

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460117

研究課題名(和文) 昆虫病原性微生物の休眠生合成遺伝子活性化による新規創薬シーズの創出

研究課題名(英文) Generation of new drug seed natural products from entomopathogenic microorganism by activating silent biosynthetic gene clusters

研究代表者

浅井 禎吾 (ASAI, Teigo)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：60572310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、探索資源に用いる微生物種(糸状菌 および 細菌)に応じた二次代謝活性化法を確立し、従来の培養方法では生産が誘導されない新規性の高い構造や薬理活性を有する多様な天然物の取得を目指した。様々な糸状菌に対して、化学変異源処理を行いランダムに変異を導入することでハイグロマイシンB耐性株について二次代謝物の生産性を評価した。その結果、ハイグロマイシンB耐性株を利用する新しい二次代謝活性化法の確立に成功した。さらに、ハイグロマイシンB耐性株を用いる手法とケミカルエピジェネティクスを利用して、様々な昆虫病原性糸状菌や内生糸状菌から新規二次代謝物の獲得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop several methods for activating silent biosynthetic gene cluster to find a variety of novel natural products and biological active compounds to be drug seeds. First we made mutants with hygromycin B resistance of various fungi by using chemical mutagenic approach and evaluated their ability of secondary metabolite production. From the results, we found that the use of mutants with hygromycin B resistance is significantly effective to stimuli fungal silent biosynthetic pathways. Next, we screened a large number of entomopathogenic fungi and fungi living in insects by applying the newly developed method in addition to chemical epigenetics and successfully obtained a diverse novel natural products.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 二次代謝物 糸状菌 休眠遺伝子 薬理活性天然物 二次代謝活性化 リボゾーム工学 生合成

### 1. 研究開始当初の背景

放線菌や糸状菌などの微生物は、医薬品として有用な化合物を生産する重要な資源である。それゆえ、古くから天然物探索研究が活発に行われ、多様性に富む化学構造や様々な生物活性を有する多くの二次代謝物が発見されてきた。しかし、微生物のゲノム情報が解読されるにつれ、そこには、さらに多くの二次代謝物生合成遺伝子の存在が明らかになった。これら生合成遺伝子の大半は、従来の培養条件下では休眠状態にあり、二次代謝物生産能力の一部しか引き出せていない。これら“休眠遺伝子”を活用することができれば、医薬品開発においてリード化合物になりえる新規活性天然物の探索源が飛躍的に向上することが期待される。

### 2. 研究の目的

昆虫病原性微生物は、特異な生活環(感染, 寄生, 増殖, 殺虫など)の中で多様な生物活性物質を利用している可能性があり、薬理活性天然物取得の良い資源と期待される。例えば、昆虫寄生糸状菌が生産する *myriocin* (免疫抑制剤) や *cordycepin* (抗生物質) は、宿主の免疫からの防御や病死した宿主の腐敗を防ぐためと考えられている。しかし、これらの活性物質の生産が宿主との生物間相互作用により誘導されるならば、従来の培養方法では発見できない新規活性天然物が数多く存在する可能性がある。本研究では、まず、新しい糸状菌二次代謝活性化法を開発し、次に、これまでに確立したケミカルエピジェネティクスと新たに開発した方法を用いて探索することで、昆虫病原性糸状菌や昆虫内生糸状菌から新規薬理活性天然物の取得を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糸状菌二次代謝活性化法の開発

放線菌などの細菌では、リボソームを標的とする抗生物質(ストレプトマイシンなど)やRNAポリメラーゼ阻害剤(リファンピシンなど)に対する薬剤耐性変異を導入することで休眠型二次代謝物の生産を活性化する方法「リボソーム工学」<sup>1</sup>が確立されており、有用物質の効率的生産や新規物質探索に活用されている。本研究では、この概念を真核生物である糸状菌へと応用し、汎用性の高い二次代謝活性化法の開発を試みた。まず、様々な糸状菌を用いて、真核生物のリボソームを標的とする薬剤であるハイグロマイシンBの耐性株を作成し、それらの二次代謝物の生産性を評価した。糸状菌は自発的な突然変異の確率が原核生物よりも低いと、胞子や菌糸に対して、化学変異原である1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン(MNNG)を処理することでランダムに突然変異を導入して、薬剤耐性株を作成した。作成した耐性株を液体培養や固体培養を含め複数の条件下で培養し、二次代謝物の生産性を評価した(図1)。

