

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：31305

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KK0173

研究課題名（和文）希少海洋微生物への特殊培養条件の応用と新規有用代謝物の探索

研究課題名（英文）Study on various culture investigations for rare marine-derived microorganisms

研究代表者

山崎 寛之（YAMAZAKI, Hiroyuki）

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70525344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：希少性の高い海洋細菌を利用した培養条件検討と二次代謝産物のLC/MS解析に基づいて、新規代謝産物の生産が期待される菌株の選別を行った。その結果、海洋放線菌Micromonospora sp. CNS697株の培養液中に新規staurosporine類縁体を、海洋細菌Bacillus sp. CNS660株の培養液中に新規macrolactin類縁体を低収量ながら検出した。また、サンディエゴと沖縄県で分離した海洋糸状菌計22株に対し、種々の条件下で培養したライブラリーを生物活性でスクリーニングしたところ、抗真菌活性を有し、特徴的なHPLCプロファイルを示す菌株を6株見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋資源を探索源とした天然物化学研究はスキューバダイビングの普及と共に発達した歴史の浅い分野であるが、ハラヴェンやヨンデリスといった海洋生物由来の抗がん剤が日本においても既に認可されている。これらに続く医薬シーズの提供が期待される海洋微生物を対象に、その物質生産能を効率的に活用する手法探索に本研究では取り組んだ。本検討から得られる成果により、海洋微生物二次代謝産物の多様性拡大が牽引され、医薬分野に重要な創薬シーズの発展に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We have screened marine-derived bacteria with the ability to produce new secondary metabolites on the basis of various culture investigations and LC/MS analyses. Our results obtained gave the detection of new staurosporine derivatives by Micromonospora sp. CNS697 and new macrolactin derivatives by Bacillus sp. CNS660.

Culture broth library of marine fungal strains collected at San Diego and Okinawa was constructed by several culture conditions and evaluated for our bioassays, resulting in the identification of six strains with anti-fungal activities and interesting HPLC profiles.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：海洋天然物化学 希少海洋微生物 生物活性物質 特殊培養条件 誘導生産 二次代謝産物

## 1. 研究開始当初の背景

生薬成分や微生物二次代謝産物に代表される天然由来化合物（天然物）は、医薬品のリードとして広く医療に貢献してきたが、陸上由来の新規有用天然物の発見数は年々減少傾向にあり、多くの製薬企業が天然物を基盤とした創薬研究から撤退している。その一方で、近年の主流であった化学合成品による創薬もまた、多様性の低さが問題となり、画期的な新薬の発見は困難な状況にある。このような背景から、新たな創薬資源の開拓が求められており、未利用な生物資源である海洋生物をターゲットにした天然物化学研究（海洋天然物化学）が加速的に行われている。

海洋天然物化学は、スキューバダイビングの普及に伴い、20世紀後半から活発に研究されてきた。海洋は地球表面上の約70%を覆い、陸上とは全く異なる生活環境を有するため、海に生息する無脊椎動物（海綿、ホヤ、軟体サンゴなど）や微生物からは、陸上生物に無い特異な構造と強力な生物活性を有する天然物が次々と発見されてきた。実際に、神奈川県三浦半島で採集されたクロイソカイメン *Halichondria okadai* 由来の halichondrin B をリードとしたエリブリン（商品名：ハラヴェン）やカリブ海産の群体ボヤ *Ecteinascidia turbinata* より得られたトラベクテジン（商品名：ヨンデリス）が、本邦においても抗がん剤として認可されている。このように、海洋生物を創薬シーズとした研究は半世紀程度の歴史ではあるが、医薬品の重要な供給源として急速に進展している。一方で、現在までに海洋微生物の代謝産物をリードとした医薬品は実用化されていないが、2003年にバハマ沖沿岸の海洋環境より分離された海洋放線菌 *Salinospora tropica* が生産する salinosporamide A は、20S プロテアソームを強力かつ選択的に阻害することが分かり（Fenical, W. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, 42, 355–357）、2006年より多発性骨髄腫の治療薬として臨床試験（phase I）が行われている。また、2013年には、悪性黒色腫に対して選択的な抗がん活性を示す seriniquinone A が希少な海洋細菌 *Serinicoccus* sp. の培養液中から単離され、その標的分子が皮膚細胞特異的に生産される抗菌ペプチドの一種 dermcidin であると世界で初めて突き止められた（Fenical, W. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2014**, 111, 14687–14692）。Dermcidin を標的とした抗がん剤の開発は、アメリカ国立研究所（NCI）およびエーザイとの共同研究により、前臨床試験が実施されている。

