

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460137

研究課題名(和文) エピジェネティック制御を基軸とした地衣菌の休眠遺伝子発現と生物活性天然物の創製

研究課題名(英文) Epigenetic manipulation of gene expression in cultured mycobionts for exploring novel bioactive compounds

研究代表者

棚橋 孝雄 (Tanahashi, Takao)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20171811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナムや日本で採取した地衣類から地衣菌を単離培養し、29種の新規代謝物を単離し、各種スペクトルにより構造決定した。DNAポリメラーゼ阻害活性、ガン細胞増殖抑制活性の評価を行い、数種の代謝物に活性を認めた。培養地衣菌の生合成実験と、rDNAのITS領域のシーケンス解析により、地衣菌と菌類との系統発生的関係について推定した。HDAC阻害剤を用いたエピジェネティック制御による培養地衣菌の二次代謝への影響を検討したが、良好な結果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：From the cultures of spore-derived mycobionts of the lichens collected in Vietnam and Japan, twenty-nine new metabolites were isolated. Their structures were elucidated by spectroscopic means. Some isolated compounds exhibited inhibitory activities against mammalian DNA polymerases and cytotoxic effects against human cancer cell lines. Biosynthetic studies and the ITS sequence of the rDNA of cultured mycobionts indicated close phylogenetic relationship between a lichen species and some fungi. The epigenetic manipulation of gene expression by HDAC inhibitors failed to influence secondary metabolism in the lichen mycobionts.

研究分野：天然物化学

キーワード：地衣菌単離培養 二次代謝物 構造決定 生合成 生物活性 エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上に広く分布している地衣類は、子囊菌や担子菌類が藻類と共生した複合生物体である。地衣類の生産する地衣成分は、植物成分とも菌代謝物とも異なる特徴的な化合物群で、古くから染料や香料、生薬として利用されてきた。地衣類から地衣菌類と藻類はいずれも単離培養が可能であり、単離培養した地衣菌が地衣成分を生産することから、地衣成分の生合成に関与する遺伝子はすべて地衣菌が備えていると考えられている。しかし、我々は、高浸透圧ストレス条件下で単離地衣菌を培養することにより、地衣成分とは構造的に全く異なる、異常な新規二次代謝物を生産させることに成功している。特に、ベトナム産の痲状地衣から単離培養した培養地衣菌は、従来とは異なるポリケタイド合成酵素により生合成されたポリケタイドやマクロライド、またセスキテルペン類など興味深い新規化合物を生産することから、新たな薬用資源として可能性が期待されていた。

(2) 最近のゲノム解析により、糸状菌には、これまで単離同定された二次代謝物から予測されるより遥かに多くの生合成遺伝子が存在しており、その多くが休眠遺伝子と考えられている。そのため、エピジェネティック制御により未利用生合成遺伝子の発現を活性化し、新規有用物質の探索につなげる研究が活発に行われ、成功例が報告されている。

2. 研究の目的

(1) 地衣類の共生体から地衣菌のみを単離し、人工的な条件下で培養することが可能である。この単離地衣菌には、地衣類に特徴的な二次代謝物・地衣成分の生合成遺伝子のほかにも多くの二次代謝遺伝子が内在していると予想されるが、自然界の共生状態では藻類が介在することにより、これら遺伝子の発現は抑制され休眠している。そこで、地衣類より地衣

菌を単離培養し、共生を脱することにより、内在する休眠二次代謝関連遺伝子が発現させて、新たな二次代謝物を生産させる。

(2) 代謝物を生産しない地衣菌株に、エピジェネティックな手法を用いて、内在する未利用の二次代謝遺伝子を発現させることにより、天然の地衣類の地衣成分とは異なる新規二次代謝物を生産させる。

(3) 単離した新規化合物のDNA代謝酵素の阻害活性およびガン細胞増殖抑制活性評価を行うことにより、抗がん活性を有する新規有用化合物の創製を目的とする。

(4) 新規骨格を有する地衣菌代謝物について、生合成実験を行い、腐生菌類との代謝経路の類似性について検討を加える。また単離地衣菌のDNA解析を行い、各株の遺伝的な類縁関係と代謝能の特性の解明をおこなう。

3. 研究の方法

(1) ベトナムあるいは日本で採集した痲状地衣類より、子器から胞子を放出させて地衣菌を単離し、高濃度の糖を含むMY寒天培地上、高浸透圧ストレス条件下で培養を行う。産生した代謝物を単離し、各種スペクトル解析により構造研究を行う。培養地衣菌に標識化合物の投与実験を行うことにより、生合成経路の解明する。

(2) エピジェネティック制御による未利用生合成遺伝子の発現を活性化のために、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤や抗酸化剤を培地に添加し、培養条件と代謝能の関係性についても検討を加える。

