

抗卵菌物質の現状と生合成研究

川崎 崇^{1*}

The current state of anti-oomycete compounds and the biosynthesis study

Takashi Kawasaki^{1*}

概要

卵菌類の仲間には、農作物へ甚大な被害を与えるものやサケやマスの養殖業、動物や人に被害を与えるものがある。本稿では、抗卵菌物質の現状として卵菌に属するミズカビに対しての抗菌剤の現状について述べると共に、放線菌 *Streptomyces* sp. TK08046 株が生産する抗卵菌物質であるサブロールマイシンの特性や生合成遺伝子の取得と解析について紹介する。

1. はじめに

卵菌には、陸上植物へ甚大な被害を与える『根腐れ病』や『立枯れ病』の原因の菌になる *Phytophthora* や *Pythium* 属などが含まれており、ジャガイモやトマトの疫病菌の *Phytophthora infestans*^{1), 2)}がその代表例である。このジャガイモ疫病菌はヨーロッパ全域でジャガイモを壊滅的に枯らし、19世紀中ごろにアイルランドで歴史的な大飢饉を引き起こしたことで知られる植物病原菌である。ジャガイモは、世界中で年間約1億トンも消費される主要作物の一つで、ジャガイモ疫病菌がもたらす年間被害額は50億米ドルに達している。このことは、農業に深刻な打撃を与え続けており、食糧を確保する上で問題点の一つである。

水産業では *Saprolegnia* や *Achlya*、*Aphanomyces* 属などによってミズカビ病が引き起こされる^{2), 3)}。これらの卵菌類によって引き起こされる魚病は2つに大きく分けることができる。一つは主に *Saprolegnia* が感染することによって引き起こされる魚体や魚卵の表面に寄生し繁殖する外部寄生型のミズカビ病であり、もう一つは *Aphanomyces* や *Saprolegnia* などが魚体内の器官で菌糸を伸長させることにより引き起こされる肉腫症や内臓感染症がある³⁾。特にサケ科魚類の受精卵に発生する *Saprolegnia* が原因のミズカビ病が深刻で、養マス業に大きな被害を及ぼしている。

また、馬や犬などの動物にも感染することが知られており、その感染が人にも及ぶことがある。人への感染例は、*Pythium insidiosum* が報告されており、重篤化する場合もある^{4), 5)}。また、卵菌は真菌とは細胞壁、細胞膜中のステロイドなどが異なるため従来の抗真菌症薬剤では治療が困難である。症状が重篤化した場合の治療法は患部の摘出による治療法しかない。

農業、水産業、人の健康に影響を与える卵菌類に対して特異的に抗卵菌作用を示す化合物は、期待が高いのが現状である。

2018年7月11日受理。

¹〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所 学際萌芽研究センター。

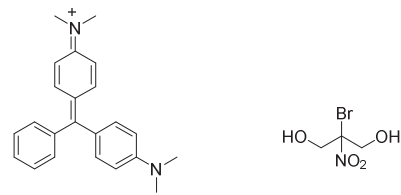
* E-mail: kawasaki.takashi.2x@kyoto-u.ac.jp

2. 抗卵菌物質の現状

2.1 抗ミズカビ剤について

ミズカビ病に対しては、薬剤による予防手段が主な方法であり、現在、この魚病に対する根本的な治療法は未だ見出されていない。薬剤を用いた予防法としては長い間、マラカイトグリーン（図 1）を用いた魚卵などの薬浴が行なわれていたが、げっ歯類を用いた発癌性試験によって発癌性が示唆されたため、現在は養殖場での食用魚に対する使用が法律によって制限されている⁶⁾。マラカイトグリーンの代替薬としてパイセス®が国内で承認されているミズカビ病の予防薬剤であり、欧州などでも使用実績がある⁷⁾。

パイセス®という薬剤はブロナポールという合成抗菌剤を主成分としている（図 1）。ブロナポールは化粧品や洗顔料などの防腐剤として使用されてきた経緯があり、比較的に人体への影響は少ないものである。ブロナポールの作用機構については完全に解明されていないが、細菌のチオール基を含む酵素の活性を阻害し、菌体の細胞膜を変成または破壊させることにより静菌的または殺菌的に作用すると考えられている⁷⁾。ブロナポールは幅広い活性を有し、ミズカビ病の原因微生物のみならず、バクテリアや水生の動植物プランクトンに対しても毒性を示すため、薬浴後の処理水の大量希釈が必要となっている。したがって、代替薬剤の開発が望まれている。



