〈総 説〉

微生物は新規天然物の宝庫

高橋洋子·中島琢自 北里大学 北里生命科学研究所 創薬資源微生物学 寄附講座

(2018年5月16日受付)

ペニシリン,ストレプトマイシンあるいはエバーメクチン等をはじめとする微生物の生産する天然化合物は医薬,動物薬,農薬等の分野で大きな社会貢献を果たしてきた。これらの生産微生物である放線菌や糸状菌は、その培養液に多様な二次代謝産物を生産することで知られており、これまでに様々な生物活性物質を求めて探索研究がなされてきた。

北里大学 大村創薬グループではこれまでに類縁体を含めて約500の新規化合物を発見してきた。これら生産菌株と探索研究の過程で既知物質と同定された物質の生産菌も含めて北里微生物資源ライブラリーと称し長期保存法により保存してきた。

これら保存菌株の復元培養液と新鮮分離株の培養液から、生産化合物の物理化学的性質、すなわちLC/UVやLC/MSなどを解析し、データベースと照合し、新規と予測された物質の単離精製を進めた。本アプローチをPhysicochemical screeningと称し2011年から現在までに類縁体も含めて35の化合物を発見した。その後、学内外との共同研究により何らかの生物活性を見出している。

ストレプトマイシンの生産菌として凍結乾燥法によって43年間保存されてきた Streptomyces griseus OS-3601株の培養液から、微生物由来では極めて珍しいイミニウムを含む化合物イミニマイシンAを発見した。また、西表島で採取したキンギンソウの根から分離した希少放線菌 Polymorphospora rubra K07-0510の培養液から1分子のトレハロースに2分子のアンジェリカ酸が結合したトレハンジェリンを発見した。本化合物は、細胞保護作用やコラーゲン促進活性等が見出され応用研究に発展している。

我々の結果は、微生物の多様な二次代謝産物生産能力を生かしきれていないこと を示している。

はじめに

2011年に、筆者の一人である高橋が住木・梅澤 記念賞をいただいてから実に6年余りが経過し た。この間、「新規微生物資源の探索」から「新規 化合物の探索」へと研究の軸足を移した。受賞タイトルは「新規生物活性物質探索のための微生物資源の開拓」¹⁾であったが、本稿のタイトルは「微生物は新規天然物の宝庫」とした。これまでも、これに類する表現を様々な場面で用いてきた。それは、"多くの研究者によって様々な微生物から数

表1. 微生物の二次代謝産物からドラーゲンドルフ反応で見出された化合物

化合物	発見年	生産菌	生物活性(年)
ピリンジシン	1973	"Streptomyces griseoflavus" NA-15	抗菌活性 (1973)
NA-337A	1974	Streptomyces sp. NA-377	脂質低下作用 (1974)
TM-64	1975	Thermoactinomyces antibiotics TM-64	角膜反射刺激 (1975)
キノリン-2-メタノール	1976	"Kitasatoa griseophaeus" PO-1227	血糖低下活性 (1976)
ジチロマイシン	1977	Streptomyces sp. AM-2504	抗菌活性 (1977)、翻訳伸長因子 (EF-G) 阻害 (2014)
スタウロスポリン	1977	Lentzea albida AM-2282	抗真菌・抗腫瘍活性(1977)、 血圧低下作用、プロテインキナーゼ阻害(1986)
1,3-ジフェネチルウレア	1978	Streptomuces sp. AM-2498	抗うつ活性 (1978)、脂肪細胞分化促進 (2011)
ハーキュリン	1979	Penicillium herquei Fg-372	血小板凝集阻害 (1996)
ネオキサリン	1979	Aspergillus japonicus Fg-551	チューブリン重合阻害 (1974)
レダクチノマイシン	1981	Streptomyces xanthochromogenus AM-6201	抗腫瘍・抗菌・抗真菌・抗ウイルス活性 (1981)
セスペンドール	2004	Pseudobotrytis terrestris FKA-25	脂肪滴の形成阻害, 抗菌活性 (2006)
スポキサゾマイシン	2011	Streptosporangium oxazolinicum $K07-0460^{\mathrm{T}}$	抗トリペノソーマ (2011)

