

公益財団法人矢崎科学技術振興記念財団  
奨励研究助成 成果報告書

公益財団法人矢崎科学技術振興記念財団  
理事長 殿

研究助成期間終了にあたり、下記の通り成果を報告します。

2025年 4月 9日

氏名 工藤雄大  
所属 東北大学・学際科学フロンティア研究所 兼 大学院農学研究科  
職位 准教授

### 1. 申請研究の題目

化合物生産を制御する放線菌シグナル分子の迅速同定法の開発と有用天然化合物の生産への応用

### 2. 研究の目的

医薬品の約5割は天然化合物に由来する。中でも放線菌は抗生物質の約7割、さらに駆虫薬、免疫抑制剤、抗がん剤などを供給してきた、最も重要な創薬基盤の一つであり、現在も盛んに研究されている。放線菌は、 $\gamma$ -ブチロラクトンに代表される低分子シグナル分子を用いて、自身の化合物生産を制御している。放線菌の優れた物質生産能を担う重要な因子であるにもかかわらず、シグナル分子はごく一部しか同定されていない。その原因として、シグナル分子の生産量が極めて微量であり、構造解析には多大な労力を要する点が挙げられる。そこで本研究では、放線菌研究におけるブレークスルーとなり得る、シグナル分子の迅速同定法の開発を目指した(項目①)。また、放線菌は研究室での通常培養では「休眠状態」となり、化合物生産が行われないことが多い。予備調査により、通常培養ではシグナル分子を生産せず休眠状態にある放線菌(以下、「休眠型放線菌」と呼称)が多数存在することが示唆された。これらの休眠型放線菌に対し、シグナル分子を人工的に添加することで、天然化合物の生産を活性化させることを計画した(項目②)。

### 3. 研究の内容

#### 項目① 放線菌シグナル分子の迅速同定法の開発

##### A. レジン共培養法:

先行研究(Kudo, Y., et al. *ACS Chem. Biol.* 2000)に基づき、放線菌をレジン(吸着剤)と共培養させることで、シグナル分子の生産量を増加させた。得られた培養物を高分解能LC-MSで分析し、主要なシグナル分子である $\gamma$ -ブチロラクトンをターゲットに、分子式を指標とした構造ベースの探索を実施した。検出された候補化合物を各種クロマトグラフィーで精製し、分光学的手法(NMRおよびCDスペクトル解析)により構造決定を行った。

##### B. 化学-酵素合成法による予想シグナル分子の合成と放線菌における同定:

各放線菌の分析から、系統ごとにシグナル分子の含有に一定の法則性があることが示唆された。そこで、存在が予想されるシグナル分子群を人工合成し、放線菌の抽出物との比較により同定を行う手法を考案した。シグナル分子の生合成酵素に関する知見を活かし(Kudo, Y., et al. *ACS Chem. Biol.* 2000)、酵素反応を利用した効率的な合成法を構築した。

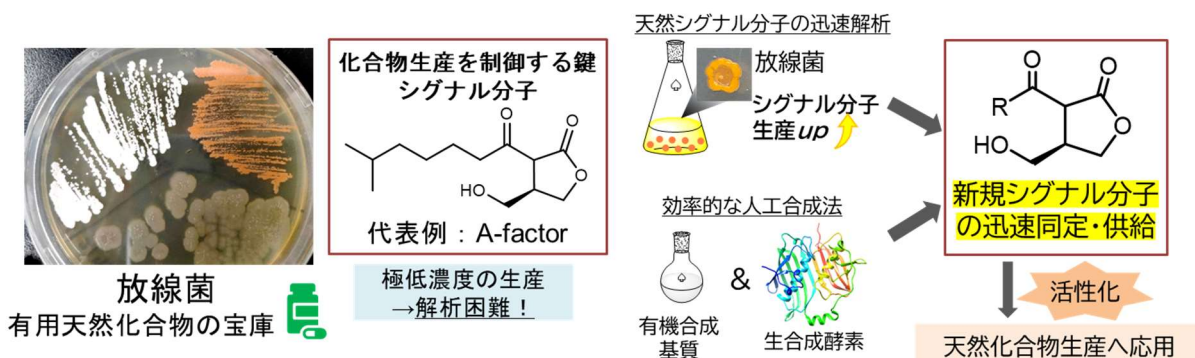
有機合成により基質を調製し、異種発現で得た酵素を用いて三段階の連続酵素反応を行い、シグナル分子を合成した。合成化合物と放線菌抽出物をLC-MSで比較分析することで、同定を行った。

