

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05410

研究課題名(和文)放線菌の潜在的二次代謝に対する抗生物質の濃度依存的活性化作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the dose-dependent effects of antibiotics on the cryptic secondary metabolism in actinomycetes

研究代表者

保坂 毅 (Hosaka, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：50391206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗生物質の元来の定義は微生物が生産し、他の微生物の生育を阻害する化学物質とされている。その一方で、抗生物質が濃度依存的に微生物に対して好影響を与えることが報告されている。代表的な抗生物質生産菌である放線菌では、リボソームを標的とする抗生物質の存在下で生育や二次代謝能が向上することが判っている。本研究では、放線菌におけるこの現象の特性や基本メカニズムを明らかにした。加えて、それらの解析から得られた結果に基づき、抗生物質の特性を生かして放線菌から潜在的な二次代謝産物を発掘するための新たな手法を考案・検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質が効かない多剤耐性菌が次から次へと発生する中で、新しい抗生物質の開発が求められている。しかし、放線菌をはじめ、微生物の二次代謝産物から得られることの多い抗生物質の発見数は減少し続けている。この窮地を乗り切るためには、新しい抗生物質の開発や抗生物質耐性機構の解明に尽力することに加え、抗生物質の本質を理解することが極めて重要である。本研究で得られた新知見には、抗生物質研究におけるそれらの課題の達成に大きな手がかりを与える内容が含まれており、学術的にも社会的にも意義深い研究成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Antibiotics are chemical compounds that suppress the growth of microorganisms. On the other hand, antibiotics can act positively on bacteria. We have previously reported that ribosome-targeting antibiotics at concentrations below the minimum inhibitory concentration enhanced secondary metabolism in actinomycetes, which are one of the major antibiotic producers. In this study, we clarified the characteristics and basic mechanisms of this phenomenon in actinomycetes. Based on the results obtained from the analysis, we devised and verified a new method for discovering potential secondary metabolites from actinomycetes with antibiotic properties.

研究分野：応用微生物学

キーワード：抗生物質 放線菌 二次代謝 リボソーム Streptomyces

1. 研究開始当初の背景

1940年代はじめに、放線菌の二次代謝産物から結核菌に効くストレプトマイシンが発見され、抗生物質という言葉が使われるようになった。それから現在に至るまで、80年余りの間に、様々な微生物の二次代謝産物から数多くの抗生物質が見つけ出され、我々人類はそれらから多大な恩恵を受けてきた。抗生物質は元来、微生物が生産し、他の微生物の生育を抑制する効果があり、動物に対して毒性が低い化学物質と定義付けられている。その一方で、自然界において抗生物質(抗菌性を有する二次代謝産物)はどのような存在なのか? この疑問に対しての明確な答えは未だ見つかっていない。抗生物質が効かない多剤耐性菌が次から次へと発生する中で、新しい抗生物質の発見が求められている。しかし、放線菌をはじめ細菌の二次代謝産物から得られることの多い新しい抗生物質の発見数は減少の一途を辿っている。この窮地を打破するには、抗生物質の本当の姿を見抜き深く理解することが重要である。

2. 研究の目的

放線菌を低濃度の抗生物質存在下で培養すると、同菌の二次代謝能が劇的に向上することがある。本研究では、抗生物質がもたらすそのような濃度依存的現象について、分子生理学の面から深く解析し、放線菌の二次代謝活性化機構や「自然界において抗生物質はどのような存在なのか?」の解明に繋がる手掛かりを掴むことを目的とした。加えて、それらの解析から得られた知見に基づいて、放線菌からの潜在的二次代謝産物の発掘に向けた新たな手法を考案し、検証することにも取り組む。

3. 研究の方法

抗生物質リンコマイシン存在下で放線菌の二次代謝能が高まる仕組みの解析では、ゲノム情報が明らかとなっている放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)を供試菌株とした。改変 R5 液体培地を用いて、*S. coelicolor* A3(2)を 30°C で振とう培養した。対数増殖期中期(36時間)にリンコマイシンを添加し、更に培養を続け、経時的に細胞を回収した。それら細胞における遺伝子発現(mRNA レベル及びタンパク質レベル)は、半定量 RT-PCR 法やウエスタンブロッティング法により解析した。一方、同細胞中のリボソームの形成量やプロファイルは、10-40%のショ糖密度勾配遠心法によりモノソーム及びポリソームを分画し、それらを TRIAX Gradient Profiling System を用いて解析した。なお、リンコマイシン非添加条件での細胞を用いて同様に解析した場合を比較対照とした。

