

<平成 28 年度助成>

食中毒原因菌であるカンピロバクター属細菌に 特異的な生育阻害剤の探索

大利 徹

(北海道大学大学院 工学研究院)

1. 研究目的

メナキノン (MK) は、人間にとって血液凝固に必須なビタミン (ビタミン K) であり、また微生物においては呼吸の際の電子伝達系の補酵素として働き、生育に必須な物質である。その生合成は、大腸菌や枯草菌においてはコリスミ酸から *o*-スクシニル安息香酸 (OSB) を経る経路で生合成されることが明らかにされている。しかし当研究室で、ゲノム解析が終了していたグラム陽性菌である放線菌の 2 株、*Streptomyces coelicolor* および *Streptomyces avermitilis* のゲノムを精査したところ、呼吸鎖で MK を使うにもかかわらず、*o*-スクシニル安息香酸の生合成に関

与する遺伝子 (*menF*, *menD*, *menC*) のオルソログが存在しないことを発見した。また *Helicobacter* 属細菌、*Campylobacter* 属細菌においても、生育に MK が必要であるにもかかわらず、*men* 遺伝子のオルソログが存在しなかった。これらの事実から、一部の微生物では MK が新規の経路により生合成されている可能性が示唆された。そこで当研究室では、BLAST 解析により新規経路保有微生物にのみ存在する遺伝子を選別し、さらに、それら候補遺伝子破壊株を用いて新規経路の解析を行った。その結果、生合成中間体としてフタロシンを経る新たな MK 生合成経路が明らかになり、フタロシン経路と命名した (図 1)。

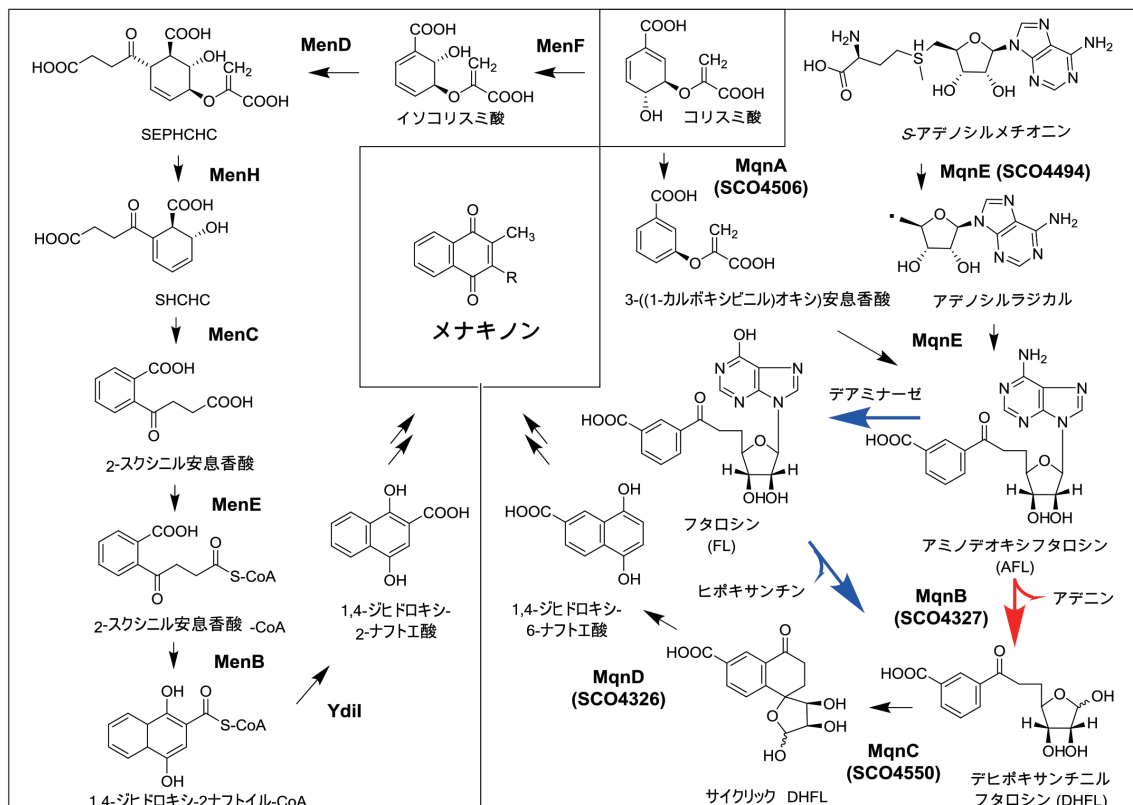


図 1 メナキノン生合成既知経路 (左) とフタロシン経路 (右)

