

令和 2 年 6 月 9 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：18K14936

研究課題名（和文）糸状菌の化合物生産能を解放するアンロッカー物質の探索

研究課題名（英文）search for an "unlocker" compounds from microbial secondary metabolites which release the ability of secondary metabolites production in fungi.

研究代表者

酒井 一成 (sakai, kazunari)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：90760075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者はユニークな構造を有する大村智記念研究所が保有する天然化合物ライブラリー約794化合物を用いて糸状菌の化合物生産能の制限を解除する低分子化合物（アンロッカー）の取得および取得したアンロッカーを利用し、糸状菌の二次代謝能を解放することで生産する天然有機化合物を単離、構造決定をすることを目的として研究を行った。その結果、74化合物がアンロッカー候補として選出された。様々な検討の結果、アンロッカーを見出した。アンロッカーの濃度依存的に新たに生産される化合物の量が変化することが示され、固体培地上でも培養性状に変化が現れることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はアンロッカーの探索が主題だが波及効果が大きい。現在、遺伝子工学的手法を用いて新たな生合成遺伝子を探索している研究施設は多い。しかし、本課題の学術的問いである「二次代謝産物能を制御している化合物は微生物が生産しているのではないか?」、「二次代謝産物能を制御している既存のターゲット以外に二次代謝能を制御しているタンパク質はあるのか?」という研究はあまりされていない。また、本研究によって得られたアンロッカーを用いることで既存または保有している糸状菌からも新たな有用化合物が生まれ、医薬品業界並びに農薬業界に多大な貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The applicant researched for search for unlocker compounds from microbial secondary metabolites which releases the ability of secondary metabolites production in fungi. The natural compounds library (794 compounds) which had Omura satoshi memorial institute were used as a search source for this research. As a result, we selected 74 compounds as candidates for unlocker. And we farther evaluate for unlocker, as a result, we found unlocker compound. The new production compound was changed by unlocker dose-dependent. Furthermore, It was clarified that the culture properties changed even on the solid medium.

研究分野：天然物創薬

キーワード：糸状菌 二次代謝産物 休眠遺伝子の解錠

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに開発されてきた医薬品の6割は天然物に由来している(*J. Nat. Prod.*, 79, 629 (2016))。そのため、薬剤開発のリード化合物として、合成では容易に取得できない骨格を有する天然有機化合物の発見は非常に魅力的であり、望まれ続けている。申請者の所属する研究グループでは微生物に特化した創薬研究を推進することで、エバーメクチンを始め多くの医薬品・農薬を上市してきた。その中でも、糸状菌は10万種を超える大分類群であり、今までに15,000を超える二次代謝産物の報告(*J. Antibiot.*, 65, 385 (2012))がある。そのため、糸状菌二次代謝産物は今後の天然物創薬に必要な不可欠な微生物資源である。近年のゲノム解析技術の進歩によりゲノム上には制限を受け利用できていない遺伝子群の存在が明らかになった。さらに、取得できているのは全生合成遺伝子群の1~2割程度の二次代謝産物のみであることが明らかとなった(*生物工学*, 89, 313 (2011), 表1)。

表1 *Aspergillus* 属の生合成遺伝子数と取得されている化合物数

	生合成遺伝子	取得できている化合物	未利用生合成遺伝子(%)
<i>A. oryzae</i>	55	5	90.9 (50)
<i>A. fumigatus</i>	36	18	50.0 (18)
<i>A. nidulans</i>	49	5	89.8 (44)

A: *Aspergillus*

状況を打開すべく、遺伝子工学的的手法による生合成遺伝子の強制発現などが行われてたが、手間やコストがかかり過ぎてしまう欠点があった。そこで簡便で低コストな方法としてエピジェネティック制御に関するヒストン脱アセチル化酵素などの酵素に対する阻害剤の添加する方法が注目された。だがこれらの酵素阻害剤を使用した化合物生産能の解放は現段階で1割程度と汎用性に難があることが明らかとなった。申請者の所属する研究グループでの検討株でも酵素阻害剤を添加することで二次代謝プロファイルに変化が生じた糸状菌は2割程度であった(未発表)。また、*Candida albicans* は低分子化合物がクオラムセンシングを介して酵母型から菌糸型に形態変化を起こすことを示唆する報告がある(*App. Environ. Microbiol.* 67, 2982 (2001))。

2. 研究の目的

(1) ユニークな構造を有する天然有機化合物および微生物培養抽出物ライブラリーを利用し、LC/ESI-MS データを指標に糸状菌の化合物生産能の制限を解除する低分子化合物 (アンロッカー) の取得する。

