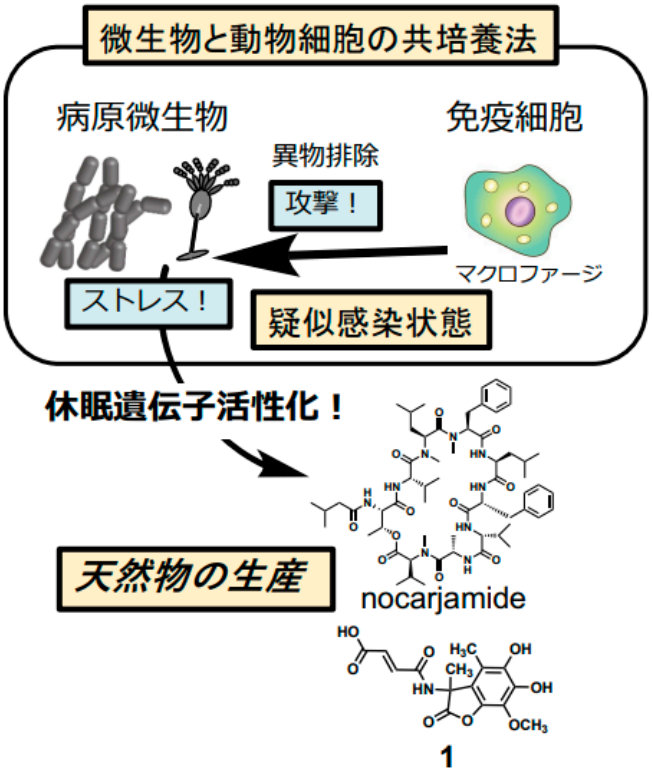
2　病原微生物の浸潤進化に学ぶ休眠遺伝子活性化と創薬	荒井　緑

【目的】放線菌や真菌は、多くの有用な化合物を提供してきた。しかしながらその遺伝子は2割程度しか働いておらず、新たな新規天然物を生産するであろう生合成遺伝子が眠ったままの休眠遺伝子であることがわかっている。我々は近年、病原放線菌と動物細胞の共培養法を開発し、休眠遺伝子活性化に成功している。この新規手法は、病原微生物が動物に感染する際の状況を再現し、疑似感染状態を模倣したもので、国内外でも初めての例であり独創的で新規性が高い。本研究では、本共培養法を病原真菌にも応用し、新たな共培養特異的化合物を見いだし、その生産機構に迫ることを目的とする。

【方法】千葉大学真菌医学研究センターが保有する臨床検体から分離された病原真菌と免疫細胞（マウスマクロファージ様細胞 J774.1、RAW264）を様々な条件下共培養を行った。細胞のみの培養、菌のみの培養および、共培養の際の化合物生産を HPLC で比較し、共培養特異的化合物を見いだした。

【結果】病原放線菌 *Nocardia tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 の共培養により生産される nocarjamide の生産機構の解明に向け種々検討し、nocarjamide の産生には *N. tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 の物理的接触は必要ないことが明らかとなり、*N. tenerifensis* は、マクロファージの出す比較的大きいタンパク質に反応している可能性があると推定した。病原真菌 *Aspergillus fumigatus* 株とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 の共培養を行い、共培養特異的に産生される化合物 **1** を単離・構造決定した。アゾール耐性を持たない *A. fumigatus* 株で同様に共培養を行ったが、共培養特有ピークは見出されなかったことから、感染に有利なアゾール耐性株特有の化合物生産と予想した。また、RNA-seq により、fumarylalanine の生合成クラスターSidE が共培養特異的に発現上昇することを見いだした。*A. fumigatus* とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 との共培養で、fumarylalanine の生合成が上昇し、化合物 **1** は、fumarylalanine を用いて生合成されたと推測した。

