

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06109・19K21227

研究課題名（和文）真菌どうしの共培養による二次代謝産物の産生誘導を活用した新規生物活性物質の探索

研究課題名（英文）Search for new bioactive compounds utilizing the induction of secondary metabolite production by co-culturing fungi

研究代表者

江口 啓介 (Eguchi, Keisuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部（薬）・特別研究員

研究者番号：60822799

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）：宮崎県日向市の土壌から単離した真菌17F4103株と17F4110株の組み合わせについて、変色領域をLC-MSで分析した。その結果、単独培養では確認されない化合物 (m/z 371 [M-H]⁻) の存在が確認できた。そこでこれらの化合物を得ることを目的に大量培養を行い、培養物のMeOH抽出物を精製し、化合物1と2を得た。構造解析の結果、1はピリジナルカロイドのPenicidone Dあることがわかった。また、目的のm/z 371 [M-H]⁻ の化合物は、既知のvermixocin A (2)と同定した。本研究により共培養により天然物の構造多様性をさらに引き出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに微生物からの医薬シーズ探索が世界中で精力的に行われた結果、新しい骨格や生物活性を有する化合物の発見が次第に困難になってきているのが現状である。したがって、従来とは異なる方法で微生物資源からの医薬シーズ探索に挑戦することにより、新規性の高い化合物が発見されることが期待できる。そこで共培養を用いることでコンビナトリアル合成などの有機合成化学的手法では取得できない化合物の取得を目指し、新規骨格を有する医薬シーズを発見することで創薬研究に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The discolored area was analyzed by LC-MS for the combination of the fungal strains 17F4103 and 17F4110 isolated from soil in Hyuga City, Miyazaki Prefecture. As a result, the presence of a compound (m/z 371 [M-H]⁻) that could not be confirmed by mono-culture was confirmed. Therefore, large-scale culture was performed for the purpose to afford these compounds, and the MeOH extract of the culture was purified to afford Penicidone D (1) and vermixocin A (2). The target compound of m/z 371 [M-H]⁻ was identified as a known vermixocin A (2). Accordingly, this research found that co-culture experiment has drawn the structure diversity of natural product.

研究分野：天然物化学

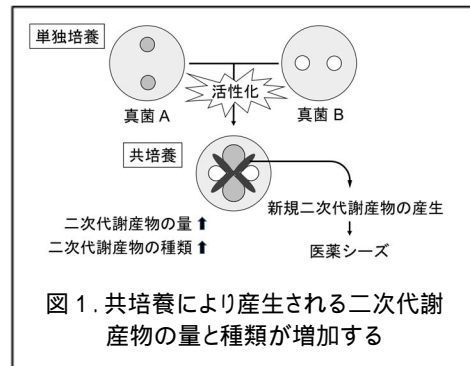
キーワード：二次代謝産物 真菌 医薬品シーズ 共培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真菌が産生する二次代謝産物は、他の微生物との共存に打ち勝つための作用、あるいは、植物や動物などに対する病原毒素としての作用を有するので、医薬品として機能する可能性を秘めている。これまでに医薬品として応用された真菌由来の化合物には、penicillins (抗細菌)、echinocandin B (抗真菌)、lovastatin (コレステロール低下)、cyclosporin A (免疫抑制) などがあり、真菌由来の二次代謝産物は医薬品開発において多大な貢献を果たしてきた。しかし、微生物からの医薬シーズ探索が世界中で精力的に行われた結果、新しい骨格や生物活性を有する化合物の発見が次第に困難になってきているのが現状である。一方、ゲノム解析の高速化に伴い、多くの微生物の遺伝子の中には未だ発見されていない新規性の高い化合物が存在することが明らかとなっている。したがって、従来とは異なる方法で微生物資源からの医薬シーズ探索に挑戦することにより、新規性の高い化合物が発見されることが期待できる。創薬研究における天然物の最大の魅力は、コンビナトリアル合成などの有機合成化学的手法では取得できない「骨格の多様性」であることが広く認識されており、未利用天然資源から新規骨格を有する生物活性物質を発見することが強く求められている。

