

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14967

研究課題名(和文) 休眠遺伝子を活用する天然物の創出ーリボソーム標的薬剤耐性菌二次代謝物の探索

研究課題名(英文) Use of Fungal Strains Resistant to Ribosome Targeting-Antibiotics for Discovery of Cryptic Secondary Metabolites

研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA, Yoshiteru)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00111302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リボソーム標的薬剤に対する耐性糸状菌を作成し、糸状菌が生産する新規二次代謝物を探索した。胞子形成能の高い糸状菌に対しては、変異原によりランダム変異を導入した後、糸状菌をHygB添加培地で培養して耐性株を選別した。その後、耐性株と野生株の二次代謝物を比較することで、*Cordyceps indigotica*から新規ナフトール誘導体を得た。

一方、胞子形成が難しい糸状菌については、菌糸処理法等を種々検討することで、耐性株を得ることに成功した。さらに、*Chaetomium indicum*から野生株には見られない新規芳香族ポリケチドを単離した。

研究成果の概要(英文)：The potential of filamentous fungi as a rich source of natural products has been unveiled by genome sequencing studies that have shown the presence of many cryptic biosynthetic gene clusters. The access for secondary metabolites hidden in the cryptic biosynthetic pathway would increase the opportunity to discover new drug candidates. In this study, to develop a new method to stimulate cryptic biosynthetic pathway in fungi, we introduced “ribosome engineering of bacteria” into fungal secondary metabolism.

We obtained mutant strains with hygromycin B resistance from various fungi by mutagenetic approach using MNNG as a chemical mutagen. The evaluation of the secondary metabolite productivities of the mutant strains indicated that introduction of hygromycin B resistance into fungi is available to activate fungal metabolite productions. Application of the method to *Chaetomium* and *Cordyceps* fungi allowed us to isolate novel compounds whose production were silent in their wild type strains.

研究分野：天然物化学

キーワード：糸状菌 二次代謝物 休眠遺伝子 リボソーム工学

1. 研究開始当初の背景

我々は、通常の培養条件では発現しない、微生物の二次代謝に関わる休眠遺伝子を覚醒させることにより、多様な新規天然物を得ている。その一環として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いたケミカルエピジェネティックス法を活用して、これまで種々の糸状菌から多様な新規天然物を得た。しかし同時に、本法では発現しない休眠遺伝子が相変わらず存在することもわかった。

最近、食総研とアステラス製薬グループは、通常培地では抗生物質を生産しない放線菌をストレプトマイシン添加条件で培養し、増殖してくる薬剤耐性変異株から新規抗生物質を見出した。変異株では、放線菌のリボソームタンパク質に変異が生じ、その結果休眠遺伝子が覚醒して新規抗生物質が生産されたことが明らかになった。リボソームは全生物に共通する細胞内小器官であり、本法が放線菌以外の生物資源に適用されうるならば数多くの新規天然物の生産が期待される。ところで、糸状菌からはこれまで有用医薬品が得られているものの、昆虫寄生菌をはじめとする糸状菌群の研究はまだ十分には行われたとはいえない。したがって、糸状菌の休眠遺伝子を上手に活用できれば、天然物ライブラリーを格段に充実させることができる。

2. 研究の目的

糸状菌の休眠遺伝子を活用する新規天然物の探索を目的とする。そのために、変異原処理によってランダム変異を起こした昆虫寄生菌、植物内生菌、薬理活性物質生産糸状菌から、リボソームを標的とする薬剤耐性を示す変異株を選抜し、二次代謝活性型変異株で新たに生産される新規天然物を得る(図1)。得られた物質については、様々な薬理作用を調べる。

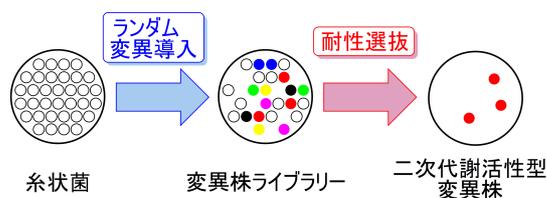


図1 本研究の概略

3. 研究の方法

(1) 変異原処理による薬剤耐性糸状菌変異株の作成(図2)

孢子形成能がある *Aspergillus nidulans* をモデル糸状菌として用い、変異原やリボソームを標的とする薬剤の選択、それらの処理濃度、培地、培養時間等の最適化を行った。

糸状菌の孢子に *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) など化学変異原を種々の濃度で加え、ランダム変異を導入した。