微生物と動物細胞の共培養による休眠遺伝子活性化と天然物生産



2. 病原微生物の浸潤進化に学ぶ休眠遺伝子活性化と創薬

荒井　緑

慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 ケミカルバイオロジー研究室

Key words：天然物，休眠遺伝子，共培養，病原放線菌，病原真菌

緒　言

放線菌や真菌は、寄生虫病薬イベルメクチンや免疫抑制剤 FK506 など多くの有用な化合物を提供してきた。しかしながらその遺伝子は 2 割程度しか働いておらず、新たな新規天然物を生産するであろう生合成遺伝子が眠ったままの休眠遺伝子であることがわかっている。その休眠遺伝子を活性化するため、化合物の添加［1］、異種発現［2］、菌同士の共培養［3］などの試みがなされているが未だ画一された方法論はない。そのような中、我々は近年、病原放線菌と動物細胞の共培養法を開発し、休眠遺伝子活性化に成功している［4，5］。この新規手法は、病原微生物が動物に感染する際の状況を再現し、疑似感染状態を模倣したもので、国内外でも初めての例であり独創的で新規性が高い。病原菌が動物に感染した際、免疫細胞からの異物排除のストレスを受けた病原菌は生き残るために休眠遺伝子を活性化し、異物排除に対抗するため、未知天然物を生産するかもしれない。それはこれまで気づかれなかった異種生物間相互作用による天然物生産現象である（図 1）。このような感染を容易にするための天然物生産の能力は、進化の結果とも捉えられ、我々はこのような病原菌の進化を感染対象の宿主へ浸潤（侵略）しやすくする進化として「浸潤進化（invasive evolution）」と呼ぶことにした。放線菌 *Nocardia tenerifensis* とマクロファージ J774.1 との共培養を行うと、休眠遺伝子の活性化が起こり、新規環状ペプチド nocarjamide 及び新規化合物 dehydropropylpantothenamide が得られる（図 2）。興味深い事に、nocarjamide は Wnt シグナル活性化作用を示す。Wnt シグナルは、マクロファージからのサイトカイン TNF-α 産生を抑制するため、nocarjamide は免疫抑制に働くと解釈できる。このような興味深い現象をさらに研究するため、さらなる共培養特異的天然物の探索と単離・構造決定に取り組むことにした。

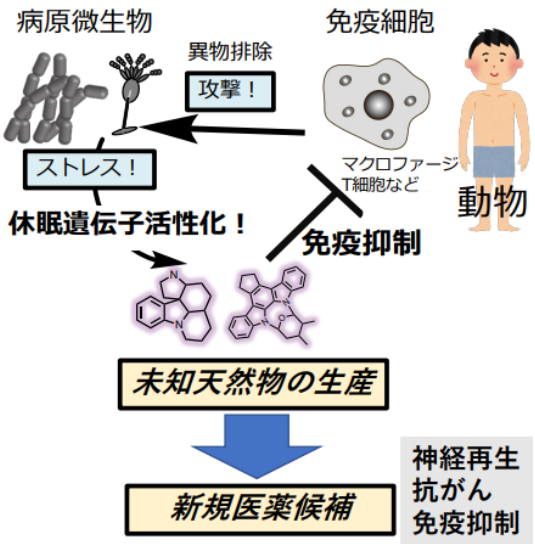


図 1. 病原微生物の浸潤進化は存在するのか？医薬への応用は？
病原微生物と細胞の共培養により、特異的化合物が産生される。

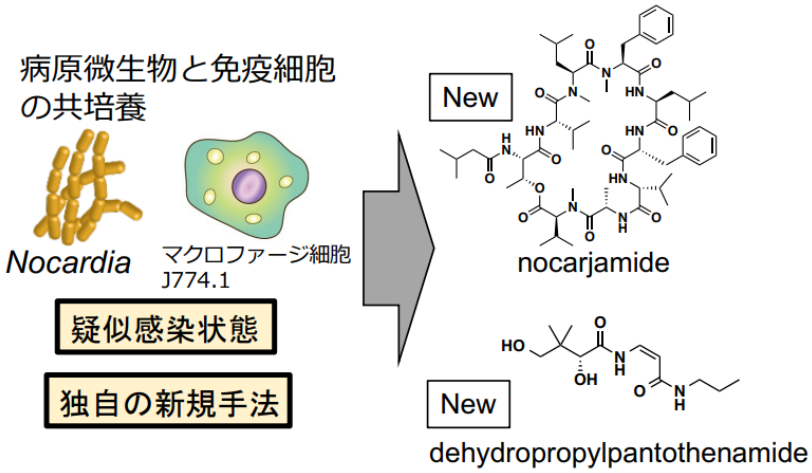


図 2. 病原微生物と免疫細胞の共培養による新規天然物
Nocardia tenerifensis とマクロファージ J774.1 との共培養により、新規化合物 nocarjamide 及び新規化合物 dehydropropylpantothenamide が得られる。

