

令和 1 年 5 月 27 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 6

氏 名

張 驥 驊

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地(派遣先国名)用務地: バーバード大学 (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

免疫応答を制御する腸内細菌由来低分子化合物の探索

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 28 日 ~ 平成 31 年 4 月 27 日

4. 受入機関名及び部局名

Harvard University, Department of Chemistry and Chemical Biology, Prof. Emily Balskus

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入)

も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 要約:

腸内細菌叢は人体の「隠された臓器」と呼ばれるほど重要な生理的役割を担っており、近年メタゲノミクス解析により腸内細菌叢の構成変化が健康に影響を与えるという報告が多くなされているが、その因果関係やメカニズムの解明は未だに不十分である(Koppel and Balskus, *Cell Chem. Biol.*, **2016**, *1*, 18)。腸内細菌も自然界の細菌同様、生理活性物質を産生していることが報告され、創薬資源の探索源として、およびそれ自体がプロバイオティクスとして注目されている(Donia and Fischbach, *Science*, **2015**, *349*, 395)。本研究では、腸内細菌由来の低分子化合物の同定と宿主に与える影響の解明を目指し、免疫系に影響を及ぼす腸内細菌由来低分子化合物の同定を目的とした。低分子化合物の作用点として近年注目されている芳香族炭化水素受容体(arylhydrocarbon receptor; AhR)はこれまでに様々な構造活性相関研究が報告されており、それらの結果を踏まえ、structure-guided genome-mining によりリガンドの探索を行った。その結果、

1. ヒトの大腸より単離された放線菌が新規 AhR リガンドを産生すること
2. ベータカルボリン構造や II 型 PKS 由来の多環芳香族構造をもつ化合物は AhR の強力なリガンドであること
3. AhR リガンド活性を持つ新規 Streptonigrin 誘導体を同定
4. 腸内細菌が免疫抑制サイトカインである IL10 産生誘導活性を持つ代謝物を産生すること
5. II 型 PKS 遺伝子は多くの腸内細菌に分布していること

などを明らかにすることができた。

研究の遂行状況詳細：

#### a) Targeted genome mining

AhR は多環芳香族炭水化物に強力に結合することが知られているが、これらの多環芳香族化合物は微生物の二次代謝経路からも産生されうる。例えば、II 型 PKS(type II polyketide synthase)はテトラサイクリンなどの多環芳香族化合物を産生する。また、トリプトファンとアルデヒドの縮合反応によりベータカルボリンを合成する微生物由来酵素や、トリプトファン二分子から bisindole 構造を合成する微生物酵素なども報告されている。そこで、これらの既知酵素の遺伝子ホモログが腸内細菌に分布しているかをまず探索した。

Genome mining には Blast (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) や sequence similarity network (Enzyme Function Initiative, <https://efi.igb.illinois.edu>)を用いた。

- II 型 PKS の sequence similarity network の結果、*Blautia wexlerae*、*Streptomyces* sp. HPH0547、*Streptomyces* sp. HGB0020、などの腸内細菌に II 型 PKS が存在していることが分かった。
- bisindole 生合成遺伝子を用いた sequence similarity network の結果、既知生合成酵素と高い類似性を示すホモログ酵素は腸内細菌には見られなかった。
- ベータカルボリン生合成遺伝子を用いた sequence similarity network の結果、*Streptomyces* sp. HPH0547 に類縁酵素が存在することが分かった。また、*Clostridium symbiosum* にも類縁酵素が見られたが、ベータカルボリン生合成遺伝子との類似度が低いためその機能を推測することは困難と判断した。

以上の結果より *Streptomyces* sp. HPH0547 の AhR 活性化化合物産性能をさらに評価することとした。なお放線菌はヒトにおいて放線菌症を引き起こすことが知られており、*Streptomyces* 属に関してもクローン病患者から単離された報告(Ekkelenkamp, M. B., *et al. Emerg. Infect. Dis.*, **2004**, 10, 1883.)があるなど、ヒトに有害な共生菌と考えることができる。実際に本菌 *Streptomyces* sp. HPH0547 は大腸切除術の後に再建された ileo-anal pouch から単離された菌株である。