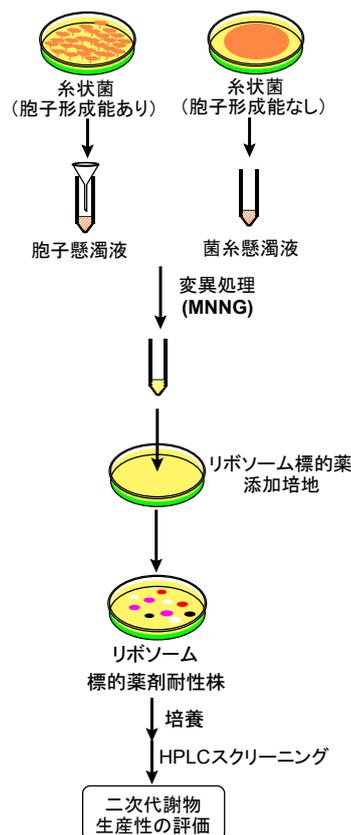


図1. 糸状菌リボソーム標的薬剤耐性株の作成と二次代謝物生産性評価のスキーム

#### (2) 2種の二次代謝活性化法を用いる昆虫病原性糸状菌および昆虫内生糸状菌由来新規天然物の探索

昆虫病原性糸状菌に加え、独自に昆虫から分離した内生糸状菌を探索源として、本研究で開発したハイグロマイシン耐性株を利用する方法と、既に確立しているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いるケミカルエピジェネティクスの2種の糸状菌二次代謝活性化法を用いて、新規天然物の探索を行った。また、多様な新規二次代謝物の獲得を目指し、上述の菌に加え、植物内生糸状菌や *Chaetomium* 属糸状菌など、幅広い菌種に適用した(図2)。

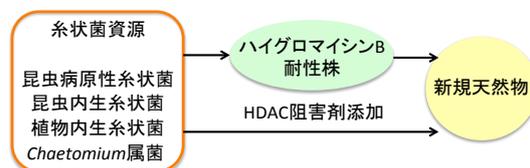


図2. 本研究での新規天然物探索の概略

### 4. 研究成果

#### (1) ハイグロマイシンB耐性株を用いる新規二次代謝活性化法の開発

まず、代表的な糸状菌の属である *Aspergillus* 属や *Eupenicillium* 属菌のうち、ハイグロマイシンBに対して500 µg/ml以下で感受性を示す菌について検討した。変異処理の条件と選抜時の薬剤濃度を検討するこ

とにより、ほとんどの菌で耐性株を取得することができた。また、十分に孢子を形成した昆虫寄生糸状菌 *Sporothrix pallida* でも同様に薬剤耐性株が取得でき、適応範囲の広さが示された。続いて、孢子を形成しない菌への適応を試みた。変異源の濃度、薬剤濃度の検討に加え、菌糸の調製法を検討することで、数種の菌でハイグロマイシン B 耐性株の作成に成功した。続いて、得られたハイグロマイシン B 耐性株を種々の条件で培養し、二次代謝物生産能について評価した。その結果、薬剤耐性株が作成できた菌種に関しては、高い確率で二次代謝が活性化していることを見出した (図 3)。この方法では、化学変異源を用いてランダムに突然変異を導入しているため、ハイグロマイシン耐性化に寄与する遺伝子変異と二次代謝活性化を引き起こすのに寄与する遺伝子変異が同じかそれとも異なるのかについては明らかにできていないものの、新規天然物探索という観点からは、幅広い菌種に対して同様の手法で二次代謝を活性化できる、簡便かつ汎用性の高い手法を開発できた。

