

平成30年6月1日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07167

研究課題名(和文)植物内生放線菌由来の二次代謝産物ライブラリーの構築

研究課題名(英文)Construct secondary metabolites library from endophytic actinomycete strains

研究代表者

須賀 拓弥 (SUGA, Takuya)

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号：70782366

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)：本研究では、植物の根から分離される放線菌、植物内生放線菌が生産する二次代謝産物を取得し化合物ライブラリーを作製することを目的とした。

植物内生放線菌34株を培養し、培養物抽出液を解析した結果、生産菌として5株を選定した。これら菌株を培養、精製および構造解析を行い、新規・既知化合物12種を得た。中でも、アロストレプトマイセス属株培養物抽出液から、ハムラマイシンA&Bと命名した新規化合物を取得した。本化合物の母核を有した化合物は今までに1種類しか報告されておらず、大変珍しい化合物であった。12化合物で構成されたユニークな化合物ライブラリーを作製することができた。

研究成果の概要(英文)：Endophytic actinomycete strains have a capacity to produce a wide variety of biological active compounds. This is a purpose that searching for new compounds from the cultured broths of endophytic actinomycete strains and construction of the compound library. Result of screening, *Allostreptomyces* sp. strain produced new secondary metabolite was selected from the 34 strains of endophytic actinomycetes. Two new compounds, designated as hamuramicins A&B, were isolated from the extract of cultured broth of the strain. The core structure was a rare, only one compound was reported in the past as an analogue. The 12 compounds library including hamuramicins was constructed.

研究分野：天然資源系薬学

キーワード：農芸化学 天然物化学 植物内生放線菌 化合物ライブラリーの作製

1. 研究開始当初の背景

微生物が生産する複雑でユニークな二次代謝産物を1から創造することは難しく、科学が発展した現在であっても天然物そのものが臨床現場で使用されているものも多い。微生物が生産する二次代謝産物を新たに発見することは、合成化合物ライブラリーに代えがたい知見を与えてきた。

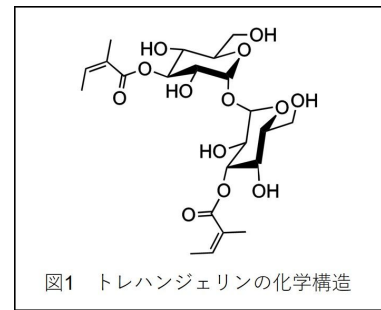
放線菌は、グラム陽性高 G+C 細菌の中でも形態分化が進んだ一群(アクチノバクテリア綱)であり、医薬品を始めとする多数の有用物質の探索源として活用されてきた。本研究所では、天然物由来の創薬研究のために長年にわたり放線菌分離を行い、多数の有用物質発見に貢献してきた(Ōmura, S. *Tetrahedron* **67**, 6420-6459 (2011))。その代表例として、エバームクチンとスタウロスポリンが挙げられる。エバームクチンは当初、企業との共同研究にて動物の駆虫薬として発見され、後に人のオンコセルカ症やリンパ系フィラリア症に効果を示すことがわかり、アフリカや中南米で医薬品として用いられた。現在日本では疥癬虫(人に感染するダニの一種)の治療薬として使用されている。スタウロスポリンは物性を指標に取得され、後に強力なプロテインカイネースC阻害活性を示すことがわかり、試薬として世界中で汎用されている。

従来、放線菌は土壌から採取され、採取された放線菌のうち、ストレプトマイセス属が9割を占める。一方、植物の根を分離源と用いることで、ストレプトマイセス属以外の放線菌(希少放線菌)を多く分離でき、本研究所では2新属、9新種を新たに提唱している(Inahashi, Y. et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2652-2658 (2010)、Matsumoto, A. et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 2706-2711 (2014)など)。

現在までに、植物内生放線菌培養液から3種類の新規化合物を得られ、中でもトレハンジェリン(図1)は抗老化作用を見出し企業に

より商品化される予定である

(FANCLホームページより)