(2) 取得したアンロッカーを利用し、糸状菌の二次代謝能を解放することで生産する天然有機化合物を単離、構造決定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験糸状菌は二次代謝プロファイルが明確でありかつアンロッカーによって新たな化合物の生産が確認しやすい糸状菌として *Talaromyces siamensis* FKA-61 株を選択した。本試験糸状菌は当研究室において共培養法を用いることで通常培養では作らない化合物を生産する(*J. Antibiot.*, 69, 573 (2015))。そのため、本試験菌は外部からの刺激などによって二次代謝プロファイルに変化が生じることが明らかとなっている糸状菌である。その際に特定の培地で生産される二次代謝プロファイルを網羅的に解析済みであることから本研究に適した糸状菌である。先にも述べたように、化合物ライブラリーだけではなく微生物培養液からもアンロッカーの取得を目的としているため1stスクリーニング、2ndスクリーニングを導入し、アンロッカーの取得を簡便にした(Fig. 1)。1stスクリーニングでは糸状菌の分子形成が抑制されると二次代謝も抑制される特徴を利用し、Potato dextrose broth (PDB, Difco) に高純度アガーを加え FKA-61 を植菌

することで分生子形成を抑制する検定プレートを作成した。化合物ライブラリー(約 1,000 化合物)から化合物を選択し、染み込ませたペーパーディスクを作成した検定プレートで評価する。

Fig. 2 の破線のようにペーパーディスクの周りに色素円を形成した化合物は分生子形成を促進し、ペーパーディスクの周囲に色素円を形成したと考え通過とする。2nd スクリーニングでは、実際に PDB で液体培養を行い、LC/ESI-MS で二次代謝プロファイルの変化を検出し、変化の見られた化合物をアンロッカーとする。この際に、メタボロミクスなどのプロファイリング用に開発された Marker View™ というソフトウェアを用いて二次代謝プロファイルの解析を行う。Marker View™ は散布図のように代謝物をプロットし、A という代謝物由来のピークがどのサンプルに入っているかを明確にしてくれるため本研究に最適なソフトウェアである。このソフトウェアを用いて化合物または微生物培養抽出物添加の有無で二次代謝プロファイルと比較することで評価する。本項目で使用する生産培地として使用する PDB 培地、高純度アガー、機器分析に使用する溶媒、HPLC 分析カラムを本研究費で購入する。

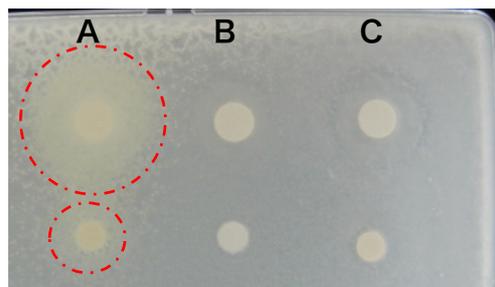


図1 培養液で色素生産が認められたプレート例 左から培養液 A, B, C 破線で囲った箇所のみ色素生産を確認した。

(2) 得られたアンロッカーの汎用性試験を行う。

現在、前述で述べたようにエピジェネティック制御で使われる酵素阻害剤を使用しても 1 割程度にしか効果を示していない。そこで本研究課題では糸状菌にユニバーサルに効果のあるアンロッカー発見のために、(1) で得たアンロッカーの汎用性を検定することとした。試験菌とは科または目レベルで異なる糸状菌 10 株を用いてアンロッカーの評価を行う。10 株中 3 株以上に対して二次代謝プロファイルが異なる化合物を高汎用性アンロッカーとした。

4. 研究成果

大村天然化合物ライブラリー794 化合物を評価した結果、74 化合物が寒天プレート上に変化が現れた。これは全体の 9.8%でありヒット率としては多いのではないかと考えた。またこの変化には阻止円の周りにできる色素円も含まれている。ここで選択した 74 化合物から阻止円がなく色素円径や分生子円径が大きな物さらに保有量の多いものから順次液体培養(2 次スクリーニング)を行った。

添加サンプル DMSO に溶かし、終濃度 10 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ になるように 10 μL 添加した。また添加した化合物は化合物ライブラリーに 50 mg 以上ある化合物を優先的に選択した。現在までに 12 化合物を評価し、LC/UV 分析で濃度依存的に新たなピークが現れた化合物は化合物 A のみであった。化合物 A を添加時の LC/UV チャートを図 2 下枠内左に示した。図 2 下枠内左に示した griseofulvin、化合物 B、thailandolide B、化合物 A のピーク面積を化合物 A の添加量ごとにグラフ化した(図 2 下枠内右)。これらの結果より化合物 A を FKA-61 と培養することで thailandolide B では DMSO のみの添加時と比べて約 12 倍ほど化合物生

