

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06102・19K21222

研究課題名(和文) 微生物間相互作用を活用した医薬シーズ探索資源の高度化と休眠遺伝子活性化機構の解明

研究課題名(英文) Advancement of resources for drug discovery seeds utilizing microbial interactions and elucidation of activation mechanism of microbial dormant gene clusters

研究代表者

原 康雅 (Yasumasa, Hara)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：10824625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：海洋由来真菌 *Aspergillus niger* 15F41-1-3株とミコール酸含有細菌 *Mycobacterium smegmatis* の共培養により、各微生物の単培養では見られない色素産生や共培養選択的ながん細胞増殖阻害活性が確認された。この共培養抽出物を分画した結果、共培養条件選択的に産生される活性化合物として malformin C を単離し、その他に共培養条件選択的に産生する3種の既知化合物を得た。さらに、本真菌株の色素や二次代謝産物産生には、生細菌と真菌の直接的な接触が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、研究例が少ない真菌とミコール酸含有細菌の共培養は、真菌の休眠遺伝子を活性化し新たな天然物を探索する方法になると考えられ、医薬シーズ探索資源の高度化につながる可能性がある。また、本研究成果より得られた共培養による休眠遺伝子活性化メカニズムに関する知見は、今後、汎用性の高い休眠遺伝子活性化法の確立や自然界における二次代謝産物の産生意義の解明の糸口につながるものと期待する。

研究成果の概要(英文)：Co-culture experiments using marine-derived *Aspergillus niger* with *Mycobacterium smegmatis*, a mycolic acid-containing bacteria resulted in the production of a pigment by *A. niger* and increased cytotoxic activity of the extract against human prostate cancer cells. An analysis of secondary metabolites in the extract of the co-culture broth revealed that the increase in cytotoxic activity was caused by the production of malformin C, and that TMC-256A1, desmethylkotanin, and aurasperone C were selectively produced under co-culture conditions. In addition, further study suggested that direct interaction between the two microorganisms was necessary for the production of the pigment and the cytotoxic compound malformin C from *A. niger*.

研究分野：天然物化学

キーワード：共培養 微生物資源 培養抽出物ライブラリー構築 海洋由来真菌 ミコール酸含有細菌 放線菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物(放線菌や真菌)が産生する二次代謝産物は、多彩な化学構造を有しており、この構造多様性に起因する様々な生物活性から、数多くの二次代謝産物が医薬品または医薬シーズとして利用されてきた。しかし、近年、新規二次代謝産物の発見は難しくなっており、これまでとは異なる視点からの新規二次代謝産物の探索研究が必要とされている。このような中、ゲノム解析技術の飛躍的向上により、微生物には、発現していない(休眠状態の)二次代謝産物生合成遺伝子が数多く存在することが明らかにされ(Bentley, S. D. *et al. Nature* 2002, Nett, M. *et al. Nat. Prod. Rep.* 2009)、休眠遺伝子の異種強制発現、微生物への薬物負荷による休眠遺伝子の活性化と二次代謝産物産生が行われている(Laureti, L. *et al. PNASUSA* 2011, Hosaka, T. *et al. Nat. Biotechnol.* 2009)。また、最近では、放線菌と他生物との共培養により、休眠遺伝子を活性化させ、新規二次代謝産物を産生させる試みが行われており、放線菌 *Streptomyces* 属とミコール酸含有細菌 *Tsukamurella* 属との共培養で、新規抗菌物質 *alchivemycin A* が生産されることが報告され(Onaka, H. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 2011)、研究代表者も放線菌 *Nocardia* 属と動物細胞との共培養により、新規化合物 *dehydropropylpantothenamide* や *nocarjamide* が産生されることを明らかにしている(Hara, Y. *et al. J. Nat. Med.* 2018, Hara, Y. *et al. Org. Lett.* 2018)。しかしこれまでに、共培養を真菌で検討した例は数例しかなく、さらに、生物間相互作用による休眠遺伝子活性化のメカニズムも解明が進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、微生物と他者との相互作用に注目し、両者を同一環境で培養する共培養法を用いることで、他者による刺激により、微生物が、休眠している生合成遺伝子を活性化させることを期待し、1) 新たな培養抽出ライブラリーの構築による二次代謝産物探索資源の高度化、2) 共培養選択的に産生される新たな二次代謝産物の単離・構造決定、3) 休眠遺伝子活性化機構の解析を行うこととした。本研究1年目と2年目で所属機関が異なることから、各研究での詳細な目的を以下に述べる。

