

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870660

研究課題名(和文) 休眠遺伝子エピジェネティック制御の新しい標的を利用する糸状菌代謝産物生産法の開発

研究課題名(英文) Development of induced production method for dormant fungal secondary biogenesis by modulating new epigenetic targets

研究代表者

山崎 寛之 (YAMAZAKI, Hiroyuki)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70525344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌代謝産物の新たな生産法として注目されているケミカルエピジェネティクスに応用可能な細胞内因子の探索と様々な培養条件の検討を行った。

Sirtuin活性化剤であるresveratrolを用いた添加培養から、海洋糸状菌Trichoderma sp. TPU199株によるbisabolane型セスキテルペンの生産を誘導した。本検討で見出したTPU199株においては、培地中のハロゲン化イオンを代謝物中に取り込む能力を見出し、NaI添加培地による培養から新規I含有化合物の誘導生産に成功した。また、本検討より得られた6株の糸状菌と1株の放線菌培養液より、16個の新規二次代謝産物を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the induced production of new fungal metabolites by modulating new targets of epigenetic factor and several culture methods.

In the course of our studies, the production of a bisabolane sesquiterpene from marine-derived fungus Trichoderma sp. TPU199 was induced using the fermentation with resveratrol as a sirtuin activator. Our continuous efforts revealed that the strain TPU199 had the ability to produce halogenated epidithiodiketopiperazines by the cultivation supplemented with sodium halides. Especially, NaI-added fermentation of the strain TPU199 led to the production of a new iodo derivative, iododithiobrevamide. Moreover, sixteen new metabolites were isolated from the culture broth of six fungal and one actinomycete strains obtained during this study.

研究分野：天然物化学

キーワード：ケミカルエピジェネティクス 休眠生合成遺伝子 海洋糸状菌 二次代謝産物 生物活性物質

### 1. 研究開始当初の背景

微生物は医薬品探索の重要な資源であり、Fleming によるペニシリンの発見に端を発し、プラバスタチンやタクロリムスに代表される多くの化合物が医薬品として広く医療に貢献してきた。しかしながら、探索研究が進むにつれて微生物を含む天然資源から新規生物活性物質を得ることが困難となり、多くの製薬企業が天然物領域から撤退し、合成品ライブラリーを中心とした創薬を優先している。よって、天然物探索の新しいアプローチの開発が重要な課題となっている。

近年、抗寄生虫薬 avermectin 生産菌である放線菌 *Streptomyces avermitilis* MA-4680 株の全ゲノム配列が解明され、少なくとも 30 個の二次代謝産物に関わる生合成遺伝子を有することが証明された (Ikeda H. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 526)。これにより、微生物にはこれまで同定された化合物の数より遥かに多くの未同定な二次代謝産物生合成遺伝子が存在することが明らかになった。しかし、二次代謝産物は菌の生育に必須ではないため、通常の培養条件では限られた二次代謝産物しか生産されていない。従って、休眠している遺伝子を発現させる最適な培養条件と培養法の確立は、微生物資源の新たな物質生産能を引き出し、持てる資源の再開拓と有効的な活用が期待される。また、多くの製薬企業が天然物探索を撤退した現在、大学のようなアカデミアが、多くの可能性を秘めた未開拓遺伝子資源からの新規化合物の発見・提供に繋がる基礎研究を進める意義は非常に大きい。

### 2. 研究の目的

2007 年に Keller らは、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の 1 つである HdaA 欠損糸状菌株において、多くの二次代謝産物の生産量が顕著に向上することを報告した (Keller NP. *et al.*, *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1656)。即ち、HDAC や DNA メチル化酵素 (DNMT) の阻害によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が、二次代謝産物に関わる休眠遺伝子発現の活性化に繋がると示唆された。実際、2009 年に Cichewicz らは、SAHA (HDAC 阻害剤) や 5-azacytidine (DNMT 阻害剤) を培養液に加えることで、幾つかの糸状菌から数種類の新規物質の取得に成功し、天然物探索の新しい方法論としてケミカルエピジェネティクスを提示した (Cichewicz RH. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 1199)。

我々も HDAC や DNMT の阻害剤を用いたエピジェネティック遺伝子発現制御の研究を行っているが、これらの酵素の阻害により二次代謝産物に変化する菌株は多くない。そこで本研究では、物質生産に関わるより有効なエピジェネティック因子の探索および効果的な培養手法の構築を目的に、本研究に着手することにした。

