

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05709

研究課題名(和文) 微生物間のコミュニケーションを介した培養方法に基づく生理活性物質の探索

研究課題名(英文) Search for biological active compounds based on culture methods through communication between two microorganisms

研究代表者

塩野 義人 (Shiono, Yoshihito)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：80361278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分離糸状菌 *Clonostachys rosea* B5-2 と *Nectria pseudotrichia* B69-1の二種の菌類を共培養することにより、5種の化合物を単離した。それらは、構造解析の結果、furanocochlioquinol (1) と furanocochlioquinone (2)、nectrianolin D (3)であり、化合物 4 と 5 は既知物質であった。ヒト前骨髄性白血病細胞株に対する毒性試験においては、化合物 1 が一番強い毒性を示した。Arthrinium marii M-211株のりんごジュース培地より、二種の新物質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに天然有機化合物の単離精製に関する研究は多くなされてきたことから、新規な二次代謝産物を得ることは簡単ではないと言われている。その一方、放線菌や糸状菌のような有用な物質を生産する酵素の遺伝情報が明らかにされると、予想以上に多くの生合成遺伝子クラスターを持っていることが判明した。共培養法により、微生物細胞間でのコミュニケーションや細胞間の直接の接触刺激による物質生産における制御機構を明らかにできれば、二次代謝産物の生産を活性化させる菌類の組み合わせが判明すると共に、これまで以上に、共培養法により新規骨格を有する生理活性物質の発見に期待できる。

研究成果の概要(英文)：Three new meroterpenoid derivatives, furanocochlioquinol (1) and furanocochlioquinone (2), as well as nectrianolin D (3), together with two known biogenetically related compounds 4 and 5 were isolated from a mixed culture of two mangrove-derived fungi, *Clonostachys rosea* B5-2 and *Nectria pseudotrichia* B69-1. The structures of 1-3 were deduced based on the interpretation of HRMS and NMR data. Compounds 1-5 exhibited cytotoxicity against human promyelocytic leukemia (HL60) cells with IC50 values ranging from 0.47 to 10.16  $\mu$ M. A novel 2,3-epoxy naphthoquinol, named (6R,7R,8R)-theissenone A (1), possessing an oxatricyclo[5.4.0.03,5]undeca-trien-2-one skeleton, together with two known compounds, (6S,7R,8R)-theissenone (2) and arthrinone (3), were produced by an endophytic fungus, *Arthrinium marii* M-211.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：共培養 コクリオキノン 細胞毒性 *Clonostachys rosea* *Nectria pseudotrichia* *Arthrinium marii*

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

医薬や農薬の生理活性物質の探索源として、これまでに多くの資源微生物が用いられてきた。そして、近年の遺伝子技術の発展により、放線菌をはじめとする菌類の二次代謝産物産生遺伝子群が研究され、二次代謝産物をコードする生合成遺伝子はクラスターを形成していることが明らかとなっている。さらにこの生合成遺伝子群の多くは、機能未知であり、眠っている遺伝子(クリプティック遺伝子)と言われている。すなわち、一菌株において、発見された二次代謝産物の生合成遺伝子の数は、既に単離されている二次代謝産物の数よりも多く、これは我々がまだ知らない新規な二次代謝産物を生産する能力がある事を意味する。したがって、これまでこの眠っている遺伝子を発現させる試みが多くなされてきた。例えば、クリプティック遺伝子の異種発現、転写翻訳系の活性化、低分子化合物による活性化、共培養法などがある。この研究で用いる共培養法は、バイオコンバージョンや細胞間の刺激により生産される物質も存在し、培養系としては、複雑である。しかしながら、二種以上に菌類を混ぜ合わせて、培養するものであり、組み合わせによる個数が増えることを除けば、非常に簡便であり、魅力的である。

## 2. 研究の目的

糸状菌は多様な化学構造を有する二次代謝産物を生産するが、ゲノム解析技術の進歩により、二次代謝産物生合成遺伝子の多くは、二次代謝産物を生産せずに発現しないままである。そこで、より多くの新しい構造を有する二次代謝産物を得ることを目的に、異種の微生物間の相互作用を利用した「共培養法」により、休眠遺伝子(クリプティック)を活性化し、新たな代謝産物を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