創薬研究の現場では、以下に示す2種類の未利用微生物資源が注目されている。(1-1) 深海や高温、酸性・アルカリ性など極限環境で増殖する極限微生物や、研究室での通常の培養条件下では増殖しない難培養微生物は未利用資源である。そして、微生物の95%以上は難培養性であるといわれている。(1-2) 通常の培養条件では、微生物が有する二次代謝産物の生合成遺伝子のうち10~30%程度しか発現していないということが、最近の遺伝子解析技術の進歩により明らかになった。すなわち、多くの生合成遺伝子は、未利用な「休眠遺伝子」資源であるといえる。したがって、休眠遺伝子の発現を活性化することができれば、新たな生物活性物質が取得できる。(1-1)や(1-2)などの未利用資源から新たな生物活性物質を発見することは、微生物資源を活用した創薬研究において重要課題である。休眠遺伝子を活性化させる方法の一つとして、微生物の共培養が挙げられる。共培養は、自然界のように複数の微生物を混合して培養する方法であり、微生物を共培養することにより単独培養では産生されない化合物の取得が可能であることが知られている(図1)。さらに、複数の微生物が培地上で接触することにより産生が誘導される化合物は、それぞれの微生物間で機能する何らかの生物活性物質であると考えられる。したがって、共培養により、休眠状態にある生物活性物質の生合成遺伝子が活性化されることが期待できる。これまでに、細菌や放線菌を用いて真菌に対する共培養を行った例は多く報告されており、多くの新規化合物が産生誘導されることが明らかにされてきた。しかし、真菌どうしの共培養エキスから生物活性物質を探索した例は非常に少ない。そこで、当研究室で無作為に選んだ真菌どうしを共培養したところ、80%以上の組合せで二次代謝産物の種類や量が増加した。共培養により産生誘導されたそれら二次代謝産物の生物活性や生物学的役割は非常に興味深い。



2. 研究の目的

本研究では、インドネシアやタイ、および、熊本の阿蘇山や天草など、国内外で独自に採取した真菌を用いて、真菌どうしを共培養することにより、単独培養では得られない新規化合物を取得することを目的としている。そして、得られた化合物の構造の新規性と生物活性を評価し、真菌どうしの共培養による医薬シーズ探索を強力に推進する。これまでに、放線菌や細菌を用いた共培養の研究は精力的に行われてきたが、真菌どうしの共培養の例は少ない。しかし、無作為に選んだ真菌どうしの共培養について、これまでに調べたところ、80%以上の組み合わせで真菌の二次代謝産物プロファイルが変化し、産生される二次代謝産物の種類や量が増加した。この結果から、「真菌どうしの共培養により二次代謝産物プロファイルが変化するという現象は、特定の組み合わせでのみ起こる特別な現象ではなく、無作為に選んだ組み合わせで頻繁に起こる現象である」ことが分かる。しかし、真菌からの医薬シーズの探索は、伝統的に単独培養のエキスについて調べてきた歴史があり、共培養したエキスからの探索は行われてこなかった。したがって、真菌どうしの共培養を利用して医薬品シーズを探索するという点は、本研究の独自性であるといえる。また、真菌どうしの共培養により二次代謝産物の産生が活性化されるという現象は、無作為に選んだ組み合わせで頻繁に起こる現象であることから、多様な真菌に適応可能かについて、その汎用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 真菌どうしの対峙培養

本研究で用いた真菌は、宮崎県日向市の土壌から単離した。継代用の培地は2.0% malt extract および0.5% peptone、3.0% 寒天を精製水で調製し、20 mLを9 cmシャーレに分注して作成し

た麦芽エキス寒天培地を使用した。LC-ESIMS による分析のための培養として、前培養していたそれぞれの真菌を対峙させるように、上記と同様の方法で調製した麦芽エキス寒天培地に植菌し、共培養を行った。比較のため、それぞれの真菌の単独培養も行った。培養は 25 °C で 14 日間行った。

(2) 真菌の培養物の抽出と分析

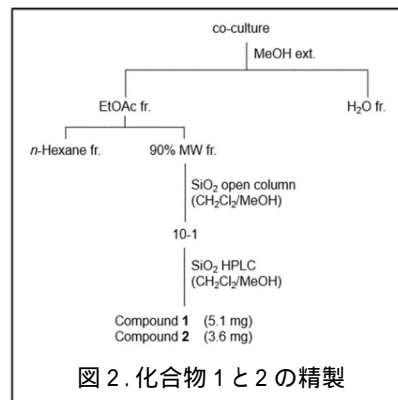
得られた培養物を MeOH でソニケートし抽出した。MeOH 抽出物について ODS カラムクロマトグラフィー (10% MeOH-H₂O, MeOH) で精製し、MeOH 画分について LC-ESIMS 分析した。分析条件は、COSMOSIL 2.5C₁₈-MS-II (2.5 x 100 mm) のカラムを 40 °C で使用し、流速 0.30 mL/min で、2 溶媒系 (移動相 A: acetic acid-H₂O, 移動相 B: 0.1% acetic acid-CH₃CN; 0 - 5 min, 10 - 100% B, 5 - 8 min, 100% B) である。MS スペクトルは positive ion mode および negative ion mode で測定し、データ解析では Hystar data analysis software を使用した。