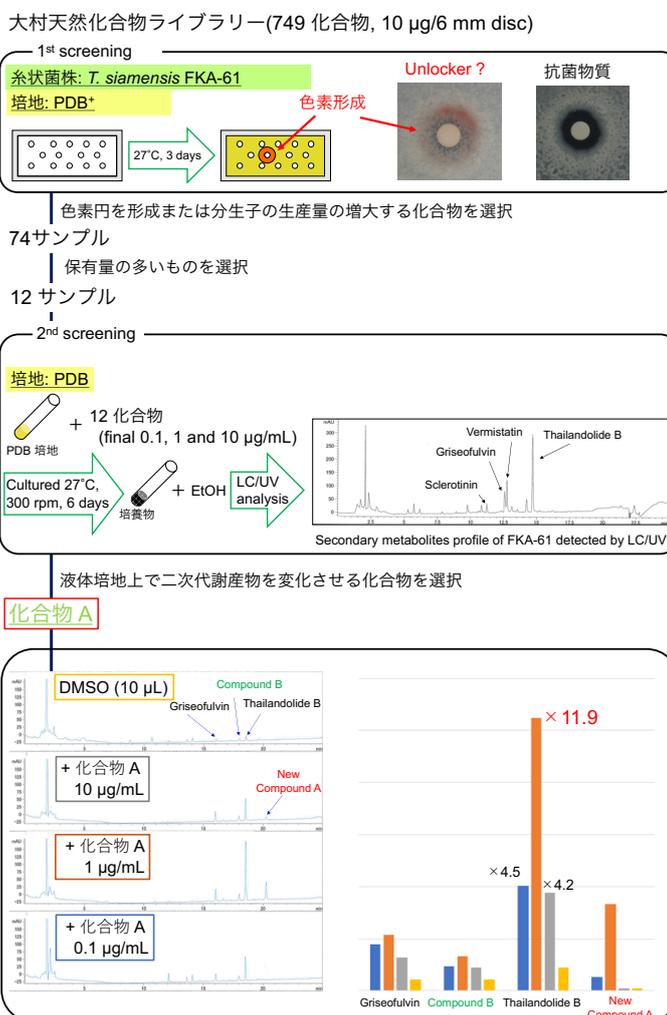


図2 アンロッカー探索のスキームおよび結果

産量が増幅していることがわかる。さらに今まで確認できていなかった New compound も確認できた。今後は新たに出現した New compound の取得および構造決定を行う予定である。

さらに化合物 A を添加した培地での培養性状比較を行う目的で化合物 A を添加した寒天培地に FKA-61 を植菌し培養性状の観察を行った。その結果、図 3 左に示した MEA 培地では DMSO や H₂O では白い培養性状にもかかわらず化合物 A を添加することで赤い色素が濃度依存的に生産されるだけでなく菌糸の広がりも抑制され硬いコロニーが形成されていることが明らかとなった。また LcA でも同様に化合物 A の濃度が濃くなるに従って菌糸の成長抑制が示された。これらの結果から化合物 A は *T. siamensis* FKA-61 に対して菌糸成長抑制を示すことが明らかとなった。今後これらと化合物生産に対する影響が関係しているかなどの研究を進める予定である。

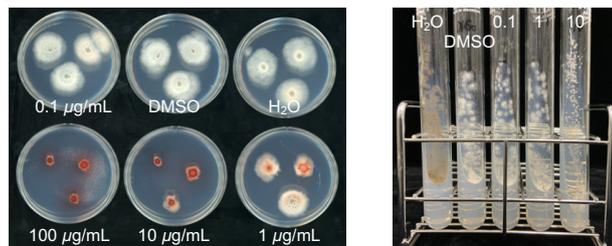


図 3 MEA(左)およびLcA スラント(右)に化合物 A を添加した培地に FKA-61 を植菌した 時の培養性状

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazunari Sakai, Mutsumi Nagoya, Eri Arakawa, Yoshihiro Watanabe, Masato Iwatsuki, Kenichi Nonaka
2. 発表標題 Search for unlocker compounds from microbial secondary metabolites which releases the ability of secondary metabolites production in fungi
3. 学会等名 Asia Mycological Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 一成, 名見耶 睦, 荒川 絵美, 渡邊 善洋, 岩月 正人, 野中健一
2. 発表標題 微生物が生産する糸状菌の二次代謝産物能の制限を解除するアンロッカーの探索
3. 学会等名 第32回 北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

〔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	野中 健一 (Nknaka Kenichi)		
研究協力者	岩月 正人 (Iwatsuki Masato)		