【本研究1年目】

所属研究室では、海綿などの底生海洋生物、海底温泉など、様々な海洋環境由来の海砂から分離した1,000株以上の海洋由来真菌を保有し、その培養抽出物に関する20種類以上の生物活性情報、ならびに二次代謝産物に関する情報を独自に保有している。そこで、研究代表者がこれまで展開してきた放線菌 *Nocardia* 属と動物細胞との共培養技術や二次代謝産物分析技術を基盤として、本研究では、1) 保有真菌株とミコール酸含有細菌 *Mycobacterium smegmatis* との共培養を行い、新たな培養抽出ライブラリーを構築することにより、保有する二次代謝産物探索資源の高度化を図ることとした。そして、2) 共培養選択的に生産される二次代謝産物の探索および構築している20種類の生物活性試験を実施し、さらに3) 1) および2)の検討結果から見出す、*M. smegmatis* との相互作用により新たな二次代謝産物を生産する真菌株、並びに、研究代表者がすでに共培養選択的な二次代謝産物生産を確認している海洋由来真菌 *Aspergillus niger* 15F41-1-3株をモデルとして、休眠遺伝子活性化メカニズムを明らかにすることとした。

【本研究2年目】

研究代表者の所属機関変更に伴い、使用する天然資源を、新所属研究室が独自に保有する2,000株以上の日本国内の土壌、河川等より分離された放線菌等に変更した。この放線菌等を活用した共培養を行うことで、高度化した新たな培養抽出物ライブラリーを構築することとした。また、2) 培養抽出物のがんおよび感染症に関する生物活性評価などから、構築した放線菌共培養ライ

ブラリーの有用性を実証し、さらに3) 共培養選択的に産生される二次代謝産物の単離・構造決定を行うこととした。

3. 研究の方法

【本研究1年目】

保有する真菌株の中から、これまでの培養条件では生物活性を示さなかった真菌株を選択後、これをミコール酸含有細菌である *Mycobacterium smegmatis* 存在下または非存在下で培養して、培養抽出物ライブラリーを作成する。次に、LCMS による網羅的二次代謝産物分析、がんおよび感染症に関与する生物活性試験での評価を行い、共培養選択的に生物活性を有する二次代謝産物を産生する真菌株を選出する。さらに大量培養により生物活性を有する天然物等の単離と構造解析を進め、新規二次代謝産物の取得を試みる (図1)。

