

# 放線菌に潜在する有用物質生産能力に魅せられて

木谷 茂\*・仁平 卓也

## はじめに

大村智先生（北里大学特別荣誉教授）が、抗寄生虫薬エバーメクチンの発見による寄生虫病の制圧に貢献したとして、2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞された。筆者らとは縁遠いと感じていたノーベル賞が、大村博士の受賞により一気に身近に感じられると同時に、エバーメクチンを生産する微生物である「放線菌」が、各種報道により取り上げられることは、放線菌を研究する者にとり、非常に喜ばしく感じられ、身が引き締まる思いである。多彩な医薬品を生み出してきた放線菌ではあるが、探索の非効率性や莫大な利益を生み出す慢性疾患治療薬が数少ないなどの費用対効果の面により、近年、多くの製薬会社が放線菌を含む微生物などからの天然有用物質探索研究より撤退することがよく聞かれる。たとえば、免疫抑制剤タクロリムスと抗真菌剤ミカファンギンを世に送り出してきた天然物探索研究の雄とされてきたアステラス製薬が、2014年に醗酵創薬研究に関する資産を大鵬薬品に譲渡したことは、衝撃的な出来事であった。しかし、今回の大村博士のご受賞が契機となり、有用生理活性物質の宝庫である放線菌が再注目され、単純なモノ取りではない革新的な天然物探索研究が活発になるのではないかと期待している。本稿では、筆者らが取り組んできた放線菌二次代謝を制御する低分子シグナル（放線菌ホルモン）について、エバーメクチン生産菌における研究を述べるとともに、放線菌ゲノムに潜在する有用資源の顕在化と天然物探索の新たな取り組みを概説する。

## エバーメクチン生産を制御する放線菌ホルモン

タクロリムスや抗結核薬ストレプトマイシンなどの生理活性物質は、放線菌の二次代謝産物として生産される。この放線菌の二次代謝をnMオーダーで誘導する低分子シグナル物質が、放線菌ホルモンである。放線菌ホルモンに関する研究は古く、1943年にWaksmanらがストレプトマイシンを単離したのに対し、1967年に旧ソビエト連邦（現ロシア連邦）のKhokhlovらがストレプトマイシン生産を調節するA-ファクターを報告している（図1A）<sup>1)</sup>。しかし、当時の学会にはA-ファクターの重要性は認められず、別府ら（東京大学醗酵学研究室）の再発

見により、放線菌ホルモン制御系を遺伝子レベルで解明する研究が進展し始めた。筆者らは、1987年と1989年に、抗菌剤バージニアマイシン生産誘導因子であるバージニアブタノライド（VB）と青色色素生産誘導因子IM-2の絶対立体構造を決定している（図1A）<sup>2,3)</sup>。A-ファクターも加えたこれらの放線菌ホルモンは、 $\gamma$ -ブチロラクトン環を含む3-ヒドロキシメチルブタノライドを共通骨格として持ち、 $\gamma$ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンと呼ばれる。筆者らと東京大学醗酵学研究室は、 $\gamma$ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンがその特異的な受容体に認識されると同時に、受容体のDNA結合能を失活させ、受容体が標的とする制御因子を転写レベルにて調節することを明らかにした<sup>4,5)</sup>。日本発のこれらの研究が端緒となり、世界中が放線菌ホルモン制御系の分子機構に注目した結果、ホルモン受容体の基本的機能は普遍的であるのに対し、ホルモン受容以降の制御系活性化メカニズムは菌株によって異なることが分かってきた。ただし、生理現象をnMレベルで引き起こす放線菌ホルモンの生産量は、きわめて少なく、構造決定に必要なmgオーダーの精製品を確保するには、トン単位の培養が必要になるなど、放線菌ホルモンの同定に成功した研究グループは筆者ら

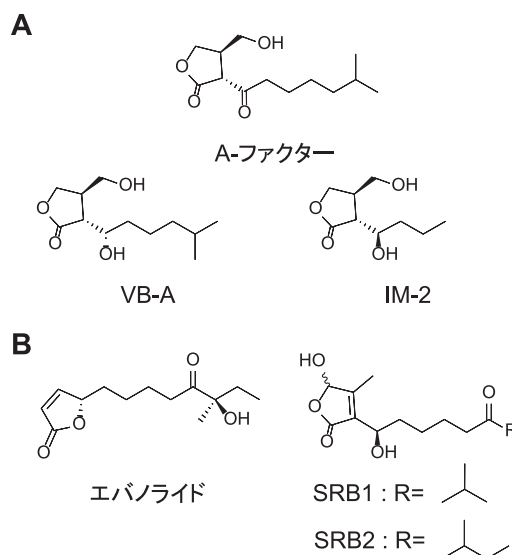


図1. 放線菌の二次代謝を誘導する放線菌ホルモン。A)  $\gamma$ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンの化学構造。B) ブテノライド型放線菌ホルモンの化学構造。