多くの化合物が発見され、医薬、動物薬、農薬、試薬などで実用化され社会に貢献している"という、 一般的な意味合いで用いてきたものであった。

本稿では、筆者等がこの数年で「微生物は新規天 然物の宝庫」であることを実感した例を紹介した い。北里大学北里生命科学研究所創薬グループ(以 下、大村創薬グループ) は、I. 微生物の分離および 培養関連、II. 微生物代謝産物からの物質探索、III. 有機合成による化合物の適正化、を担う共同研究 体制で新規物質の探索を行っている。IIに於いて は、特定の生物活性を指標に新規化合物を取得し ていく手法 (II-1) と、化合物の物理化学的特性を 指標として新規物質を見いだす方法 (II-2) の2つ のアプローチで探索が行なわれてきた。II-2は、 1970年代初頭より大村 智先生(現 北里大学特 別栄誉教授)の「微生物は無駄な物は作らないはず だ」との強い思いで、ドラーゲンドルフ試薬を用い 含窒素化合物を探索する方法で始められた。表1 に、この方法で発見された化合物を示した。この中 には、現在、生化学試薬として多くの研究者に用い られているスタウロスポリン2)が含まれる。本物質 は、1977年に放線菌 Saccharothrix aerocolonigenes subsp. staurosporeus AM-2282^{T 3)} (現 Lenzea albida AM-2282⁴⁾) の培養液より発見された。発見当初, 抗腫瘍活性や血圧低下作用などが見出されたが. 医薬品までは至らなかった。約10年後に新たにプ ロテインキナーゼ阻害活性が見いだされ、現在、生 化学試薬として使用されている5,60。"スタウロスポ リン"で論文検索すると、ヒット数は10,000件以上 にのぼる。同様に、1977年に発見された環状ポリ ペプチドのジチロマイシンは、発見当初は抗菌活 性のみ知られていたが、発見から37年後翻訳伸長 因子阻害活性が見出され、その生産菌と化合物が 再び利用されている。これらの事例は、 化合物と生 産菌が我々の手中にあれば社会に大きく貢献でき る可能性を示している^{7,8,9,10)}。

近年の分析技術の発展や、データベースの充実

により、菌株の培養液に含まれる化合物をLC/UVやLC/MS等の物理化学的性質を解析することで、新規性を予測することが容易になった。筆者らは、微生物の能力を最大限に引き出そうという大村先生の考えを受け継ぎ、この方法をPhysicochemical screening(PC screening)と称し新規物質の探索を行った。大村創薬グループ共同研究II-2のアプローチである。微生物培養液から新規と予測された化合物を単離精製し構造決定を行い、その後、生物活性を見出すという手法である。スクリーニングの対象とした微生物は、放線菌と糸状菌である。

1. Kitasato Microbial Library (KML)株 および新鮮分離菌株を用いたPC screening

1-1. KML株を用いたPC screening

北里生命科学研究所 大村創薬グループによって、これまでエバーメクチン、スタウロスポリン、ラクタシスチン等500以上の新規化合物が発見されてきた¹¹⁾。これら新規化合物および探索研究の過程で既知物質と同定された物質の生産菌は、Kitasato Microbial Library(KML)と称し凍結乾燥法等によって長期保存されている。最近、このKML株を復元し保存性と物質生産の確認を行う機会があった。その結果、50年近く保存されていた菌株も含めて、放線菌の生存率は99%、糸状菌では97%であった。登録されている化合物の生産性も予想以上に良好なものであった。これらの具体的な結果は別の機会に改めて報告することとする。今回、この復元試験の時の培養液を用いてPC screeningを行った。

PC screeningの方法を概略すると、予め設定しておいた4種類の液体培地で27℃、6日間培養後、当量のエタノールを加え、よく混和し菌体を破砕した後に遠心により上清を回収し、分析試料とした。LC/MSやLC/UV解析後にDictionary of Natural Productや大村創薬グループでこれまでに蓄積し

71—3

微生物の二次代謝産物から化合物の物理化学的特性を指標に見出された物質

	化合物	生産菌	菌株の分離源や由来等	生物活性(年)	参考文献
-	トレハンジェリン (A~C)	Polymorphospora rubra K07-0510	キンギンソウの根(西表島)	脂質過酸化反応阻害 (2013) コラーゲン生成促進 (2014)	J Antibiot, 66: 311 (2013)
2	マングロマイシン (A~I)	Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216	マングローブ林堆積泥 (西表島)	抗トリパノソーマ (2011) 抗酸化 (2013)	J Antibiot. 67: 253 (2014) J Antibiot. 67: 533 (2014) J Antibiot. 68: 220 (2015)
c	アクチノアオライド (A~E)	Actinoallomurus fulvus MK10-036 A. fulvus K09-0307	植物の根 (唐辛子の一種、タイ) ジャノヒゲの根 (埼玉県)	抗トリパノソーマ (2011)	Org Lett. 17: 864 (2015)
4	ナナオマイシン F, G & H	"Streptomyces rosa subsp. notoensis" OS-3966	*KML(Nanaomycin 生産菌、 七尾市土壌、39 年間保存)	H; 上皮間葉転換誘導細胞 の増殖阻害(2016)	J Biosci Bioeng. 120: 596 (2015) J Biosci Bioeng. 123: 765(2017)
5	K10-0126 KA & KB	Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216	マングローブ林堆積泥 (西表島)	脂質蓄積抑制(2014)	J Antibiot. 68: 348 (2015)
9	イミニマイシン A&B	Streptomyces griseus OS-3601	KML(Streptomycin 生産菌として43 年間保存)	抗細菌 (2015)	J Antibiot. 69: 611 (2016) Tetrahedron Lett. 57: 3284 (2016)
7	サガミラクタム	Actinomadura sp. K13-0306	土壌(神奈川県)	抗トリパノソーマ、細胞毒性 J Antibiot. 69: 818 (2016) (2015)	J Antibiot. 69: 818 (2016)
∞	ビスオキサゾロマイシン	Streptomyces subflavus subsp. irumaensis AM-3603	KML (Irumamycin 生産菌として 36 年間保存)	抗細菌 (2016)	J Antibiot. 70: 1142 (2017)
6	ムミアマイシン	Mumia sp. YSP-2-79	海洋、スポンジ (鹿児島県)	抗細菌、抗酸化(2017)	JGAM. 64: 62 (2018)
10	ピリゾマイシン A&B	Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216	マングローブ林堆積泥 (西表島)	抗細菌(2016)	J Antibiot. 71: 606 (2018)
=	ジピリマイシン A&B	Amycolatopsis sp. K16-0194	土壌、月桃の根元 (沖縄) エルゴステロールカラム	抗細菌 (2018)	J Antibiot. 71: 535 (2018)
12	ハムラマイシン A&B	Allostreptomyces sp. K12-0794	シダ植物の根	抗細菌(2018)	J Antibiot. (doi.org/10.1038/s41429-018-0055-x)
13	サルコポディノール A&B	Sarcopodium sp. FKJ-0025	深海(200 m)の堆積物、 ワカミコ カルデラ(鹿児湾)	抗細菌 (2018)	Biosci. Biotech.Biochemi. (doi.org/10.1080/09168451.2018.1467264)