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、さらには胃癌の原因として知られ、人に悪影響を及ぼす細菌である。現在ピロリ菌に対し有効な抗生物質は存在するが、非特異的であるために、ピロリ菌だけでなく大腸菌や乳酸菌などの有用な腸内細菌をも死滅させてしまい、服用者の腸内環境が乱れることが問題となっている。また、夏場におけるカンピロバクター属細菌に起因する食品の微生物汚染は、毎年報道されているように依然大きな社会問題である。これらの予防・駆除には、原因菌の増殖を特異的に抑える抗菌剤の開発が望まれる。両病原菌はゲノム解析が終了しているが、そのゲノム中に既知経路の生合成遺伝子である *menF-C* 遺伝子オーソログが存在せず、フタロシン経路遺伝子群のオーソログを持つ。そのため、両株は新規フタロシン経路により MK を合成していると推定される。従って、フタロシン経路のみを阻害する化合物は、大腸菌や乳酸菌などの既知経路保持株を阻害せずにピロリ菌のみ阻害できる特異的な抗生物質になる可能性がある。そこで候補化合物を微生物培養液に探索した。

2. 研究方法

当研究室では病原菌であるピロリ菌を扱うことができないため、フタロシン経路保有株として *Bacillus halodurans* を、既知経路保有株として *Bacillus subtilis* を用いて、フタロシン経路阻害剤を放線菌とカビの培養液に探索した。

2-1. 使用した菌株と培養条件

B. subtilis は Sigma-Aldrich の LB 培地を用いて 37℃ で培養した。他方、*B. halodurans* は NaCl 2% (w/v) 含有 LB を用いて 30℃ で培養した。

2-2. スクリーニング

微生物培養サンプル 50 ml をペーパーディスクに染み込ませ、バイオアッセイに用いた。

抗菌活性は、ペーパーディスクアッセイによる生

育阻止円の形成の有無で判定した。LB 寒天培地に、被検菌を含む軟寒天を重層した二層からなる培地を用いた。軟寒天の上に、上記サンプルを染みこませた濾紙を置いて 30℃ で一晚培養し、阻止円を観測した。

B. halodurans にのみ活性を示したサンプルについて、MK 添加による生育阻害回復アッセイを行った。選別されたサンプルがフタロシン経路を阻害している場合、経路の最終生産物である MK を添加すれば菌の生育は回復すると考えられる。そこで液体培養で、菌体+サンプル、および菌体+サンプル+MK で試験し、後方で生育が回復したものを候補サンプルとした。

3. 結果

3-1. ペーパーディスクアッセイ結果

放線菌とカビの培養液、3,200 サンプルについてペーパーディスクアッセイを行った結果、18 のヒットサンプルを得た。この中で、MK 添加によりクリアに生育が回復した No.SF2910 を選抜し、活性本体の精製を行った。

3-2. 活性化区分の単離・生成

No.SF2910 生産菌を 15 ml のシード培地 (スターチ 2.5%, グルコース 2.0%, ポリペプトン 0.7%, 小麦胚芽 0.6%, yeast extract 0.45%, soybean meal 0.3%, Lab-Lemco powder [Merck, Darmstadt, Germany] 0.3%, CaCO₃ 0.2%, pH 7.2, 100 mL フラスコ使用) で 28℃、3 日間培養後、一部を 80 ml の生産培地 (モルトシロップ 4.0%, soybean meal 2.0%, cotton seed meal 1.0%, sungrain F2 0.5%, 大豆油 0.3%, CaCO₃ 0.3%, FeSO₄ 0.001%, CoCl₂ 0.0001%, NiCl₂ 0.0001%, pH 7.2, 500 mL フラスコ使用) に移植し、220 回転、28℃ で 5 日間培養した。培養後、遠心機で菌体を除去後、上清を等量の酢酸エチルで 3 回抽出し、エバポレーターで濃縮した。少量のアセトニトリルで溶解後、逆相の HPLC で分離を行った (カラム: 関東 Mightysil Aqua RP-18 column [250 ×