微生物資源における近年の動向としては、ゲノム解析技術の発展により、二次代謝産物生産に関わる多くの生合成遺伝子群が眠った状態にあると科学的に解明され（Ikeda, H. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 526–531）、通常の研究室レベルで用いられる培養条件下で生産される微生物代謝産物が、全体の一部であることが明らかになった。そこで、物質生産に関わる生合成遺伝子の休眠状態を解除する手法開発に注目が集まり、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）やDNAメチル基転移酵素（DNMT）などのエピジェネティック因子に作用する低分子制御物質を利用したケミカルエピジェネティクス（Cichewicz, R.H. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 36, 1199–1213）、一つの菌株に数種類の培地を検討する OSMAC 法や複数の異なる微生物を混合して培養する共培養法等が報告されてきた（Zarins-Tutt, J.S. *et al.*, *Nat. Prod. Rep.*, **2016**, 33, 54–72）。申請者も国内での研究において一貫して、休眠状態にある微生物の生合成遺伝子を覚醒させる培養条件を種々検討し、簡便に行える有用な培養方法を提示してきた（Yamazaki, H. *Yakugaku Zasshi*, **2019**, 139, 663–672）。本申請課題では、海綿やホヤといった海洋無脊椎動物に続き、今後益々重要な役割を担ってくと考えられる海洋由来微生物の物質生産能を最大限に活かすため、海洋細菌（主に放線菌）や海洋糸状菌の培養条件研究に着手した。

## 2. 研究の目的

上述したように、近年、微生物が有する休眠生合成遺伝子が注目され始め、ケミカルエピジェネティクスやゲノムマイニングといった新しい概念に基づいた物質生産法が研究されている。申請者が実施する研究課題では、近年の新手法と様々な培養条件を融合させ、新規有用物質を効率的に生産させる新たな培養法の確立に取り組んでいる。一方、未利用資源として海洋に生息する微生物（主に放線菌や糸状菌）は、様々な珍しい二次代謝産物を生産することが報告されている。本研究では、海洋環境（海洋資源）から分離された微生物に対し、種々の培養手法（申請者が構築した培養手法も含む）を組み合わせ適応させ、創薬に繋がるユニークな新規生物活性物質の生産誘導を目指す。本研究により見出される成果は、天然物を基盤とした創薬分野を促進させ、医薬品開発に繋がるリード化合物の発見・提供に進展するものと期待される。

## 3. 研究の方法

- (1) スクリプス海洋研究所が所有する希少な海洋細菌ライブラリーの中から、分類学解析、生物活性（抗がん活性や抗 MRSA 活性）および LC/MS 解析によってスクリーニングされた菌株を用いて、種々の培養条件検討を行った。得られた培養液の代謝物の変化を HPLC-DAD および LC/MS により比較して分析した。条件検討により代謝産物の生産に変化が確認された菌株については、適切な条件を用いて大量培養を行い、通常条件の生成物と特殊条件で得られる生成物を単離して比較する。最終的には、質量分析や NMR などの各種スペクトル解析を駆使して、立体を含めた化学構造を決定する。
- (2) サンディエゴ（米国）や沖縄県本島において、海洋に由来する微生物（糸状菌や放線菌）の分離を行い、本実験に適応した。

上記の検討で得られた微生物培養液を用いて、生活習慣病および感染症に着目した以下の生物活性スクリーニングを行った。

- (3) プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) 1B は、インスリンやレプチンによる細胞内シグナル伝達を負に制御する因子であり、その阻害剤は 2 型糖尿病や肥満症のみならず 1 型糖尿病に対しても有望な治療薬となると考えられている。活性試験に用いる酵素としては市販のヒト PTP1B (Enzo Life Sciences) を使用する。基質には *p*-ニトロフェニルリン酸化ナトリウム (*p*NPP, Sigma) を用いて、*p*NPP の脱リン酸化による発色の吸光度 (405 nm) を測定し、試験サンプルによる酵素阻害活性を評価する。同様に、T 細胞 PTP (TCPTP)、CD45 チロシンホスファターゼ (CD45) や両特異性型 *vaccinia* H-1-related phosphatase (VHR) 等のタイプの異なるホスファターゼに対する選択性評価も実施する。
- (4) 深在性真菌症の原因菌である 4 種の病原真菌 *Candida albican*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* および *Rhizopus oryzae* や耐性菌として社会問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗菌活性はペーパーディスク法と微量液体希釈法による試験を行う。また、非感染性で早生育型の *Mycobacterium smegmatis* を結核菌 (*M. tuberculosis*) の代替検定菌として同様に評価する。得られた活性物質に関しては、結核菌と同じ遅生育型の *M. bovis* (ウシ型結核菌) や非結核性抗酸菌症として近年問題となっている MAC 症起因菌 (*M. avium* と *M. intracellulare*) も用いて再評価を行う。必要に応じ、当研究グループで構築したカイク簡易 *in vivo* 感染モデルを各種病原微生物に応用し、サンプル投与による延命効果を検証する。

