



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部第 186 回例会

若手シンポジウム 農芸化学を支える微生物研究の力

講演要旨集



令和元年 11 月 9 日（土）

信州大学農学部（伊那キャンパス）F 棟 30 番講義室

主催：公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部

共催：信州大学農学部

信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部第 186 回例会
若手シンポジウム 農芸化学を支える微生物研究の力

令和元年 11 月 9 日(土)

信州大学農学部(伊那キャンパス)F 棟 30 番講義室

主催: 公益社団法人 日本農芸化学会中部支部

共催: 信州大学農学部

信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所

プログラム

13:00 - 13:05 開会の辞 支部長 人見清隆(名古屋大学大学院創薬科学研究科)

特別招待講演

13:05 - 13:45 「食品安全を支えるカビ毒研究」
中川博之(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門)

13:45 - 14:25 「ゲノム情報を活用した細菌の生理活性ペプチドの生産」
小谷真也(静岡大学大学院農学領域)

若手フロントランナー特別講演

14:30 - 15:10 「敗血症の重症化を抑えるオリゴ DNA のプライミング効果」
下里剛士(信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所)

15:10 - 15:30 休憩

若手研究者招待講演

15:30 - 16:00 「原核生物の温度適応～リボソーム RNA 遺伝子の G+C 含量に着目して～」
佐藤 悠(大阪大学大学院工学研究科)

16:00 - 16:25 「Latent specialized metabolite producers from bee symbionts in Thailand」
Chompoonik Kanchanabanca(Chulalongkorn University)

16:25 - 16:50 「抗生物質探索源としての昆虫病原性細菌の利用」
今井 優(Northeastern University)

16:50 - 16:55 閉会の辞

17:15 - 18:30 懇親会(信州大学農学部生協食堂)

食品安全を支えるカビ毒研究 中川博之（農研機構食品研究部門）

はじめに

カビ毒（マイコトキシン）とは、カビの二次代謝産物の中でヒトや家畜に毒性を示す物質の総称である。穀類等の農作物に着生したカビが死滅してもカビ毒は残留することが多く、通常の加工調理程度の加熱処理や環境変化では分解・除去が困難である。このため、汚染が問題となるカビ毒については飼料や食品等における濃度基準値が設定されている。フザリウムトキシンは主要穀物である麦やトウモロコシ等において比較的高頻度で汚染が発生するカビ毒である。産生菌であるフザリウム属はその多くが植物病原菌であることが汚染防除を困難なものにしている。温帯気候域に位置するわが国では麦やトウモロコシの栽培期間が雨期と重なるため、フザリウムトキシンによる深刻な汚染が発生することもある。演者らはこれまでに、高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS 法）によるフザリウムトキシン分析に関して、以下の研究を展開している。

主要フザリウムトキシン 5 種の LC-MS/MS 法による一斉分析と妥当性確認^{1,2)}

小麦および大麦を汚染する主要フザリウムトキシン 5 種（デオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ゼアラレノン）について、高速液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法（LC-MS/MS 法）による一斉分析法を開発し、12 機関における室間共同試験による妥当性確認を行った。フザリウムトキシンの一斉分析にはこれまで多くの機器分析手法が報告されているが、その多くは室間共同試験による妥当性確認がなされていない。また、LC-MS/MS 法によるカビ毒分析においては抽出効率のばらつきや夾雑成分によるイオン化への影響がしばしば問題視されるが、本手法では内部標準物質による補正を行うことでこれらの影響を低減できていると思われる。本手法はトリコテセン（タイプ A、B）とゼアラレノンを一斉分析できる室間共同試験による妥当性確認がなされた一斉分析法としては、国内外を通じて最初の例である。

マスクドマイコトキシン（モディファイドマイコトキシン）の検出³⁻⁵⁾

マスクドマイコトキシン（モディファイドマイコトキシンとも呼ばれる）とは、植物体内における代謝や食品の加工調理等によって構造が変化し、汎用的分析法では検出されない（見えない＝masked）状態になったカビ毒の総称である。マスクドマイコトキシンを見逃すことはカビ毒リスクの過小評価につながる恐れがあることから、近年新たな危害要因として注目されている。演者らはマスクドマイコトキシンの検出に高分解能 LC-MS（LC-Orbitrap MS）法を適用し、精密質量を指標としたスクリーニングを行った。その結果、麦試料においてタイプ B トリコテセン（ニバレノール、フザレノン-X）由来、またトウモロコシ試料においてタイプ A トリコテセン（T-2 トキシン、HT-2 トキシン、ネオソラニオール、ジアセトキシシルペノール、モノアセトキシシルペノール）由来のマスクドマイコトキシンを新たに検出した。