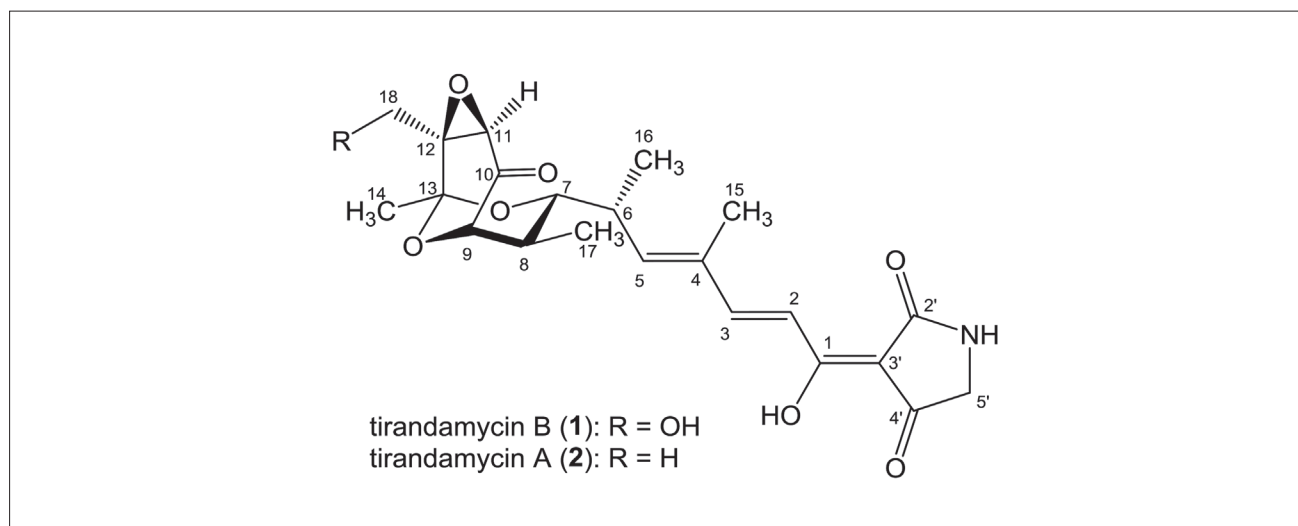


図2 チランダマイシンの構造

4.6 mm] ; 移動相 : 0.1% ギ酸を含むアセトニトリル 37%; 流速 : 1 ml/min; 検出 190–400 nm) 210 nm で検出されたピークを全て分画後、バイオアッセイで活性区分を同定し、繰り返し分離を行うことで最終的に、淡い黄色の結晶 3.9 mg を得た。

本化合物の分子式は、高分解能質量分析により $C_{22}H_{27}NO_8$ と推定された。次いで、NMR (1H と ^{13}C) と二次元 NMR (COSY, HSQC, HMBC) により、最終的に既知化合物である、チランダマイシンと決定した (図 2)。

同様の手法で、aplasomycin と boromycin もフタロシン経路を阻害することを明らかにした。

4. 考察

本新規経路はピロリ・カンピロバクター菌等に特異的な経路であり、乳酸菌など有用な腸内細菌群は既知経路のみを有している。従って、ピロリ菌のように迅速な診断方法が確立されている病原菌であれば、この新規経路の阻害剤を探索することにより、副作用がない有用な抗生物質の開発が期待できる。

今回、その候補としてチランダマイシンを単離・同定した。予備的に、その作用機序を検討した結果、MK の生合成上、ナフトキノン骨格形成後にプレニル側鎖を付加する酵素を阻害していると推定された。チランダマイシンの阻害活性は医薬品として開発できるほど高くはなかったが、本スクリーニング法が目的化合物を取得可能であることを示せた点では意義のある成果と考えられる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団の援助を受けて実施しました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Y. Ogasawara, K. Kondo, A. Ikeda, R. Harada and T. Dairi. Identification of tirandamycins as specific inhibitors of the futasine pathway. *J. Antibiot.* 70, 798-800 (2017).
- 2) Y. Shimizu, Y. Ogasawara, A. Matsumoto, and T. Dairi. Aplasmomycin and boromycin are specific inhibitors of the futasine pathway. *J. Antibiot.* doi: 10.1038/s41429-018-0087-2 (2018).

Screening of compounds specifically inhibiting the new menaquinone biosynthetic pathway

Tohru DAIRI

Graduate School of Engineering, Hokkaido University

Menaquinone (MK) is an essential compound, due to its role as an obligatory component of the electron transfer pathway in microorganisms. In *Escherichia coli*, MK has been shown to be derived from chorismate by eight enzymes, designated as *menA* to *H*. However, we discovered that an alternative pathway, which we named the futasosine pathway, operates in some microorganisms, including *Helicobacter pylori* and *Campyobacter jejuni*, which cause gastric carcinoma and food poisoning, respectively. Since both humans and some useful intestinal bacteria, such as lactobacilli, possess the classical pathway, and MK biosynthesis is essential for microorganism survival, the futasosine pathway is an attractive target for the development of specific anti-*H. pylori* and -*C. jejuni* drugs. In this study, we attempted to obtain such compounds from the culture broth of actinobacteria and fungi.

As test organisms, we used two types of *Bacillus* strains, *Bacillus subtilis* and *Bacillus halodurans*, which possess the classical and futasosine pathway, respectively. Using a paper disk assay, we found that a culture broth of an actinobacterium specifically inhibited the growth of *B. halodurans*. After purifying the active compound and determining its structure, we confirmed that it consisted of tirandamycin A and B. Similarly, aplasmomycin and boromycin were also shown to inhibit the futasosine pathway.