

令和元年6月12日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15250

研究課題名（和文）微生物の化合物生産能を最大限に活用できるスクリーニングによる新規物質の探索研究

研究課題名（英文）The search for novel metabolites from microorganisms by physicochemical screening

研究代表者

松尾 洋孝 (Matsuo, Hirotaka)

北里大学・北里生命科学研究所・特任助教

研究者番号：70613694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：深海・地殻由来糸状菌を探索源とした新規有用物質探索を目的に、物質の物理化学的性状（物質の特徴）を指標としたスクリーニング（physicochemical screening）を行った。280株の糸状菌が4種類の培地で培養された計1120サンプルの中から新規有用物質を探索した結果、3株の糸状菌から計5種の新規物質の取得に成功した。これらの物質は取得後、様々な有用活性が見出され、医薬品等のシード物質として活用できることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、科学技術の発展にともない、深海の探索が可能となってきた。そして、深海にも様々な生物が生存しており、糸状菌も多く存在していることが明らかになってきた。深海のような極限環境に適応するため、深海の糸状菌は陸上の糸状菌と異なる物質を生産していることが期待されている。

本研究により、深海の糸状菌は新規有用物質を生産していることが明らかとなり、今後、それらの物質が医薬品などに活用されることを期待したい。

研究成果の概要（英文）：To obtain the useful novel metabolites, the physicochemical screening was carried out. Deep-sea derived fungal strains were used as a source. Five novel metabolites were obtained from three different fungi. These novel metabolites were found many useful activities and expected to be a seed compound such as medicines.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 新規有用物質 二次代謝産物 含窒素天然物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物はこれまでに、人知の及ばない構造を有する化合物を提供してきた。それらは長い生存競争の過程における生命活動に伴い作り出された化合物であるため、強力な生物活性を示すものが多い。しかし、これまでに見出されてきた生物活性物質の多くは、ある特定の活性を指標に探索されてきたため、目的の活性と偶然に一致した場合のみ、化合物が取得されてきた。つまり、目的の活性のない物質は、例え新規物質であったとしても見逃されてきた可能性がある。そこで、物質の物理化学的性状に着目した physicochemical screening (PC screening) が実施された。PC screening は、物質の新規性を予測してから精製・単離する方法であり、新規物質の取得に特化した方法である。

2. 研究の目的

本研究では、深海由来 (希少) 糸状菌を数種類の培地で培養し、その二次代謝産物から、PC screening により新規物質を取得することを目的とした。

3. 研究の方法

糸状菌は培地の種類によって異なる多様な二次代謝産物を生産することが分かっている。そこで、当研究所のこれまでの経験から、特に化合物生産性が良い 4 種類の培地を用いて希少糸状菌 12 株を培養した。培養後、等量のエタノールを加え、生産物を抽出した (EtOH 抽出物)。この EtOH 抽出物について、当研究所が保有する LC/MS で分析し、それぞれの生産物の物理化学的性状を獲得した。これらの情報を、天然物データベースである「Dictionary of Natural Products」と照合し、該当するものがない物質を新規物質と予想した (推定新規物質)。推定新規物質の生産菌を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製・単離した。NMR、質量分析等により構造解析を行い、構造が明らかになったものに対しては、様々な生物活性を評価し、その有用性を検討した。また、取得後の強力な活性を期待し、含窒素物質の選択的探索も行った。深海由来糸状菌培養液 1120 サンプルを TLC で展開後、含窒素物質生産菌の指標としてドラージェンドルフ試薬を噴霧した。陽性スポットを示したサンプルに対し、LC/MS で分析し、含窒素物質の指標として、分子量が奇数 (窒素ルール) となる物質を探索した。その結果、ペニシリウム属糸状菌 FKJ-0123 株およびペニシリウム属糸状菌 FKJ-0213 株が生産する物質を新規含窒素物質と推定した。推定新規含窒素物質は取得後、様々な生物活性を評価し、その有用性を検討した。

