特集：創薬とMS

微生物由来新規天然物探索におけるMSの役割

Role of the Mass Spectrometry in the Screening for
New Microbial Natural Products

澤 竜一

Ryuichi SAWA

微生物化学研究所分子構造解析部

1. はじめに

微生物由来の二次代謝産物は、多種多様であり化合物の宝庫である。微生物由来生理活性物質のおよそ40%は放線菌によって生産され¹⁾、その中から多くの医薬品など有用な物質を生み出している(図1)。一方で精力的な探索の結果、新規化合物の発見は困難なものとなってきた。しかし人類が見いだした微生物は、地球上に生息するごく一部だけでも言われており、微生物二次代謝産物からの有用な生理活性物質の発見は、いまだ無限の可能性を秘めている。その中で多様な物質生産を示す微生物からの新規物質探索において、質量分析法はきわめて重要な役割を担っている。

本稿では、微生物由来、その中でも放線菌の産生する新規天然物探索を中心に質量分析法がどのような役割を果たしているのかを紹介する。

2. MSによる迅速同定

微生物培養物からの新規生理活性物質の探索は、生理活性のある培養物を選択し、液液分配や各種クロマトグラフィーを組み合わせ、それぞれの活性画分を集めることで活性物質を特定することに始まる。ここで単離できた物質についてはMS, NMR, また単結晶が得られた場合は、X線結晶解析を行うことで、その化合物の構造決定を行い、種々のデータベースを参照して、新規構造であるかを検討するという流れで行われている。しかしながら先述したとおり、これまで多くの研究者によって新規化合物が世の中に提示された結果、いわゆる「ものとり」をしてから同定したのでは、多くの部分は既知化合物しかとることができないと言っても過言ではない。

上記の流れを大きく変えたのは、感度の高い大気圧イオン化LC-MS(特にLC-ESI/MS)の普及である。この進歩が既知化合物の効率、迅速同定(dereplication)の精度を高めた⁴⁾。さらに21世紀に入りLC-MSは、長時間の分析

において安定度の高い、高分解能、高精度の質量分析計が開発され、LC-MSもしくはLC-MS/MSで常に精密質量が測定できるようになった。またメタボローム解析手法の発達により、LC-MSから得られる膨大な量の精密質量データの処理も可能となり、dereplicationの精度はさらに向上した。LC-MSが使用できるようになってからは、活性のある培養物を、LCで分離してオンラインでMSとフラクションコレクタにスプリットさせ、活性画分とMSのピークを重ね合わせて、保持時間と精密質量あるいはUVスペクトルデータから既知化合物の推定も容易になった。またあらかじめ培養物をLCなどで分画したものをライブラリ化して種々のアッセイに供し、活性画分のMSデータを参照して新規化合物を取得する方法も報告されている^{5)~7)}。

さらに、分取LC-MSシステムも市販されるようになり、物質単離においてMSはなくてはならない検出器となって

Kanamycin A : $R^1=R^2=OH$ Kanamycin B : $R^1=NH_2, R^2=OH$

図1. Kanamycin生産菌およびその構造。

放線菌 *Streptomyces kanamyceticus* によって生産される抗生物質で、(財)微生物化学研究会設立の基礎となった。当時、耐性菌によって引き起こされる重篤な感染症の治療に著効を示した^{2),3)}。

いる。

しかし、これらの手法をもってしても、構造が多様な天然物においては、市販標準品も少なく、化合物を完全に同定するには、単離しないと決定しにくい場面も多い。そのために種々の探索の過程で得られた既知物質について構造を確認したうえでインハウスデータベースとして蓄積しているところが多い。

3. MSを用いた物質単離および構造解析

MSが物質の単離に役立った例として、アポトーシス抑制タンパク質Bcl-xLの機能を阻害する新規物質Inced-nine⁸⁾が挙げられる。本物質は、不安定でシリカゲル、ゲルろ過等の担体を用いた精製で回収率が悪いと、高速遠心液液分配クロマトグラフィー (CPC) で精製を行ったが、精製過程で生成される構造変化体との分離状態を迅速に検出するのが、UVやTLCでは困難であった。そこでCPCで分画したそれぞれの画分をオフラインでESI-MSのフローインジェクション法で分析し、それぞれの物質を検出することで単離に成功している。

構造解析の例として、抗生物質Amycolamicin⁹⁾が挙げられる。天然物の構造解析においては、MSとNMRは相補的に使用されることが多い。本物質は、HRESI/MSよりその分子式を $C_{44}H_{60}Cl_2N_4O_{14}$ と決定した。単離精製の過程で、LC-MSにおいて保持時間が約0.5分前に同じ m/z を示すピークが出現した (図2A-右)。それぞれ単離を試みたが、13.77分のピークを分取すると再び二つのピークとなり、異性化する構造が示唆された。さらに単離された本物質を重メタノール中でNMRスペクトルを測定すると、3日後に複雑化したスペクトルが (図2B) が観測された。複雑化する前のNMRスペクトルの解析から、本物質は互変異性を伴うことで知られるテトラミン酸構造 (図3) を有することが判明したが、この状態ではLC-MS分析において単一のピークを示した (図2A-左)。次いでNMRが複雑化した状態でLC-MSを測定したところ、先ほどと同様、二つのピークが