\*著者紹介 大阪大学生物工学国際交流センター（准教授） E-mail: kitani@icb.osaka-u.ac.jp

を含め、ごくわずかしかない。

筆者らは、工学的な観点から、1996年より工業生産用放線菌における放線菌ホルモン受容体の機能を解析し始めた。全世界にて莫大な売上を上げていたエバーメクチンに着目し、その生産菌 *Streptomyces avermitilis* より放線菌ホルモン受容体遺伝子を見いだしたことから、エバーメクチン生合成研究の第一人者である池田治生博士（北里大学生命科学研究所）との共同研究がスタートした。その後、2003年に *S. avermitilis* の完全長ゲノム<sup>6</sup>が池田博士と大村博士から報告されるなど、*S. avermitilis* の遺伝子解析ツールが急速に整備された。ゲノム情報が公開される以前は、筆者らは、エバーメクチン生産を調節する放線菌ホルモンは $\gamma$ -ブチロラクトン型ではないかと考えていた。しかし、① $\gamma$ -ブチロラクトン型ホルモンの生合成遺伝子と推定される遺伝子がエバーメクチン生産に関与しないこと、②ホルモン受容体遺伝子に隣接する機能未知の酵素遺伝子がエバーメクチン生産に関与すること、③この酵素遺伝子破壊株の形質が $\gamma$ -ブチロラクトン型ホルモンでは回復しないこと、④形質を回復する野生型株の培養抽出液がホルモン受容体のDNA結合能を失活させること、などから、エバーメクチン生産を司る放線菌ホルモンは、 $\gamma$ -ブチロラクトン型とは異なる化学構造を持つと確信した。池田博士と長光亨博士（北里大学薬学部）と共同して、1000 Lの *S. avermitilis* 培養液から、ホルモン受容体のDNA結合能阻害活性を指標に、1.2 mgのホルモン受容体結合物質エバノライド (avenolide) を単離し、その平面構造を決定した。エバノライドの絶対立体構造は、化学合成により確認し、2011年にその詳細を報告した(図1B)<sup>7,8)</sup>。ブテノライド環を含むエバノライドは、エバーメクチン生産を4 nMの最小有効濃度で誘導することから放線菌ホルモンといえる。面白いことに、このエバノライドの命名者は大村博士なのである。投稿直前の論文では、苦心して考えた別の名前を使用していたが、共著者の大村博士より「この放線菌ホルモンの名前は、エバノライドとするように」と連絡があり、急遽、書き直して投稿したのである。なぜこの名前にこだわられたのか、いつか理由を聞いてみたいと思っていたが、ノーベル賞を受賞され、お忙しくなられた今となっては、難しそうに感じる。エバノライド生合成遺伝子のホモログが他の放線菌ゲノムにも確認されることから、ブテノライド型放線菌ホルモンの広範囲な分布を予想していたところ、SRB1とSRB2が新たなブテノライド型ホルモンとして2012年に報告された(図1B)<sup>9)</sup>。したがって、 $\gamma$ -ブチロラクトン型ホルモンと並び、ブテノライド型放線菌ホルモンが放線菌二次代

謝の分子機構を解き明かす重要な鍵分子であると確信して、その制御系について、詳細な解析を行っている。

### 放線菌ホルモン制御系を活用した潜在有用資源の開拓

2002年に、遺伝学的基準放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)のゲノム情報<sup>10)</sup>が公開されたのを皮切りに、放線菌の遺伝子情報を簡単に得ることが可能となった。その結果、予想していたよりも遙かに多い、約30もの二次代謝生合成遺伝子群が1菌株あたりに配置されていることが明らかとなった。筆者らは「放線菌ホルモンは二次代謝産物の生産を調節する」と常々、論文に書いており、また他の研究グループも同様に記述している。しかし、筆者らの頭の中をふと、「我々は、我々にとって興味ある数種の代謝物（抗生物質など）のみを研究対象として捉えているだけであり、それ以外の二次代謝物も放線菌ホルモンに生産調節されているのではないか？」という考えがよぎった。そこで、研究室が保有する放線菌ホルモン受容体の遺伝子破壊株について、代謝物解析をしたところ、液胞型プロトンATPase阻害物質バフィロマイシン生産菌である *Kitasatospora setae* のホルモン受容体遺伝子破壊株より、生産が顕著に増加するピークを見いだした。その化学構造を決定した結果、 $\beta$ -カルボリン骨格を含む新規物質（キタセタリンと命名）であることがわかった(図2)<sup>11)</sup>。さまざまな生理活性を示す $\beta$ -カルボリン化合物は、植物または海生動物の成分としてよく知られた物質ではあるが、微生物が生産する例は稀である。したがって、放線菌由来の $\beta$ -カルボリン化合物の生合成遺伝子は、既存の酵素遺伝子とは異なるのではないかと考え、キタセタリン生合成遺伝子を探索することにした。ここで活躍したのが、池田博士が開発したエ