(3) 代謝物のDNAポリメラーゼ阻害活性およびガン細胞増殖抑制活性の評価は、従来の方法に従って行う。

(4)DNA シーケンス解析は外部委託する。

4. 研究成果

(1) ベトナムで採取した *Pyrenula* sp.、*Diorygma* sp.、*Pseudopyrenula subnudata* および未同定の多数の痂状地衣類、また日本産 *Hematomma* sp.から地衣菌を単離し、高濃度の糖を含む寒天培地上、高浸透圧ストレス条件下で培養を行った。産生した代謝物を単離し、各種スペクトル解析により構造研究を行った。*Pyrenula* sp. の地衣菌からは2種の既知アントラキノン、1種の既知キサントンとともに、8種の新規ポリケタイド類を単離、構造決定した。また *Pseudopyrenula subnudata* の地衣菌からは6種の新規ポリケタイド類を、*Diorygma* sp. の地衣菌からは1種の新規イソクマリンと6種の新規セスキテルペン類を単離、構造決定した。ポリケタイド類とセスキテルペン類は、これまで地衣体からも培養地衣菌からも単離されたことがなく、最初の例である。また、未同定地衣菌株 V414, V413, V403, V405, V407 からは多数の既知フェノール性化合物とともに3種の新規 phenguiganardic acid 誘導体を単離、構造決定した。V402 からはマクロラクトン curvularin とともに2種の新規フェノール性化合物を、V507 からは arthoniafurone A と 8-O-methylbostrycoidin とともに2種の新規ナフトキノ誘導体を単離、構造決定した。また日本産 *Hematomma* sp.の培養地衣菌から、1種の新規化合物ピラノナフトキノンを単離、構造決定した。

(2)代謝物を生産しない地衣菌株 V210, V172, V177 に、寒天培地、液体培地に種々の濃度の suberoyl bis-hydroxamic acid、nicotinamide、または azacytidine を添加することにより、エピジェネティックな物質生産の可能性を検討した。一部菌株では、PDB 液体培地中、suberoyl bis-hydroxamic acid

を添加することにより、代謝物の HPLC 分析で変化を示すものがあったが、現在までのところ満足する結果は得られていない。また、種々の化学物質の添加による二次代謝への影響を検討した。*Pyrenula* sp.の培養地衣菌に安息香酸ナトリウムを加えて培養すると、新規ポリケタイドの産生が認められたので、単離、構造決定した。

(3) *Pyrenula* sp.から得られた新規ポリケタイドの DNA ポリメラーゼ α および β に対する阻害活性を評価したところ、pyrenulic acid A および pyrenulic acid G が IC_{50} 8.1~19.5 μ M の範囲で阻害した。また HCT116 ヒトガン細胞に対する細胞毒性に関しても評価を行なった。pyrenulic acid A が評価した化合物の中で最も強く、 IC_{50} 6.4 \pm 0.7 μ M で HCT116 の細胞増殖を抑制した。また、*Hematomma* sp.の培養地衣菌から単離した新規化合物 8-methylascomycone A は、DNA ポリメラーゼ α 、 β および κ に対して阻害活性を示し、 IC_{50} 6.7 μ M で HeLa 細胞の増殖を抑制した。

(4) *Pyrenula* sp.培養地衣菌から単離したポリケタイド類は、*Cladobotryum* 属菌の培養物から報告されている化合物と構造的に類似している。そこで、標識化合物の投与実験を行うことにより、生合成経路における酢酸およびメチオニンの取り込み様式について明らかにした。また、培養地衣菌の rDNA の ITS 領域を解析し、*Cladobotryum* 属菌と比較したところ、62%の相同性を示した。また、*Pseudopyrenula subnudata* の地衣菌の新規ポリケタイドについても、標識化合物の投与実験を行い、類似の骨格の代謝物を産生する *Penicillium* sp.と同様の経路で生合成されることを明らかにした。種が未同定であった地衣菌についても、DNA シーケンス解析を行った。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Duy Hoang Le, Yukiko Takenaka, Nobuo Hamada, Yoshiyuki Mizushina, Takao Tanahashi.
“Polyketides from the Cultured Lichen Mycobiont of a Vietnamese *Pyrenula* sp.□” J. Nat. Prod. 査読有, 77, 2014, 1404–1412.

[学会発表](計 4 件)

竹仲由希子、角田文香、棚橋孝雄、濱田信夫、水品善之、「*Haematomma* sp. 単離培養地衣菌の代謝物の構造と生物活性」日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸 (神戸)

Yukiko Takenaka, Takao Tanahashi

“Polyketides from cultured lichen mycobionts of *Pseudopyrenula subnudata* and their biosynthetic origin”

63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2015 年 8 月 24 日、Budapest (Hungary)

Takao Tanahashi, Yukiko Takenaka

“Sesquiterpene derivatives from cultured lichen mycobionts of *Diorygma* sp.”

63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2015 年 8 月 24 日、Budapest (Hungary)

竹仲由希子、Duy Hoang Le、棚橋孝雄、「ベトナム産地衣類より単離培養した地衣菌の代謝物の多様性」日本地衣学会第 15 回大会、2016 年 7 月 17 日、岐阜大学 (岐阜)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
棚橋 孝雄 (TANAHASHI, Takao)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20171811

(2) 研究分担者
濱田 信夫 (HAMADA, Nobuo)
大阪市立自然史博物館・学芸課・外来研究員
研究者番号：40270764

水品 善之 (MIZUSHINA, Yoshiyuki)
信州大学・学術研究院農学系・教授
研究者番号：20307705

(3) 連携研究者
竹仲 由希子 (TAKENAKA, Yukiko)
神戸薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：90289041

(4) 研究協力者
()