(3) 大量培養

本研究において使用した真菌 17F4103 と真菌 17F4110 の継代は、2.0% malt extract および 0.5% peptone、3.0% 寒天を精製水で調製し、20 mL を 9 cm シャーレに分注して作成した麦芽エキス寒天培地を使用した。継代は 1 週間ごとに行い、培養は 25 °C で行った。大量培養は、前培養 (1 週間) していたそれぞれの真菌を、上記と同様の麦芽エキス寒天培地 100 枚に対峙させるように植菌し、25 °C で 41 日間行った。

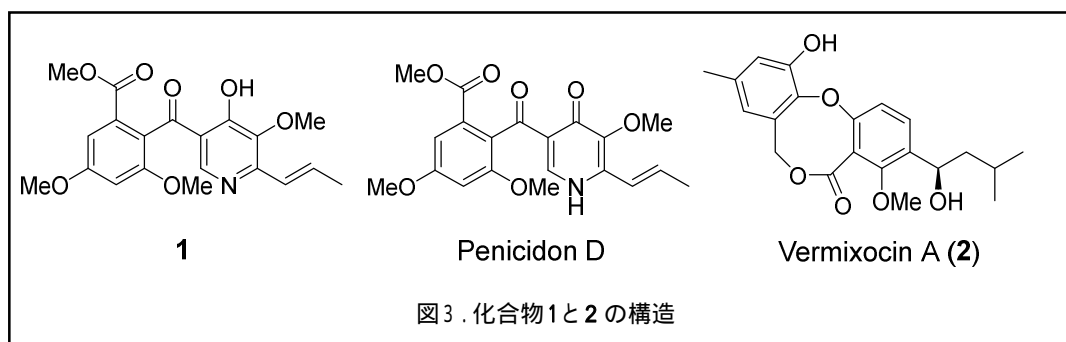
(4) 精製

得られた培養物を MeOH で抽出し、加熱減圧条件下で濃縮後、EtOAc と H₂O で液々分配した。得られた EtOAc 画分を加熱減圧条件下で濃縮後、90% MeOH/H₂O に溶解させ、n-hexane を加えて分配し、90% MeOH/H₂O 画分 (170 mg) を得た。90% MeOH/H₂O 可溶部 (170 mg) を SiO₂ カラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH, 20:1, 9:1, 8:2, CH₂Cl₂:MeOH:H₂O, 7:3:0.5, 6:4:1, MeOH) で分離し、画分 10-1.8 を得た。CH₂Cl₂:MeOH, 20:1 で溶出した画分 10-1 を SiO₂ HPLC (Inertsil SIL-100A; CH₂Cl₂:MeOH, 319:1, 159:1) にて分離精製を行い、化合物 1 (5.1 mg) と化合物 2 (3.6 mg) を単離した (図 2)。



4. 研究成果

宮崎県日向市の土壌から単離した 12 種の真菌について、寒天培地上で総当たりの組合せ (66 種) で共培養して経過を観察したところ、いくつかの組み合わせで、接触領域に変色が認められた。その中で、接触領域が赤く変色した 17F4103 株と 17F4110 株の組み合わせについて、変色領域を抽出し LC-MS で分析した。その結果、単独で培養した場合には確認されなかった、m/z 376 [M+H]⁺、371 [M-H]⁻、346 [M+H]⁺ の 3 つの化合物の存在が確認できた。そこで今回は、これらの化合物を単離することを目的として大量培養を行い、培養物の MeOH 抽出物を精製し、化合物 1 と 2 を得た。1 は、各種 NMR スペクトルを解析して構造を推定した。しかし、4 級炭素が多く、HMBC スペクトルでの相関が十分に得られなかったため、NMR スペクトルの解析だけでは構造を決定することができなかった。そこで、1 の ¹³C NMR の化学シフトを計算し、実測値と比較することで構造を決定することができた。また、1 の NMR データは既知の Penicidon D と一致したが、計算化学により構造を再検討したところ、Penicidon D (1) はケトン型ではなくエノール型で表記すべきであることを明らかにした。また、当初、目的としていた m/z 371 [M-H]⁻ の化合物は、Vermixocin A (2) と同定した (B. Proksa *et al.*, *J. Antibiot*, 1992, 45, 1268-1272.)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 村上隼矢、林望、猪俣照世、下田康嗣、江口啓介、加藤光、塚本佐知子 |
| 2. 発表標題 真菌の共培養により得られた新規炭素骨格を有するピリジナルカロイドの構造について |
| 3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|