

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890083

研究課題名（和文） 微生物が生産する非天然型生物活性物質の新規構造に関する研究

研究課題名（英文） Search for non-natural type bioactive compound produced by fungi.

研究代表者

加藤 光 (KATO HIKARU)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：20547129

研究成果の概要（和文）：フナムシ由来 *Aspergillus* 属真菌から、5種の新規イタコン酸誘導体を見出した。それらのうち2種は、イタコン酸前駆体の取込実験により得られ、オキザリル基を有していた。続いて、本真菌にイタコン酸誘導体を効率的に産生させるために、取込実験の条件を検討し、イタコン酸誘導体を優位に産生させる条件を見出した。以上のことから、本研究では、取込実験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。

研究成果の概要（英文）：Five new itaconic acid derivatives were isolated from *Aspergillus* sp. Two of the derivatives were isolated from feeding experiment with itaconic acid precursor and have had oxalyl group. Secondly, to stimulate the fungus to produce itaconic acid derivative, we examined the influence of culture conditions on feeding experiment. Accordingly, this research found that feeding experiment has drawn the structure diversity of natural product.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	920,000	276,000	1,196,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,990,000	597,000	2,587,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：取込実験、非天然型化合物、*Aspergillus* 属、イタコン酸

## 1. 研究開始当初の背景

本研究室では、2008年度までに、能登地方沿岸で採集した海洋由来 *Aspergillus* 属真菌の培養物から、15種の新規インドールアルカロイド notoamides A-N および versicolamide Bなどを単離した (Kato *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**,

46, 2254; Tsukamoto *et al.* *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 2064; Tsukamoto *et al.* *Org. Lett.*, **2009**, 11, 1297)。そして、notoamidesの生合成前駆体として notoamide Eを推定し、取込実験により notoamide Eが notoamides CおよびDの前駆体であることを証明した。さらに、非天然型新規化合物として notoamides E2-E4を得た (Tsukamoto *et al.*

*J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3834)。それら3種の新規化合物の中でも、notoamide E4はnotoamidesの中ではこれまでに見出されていないkynurenine骨格を有していた。また、本真菌と同属の*Aspergillus*属真菌からは、notoamide Bの鏡像異性体類が単離されており、2種の同属菌において起きていると考えられる生合成的分子内Diels-Alder反応(IMDA)が互いに逆の選択性を示すというユニークさはNature ChemistryのResearch Highlightsで紹介された。

(<http://www.nature.com/nchem/reshigh/2008/0408/full/nchem.2008.3.html>)

生合成前駆体の微生物への取込実験は、生合成経路を調べる目的で実施される。申請者も同様の目的で取込実験を行い、1種の新規骨格同族体を含む合計3種の非天然型新規化合物を得た。これにより、取込実験が新規生物活性物質の探索に応用できる可能性が示唆されたが、非天然型化合物を生合成させる目的で行われた報告は少ない(Xu *et al.* *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1467)。微生物の生合成においては、現在の有機化学的手法では不可能な反応が起こり得る。その特性の活用により天然物の構造多様性をさらに引き出し、医薬品シーズを効率的に供給したい。以上のnotoamidesに関する研究での結果を踏まえ、取込実験が微生物に多様な非天然型生物活性物質を生合成させる効率的な方法になり得ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、海洋由来微生物の2次代謝産物から薬理的機能性をもつ生物活性物質を見出し、その生合成前駆体の取込実験により非天然型新規活性物質を微生物に生合成させることを目的とする。そして、取込実験が、多様な化学構造を微生物に生合成させる効率的な方法となり得るのかを検討する。

## 3. 研究の方法

能登地方沿岸にて、海洋生物および海底の泥などを採集した。次いで、寒天培地(海水を用い調製)上に採集した海洋生物の体液および泥などを乗せ、インキュベーター中(25℃)で菌を培養した。培地上に生えた微生物を単離した。

採集した微生物を寒天培地上で培養し、

培地をメタノールで抽出した。得られた抽出物を液々分配により、水可溶部、*n*-ブタノール可溶部および酢酸エチル可溶部に分け、スクリーニング用サンプルとした。

作製したスクリーニング用サンプルについて、マウス由来パイエル板を用いた腸管免疫応答試験やHeLa細胞に対する毒性試験、および、抗菌活性試験などによりスクリーニングした。