リボソームを作用点とする薬剤である hygromycin B (HygB) を濃度を変えて培地に加え、変異原処理した糸状菌を培養した(一

次選抜)。

上記の培養で増殖した薬剤耐性株を再び HygB を添加した寒天培地で培養した(二次選抜)。

増殖した薬剤耐性株を液体培地で大量培養した。

次いで、孢子形成能のない糸状菌である *Chaetomium indicum* の菌糸を用いて、二次代謝が活性化された薬剤耐性糸状菌の作成を試みた。

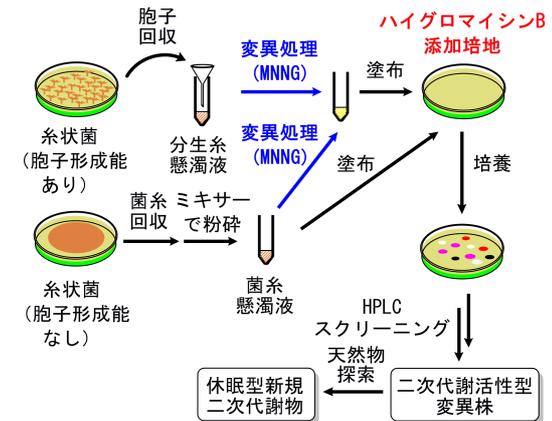


図2 実験操作

(2) 種々の薬剤耐性糸状菌変異株作成

上記実験において最適化された条件を用いて、*Aspergillus*、*Penicillium*、*Pseudomonas*、*Eupenicillium*、*Chaetomium*、*Cordyceps* 属菌などの薬剤耐性変異株を選別した。その後、野生株との成分を HPLC で比較し、変異株と野生株との間で明らかな成分の差異がある変異株を大量培養した。

(3) 糸状菌変異株に含まれる新規二次代謝物の探索

上記実験で得た変異株エキスに含まれている新規二次代謝物を網羅的に単離し、その構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 変異原処理による薬剤耐性糸状菌変異株作成

孢子に対しては、変異原である MNNG を用いてランダムに突然変異を導入し、HygB 耐性株の作成を試みた。まず、孢子形成能の高い *Aspergillus* 属や *Eupenicillium* 属菌のうち、HygB 500 µg/ml 以下で感受性を示す菌について検討した。変異原処理の条件と選抜時の HygB 濃度を検討することにより、ほとんどの菌で耐性株を取得することができた。耐性株を取得できた菌に関しては、いずれも二次代謝が活性化した株を効率良く見出すことができた。また、十分に孢子を形成した昆虫寄生糸状菌 *Sporothrix pallida* でも同様に二次代謝活性型の HygB 耐性株が取得でき、適応範囲の広さが示された。しかし、糸状菌の多くは孢子を十分に形成させることが難しい。そこで、菌糸体を用いて HygB 耐性株が

取得できるか検討した。先の検討事項に加え、MNNG と反応させる菌系の調製法を検討した結果、数種の菌で HygB 耐性株が得られ、それぞれの変異株の二次代謝は活性化していた。変異原処理では複数の変異が導入されてしまう。昆虫寄生糸状菌 *Orbiocrella patchii* の菌系から変異原処理なしでも HygB 耐性株が得られ、変異原処理で取得した耐性株と同じように二次代謝が活性化していたことは、HygB 耐性に関わる変異が二次代謝活性化に寄与している可能性を示唆している。

HygB 耐性株で二次代謝が顕著に活性化した例を図3に示す。このように、本法が、二次代謝活性型糸状菌を得るのに効果的な方法であることが示された。

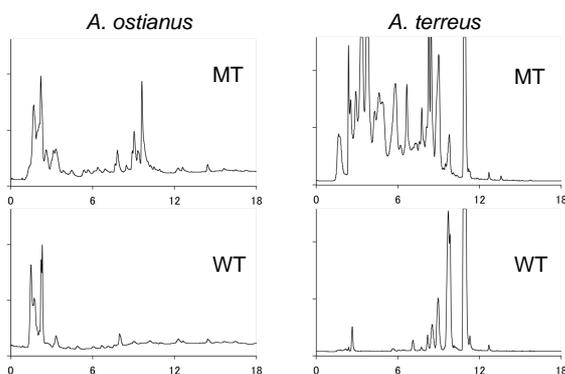


図3. HygB 耐性株 (MT) と野生株 (WT) の二次代謝プロファイルの比較

(2) リボソーム標的薬剤耐性株からの新規休眠型二次代謝物の取得

Chaetomium indicum

ホモジナイズした *C. indicum* の菌系を MNNG 50 $\mu\text{g/ml}$ で 30 分反応させ、HygB 50 $\mu\text{g/ml}$ の培地で選抜することで耐性株を取得した。耐性株は 30 以上であり、それぞれの培養を行ったところ、8 割程度の株が類似の二次代謝プロファイルを示し、野生株では見られない二次代謝物を生産していた。HygB 耐性株の二次代謝プロファイルの詳細を調べるため、培養液中の成分を HPLC 分析により経時的に追跡した。その結果、保持時間 10 分付近の化合物の生産が培養初期にのみ確認され、培養経過にともない 12 分付近の化合物の蓄積

