

微生物が生産する生物活性物質の探索

はやかわ よういち
東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 教授 早川 洋一

はじめに

微生物は、抗生物質と呼ばれる抗菌物質をはじめとして、抗がん物質、免疫抑制物質、コレステロール生合成阻害物質などさまざまな生物活性物質を生産し、多くの化合物が人類にとって欠かすことのできない医薬として利用されています。大村智先生が2015年のノーベル生理学・医学賞を受賞したのも、微生物由来の抗線虫物質エバーメクチンの発見が評価されてのものでした。これらの生物活性物質は微生物が生きていくためには必ずしも必要ないことから、二次代謝産物というカテゴリーに分類されています。

近年、多くの二次代謝産物の生合成遺伝子が明らかになり、その巧妙で複雑なシステムを創り出した生命の神秘に改めて感心させられます。私たちの研究室では、微生物が生産する生物活性物質を探索し、それらの化学構造や作用、生合成機構などについて研究して

います。ここではその一例について紹介します。

微生物が生産する抗がん物質の探索

遺伝的にプログラムされた細胞死であるアポトーシスはがん遺伝子によっても制御されています。アデノウイルスのE1Aがん遺伝子はRBがん抑制遺伝子産物の働きを抑制することによって細胞増殖を促進しますが、同時に細胞のアポトーシス感受性を亢進させることが知られています(図1)。そこで、E1Aがん遺伝子を導入した細胞を用いて、正常細胞と比較して選択的に細胞死を誘導する微生物代謝産物を探索しました。その結果、土壌から分離した放線菌*Streptomyces olivoviridis* NA05001株の培養液中に新規活性物質を見出し、thioviridamide (TVA) と命名しました。

TVAの分子式は高分解能マスペクトルから $C_{56}H_{93}N_{14}O_{10}S_7^+$ と決定し、核磁気共鳴(NMR)スペクトルの解析により、その構造は図2に示すような11個のアミノ酸が結合した環状ペプチドであることが明らかになりました。しかし、通常のペプチドにおけるアミノ酸同士の結合がアミド結合であるのに対して、TVAではそのうち5カ所がチオアミド結合になっていました。このような化合物はこれまでに報告されたことがなく、その生物活性や生合成機構に興味を持たれました。

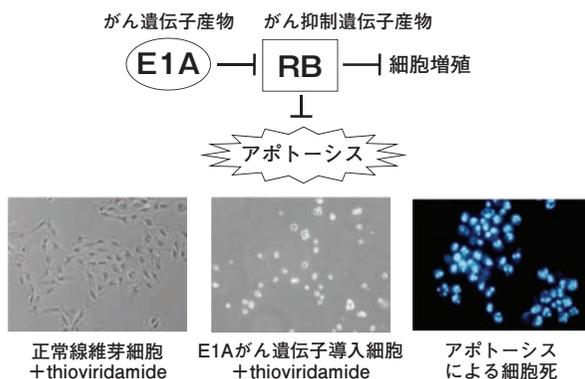


図1 アデノウイルスE1Aがん遺伝子の働きとE1Aがん遺伝子導入細胞

TVAはE1Aがん遺伝子導入細胞に対して低濃度で細胞死を誘導し（50%増殖阻害濃度：32 ng/ml）、TVAで処理した細胞にはアポトーシスに特徴的なクロマチンの凝縮と核の断片化が観察されました（図1）。一方、ラット正常線維芽細胞3Y1細胞に対する活性は高濃度でのみ認められました（50%増殖阻害濃度：890 ng/ml）。現在までに、アデノウイルスが直接ヒトの発がんに関わっている証拠はありませんが、このような化合物を発見できたことは抗がん剤開発の一つの方向性を提供したものと考えています。

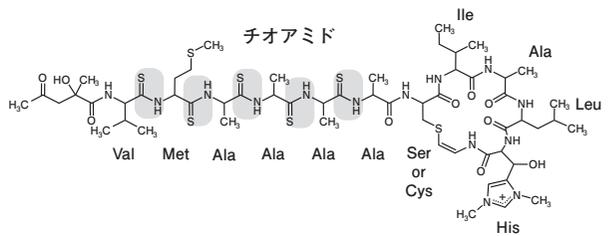


図2 Thioviridamideの化学構造

二次代謝産物の生合成機構解明

微生物二次代謝産物の生合成遺伝子は一箇所に集まって存在しており、生合成遺伝子クラスターと呼ばれています。TVA生合成遺伝子を同定するためにさまざまな方法を試みましたが、最終的には生産菌のゲノム解析により明らかにすることができました。すなわち、*S. olivoviridis* NA05001株のゲノムDNAを用いてシーケンス解析を行い、TVA前駆体ペプチドに含まれると予想されるアミノ酸配列（バリン・メチオニン・アラニン・アラニン・アラニン・アラニン・セリン／システイン・イソロイシン・アラニン・ロイシン・ヒスチジン）に相当する塩基配列を探索しました。その結果、この配列を含むTVA前駆体ペプチド遺伝子 *tvaA* を見出しました（図3）。

次に周辺の塩基配列からTVA生合成遺伝子クラスターを予測し、生合成遺伝子の候補である *tvaA*~*tvaO* の15遺伝子を異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23株に導入しました。この菌の培養物を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、TVAの生産が確認され、TVA生合成遺伝子が *tvaA*~*tvaO* に含

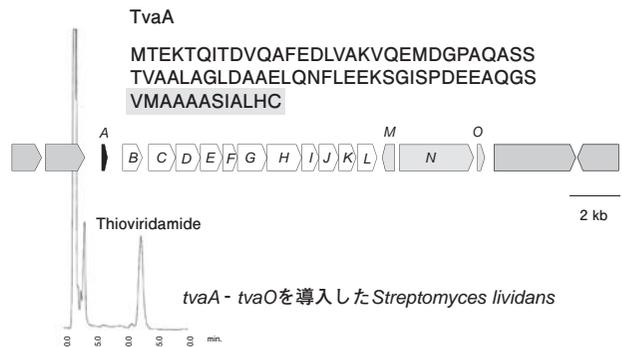


図3 Thioviridamide生合成遺伝子クラスター

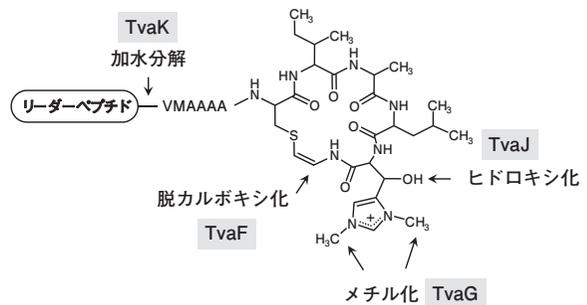


図4 Thioviridamide生合成に関わる遺伝子産物の機能

まれることが判明しました。

次に、この領域をさらに短縮して同様の実験を行い、TVA生合成遺伝子クラスターを *tvaA*~*tvaL* の12遺伝子と同定しました（図3）。データベース上に登録されている遺伝子との相同性から、*tvaF*はC末端システイン残基の脱カルボキシ化、*tvaG*はヒスチジン残基のメチル化、*tvaJ*はヒスチジン残基のヒドロキシ化、*tvaK*はリーダーペプチドの加水分解に関わることが推定され（図4）、現在、残りの候補遺伝子からチオアミド形成に関与する遺伝子の同定を試みています。