おわりに

カビ毒の配糖化は植物の異物解毒作用によって起こるものである。ヒトや動物の体内で異物が代謝や誘導化することで解毒するように、植物が独自にこのような減毒機構を持っていることは学術的に興味深い。欧州食品安全委員会（EFSA）は2014年にカビ毒のヒトへの暴露量を評価する際にはこれらの誘導体による暴露も勘案することが適切であるとしており、その根拠としてその多くが生体内で加水分解されて元のカビ毒を遊離するためであるとしている。今後モディファイドマイコトキシンが我が国でPM-TDI（暫定最大耐容一日摂取量）へ算入されるか否かは不明であるが、カビ毒の適切なリスク評価に資することで食品の安全確保に貢献する、という目標をモチベーションとして関連研究を継続したいと考えている。

謝辞

本講演で示すデータの一部はH20～24年度農林水産省リスク管理型委託プロジェクト（生産工程プロ）で実施した研究の成果である。関係各位に深謝申し上げる。

文献

- 1) Nakagawa, H. et al., Analytical and Bioanalytical Techniques. (online journal) doi: 10.4172/2155-9872.S6-002 (2014).
- 2) 中川博之 和光純薬時報 83(3), 8-10 (2015).
<http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/journal/jiho/pdf/jiho833.pdf>
- 3) 中川博之 日本防菌防黴学会誌 43(8), 369-374 (2015).
- 4) Nakagawa, H. JSM Mycotoxins 66, 21-25 (2016).（日本マイコトキシン学会学術奨励賞 Award Review）
- 5) Boyd, I. *Glucosides: Sources, Applications, and New Research*; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA, 2016（ISBN: 978-1-63485-841-0）（第1章 執筆担当）

＜略歴＞

1994年 早稲田大学理工学部卒業、1999年 早稲田大学理工学部博士後期課程修了、博士（工学）学位取得、1999年 第2736号）、1998-2000年3月 早稲田大学理工学部 助手、2000年4-10月工業技術院（現・産業技術総合研究所）特別技術補助職員、2000年11月-2002年3月 新エネルギー・産業技術総合開発機構産業技術養成技術者（NEDOフェロー）、2002年4月（独）食品総合研究所 重点研究支援協力員（博士研究員）、2004年（独）食品総合研究所 研究員、2015年（国）農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 主任研究員、2016年（国）農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 上級研究員、現在に至る。

＜受賞歴＞

日本マイコトキシン学会学術奨励賞「カビ毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の検出に関する研究」（2015年2月）