*KML; Kitasato Microbial Library

てきたデータベース等に照らし合わせて新規性を 予測して単離精製後、構造決定を行った。

2011年から開始して現在までに、この方法で見出された化合物を表2に示した。報告した年代順に化合物名、生産菌株とその由来、生物活性、公表した学術誌が記載されている。KML株には、発見された当初の化合物と保存期間を記した。類縁体も含めると35の新規化合物を見出した。

KML株からは、ナナオマイシン類(表 2、No. 4(後述)) 12,13 、イミニマイシン類(表 2、No. 6(後述)) $^{14,15)}$ およびビスオキサゾロマイシン(表 2、No. 8) $^{16)}$ が見出された。ナナオマイシン類およびイミニマイシン類については後述するように、それぞれ PC screening の手法を取り入れたことによって発見された化合物と言える。

1-2. 新鮮分離株を用いたPC screening

新鮮分離株として,植物の根,マングローブ林 の堆積物,深海等から分離された放線菌および糸 状菌を対象にした。

一般の土壌を用いた放線菌の分離では、 Streptomyces属の菌株が多く分離されるが、植物 の根の内部から放線菌を分離すると、約80%が Streptomyces 属以外の放線菌、いわゆる希少放線 菌であり¹⁷⁾, 分類上も興味深い菌株が多く, 現在 までに2新属,7新種を提唱している¹⁷⁾。これら の菌株から Polymorphospora rubra K07-0519株 の生産するトレハンジェリン類 (表2, No.1 (後 述)) ^{18,19)} や Actinoallomurus fulvus MK10-036 およ びK09-0397の生産するアクチノアロライド類 (表2, No. 3)²⁰⁾ が見出された。表2, No. 12に示 したハムラマイシン類は、シダ植物の根から分離 された放線菌 Allostreptomyces sp. K12-0794の培 養液から見出された。本属における化合物生産例 は初めてで、22員環マクロライド構造の化合物で ある²¹⁾。ドラーゲンドルフ反応で見出されたスポキ サゾマイシン(表1)も、沖縄県、西表島で採取した キンギンソウの根から分離された Streptosporangium 属の新種, Streptosporangium oxazolinicum K07-0460^T の培養液から発見された ^{22,23)}。

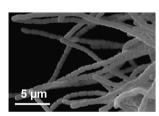
表2のNo. 2, No. 5 およびNo. 10 に示したマングロマイシン類 24,25,26 9類縁体,K10-0216KA&KB $^{27)}$ およびピリゾマイシン類 $^{28)}$ 計13 化合物は西表島のマングローブ林堆積物から分離された希少放線菌 Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216から見出された。1 菌株で,しかも同じ培養液から発見された点で興味深い(後述)。

以下に、KML株から発見されたナナオマイシン類 (表2, No. 4) およびイミニマイシン類 (表2, No. 6), 希少放線菌から見出されたトレハンジェリン類 (表2, No. 1), 希少放線菌 *L. aerocolonigenes* K10-0216 の同一培養液から見出された化合物 (表2, No. 2, No. 5 および No. 10) について詳細に述べる。

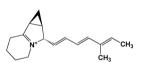
2. KML 株 "Streptomyces rosa subsp. notoensis" OS-3966の生産するナナオマイシンF, G, H^{12,13)}

能登半島の七尾市の土壌から分離された "Streptomyces rosa subsp. notoensis" OS-3966 (図1) の生産するナナオマイシンA~E (図1)^{29,30,31)} は抗 マイコプラズマ物質として1974年に発見されたナ フトキノン骨格を有する抗生物質である。ナナオマ イシンAは、牛の皮膚糸状菌症の治療薬として開 発され動物用医薬品として現在も用いられてい る32)。その構造上の特徴から、本物質がセミキノン ラジカルとなり酸素と反応して活性酸素を発生す る。この活性酸素がDNAに損傷を与え、抗細菌や 抗糸状菌活性を示す。今回、このナナオマイシン生 産菌の凍結乾燥復元時の培養液を用いてPC screeningを行ったところ m/z 805を示す新規物質 が含まれていることが分かった。各種クロマトグラ フィーにより単離精製した結果, 類縁体も含めて3 種類の新規物質ナナオマイシンF, G, H (図1) を得