細胞毒性の認められた培養物を産生した*Aspergillus niger*を麦芽エキス培地で大量培養(約500枚の寒天培地)し、培地ごとメタノールで抽出した。得られた抽出液の溶媒を減圧下で除去し、残留物を水と酢酸エチルで分配した。さらに、酢酸エチル可溶部を90%メタノール-水と*n*-ヘキサンで分配した。活性の認められた90%メタノール-水可溶部をSiO<sub>2</sub>カラムクロマトグラフィーで分画し、クロロホルム:メタノール=2:1で溶出した画分をODSカラムクロマトグラフィーで分画した。さらに、40%メタノール-水で溶出した画分を、ODS HPLCで精製し、イタコン酸誘導体を得た。

イタコン酸の前駆体はクエン酸であることが知られている。そこで、クエン酸を添加した麦芽エキス液体培地で本真菌を振盪培養した。得られた培養液に70%エタノールとなるようエタノールを加え、抽出を行った。その抽出液をろ過し、残渣をメタノールで抽出してろ液と混合し、水と酢酸エチルで分配した。さらに、酢酸エチル可溶部を90%メタノール-水と*n*-ヘキサンで分配した。得られた90%メタノール-水可溶部をODSカラムクロマトグラフィーで分画し、40%メタノール-水で溶出した画分をODS HPLCで精製した。

最後に、イタコン酸誘導体の産生効率を良くするために、以下の4つの培養条件を検討した。すなわち、以下の4つの培養条件での培地について、クエン酸を添加した麦芽エキス液体培地の振盪培養物とHPLCにて比較した。

### ①液体培養 or 寒天培養

クエン酸を添加した寒天培地に本菌を植菌し、25℃で、5日間培養した。

### ②振盪培養 or 静置培養

クエン酸を添加した液体培地に本菌を植菌し、25℃で、5日間、静置培養した。

### ③クエン酸の有無

麦芽エキス液体培地に本菌を植菌し、120 rpm、25℃で、5日間、振盪培養を行った。

④pH の変化

クエン酸ナトリウムを添加した液体培地に、本菌を植菌し、120 rpm、25°Cで、5日間、振盪培養を行った。

4. 研究成果

*Aspergillus niger* の培地から、3個の新規化合物 A (34.6 mg)、B (6.9 mg)、C (2.5 mg) と1個の既知化合物 2-methylene-3-(6-hydroxyhexyl)-butanedioic acid (D、31.3 mg) を単離した (figure 1、chart 1)。

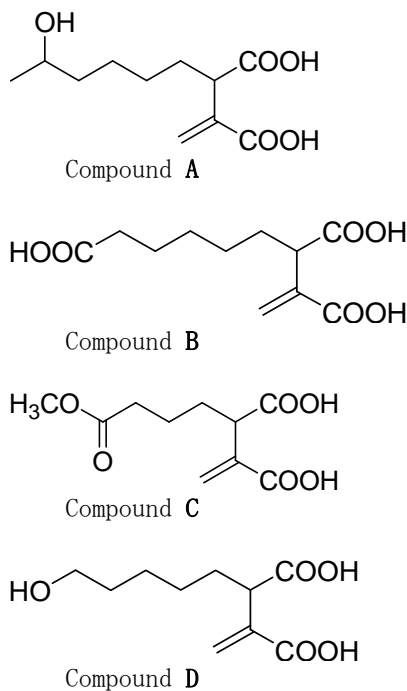
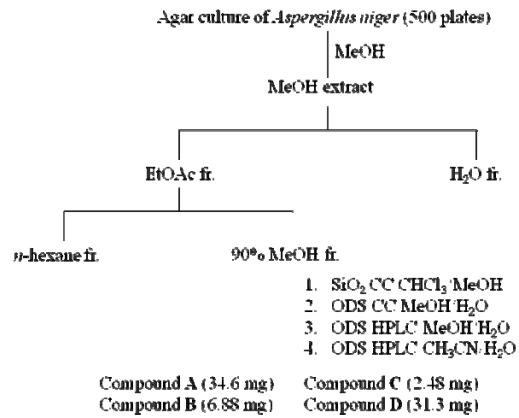


Figure 1. Structure of the compounds A・D.

Chart 1. Isolation of compounds A・D.