マラカイトグリーン ブロナポール

図 1: マラカイトグリーンおよび
ブロナポールの構造

2.2 抗ミズカビ作用を示すサブロールマイシンについて

放線菌 *Streptomyces* sp. TK08046 株が生産するサブロールマイシン A および E（図 2）は、アングサイクリン系抗生物質である。サブロールマイシン A および E は、サケやマスの養殖において被害をおよぼすミズカビに対して最少発育阻止濃度（MIC）がサブロールマイシン A は $0.0039\mu\text{g/ml}$ 、サブロールマイシン E は $0.0078\mu\text{g/ml}$ と非常に低濃度で抗ミズカビ活性を示すものである⁸⁾。市販のパイセスと比べても低濃度で作用することが分かる。また、サブロールマイシン E は、植物プランクトンに発育阻害活性を示さない上、動物プランクトンのミジンコに対しては、パイセスに比べて IC₅₀（半数阻害濃度）が高く、毒性が低い（表 1）。

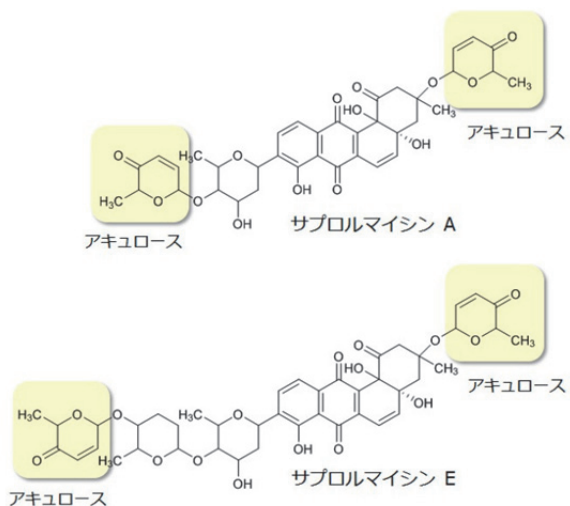


図 2: サブロールマイシン A および E の構造

表 1：サブロルマイシン A および E の生物活性

対象生物			MIC (μg/mL)		
			サブロルマイシン A	サブロルマイシン E	パイセス®
真核生物	卵菌	<i>Saprolegnia parasitica</i> (ミズカビ)	0.0039	0.0078	5.0
植物プランクトン	緑藻	<i>Chlorella kessleri</i>	>100	>100	62.5
	藍藻	<i>Synechocystis sp.</i>	>100	>100	6.3
動物プランクトン		<i>Daphnia pulex</i> (ミジンコ)	ND	4.48※	3.69※

ND: Not determined

※ IC50 (μg/mL)

3. 放線菌 *Streptomyces* sp. TK08046 由来サブロルマイシン生合成遺伝子について

3.1 サプロルマイシン生合成遺伝子の取得と解析

放線菌 *Streptomyces* sp. TK08046 が生産するサブロルマイシン A～E は、アングサイクリン抗生物質^{9), 10)} に属しており、特にサブロルマイシン A および E は、抗卵菌物質として非常に低濃度で特異的に作用する⁸⁾。この特異的な作用に関しては、サブロルマイシン類の構造と活性の相関から希少糖であるアキュロースが2つ構造に必要なことが示唆されている(図2)。そこで、我々は、サブロルマイシン生合成においてアキュロースの糖転移に関与する遺伝子を解析と利用を目的に、サブロルマイシン生合成遺伝子クラスターの取得と解析を試みた。アングサイクリンの環化酵素と芳香化酵素をコードする遺伝子を含むコスミド DNA について高速シーケンス解析を行い、42 kb の配列を解析した結果、取得したコスミドにポリケチド合成遺伝子やデオキシ糖合成遺伝子などサブロルマイシン生合成遺伝子クラスターと推定される領域を含んでいた(図3)。そこで、取得した生合成遺伝子クラスターがサブロルマイシンの生合成に関与するかどうかを確かめるため、サブロルマイシン生合成遺伝子クラスターの全領域を含むと考えられるコスミドを *Streptomyces lividans* TK23 株(異種放線菌宿主)に導入し、形質転換体の代謝物を HPLC で分析した。その結果、形質転換体の代謝物において、サブロルマイシン A、C、E が検出された(図4)。さらに、LC-MS の分析においても、目的の分子イオンを確認することができた。したがって、形質転換体は、サブロルマイシン類を生産しており、取得した生合成遺伝子クラスターがサブロルマイシンの生合成遺伝子であることを証明した。また、遺伝子の相同性検索結果を基にサブロルマイシン類の生合成経路についても推定した(図5)¹¹⁾。