### 3. 研究の方法

本申請研究期間において、下記の(1)~(4)の実験項目について重点的に検討した。

#### (1) 微生物菌株の分離

本申請期間中、インドネシア、沖縄県西表島および東北地方において、海洋糸状菌や海洋放線菌を中心に分離を行い、本実験に適応した。

#### (2) Resveratrol を用いた物質生産検討

Resveratrol (図 1) は Sirtuin (HDAC) の活性化剤として知られているが、一部の HDAC に対する阻害作用も報告されている (Venturelli S. *et al.*, *PLoS One* **2013**, *8*, e73097)。糸状菌の転写活性に対する様々な効果を期待して、resveratrol を物質生産への検討に使用した。

Resveratrol を添加培養した時の代謝物の変化は、LC/UV で網羅的に分析した。また、resveratrol の添加濃度を 3 点取り、適切な添加量を検討した。代謝産物に変化が確認された菌株については、適切な条件を用いた大量培養を行い、無添加時の生成物と阻害剤添加の生成物を単離し、各種スペクトル解析を駆使して構造を決定した。

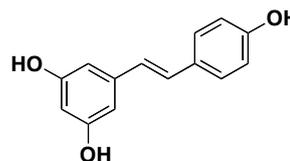


図 1 Resveratrol の構造

#### (3) Curcumin を用いた物質生産検討

Curcumin (図 2) はヒストンアセチル化酵素 (HAT) の阻害剤として知られている。従来、ケミカルエピジェネティクスに用いられてきた HDAC 阻害剤とは反対の作用ではあるが、転写の不活性化が一部の代謝産物の生産性向上に繋がると予想し、検討を行った。方法については、(1)と同様に実験を進めた。

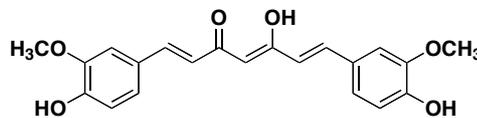


図 2 Curcumin の構造

#### (4) 生物活性スクリーニング

本検討で得られた微生物培養液を用いて、生活習慣病および感染症に着目した以下の生物活性スクリーニングを行った。

##### (a) プロテインチロシンホスファターゼ 1B (PTP1B) 阻害剤の探索

インスリンやレプチンによる細胞内シグナル伝達を負に制御する PTP1B の阻害剤は、2 型糖尿病や肥満症の有望な治療薬となると考えられている。

阻害剤探索に用いる酵素としては市販の

ヒト PTP1B (Enzo Life Sciences) を使用した。基質には *p*-ニトロフェニルリン酸化二ナトリウム (*p*NPP, Sigma) を用いて、*p*NPP の脱リン酸化による発色の吸光度を測定し、スクリーニングサンプルによる酵素阻害活性を評価した。

#### (b) 抗結核物質の探索

検定菌として非感染性で早生育型の *Mycobacterium smegmatis* を用いてペーパーディスク法による試験を行った。

活性物質として見出された化合物については *M. bovis* (ウシ型結核菌) や非結核性抗酸菌症 (MAC 症) に対する評価も実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) Resveratrol の添加培養

Resveratrol の添加培養を、海洋糸状菌約 50 株に対して行い、代謝産物の変化を LC/UV を用いて比較解析した。本検討により、海洋糸状菌 *Trichoderma cf. brevicompactum* TPU199 株の物質生産に変化が確認された。本菌株を、resveratrol 添加条件にて大量に培養し、新たに生産された代謝物を単離・精製した。NMR を中心とした機器分析の結果、その構造を bisabolane 型セスキテルペンである既知化合物 (+)-sydonol と決定した (図 3)。本菌株は、主にアミノ酸経路による代謝物を生産するが (詳細は後述)、resveratrol 添加によりイソプレネン経路が活性化されたと考えている。

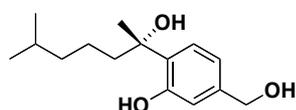


図 3 (+)-Sydonol の構造

また、インドネシアで分離した海洋糸状菌 *Penicillium citrinum* TPU1321 株においても、代謝産物の変化が検出され、大量培養とカラム精製により生成物を単離した。各種スペクトルデータより構造を解析したところ、resveratrol にアルデヒド基が付加した新規誘導体であることが分かった (未発表データ)。このような微生物変換を示す菌株はほとんど知られていないため、現在、詳細な基質検討を行っている。