#### 4. 研究成果

- (1) CNS697 株は、フィジー近海の海底泥より分離された放線菌で、形態学的な分類より *Micromonospora* に属する一放線菌と推定している。まず、海水に対する適応性を確認するため、海水濃度を 0, 25, 50, 75, 100% と振った海水培地による予備検討を行い、生育が最適だった 75% 海水培地による生産培養を 20 L のスケールで実施した。得られた培養液に化学樹脂である XAD-7 を加え、3 時間攪拌した後、回収した樹脂をアセトンで抽出することで、抽出エキスを 2.0 g 得た。次いで、ODS カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、高極性画分より lumichrome を、低極性画分より 3 成分の staurosporine 誘導体を単離した (Tanida, S. *et al.*, *J. Antibiot.*, **1989**, 42, 1619–1630)。低収量ながら、staurosporine 類と同様の UV スペクトルを有し、報告例のない分子量を示す代謝産物の生産が LC/MS 解析から確認されており、新規の staurosporine 類と期待して大量培養による成分取得を検討している。
- (2) CNS660 株も、フィジー近海水深 30 m より採取された海泥から分離され、形態学的特徴より *Bacillus* に属する一細菌と推定している。本株においても海水培地に対する適応が認められ、最適な生育を示す 75% 海水培地による 20 L の生産培養を進めた。CNS697 株と同様の抽出を行い、シリカゲルカラムにより分画し、ODS カラムを用いた HPLC 精製より 2 成分のマクロライド化合物 macrolactin A と S を単離した (Gustafson, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 7519–7524; Lu, X.-L. *et al.*, *Nat. Prod. Res.*, **2008**, 22, 342–347)。また、365 nm のみに UV 吸収帯を有する代謝産物を微量成分として得ており、テトラエン部位を持つ新規 macrolactin 類と推定している (図 1)。

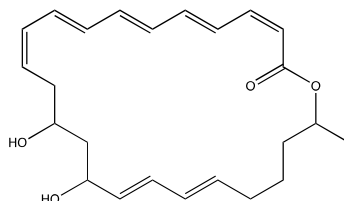


図 1. 新規 macrolactin 類の推定構造

また、*Streptomyces* に属する放線菌 CNS691 株の 20 L 培養と抽出実験も終わっており、得られた抽出エキスの LC/MS 解析より、興味深い成分の検出を確認している。

- (3) AJS044 株および AJS183 株は、ラホヤ海岸の棧橋近海より分離された希少な海洋細菌で、代謝産物の単離報告例がほとんど見当たらない。上記菌株と同様に、両株においても、海水培地への依存性が確認されたため、75% 海水培地を用いた生産培養を各 10 L 行った。両菌株からは共に、トリプトファン代謝物やシンプルなジケトピペラジン類が主に単離され、単独培養での物質生産能は高くないと考えられた。そこで、本菌株類を利用した共培養実験を上述した CNS697 株と CNS660 株に応用したところ、代謝産物産生への影響が LC/MS 解析により確認されている。

- (4) ラホヤ海岸で採集した海泥、海藻や海洋生物（カニやイソギンチャク）の表面を滅菌海水で十分に洗浄し、各サンプルをすり潰した後に得た懸濁液を寒天培地（含海水）に塗布することで、各海洋資源に内在する 11 株の海洋系状菌の分離に成功した（TMPU1901–1911 株）。また、同様に、沖縄県本島の海洋資源より海洋系状菌 11 株を分離した（TMPU1912–1922 株）。

これらの海洋系状菌を用いて種々の培養条件を検討し、得られた培養液ライブラリーの生物活性評価と HPLC-DAD 分析を行った。検討の結果、ラホヤ海岸の海藻より分離した TMPU1908 株（海水培地、振とう条件）の培養液中に *R. oryzae* に対する抗真菌活性が確認された。同時に分離された TMPU1905 株（海水培地、振とう条件）には顕著な生物活性が確認されなかったが、臭化ナトリウム（NaBr）を添加した培養条件（振とう培養）にて、特異的な代謝産物の生産が検出された。

沖縄県万座毛海岸で分離した 6 株のうち、TMPU1917 株、1918 株および 1919 株の NaBr 添加培養液（振とう条件）にのみ *C. albicans* に対する抗真菌活性が認められた。加えて、TMPU1917 株（海水培地、振とう条件）と 1919 株（NaBr 添加培地、振とう条件）では抗 *C. neoformans* 活性が、TMPU1921 株と 1922 株（共に海水培地、振とう条件）では抗 *R. oryzae* 活性が確認された。