図2. Amycolamicinのメタノール溶液中における構造変化。
A) m/z 939.3556 $\pm$ 5 ppmの抽出マスマスペクトル。
B) NMRスペクトルの変化。下段の太字は新たに出現した糖部分のシグナル。C) Amykitanoseの構造変化。

図3. AmycolamicinのHR-ESI/MSと構造。

HPLC

HPLC: Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000
 Column: SUPELCO Ascentis Express C18
 2.1 x 50 mm 2.7 μ m
 Column temperature: 40°C
 Mobile phase:
 A: 0.1% HCOOH aq.
 B: 0.1% HCOOH-Acetonitrile
 0 - 5 min A 95 $\rightarrow$ 0 %
 5 - 8.5 min A 0 %
 8.5 - 12 min A 95 %
 Flow: 0.4 mL/min
 Injection vol.: 5 μ L

MS

Thermo Fisher Scientific Q Exactive
 Ionization: HESI (pos, neg, MS/MS)
 Spray voltage: 4 kV
 Capillary temp.: 350°C
 S lens RF level: 50
 <MS>
 Positive-negative scan
 Mass range: m/z 133.4 - 2000
 Resolution: 35000
 <MS/MS>
 TOP10 data dependent scan
 Resolution: 17500
 Software: Xcalibur

図4. LC-HR-ESI-MS/MSの測定条件.

観察された(図2A-右). 最終的に, これら混合物の状態
 NMR スペクトルを解析し, 構造上部の amykitanose と命名
 した新規糖がアノマー化することが解明できた(図2C).
 さらに本物質の塩素原子の置換位置については, HR-ESI-
 MSにおいて特徴のあるフラグメントが生成される(m/z
 331.0616 Δ -0.5 mDa [$C_{14}H_{19}Cl_2N_2O_4 \cdot H_2O$] $^+$) こと
 から NMR データを参照して 12', 13' 位にそれぞれ結合している
 ことが決定できた(図3).

4. 精密質量を用いた新規物質探索

われわれは, 主として放線菌培養物から各種生理活性物
 質の探索を行っている. 先述のように長年にわたる生理活
 性物質の探索において, 極めて多くの種類の物質が発見さ
 れてきたことから, 新たな物質の発見の手掛かりとして各
 培養物にどのくらいの既知物質が含まれているのか, また
 どのくらい多様性があるのかについて知る方法が必要であ
 り, われわれは高精度 LC-MS を用いた微生物培養物の精
 密質量に基づいた新規物質の探索を行っている. 分離され
 た菌株について固体培養, 液体培養を行い, それぞれの有
 機溶媒抽出物について Q Exactive (Thermo Fisher Scientif-
 ic) を用いて LC-HR-ESI-MS/MS 分析を行っている. イオ
 ン化法は ESI でポジティブモードおよびネガティブモード
 とポジティブモードのトップ 10 の HCD MS/MS の交互ス
 キャンとした(図4). 得られた RAW データは, ポジティ
 ブ, ネガティブ別に SIEVE (Thermo Fisher Scientific) に
 取り込み, 精密質量@保持時間およびピーク面積のリスト
 を作成した. 精密質量@保持時間インデックスにおいて,
 既知物質が該当した場合には, 該当物質名を併記すること

図5. 深海由来および陸上由来放線菌培養物の m/z -保持時間
 散布図.
 矢印は, 新規化合物のプロット.

で順次データベース化している.

ここで現状の問題として, ポジティブのデータとネガ
 ティブのデータは別々にしか処理できないため, ソフト
 ウェアが推定したアダクトの判別が正しくない場合もあ
 り, 現状その最終確認は, スペクトルベースで行ってい
 る. アダクトイオンのパターンや出現頻度などの解析につ
 いては, Nielsen らの論文で詳細に述べられている¹⁰⁾.

また天然物データベースとして知られる Dictionary of
 Natural Products (DNP, CRC Press) より放線菌代謝物を
 参照して, 約 5,000 種の化合物名, 分子式および計算精密
 質量のリストを作成し, 同じく SIEVE で上記精密質量と
 5 ppm 以内でマッチするものには, 既知物質候補を示すフ
 ラッグを立てた. 現在, 深海由来放線菌からの新規化合物
 の探索を行っており, 陸上由来放線菌培養物との m/z -保
 持時間をそれぞれ重ねてプロットした結果を図5に示す.
 深海由来と陸上由来では, それぞれ特徴的なプロットを含
 むことを示し, 深海由来微生物代謝物固有の成分について
 探索を行っている.

一方, 培養物の中の特異ピークの探索については, ポジ
 ティブイオン化における各培養物に存在する各ピークの面
 積にスレショールドを設けてそれ以上を 1, それ未満を
 0 として各ピークの面積を 0, 1 に置き換え, 各ピークにお
 いてサンプル数分の和を求めてピーク出現数を算出した.
 このピーク出現数の少ないものを特異ピークとして, また
 それらのピークのうち上記既知物質候補ピークのフラッグ
 がないものをリスト化して低頻度新規物質候補ピークとし
 た. これらの候補は, DNP 未掲載化合物であるが, より
 多くの物質を収載している SciFinder (American Chemical
 Society) での新規性の確認が必須である. これらのピー
 クは, MS ベースで物質単離することが可能である. 一例
 として図4において矢印で示したプロットは, 単離精製し
 た結果, 新規物質であることが判明している.

