

博士論文（要約）

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)

二宮 章洋

*Streptomyces* 属放線菌は多様な二次代謝産物を生産することから、創薬シ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 1b) 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。

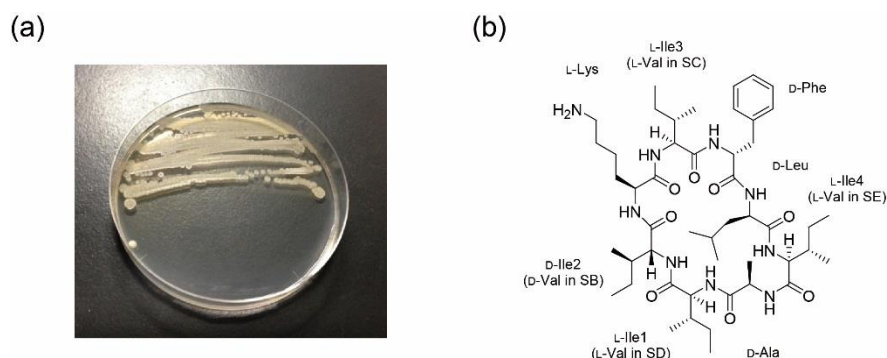


図 1. (a) *Streptomyces* sp. JAMM992. (b)スルガミド A-E の構造.

## 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 への置換が生じると考えた。そこで、次世代シーケンサーを用いて JAMM992 株のゲノム配列を解析した後、antismash を用いてゲノム中に含まれる二次代謝産物の生合成遺伝子を網羅的に探索した結果、4 つの連続した NRPS 遺伝子 *surA*, *surB*, *surC*, *surD* を含む遺伝子クラスターを発見した (図 2a)。予想される各 A-ドメインの基質アミノ酸、および、エピメラーゼドメイン (E-ドメイン) の位置情報をもとに、スルガミド A-E は SurA および SurD の組み合わせにより生合成されると推定した (図 2b)。一方で、SurB と SurC からは 10 残基のペプチドが生合成されることが予想されたが、この構造をもつ代謝物に関する報告は過去になかった。NRPS のアミノ酸配列を基に A-ドメインの基質アミノ酸を予想するプログラム、NRPSpredictor2 を用いた解析では、SurB/SurC の推定生合成産物の C 末端には 6 つの脂肪族アミノ酸が連続すると予測されたことから、LC-MS/MS を用いて培養液中の代謝物を精査したところ、 $m/z$  1057 に分子イオンピークを与え、C 末端の配列が -Val-Ala-Val-Ala であるペプチド、スルガミド F (図 2c) を発見した。この C 末端のアミノ酸配列は、SurC のモジュール 3, 4, 5, および 6 の A-ドメインから予想されるアミノ酸配列とよい一致を示した。また、JAMM992 株の *surB* 遺伝子を破壊した変異株  $\Delta surB$  がスルガミド F の生産能を欠いていたことから、スルガミド F を SurB および SurC の産物として同定した。スルガミド F の化学構造は、NMR 解析および MS/MS 解析により、3-amino-2-methyl propionic acid (AMPA) 残基を含む直鎖状デカペプチド Trp-Leu-Val-Thr-AMPA-Leu-Val-Ala-Val-Ala と決定し、マーフィー法およびエドマン分解により各アミノ酸の絶対配置を決定した。

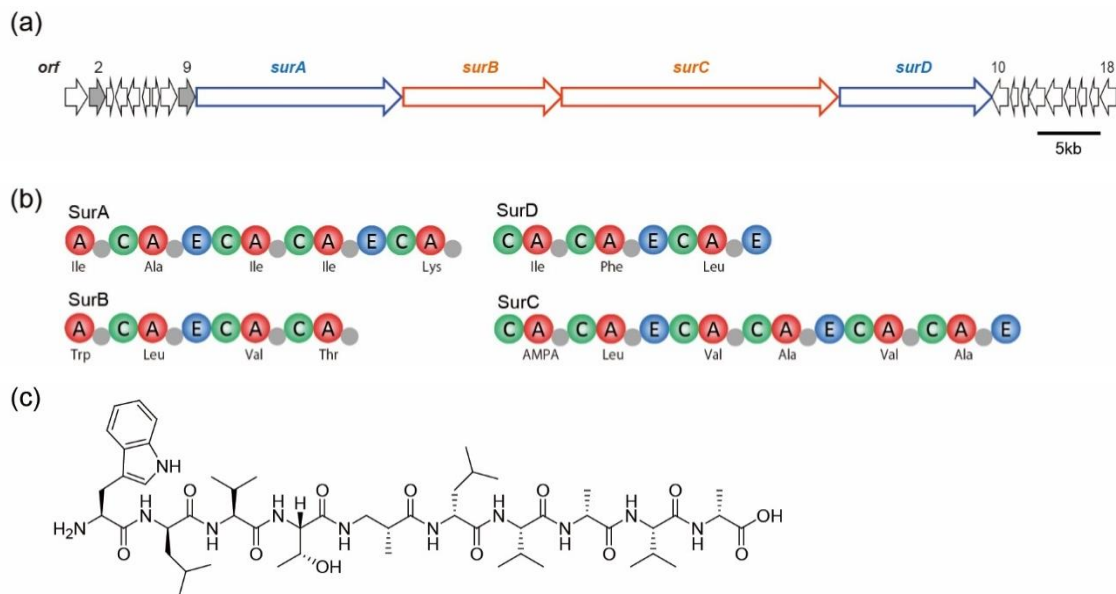


図 2. (a) スルガミド生合成遺伝子クラスター. (b) SurA, SurB, SurC, および SurD のドメインの構成. SurA, SurB, SurC, および SurD のドメイン構成. A, C, E, 小円はそれぞれ, アデニル化ドメイン, 縮合ドメイン, エピメラーゼドメイン, ペプチジルキャリアタンパク質をあらわす. (c) スルガミド F の構造.

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

第 4 章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定である。