

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14935

研究課題名(和文)糸状菌の休眠遺伝子を覚醒するキノ酸を利用した新規天然化合物の探索

研究課題名(英文) Search for novel natural compounds using quinic acid that expresses silent genes of filamentous fungi

研究代表者

野中 健一 (Nonaka, Kenichi)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：60421369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物内生糸状菌100株と土壌糸状菌100株を4種類の生産培地(各キノ酸添加・無添加)で培養し、糸状菌培養液を800サンプル調整した。キノ酸の化合物生産に与える影響の評価をキノ酸の有無による色調変化、6種類の病原菌に対する抗菌活性の変化で調査した。特に変化の大きかった液体培地に関しては、200株中113株において色調の変化が見られ、200株中114株において抗菌活性に変化が見られた。

また上述の検討の過程でCladosporium sp. FKI-8232株はキノ酸添加時のみに低分子化合物が大量に生産誘導される事が判明した。本化合物の構造を決定したところ、新規のマクロライド系化合物であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未利用遺伝子を発現させるために、直接遺伝子を操作する遺伝子工学的手法、異種糸状菌の相互作用を利用した共培養法、糸状菌の光受容体に作用する波長領域を用いた光照射培養法やケミカルエビジェネティクスなど、世界中で様々な方法が検討されて来た。しかし、いずれの方法でも大量の糸状菌サンプルを扱う大規模スクリーニングに利用する事は出来ない問題点がある。そこで、申請者らが考案したキノ酸添加培養法で新規化合物を取得するという試みは世界的に見ても実施例がなく、汎用性の面からも生物活性を指標とした大規模スクリーニングに利用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：100 strains of fungal endophytes and 100 strains of soil fungi were cultured in four types of production media (each with or without addition of quinic acid) to prepare 800 samples of fungal culture broths. The effect of quinic acid on the production of compounds was evaluated by changing the color tone depending on the presence or absence of quinic acid and the change in antibacterial activity against 6 types of pathogenic bacteria. Regarding the liquid medium that showed a large change, the color tone was changed in 113 of 200 strains and the antibacterial activity was changed in 114 of 200 strains.

Also, in the process of the above-mentioned examination, it was found that the Cladosporium sp. FKI-8232 strain induced production of low-molecular compound only when quinic acid is added. When the structure of this compound was determined, it was a novel macrolide compound.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 遺伝子発現 二次代謝 天然化合物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界初の抗生物質であるペニシリンが青カビの 1 種から発見されて以来、2010 年までに 15,000 を超える化合物が糸状菌から発見されており、さらに毎年 600 を超える新規化合物が糸状菌から発見されている (Berdy *J Antibiot*, 2012)。そのため、糸状菌は放線菌と並び微生物創薬において最も重要な化合物探索源である。申請者の研究グループにおいても、殺虫剤 inscaris のリード化合物である pyripyropene、脂肪酸合成阻害剤 cerulenin など数多くの新規生物活性物質を糸状菌より発見して来た (Omura *et al. J Antibiot*, 1993; Sano *et al. J Antibiot*, 1967)。

一方、比較的容易にゲノム情報を入手出来るようになった現在では、糸状菌が保有している二次代謝産物合成遺伝子の 1~2 割程しか発現出来ていない事が明らかになって来ており、多くの生合成遺伝子は休眠状態のままであることが分かって来た (Keller *et al. Nat Rev Microbiol*, 2005)。そこで、このような休眠状態の生合成遺伝子を発現させることができれば、新規天然化合物の取得が期待される。休眠遺伝子を発現させるために、直接遺伝子进行操作する遺伝子工学的的手法、異種糸状菌の相互作用を利用した共培養法、糸状菌の光受容体に作用する波長領域を用いた光照射培養法など、世界中で様々な方法が検討されて来た。