ほかの研究グループにおいても培養物のプロファイリン
 グによる多様性解析¹¹⁾, 物質ベースのスクリーニングが盛
 んに行われており^{12)~16)}, 生理活性を指標とした新規物質
 取得とともに, 新規物質の取得方法として工夫されている.

5. おわりに

最近の報告として、MSおよびMS/MSのフラグメントパターンから視覚的に化合物を関連づける、モレキュラーネットワークという新たな手法が考案されている^{17),18)}。この手法を用いた新規物質の探索の報告¹⁹⁾も出てきており、MS/MSフラグメントベースの化合物探索法としてたいへん興味深い。

謝 辞 本稿作成にあたり、ご協力いただきました微生物化学研究所、五十嵐雅之博士、波多野和樹博士に深謝します。

文 献

- 1) J. Berdy, *J. Antibiot.*, **65**, 385, 441 (2012).
- 2) H. Umezawa, M. Ueda, K. Maeda, K. Yagishita, S. Kondo, Y. Okami, R. Utahara, Y. Osato, K. Nitta, and T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, 181 (1957).
- 3) T. Takeuchi, T. Hikiji, K. Nitta, S. Yamazaki, S. Abe, H. Takayama, and H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 107 (1957).
- 4) N. Shigematsu, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 295 (1996).
- 5) T. M. Bugni, B. Richards, L. Bhoite, D. Cimbora, M. H. Kay, and C. M. Ireland, *J. Nat. Prod.*, **71**, 1095 (2008).
- 6) T. Nogawa, A. Okano, S. Takahashi, M. Uramoto, H. Konno, T. Saito, and H. Osada, *Org. Lett.*, **12**, 4564 (2010).
- 7) 野川俊彦, 長田裕之, 化学と生物, **52**, 395 (2014).
- 8) Y. Futamura, R. Sawa, Y. Umezawa, M. Igarashi, H. Nakamura, K. Hasegawa, M. Yamasaki, E. Tashiro, Y. Takahashi, Y. Akamatsu, and M. Imoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1822 (2008).
- 9) R. Sawa, Y. Takahashi, H. Hashizume, K. Sasaki, Y. Ishizaki, M. Umekita, M. Hatano, H. Abe, T. Watanabe, N. Kinoshita, Y. Homma, C. Hayashi, K. Inoue, S. Ohba, T. Masuda, M. Arakawa, Y. Kobayashi, M. Hamada, M. Igarashi, H. Adachi, Y. Nishimura, and Y. Akamatsu, *Chem. Eur. J.*, **18**, 15772 (2012).
- 10) K. F. Nielsen, M. Månsson, C. Rank, J. C. Frisvad, and T. O. Larsen, *J. Nat. Prod.*, **74**, 2338 (2011).
- 11) T. Ito, T. Odake, H. Katoh, Y. Yamaguchi, and J. Aoki, *J. Nat. Prod.*, **74**, 983 (2011).
- 12) T. Nakashima, P. Boonsnongcheep, T. Kimura, M. Iwatsuki, N. Sato, K. Nonaka, S. Prathanturug, Y. Takahashi, and S. Omura, *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 596 (2015).
- 13) T. Nakashima, R. Okuyama, Y. Kamiya, A. Matsumoto, M. Iwatsuki, Y. Inahashi, K. Yamaji, Y. Takahashi, and S. Omura, *J. Antibiot.*, **66**, 311 (2013).
- 14) T. Nakashima, M. Iwatsuki, J. Ochiai, Y. Kamiya, K. Nagai, A. Matsumoto, A. Ishiyama, K. Otoguro, K. Shiomi, Y. Takahashi, and S. Omura, *J. Antibiot.*, **67**, 253 (2014).
- 15) T. Nakashima, Y. Kamiya, M. Iwatsuki, Y. Takahashi, and S. Omura, *J. Antibiot.*, **67**, 533 (2014).
- 16) T. Nakashima, Y. Kamiya, M. Iwatsuki, N. Sato, Y. Takahashi, and S. Omura, *J. Antibiot.*, **68**, 220 (2015).
- 17) N. Garg, C. A. Kapono, Y. W. Lim, N. Koyama, M. J. A. Vermeij, D. Conrad, F. Rohwer, and P. C. Dorrestein, *Int. J. Mass Spectrom.*, **377**, 719 (2015).
- 18) J. Watrous, P. Roach, T. Alexandrov, B. Heath, J. Yang, R. D. Kersten, M. van der Voort, K. Pogliano, H. Gross, J. M. Raaijmakers, B. Moore, J. Laskin, N. Bandeira, and P. Dorrestein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E1743 (2012).
- 19) K. Kurita, E. Glassey, and R. G. Linington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11999 (2015).