り)。キンギン草から分離された希少放線菌ポリモノスポラ・ルブラ K07-0510 株が生産するトレハンジェリンはトレハロース1分子に植物由来の化合物によくみられるアンジェリカ酸が2分子結合した構造をしている。トレハンジェリンは保湿能があり、そのような形で植物に寄与していると推定される。植物内生放線菌と植物の間でなんらかの相互作用あると考えられる。また、本研究所では新たな植物内生放線菌の分離方法が検討されており、今まで以上に多様な放線菌が分離され、これらの培養液中には新たな二次代謝産物が含まれることが期待される。植物内生放線菌培養液から二次代謝産物を取得し、化合物ライブラリーを作製する。そして、本化合物ライブラリーを用いて、植物病原菌に対する抗菌活性や植物に対して成長促進作用などを評価する。

2. 研究の目的

植物の根から分離される放線菌は土壌から分離される放線菌の種類に比べ、多様性に富んでおり、植物の根から分離される放線菌が注目を集めている。本研究所は植物の根を分離源とし、これまでに2新属、9新種を新たに提唱してきた。また植物内生放線菌の新たな分離方法が検討されており、今まで以上に多様な放線菌が分離されることが期待される。植物内生放線菌と植物は互いに共生関係にあると考えられ、放線菌の物質生産能を考えると有用な低分子化合物を植物へ提供している可能性がある。そこで、これら植物内生放線菌培養液から二次代謝産物を取得

し、化合物ライブラリーを構築する。本化合物ライブラリーを用いて、植物病原菌に対する抗菌活性や植物に対する成長促進作用を評価する。

3. 研究の方法

植物内生放線菌 (1,000 株) を 4 種類の生産培地で培養し、生育良好な希少放線菌を選択し、培養液抽出物を HPLC および MS で解析する。データベース解析を行い、新規性の高いと考えられた化合物については、生産菌の大量培養を行い、新規化合物の単離、構造解析および絶対立体配置の決定を行う。また、その過程で取得される既知化合物も含めライブラリーを作製し、植物病原菌に対する抗菌活性、植物に対する成長促進作用、そして病害虫に対する駆虫活性を評価する。活性が認められた化合物については、共同研究により農薬に向けて開発を進める。

4. 研究成果

はじめに、ストックしてある植物内生放線菌を培養したところ、34 株について生育が確認された (表 1)。

表 1 使用した植物内生放線菌

Family	Genus	Number of strain	
Pseudonocardiaceae	<i>Actinokineospora</i>	1	
	<i>Amycolatopsis</i>	1	
	<i>Kibdelosporangium</i>	5	
	<i>Kutzneria</i>	1	
	<i>Lentzea</i>	2	
	<i>Pseudonocardia</i>	1	
	<i>Saccharothrix</i>	2	
Streptosporangiaceae	<i>Microbispora</i>	4	
	<i>Nonomuraea</i>	1	
	<i>Planomonospora</i>	1	
	<i>Planotetraspora</i>	2	
	<i>Streptosporangium</i>	1	
Micromonosporaceae	<i>Actinorhabdospora</i>	1	
	<i>Micromonospora</i>	2	
	<i>Planosporangium</i>	1	
	<i>Verrucosisspora</i>	1	
Streptomycetaceae	<i>Allostreptomyces</i>	2	
	<i>Streptomyces</i>	3	
Nocardioideaceae	<i>Kribbella</i>	2	
Total	5	19	34

この 34 株を当初予定していた液体の生産培地 4 種に加え、固体の生産培地 5 種で培養し、

培養後メタノールにて抽出を行った。培養物抽出液 306 サンプルを粗精製および濃縮を行い、LC-UV および LC-MS を用いて作製したサンプルを分析した。化合物の生産量、精製のしやすさおよび培養の簡便さを加味した結果、キブデロスポランギウム属 K12-0421 株、アクチノキネオスポラ属 K12-0511 株、アミコラトプシス属 K12-0975 株、アロストレプトマイセス属 K12-0794 株およびサッカロスリックス属株を生産菌として選定した。しかし、培養について 2 つの問題があった。1 つ目としてジャー・ファンメーターを用いた大量培養では、増殖が遅く、純粋培養が困難であったこと、2 つ目として化合物生産能が良い菌株を選定しているが、それでも構造決定や生物評価する上で十分な量でなかったことが挙げられた。そこで、それぞれの菌種に応じた培養法や生産培地を取り入れ、培養を行った。培養物精製物を精製することで新規物質 6 化合物、既知物質 6 化合物を取得した (図 2)。

