

海洋微生物由来の新規生物活性物質の探索と応用

(薬化学教室) 伊藤 卓也

これまでに、天然資源からの医薬品リード化合物の探索は、陸棲の動植物を中心に行われてきた。特に、微生物からはペニシリンやアドリアマイシンをはじめとする数多くの抗生物質が見出され、感染症やがんなどの治療薬として利用され、多くの人命を救ってきた。しかしながら、陸性の微生物からの探索研究が進むにつれ、徐々に新規生物活性物質を得ることが難しくなっている。

一方、海洋は地球表面積の約 70% を占め、地球上の全生物種の約 80% にあたる 50 万種以上もの海洋生物が生息していると言われている。また、海洋生物は過酷な条件下で生息していることから、陸棲生物とは異なった代謝系、または生体防御機構を発達させてきたと考えられる。このような観点から、海洋生物からの二次代謝産物について積極的に研究されるようになり、これまでに見出された海洋生物由来の二次代謝産物は 1 万を超えようとしている。¹⁾ しかしながら、海洋微生物由来の生物活性物質の探索研究は始まったばかりということもあり、その数はまだまだ多いとは言い難い。海洋域は人間が踏み入ることができない未開拓なところがほとんどであり、今だに発見されていない有用微生物の宝庫であると考えられる。また、これまで分離・培養できる微生物は、全種類の 1% であることが知られている。²⁾ したがって、このような海洋に生息する未開拓な微生物を分離・培養できれば、より高い確率で新規活性物質を見出すことが期待できることから、我々は海洋微生物から生物活性を示す二次代謝産物の探索を行うことにした。

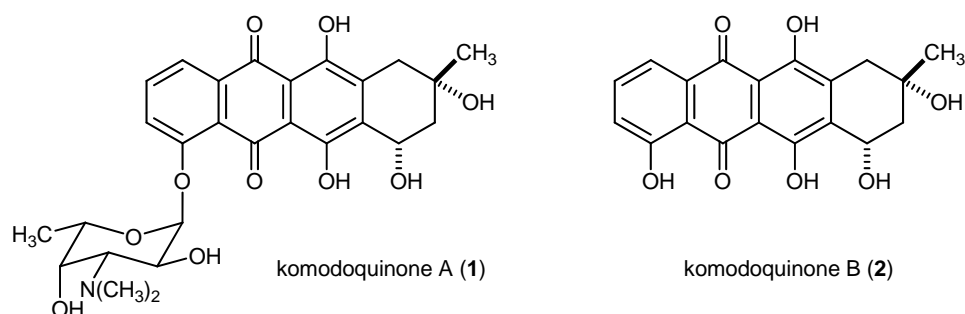
海洋放線菌 *Streptomyces* sp. KS3 株由来の komodoquinone 類の単離^{3),4)}

陸棲の放線菌および真菌からは、他のバクテリアや動植物に比べて圧倒的に多くの抗生物質や生物活性物質が見出されている。その中には医薬品や農薬として実用化しているものも少なくない。そこで、海洋の微生物についても同様のことが期待できることから、我々も放線菌と真菌に注目し、海洋域からの微生物の選択的な分離方法を構築した。この方法を用いて、水深 50~200 m の海底土壌および海綿などの海洋生物から約 300 株の放線菌と真菌を分離することに成功した。分離した微生物を液体培地による培養を行い、得られた抽出エキスについて、真菌 *Candida albicans* に対する抗真菌活性、咽頭がん細胞 KB 細胞に対する細胞毒性活性、およびマウス神経芽細胞腫 Neuro 2 A 細胞に対する神経突起伸展活性試験によるスクリーニングを行った。活性の認められた有望な菌株について大量培養し、活性成分を単離した。非常に多様に富んだ化学構造を有する活性物質が得られたが、すでに陸棲の放線菌および真菌から見出された既知物質ばかりであった。