放線菌の二次代謝に対する抗生物質の濃度依存的作用の特性解析も *S. coelicolor* A3(2)を供試菌株として行った。抗生物質による二次代謝活性化作用は *S. coelicolor* A3(2)が生産する2種類の色素抗生物質(青色色素抗生物質アクチノロージン及び赤色素抗生物質ウンデシルプロジギオン)の生産量を指標に評価した。

抗生物質の濃度依存的な作用活用による潜在的二次代謝産物探索手法の考案と検証は、研究代表者が保有する放線菌菌株や土壌試料から新たに分離した放線菌を供試菌株として行った。各放線菌における二次代謝活性化の有無は、抗菌物質生産性の解析や培養抽出物の成分分析(HPLCを用いた比較分析)により評価した。

4. 研究成果

(1) 抗生物質リンコマイシン存在下で放線菌の二次代謝能が高まる仕組みの解析

S. coelicolor A3(2)を 5 µg/mL のリンコマイシン存在下で培養すると、同菌の青色色素抗生物質(アクチノロージン)生産量が劇的に増加した。この条件を二次代謝活性化のための至適条件とし、リンコマイシン存在下における遺伝子発現変化を解析した。その結果、リンコマイシン添加後先ず、WblC タンパク質が高発現することを突き止めた。それが起点となり、WblC レギュロン遺伝子群の誘導を介した大規模な遺伝子変化で内因性の抗生物質耐性機構が稼働し、*S. coelicolor* はリンコマイシンに対して一時的な耐性状態になることが分かった。具体的には、リボソームからリンコマイシンを引き剥がす ATP binding cassette F-family(ABCF)タンパク質や、リンコマイシンにより停滞した 70S リボソームを 50S 及び 30S サブユニットに解離させ、再構築を促すリボソーム解離因子(HflX タンパク質)、リンコマイシンの結合部位を修飾する 23S rRNA メチル化酵素(23S rRNA MTase)の発現が高くなることが明らかになった。それらリンコマイシン耐性に関与する遺伝子に続き、リボソームタンパク質 S12 や翻訳伸長因子(EF-G 及び EF-Tu)が高発現することも判明した。以上の結果から、5 µg/mL のリンコマイシン存在下における遺伝子発現解析の結果から、リンコマイシンの標的であるリボソームが質的および量的に変化している可能性が考えられた。そのことを実験的に証明するために、リンコマイシン添加後のリボソームの形成量やプロファイルを解析した。その結果、リンコマイシン存在下におけるポリソームは、リンコマイシン添加後 1 時間で減少するが、3 時間後には再形成されはじめ、12 時間後ではリンコマイシン非存在下と同等のレベルまで戻ることが判った。興味深いことに、リン

コマイシン非存在下と比較して、リンコマイシン存在下では、培養後期(リンコマイシン添加後 24 時間以降)のリボソーム形成量が多く、加えてポリソームレベルも高くなることが明らかになった。このことは、リンコマイシン存在下において、長時間にわたり、リボソームが安定的かつ活発に働いていることを示唆した。半定量 RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析からは、リンコマイシン存在下において青色色素抗生物質合成の正の調節因子 *actII-ORF4* 遺伝子の mRNA 発現量が高くなることも明らかになった。以上の結果を踏まえ、リンコマイシン存在下で安定的かつ活発であるリボソームは、高発現した *actII-ORF4* の mRNA の効率的な翻訳、すなわち ACTII-ORF4 タンパク質の高発現化を可能にし、結果として、青色色素抗生物質が高生産されることも突き止めた。

リンコマイシンによるリボソームの安定化や、*actII-ORF4* の mRNA が高発現することの仕組みの解明は今後の課題であるが、本研究より、リンコマイシン存在下におけるリボソームの質的および量的変化が放線菌の二次代謝活性化に深く関与していることが明らかとなった(図 1)。