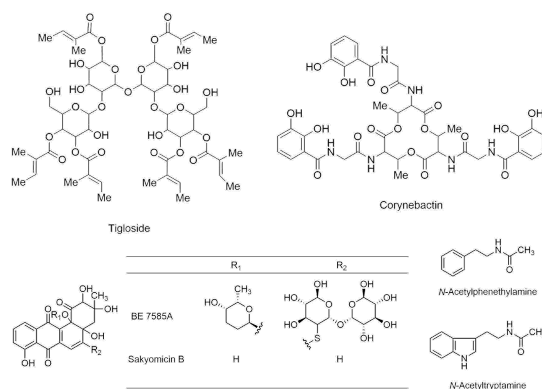


図 2 得られた既知物質の化学構造

中でも、アロストレプトマイセス属 K12-0794 株を液体培地で 200 L 培養し、抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC にて精製することでハムラマイシン A&B と命名した新規物質を取得した (図 3)。ハムラマイシンは構造解析の結果、母核にトリエンおよびトリエノンを含む 22 員環ラク

トンを有していた。この母核を有した化合物は今までに1種類しか報告されておらず、大変珍しい化合物であり (Smith JR, et al. Structure revision of the antibiotic pulvomycin. *J Am Chem Soc.* **107**, 2849-2857 (1985))、またアロストレプトマイセス属菌株からはじめて二次代謝産物を報告することができた。

続いて、ハムラマイシンの抗菌活性および細胞毒性を評価した。グラム陽性、陰性菌8種に対して抗菌試験を実施したところ、コクリア・リゾフィラおよびキサントモナス・オリゼーに対して強い抗菌活性 (最小発育阻止濃度 (MIC) : 4 µg/mL) を示したが、

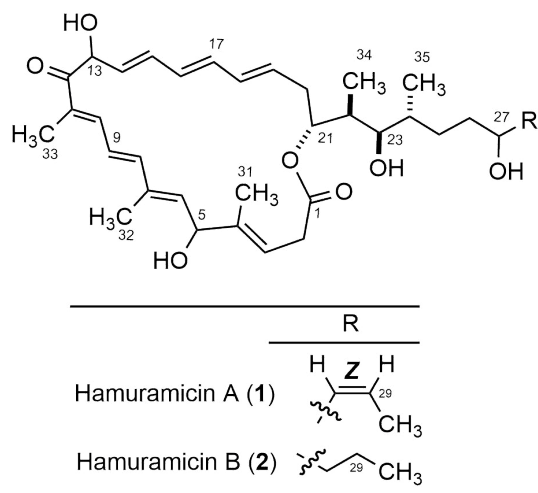


図3 ハムラマイシンの化学構造

他の6種の細菌には一切抗菌活性を示さなかった (MIC: >256 µg/mL)。本キサントモナス・オリゼーはイネに対する病原菌であることから、ハムラマイシンが農薬のリード化合物になり得ることが示唆された。また、ヒト由来ガン細胞に対して毒性も認められたことから、抗ガン剤としても応用が期待される。

以上をまとめると、植物内生放線菌34株を異なる9種類の生産培地で培養し、抽出後、種々の機器分析を用いて、培養液抽出物を解析した。その結果、5種の菌株が選定され、培養、精製および構造決定をし、新規物質6化合物、既知物質6化合物を得た。中でもア

ロストレプトマイセス属株培養液抽出物から新規物質ハムラマイシンは珍しい構造をしていた。これら12化合物で構成されたユニークな化合物ライブラリーを作製することができた。

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)

著者名: Takuya Suga, Tōru Kimura, Yuki Inahashi, Masato Iwatsuki, Kenichi Nonaka, Akira Také, Atsuko Matsumoto, Yōko Takahashi, Satoshi Ōmura and Takuji Nakashima.

論文標題: Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794. *J. Antibiot.* (2018) [査読あり]

doi: 10.1038/s41429-018-0055-x

[学会発表](計1件)

学会名: 日本放線菌学会 2017年度
発表者名: 須賀拓弥、木村徹、廣瀬友靖、稲橋佑起、岩月正人、武晃、野中健一、松本厚子、砂塚敏明、塩見和朗、高橋洋子、大村智、中島琢自
発表標題: 植物分離放線菌株 *Allostreptomyces* sp. K12-0794 株が生産する新規物質について

6. 研究組織

(1)研究代表者

須賀 拓弥 (SUGA, Takuya)

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号: 70782366