

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14939

研究課題名(和文)天然物化学的手法による植物内生菌の生態解明と有用資源としての活用へのアプローチ

研究課題名(英文)Elucidation of the ecology of plant endophytic fungi by natural product chemistry and approaches to their utilization as useful resources

研究代表者

中島 健一 (Nakashima, Ken-ichi)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：70635135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、宿主植物の二次代謝産物による植物内生真菌の二次代謝経路制御の有無を検証するため、宿主植物種を明確にした植物内生菌株ライブラリの拡充し、植物内生菌が産生する化合物のライブラリ化とそれを用いた生理活性試験を実施することを目指した。今回の研究で、予備検討で保有していた300菌株に加え、さらに200菌株を国内各地で採集した植物から分離し、そのうち5種類の菌株から18種の新規化合物を単離・同定した。単離した化合物の中には、過去に報告例のない骨格を有する化合物も存在し、植物内生真菌が産生する化合物の新規性および多様性の高さを示唆する結果であったと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、植物内生菌の二次代謝産物に関する研究は海外で盛んに行われている一方で、国内における研究者は少ないのが現状である。島嶼国である日本では、宿主である植物と同様に植物内生菌も独自の進化を遂げている可能性が高い。今回、これまでに報告のない骨格を有する化合物を含め18種の新規化合物を報告できたことは、国内の植物内生真菌が産生する化合物に関する新たな情報を提供できたと考えている。また、今回の研究により今後の我々の植物内生真菌に関する発展した研究への基盤構築を果たせたとも考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to expand the library of endophytic fungal strains by specifying the host plant species in order to verify in the future whether the secondary metabolic pathways of endophytic fungi are regulated by the secondary metabolites of host plants. In this study, we isolated 200 more strains from plants collected in various area of Japan in addition to the 300 strains we had in our preliminary study, and isolated and identified 18 new compounds from five of the strains. Some of the isolated compounds had carbon scaffolds that have never been reported before, suggesting the novelty and diversity of compounds produced by plant endophytic fungi.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物内生菌 ポリケタイド セスキテルペノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物内生菌(エンドファイト)は、自然界に存在するほぼ全ての植物組織内に存在しているが、その役割については未解明な点が多い。過去の研究報告では、植物内生菌からは多くの文献未記載の新規化合物を産生することが報告されており、新たな医薬資源として大いに期待が持たれる。また、島国である本邦には、多くの固有植物が生育していることを考慮すると、植物を宿主とする内生菌にも同様に多様性や独自性の高さが期待できる。そこで、植物内生菌の二次代謝産物に関する研究は、国内の生物資源の化学的多様性を明らかとする点で意義深く、新規医薬資源となり得る生物資源の発掘に繋がる可能性があると考えられる。一方で、多くの植物内生菌は、複数の生合成遺伝子クラスターを有するにもかかわらず、通常の培養条件下では二次代謝産物の産生能が乏しい菌株も複数存在することがわかっている。過去に、別の研究グループはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤などを用いて、エピジェネティックに遺伝子発現を制御することで従来産生されない二次代謝産物の誘導に成功しており、その他にも「休眠遺伝子」とも呼ばれる通常の培養条件では利用されていない遺伝子を活性化するための様々な試みが行われている。そこで未解明な点が多い植物内生菌と宿主植物の共生関係を探る鍵として、植物の二次代謝産物による植物内生菌の二次代謝経路の制御があるのではないかと予想し、植物内生菌の生体解明のためには植物内生菌の産生化合物や宿主植物に関して理解を深めるとともに基礎情報の拡充が必要であると考え本研究課題を着想した。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、宿主植物の二次代謝産物による植物内生菌の二次代謝経路制御の有無を検証することにある。そのために今回の研究期間では、宿主植物種を明確にした植物内生菌株ライブラリの拡充し、植物内生菌が産生する化合物のライブラリ化とそれを用いた生理活性試験の実施を主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物内生真菌の分離培養

研究対象とした植物は国内各地で採集し、採集後3日以内に内生菌の分離に供した。採集植物の切片は70%エタノールおよび0.5%次亜塩素酸ナトリウム等による表面殺菌後、内部組織を露出させ50ppmクロラムフェニコール含有麦芽寒天エキス培地(MEA)上に配置することで培養した。数日後、発生した菌糸を釣菌し、新たなMEA培地(10cm dish)上で培養を行うことで真菌を単離した。分離した菌は、rDNAのITS領域ならびに26S rRNA遺伝子の配列をDNAシーケンサーにて解析することで同定した。