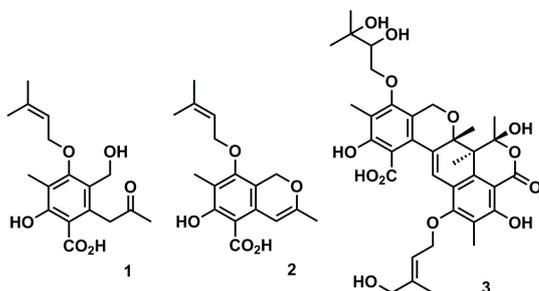


図4 *Chaetomium indicum* の HygB 耐性株の成分

が増加する様子が観察された。HygB を大量培養し、それぞれのピークに対応する二次代謝

物の同定を行い、新規芳香族ポリケタイド 1-3 を同定した (図4)。化合物 1-3 のいずれもが *o*-プレニル化された芳香族ポリケタイドであり、3 はユニークな 5 環式構造を有していた。なお、我々は既に、HDAC 阻害剤を用いて *C. indicum* を培養することで chaetophenol 類を得ている (図5)。

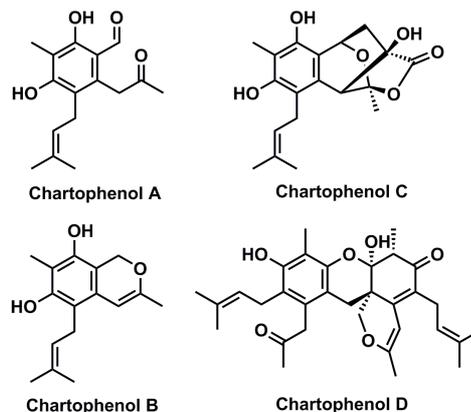


図5 HDAC 阻害剤によって誘導される *Chaetomium indicum* の成分

Cordyceps indigotica

昆虫寄生糸状菌の *C. indigotica* の胞子を MNNG 200 $\mu\text{g/ml}$ で 30 分反応させ、HygB 200 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地を用いて耐性株を取得した。得られた耐性株は胞子形成能が低下していた。得られた耐性株のうち約半分で、野生株では見られない新規ナフトール誘導体 4 の生産が誘導された (図6)。その生産量は HDAC 阻害剤である SBHA 添加により増大し、ケミカルエビジェネティク

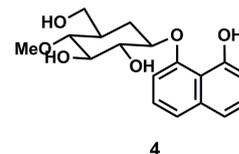


図6 *Cordyceps indigotica* の HygB 耐性株の成分

(3) まとめ

本研究では、バクテリアにおけるリボソーム工学の概念に基づき、真核生物に有効なリボソーム標的薬である HygB 耐性糸状菌を作成し、それらの二次代謝能を評価した。その結果、様々な菌において、本スキームで作成した HygB 耐性株から効率良く休眠型二次代謝物を生産する株を取得できることを初めて示した。また、数種の菌から新規二次代謝物を取得し、天然物探索において有効であることを示した。二次代謝活性型耐性株が取得できた他の菌についても新規物質の探索を進めている。現在、菌系からの耐性株の取得の条件の最適化や適応範囲を拡大することで、天然物探索に汎用できる方法の確立を目指している。

HygB は、真核および原核生物の両方に作用し、原核生物においてはリボソーム工学で代表的な抗生物質であるストレプトマイシンと同じ標的部位に作用することが知られて

いる。また、*C. indicum*ではG-418耐性株とHygB耐性株が同じ代謝変化を示したことから、リボソーム工学様の効果が期待される。さらに、*O. petchii*では、変異原なしでも耐性株を取得できたことから、二次代謝の活性化が、変異原処理により複数入るランダムな変異に由来するのではなく、耐性化と関わっている可能性が考えられる。最近、真核生物では有効ではないアミノグリコシド系抗生物質であるネオマイシンやゲンタマイシンの超高濃度溶液で胞子を処理し、生き残った耐性株から新規二次代謝物の取得の報告例がある。その詳細な機構は明らかになっていないが、我々の研究も含めて、二次代謝活性化機構の解析を進めることで、真核生物におけるリボソームの新たな機能が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

山本崇史，森下陽平，網谷雄志，塚田健人，浅井禎吾，大島吉輝，リボソーム標的型薬剤耐性糸状菌が生産する休眠型新規二次代謝物の探索，第57回天然有機化合物討論会，2015年9月9-11日，神奈川県民ホール（神奈川県・横浜市）。

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA Yoshiteru)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00111302