約 100 株の分離糸状菌類を用い、蒸留水と玄米で調製した培地で、それぞれを培養し、生理活性物質の生産が高い菌株を選出した。その後、二種の菌類を同じ寒天培地状で、同時に共培養し、嫌触反応が見られるかどうかを肉眼で確認した。嫌触反応を示した菌類同士を共培養法の組み合わせとし、それぞれの純粋培養時と共培養時で、二次代謝産物の生産性に着目して、TLC や HPLC を駆使しながら、スクリーニングをした。その結果、*Clonostachys rosea* B5-2 と *Nectria pseudotrichia* B69-1 の二種の糸状菌を選択した (Fig. 1)。また、糸状菌 *Arthrimum marii* M-211 株については、培地条件を検討中に、りんごジュースを培地に添加した時のみ、顕著に生産性が増加した物質が見られたことから (Fig. 3)、それらの物質にも注目することにした。

## 4. 研究成果

< *Clonostachys rosea* B5-2 と *Nectria pseudotrichia* B69-1 株の複合培養について >

糸状菌 *C. rosea* B5-2 株と *N. pseudotrichia* B69-1 株は、同一シャーレ内で二種の菌株を同時に生育させると、黄色の嫌触反応を示した。また、それぞれの菌類の純粋培養物において、共培養時には見られた物質を認められなかった。これは共培養により、これまで発現していない遺伝子群が活性化され、微生物間のコミュニケーションや接触刺激に関わる物質であると予測された。そこで、これ

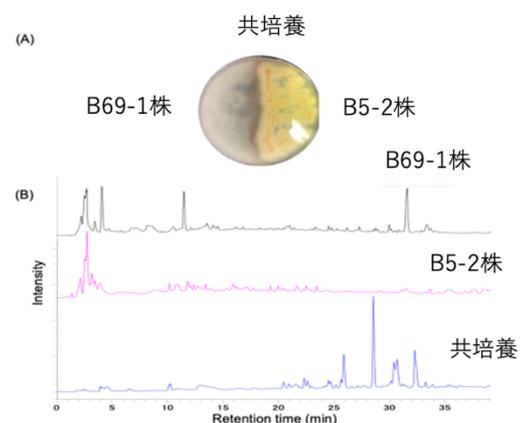


Fig. 1 HPLCによる分析結果

らの物質に着目し、各種カラムクロマトグラフィーにより、それらを単離し、化学構造や生理活性を明らかにすることにした。B5-2 株と B69-1 株の玄米を主成分とした培地において共培養させ、メタノール抽出物について、各種カラムクロマトグラフィーを用い、精製した。その結果、5 種の物質を単離することができた。続いて、それらの化学構造を NMR 実験データの解析を中心に明らかにしたところ、化合物 **1**, **2**, **3** は、新物質の furanocochlioquinol (**1**) と furanocochlioquinone (**2**), nectrianolin D (**3**) であり、化合物 **4** と **5** は既知の 12-dehydrocochlioquinone D (nectripenoid B) (**4**) と cochlioquinone D (**5**) であった (Fig. 2)。このように単離された化合物 **1-5** の生理活性については、100 µg/disk の濃度で、グラム陰