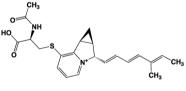
図1. ナナオマイシン、イミニマイシン、トレハンジェリン、マングロマイシン、K10-0216 KA、 KB およびピリゾマイシンの生産菌と各化合物の構造



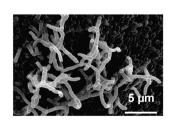
S. griseus OS-3601



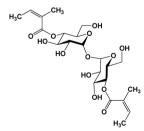
イミニマイシンA



イミニマイシン B



Polymorphospora rubra K07-0510

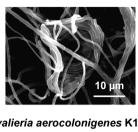


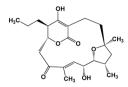
トレハンジェリンA

トレハンジェリンB

トレハンジェリンC

図1. 続き

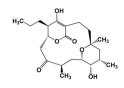




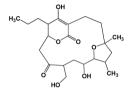
マングロマイシンA

マングロマイシンB

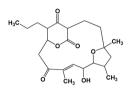
Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216



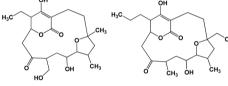
マングロマイシンC



マングロマイシン D

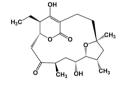


マングロマイシンE

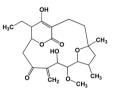


マングロマイシンF

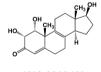
マングロマイシンG



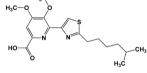
マングロマイシンH



マングロマイシンI



K10-0216 KA



ピリゾマイシン A



K10-0216 KB

ピリゾマイシン B

- 1) 生産菌は寒天培地に生育したコロニーの走査型電子顕微鏡写真を示す。
 - ・"S. rosa subsp. notoensis" OS-3966, S. griseus OS-3601 および Polymorphospora rubra K07-0510: 胞子連鎖
 - · Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216: 疑似胞子のう
- 2) マングロマイシン、K10-0216 KA, KB およびピリゾマイシンは、同一の培養液より発見された。

ることができた。これら3化合物には、抗細菌、抗 糸状菌活性は見られなかった。その理由は、キノン 骨格の4a位と10a位の2重結合が還元され、セミキ ノンラジカルが形成されないことによると思われ

る。これら化合物の発見後, 共同研究等で様々な生 物活性を調べたところ上皮間葉転換誘導細胞の増 殖抑制効果が見出された³³⁾。上記の結果は、ナナオ マイシンA~E発見当初の抗菌活性による生物活 性評価では検出されない化合物をPC screeningによって発見できたことを示している。また、ナナオマイシンA~Eの生産培地はグリセロールときな粉を主成分とする培地^{29,30)}であるが、今回、見出されたナナオマイシンF~Hは、可溶性デンプンと脱脂小麦胚芽を主成分とする培地^{12,13)}で見出された。培地組成を変えることによって、さらなる新規化合物発見の可能性を示唆している。

3. KML 株 Streptomyces griseus OS-3601の生産するイミニマイシンA, B^{14,15)}

OS-3601 株は1981年に熊本県阿蘇の土壌より 分離され、翌年の1982年に、ストレプトマイシン 生産菌として凍結乾燥により長期保存され Streptomyces griseus と同定されていた菌株 (図1) である。43年間長期保存され、今回の復元調査時 の培養液1.200の中で1サンプルのみに検出され たm/z 242の化合物に注目し単離精製を進め、新 規化合物イミニマイシAおよびB(図1)を得た。 イミニマイシAはイミニウムイオンを持つイン ドリジン化合物、イミニマイシンBはピリジニウ ムイオンを持つ化合物であり、分子内にイミニウ ムイオンを有する化合物は植物や海綿から数例知 られているが、微生物代謝産物では珍しい例とな る。本物質はグラム陽性菌、陰性菌に抗菌活性を 示す。1943年に、Selman A. Waksman が S. griseus の二次代謝産物からストレプトマイシンを発見し て以来、S. griseusと同定された菌株から約200の 化合物が報告されている34)。そして、ゲノム解析 も進んでいる。土壌試料からの放線菌分離の際に も, 最も高頻度に出現してくる種である。放線菌 の中でも研究し尽くされているように見受けられ る S. griseus で、しかもストレプトマイシンの生 産菌から新規物質が見出されたことは驚きである とともに、微生物の能力の奥深さを思い知らされ た。本化合物の単離精製に着手する前に、担当者が本菌株培養液のHPLCチャートとLC/MSのデータを提示し、この物質を単離精製するつもりである、と告げてきた時、なぜ S. griseus で、しかもストレプトマイシンの生産菌を選択するのかと尋ねたら、"新規物質であると思われるから"、との返答であった。まさに、その通りになった。

後になって、ゲノム情報からも本物質の生産は 予測できたとのことであるが、なぜ、これまで発 見されなかったのか。それは、化合物が不安定で あること、生産性が低いこと、また、大量に生産 している非水溶性抗菌物質サイクロヘキシミドと HPLC上でピークが重なり合っていること等によ ると考えられる。研究者の探究心と技術、機器類 の進歩がうまく饗宴しあって成し得た成果である と考える。まさに、冒頭で記載した大村先生のこ とば「微生物は無限の資源」「微生物の研究は始 まったばかり」を実感した。