次に、クエン酸を添加した麦芽エキス液体培地で本真菌を培養し、2個の新規化合物 E (5.0 mg)、F (2.6 mg) (figure 2) と3個の既知化合物 hexylitaconic acid (G, 3.8 mg)、tensyucic acid B (H, 5.3 mg)、tensyucic acid D (I, 5.4 mg) を単離した (chart 2)。これらの化合物は、クエン酸を添加しない麦芽エキス培地の抽出物からは見出されなかった。また、オキザリル基を有するイタコン酸は、本研究で初めて見出された。

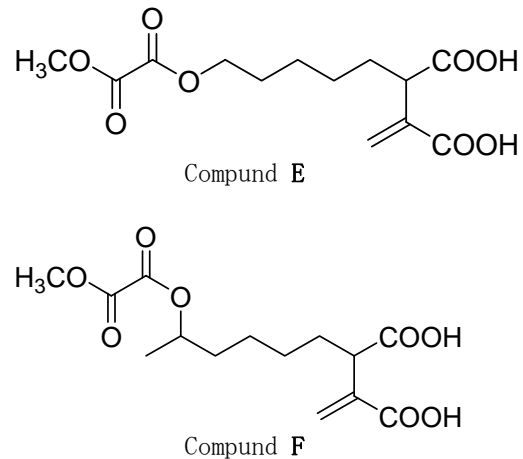
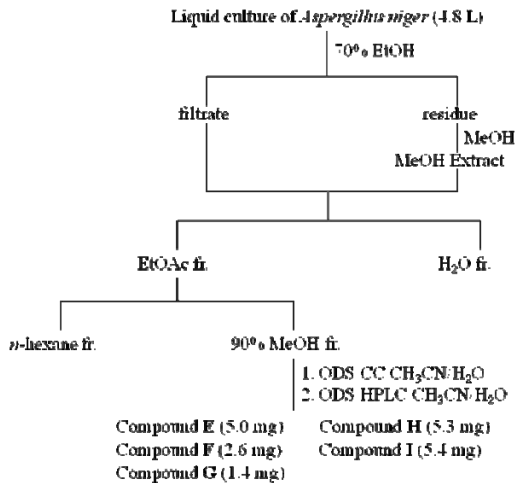


Figure 2. Structure of the compounds E and D.

Chart 2. Isolation of compounds E・I.



最後に、以下の4つの培養条件について検討した。

① 液体培養 or 寒天培養

クエン酸寒天培地では、イタコン酸誘導体では観察されない254 nmの吸収がより強く認められた。また、寒天培地のHPLCチャート上では、化合物Eの保持時間付近では210 nmにおける吸収ピークが観察されなかった。これらのことから、寒天培地では夾雑物が多く産生され、イタコン酸誘導体を効率よく産生させることはできなかったことが分かった (Figures 3 and 4)。

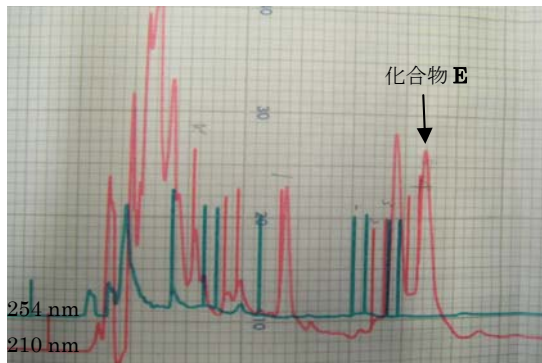


Figure 3. HPLC profile of liquid culture.

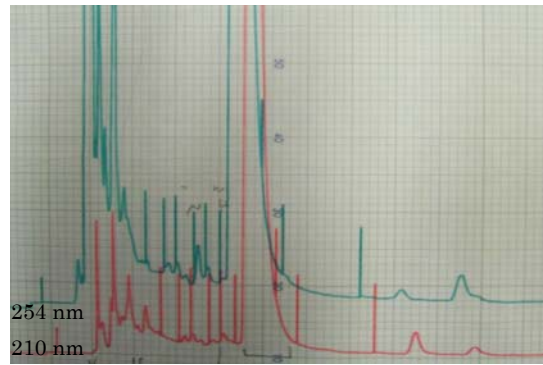


Figure 4. HPLC profile of agar culture.