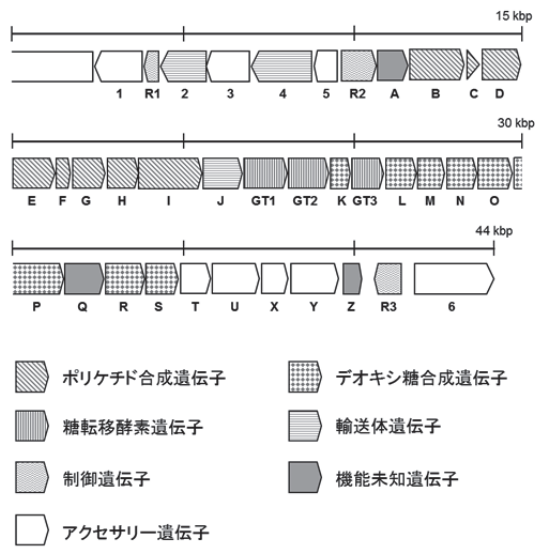
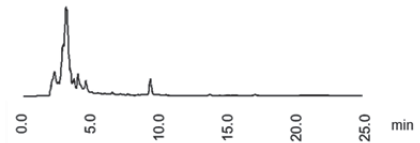


図 3 : サプロルマイシン生合成遺伝子クラスター

非遺伝子導入株



遺伝子導入株

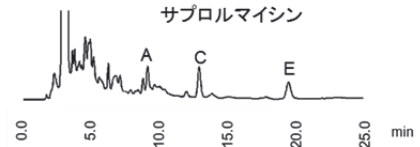


図 4: サプロルマイシン生合成遺伝子群を導入した放線菌の HPLC 分析. A: サプロルマイシン A. C: サプロルマイシン C. E: サプロルマイシン E.