＜関心のある分野・抱負＞

「植物病原菌と植物の攻防」、「カビはなぜカビ毒をつくるのか」、等の現象を紐解きたい。

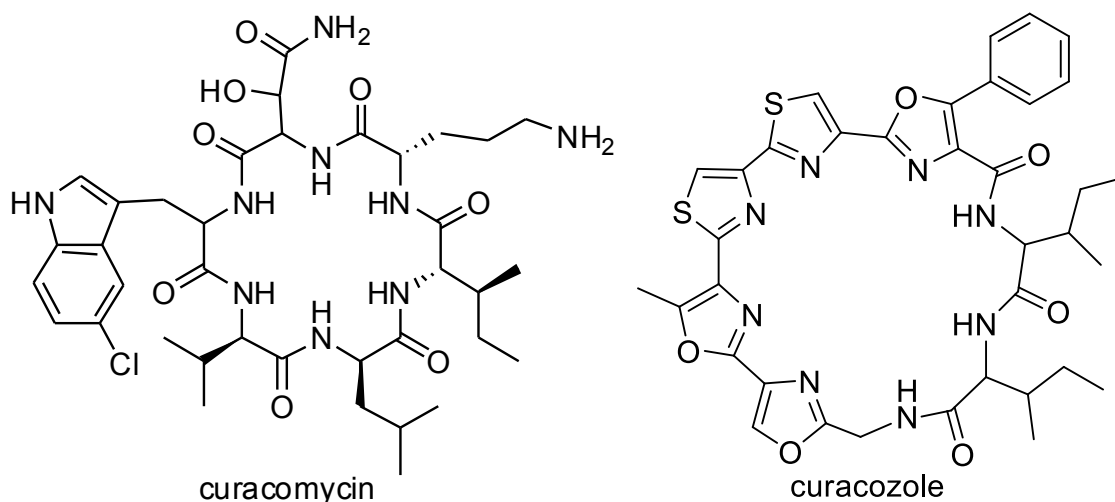
ゲノム情報を活用した細菌の生理活性ペプチドの生産

小谷真也（静岡大学大学院農学領域）

カビや細菌等の微生物は多種多様な生理活性ペプチドを生産することで知られている。それらのペプチドは生産システムによって、大きく分けて2種類になる。非リボソームペプチド（non-ribosomal peptide）もしくは、リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド（Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides）である。近年の次世代シーケンサーによる遺伝子配列の決定技術により、データベースの遺伝子情報が非常に速いスピードで蓄積されつつある。ゲノムマイニングとは、ゲノム情報から生合成に関する情報を検索し、それを実際の有用物質の生産に結び付ける技術である。膨大な遺伝子情報からゲノムマイニングで新規ペプチドを探索する試みが世界中で展開されつつある。発表者は、近年精力的にこの技術を用いたペプチド探索および異宿主生産の研究に取り組んでおり、その成果を発表する。

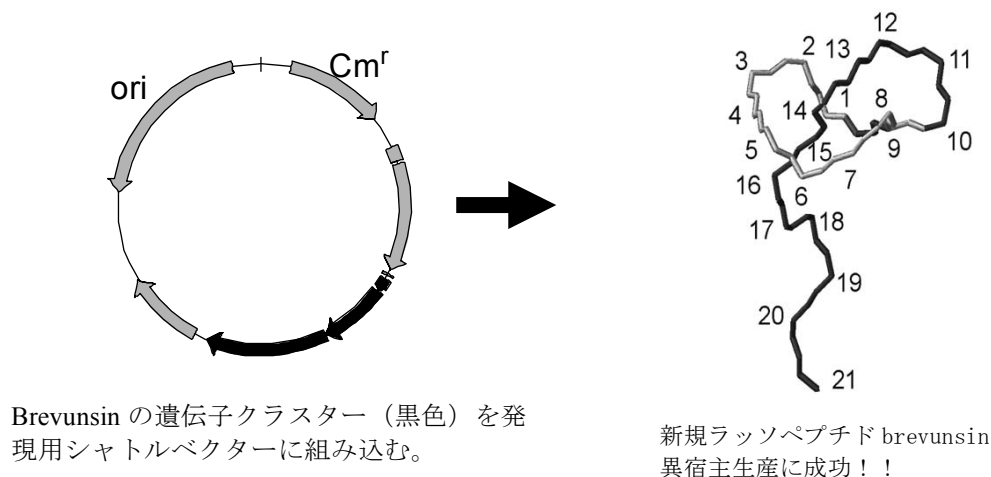
1. ゲノム情報に基づく新規生理活性ペプチドの発見

発表者は、ゲノムマイニングを行い、新規環状ペプチドの発見を行っている。これまでに数々のペプチドの単離・構造決定に成功している。中でも、*Streptomyces curacoii* から2種類の環状ペプチド（curacomycin¹および curacozole²）が発見された。Curacomycin は塩化トリプトファンを含む環状ヘキサペプチドであり、抗菌活性を示した。また、Curacozole はオキサゾールおよびチアゾールを多数構造に含む環状ペプチドであり、強力な細胞毒性およびアポトーシス誘導活性を示した。また、ゲノム情報から、両化合物の生合成遺伝子クラスターの推定を行った。



2. ラッソペプチドの異宿主生産

ラッソペプチドとは細菌によって生産される環状ペプチドであり、N 末端側が環状構造を形成し、C 末端側の直鎖ペプチド部分が輪の中を貫通する特異な構造を有するペプチド分子である。発表者は、ゲノムマイニングに基づいて、新規ラッソペプチドの構造決定に取り組んでおり、数々のラッソペプチドの構造決定に成功している。また、新規ラッソペプチド³の異宿主生産に成功したので詳細を紹介したい。



文献

- 1) I. Kaweewan, H. Komaki, H. Hemmi, S. Kodani, Isolation and structure determination of new antibacterial peptide curacomycin based on genome mining, **Asian Journal of Organic Chemistry**, 6 (12), 1838–1844, 2017
- 2) I. Kaweewan, H. Komaki, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Hosaka, G. Isokawa, T. Oyoshi, S. Kodani, Isolation and structure determination of a new cytotoxic peptide curacozole from *Streptomyces curacoi* based on genome-mining, **Journal of Antibiotics**, 72 (1), 1-7, 2019
- 3) S. Kodani, H. Hemmi, Y. Miyake, I. Kaweewan, H. Nakagawa, Heterologous production of a new lasso peptide brevunsin in *Sphingomonas subterranea*, **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 45 (11), 2018