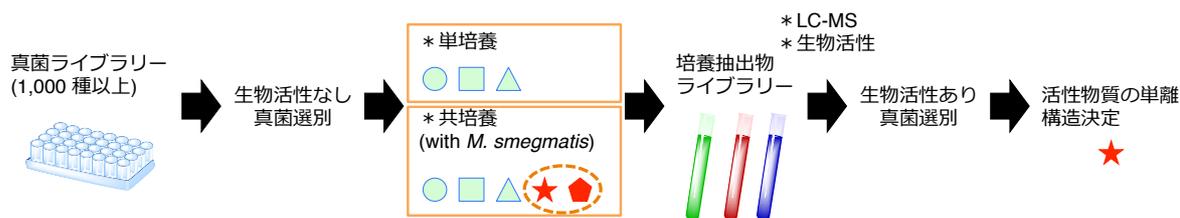


図1 探索資源の高度化

また、これまでの研究から共培養選択的な二次代謝産物の生産を確認している、海洋由来真菌 *Aspergillus niger* 15F41-1-3 株の休眠遺伝子活性化機構の解明に関し、以下の2点について検討する (図2)。まず、休眠遺伝子活性化における *M. smegmatis* の役割について、(a) 直接的な接触の必要性、(b) 生存の有無の重要性、(c) 分泌される分子の重要性について検討する。次に、真菌の休眠遺伝子活性機構について、(a) トランスクリプトーム解析による遺伝子発現変動、(b) メタボローム解析による一次代謝の変動を測定することにより、休眠遺伝子活性化におけるシグナル伝達を解析する。

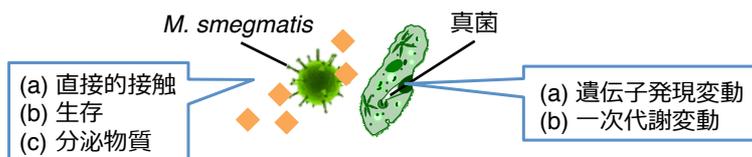


図2 休眠遺伝子活性化機構解析

【本研究2年目】

保有する放線菌株の中から、放線菌単培養抽出物では生物活性を示さなかった放線菌株を選択後、放線菌共培養抽出物ライブラリーを作成する。次に、共培養抽出物について生物活性試験評価を行い、共培養選択的に生物活性を有する二次代謝産物を産生する放線菌株を選出する。さらに大量培養により生物活性天然物の単離と構造解析を進め、新規二次代謝産物の取得を試みる。

4. 研究成果

【本研究1年目】

真菌株の単培養抽出物が抗菌活性および細胞増殖阻害活性を示さなかった真菌 295 株に関して、MG7H9 培地にてミコール酸含有細菌 *Mycobacterium smegmatis* mc²155 との共培養を行い、培養抽出物ライブラリーを構築した。得られた培養抽出物の生物活性を測定した結果、2 株の培

養抽出物に共培養条件選択的な前立腺がん細胞 (DU145) 増殖阻害活性が見られた (図 3)。そこで、2015 年に海綿から分離した真菌 *Aspergillus niger* 15F41-1-3 株に着目したところ、共培養抽出物を LCMS にて測定した結果、単培養抽出物では見られない 7 本のピークが観測された。また、生物活性以外の共培養選択的な変化として、橙色色素の産生 (図 4) や linoleyl ergosterol の産生を確認した。そこで次に、前立腺がん細胞 (DU145) 増殖阻害活性を指標に、*A. niger* 15F41-1-3 株と *M. smegmatis* との共培養抽出物を分画した結果、共培養条件選択的に産生される活性成分として環状ペプチド malformin C (1) を単離した。また、共培養選択的に産生される 3 種の化合物 TMC-256A1 (2)、desmethylkotanin (3)、aurasperone C (4) を単離した (図 5)。これら 4 つの化合物は *A. niger* の別の単培養条件にて既に単離が報告されていることから、本研究の培養条件では、*M. smegmatis* が、休眠状態にある化合物 1-4 に対応する真菌の生合成遺伝子クラスターを活性化することが示唆された。真菌株の二次代謝変化の機序について、透析膜を用いた *M. smegmatis* との共培養 (図 3, 4: Co-culture (partitioned)) や死滅処理した *M. smegmatis* を用いた共培養 (図 3, 4: Co-culture (autoclaved *M. smegmatis*)) を行い、*M. smegmatis* の直接的な接触の必要性、生存の有無の重要性、分泌される分子の重要性の 3 点について検討した。その結果、本真菌株の malformin C の産生には、生細菌と真菌の直接的な接触が重要であることが示唆された。一方で、真菌 *A. niger* 15F41-1-3 株の遺伝子発現変動および一次代謝変動の測定は本研究では実施できなかったため、今後の課題である。