#### (2) Curcumin の添加培養

Curcumin の添加培養を、海洋糸状菌約 50 株に適応した。現在までに、物質生産に変化を示す菌株は見出せていないが、curcumin を新規誘導体に変換する海洋糸状菌 *P. raistrickii* TPU1243 株を発見した。Bisdesmethoxycurcumin、resveratrol や chalcone 等の類似化合物を用いた基質検討の結果、 $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンに対する選択的な還元作用を示すことが分かった。本菌株が有する選択的な物質変換能を利用して、共培養系への応用

にも取り組んでいる。

#### (3) 海洋糸状菌 *Trichoderma* sp. TPU199 株の培養条件検討

上述した海洋糸状菌 TPU199 株は、パラオ産の紅藻から分離され、通常用いる真水の生産培地による振とう培養において、非常にユニークな代謝産物を生産することが分かった。特に、gliovirin や pretrichodermamide A (図 4) は 2 分子のフェニルアラニンの  $\alpha$  位と  $\beta$  位間でジスルフィド結合を形成する希少な epidithiodiketopiperazine 類であったため、本菌株を用いて種々の検討を行った。

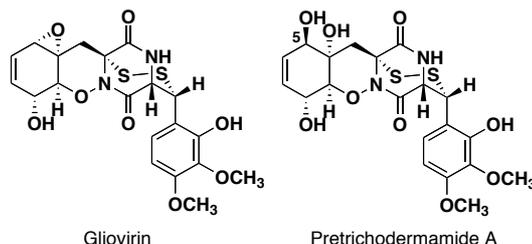


図 4 Gliovirin と pretrichodermamide A の構造

まず、本菌株が海洋由来であることから、海水を用いた培養を検討した結果、pretrichodermamide A の 5 位水酸基が Cl 基に変換した DC1149B の生産が新しく確認された (図 5)。海水中の Cl 成分が取り込まれ、DC1149B が誘導されたと考えられたので、真水に 3% の NaCl を添加した培地を用いて培養を行ったところ、海水培地と同様に DC1149B の生産が確認された。そこで、Br 誘導体や I 誘導体の生産を期待して NaBr と NaI を添加した培地を用いて本菌株を培養したところ、5 位が Br 基に置換した DC1149R と新規 I 誘導体である iododithiobrevamide がそれぞれの培養液中から新たに単離された (図 5)。

さらに、本菌株に対し、HDAC 阻害剤である dimethyl sulfoxide (DMSO) の添加と海水培地の組み合わせ培養を行った結果、DC1149B の trithio 体が新規化合物 (chlorotrithiobrevamide) として得られた (図 5)。本菌株において確立した手法を他の菌株に応用することで、更なる新規物質の生産を検討している。

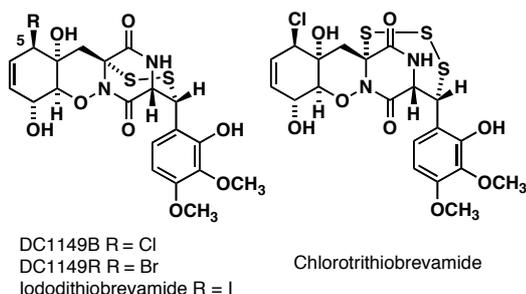


図 5 Epipolythiodiketopiperazine 類の構造

#### (4) 生物活性スクリーニング

本検討過程で得られた微生物培養液を用いて、生物活性スクリーニングを実施した。

##### (a) PTP1B 阻害剤

(i) インドネシア産単体ボヤ *Polycarpa aurata* より分離した海洋糸状菌 *Penicillium verruculosum* の培養液 (海水培地、振とう条件) より、新規化合物 verruculide A と B を見出した (図 6)。NMR を中心とした構造解析より、立体を含めた新規メロセスキテルペン構造を明らかにした。また、verruculide A が IC<sub>50</sub> 値 8.4 μM で PTP1B 阻害活性を示すのに対し、環化前駆体である verruculide B では活性の低下が認められた。