しかし、遺伝子工学的的手法は操作が複雑で膨大な時間と費用を要するため、大量の糸状菌サンプルを扱う大規模スクリーニングに利用する事は出来ない問題点がある。また、異種糸状菌の共培養法ではどのような分類群の組合せでも有効というものではなく、組合せの規則性も解明されていないため、理論的に組合せる菌の種を決定する事が困難である。

この様な中、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤という低分子化合物を培地に添加する非常に簡便な方法で、ヒストンを遺伝子発現しやすい構造にするケミカルエピジェネティクスという方法が確立され、この方法での見出された新規化合物の報告数が増えつつある (e.g., Asai *et al. Org Lett*, 2012)。しかしながら、この方法においても供試菌株の 10%未満でしか有効でないという問題点がある (浅井 & 大島, 化学と生物, 2013)。

### 2. 研究の目的

HDAC 阻害剤を培地に添加する非常に簡便な方法で化合物探索を行うケミカルエピジェネティクスは非常に効果的であるものの、供試菌株の 10%未満でしか有効でないという問題点がある。そこで、本申請では HDAC 阻害剤に代わる低分子化合物として申請者が見出したキナ酸を利用する計画を立て、キナ酸が化合物生産に及ぼす有効性を示す糸状菌分類群の解明、

発酵技術と機器分析を駆使した汎用性の高い培養条件の決定、生物活性を指標としたスクリーニングでの効果の解明を目的とし、新規医薬品リード化合物の取得を目指す。

### 3. 研究の方法

申請者は既に事前検討として、キナ酸結合領域を有する転写抑制因子を保有していると確認した *Penicillium* 属糸状菌を用いて、液体培地へのキナ酸添加量と化合物生産の変化について検討した。添加濃度を 0.1%~1%まで段階的に検討した結果、1%添加時に抗菌活性や HPLC プロファイルで無添加時と顕著な違いがみられた。

当グループの 10,000 株の糸状菌ライブラリーから任意に選択した植物内生糸状菌 100 株と土壌糸状菌 100 株を 4 種類の生産培地 (液体培地・固体培地:各 1%キナ酸添加・無添加)で培養し、100% EtOH で化合物抽出を行うことで糸状菌培養液サンプルを計 800 サンプル調整した。尚、液体培養は 27 で 6 日間、固体培養は 25 で 13 日間培養を行った。

キナ酸の化合物生産に与える影響の評価: 上述の培養液のキナ酸の有無による色調変化、6 種類の検定菌 (*Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas oryzae*, *Candida albicans*, *Mucor racemosus*) に対する抗菌活性の強弱の変化を調査した。

またキナ酸添加時のみに低分子化合物が大量に生産誘導され際は、大量培養を行い、目的の交合物を単離した後に NMR, MS 等の機器分析で構造を決定した。

### 4. 研究成果

色調変化においては、植物内生菌では、液体培地で 100 株中 45 株、固体培地では 100 株中 19 株において変化が見られた。一方、土壌糸状菌では、液体培地で 100 株中 68 株、固体培地で 100 株中 34 株において変化が見られた。6 種類の病原菌に対する抗菌活性の変化においては、植物内生菌では、液体培地で 100 株中 25 株、固体培地では 100 株中 10 株において変化が見られた。一方、土壌糸状菌では、液体培地で 100 株中 89 株、固体培地で 100 株中 56 株において変化が見られた。

変化の大きかった液体培地に関しては、200 株中 113 株 (56.5%) において色調の変化が見られ、200 株中 114 株 (57%) において抗菌活性に変化が見られた。これまで糸状菌の二次代謝の発現に使用されて来た低分子化合物は全試験菌の 10%以下であったため、キナ酸は従来の低分子化合物と比べ非常に汎用性が高いことが判明した。

また上述の検討の過程で *Cladosporium* 属糸状菌の 1 株がキナ酸添加時のみに低分子化合物が大量に生産誘導される事が判明した。キナ酸で生産誘導された低分子化合物を機器分析で構造を決定したところ、新規のマクロライド系化合物であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 協力 者	岩月 正人  (Iwatsuki Masato)		