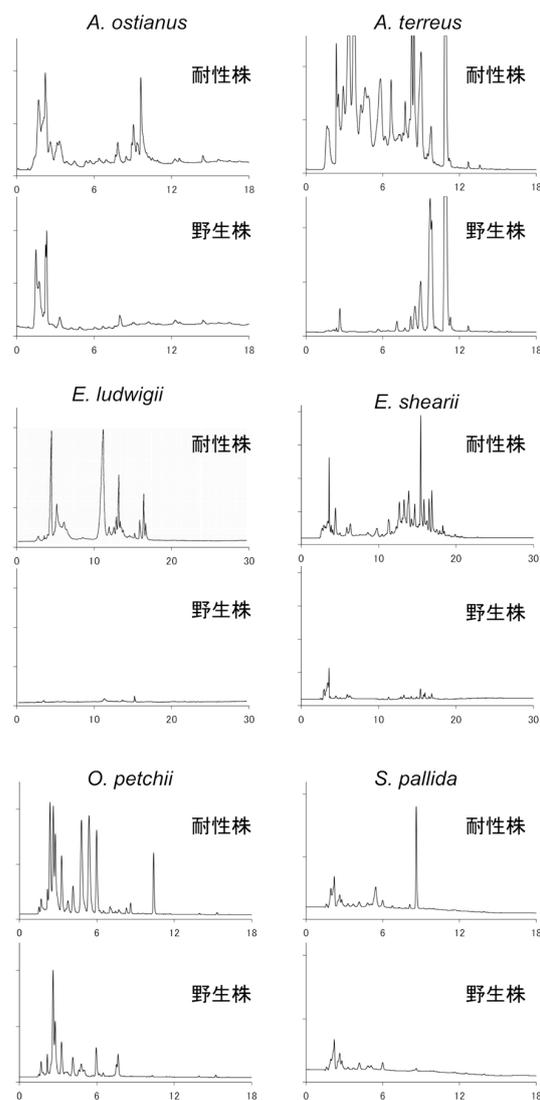


図 3. 各種ハイグロマイシン B 耐性株による二次代謝活性化の様子。

(2) ハイグロマイシン B 耐性株を利用する新規天然物探索。

① 昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps indigotica*

昆虫寄生糸状菌 *C. indigotica* の孢子を MNNG 0.2 mg/ml で 30 分反応させ、HygB 200  $\mu$ g/ml 含有培地を用いて耐性株を取得した。得られた耐性株は孢子形成能が低下していた。得られた耐性株のうち約半分で、野生株では見られない新規ナフトール誘導体 **1** の生産が誘導されていた (図 4)。さらに薬剤耐性株を HDAC 阻害剤である SBHA 添加条件で培養したところ、**1** の生産量が顕著に増大することを見出した。これは、ケミカルエピジェネティクスとの併用効果を示す、興味深い結果である。

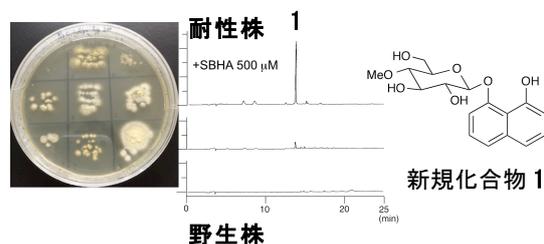


図 4. *C. indigotica* ハイグロマイシン B 耐性株(左)、二次代謝プロファイルの比較 (中)、新規化合物 **1** の構造 (右)。

② *Chaetomium indicum*

ホモジナイズした *Chaetomium indicum* の菌糸を MNNG 0.05 mg/ml で 30 分反応させ、ハイグロマイシン B 50  $\mu$ g/ml の培地で選抜することで耐性株を取得した (図 5)。計 30 以上の耐性株を取得し、それぞれ培養したところ、