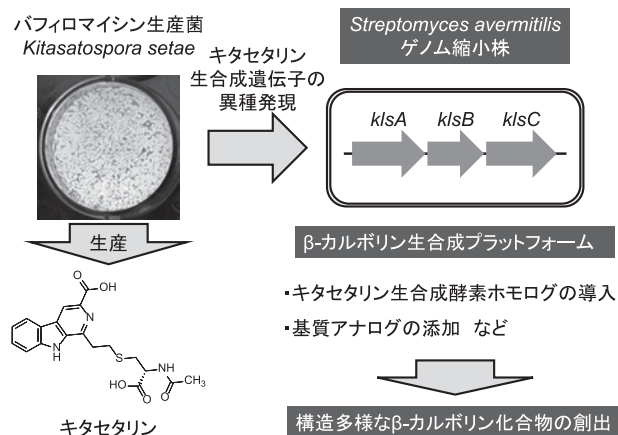


図2. 生合成プラットフォームによる $\beta$ -カルボリン構造の多様性創出

パーメクチン生産菌の優れた代謝能のみを残した *S. avermitilis* ゲノム縮小株である<sup>12)</sup>。 *K. setae* の遺伝子を *S. avermitilis* ゲノム縮小株にて異種発現させたところ、キタセタリン生合成に関与する酵素遺伝子群を同定することに成功した<sup>13)</sup>。これらの酵素群は既知のβ-カルボリン生合成系酵素とは異なっており、その新規性が期待される。また、この異種発現株はたった三つの遺伝子が導入されたのみであることから、ホモログ酵素遺伝子の挿入置換などにより機能を簡単に変換できるβ-カルボリン生合成プラットフォームとなりうる(図2)。したがって、このキタセタリン異種生産株を活用すれば、β-カルボリン化合物の構造多様性を創出できるのではないかと考えている。従来の放線菌ホルモン制御系研究は、興味ある代謝物のみに着目してきたが、解析する視点を変えたことにより、放線菌ゲノムに潜在する有用化合物/遺伝子資源を開拓することに筆者らは成功した。基礎的研究であった放線菌ホルモン制御系の解明が、新規物質を創出する工学的応用研究へと結びつく良い事例ではないかと考えている。

#### 天然物質探索の原点に立ち返り

筆者らは放線菌ホルモン制御系の知見に基づき、有用資源を開発してきている一方、新規天然物質の探索、つまり放線菌研究の原点に近年、立ち返っている。放線菌は土壌微生物として一般的に知られているが、植物体内や海洋にも生息することが明らかとなってきた。なぜ、放線菌は土壌と大きく異なる環境に生息する、また生息しなければならないのだろうか？この問いに対する明確な答えはまだない。また、言い換えると、植物内生放線菌や海洋放線菌の二次代謝系は未知であり、ゲノムに秘められた能力も含め、新規天然物質を生産する能力は未開拓であるといえよう。このような観点に基づき、筆者らは、タイ王国・ラオスなどの生物多様性に富む熱帯・亜熱帯地域の植物に内生する放線菌や日本近海の高圧に生息する放線菌、また海底堆積物に潜む放線菌などを単離し、その物質生産能力を精査し始めている<sup>14)</sup>。代表的な

放線菌である *Streptomyces* 属以外の放線菌が分離される度に、その未知なる能力はいかほどであるかと思いを巡らせながら、エパーメクチン生産菌のような夢ある放線菌に出逢えることを願っている。

#### おわりに

最初の放線菌のゲノム DNA 配列が公開され、早15年近く経とうとしている。放線菌のゲノム情報が次々と公開されていくたびに、「これで放線菌のすべてが明らかとなり、放線菌研究の先が見えた」と思ったものであるが、新規化合物や新奇酵素などが明らかになるにつれ、「実は、放線菌の可能性は無限ではないか」と思い始めている。大村博士はノーベル賞の受賞講演で、放線菌を「地球からの素敵な贈り物」と例えられ、「微生物は無限の資源である」と述べられた。大村博士のご受賞を契機に、微生物天然物研究の重要性が再認識され、放線菌も含めた微生物がもつ優秀な能力を掘り起こす研究が活発になることを期待したい。

#### 文 献

- 1) Khokhlov, A. S. *et al.*: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **177**, 232 (1967).
- 2) Yamada, Y. *et al.*: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **40**, 496 (1987).
- 3) Sato, K. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 170 (1989).
- 4) Okamoto, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **270**, 12319 (1995).
- 5) Onaka, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **177**, 6083 (1995).
- 6) Ikeda, H. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 526 (2003).
- 7) Kitani, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16410 (2011).
- 8) Uchida, M. *et al.*: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **64**, 781 (2011).
- 9) Arakawa, K. *et al.*: *Chembiochem.*, **13**, 1447 (2012).
- 10) Bentley, S. D. *et al.*: *Nature*, **417**, 141 (2002).
- 11) Aroonsri, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 56-58 (2012).
- 12) Komatsu, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2646 (2010).
- 13) Aroonsri, A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 8015 (2012).
- 14) ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告書: [http://www.saltscience.or.jp/general\\_research/2011/201117.pdf](http://www.saltscience.or.jp/general_research/2011/201117.pdf) (2016/3/24).