方　法

1. 微生物と動物細胞の共培養と化合物単離

千葉大学真菌医学研究センターが保有する臨床検体から分離された病原真菌と免疫細胞（マウスマクロファージ様細胞 J774.1、RAW264）を様々な条件下共培養を行った。沪過により上清と菌体に分け、菌体は MeOH で破砕し、遠心で得た上清をエバポレーターで濃縮し、先の上清と合わせた。合わせた層を酢酸エチルにより抽出し、その一部をエバポレーターで濃縮し、HPLC で分析した。細胞のみの培養、および菌のみの培養時との比較により共培養特異的化合物を見いだした。見いだした化合物は、HPLC のリテンションタイムを指標に、各種カラムクロマトグラフィーを用いて化合物を単離し、一次元および二次元 NMR などを用いてその構造を決定した。

結果および考察

1. Nocarjamide 産生機構の解析

病原放線菌 *Nocardia tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 を共培養すると nocarjamide を産生する。HPLC で解析することで、単培養のみの時には現れない化合物ピークが、共培養時に現れる（図 3）。*N. tenerifensis* がマクロファージの何に反応しているかを検証した。病原放線菌はマクロファージより捕食されることが知られている [6]。それでは、放線菌と細胞の接触が必要なのだろうか？まず、ライセート条件やオートクレーブで細胞を破砕した後に、*N. tenerifensis* と培養しても nocarjamide は得られなかったことから、細胞は生きていることが必要であると示唆された（図 4）。次に *N. tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 の共培養の培養液、あるいは J774.1 のみの培養液を *N. tenerifensis* の単培養に添加したところ、興味深いことに nocarjamide が産生された。このことから、nocarjamide の産生には *N. tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 の物理的接触は必要ないことが示唆された。J774.1 の出すタンパク質や化合物に *N. tenerifensis* が反応している可能性がある。そこで次に透析膜（孔径 5 Å）（化合物や小さなタンパク質は通り抜けられる）で *N. tenerifensis* と J774.1 を遮って培養したところ、nocarjamide は産生されなかった。従って、*N. tenerifensis* は、マクロファージの出す比較的大きいタンパク質に反応している可能性があると示唆された。

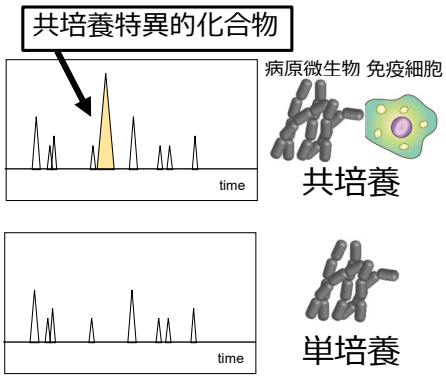


図 3. 病原微生物と免疫細胞の共培養

上段は共培養後の酢酸エチル層の HPLC チャートであり、下段の菌の単培養時と比較して、共培養特異的化合物が得られる。

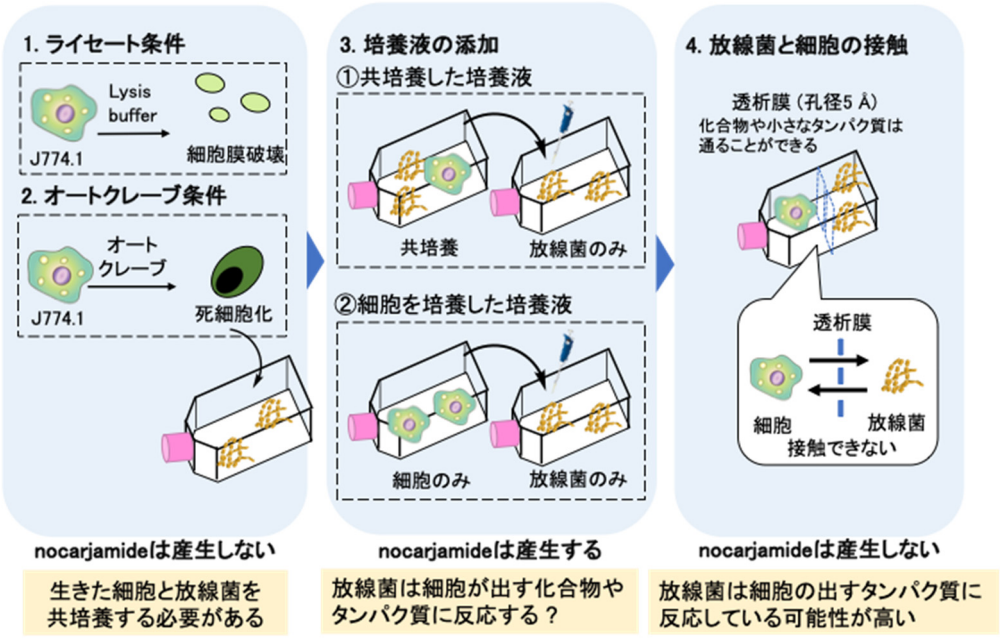


図 4. Nocarjamide 産生機構の解析

細胞をライセート化やオートクレーブ処理すると化合物は産生しない。一方、細胞の培養液を加えるだけで化合物を産生した。透析膜で細胞と菌を隔てると化合物は産生しなかった。