(2) 産生化合物の単離および構造解析

初めに、1~2枚のMEA培地にて30日間培養した各菌株の菌体をメタノールにて抽出することで得られたエキスについてTLCおよびLC-MSにて分析することで産生物質を検証する菌株の選定を行った。選定した菌株は50~300枚のMEA培地で培養し、メタノールにて抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィー、再結晶法等の手法により化合物の単離を行った。単離化合物の構造は、高分解能ESI-MSスペクトル、1次元および2次元NMRスペクトル等の機器分析学的手法により決定した。必要に応じて、新モッシャー法、単結晶X線結晶構造解析、量子化学計算によるECDスペクトル予測等による絶対立体配置の決定を行った。

(3) 生理活性試験

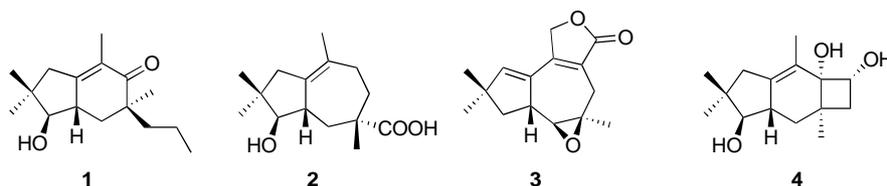
単離化合物の生理活性試験として、核内受容体アゴニスト活性試験、細胞増殖抑制活性試験、薬剤耐性菌への抗菌活性試験を行った。核内受容体アゴニスト活性試験は、HEK293細胞にRXR α 、RAR α 、LXR α 、PPAR γ 、PPAR δ など任意の核内受容体発現プラスミドおよびそれぞれに対応するルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクションし、各核内受容体に対するアゴニスト活性を検証した。細胞増殖抑制活性試験は、肝癌由来細胞株HepG2細胞およびヒト乳癌細胞株MCF-7細胞等に対する増殖抑制作用をMTT試験により評価した。CAMH培地を使用した培地微量液体希釈法にて行った。抗菌活性試験は、CAMH培地を使用した培地微量液体希釈法により、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)およびバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)等などに対する抗菌活性を検証した。

4. 研究成果

(1) シワタケ *Phlebia tremellosa* ECN184 から単離したセスキテルペノイド

ハネセンナ(*Senna alata*)の葉部より分離した *Phlebia tremellosa* の培養菌糸体から3種の新規化合物1-3および過去に同種菌から報告のあるsterpurane型セスキテルペノイド tremetriol (4)を単離した。単離化合物のうち、phlebidiol (1)およびphlebioic acid (2)は、いずれも

過去に報告例のない炭素骨格を有しており、seco-sterpurane 型および phlebiane 型セスキテルペノイドとそれぞれ命名した。また、phlebiolide (3) は、天然から 2 例目の merulane 型骨格を有する化合物であった。新規化合物は、いずれも NOESY スペクトルにより相対立体配置を決定した後、量子化学計算による ECD スペクトルのシミュレーションを行い、実測値と比較することで絶対立体配置を決定した。新規化合物はいずれも tremetriol (4) 等の sterpurane 型セスキテルペノイドを前駆体として、転位反応や酸化的開裂により産生されていると推察された。

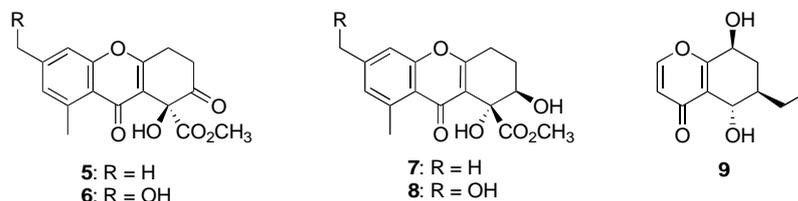


(2) *Talaromyces* sp. ECN211 から単離したキサントン誘導体

イワヒバ (*Selaginella tamariscana*) の葉部より分離した *Talaromyces* sp. ECN211 からは、talaromycone A および B と命名した 2 種の新規キサントン誘導体 5, 6 および 2 種の既知キサントン誘導体 7, 8 を含む計 6 種の化合物を単離した。化合物 5 および 7 については、単結晶 X 線結晶構造解析を実施し、絶対立体配置を決定した。さらに、5 と 6 および 7 と 8 の ECD スペクトルを比較することで 6 と 8 の絶対立体配置も決定した。単離した化合物 5-8 について各種核内受容体に対するアゴニスト活性を検証したが、いずれの受容体にも活性は認められなかった。