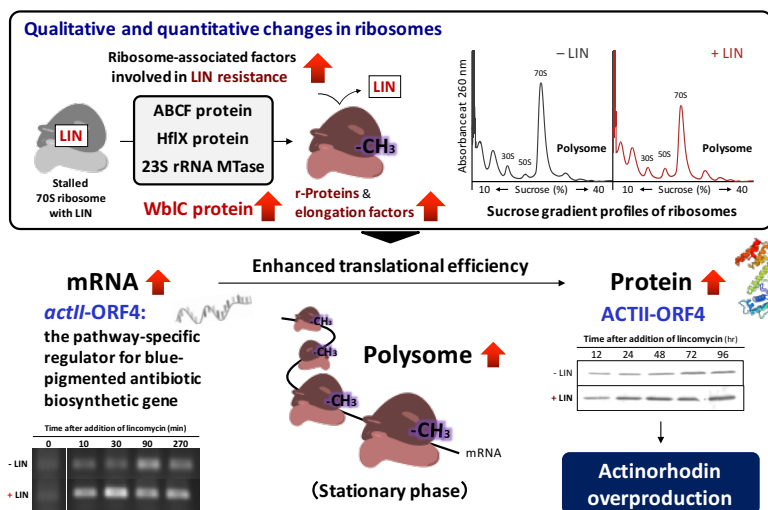


図 1 抗生物質リンコマイシンによる二次代謝活性化の推定メカニズム

(2) 放線菌の二次代謝に対する抗生物質の濃度依存的作用の特性解析

作用の異なる 19 種類の抗生物質を用いて、各抗生物質が放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2)の二次代謝能に与える影響を調べた。*S. coelicolor* A3(2)を YEME 液体培地で対数増殖期中期(培養 36 時間)まで培養した後、様々な濃度の各抗生物質を添加し、さらに培養を続けた。培養 7 日目の青色色素抗生物質アクチノロージンおよび赤色色素抗生物質ウンデシルプロジギオシンの生産量を測定し、各抗生物質の二次代謝活性化作用を評価した。その結果、供試抗生物質のうち 7 種類(アパラマイシン, G418, カナマイシン, ネオマイシン, クロラムフェニコール, チオストレプトン, タイロシン)において、強い二次代謝活性化作用が認められた。アクチノロージンとウンデシルプロジギオシンの高生産化パターンは各抗生物質で異なっていたが、興味深いことに、それら全てがリボソームを標的とする抗生物質であった。このことは、二次代謝活性化において、リボソームが何らかの重要な役割を担っている可能性を示唆した。本検討で最も強力な二次代謝活性化作用を示したクロラムフェニコールは、クロラムフェニコール非存在下に比べて、最大で 19 倍と 29 倍のアクチノロージンとウンデシルプロジギオシンの生産量の増加をもたらした。このような強い二次代謝活性化は、20~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを培養 30~36 時間後に添加した条件でのみ認められた。限定された濃度域および添加時間での二次代謝活性化はタイロシンにおいてもみられた。以上の結果から、抗生物質による二次代謝活性化は、その濃度や添加時間、さらには培地組成に大きく依存することが明らかになった。

一方、リボソームを標的とする抗生物質の濃度依存的二次代謝活性化作用と RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子における特定変異の二次代謝活性化効果を組み合わせると、放線菌の潜在的二次代謝産物生産能を効率良く引き出せることも、リンコマイシンやクロラムフェニコールを用いた解析から見出した。

(3) 抗生物質の濃度依存的作用活用による潜在的二次代謝産物探索手法の考案と検証

リボソームを標的とする抗生物質リンコマイシンやクロラムフェニコール、タイロシンは、*S. coelicolor* A3(2)以外の放線菌に対しても濃度依存的に二次代謝活性化作用を示すことが、土壌分離放線菌を含む様々な放線菌で実験的に証明できた。加えて、放線菌の種類や培養条件にもよるが、DNA 複製を標的とする抗生物質ノボビオシンやオフロキサシンにも二次代謝活性化作用があることを見出した。しかし、抗生物質による二次代謝活性化が、濃度や培養への添加時期、さらには培地組成にも大きく依存するがゆえに、各放線菌におけるその最適条件を特定するには緻密な検討を要することが分かった。このような問題点が明確となったことから、本手法の応

用展開には大幅な改善策が必要であると判断した。この課題の克服に向けた新たな方法論を考案し、検証したところ、土壌への抗生物質の添加でそれらに存在する放線菌の潜在的二次代謝を複合的に活性化できる可能性を新たに見出した。この手法の有効性の真価の検証は今後の課題であるが、微量のノボジオシンが、土壌中の放線菌やその代謝に好影響を与えることを実験的に明らかにしつつある。