<略歴>

1997 年東京大学農学部水産学科卒業、1999 年東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻修士課程修了、2002 年東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻博士課程、2003 年 Hofstra 大学(NY, USA) Research Associate、2006 年日本学術振興会特別研究員 PD (農研機構食品総合研究所)、2008 年静岡大学創造科学技術大学院 助教、2016 年静岡大学大学院農学領域 准教授

<受賞歴>

2017 年 8 月 エスベック環境研究奨励賞、2018 年 4 月 長瀬研究振興賞

<関心のある分野・抱負>

バクテリアのゲノムに存在する遺伝子から、未知の二次代謝産物を明らかにしたい。

敗血症の重症化を抑えるオリゴ DNA のプライミング効果

下里剛士（信州大学バイオメディカル研究所）

オリゴ DNA とは

オリゴ DNA (ODN) とは、微生物ゲノム DNA に由来する免疫機能性核酸素材であり、免疫機能に限らず多彩な機能を発揮する核酸配列が次々と見出されている。オリゴ DNA 研究の歴史を紐解くと、1984 年に徳永徹博士によって *Mycobacterium bovis* BCG 由来の DNA による抗腫瘍活性の発見に遡る。その徳永博士らの主張はしばらく受け入れられなかったが、1995 年に、米国の Klinman 博士らのグループによって、大腸菌由来の CpG DNA モチーフ（シトシンとグアニン塩基が並んだ配列）が B リンパ球を活性化するという報告により裏付けられることになる。さらに、2000 年になって CpG DNA の受容体分子として TLR9 が同定されたことで、細菌由来 DNA のもたらす免疫作用について理解が進んだ。現在では、DNA 配列をもとに化学合成した ODN が研究材料として広く利用されており、塩基配列・修飾パターンに加えて、免疫活性の違いにより、Class A (Type D)、B (Type K) および C に分類されている。本講演内容とは別に、私の研究グループでは、注射に頼らない経口ルートからのオリゴ DNA 投与システムの構築を目指しており、オリゴ DNA を有効成分とする経口素材の開発研究を進めている[1]。

敗血症の重症化を抑えるオリゴ DNA の探索

ークラス A CpG-ODN による PAF-アセチルヒドロラーゼの活性化ー

敗血症は、細菌感染に伴う急激な炎症応答と凝血反応が特徴的な感染性疾患であり、重篤な臓器障害を引き起こし、極めて死亡率が高いことが知られている。近年、血小板活性化因子 (PAF) は、炎症応答および血液凝固の両方の誘導に関わることから、敗血症の発症において中心的な役割を果たしていることが報告された。そこで私の研究グループでは、この PAF の分解酵素である PAF-アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) に着目し、PAF-AH の活性化を誘導する ODN の探索に着手した。さらに 2 種類のマウス致死性敗血症モデルを用いて ODN の有効性について検証した。結果として、Class A CpG-ODN (CpG-A) が強力に PAF-AH を誘導することを発見した。また敗血症の特徴である凝血症状に特化した播種性血管内凝固症候群 (DIC) モデルを作出し、CpG-A の予防的投与が PAF-AH の活性化を介して凝血反応を改善し、100%の生存率を維持することを明らかにした。同作用は、敗血症の起因菌となるグラム陰性菌の細胞壁構成成分である LPS により誘導されるエンドトキシンショックモデルにおいても、生存率およ

び低体温症、炎症症状を改善した。すなわち、CpG-A は PAF-AH の誘導および活性化を介して敗血症の重症化を抑えることが示された[2]。

将来展望

本研究により、Class A CpG-ODN が、血小板活性化因子の働きを阻害しつつ、炎症反応を抑制するという効果が明らかとなった。現在、敗血症や敗血症によるショック状態を防ぐための治療薬としては、抗菌薬や血圧を上昇させる昇圧薬が使用されている。また血液凝固が進み、敗血症が重症化して多臓器障害を起こした場合は、血液凝固を抑える薬が用いられている。これらの薬は高額な上に、必ずしも死亡リスクを抑えることが出来ないことが問題となっている。そこで、優れた生存率を示した Class A CpG-ODN と既存の薬剤を併用し、敗血症の初期段階に投与する新たな提案として本研究を位置づけている。本研究成果を踏まえ、より安価な薬剤の開発に繋がることに期待したい。