2. 病原真菌 *Aspergillus* とマクロファージとの共培養

次に、病原真菌 *Aspergillus* とマクロファージとの共培養を試みた。病原性真菌 *Aspergillus* のうち、病原性の強い *Aspergillus fumigatus* 株とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 を種々の培地条件下で共培養し、微生物のみの単培養のときの生産化合物と比較し、共培養特異的な化合物が生産されたか LC-MS（高速液体クロマトグラフ質量分析）にて解析した。Czapek-Dox（CD）培地、静置培養、1 週間培養において、共培養特異的な化合物を見いだした。大量培養（動物細胞数：菌体量＝2.25×10^7個：0.3 cm^3、CD 培地、175 cm^2細胞培養フラスコ、28℃、7 日間）で静置培養し、培養液を得た後、各種クロマトグラフィーを用いて単離した。HRMS（*m/z* 360.0690 $[M+Na]^+$、calcd for $C_{15}H_{15}NO_8Na$ 360.0691 より化合物の分子式は $C_{15}H_{15}NO_8$ と決定した。各種 NMR（核磁気共鳴装置）を用いて構造決定を行った（図 5）。^{1}H-NMR からトランス型の二重結合の存在が示唆され、また二次元 NMR からピロガロール型

の酸化様式を有するベンゼン環・g-ラクトン骨格・アミド結合・エステル結合の存在が示唆された。これらの部分構造は連結されたが、メトキシ基の置換位置については判明しなかったため、3 つの異性体 a-c について計算ソフト Spartan を用いて^{13}C の化学シフト値の計算を行った。実測値と計算値を比較した結果、異性体 a の値と良い一致を示したことから化合物 **1** の平面構造を決定した。化合物 **1** は *A. fumisynnematus* F746 より単離報告のある既知化合物 (-)-fumimycin［7］と類似した構造を有していた。アゾール耐性を持たない *A. fumigatus* 株で同様に共培養を行ったが、共培養特有ピークは見出されなかったことから、感染に有利なアゾール耐性株特有の化合物生産と予想した。

また、RNA-seq により、共培養特異的に発現が上昇、あるいは減少している遺伝子の特定を試みた。その結果、fumarylalanine の生合成遺伝子クラスターである SidE の発現が顕著に増加していた。大変興味深いことに、*A. fumigatus* をマウス鼻腔から感染させると、fumarylalanine の生合成クラスターSidE が発現上昇し、fumarylalanine が生成することが報告されていた［8］。化合物 **1** の構造を良く見ると、fumarylalanine のユニットがあることがわかる。すなわち、*A. fumigatus* とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 との共培養でも、fumarylalanine の生合成が上昇し、化合物 **1** は、fumarylalanine を用いて生合成されたと推測した (図 6)。このように、本共培養は、*in vivo* での実際の感染状態を模倣していると考えられる。現在、化合物 **1** の生物活性評価の検討に取りくんでいる。