4. 研究成果

希少糸状菌由来の新規物質探索

希少糸状菌 12 株の培養液 (48 サンプル) を対象とした PC screening の結果、*Sarcopodium* sp. FKJ-0025 株が F38 培地で生産する物質を新規物質と推定した。そこで、FKJ-0025 株を F38 培地で 3 L 培養後、培養液を酢酸エチルで抽出し、得られた酢酸エチル抽出物をシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーにより精製した結果、2 つの新規物質 (sarcopodinol A および B と命名) を取得した。核磁気共鳴装置 (NMR)、高分解能質量分析装置 (HRESIMS) による構造解析の結果、sarcopodinol A および B はヒドロキシキノールを基本骨格とする新規物質であることが分かった (図 1)。Sarcopodinol A は、不斉炭素に結合する 2 級水酸基を有していたため、その絶対立体構造を改良モッシャー法によって解析した結果、その絶対配置を R であると決定した。Sarcopodinol A および B の抗菌活性および細胞毒性試験を行った結果、sarcopodinol A は抗菌活性を示さなかったが、Jurkat 細胞に $IC_{50} = 47 \mu\text{g/mL}$ で細胞毒性を示した。一方、sarcopodinol B は、HL-60 細胞、Jurkat 細胞、Panc1 細胞に対してそれぞれ $IC_{50} = 37, 47, 66 \mu\text{g/mL}$ で細胞毒性を示した。

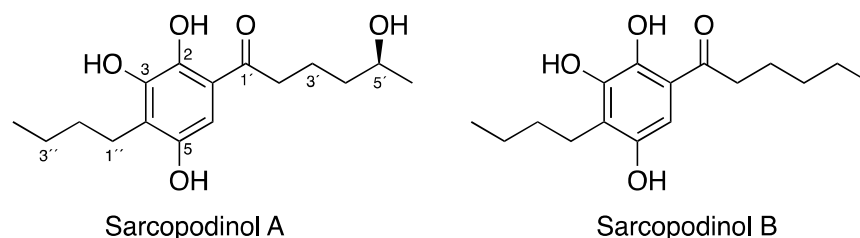


図 1. Sarcopodinol A および B の構造

深海由来糸状菌からの新規含窒素物質の探索

深海由来糸状菌培養液 1,120 サンプルから新規含窒素物質探索の結果、*Penicillium brevicompactum* FKJ-0123 株より推定新規含窒素物質 1 種、*Penicillium steckii* FKJ-0213 株より推定新規含窒素物質 2 種を見出した。

FKJ-0123 株を F36 培地 2 kg で培養後、培養物をメタノールで抽出後、酢酸エチルで分配抽出した (EtOAc 抽出物)。EtOAc 抽出物をシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーにより精製した結果、cipralphelin と命名した新規含窒素物質を取得した。NMR、HRESIMS による構造解析の結果、シンナモイル基を有するトリペプチドであることが明らかになった (図 2)。各種アミノ酸の絶対立体構造は改良マーフィー法にて決定した。Cipralphelin の活性探索を

行った結果、ヒドロキシラジカル消去活性を見出した。Cipralphelin を 1.0 mM で処理したとき、ポジティブコントロールのケルセチンと同等の活性を示した (図 2)。