文献

1. Wang *et al.* Mol Ther, 23(2), 297-309, 2015.
2. Yamamoto *et al.* Front Immunol, 8:1049, 2017.

<略歴>

2001 年 東北大学農学部 卒業、2006 年 東北大学大学院農学研究科 修了・博士（農学）学位取得、2006 年 米国食品医薬局 生物製剤評価研究センター（FDA/CBER）・博士研究員、2007 年 米国国立癌研究所フレデリック（NCI at Frederick）・博士研究員、2007 年 信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・特任助教、2012 年 信州大学農学部・准教授、2019 年 信州大学農学部・教授／信州大学バイオメディカル研究所 生体分子イノベーション部門・部門長（現在に至る）

<受賞歴>

平成 29 年度若手農林水産研究者表彰・農林水産技術会議会長賞（2017 年）
第 14 回日本農学進歩賞（2015 年）

<関心のある分野・抱負>

腸内環境の的確な制御は、ヒトや家畜の健康維持・増進において有力な戦略となり得る可能性が示唆されています。その戦略を打ち立てるためのツールとして、私は古来より哺乳動物と共に歩み、受け継がれてきた腸内に常在するプロバイオティック乳酸菌に注目しています。世界的な長寿エリアである信州を拠点に、腸状態の安定化と健康長寿に寄与する新たな乳酸菌研究の発信と、このことに相乗的に作用する分子素材の創製を目指して研究を行っています。

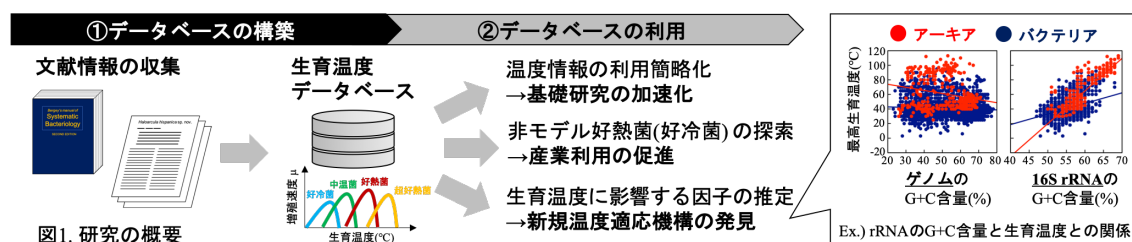
原核生物の温度適応～リボソーム RNA 遺伝子の G+C 含量に着目して～

佐藤 悠（大阪大学大学院工学研究科）

はじめに

「温度」は生物の生育・増殖に関わる重要な因子である。特に、原核生物(バクテリアとアーキア)は、氷点下でも凍結しない南極の塩湖から 100℃を超える深海の熱水噴出孔まで多様な環境から見つかっており、各環境温度に適応している。演者は、「原核生物がどのようにして各生息環境の温度に適応しているのか」に興味を持ち、生育温度に影響を及ぼす因子の特定を目指して研究を進めている(図 1)。

生育温度に影響を及ぼす因子の一例として、原核生物の系統解析に広く用いられるリボソーム RNA(rRNA)が挙げられる。rRNA は、折り畳まれて二次構造を形成し、タンパク質合成の翻訳プロセスを担うリボソームの一部として機能する。rRNA の二次構造を形成する塩基対のうち、グアニン(G)とシトシン(C)との間で水素結合数が最も多い。そのため、塩基配列中に G と C の占める割合(G+C 含量)が高いほど、二次構造の耐熱性も高くなると考えられる。実際に、rRNA の 1 種である 16S rRNA の G+C 含量とアーキアの生育温度との間で高い相関が示されており¹⁾、16S rRNA は生育温度に影響を及ぼす因子である可能性が高い。



原核生物の温度データベースの構築と利用

原核生物の生育温度に影響を及ぼす因子を探索する上で、全原核生物の温度情報は必須である。NCBI Taxonomy database によると 2019 年 10 月現在で未記載種も含めて約 2 万種の原核生物が報告されているが、これらの生育温度情報の包括的な利用は未だに困難である。そこで、演者は最低、至適、最高生育温度の決定されている全原核生物の情報を収集・整理し、生育温度データベースの構築を進めている。また、得られた生育温度とゲノム等の分子情報との相関分析を行い、生育温度に影響を及ぼす因子を推定した。その結果、ゲノムの G+C 含量と生育温度との相関 ($R^2=0.01-0.05$)に対して、16S rRNA