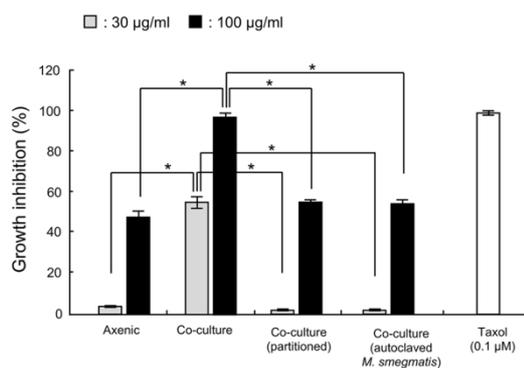


図 3 各培養条件抽出物の細胞増殖阻害活性

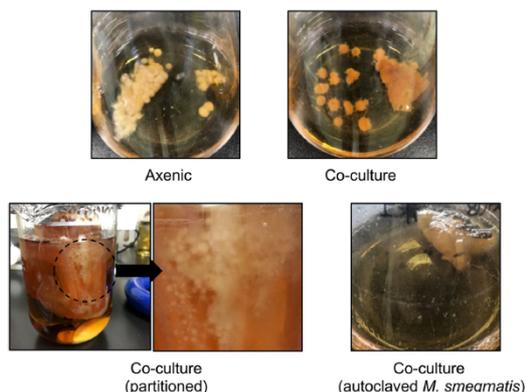


図 4 各培養条件での *A. niger* 15F41-1-3 による色素産生

【本研究 2 年目】

グラム陽性菌 *Bacillus subtilis* を用いて、Waksman 培地で培養した放線菌の単培養抽出物 1242 種に対して MTT 法による抗菌活性試験を実施し、抗菌活性を示さなかった 805 株を選択した。この放線菌 805 種について、同一環境で単離された放線菌の組み合わせで共培養を行い、抗菌活性試験を行った。その結果、単培養抽出物に比べて強い抗菌活性を示した共培養抽出物は 504 種中 26 種であった。中でも強い抗菌活性を示した、福岡県にて採取した放線菌株の組み合わせで大量培養を行い分画した結果、抗菌活性を示す化合物を単離した。

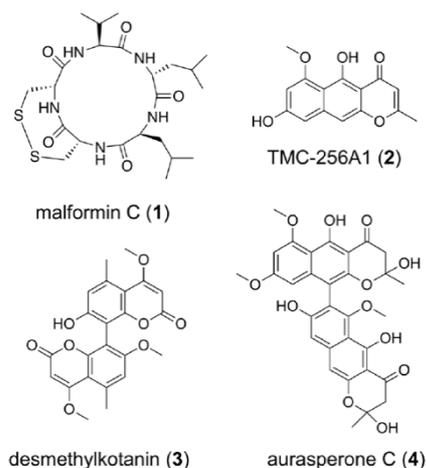


図 5 単離化合物の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jomori, T.; Hara, Y.; Sasaoka, M.; Harada, K.; Setiawan, A.; Hirata, K.; Kimishima, A.; Arai, M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Mycobacterium smegmatis alters the production of secondary metabolites by marine-derived Aspergillus niger	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 76-82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s11418-019-01345-0	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城森 啓宏, 笹岡 美歩, 原 康雅, Andi Setiawan, 荒井 雅吉
2. 発表標題 微生物共培養法を利用した活性天然物の探索
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 城森 啓宏, 原 康雅, 笹岡 美歩, Andi Setiawan, 荒井 雅吉
2. 発表標題 微生物共培養法を利用した活性天然物の探索
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉 まれの, 原 康雅, 石橋 正己
2. 発表標題 微生物の生育環境を模倣した共培養法による新規天然物の探索
3. 学会等名 日本薬学会140年会
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
--	---------------------------	-----------------------	----