4. 植物由来希少放線菌 *Polymorphospora* rubra K07-0510 の代謝産物から見出 された新規物質トレハンジェリン ^{18,19)}

沖縄県西表島で採取したキンギンソウの根から 分離された Polymorphospora rubra K07-0510(図 1)の培養液に、216 nmに極大吸収波長を示す m/z 507の新規と予測されるピークを見いだし、単離精 製を進めた。構造解析を行ったところ、1分子のト レハロースに2分子のアンジェリカ酸が結合した 物質であることが分かり、トレハンジェリンA、B、 Cと名付けた(図1)。主生産物質であるトレハン ジェリンAは、アンジェリカ酸がトレハロースの3、 3'位、類縁体であるBおよびCは、それぞれ3、2'位、4、4'位に結合している。物質単離後に、各種生 物活性を調査したところトレハンジェリンAとC に光酸化による赤血球の溶血反応阻害活性がある ことが分かった。同様の作用が知られているアス コルビン酸と比較し強い活性であった。その後、 細胞保護作用やコラーゲン生産促進活性があることが分り、現在、企業と共同で開発研究中である。 アンジェリカ酸はアロマテラピーに用いられる カモミールのエッセンシャルオイル成分として有 名で、植物成分としてよく知られている物質であ るが、微生物が生産する例は極めて珍しい。植物 の根から分離された放線菌がアンジェリカ酸を生 産したことは興味深い。

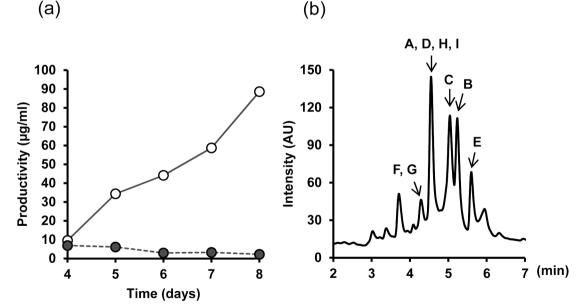
5. Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216の生産するマングロマイシン A~ $I^{24,25,26)}$, K10-0216 KA & KB $^{27)}$, およびピリゾマイシンA & $B^{28)}$

Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216 (図 1)

は、2011年に西表島のマングローブ林の堆積泥から分離された希少放線菌である。本菌株の培養液から基本骨格の全く異なる3種類の新規化合物、類縁体を含めると13化合物を発見した(図1)。

汽水域に生育するマングローブ林には多様な微生物が生息し、希少放線菌が多く分離されることが知られている³⁵⁾。西表島のマングローブ林堆積泥5試料から65株の放線菌を分離した。16S rDNA部分塩基配列による簡易同定を行なったところ、Micromonospora属が44株、次いでActinomadura属、Verrucosispora属と、希少放線菌が83%を占めた。これら希少放線菌の培養液を用いPC screeningを行った。Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216の培養液中にマングロマイシンAおよびBと名付けたそれぞれ分子量410あるいは392、極大吸収波長251 nmあるいは236 nmを示す新規性が予測され

図2. Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216によるマングロマイシン生産培地の検討とHPLC分析



- (a) 培地検討による生産性 (マングロマイシンA換算による)
 - ●: 基本培地; 2.0% 可溶性でんぷん, 1.0% 脱脂小麦胚芽, 0.5% グリセロール, 0.3% 乾燥酵母, 0.5% 肉エキス, 0.5% CaCO₃ ○: 改良培地; 5.0% 可溶性でんぷん, 1.0% 脱脂小麦胚芽, 0.5% グリセロール, 1.0% 乾燥酵母, 0.5% CaCO₃
- (b) マングロマイシン類のHPLC分析

カラム: MonoBis (3.2×150 mm, Kyoto Monotech Co., Ltd, Kyoto, Japan)

移動相: A; 0.1% formic acid/H₂O, B; 0.1% formic acid/MeOH

条件: 0-10 min, B; 5-100%, 40°C

流速: 0.5 mL/min 検出: 254 nm

る生産物質を含んでいることが分かった。しかし、 本菌株のジャーファーメンター培養ではこれらの ピークは得られず、目的物質を得るために500ml 容量の三角フラスコに100ml仕込みで、15Lの培 養液から単離精製を行った。構造解析により、5.6-ジヒドロ-4-ヒドロキシ-2-ピロン環とテトラヒドロ フラン環を含むサイクロペンタデカン骨格のユ ニークな構造であることが分かった(図1)。両物質 は抗トリパノソーマ活性を有し、特許出願を行っ た。その後、本物質の大量取得のために生産培地の 検討を行ったところ、培地成分中の可溶性でんぷ んの濃度を2.0%から5.0%, 乾燥酵母0.3%を1.0% にすることでマングロマイシン A 換算 0.24 μg/ml か ら88.6 µg/mlと生産量が飛躍的に増大した(図2a)。 この条件における10Lの培養液中には多くの類縁 体(図2b)が含まれることが分かった。それぞれ単 離精製、構造決定を行った。結果として、類縁体9 化合物を得ることができた (図1)¹⁰⁾。新たにDPPH ラジカル消去活性が見いだされるとともに、特に I物質はNO消去活性が高いことが分かった10)。