#### b) *Streptomyces* sp. HPH0547 の発酵生産と代謝物分析

放線菌二次代謝産物の誘導培地として知られている A3M 培地及び K 培地を用い発酵生産を行い、その後 HPLC 及び LC-MS を用いて代謝物の分析を行った。また、AhR 活性の評価は Broad Institute Ramnik Xavier 研と共同研究により、AhR ノックアウト HT29 細胞と野生型細胞の CYP1A1 誘導活性の違いにより評価した。さらに、抗菌活性の評価のため、グラム陰性菌 *E.coli* 及びグラム陽性菌 *Staphylococcus epidermidis* を用い、disc diffusion アッセイを行なった。

- MS networking (GNPS: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>)を用いた代謝物解析の結果 Desferrioxamine、albonourcin、oxachelin などの化合物が同定された。Desferrioxamine 及び oxachelin は siderophore 活性があることが報告されており、金属イオンにキレートしこれらのイオンの動態に影響を与えることが可能である。
- AhR 活性評価及び多環芳香族化合物特有の UV スペクトル (350 nm-500nm 領域)に基づくスクリーニングの結果、ゲノムマイニングにより予想されたようにベータカルボリン化合物である oxopropaline 及び streptonigrin が単離された。
- 新規 streptonigrin 類縁体 (neostreptonigrin) を同定し、単離ののち構造決定を行なった。
- 遺伝子から予測された type II PKS 産物を検出することはできなかった。これは当該遺伝子が転写されず cryptic な状態であったためと考えられる。
- type II PKS 産物として知られている resistomycin と、当該研究室保有菌株の *Salinispora pacifica* の産生する type II PKS 産物である homorabelomycin を用い AhR assay を行なった。
- resistomycin, homorabelomycin, oxopropaline 及び neostreptonigrin は、AhR アゴニストであると報告されている diindolylmethane 及び indole-3-aldehyde よりも強力な AhR 誘導活性を示した。
- 抗菌活性評価の結果、streptonigrin は *E.coli* 及び *S.epidermidis* 双方に対し顕著な活性を示したが、oxopropaline 及び neostreptonigrin は活性を示さなかった。

以上の結果よりヒト腸内より単離された *Streptomyces* sp. HPH0547 は様々な生理活性物質を産生し、oxopropaline や neostreptonigrin が強力な AhR 誘導活性を有することを同定した。これまでに既知の AhR 誘導化合物にはダイオキシンや多環芳香族炭化水素などの環境汚染分子、植物由来のポリフェノール、インドールの代謝物などが報告されてきたが、微生物由来化合物は報告例が限られており、ベータカルボリン骨格が AhR を強力に誘導することはこれまでに報告例がない。本 *Streptomyces* 菌株の type II PKS 遺伝子は実験室環境下の発酵生産では代謝物を同定できなかったが、type II PKS 産物である resistomycin や homorabelomycin が強力な AhR 誘導活性を有することは、sequence similarity network 分析の結果複数の人体共生菌に当該遺伝子が分布していることが分かったことと合わせて非常に興味深い。

芳香属化合物を産生する type II PKS はこれまで放線菌やその近縁種のみ分布すると考えられてきたが、近年 clostrubin など幾つかの化合物が放線菌以外から単離されている。そこで、これらの遺伝子を用い Blast 検索を行い芳香属化合物産生 type II PKS の配列を収集し、その分布と酵素の系統樹解析を行なった。

- type II PKS は放線菌以外にも広く分布し、その多くが嫌気性菌であった。
- 上述の *Blautia* 以外にも *Streptococcus* や *Lactobacillus*、*Clostridium*、*Propionibacterium* など多くの腸内細菌や人体共生菌に type II PKS は分布していた。
- これらの嫌気性菌に存在する type II PKS は既知の放線菌由来 PKS とは配列が異なり、系統樹上で新しいクラスに属する酵素であった。
- 嫌気性菌の type II PKS 遺伝子クラスターは放線菌由来の同遺伝子クラスターに多く見られる酸化酵素を含んでいない。