TMPU1921 株については、2 L スケールで再培養を行い、*R. oryzae* に対する抗真菌活性を指標に精製を進めた結果、主な活性物質として 6-methylsalicylic acid を単離した。本化合物は、MIC 値 6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で *R. oryzae* の生育を阻害し、本活性は初めての知見であった。類縁物質 salicylic acid が乾癬や白癬に対する医薬品としても認可されていることもあり、今後、カイコを用いた *in vivo* 感染モデルを用いて評価を進める予定にある。本菌株に関しては、6-methylsalicylic acid を含む周辺のカラム画分においても目的の活性を確認しているため、他の活性成分についても分離を行なっている。

他の候補菌株の大スケールによる培養実験も既に終了しており、順次目的の生物活性を示す代謝産物の精製と構造解析を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki, Yagi Akiho, Akaishi Masanari, Kirikoshi Ryota, Takahashi Ohgi, Abe Tatsuki, Chiba Satomi, Takahashi Kenta, Iwakura Natsuki, Namikoshi Michio, Uchida Ryuji	4. 巻 59
2. 論文標題 Halogenated cladosporols produced by the sodium halide-supplemented fermentation of the plant-associated fungus <i>Cladosporium</i> sp. TMPU1621	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 1913 ~ 1915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.03.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rotinsulu Henki, Yamazaki Hiroyuki, Sugai Shino, Iwakura Natsuki, Wewengkang Defny S., Sumilat Deiske A., Namikoshi Michio	4. 巻 72
2. 論文標題 Cladosporamide A, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, produced by an Indonesian marine sponge-derived <i>Cladosporium</i> sp.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 779 ~ 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s11418-018-1193-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki, Takahashi Kenta, Iwakura Natsuki, Abe Tatsuki, Akaishi Masanari, Chiba Satomi, Namikoshi Michio, Uchida Ryuji	4. 巻 71
2. 論文標題 A new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory -pyrone-type polyketide from Okinawan plant-associated <i>Aspergillus</i> sp. TMPU1623	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 745 ~ 748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41429-018-0054-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki, Takahashi Ohgi, Kirikoshi Ryota, Yagi Akiho, Ogasawara Teruki, Bunya Yuki, Rotinsulu Henki, Uchida Ryuji, Namikoshi Michio	4. 巻 73
2. 論文標題 Epipolythiodiketopiperazine and trichothecene derivatives from the Nal-containing fermentation of marine-derived <i>Trichoderma</i> cf. <i>brevicompactum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-0314-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wewengkang Defny S., Yamazaki Hiroyuki, Takahashi Moe, Togashi Toshiki, Rotinsulu Henki, Sumilat Deiske A., Namikoshi Michio	4. 巻 -
2. 論文標題 Production of an -pyrone metabolite and microbial transformation of isoflavones by an Indonesian Streptomyces sp.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Asian Natural Products Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10286020.2019.1635588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazaki Hiroyuki	4. 巻 139
2. 論文標題 Search for Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from Marine Organisms and Induced Production of New Fungal Metabolites by Modulating Culture Methods	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 663 ~ 672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 八木瑛穂, 山崎寛之, 内田龍児
2. 発表標題 カイコ Mycobacterium avium complex 症モデルの構築と天然化合物ライブラリーの評価
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎寛之
2. 発表標題 インドネシアにおける海洋天然資源の調査研究および微生物による含ハロゲン二次代謝産物の効率的生産
3. 学会等名 日本生薬学会 第66回年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木 瑛穂、山崎 寛之、斉藤 杏里、浪越 通夫、内田 龍児
2. 発表標題 海洋糸状菌Trichoderma cf. brevicompactum TPU199株が生産する新規trichothecene類の抗真菌活性
3. 学会等名 第58回 日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 優雅、千葉 まれの、山崎 寛之、内田 龍児
2. 発表標題 放線菌TMPU-A0004株が生産する抗真菌活性物質
3. 学会等名 第58回 日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 優雅、八木 瑛穂、山崎 寛之、内田 龍児
2. 発表標題 放線菌TMPU-A0287株が生産する抗真菌活性物質に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北医科薬科大学 薬学部 天然物化学教室 ホームページ <a href="http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/tennen/index.html">http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/tennen/index.html</a> Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego <a href="https://scripps.ucsd.edu/">https://scripps.ucsd.edu/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	Fenical William  (Fenical William)	University of California, San Diego・Center for Marine Biotechnology and Biomedicine, Scripps Institution of Oceanography・Professor	