微生物は培養条件を変えることで、その代謝産物に変化することが知られている。たとえ、新たな活性物質を産生する微生物を分離しても、その能力を発揮できる場を提供しなければ、新規物質を発見することはできない。そこで、「眠っている遺伝子」を呼び起こし、二次代謝産物の生合成に関与する酵素を発現させ、新たな代謝産物を産生することを期待して、分離した微生物を様々な条件で培養した。その中で、個体培養は古くから酒や醤油などの麹培養に用いられてきた培養方法であり、生物活性物質の探索において個体培養が使用されるようになったのはここ数年である。また、我々が知る限り放線菌の穀物類を用いた個体培地による培養での活性物質の報告例はないこと

から、この培養方法を用いて新規生物活性物質の探索を行うことにした。

その結果、米を基とする個体培養で培養した放線菌 *Streptomyces* sp. KS3 株の抽出エキスは、Neuro2A 細胞に対して神経突起伸展活性を示すと共に、赤色色素の生産が観察された。そこで、この株を大量培養し、活性の結果を指標に各種クロマトグラフィにより分画・精製を行ったところ、新規アントラサイクリン komodoquinone A (1)とそのアグリコン komodoquinone B (2)を見出した。これら化合物の全化学構造は、詳細なスペクトルデータの解析、化学変換、改良 Mosher 法の適用などにより決定した。その結果、komodoquinone A (1)は新規アミノ糖を含むアントラサイクリンであり、しかも D 環上の水酸基にアミノ糖がグリコシド結合している初めてのタイプのアントラサイクリンであることが判明した。



Komodoquinone A (1)は、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A に対して、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 50%以上の細胞に神経突起伸展を観察できた。また、化学構造の近似する adriamycin には全くこの作用は見られず、komodoquinone B (2)は 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で弱い活性を示すのみであった。このことから、D 環に結合するアミノ糖の存在が活性発現に重要ではないかと推測された。