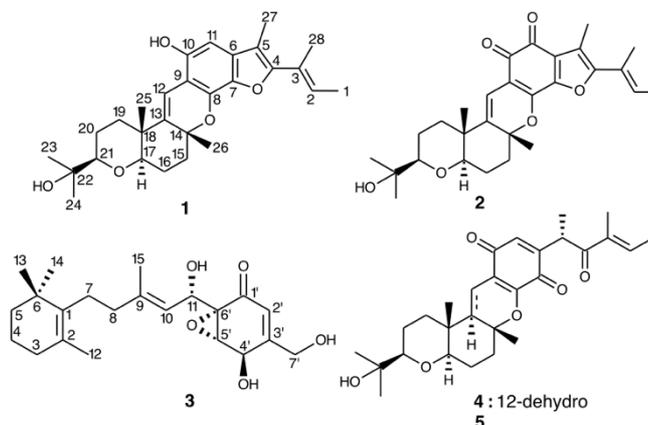


Fig. 2. 化合物 **1** - **5** の構造

性菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) とグラム陽性菌類 (*Staphylococcus aureus*) に対して、弱い抗菌活性を示した。また、ヒト前骨髄性白血病細胞株 (HL-60: Human promyelocytic leukemia cells) に対する毒性試験においては、テーブルに示したように、単離した物質の中で、化合物 **1** が一番強い毒性を示した (Table 1)。本研究で、単離した物質の **1, 2, 4, 5** は、化学構造の骨格により、cochlioquinone 類に属し、cochlioquinones A と B は植物病原菌類が生産する物質として、初めて単離されている。その後、多くの類縁物質が報告され、抗真菌活性や細胞毒性を示すものが多く、メロテルペノイドに属した構造の多様性から生じる類縁物質のユニークな構造と活性との相関により、活性発現機構に注目されている。一方、nectrianolin D (**3**) については、我々の先行研究で、*N. pseudotrichia* 120-1NP 株の新規細胞毒性物質として、明らかにした nectrianolin A, B, C に続く新類縁物質であった。細胞毒性試験の結果、nectrianolin D (**3**) は、nectrianolins A, B より弱い毒性を示したことから、活性発現機構の手がかりとなる所見を示した。B69-1 株は、*N. pseudotrichia* 120-1NP と同一の属種であることから、120-1NP 株において、化合物 **3** が生産されていないかを調査したが、確認できなかった。

Table 1. 化合物 **1** - **5** の細胞毒性試験 (HL60株)

Compounds	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>1</b>	0.47
<b>2</b>	0.63
<b>3</b>	10.16
<b>4</b>	0.93
<b>5</b>	1.61
Camptothecin	0.016

< *Arthrinium marii* M-211 株の生産する生理活性物質について >

本研究では、菌類の持つ潜在的な二次代謝産物生産能力に期待し、それらを引き出す一つの方法として、共培養方法に着目した。一方で、生産培地成分の検討を繰り返し、培養条件に工夫を加え、新たに誘導される二次代謝産物

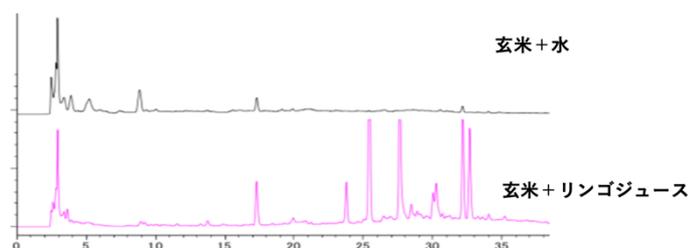


Fig. 3. HPLCによる分析結果

にも着目した。その過程において、糸状菌 *Arthrinium marii* M-211 株は、培養培地に市販りんごジュースを添加することにより、二次代謝産物の生産パターンを顕著に変化させた。

そこで、これらの構造解析と生理活性について調べた。まず、*A. marii* M-211 株を市販のりんごジュースと玄米で調製した培地で 30 日間培養した。続いて、培養抽出物を各種カラムクロマトグラフィーで精製し、化合物 6 と 7, 8 を単離した。構造解析の

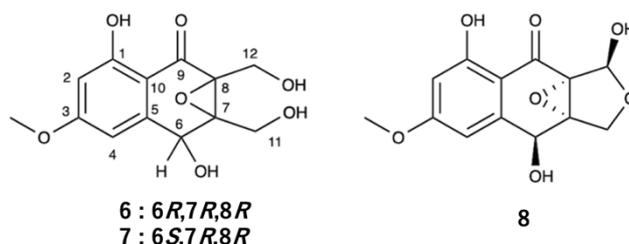


Fig. 4. 化合物 6 - 8 の構造

結果、化合物 6, 7 は新物質であり、同じ平面構造を有する異性体であった。NOESY 実験や ECD スペクトル、計算による ECD スペクトルなどの解析の結果、両化合物の構造を明らかにした (Fig. 4)。生理活性試験の結果、H4IIE (ラット肝癌細胞) 株に対して、弱い毒性を示した [IC<sub>50</sub> (μM), 6: 67.5, 7: 46.6, 8: 13.4]。