② 振盪培養 or 静置培養

Figure 3 との比較から、静置培養では figure 4 と同様に 254 nm での吸収がより強く認められ、夾雑物が多く産生されていることが分かった (figure 5)。また、化合物Eと同程度の保持時間に210 nmの吸収が観測されなかったことから、Eの産生には振盪すること、つまり十分な酸素の供給が必要であると考えられる。

③ クエン酸の有無

Figure 6 で認められた化合物Eと同程度の保持時間のピークは、<sup>1</sup>H NMR スペクトルよりイタコン酸誘導体ではなかった。よって、前駆体であるクエン酸を添加したことで、化合物Eを優位に産生できたと言える。

④ pH の変化

Figure 3 と figure 7 を比較したところ、類似したピークが認められた。また、化合物Eの収量を比較したところ、クエン酸液体培地の場合と同程度だった。

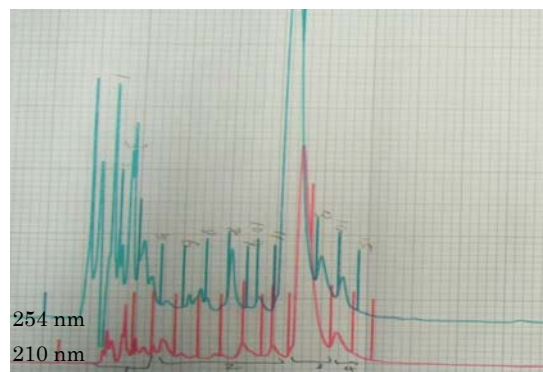


Figure 5. HPLC profile of static culture.

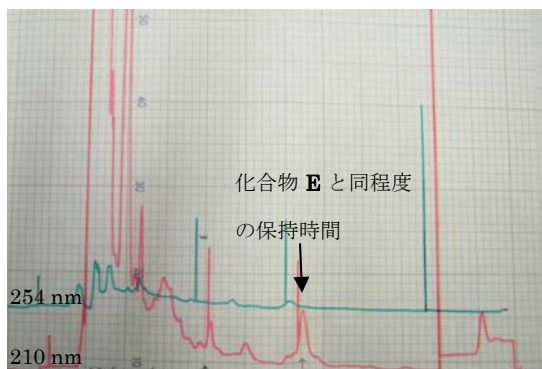


Figure 6. HPLC profile of malt extract liquid culture.

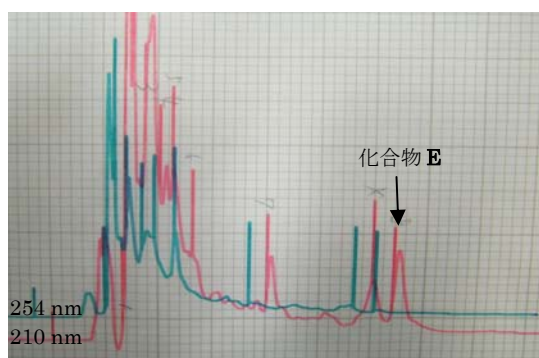


Figure 7. HPLC profile of liquid culture containing sodium citrate.

①-④の検討から、クエン酸を添加した液体培地で振盪培養した時、イタコン酸誘導体が優位に産生されることが分かった。また、pHによる変化は認められなかった。これにより、イタコン酸を優位に産生させる条件を見出した。これらの条件によって、イタコン酸誘導体を選択的に本真菌に産生させ、工業的に利用できる可能性が示唆された。また、前駆体の取込実験により効率的に新規化合物が産生され、かつ、優位に目的化合物誘導体が産生された。これらにより、取込実験が、多様な化学構造を微生物に生合成させる効率的な方法となり得ると考える。天然物の生合成においては、現在の有機化学的手法では不可能な反応が起こりえる。その特性の活用により天然物の構造多様性をさらに引き出すことができれば、医薬品シーズを効率的に供給できると思われる。本研究では、取込実験により、天然物の構造多様性を引き出すことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 津幡知侑, 加藤光, 伊達絢一郎, 川畑哲郎, 内田千晶, 高野文英, 太田富久, 海洋由来 *Aspergillus* 属真菌が産生する itaconic acid 誘導体の構造, 第130年会日本薬学会, 2010年3月28日, 岡山大学津島キャンパス (岡山県)
- ② 加藤光, 津幡知侑, 伊達絢一郎, 高野文英, 太田富久, クエン酸豊富な条件下で *Aspergillus niger* が産生する新規イタコン酸誘導体, 第131年会日本薬学会, 2011年3月31日, 東日本大震災のため誌上開催

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 光 (KATO HIKARU)  
金沢大学・薬学系・助教  
研究者番号: 20547129

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし