによって、スルガミド A-E に加えて、新規化合物スルガミド F が生合成されることを明らかにした。さらに、スルガミド A がこれまでに報告されたシグナル分子とは異なる機構によって放線菌の菌糸形成を制御することを示唆する結果を得た。

1. *Streptomyces* 属海洋放線菌からのスルガミド A-E の発見

制がん活性を示す化合物を探索する過程で、海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 (図 1a) の抽出物中に新規化合物スルガミド A-E (図 2b) を発見した。当該放線菌株の培養液を、順次、溶媒分画、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC により精製し、スルガミド A-E を得た。HR-ESIMS および NMR スペクトルを解析することで、スルガミド A-E の平面構造を決定した。スルガミド A-E は環状オクタペプチドであり、スルガミド B-E はスルガミド A に含まれる 4 つの Ile のうちいずれか 1 つが Val に置換した構造を有していた。構成アミノ酸の絶対配置は Marfey 法を用いて決定した。ただし、D-Ile と L-Ile が共存するスルガミド A および C-E については、部分加水分解により得られた Ile-Ile あるいは Val-Ile を DAA 誘導体とし、HPLC-MS 分析による合成標品との保持時間の比較により、前述した配列中の Ile の絶対配置を決定した。スルガミド A-E 中の対応するアミノ酸残基の絶対配置は同一であった。スルガミド A のように D-型と L-型の同一アミノ酸が共存するペプチドの絶対配置の決定は一般的に困難とされているが、LC-MS を用いた簡便な方法でこの問題を解決することに成功した。スルガミド A-E はがんの浸潤と転移において重要な機能をもつ酵素カテプシン B の阻害活性を示した。

(a)



(b)

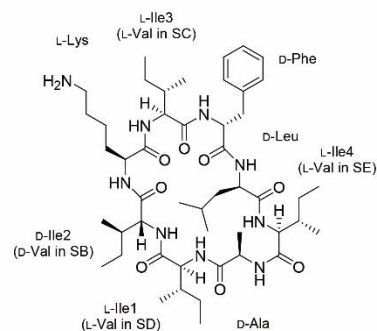


図 1. (a) *Streptomyces* sp. JAMM992. (b) スルガミド A-E の構造.

2. スルガミド生合成遺伝子クラスターの同定とスルガミド F の発見

スルガミド B-E はスルガミド A に含まれる 4 つの Ile 残基のうちいずれか 1 つが Val に置換した構造を有しており、対応する残基の絶対配置がスルガミド A-E 間で保存されていることから、スルガミド A-E は、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) によって生合成され、アデニル化ドメイン (A-ドメイン) の低い基質選択性により Ile から Val への置換が生

JAMM992 株の *surA* 遺伝子を破壊した変異株 $\Delta surA$ はスルガミド F を生産したが、スルガミド A は生産しなかった。一方で、*surB* 遺伝子の変異株 $\Delta surB$ はスルガミド A を生産したが、スルガミド F は生産しなかった。この結果から、スルガミド A は *surA* と *surD*、スルガミド F は *surB* と *surC* の生合成産物であることが示された。モジュールのドメイン構成を考慮すると、*surA/surC* あるいは *surB/surD* の組み合わせによりペプチドが生合成される可能性があるが、これらのペプチドは培養液中に検出されなかった。これは、SurA/SurD、および SurB/SurC が特異的に相互作用するためであると予想している。本研究は、4 つの連続する NRPS 遺伝子のうち、両端の 2 つは環状オクタペプチド、中央の 2 つは直鎖状デカペプチドの生合成を担う、という、前例のない生合成の様式を解明した。

3. スルガミドの生産者における生理機能の解析

著者は、地理的に離れた、異なる環境中から分離された複数の *Streptomyces* 属放線菌株がスルガミド類を共通して生産することから、スルガミド類が生産菌において重要な生理機能を持つという仮説を立て、スルガミド類の生理機能の解明を研究の目的とした。

先述した遺伝子情報を基に、生合成遺伝子の破壊実験をおこなったところ、スルガミド A と F はいずれも生産菌の気中菌糸形成に関与することが明らかになった。スルガミド A と F の生産量と菌体の乾燥重量を経時的に測定したところ、スルガミド A と F は対数増殖期中に生産が誘導されることが示された。

次に、スルガミド A の、気中菌糸形成誘導における標的分子を明らかにすることとした。スルガミド A が、プロテアーゼであるカテプシン B に対する阻害活性を示すことから、スルガミド A が生産菌自身のプロテアーゼに作用して気中菌糸形成を促進する可能性に着目した。*Streptomyces* 属放線菌は細胞外に様々なプロテアーゼを分泌し、これらが放線菌の増殖と形態分化に関与することが知られている。そこで、培地中に放出された菌体外プロテアーゼに対するスルガミド A の作用を調べたところ、スルガミド A によって、メタロプロテアーゼ活性が上昇することが示された。メタロプロテアーゼは *Streptomyces* 属放線菌において気中菌糸の形成に関与するとの報告があることから、申請者は、スルガミド A がメタロプロテアーゼの活性化を通して生産菌の気中菌糸形成を促進するという仮説を立てた。スルガミド生産株の培養上清から調製した粗酵素を精製し、メタロプロテアーゼ (SJAP) を得た。プロテインシーケンサーを用いて決定した SJAP の N 末端配列を、スルガミド生産株のゲノム配列に対して検索し、SJAP をコードする遺伝子 *sja* を同定した。SJAP の組換えタンパク質を用いて酵素試験をおこなった結果、スルガミド A が組換え SJAP を活性化することが確認できた。さらに、Biacore を用いた相互作用解析により、スルガミド A と組換え SJAP が相互作用することが明らかになった。以上の結果から、スルガミド A は、分泌型プロテアーゼである SJAP を活性化する、という機構によって放線菌の形態分化を制御する可能性が示された。