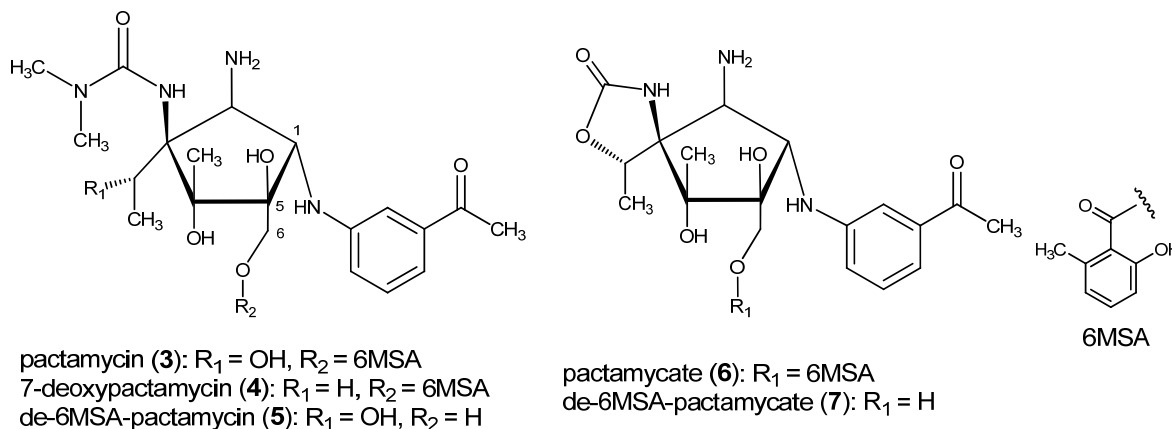
S. pactum が産生する pactamycin の生合成⁵⁾

アミノサイクリトール抗生物質は抗腫瘍や抗菌活性などの生物活性を有する微生物の二次代謝産物として知られている。その中でも gentamicin や kanamycin、neomycin、streptomycin は、現在もなお感染症の治療薬として利用されている。一方、放線菌 *Streptomyces pactum* が生産する pactamycin は、cyclopentitol と 2 つの芳香環 (6-methylsalicylate, *m*-aminoacetophenone)からなるアミノサイクリトール抗生物質で、グラム陽性あるいは陰性細菌に対して強い抗菌活性を示す。また、pactamycin は抗腫瘍活性も示すが、その毒性が強いために臨床開発は途中で中断している。そのため、毒性の軽減や薬効の向上を目的とした pactamycin のアナログの開発が切望されている。しかしながら、構造中に多くの不斉炭素を含むため、pactamycin およびその誘導体を化学的に合成することは非常に困難である。

近年、分子生物学的手法を使った抗生物質の生合成研究が盛んに行われるようになり、遺伝子改変した微生物からのアナログ合成も可能になってきている。したがって、このような手法を利用すれば、pactamycin のアナログの創製が期待できることから、分子生物学的および遺伝子工学的な視点から pactamycin の生合成研究に着手することにした。

今回、我々は *S. pactum* 染色体から pactamycin 生合成遺伝子クラスターのクローニングに成功した。また、クラスターの配列を解析したところ、生合成に関与する 26 個の open reading frame (ORF) の存在を明らかにした。生合成遺伝子クラスターを機能解析する目的で、ポリケタイド合成酵素遺伝子 (*ptmQ*)を *S. lividans* に導入した結果、その導入株の培養液から 6-methylsalicylic acid (6-MSA)が

生産されていることが判明した。さらに、*ptmQ* の遺伝子破壊株を作成したところ、その破壊株から de-6MSA-pactamycin および de-6MSA-pactamycate の 2 種の生合成中間体が得られた。それぞれの化合物を抗細菌活性および細胞毒性試験を行い、活性の比較を検討した。現在、遺伝子破壊株および改変株を調製し、構造活性相関研究を進めているところである。



海洋微生物からの新規活性物質探索の新展望

Streptomyces 属などの優先種放線菌から数多く抗生物質が見出されているが、探索研究が進んでいる優先種から新規活性物質を見出すことは非常に困難な状況にある。したがって、未開拓な海洋域から分離され、さらには希少種放線菌は新規二次代謝産物の供給源として期待できる。北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所 (MBI)・志津里教授から、希少放線菌を含む貴重な微生物資源を数十株譲り受けた。現在、これら菌株から海洋細菌 *Pseudovibrio* sp. に特異的に抗菌活性を示す化合物の探索に着手している。

また、海綿などの海洋生物の代謝産物の中には、その構造が非常に微生物代謝産物に近似しているものもあり、真の生産者は共生微生物ではないかと考えられている。⁶⁾ 志津里らは、海綿に共生している微生物の単離に成功しているが、極めて生育速度が遅く培養が困難な場合が多いため、物質生産までには至っていない。これら問題を解決する目的で、この株の 1 つの全ゲノム解析が始められ、先日終了した。我々は二次代謝産物生合成遺伝子の解析と、それら物質生産の研究を行うことになった。今後、これら技術を駆使して、新たな活性物質が得られることを熱望している。

- 1) Colwell, R. A., Grimes D. J., *Nonculturable Microorganisms in the Environment*; American Society for Microbiology, 2000.
- 2) 北川 勲、海洋天然物化学、化学同人、1987.
- 3) Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S., Kobayashi, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66(10), 1373-7.
- 4) Itoh, T., Kinoshita, M., Wei, H., Kobayashi, M., *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51(12), 1402-4.
- 5) Mahmud, T., Ito, T., Roongsawang, N., Shirasaka, N., Flatt, P., US patent PCT/US2008/060876.
- 6) Itoh, T., Kobayashi, M., *Current technology for accessing yet-unexploit microbial resources*; Kudo, T., Ohkuma, M., ED.; CMC Publishing Co., Ltd.: Tokyo, 2004; pp 244-54.