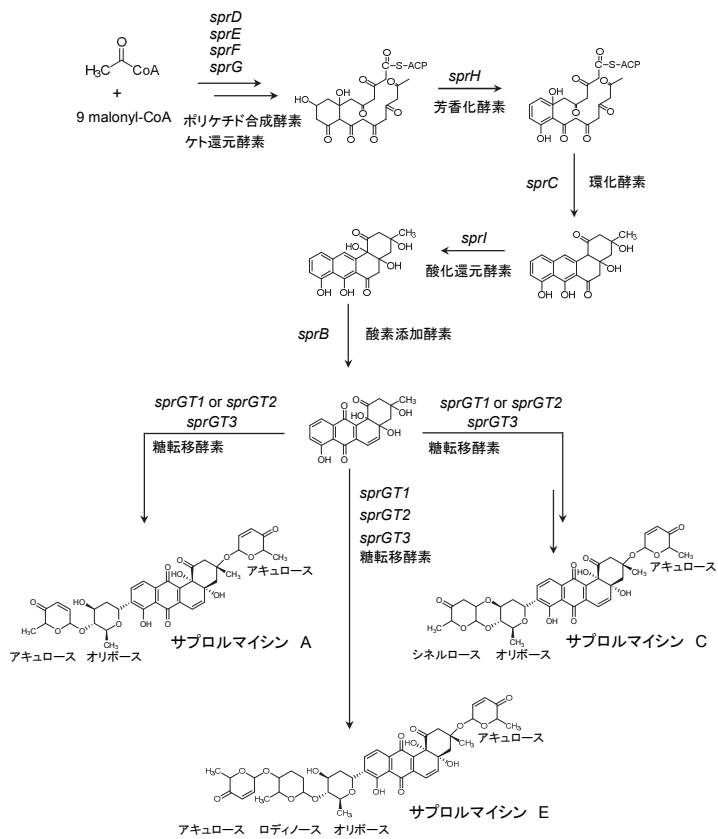


図 5 : サプロルマイシン推定生合成経路

4. おわりに

卵菌類の間には、陸上植物へ甚大な被害を与えるものや養殖業、動物や人に被害を与えるものがある。これは、水圏、植物圏、人間生活圏での質の向上においての妨げになっている。放線菌 *Streptomyces* sp. TK08046 株が生産するサブロルマイシン類は、卵菌に属するミズカビに対して生物活性を示す抗卵菌物質であるが、特にサブロルマイシン A および E は、ミズカビに対して特異的に作用する。この特異的な作用に関しては、サブロルマイシン類の構造と活性の相関から希少糖であるアキュロースが 2 つ構造に必要なことが示唆されている⁸⁾。そこで、サブロルマイシン生合成において希少糖のアキュロースの転移に関与する遺伝子を解析し、その遺伝子を利用することでアキュロースを付加した新たな特異的な抗卵菌物質の創製が可能になるかもしれない。

参考文献

- 1) Blum M, Boehler M, Randall E, Young V, Csukai M, Kraus S, Moulin F, Scalliet G, Avrova AO, Whisson SC, Fonne-Pfister R. Mandipropamid targets the cellulose synthase-like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 227-243, 2010.
- 2) Sanju S, Thakur A, Siddappa S, Sreevathsa R, Srivastava N, Shukla P, Singh BP. Pathogen virulence of *Phytophthora infestans*: from gene to functional genomics, *Physiol Mol Biol Plants*, 19(2), 165-177, 2013.
- 3) 江草周三, 若林久嗣, 室賀清邦, 魚介類の感染症・寄生虫病, 恒星社厚生閣, 2004.
- 4) Shenep JL, English BK, Kaufman L, Pearson TA, Thompson JW, Kaufman RA, Frisch G, Rinaldi MG., Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clinical Infection Diseases*, 27, 1388-1393, 1998.
- 5) Krajaeun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitamun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwat M, Somkaew S. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in thailand. *Clinical Infection Diseases*, 43, 569-576, 2006.
- 6) 食品安全委員会. マラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの食品健康評価について. 2005.
- 7) 食品安全委員会. 孵化を目的としたニシン目魚類のプロノポールを有効成分とする魚卵用消毒剤(パイセス). 2013.
- 8) Nakagawa K, Hara C, Tokuyama S, Takada K, Imamura N., Saprolmycins A-E, new angucycline antibiotics active against *Saprolegnia parasitica*. *J. Antibiot.*, 65(2), 599-607, 2012.
- 9) Krohn, K., Rohr, J., Angucyclines: total syntheses, new structures, and biosynthetic studies of an emerging new class of antibiotics. *Top.Curr.Chem.*, 188, 127-195, 1997.
- 10) Rohr, J., Thiericke, R, Angucycline group antibiotics. *Nat. Prod. Rep.*, 9, 103-137, 1992.
- 11) Kawasaki T, Moriyama A, Nakagawa K, Imamura N. Cloning and identification of saprolmycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TK08046. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80(11), 2144-2150, 2016.

著者プロフィール



川崎 崇 (Takashi Kawasaki)

<略歴> 2005 年富山県立大学大学院博士後期課程修了 博士(工学) / 同年東京理科大学薬学部製薬学科助教 / 2006 年東京理科大学薬学部生命創薬科学科(旧製薬学科)助教 / 2010 年 京都大学生存圏研究所 産学官連携研究員 / 2011 年 神戸大学大学院農学研究科 学術推進研究員 / 2012 年 立命館大学薬学部薬学科 助教 / 2018 年 京都大学生存圏研究所 特任講師(ミッション専攻研究員) 現在に至る。<研究テーマと抱負> 生合成遺伝子を用いた特異的な抗卵菌物質の創製を目指した研究。<趣味> バスケットボール。