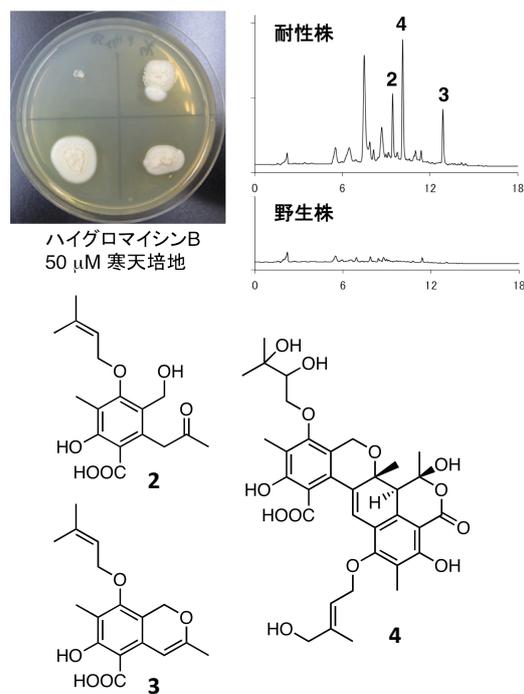


図 5. *C. indicum* のハイグロマイシン耐性株、二次代謝物の生産性、新規ポリケタイド **2-4** の化学構造。

実に 8 割以上の耐性株で、二次代謝が顕著に活性化していた (図 5)。耐性株を大量培養し、それぞれのピークに対応する二次代謝物の同定を行い、新規芳香族ポリケタイド **2-4** を同定した。いずれも *O*-プレニル化された芳香族ポリケタイド類であり、**3** はユニークな新規 5 環式構造を有していた (図 5)。

### ③ HDAC 阻害剤添加による新規天然物探索

昆虫病原性糸状菌や内生糸状菌を中心に、様々な糸状菌を HDAC 阻害剤である SBHA とニコチンアミド添加条件にて培養し、二次代謝が顕著に活性化される条件を探索した。その結果、*Chaetomium cancroideum* をニコチンアミド添加条件で培養すると、顕著に二次代謝物の生産が活性化され、新規ポリケタイド **5-7** の取得に成功した (図 6)。

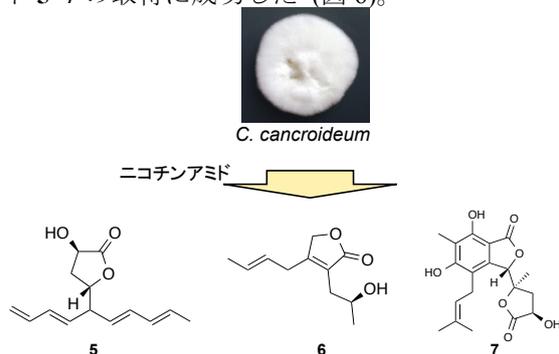


図 6. ニコチンアミドを用いて取得した新規糸状菌二次代謝物

### ④ まとめ

本研究では、ランダム変異導入で作成したハイグロマイシン B 耐性株では、高い確率で二次代謝物の生産が活性化されているという現象を初めて見出した。本法は、二次代謝活性化とハイグロマイシン B 耐性が直接関連しているかどうかなど、詳細なメカニズムについては不明だが、ハイグロマイシン B 耐性株を用いれば、従来の培養では生産されない休眠型二次代謝物にアクセス可能であることが示され、新規天然物探索を行う上で、有用な方法の一つになり得る。今後、このような二次代謝活性化の方法論が発展すれば、病原性糸状菌を含め、様々な糸状菌から新規天然物が発見され、医薬シーズ探索が加速することが期待される。

### 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 5 件)

(1) Epigenetic stimulation of polyketide production in *Chaetomium cancroideum* by an NAD<sup>+</sup>-dependent HDAC inhibitor. T. Asai\*, S. Morita, T. Taniguchi, K. Monde, Y. Oshima\*, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 646-651. 査読あり, DOI: 10.1039/C5OB01595B

[学会発表] (計 33 件)

(1) 森下陽平, 岡崎裕亮, 大島吉輝, 浅井禎吾. サイトカイニンによるジョロウグモ内生糸状菌の二次代謝活性化, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 26 日, 国際センター, 宮城 (仙台).