(3) *Xylaria* sp. ECN212 から単離したクロモン誘導体

カンレンボク (*Camptotheca acuminata*) の葉部から分離した *Xylaria* sp. ECN212 から新規クロモン誘導体 9 を単離し、構造決定を行った。本化合物は、以前我々が別の *Xylaria* 属真菌 (ECN008 株) から単離した xylariacetal の類縁化合物であると考えられた。そこで、分子系統学的解析により、rDNA の ITS 領域ならびに 26S rRNA 遺伝子の配列について調べたところ、ECN212 株と ECN008 株は *Xylaria* 属の中でも近縁に位置していることがわかった。

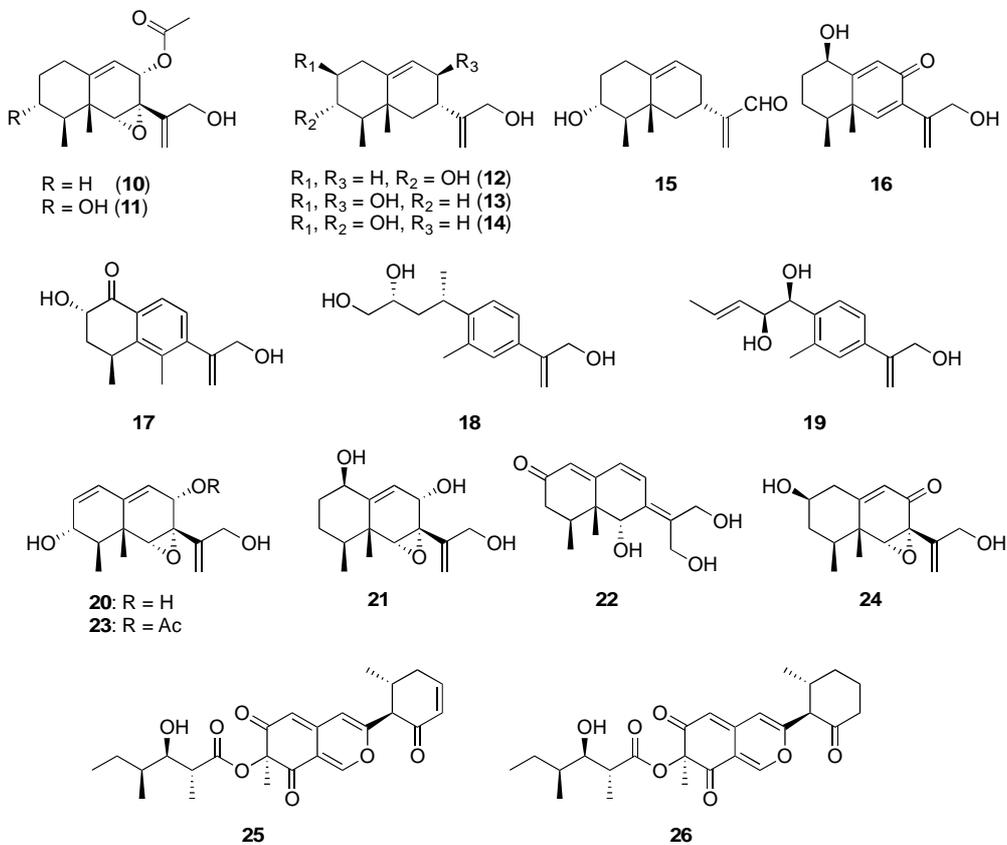


(4) *Paraconiothyrium brasiliense* ECN258 から単離したセスキテルペノイド

クスノキ (*Cinnamomum camphora*) の枝部から分離した *Paraconiothyrium brasiliense* ECN258 からは、10 種におよぶ新規セスキテルペノイド 10-19 および 5 種の既知セスキテルペノイド 20-24 を単離した。単離化合物のうち、paraconiothin A-G (10-16) はいずれも eremophilane 型セスキテルペノイドであった。一方で、paraconiothin H-J (17-19) は eremophilane 型セスキテルペノイドが 1,2-転位反応を受けることで産生されていると推察された。Paraconiothin I (18) および J (19) と同様の骨格を有する化合物の報告は、我々の知る限りでは過去にキク科植物から一例報告されているのみで、非常に珍しい例といえる。なお、化合物 16 および 17 に関しては、ECD スペクトルのシミュレーションにより絶対立体配置の決定を行った。さらに、単離化合物について各種核内受容体に対するアゴニスト活性を検証した結果、化合物 12 および 18 に肝臓 X 受容体 α (LXRα) に対する弱い抑制作用を見出した。この抑制作用が受容体への直接の結合によるものか、他の転写因子等を介したものかについては今後さらなる検証が必要である。