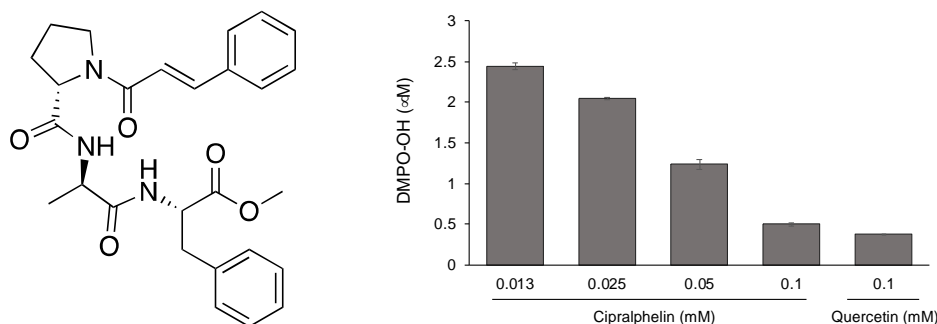


図 2. Cipralphelin の構造とヒドロキシラジカル消去活性

FKJ-0213 株は F8 培地で 1.5 L 培養後、培養液をメタノールで抽出後、酢酸エチルで分配抽出した (EtOAc 抽出物)。EtOAc 抽出物をシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーにより精製した結果、hatsusamide A と命名した新規含窒素物質を取得した。また、hatsusamide A 再取得のため 6 L で再培養し、精製した結果、hatsusamide A および hatsusamide B と命名した新規含窒素物質を取得した。また、同時に既知物質である tanzawaic acid B および trichodermamide C も取得した。NMR、HRESIMS による構造解析の結果、hatsusamide A は tanzawaic acid B と trichodermamide C がエステル結合した構造であることが、hatsusamide B は aspergillazine 類の新規類縁体であることが明らかになった (図 3)。Hatsusamide A は加水分解後、tanzawaic acid B と trichodermamide C の ¹H-NMR および比旋光度の比較により絶対立体構造までを、hatsusamide B は、ROESY、結合定数および推定生合成経路により相対立体構造までを決定した。

各種活性評価の結果、hatsusamide A は HeLa S3、A549、Panc1、HT29、H1299 細胞に対してそれぞれ IC₅₀ 15.0、13.7、12.9、6.8、18.7 μM で細胞毒性を示し、*Plasmodium falciparum* K1 株および FCR3 株に対してそれぞれ IC₅₀ 27.2、27.9 μM で抗マラリア活性を示した。興味深いことに、tanzawaic acid B と trichodermamide C はそれ自体では細胞毒性を示さなかった。Hatsusamide B は細胞毒性、抗マラリア活性ともに活性を示さなかった。

以上のように、深海由来 (希少) 糸状菌を探索源とした PC screening により、計 3 株の糸状菌から 5 種の新規物質の取得に成功した。また、これらの新規物質は取得後、様々な活性評価により有用活性が見出された。今後、さらなる活性探索を続け、応用研究へと発展することを期待したい。

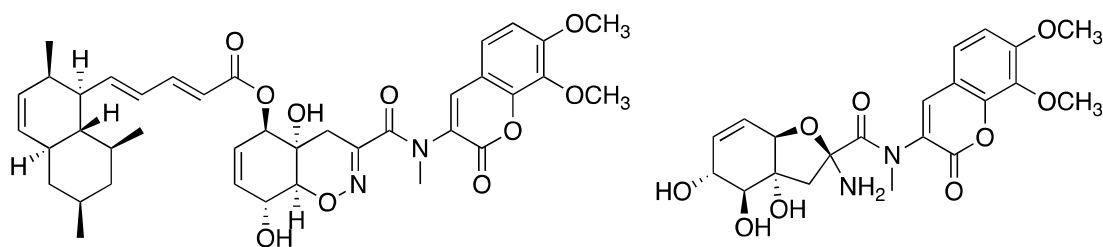


図 3. Hatsusamide A および B の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Matsuo H., Nonaka K., Nagano Y., Yabuki A., Fujikura K., Takahashi Y., Ōmura S., Nakashima T. New metabolites, sarcopodinols A and B, isolated from deep-sea derived fungal strain *Sarcopodium* sp. FKJ-0025. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **82**, 1323–1326 (2018).

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 松尾洋孝、野中健一、長野由梨子、藤倉克則、高橋洋子、大村智、中島琢自；深海由来糸状菌を探索源とした Physicochemical Screening による新規物質の探索；環境微生物系学会合同大会 2017；日本菌学会主催；仙台；2017 年 8 月 29 日～31 日

(2) 松尾洋孝、目代貴之、野中健一、長野由梨子、矢吹彬、藤倉克則、庭野吉己、高橋洋子、大村智、中島琢自；深海由来糸状菌 *Penicillium* sp. FKJ-0123 株が生産する新規シンナモイルト

リペプチドについて；2018 年度日本農芸化学会；日本農芸化学会主催；東京；2019 年 3 月 24 日～27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/souyaku-shigen/TOP.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：廣瀬友靖
ローマ字氏名：Hirose Tomoyasu
研究協力者氏名：岩月正人
ローマ字氏名：Iwatsuki Masato
研究協力者氏名：浅見行弘
ローマ字氏名：Asami Yukihiro
研究協力者氏名：野中健一
ローマ字氏名：Nonaka Kenichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。