## 項目② シグナル分子の添加による二次代謝 (化合物生産) 活性化の実証

休眠型放線菌にシグナル分子を添加し、二次代謝の活性化を試みた。

[対象] 項目①で解析した 30 株のうち、約半数ではシグナル分子様の成分が検出されなかったが、バイオインフォマティクス解析により、シグナル分子の受容体を有することが確認された。これらの株は、シグナル分子が存在すれば化合物生産を開始し得ると考えられた。

[代謝産物の解析] シグナル分子を添加した群と非添加の群における代謝産物を LC-MS で比較し、生産量の変化を確認した。



## 4. 研究の成果と結論、今後の課題

### 項目① 放線菌シグナル分子の迅速同定法の開発

#### A. レジン共培養法:

本法を放線菌 30 株に適用し、新規天然物として 4 種の  $\gamma$ -ブチロラクトン化合物を発見し、構造決定に成功した。従来の方法と比較して、必要培養量を約 1/100 に削減でき、本手法の有効性を示した。

#### B. 化学-酵素合成法による予想シグナル分子の合成と放線菌における同定:

三段階の連続酵素反応を含む化学酵素合成法を新たに確立し、12 種の  $\gamma$ -ブチロラクトン化合物を合成した。これらを用い、放線菌の抽出物と LC-MS で比較分析を行い、新規天然物として複数の化合物を同定した。試験した約 30 株のうち、約半数からシグナル分子を検出することができ、 $\gamma$ -ブチロラクトンの化学構造の多様性および放線菌における広範な分布を明らかにした。従来困難であった放線菌シグナル分子の同定に対し、有効な解析手法を提案できた。本成果は筆頭かつ責任著者として執筆した論文として、英国王立化学会の *RSC Chemical Biology* 誌に掲載された。

## 項目② シグナル分子の添加による二次代謝 (化合物生産) 活性化の実証

休眠型放線菌にシグナル分子を添加し、代謝産物の変化を解析した。対象株および使用シグナル分子の選定を完了し、試験を行った結果、添加により代謝産物に変動が見られる成分を複数確認した。今後、それらの詳細な構造解析を実施する予定である。また、近年、放線菌のシグナル分子が他生物(グラム陰性菌)に対しても二次代謝を活性化することが報告されている(Liu, X., et al., *Sci. China Life Sci.* 2021)。今回、ある生物のシグナル分子を放線菌に添加した結果、放線菌の代謝プロファイルに変化が観測された。放線菌と他生物とのコミュニケーションや応答メカニズムの新たな展開が期待されたため、さらに追及していく。

## 5. 成果の価値

### 5-1. 学術的価値

シグナル分子に関する従来の研究は、構造未解明のまま議論される例が多かった。本研究では、各放線菌におけるシグナル分子の化学構造を明確化し、分子レベルでの化合物生産制御機構の解明に寄与した。「シグナル分子の化学構造が不明であること」および「供給が困難であること」は、長年放線菌研究のボトルネックとされてきた。本研究で構築した迅速同定法および人工合成法の一般化により、このボトルネックの解消と、放線菌研究の国際的な加速が期待される。

## 5-2. 社会的価値

放線菌は抗生物質をはじめとする有用化合物の工業的生産に利用されており、極めて優れた物質生産システムである。放線菌による化合物生産の制御には、シグナル分子に関する理解が不可欠である。本研究により、シグナル分子を用いた生産制御機構の理解が進み、将来的にはシグナル分子の人工添加による生産増強法への展開が期待される。これにより、環境負荷が少なく持続可能な次世代型物質生産技術として、放線菌の更なる有効利用が期待できる。

## 6. 研究成果

・「研究論文(原著)」

1. Yuta Kudo<sup>\*</sup>, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita. Identification of  $\gamma$ -butyrolactone signalling molecules in diverse actinomycetes using resin-assisted isolation and chemoenzymatic synthesis. *RSC Chemical Biology*, 6, 630-641, 2024 年度.

・「国際会議発表」

1. Yuta Kudo. Identification of Trace Natural Products Utilizing LCMS: Investigating the Tetrodotoxin Biosynthesis and Actinomycete Signaling Molecules. UC San Diego, Scripps Institution of Oceanography Symposium, The Genomic Wave: New Frontiers in Natural Product Discovery. 2024 年度 [招待]
2. Yuta Kudo, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita. Rapid identification of  $\gamma$ -butyrolactone signaling molecules in actinomycete through isolation and chemo-enzymatic synthesis. 5th International Conference on “Natural Product Discovery and Development in the Genomic Era” 2024 年度

・「特許」

なし

・「受賞」

工藤雄大、日本生薬学会 第 70 回年会 優秀発表賞(口頭), 日本生薬学会、2024 年度

以上