(5) *Muyocopron laterale* ECN279 から単離したアザフィロン誘導体

ハマナタマメ (*Canavalia lineata*) の葉部から分離した *Muyocopron laterale* ECN279 から muyocopronon A および B と命名した 2 種の新規アザフィロン誘導体 25, 26 を単離した。両化合物ともに、三環性のアザフィロン骨格にアルキル鎖がエステル結合した構造を有していた。アルキル鎖の絶対立体配置は新モッシャー法によって、アザフィロン部分の絶対立体配置は、ECD スペクトルのシミュレーションによってそれぞれ決定した。化合物 2 は、黄色ブドウ球菌および腸球菌に対して非常に弱い (MIC ≈ 128 μg/mL) 抗菌活性を示した。この抗菌活性は、MRSA および VRE に対しても同程度であった。



今回の研究の結果、植物内生真菌が産生する化合物として新たに 18 種の新規化合物を同定した。単離した新規化合物の中には、過去に報告例のない骨格を有する化合物も存在し、植物内生真菌が産生する化合物の新規性および多様性の高さを示唆する結果であったと考えている。一方で、二次代謝産物の検討を行うことのできた菌株は今回分離した菌株の一部であるため、残りの菌株について今後も産生化合物およびその生理活性の検証を継続して行う予定である。また、今回得られた菌株について、宿主植物成分との共培養を行った実験を試行しているが現状ではうまく進行していない。今後、培養条件および分析条件などについてさらなる検証を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakashima Ken-ichi, Tomida Junko, Hirai Takao, Kawamura Yoshiaki, Inoue Makoto	4. 巻 73
2. 論文標題 Sesquiterpenes with new carbon skeletons from the basidiomycete <i>Phlebia tremellosa</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 480 ~ 486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01286-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima Ken-ichi, Tomida Junko, Hirai Takao, Kawamura Yoshiaki, Inoue Makoto	4. 巻 82
2. 論文標題 Paraconiothins A-J: Sesquiterpenoids from the Endophytic Fungus <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> ECN258	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 3347 ~ 3356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.9b00638	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 Nakashima Ken-ichi, Tomida Junko, Hirai Takao, Kawamura Yoshiaki, Inoue Makoto	4. 巻 16
2. 論文標題 Absolute configurations of talaromycones A and B, -diversonolic ester, and aspergillusone B from endophytic <i>Talaromyces</i> sp. ECN211	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Beilstein Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 290 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3762/bjoc.16.28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakashima Ken-ichi, Tomida Junko, Tsuboi Tomoe, Kawamura Yoshiaki, Inoue Makoto	4. 巻 16
2. 論文標題 Muyocopronones A and B: azaphilones from the endophytic fungus <i>Muyocopron laterale</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Beilstein Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2100 ~ 2107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3762/bjoc.16.177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Ken-ichi, Tomida Junko, Kawamura Yoshiaki, Inoue Makoto	4. 巻 102
2. 論文標題 A new chromone derivative from endophytic fungus <i>Xylaria</i> sp. ECN212	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 955 ~ 955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-21-14427	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakashima Ken-ichi, Tomida Junko, Hirai Takao, Kawamura Yoshiaki, Inoue Makoto
2. 発表標題 New sesquiterpenoids from an endophytic fungus <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> ECN258.
3. 学会等名 GA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島健一、富田純子、平居貴生、河村好章、井上誠
2. 発表標題 植物内生菌 <i>Talaromyces</i> sp. ECN211株から単離した新規ポリケタイドに関する研究
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島健一、野尻悠斗、富田純子、平居貴生、河村好章、井上誠
2. 発表標題 <i>Xylaria</i> 属植物内生真菌が産生する新規セスキテルペンのNF- B阻害作用
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島健一、富田純子、平居貴生、河村好章、井上誠
2. 発表標題 植物内生菌 <i>Paraconiothyrium</i> sp.が産生する新規セスキテルペン
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 中島健一、富田純子、平居貴生、河村好章、井上誠.
2. 発表標題 植物内生真菌 <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> が産生する新規セスキテルペノイドに関する研究(2)
3. 学会等名 日本生薬学会 第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島健一、富田純子、坪井知恵、河村好章、井上誠
2. 発表標題 植物内生真菌 <i>Muyocopron laterale</i> から単離した新規アザフィロンの構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------