これらの結果は、嫌気性菌由来 type II PKS が新たな芳香属化合物のゲノムマイニング目標として有望であることを示唆しており、またこれらは酸化修飾を受けないことから AhR リガンド構造に好まれる平面的な多環芳香環構造を保つ可能性が高いと考えられる。

以上に述べたように、本研究では腸内細菌の二次代謝産物が AhR 誘導活性を有することを同定し、腸内細菌が免疫応答を司るメカニズムにおいて芳香族化合物が重要な役割を果たしていることを示した。また、これまでに同定されていない type II PKS が多くの人体共生菌に分布していることを明らかにし、人体共生菌を標的とした生理活性化合物の今後の探求への道標をたてた。また、これら知見は、AhR を標的とした活性分子のデザインに寄与するものであり、活性は高いが毒性が少ない AhR リガンドの開発が期待される。

#### c) 腸内細菌代謝物の網羅的スクリーニング

Harvard Medical School の Dennis Kasper らは、様々な腸内細菌を単独で無菌マウスの腸に定着させると細菌の菌株依存的にマウスの免疫応答が変わることを報告している(Geva-Zatorsky, Cell 2017)。そこで、これらの細菌が産生する免疫応答を制御する低分子化合物の同定と、より一般的にどのような生理活性物質を産生するかの代謝プロファイルを明らかにすることを目的に、当該グループと共同研究を開始した。

腸内細菌を単独で複数の培地にて培養の後、Mass Spectrometry にて分析し、培養抽出物を異なる有機溶媒または水を用い分配した後、抑制性サイトカインである IL10 の分泌誘導活性を、マウス脾臓細胞を用い評価した。

- *Bifidobacterium longum* 及び *Bacteroidetes ovatus* の細胞抽出液（メタノール画分）が IL10 の分泌を促進することが分かった。
- 細胞抽出液を HPLC 精製(C18 逆層クロマトグラフィー)したフラクションでは IL10 誘導活性は見られなかった

これらの結果は、腸内細菌由来の低分子化合物が IL10 分泌を誘導するが、その化合物は精製過程で分解したか、複数の化合物が協奏的に作用する必要があることを示唆している。活性化化合物の正体を突き詰めるには至っていないものの、引き続き Geva-Zatorsky らによるフォローアップ研究が行われている。

d) 腸管以外に分布する細菌による免疫応答制御分子の探索

上記 a)に記載した type II PKS の genome mining の結果、皮膚及び口腔に常在する細菌である *Propionibacterium acidifaciens* が当該遺伝子を保有していることが判明した。気道に感染する *Pseudomonas* 属の細菌が芳香族化合物である Phenazine を産生し、AhR を介してヒトの免疫に影響を与えることが報告されているように、腸管以外の細菌が AhR シグナリング経路を利用し免疫応答を変化させる影響も大変興味深い。

- *P.acidifaciens* を複数の培地にて培養し type II PKS 由来代謝産物の産生を HPLC と MS を用いて分析した。しかし標的化合物を検出することはできなかった。このことから標的遺伝子が転写されず cryptic 出会ったことが考えられた。
- University of California San Diego の Richard Gallo らは皮膚常在菌の *Staphylococcus epidermidis* が 6-hydroxyladenine を産生することで宿主の皮膚ガン発症を抑える効果があることを報告した。本化合物の生合成遺伝子を Comparative genomics により、非生産菌と生産菌を比較することで予測した。
- 予測により得られた生合成酵素候補を大腸菌により異種発現し可溶性蛋白として得ることができた。

今後当該研究室で本酵素の活性評価および生合成経路の解明がなされる予定である。

まとめ：

以上、当初の計画通りに腸内細菌から AhR 誘導活性を持つ新規化合物を同定することができ、またテーマから派生するいくつかの共同研究を開始し、興味深い結果を得ることができた。