以外の rRNA や一部の tRNA の G+C 含量と生育温度との間で比較的高い相関 ($R^2=0.39-0.85$)が見られた。ゲノムサイズ等の他の因子についても解析を進行中である。

G+C 含量の異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を持つアーキアの温度適応戦略

原核生物の分子情報の収集時に、ゲノム上に塩基配列の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子を有する原核生物を見出した。特に、好塩性アーキア *Haloarcula* 属菌株は、塩基配列が 4-6%異なり、且つ、G+C 含量が 1-3%異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を有している。そこで、G+C 含量と生育温度との関係に着目し、「G+C 含量の異なる 2 種類の 16S rRNA 遺伝子を持つ *Haloarcula* 属菌株はより幅広い温度範囲にて増殖可能である」という仮説を立て、検証した。まず、温度別での 2 種類の 16S rRNA の発現量を調べた結果、高温になるにつれて G+C 含量のより高い 16S rRNA の割合が増加した²⁾。次に、片方の 16S rRNA 遺伝子のみを有する変異株を作製し、さまざまな温度条件下にて培養を行った。その結果、最低生育温付近(25℃)では変異株は野生株よりも顕著に増殖が遅かったが、最高生育温度付近(45-50℃)では G+C 含量の高い 16S rRNA 遺伝子のみを持つ変異株と野生株は概ね同じ速さで増殖した³⁾。結果より、*Haloarcula* 属菌株において、低温では 16S rRNA 遺伝子のコピー数が、高温では G+C 含量の高い 16S rRNA が増殖に重要であることが示唆された。*Haloarcula* 属菌株の生息環境が昼夜で寒暖の差が激しい砂漠の塩湖であることを鑑みると、16S rRNA を用いた環境温度への適応戦略と思われる。

おわりに

本講演では、rRNA の G+C 含量が原核生物の生育温度や各温度での増殖速度に影響を及ぼす可能性を示した。一方、温度データベース構築過程において、rRNA の G+C 含量だけでは説明のつかない温度応答を示す原核生物の存在も確認している。今後も生物の生育温度に影響する因子について研究を進めていき、新たな温度適応機構の発見に繋げたい。

文献

¹⁾ Kimura H. *et al.* Environmental Microbiology Reports 5: 468-474 (2013).

²⁾ Sato Y. and Kimura H. Antonie van Leeuwenhoek 111: 705-716 (2019).

³⁾ Sato Y. *et al.* Frontiers in Microbiology 81: 3869-3879 (2017).

<略歴>2013 年 静岡大学理学部卒業、2015 年 静岡大学大学院理学研究科修了、2018 年 静岡大学創造科学技術大学院自然科学系教育部環境・エネルギーシステム専攻修了（同年 3 月博士（理学）取得）、2018 年より大阪大学工学研究科 特任研究員

<関心のある分野・抱負>「生き物の生育可能な温度を決定する(上で重要な)因子は何か」を解明し、その成果を社会に還元したい。

Latent specialized metabolite producers from bee symbionts in Thailand

Chompoonik Kanchanabanca

(Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University)

Discovering novel natural bioactive compounds has been challenging scientists for almost a century. However, there has been the decline in the antibiotic research as the classical screening methods lead to the frequent rediscovery of the already existing compounds. Many strategies have been employed to reinforce the microbial metabolite research including the identification of the hidden activity of microbial biosynthetic machinery and the search of alternative ecological habitats than soil. *Streptomyces* screening from rare niche, i.e. symbionts of insects, could potentially lead to the discovery of novel bioactive compounds. Bees are highly diverse social insects and considered to play a vital role in pollination of plants in Thailand. There have been a number of actinomycetes isolated from brood cells, hive material and adult bees in the genera *Apis*, *Trigona* and *Tetragonisca* with the ability to produce antimicrobial against bee pathogens^{1,2,3}). However, the studies of their ability to produce bioactive compounds beneficial to human are few.

Forty actinomycetes isolates were obtained from eastern honey bees (*Apis cerana*) and stingless bees (*Tetragonella laeviceps*). Different colony morphologies and antimicrobial activities were observed on various agar media. Most isolates exhibited antimicrobial activity against at least one tested species, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. On the basis of morphology, antimicrobial activity and molecular analysis of 16S rRNA genes, all isolates belong to genus *Streptomyces*, and nine different isolates could be divided into five groups according to their closely related type strains, *Streptomyces andamanensis* KC-112, *Streptomyces fumigatiscleroticus* NBRC 12999, *Streptomyces deserti* C63, *Streptomyces tanashiensis* LMG 20274 and *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475.

Strain I-EHB-18 (*S. andamanensis* KC-112⁴), 99.86%) isolated from *A. cerana* showed broad antimicrobial activity against all tested species. Additionally, the effect of the crude metabolite on preadipocytes cell line 3T3-L1 differentiation was examined. The result showed that crude extracted from I-EHB-18 could inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells at the early stage of differentiation with no acute cytotoxicity⁵). Detailed study revealed that this crude

extract suppressed expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), a master regulator of adipocyte differentiation. This is the first report of bioactive compound possessing anti-adipocyte differentiation activity produced by *Streptomyces* isolated from Eastern honey bees. Furthermore, whole genome sequencing of I-EHB-18 revealed the genome size of 8.8 Mb. Draft genome analysis using antiSMASH illustrated the strain abilities to produce various secondary metabolites including polyketides and non-ribosomal peptides. Hence, The *Streptomyces* spp. isolated from bees could produce various potential bioactive compounds, leaving room for exploration in the future.

References

- ¹⁾Promnuan, Y. *et al.* World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1685-1689 (2009).
- ²⁾Promnuan, Y. *et al.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63, 1896-1901 (2013).
- ³⁾Cambroner-Heinrichs, J. C. *et al.* Microbiology 165: 292-301 (2019).
- ⁴⁾Sripreechasak, P *et al.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66: 2030-2034 (2016).
- ⁵⁾Tangwichai, O. *et al.* the 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference: 1139–1156 (2016).

<Biography>

Chompoonik Kanchanabanca has completed her PhD in 2015 from the Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK. Since 2015, she has been working as a lecturer at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand.

<Award-winning>

Good Dissertation Award, National Research Council of Thailand (2019)

<Research interests>

Enzymology of natural products biosynthetic pathway

Regulation of bioactive compounds production

新たな抗生物質探索源としての昆虫病原性細菌の利用

今井 優 (Antimicrobial Discovery Center, Northeastern University)

はじめに

多剤耐性菌の出現と伝播は大きな社会問題となっている。特に多剤耐性グラム陰性菌への懸念は大きく、2017 年に世界保健機関 (WHO) が公表した“新規抗生物質の開発が急がれる耐性菌リスト”では、*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* および *Enterobacteriaceae* が最上位に挙げられている¹⁾。

これまで抗生物質の探索源としては、放線菌や糸状菌がその主役を担ってきた。一方、近年では既知物質の再単離に終わることも多く、新しい探索源の開拓が大きな課題となっている。昆虫病原性細菌である *Photobacterium* および *Xenorhabdus* 属細菌は、ゲノム中に多くの抗生物質合成遺伝子クラスターを有することが判っており、新たな探索源として注目を集めつつある²⁾。ごく最近我々は、これら昆虫病原性細菌の培養物中から、グラム陰性菌に特異的かつ強力な活性を示す抗生物質を発見した。本公演ではこの成果について紹介したい。

グラム陰性菌に特異的な活性を示す化合物のスクリーニング

22 属 67 株の *Photobacterium* および *Xenorhabdus* 属細菌から調整した培養上清を *Escherichia coli* に対するスクリーニングに供した。その結果、*P. temperata* HGB1456 由来の培養上清が *E. coli* に対して強力な生育阻害活性を示すことを見出した。高速液体クロマトグラフィーにより活性物質を精製後、構造解析に供したところ、この化合物が分子量 965 の新規物質であることが明らかとなった。ダロバクチンと名付けられたこの化合物は、*E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* および *Klebsiella pneumoniae* など代表的なグラム陰性病原菌に対して強い活性を示した [最小生育阻止濃度 (MIC): 2-8 µg/ml]。一方、ダロバクチンはグラム陽性菌やヒト腸内細菌叢において重要な役割を果たすグラム陰性菌 *Bacteroides* 属には活性を持たず、ヒト由来細胞株にも毒性を示さなかった。

ダロバクチンの作用機作

ダロバクチンの標的を明らかにするため、MIC 以下の濃度のダロバクチン存在下で *E. coli* を継代培養し、ダロバクチン耐性変異株 (MIC: >128 µg/ml) を分離した。変異株の全ゲノムを解析したところ、*bamA* 遺伝子に複数の変異を有することを見出した。BamA タンパク質はグラム陰性菌の外膜に存在し、β-バレルタンパク質のフォールディングと外膜への挿入に関与する必須タンパク質である。また興味深いことに、全ての変異点は BamA タンパク質の横方向ゲート上に存在していた。