以上のように、本研究において、抗生物質が放線菌の二次代謝を活性化する現象の特性や基本メカニズムを明らかにした。加えて、その解析から得られた知見に基づいて、抗生物質の特性を生かして放線菌から潜在的な二次代謝産物を発掘するための新たな手法を考案・検証したところ、今後の応用展開に活かせる重要な新知見を得た。これらの成果は、放線菌の二次代謝活性化機構や「自然界において抗生物質はどのような存在なのか?」の解明に向けた大きな一歩といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mukai Keiichiro, Kobayashi Momoko, Hoshino Kanata, Maruyama Tomoko, Hayashi Daiki, Hamauzu Ryoko, Hosaka Takeshi	4. 巻 77
2. 論文標題 Lincomycin-Induced Secondary Metabolism in <i>Streptomyces lividans</i> 66 with a Mutation in the Gene Encoding the RNA Polymerase Beta Subunit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 2933 ~ 2939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-020-02126-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hoshino Kanata, Imai Yu, Mukai Keiichiro, Hamauzu Ryoko, Ochi Kozo, Hosaka Takeshi	4. 巻 104
2. 論文標題 A putative mechanism underlying secondary metabolite overproduction by <i>Streptomyces</i> strains with a 23S rRNA mutation conferring erythromycin resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2193 ~ 2203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-019-10288-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishizuka Misaki, Imai Yu, Mukai Keiichiro, Shimono Kazuma, Hamauzu Ryoko, Ochi Kozo, Hosaka Takeshi	4. 巻 111
2. 論文標題 A possible mechanism for lincomycin induction of secondary metabolism in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antonie van Leeuwenhoek	6. 最初と最後の頁 705 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10482-018-1021-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 保坂 毅・向井 慶一郎・石塚 美咲・小林 桃子	4. 巻 2018年12月臨時増刊号
2. 論文標題 放線菌の二次代謝に対する抗生物質の濃度依存的活性化作用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 81 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 向井 慶一郎、石塚 美咲、今井 優、小林 桃子、星野 颯、保坂 毅
2. 発表標題 放線菌の二次代謝に与えるリンコマイシンの濃度依存的な好影響の解析 (The dose-dependent positive effects of lincomycin on secondary metabolism in streptomycetes)
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高羽七星、星野颯、濱渦亮子、保坂毅
2. 発表標題 放線菌におけるノボビオシン耐性変異株の出現と特徴 (The emergence of novobiocin-resistant mutants in actinomycetes and their characteristics)
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林大稀、向井慶一郎、小林桃子、保坂毅
2. 発表標題 抗生物質が土壌の性質に与える影響の解析 (Physiological analysis of the effects of antibiotics on soil properties)
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野 颯、谷津穂高、濱渦 亮子、保坂 毅
2. 発表標題 オフロキサシンを活用した放線菌の二次代謝活性化 (Combined genetic and physiological effects of ofloxacin can activate secondary metabolism in actinomycetes)
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mukai Keiichiro, Ishizuka Misaki, Kobayashi Momoko, Imai Yu, Hosaka Takeshi
2. 発表標題 The fundamental mechanism underlying the lincomycin induction of secondary metabolism in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保坂毅
2. 発表標題 抗生物質の本質的理解とその応用
3. 学会等名 微生物ウィーク2019シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林桃子、向井慶一郎、林大稀、石塚美咲、今井優、保坂毅
2. 発表標題 放線菌の二次代謝に対する抗生物質の活性化作用とそのメカニズムの解析
3. 学会等名 第34回 (2019年度) 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保坂毅
2. 発表標題 抗生物質の本質的理解に向けた放線菌の分子生理学的研究
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井 慶一郎、小林 桃子、石塚 美咲、今井 優、保坂 毅
2. 発表標題 リンコマイシンにより放線菌の二次代謝能が高まる仕組みの解明に向けたリボ ソームプロファイル解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井慶一郎、石塚美咲、小林桃子、今井優、越智幸三、保坂毅
2. 発表標題 リンコマイシン存在下で放線菌の生育と二次代謝が向上する仕組みの解析
3. 学会等名 日本放線菌学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林桃子、向井慶一郎、石塚美咲、今井優、保坂毅
2. 発表標題 放線菌の生育と二次代謝に対する抗生物質タイロシンの濃度依存的な作用
3. 学会等名 日本放線菌学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林桃子、向井慶一郎、石塚美咲、今井優、保坂毅
2. 発表標題 放線菌の二次代謝に対する抗生物質タイロシンのユニークな濃度依存的な活性化作用
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井慶一郎, 石塚美咲, 小林桃子, 今井優, 保坂毅
2. 発表標題 抗生物質リンコマイシンが放線菌の二次代謝能を高める仕組みの解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>信州大学学術情報オンラインシステム研究者総覧 http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.0ULNjFkV.html 信州大学応用分子微生物学研究室ホームページ https://appl-mol-microbiol-shinshu-u.jimdo.com/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今井 優 (Imai Yu)		
研究協力者	カンチャナバンカ チュンブーニック (Kanchanabanca Chompoonik)		
研究協力者	アトキンソン ジェンマ (Atkinson Gemma)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ハリリユーク バシリ (Hauryliuk Vasili)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
タイ	チュラーロンコーン大学			
スウェーデン	ウメオ大学			
米国	ノースイースタン大学			