(2) 浅井禎吾, 休眠型糸状菌二次代謝物の開拓を基盤とする創薬シーズ探索, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 若手シンポジウム「薬学に貢献する生合成研究」, 2016 年 9 月 17 日, 東大, 東京 (文京区).

(3) 浅井禎吾, 塚田健人, 森下陽平, 伊藤史織, 網谷雄志, 岡崎裕亮, 児玉栄一, 大島吉輝, ジョロウグモ内生糸状菌のポストゲノム型天然物探索, 第 58 回天然物有機化合物討論会, 2016 年 9 月 15 日, 東北大学, 宮城 (仙台).

(4) Y. Morishita, T. Amiya, T. Yamamoto, Y. Oshima, T. Asai, Development of Approaches for Activating Fungal Cryptic Secondary Metabolites Production Based on Random Mutation and Chemical Induction, International Symposium on Natural Product for the Future 2016, 2016 Sep. 2, Tokushima Bunri University, Tokushima (Tokushima)

(5) 浅井禎吾, 糸状菌の未利用生合成遺伝子を活用するポストゲノム型天然物探索, 生命理工学融合セミナー2016-若手から発信するナノサイエンス-, 2016 年 8 月 29 日, 東工大 大すずかけ台キャンパス, (神奈川 (横浜)).

(6) 浅井禎吾, 休眠遺伝子を活用する天然物探索-新しいケミカルスペースを求めて, 第 54 回ヒューマンサイエンス振興財団 バイオインターフェース, 2016 年 5 月 31, 全理連ビル, 東京 (渋谷区).

(7) 浅井禎吾, エピジェネティック制御を利用した糸状菌未利用遺伝子の活用と多様な天然物の創出, 日本薬学会第 136 回年会平成 28 年度奨励賞受賞講演, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜, 神奈川 (横浜).

(8) 浅井禎吾, 糸状菌休眠型生合成経路を活用する新たな天然物ケミカルスペースの開拓, 日本薬学会第 136 回年会, 薬研究における天然物化学のミッションと新潮流, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜, 神奈川 (横浜).

(9) 布木純, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝. キリギリス内生糸状菌が生産する新規二次代謝物の探索, 第 53 回日本薬学会東北支部大会, 2015 年 10 月 5 日, いわき明星大学, 福島 (磐城).

(10) 山本崇史, 森下陽平, 網谷雄志, 塚田健人, 浅井禎吾, 大島吉輝, リボソーム標的薬剤耐性糸状菌が生産する休眠型新規二次代謝物の探索, 第 57 回天然有機化合物討論会, 2015 年 9 月 9 日, 神奈川県民ホール, 神奈川 (横浜)

(11) 浅井禎吾, 糸状菌ゲノムに眠る新規二次代謝物をどうやってとるか, 日本薬学会東北支部主催第 14 回化学系若手研究者セミナー 2015 年 9 月 5 日, 東北大学, 宮城 (仙台).

(12) 森下陽平, 浅井禎吾, 大島吉輝. 二次代謝活性型糸状菌の効率的な作成と選抜: ランダム突然変異導入とハイグロマイシン耐性選抜 日本薬学会第 135 回春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 兵庫医療大学, 兵庫 (神戸).

(13) 山本崇史, 浅井禎吾, 大島吉輝. 突然変異導入による休眠型糸状菌二次代謝物の生産誘導と新規天然物探索, 日本薬学会第 135 回春季年会, 2015 年 3 月 27 日, 兵庫医療大学, 兵庫 (神戸).

[その他]

(1) エピジェネティック制御を利用する新規医薬資源の開拓, 浅井禎吾, 大島吉輝. 生化学 「みにれびゅー」, **2016**, 88, 643-648. <https://seikagaku.jbsoc.or.jp/10.14952/SEIKAGAKU.2016.880643/data/index.pdf>

ホームページ等

[http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/lab\\_asai.html](http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/lab_asai.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

浅井 禎吾 (ASAI Teigo)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号:

60572310

参考文献

1) Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., Kurosawa, K. *Adv. Appl. Microbiol.* **2004**, 56, 155-184.