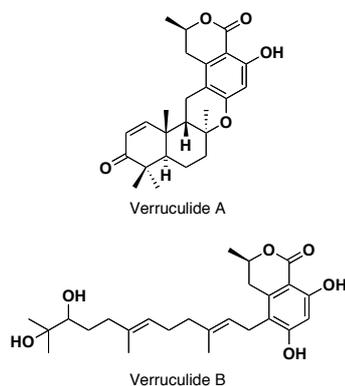


図 6 Verruculide A および B の構造

(ii) 青森県むつ市で採集した海水より分離した海洋糸状菌 *Trichoderma* sp. の培養液 (真水培地、静置条件) より、2 成分の新規ポリケタイド trichoketide A および B を単離した (図 7)。両化合物は互いにエピマーの関係にあり、それぞれの ECD スペクトルを計算値と比較することで絶対立体配置を決定した。PTP1B に対しては、それぞれ IC<sub>50</sub> 値 53.1 および 65.1 μM の阻害活性を示した。

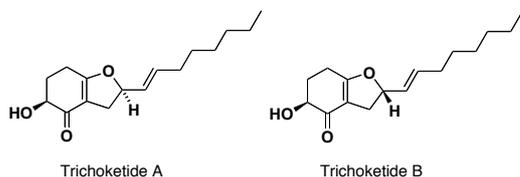


図 7 Trichoketide A および B の構造

(iii) 沖縄県西表島の星砂の浜にて採取した湧き水より分離した糸状菌 *Aspergillus* sp. TPU1343 株の培養液中 (真水培地、振とう条件) より、1 成分の新規 bis-tetrahydroxanthone 化合物を見出し、asperdichrome と命名した (図 8)。本化合物は、2 分子の tetrahydroxanthone がエーテル結合により 2 量体化した初めての報告であり、PTP1B に対して IC<sub>50</sub> 値 6.0 μM

で阻害活性を示した。

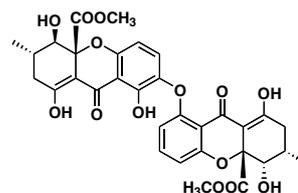


図 8 Asperdichrome の構造

##### (b) 抗結核物質

(i) 沖縄県西表島で分離した海洋放線菌 *Streptomyces* sp. TPU1236A 株の培養液中 (海水培地、振とう条件) より、5 つの新規物質 streptcytosines A-E を単離した。Streptcytosine A (図 9) は *Mycobacterium smegmatis* に対し MIC 値 32 μg/mL で抗菌活性を示した。また、*M. bovis* や MAC 症の起原因菌である *M. avium* と *M. intracellulare* に対する効果も確認している (未発表データ)。

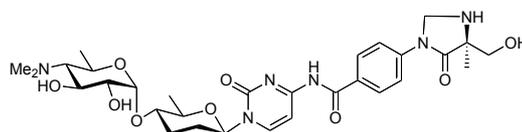


図 9 Streptcytosine A の構造

(ii) 宮城県牡鹿半島で採集した養殖カキの殻の付着物から分離した糸状菌 *Penicillium* sp. TPU1271 株の培養液中 (海水培地、静置条件) に、新規ポリケタイドである penicyrone A および B を見出した。これら新規化合物に、抗 *M. smegmatis* 活性は見られなかったが、類縁の既知物質である verrucosidin (図 10) に本活性を初めて発見した。

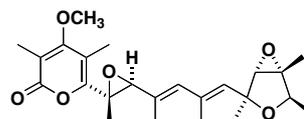


図 10 Verrucosidin の構造

これら新規物質の生産菌株は、今後新たなケミカルエピジェネティクス実験や培養条件検討に用いる優先候補株である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 9 件) \* は責任著者

- ① Lee, J.-S.; Maarisit, W.; Abdjul, D.B.; Yamazaki, H.\*; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Kanno, S.; and Namikoshi, M. Structures and biological activities of triterpenes and