さらに、同じ培養液から、3T3-L1脂肪細胞の脂質蓄積抑制活性を有するステロイド骨格を含むテルペン系化合物K10-0216KAおよびKB²⁷⁾およびグラム陽性および陰性菌に対し抗菌活性を示すピリゾマイシンAおよびB²⁸⁾と名付けたチアゾールとピリジン環を有する新規化合物を見出した(図1)。1菌株の1培養液からこのように骨格の異なる3化合物、類縁体を含めて13化合物が見いだされた。

まとめ

本報告では、北里大学北里生命科学研究所大村 創薬グループで2011年から2017年までの間に PC screeningで見いだされた微生物由来の化合物 を表2にまとめ、その中の長期保存菌株(KML) から2例、新鮮分離希少放線菌から2例を紹介し た。4例とも放線菌由来であるが、表2に示したサ ルコポディノール (表 2, No. 13)³⁶⁾ は、深海由来 糸状菌の培養液から見出された。今後、糸状菌に も精力的に取り組んでいく予定であり、多くの新 規化合物が発見できるものと考えている。

D. J. Newman³⁷⁾ らによると1981年から2014年の34年間に米国食品医薬品局 (FDA) で認可された1,211の低分子医薬品のうち、天然物あるいはそれをヒントにして創られた化合物は、65%を占めており、本報告では天然物探索の重要性が指摘されている。さらに技術の発達により、多くの化合物が有機合成に成功しているにもかかわらず、合成で創られる化合物は、微生物が生み出す天然化合物の独創性には及ばないとの報告もある³⁸⁾。

J. Berdy³⁸⁾ によると、1940年から2010年までの70年間で33,500の化合物が微生物の代謝産物から発見され、その中の10,800は、2,000年からの10年間で発見されている。生産微生物でみると、全体の約41%が放線菌由来である。

K. Tiwari & R. K. Gupta³⁹⁾ がいわゆる希少放線菌から発見された化合物についてまとめており、新規物質の探索源として興味深いと述べている。また、R. Pozzi等は、希少放線菌である Actino allomurus 属の菌株は二次代謝産物生産能力が高いと報告している⁴⁰⁾。我々も、表2に示したアクチノアロライド(表2、No. 3) $^{20)}$ を Actino allomurus fulvus K09-0307から見いだしている。本報告では割愛したが、この菌株の二次代謝産物から新規化合物4、既知化合物7を単離あるいは同定している。

微生物は人間が予想もしなかった構造を我々の目の前に見せてくれる。マングロマイシン(図1)は、その構造のユニークさから有機合成の分野でも興味が持たれ、マングロマイシンAの全合成が、30ステップを経て達成されている⁴¹⁾。著者の一人、高橋は大村創薬グループに所属し、長年微生物資源の開拓(テーマI)を担当してきたが、この数年、本稿で述べたように物質探索のテーマII-2に関わってきて「微生物は新規天然物の宝庫」

であることを実感することができた。

近年,天然物探索が見直され,再び微生物由来の新規化合物の探索が注目されている⁴²⁾。別府輝彦先生は,「化学と生物」の大村 智博士ノーベル生理学・医学賞受賞記念特集号で,"膨大な情報から目的機能をもった医薬品を設計しようとする現在の戦略は,既知情報から出発する「設計」であり,生物圏最大の多様性を有する微生物から新しいモノを探す「探索」は,新しい原理や概念を導きだす可能性がある",として探索研究の重要性を述べられている⁴³⁾。

また、大村 智先生は、2015年のノーベル生理学・医学賞受賞記念講演会で、エバーメクチンの発見の経緯やその効果についてお話されるとともに、「エバーメクチンは大地からの贈り物であり、微生物は無限の資源だ」とおっしゃった^{44,45)}。また、他の様々な講演会などで、「我々の問題の応えは自然の中にある」「微生物は十分に研究されていませんし、見方によっては微生物の研究は始まったばかりと思っています。微生物は地球のあらゆる天変地異に耐え、今日まで生き残った。微生物から学ぶことがいっぱいある」とおっしゃっている。

ゲノム解析により菌株によっては30以上の二次代謝産物生合成遺伝子を持っていることが報告されており、我々の結果は当然のこととも言える。しかし、予測されていることと、実際に新規化合物を手の中に取得していることには大きな開きがある。上述したように、化合物があれば新たな活性が見つかり社会に貢献できる道が開ける。また、その生産菌が保存されていることが重要であり、見落とされてきた能力を新たに発見できる可能性を秘めている。

菌株の遺伝子解析により得られる情報や遺伝子操作等に加え、PC screeningによるアプローチとこれまで蓄積してきたデータベースを駆使することによって新規化合物発見も飛躍的に高まると考える。

謝辞

本稿で報告したPC screening は、(公財)発酵研究所の寄附講座である北里大学 北里生命科学研究所 創薬資源微生物学研究室で行われたものであり、ここに深く感謝申し上げます。また、この研究は、大村 智先生の終始変わらぬご指導とご支援によってなされたものであり、改めて心より感謝申し上げます。また、大村創薬グループの皆様、特に微生物資源でお世話になりました松本厚子博士、野中健一博士に感謝申し上げます。PC screeningによる新規化合物の探索をともに遂行してくださった、稲橋佑起博士、松尾洋孝博士、須賀拓弥博士と多くの学生諸氏に感謝申し上げます。

利益相反自己申告

申告すべきものなし

[この総説は2011年度住木・梅澤記念賞受賞者 高橋洋子博士が受賞後の研究をまとめたものです。]

参考文献

- 1) 高橋洋子: 住木・梅澤記念賞受賞講演記録, 新規生物活性物質探索のための微生物資源の 開拓。Jpn J Antibiot. 2011; 65: 135–45.
- Ömura S, Iwai Y, Hirano A, et al.: A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin. J Antibiot. 1977; 30: 275–82.
- Takahashi Y, Shinose M, Seino A, Iwai Y, Ömura S: Transfer of staurosporine-producing strain *Streptomyces staurosporeus* AM-2282 to the genus *Saccharothrix* as, *Saccharothrix* aerocolonigenes (labeda 1986) subsp. staurosporeus subsp. nov. Actinomycetologica 1995; 9: 19–26.
- 4) Xie Q, Wang Y, Huang Y, Wu Y, Ba F, Liu Z: Description of *Lentzea flaviverrucosa* sp. nov. and transfer of the type strain of *Saccharothrix* aerocolonigenes subsp. staurosporea to *Lentzea* albida. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 1815–20.

- Ömura S, Sasaki Y, Iwai Y, Takeshima H: Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. J Antibiot. 1995; 48: 535–48.
- Nakano H, Ōmura S: Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine. J Antibiot. 2009; 62: 17–26.
- 7) 高橋洋子: 放線菌の創薬資源としての多様性: 希少放線菌代謝産物からの物理化学的性質を優先した物質探索。バイオサイエンスとインダストリー2012; 72: 135-45.
- 8) 高橋洋子: 微生物由来の天然物探索の底知れ ぬ魅力。化学と生物2016; 54: 10-6.
- 9) 高橋洋子: 微生物は無限の資源。生物工学会 誌2016; 94: 383-6.
- Nakashima T, Takahashi Y, Ōmura S: Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening. Biochem Pharmacol. 2017; 134: 42–55.
- 11) Splendid gifts from microorganisms-The achievements of Satoshi Ōmura and collaborators. Ed. Satoshi Ōmura. 2015; Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Tokyo (5th edition).
- 12) Nakashima T, Boonsnongcheep P, Kimura T, *et al.*: New compounds, nanaomycin F and G, discovered by physicochemical screening from a culture broth of *Streptomyces rosa* subsp. *notoensis* OS-3966. J Biosci Bioeng. 2015; 120: 596–600.
- 13) Nakashima T, Kimura T, Miyano R, *et al.*: Nanaomycin H: A new nanaomycin analog. J Biosci Bioeng. 2017; 123: 765–70.
- 14) Nakashima T, Miyano R, Iwatsuki M, *et al.*: Iminimycin A, the new iminium metabolite produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. J Antibiot. 2016; 69: 611–5.
- 15) Nakashima T, Miyano R, Matsuo H, *et al.*: Absolute configuration of iminimycin B, the new indolizidine alkaloid from *Streptomyces griseus* OS-3601. Tetrahedron Lett. 2016; 57: 3284–6.
- 16) Koomsiri W, Inahashi Y, Kimura T, et al.: Bisoxazolomycin A: a new natural product from 'Streptomyces subflavus subsp. irumaensis' AM-3603. J Antibiot. 2017; 70: 1142–5.

- 17) Matsumoto A, Takahashi Y: Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. J Antibiot. 2017; 70: 514–9.
- 18) Nakashima T, Okuyama R, Kamiya Y, *et al.*: Trehangelins A, B and C, novel photo-oxidative hemolysis inhibitors produced by an endophytic actinomycete, *Polymorphospora rubra* K07-0510. J Antibiot. 2013; 66: 311–7.
- 19) Inahashi Y, Shiraishi T, Palm K, *et al.*: Biosynthesis of Trehangelin in *Polymorphospora rubra* K07-0510: identification of methabolic pathway to angelyl-CoA. Chem Bio Chem. 2016; 17: 1442–7.
- 20) Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, et al.: Actinoallolides A-E, New anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, Actinoallomurus fulvus MK10-036. Org Lett. 2015; 17: 864–7.
- 21) Suga T, Kimura T, Inahashi Y, *et al.*: Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12–0794. J Antibiot. doi.org/10.1038/s41429-018-0055-x
- 22) Inahashi Y, Matsumoto A, Ōmura S, Takahashi Y: *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. J Antibiot. 2011; 64: 297–302.
- 23) Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, *et al.*: Spoxazomicins A-C, novel antitrypanosomal alkaloids produced by an endophytic actinomycete, *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460^T. J Antibiot. 2011; 64: 303–7.
- 24) Nakashima T, Iwatsuki M, Ochiai J, et al.: Mangromicins A and B: structure and antitrypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216. J Antibiot. 2014; 67: 253-60.
- 25) Nakashima T, Kamiya Y, Iwatsuki M, Takahashi Y, Ōmura S: Mangromicins, six new antioxidative agents isolated from a culture broth of the actinomycete, *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. J Antibiot. 2014; 67: 533–9.
- 26) Nakashima T, Kamiya Y, Iwatsuki M, Sato N,

- Takahashi Y, Ōmura S: Mangromicin C, a new analog of mangromicin. J. Antibiot. 2015; 68: 220–2.
- 27) Nakashima T, Kamiya Y, Yamaji K, et al.: New steroidal compounds from an actinomycete strain, Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216. J Antibiot. 2015; 68: 348–50.
- 28) Kimura T, Inahashi Y, Matsuo H, *et al.*: Pyrizomicin A and B: Structure and bioactivity of new thiazolyl pyridines from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. J Antibiot. (*in press*, doi: 10.2323/jgam.2017.06.004)
- 29) Ōmura S, Tanaka H, Koyama Y, Oiwa R, Katagiri M: Nanaomycins A and B, new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. J Antibiot. 1974; 27: 363–5.
- 30) Tanaka H, Marumo H, Nagai T, Okada M, Taniguchi K: Nanaomycins, new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. III. A new component, nanaomycin C, and biological activities of nanaomycin derivatives. J Antibiot. 1975; 28: 925–30.
- 31) Kasai M, Shirahata K, Ishii, *et al.*: Structure of nanaomycin E, a new nanaomycin. J Antibiot. 1979: 32: 442–5.
- 32) Kitaura K, Araki Y, Marumo H: The therapeutic effect of nanaomycin A against experimental *Trichophyton mentagrophytes* infection in guinea pigs (author's transl). Jpn J Antibiot. 1980; 33: 728–32.
- 33) Ōmura S, Takahashi Y, Nakashima T, Matsumoto A, Nakanishi J, Matsuo H: Epithelial-mesenchymal transition induced cell proliferation inhibitor, *Patent*, PCT/ JP2017/034819
- 34) Takahashi Y: Continuing fascination of exploration in natural substances from microorganisms. Biosci Biotech Biochem. 2017; 81: 6–12.
- 35) Azman A.S, Othman I, Velu S.S, Chan K.G, Lee

- L.H: Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. Front Microbiol. 2015; 20: Article 856.
- 36) Matsuo H, Nonaka K, Nagano Y, et al.: New metabolites, sarcopodinols A and B, isolated from deep-sea derived fungal strain Sarcopodium sp. FKJ-0025. Biosci Biotech Biochem. (in press)
- 37) Newman D.J, Cragg G.M: Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod. 2016; 79: 629–61.
- 38) Bérdy J: Thought and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. J Antibiot. 2012; 65: 385–95.
- 39) Tiwari K, Gupta R.K: Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. Crit Rev Biotech. 2012; 32: 108–32.
- 40) Pozzi R, Simone M, Mazzetti C, *et al.*: The genus *Actinoallomurus* and some of its metabolites. J Antibiot. 2011; 64: 133–9.
- 41) Takada H, Yamada T, Hirose T, *et al.*: Total synthesis and determination of the absolute configuration of naturally occurring mangromicin A, with potent antitrypanosomal activity. Org Lett. 2017; 19: 230–3.
- 42) 藤江昭彦: 天然物からアカデミア発の医薬品 を生み出すために。化学と生物 2016; 54: 43-7.
- 43) 別府輝彦: 大村先生, ご受賞おめでとうございます。 化学と生物 2016; 54: 3.
- 44) The Nobel Assembly at Karolinska Institute, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015 (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/prize_awarder/)
- 45) Satoshi Ōmura-Nobel Lecture: "A Splendid Gift from the Earth: The Origins and Impact of Avermectin". Nobelprize.org. (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/omura-lecture.html)

Microorganisms are an inexhaustible gold mine of new natural compounds

Yōko Takahashi* and Takuji Nakashima

Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, 5–9–1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo, Japan

Natural compounds produced by microorganisms have greatly contributed to the improvement of human health. Actinomycete and fungal strains are known to produce various secondary metabolites in their culture broths. The Kitasato Ōmura-Drug Discovery Group has found over 500 new compounds from these microorganisms. The production strains have been preserved by a long-term preservation method as Kitasato Microbial Library (KML).

The physicochemical properties of compounds produced by the preserved strains and fresh isolates were analyzed, and compared with a database. Subsequently, predicted new compounds were purified from culture broths and their structures were determined by NMR and MS. 35 compounds have been discovered by this approach, called Physicochemical screening. A compound, designated iminimycin, containing an iminium ion was discovered from the culture broth of *Streptomyces griseus* OS-3601. This KML strain has been stored for a long time as a streptomycin producing strain. Named trehangelin was discovered from rare actinomycete *Plolymorphospora rubra* K07-0510 isolated from the roots of orchid collected from Iriomote Island, Japan. Trehangelin A, the main compound, binds angelic acids to the 3, 3' positions of trehalose. It has been found that the compound showed cytoprotective effect and accumulation of procollagen type I C-peptide, and further research is currently in progress.

It is shown that microorganisms are an inexhaustible gold mine of new natural compounds.