<まとめ>

本研究では、糸状菌が持つ潜在能力に期待し研究を行った。近年、遺伝子操作により微生物の眠っている二次代謝産物生産能力を活性化する試みが行われているが、未だに全ての糸状菌に対して万能な二次代謝産物の生産能力を活性化する方法はなく、その持つすべての二次代謝産物の生産を引き出しことはできず、一部にとどまっている。本研究で用いた共培養法は遺伝子操作を伴う二次代謝活性化手法とは異なり、簡便で且つ、汎用性が高く、様々な糸状菌にも適用できると考えられる。しかし、組み合わせが増えることにより、実験量の増加を考慮する必要はあるが、微量しか生産されない化合物の生産量を劇的に増加させたり、もしくは類縁物質を新たに生産させる可能性もある。また、菌類の生育する“培地条件に連動した二次代謝産物の変化”にも着目し、2つの培養方法により二次代謝の活性化を試みた。培地に市販のりんごジュースを加えるという培養方法で二つの新規化合物が生産誘導された。りんごジュースに含まれるどの成分が、これらの新物質の生産を惹起したのかについては、不明のままであるが、非常に簡便な方法で、物質生産性を変化させることができることから、新規化合物の探索に目的を絞れば、有効な方法の一つである。以上のように、ここで用いた共培養法により、微生物細胞間でのコミュニケーションや細胞間の直接的な接触刺激による物質生産における制御機構が明らかにできれば、二次代謝産物の生産を活性化させる菌類の組み合わせが明らかになるとともに、これまで以上に、共培養法により新規骨格を有する生理活性物質の発見に期待できる。また、二つのコロニー間で見られる嫌触反応などの菌類同士のコミュニケーション様物質が見つければ、今後、共培養法による新規骨格の二次代謝産物発見へ期待が大いに高まる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiho Sato, Ferry Ferdiansyah Sofian, Wataru Suehiro, Desi Harneti, Rani Maharani, Unang Supratman, Fajar Fauzi Abdullah, Supriatno Salam, Takuya Koseki, Yoshihito Shiono	4. 巻 8
2. 論文標題 Resorcylic Acid Derivatives, with Their Phytotoxic Activities, from the Endophytic Fungus Lasiodiplodia theobromae in the Mangrove Plant Xylocarpus granatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry&Biodiversity	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbdv.202000928	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 Sofian Ferry Ferdiansyah, Suzuki Takuma, Supratman Unang, Harneti Desi, Maharani Rani, Salam Supriatno, Abdullah Fajar Fauzi, Yoshida Jun, Ito Yoshiaki, Koseki Takuya, Shiono Yoshihito	4. 巻 30
2. 論文標題 The 2,3-epoxy naphthoquinol produced by endophyte <i>Arthrinium marii</i> M-211	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14786419.2021.1998899	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 Sofian Ferry Ferdiansyah, Suzuki Takuma, Supratman Unang, Harneti Desi, Maharani Rani, Salam Supriatno, Abdullah Fajar Fauzi, Koseki Takuya, Tanaka Kurumi, Kimura Ken-ichi, Shiono Yoshihito	4. 巻 155
2. 論文標題 Cochlioquinone derivatives produced by coculture of endophytes, <i>Clonostachys rosea</i> and <i>Nectria pseudotrichia</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 105056 ~ 105056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fitote.2021.105056	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 Shiono Yoshihito, Sato Shiho, Sofian Ferry Ferdiansyah, Koseki Takuya, Abdullah Fajar Fauzi, Salam Supriatno, Harneti Desi, Maharani Rani, Supratman Unang	4. 巻 44
2. 論文標題 Phytotoxic -resorcylic acid derivatives from the endophytic fungus <i>Lasiodiplodia theobromae</i> in the mangrove plant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2021.05.003	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤志帆, ウナンスプラットマン, 小関卓也, 塩野義人
2. 発表標題 糸状菌 <i>Lasiodiplodia</i> sp. GI 1005 株が生産する lasiodiplodin の新規類縁体と植物の根に対する影響について
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ferry Ferdiansyah Sofian, Fatimah Ayu Warahapsari, Nanang Ariefta Rudianto, Takuya Koseki, Yoshihito Shiono
2. 発表標題 Two new octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acid C and D produced by <i>Trichoderma</i> sp. HN-1.1
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤志帆, 小関卓也, 塩野義人
2. 発表標題 インドネシア産樹木より分離した糸状菌GI-1005株が生産する代謝産物について
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 未広航, 小関卓也, 塩野義人
2. 発表標題 インドネシア産樹木内生菌が生産する新規二次代謝産物の探索
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020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
---------	---------