- sesquiterpenes obtained from *Russula lepida*. *Phytochemistry* **127**, 63–68 (2016). (査読有り)
- ② Bu, Y.-Y.; Yamazaki, H.\*; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Ukai, K.; and Namikoshi, M. Penicyrones A and B, an epimeric pair of  $\alpha$ -pyrone-type polyketides from the marine-derived *Penicillium* sp. *J. Antibiot.* **69**, 57–61 (2016). (査読有り)
- ③ Yamazaki, H.\*; Ukai, K.; and Namikoshi, M. Asperdichrome, an unusual dimer of tetrahydroxanthone through an ether bond, with protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity, from the Okinawan freshwater *Aspergillus* sp. TPU1343. *Tetrahedron Lett.* **57**, 732–735 (2016). (査読有り)
- ④ Yamazaki, H.\*; Saito, R.; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Toraiwa, K.; Iwasaki, K.; Izumikawa, Y.; Nakayama, W.; and Namikoshi, M. Trichoketides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. *J. Antibiot.* **68**, 628–632 (2015). (査読有り)
- ⑤ Yamazaki, H.\*; Rotinsulu, H.; Narita, R.; Takahashi, R.; and Namikoshi, M. Induced production of halogenated epidithiodiketopiperazines by a marine-derived *Trichoderma* cf. *brevicompectum* with sodium halides. *J. Nat. Prod.* **78**, 2319–2321 (2015). (査読有り)
- ⑥ Yamazaki, H.\*; Takahashi, O.; Murakami, K.; and Namikoshi, M. Induced production of a new unprecedented epitritiodiketopiperazine, chlorotrithiobrevamide, by a culture of the marine-derived *Trichoderma* cf. *brevicompectum* with dimethyl sulfoxide. *Tetrahedron Lett.* **56**, 6262–6265 (2015). (査読有り)
- ⑦ Bu, Y.-Y.; Yamazaki, H.\*; Ukai, K.; and Namikoshi, M. Penicillimide, an open-chain hemisuccinimide from Okinawan marine-derived *Penicillium copticola*. *J. Antibiot.* **68**, 537–539 (2015). (査読有り)
- ⑧ Yamazaki, H.\*; Nakayama, W.; Takahashi, O.; Kirikoshi, R.; Izumikawa, R.; Iwasaki, K.; Toraiwa, K.; Rotinsulu, H.; Wewengkang, D.S.; Sumilat, D.A.; Mangindaan, R.E.P.; and Namikoshi, M. Verruculides A and B, two new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from an Indonesian ascidian-derived *Penicillium verruculosum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 3087–3090 (2015). (査読有り)
- ⑨ Bu, Y.-Y.; Yamazaki, H.\*; Ukai, K.; and Namikoshi, M. Anti-mycobacterial nucleoside antibiotics from a marine-derived *Streptomyces* sp. TPU1236A. *Mar. Drugs* **12**, 6102–6112 (2014). (査読有り)
- [学会発表] (計 16 件)
- ① 山崎 寛之, 高橋 央宜, 村上 一輝, 浪越 通夫  
パラオ産海洋糸状菌 *Trichoderma* cf. *brevicompectum* TPU199 株のジメチルスルフォキシド添加培養による chlorotrithiobrevamide の生産誘導  
日本薬学会 第 136 回年会 (横浜)  
2016 年 3 月 28 日
- ② 山崎 寛之, 高橋 央宜, 桐越 亮太, Henki Rotinsulu, Defny S. Wewengkang, Deiske A. Sumilat, 鶴飼 和代, 浪越 通夫  
インドネシア産海洋糸状菌 *Penicillium verruculosum* TPU1311 株が生産する新規 protein tyrosine phosphatase 1B 阻害剤 verruculide 類に関する研究  
日本薬学会 第 136 回年会 (横浜)  
2016 年 3 月 28 日
- ③ ト 英悦, 山崎 寛之, 高橋 央宜, 桐越 亮太, 鶴飼 和代, 浪越 通夫  
海洋糸状菌 *Penicillium* sp. TPU1271 株が生産するポリケタイド化合物 penicyrones A および B に関する研究  
日本薬学会 第 136 回年会 (横浜)  
2016 年 3 月 28 日
- ④ Jong-Soo Lee, Wilmar Maarisit, Delfly B. Abdjul, Hiroyuki Yamazaki, Ohgi Takahashi, Ryota Kirikoshi, Syu-ichi Kanno, and Michio Namikoshi  
Structures and biological activities of new terpene metabolites obtained from the fruiting bodies of *Russula lepida*.  
日本薬学会 第 136 回年会 (横浜)  
2016 年 3 月 28 日
- ⑤ Hiroyuki Yamazaki, Ohgi Takahashi, Ryota Kirikoshi, Michio Namikoshi  
Induced production of new epidithiodiketopiperazines by the Palauan marine-derived fungus *Trichoderma* sp. TPU199  
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Honolulu, HI, USA)  
December 18, 2015
- ⑥ 山崎 寛之, 浪越 通夫  
海洋生物資源を対象とした protein tyrosine phosphatase 1B 阻害剤の探索と培養法検討による新規糸状菌二次代謝産物の誘導生産  
第 6 回 食品薬学シンポジウム (岡山), 日本薬学会・生薬天然物部会奨励研究賞受賞講演  
2015 年 10 月 30 日
- ⑦ 山崎 寛之, 遠藤 幸太郎, 小笠原 彰希, 高橋 萌, 渡辺 祐太, Henki Rotinsulu, Defny S. Wewengkang, Deiske A. Sumilat, 鶴飼 和代, 浪越 通夫  
インドネシア産放線菌が生産する二次代謝産物に関する研究  
第 54 回 日本薬学会東北支部大会 (岩手)