等温滴定型カロリメトリー分析によりダロバクチンと BamA タンパク質の相互作用を調べたところ、ダロバクチンが確かに BamA タンパク質と結合することが確認され

た。また BamA-ナノディスクを用いた外膜タンパク質のフォールディングアッセイからは、ダロバクチン存在下で BamA タンパク質のフォールディング活性が低下することを見出した。

ダロバクチンの *in vivo* 活性

P. aeruginosa と *E. coli* のポリミキシン耐性変異株、およびカルバペネマーゼ生産 *K. pneumoniae* を用いたマウス敗血症モデルにおいて、ダロバクチンの *in vivo* 活性を評価した。ダロバクチン未投与のグループでは感染後 24 時間で全てのマウスが死んだ一方で、ダロバクチンを投与したグループでは著しい生存率の向上が認められた。また、*E. coli* を用いたモデルから、ダロバクチンの最小有効量が 2.5 mg/kg であることも明らかとなった。加えてダロバクチンは、*E. coli* ポリミキシン耐性変異株を用いたマウス大腿モデルでも病原菌負荷を有意に減少させた。これらの結果は、ダロバクチンがグラム陰性病原菌を特異的に殺すリード化合物として大いに期待できることを示している。

おわりに

昆虫病原性細菌のように、これまで注目されていなかった細菌種にもリード化合物を作る能力が備わっていることが判ってきた。また近年では、Lewis らのグループが iChip (自然環境を模倣した *in situ* 培養器) を用いて、難培養性微生物から新しい抗生物質テイクソバクチンを見つけ出すことに成功している³⁾。これらの事実は、これまで我々が見過ごしてきた、もしくはアクセスできなかった微生物にも、発見を待つ抗生物質が数多く眠っていることを示している。これら微生物の力を借りることができれば、“ポスト抗生物質時代”の到来を遅らせることができるかもしれない。

文献

1. WHO priority pathogens list for research and development of new antibiotics
2. Tobias, N.J. *et al.* Nat. Microbiol. 2:1676-1685 (2017)
3. Ling, L.L. *et al.* Nature. 517:455-459 (2015)

<略歴>

2015 年 9 月 信州大学大学院総合工学系研究科 博士後期課程修了, 博士 (農学)

2015 年 11 月 Northeastern University (ボストン, アメリカ) 博士研究員現在に至る

<受賞歴>

Outstanding Abstract Award. ASM Microbe 2019.

<関心のある分野・抱負>

グラム陰性菌や多剤耐性菌に活性を示す抗生物質のスクリーニングと、新たな難培養性微生物の培養法の確立を目指したい。

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

アサヒビール(株) 名古屋工場	旭松食品(株) 食品研究所	アステラスファーマテック(株) 生産技術部
天野エンザイム(株) 岐阜研究所	イチビキ(株) 研究開発部	(株)伊藤園 中央研究所
伊藤忠製糖(株) 品質保証室	伊那食品工業(株)	科研製薬(株) 生産技術研究所
加藤化学(株) 技術部	カネハツ食品(株) 技術部	(株)岐阜セラック製造所 品質保証部
麒麟ビール(株) 名古屋工場	金印(株) 研究開発部	サンエイ糖化(株)
サンジルシ醸造(株) 生産本部	敷島スターチ(株) 技術開発部	敷島製パン(株)
(株)真誠	新日本化学工業(株) 研究部	太陽化学(株) ニュートリション事業部
大和製罐(株) 総合研究所	竹本油脂(株) 情報調査室	辻製油(株)
デザイナーフーズ(株)	東海漬物(株) 漬物機能研究所	東海物産(株) 研究部
(株)東洋醗酵	東洋紡(株) 敦賀バイオ研究所	中日本氷糖(株)
名古屋製酪(株) 中央研究所	(株)ニッポンジーン	日本食品化工(株) 研究所
フジ日本精糖(株) 研究開発室	物産フードサイエンス(株) 研究開発センター	ポッカサッポロフード &ビバレッジ(株)
三井農林(株) R&D グループ	(株)Mizkan Holdings 中央研究所	名糖産業(株) 食品開発部
盛田(株) 小鈴谷工場	ヤマモリ(株) 桑名工場	養命酒製造(株) 中央研究所

表紙イラスト 内田牧歩

裏表紙写真 北川輝弥



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部第 186 回例会 講演要旨集

令和元年 11 月 9 日 発行

編集発行人：公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部 支部長 人見清隆

名古屋市千種区不老町 名古屋大学東山キャンパス内