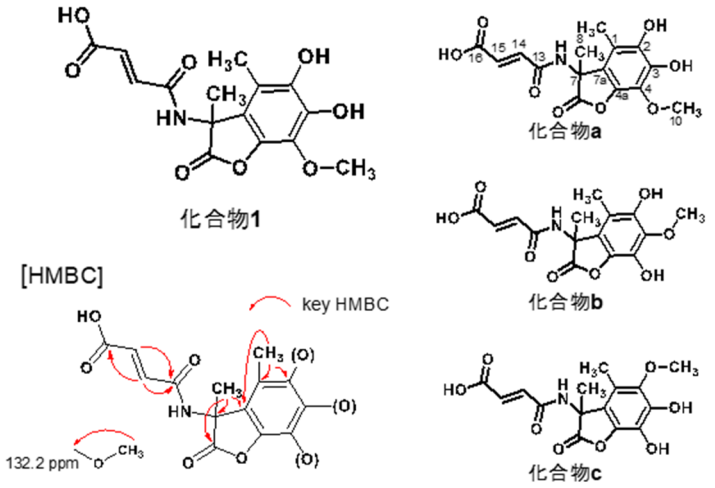


図 5. 化合物 **1** の構造解析

共培養特異的化合物 **1** の構造解析。一次元、二次元 NMR および計算科学を用いて構造を決定した。

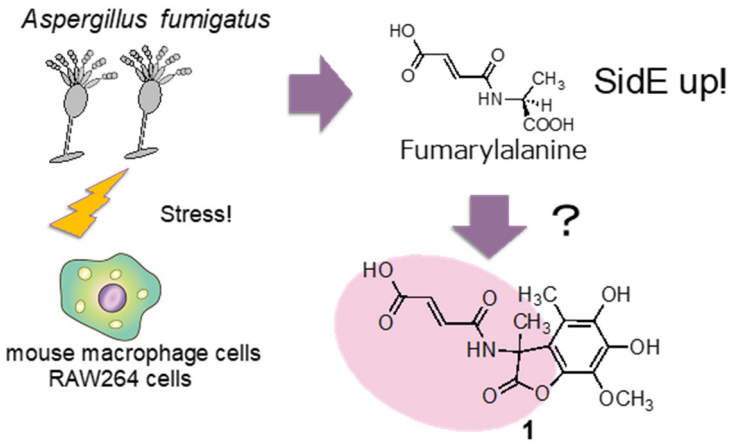


図 6. 化合物 **1** の予想生成機構

共培養によって、fumarylalanine の生合成クラスターSidE が発現上昇した。化合物 **1** は fumarylalanine を用いて生合成されていると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究は、慶應義塾大学理工学部生命情報学科ケミカルバイオロジー研究室および千葉大学大学院薬学研究院活性構造化学研究室で行われたものであり、慶應義塾大学の齋藤駿助教、千葉大学の石橋正己教授、原康雅助教、また実験を行って頂いた学生の皆様に心より感謝いたします。また、扱った放線菌、真菌は千葉大学真菌医学研究センターの保有株であり、共同研究者の矢口貴志准教授、高橋弘喜准教授、楠屋陽子助教に心より御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり多大なるご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。研究室の立ち上げ時であり、本当に助けて頂きました、ありがとうございました。

文　献

1) Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, Murakami K, Tsurumi Y, Kodani S, Yoshida M, Ochi K. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. Nat Biotechnol 2009 May;27(5):462-4. Epub 2009 Apr 26. PMID: 19396160 DOI: 10.1038/nbt.1538

2) Laureti L, Song L, Huang S, Corre C, Leblond P, Challis GL, Aigle, B. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in Streptomyces ambofaciens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 12;108(15):6258-63. Epub 2011 Mar 28. PMID: 21444795 DOI: 10.1073/pnas.1019077108.

3) Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in Streptomyces species. Appl Environ Microbiol 2011 Jan;77(2):400-6. Epub 2010 Nov 19. PMID: 21097597 DOI: 10.1128/AEM.01337-10

4) Hara Y, Arai MA, Ishikawa N, Gonoi T, Yaguchi T, Ishibashi M. Dehydropropylpantothenamide isolated by a co-culture of Nocardia tenerifensis IFM 10554 T in the presence of animal cells. J Nat Med 2018 Jan;72(1):280-289. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29209902 DOI: 10.1007/s11418-017-1161-y.

5) Hara Y, Arai MA, Toume K, Masu H, Sato T, Komatsu K, Yaguchi T, Ishibashi M. Coculture of a Pathogenic Actinomycete and Animal Cells To Produce Nocarjamide, a Cyclic Nonapeptide with Wnt Signal-Activating Effect. Org Lett 2018 Sep 21;20(18):5831-5834. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30156858 DOI: 10.1021/acs.orglett.8b02522

6) Beaman BL, Beaman L. Nocardia species: host-parasite relationships. Clin Microbiol Rev 1994 Apr;7(2):213-64. PMID: 8055469 DOI: 10.1128/CMR.7.2.213.

7) Kwon YJ, Sohn MJ, Zheng CJ, Kim WG. Fumimycin: a peptide deformylase inhibitor with an unusual skeleton produced by Aspergillus fumisynnematus. Org Lett 2007 Jun 21;9(13):2449-51. Epub 2007 May 25. PMID: 17523650 DOI: 10.1021/ol0703231.

8) Steinchen W, Lackner G, Yasmin S, Schrettl M, Dahse HM, Haas H, Hoffmeister D. Bimodular peptide synthetase SidE produces fumarylalanine in the human pathogen Aspergillus fumigatus. Appl Environ Microbiol 2013 Nov;79(21):6670-6. Epub 2013 Aug 23. PMID: 23974138 DOI: 10.1128/AEM.02642-13