- 2015年9月26日
- ⑧ 山崎 寛之, 齊藤 亮, 高橋 央宜, 桐越 亮太, 虎岩 憲吾, 岩崎 康平, 中山 渉, 泉川 裕太, 浪越 通夫  
海洋糸状菌 *Trichoderma* sp. TPU1237 株が生産する新規 PTP1B 阻害物質に関する研究  
日本薬学会 第 135 回年会 (神戸)  
2015年3月27日
- ⑨ 山崎 寛之, 今野 翔太, 岩崎 康平, 中山 渉, 泉川 裕太, 虎岩 憲吾, 浪越 通夫  
海洋糸状菌によるクルクミンの微生物変換  
第 53 回日本薬学会東北支部大会 (福島)  
2014年10月5日
- ⑩ ト 英悦, 山崎 寛之, 鶴飼 和代, 浪越 通夫  
西表島産海洋放線菌が生産する新規抗結核物質の構造と生物活性  
第 53 回日本薬学会東北支部大会 (福島)  
2014年10月5日
- ⑪ 山崎 寛之, 齊藤 亮, 菅野 秀一, 今野 翔太, 成田 麗加, 高橋 亮介, 石川 正明, 浪越 通夫  
青森県で採集した水圏由来糸状菌からの protein tyrosine phosphatase 1B 阻害剤の探索  
日本薬学会第 134 回年会 (熊本)  
2014年3月29日
- ⑫ 山崎 寛之, 成田 麗加, 高橋 亮介, 齊藤 亮, 今野 翔太, 高橋 央宜, 浪越 通夫  
パラオ産海洋糸状菌 *Trichoderma* sp. から単離した epipolythiodiketopiperazine 類の抗結核活性  
日本薬学会第 134 回年会 (熊本)  
2014年3月29日
- ⑬ 千田 一慶, 山崎 寛之, Remy E. P. Mangindaan, 浪越 通夫  
インドネシア産海洋糸状菌 *Aspergillus* sp. TPU011 株の海水培地による物質生産の検討  
第 52 回日本薬学会東北支部大会 (仙台)  
2013年10月20日
- ⑭ ト 英悦, 山崎 寛之, 鶴飼 和代, 浪越 通夫  
宮城県産海洋糸状菌 *Penicillium* sp. TPU1205 株が生産する新規ポリケタイドの構造  
第 52 回日本薬学会東北支部大会 (仙台)  
2013年10月20日
- ⑮ 山崎 寛之, Henki Rotinsulu, 高橋 央宜, 浪越 通夫  
パラオ産海洋糸状菌 *Trichoderma* sp. TPU199 株による新規 epidithiodiketopiperazine 類の生産誘導  
第 55 回天然有機化合物討論会 (京都)  
2013年9月19日
- ⑯ 山崎 寛之, 村上 一輝, 藤原 大夢, 金子剛, 浪越 通夫  
パラオ産海洋糸状菌 *Trichoderma* sp.

TPU199 株の DMSO 添加培養による新規 epitrithiodiketopiperazine の生産誘導  
第 8 回化学生態学研究会 (函館)  
2013年6月28日

[その他]  
ホームページ  
<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/tennen/site/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
東北薬科大学 薬学部 助教  
山崎 寛之 (YAMAZAKI, Hiroyuki)

研究者番号 : 70525344