

令和元年6月11日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07719

研究課題名(和文)天然物構造多様性の拡充に向けた未研究微生物種における二次代謝能の解明

研究課題名(英文) Exploration of structural diversity of secondary metabolites in unstudied microbial species

研究代表者

五十嵐 康弘 (IGARASHI, YASUHIRO)

富山県立大学・工学部・教授

研究者番号：20285159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：医薬探索に必要とされる新規骨格化合物の取得を目的として、未研究の微生物群を中心に二次代謝物の網羅的解析を実施した。好熱性細菌1種、好熱性放線菌2種から、シクロペンテノン誘導体、フランオン系ポリケチド、アントラサイクリン誘導体を単離、構造決定した。加えて、子囊菌門の希少糸状菌類3種から、 α -ピロン誘導体とフラン誘導体、二環性ポリケチド、環状ペプチド類を発見した。得られた新規化合物は、それぞれ構造上の新規性を有していたことに加えて、脂肪細胞の分化誘導活性、癌細胞の浸潤阻害活性、オートファジー誘導活性等の多様な生理作用を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の生産する化合物からは抗生物質、抗癌剤、代謝異常の治療薬などさまざまな医薬品が実用化され、人類の福祉に役立てられてきた。一方で、地球上の全微生物のうち、90%の微生物が未研究の新種と推定されている。そのような未知微生物は新薬候補化合物を生産する能力を有すると考えられるため、未研究微生物が生産する新規化合物の構造や活性の解明を通じて、それらの化合物を医薬探索研究に資することは、新薬開発に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Exhaustive chemical screening was carried out from unstudied or under-evaluated microbial species in order to obtain structurally novel compounds for drug discovery. One new cyclopentenone derivative, three furanone-containing polyketides, and two new anthraquinone derivatives were found from a thermophilic Firmicutes bacterium *Thermosporothrix*, thermophilic Actinobacteria *Sphaerimonospora* and *Actinomadura*, respectively. In addition, a new α -pyrone and furan derivatives, a bicyclic polyketide, and three cyclic peptides were isolated from rare fungi of the genus *Robillarda*, *Phacidiopicnys*, and *Cladobotryum*, respectively, all of which belong to the phylum Ascomycetes. Each new compound possesses the structural uniqueness and novelty and biological properties such as adipocyte differentiation inducing activity, inhibitory activity of tumor cell invasion, and autophagy-inducing activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物 微生物 創薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内で酵素によりつくられる天然物は、本質的にタンパク質等の生体分子に親和性を示すため、合成化合物に比べて創薬リードとして望ましい物性を有すると考えられている。近年では高分子医薬品の進展も著しいが、あらゆる疾病に対応できるわけではなく、特に抗生剤などは今後も低分子医薬品が中心となることに変わりないと予想される。しかし *Streptomyces* 属放線菌や *Penicillium* 属糸状菌などは過去数十年間にわたり徹底的にスクリーニングされたため、FK506 やスタチン系薬剤の開発以来、注目に値する新規骨格化合物の発見が十分になされてきたとは言い難い。一方で二次代謝物の観点から、これまでに十分には調べられていない、あるいは全く研究されていない分類群が微生物の中には相当数残されていることも事実である。

2. 研究の目的

これまでに報告者らは、新たな創薬リード化合物の発見を目的として、UV スペクトルを指標とした分光学的スクリーニングによる新規骨格生理活性物質の探索を行い、放線菌、細菌、糸状菌から生合成的に報告例のない新奇な構造上の特徴を有する化合物を多数得ることに成功している(引用文献 ~)。本研究では、これまでの成果に立脚し、創薬ライブラリーの多様性拡充に寄与しうる、医薬探索に必要とされる新規骨格化合物を提供することを目的として、好熱性微生物や希少糸状菌など、研究報告のない分類群を中心に二次代謝物の徹底的な解析を行うことを計画した。

<引用文献>

- Y. Igarashi, N. Matsuoka, Y. In, K. T. Kataura, E. Tashiro, I. Saiki, Y. Sudoh, K. Duangmal, A. Thamchaipenet. Nonthmicin, a polyether polyketide bearing a halogen-modified tetronate with neuroprotective and antiinvasive activity from *Actinomadura* sp. *Org. Lett.* **19**, 1406-1409 (2017)
- Y. Igarashi, D. Asano, M. Sawamura, Y. In, T. Ishida, M. Imoto. Ulbactins F and G, polycyclic thiazoline derivatives with tumor cell migration inhibitory activity from *Brevibacillus* sp. *Org. Lett.* **18**, 1658-1661 (2016)
- S. Saito, T. Fujimaki, W. Panbangred, Y. Igarashi, M. Imoto. Antarlides: a new type of androgen receptor (AR) antagonist that overcomes resistance to AR-targeted therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 2728-2732 (2016)
- Y. Igarashi, T. Zhou, S. Sato, T. Matsumoto, L. Yu, N. Oku. Akaeolide, a carbocyclic polyketide from marine-derived *Streptomyces*. *Org. Lett.* **15**, 5678-5681 (2013)
- Y. Igarashi, L. Yu, M. Ikeda, T. Oikawa, S. Kitani, T. Nihira, B. Bayanmunkh, W. Panbangred. Jomthonic acid A, a modified amino acid from a soil-derived *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.*, **75**, 986-990 (2012)
- T. Fukuda, Y. Sudoh, Y. Tsuchiya, T. Okuda, F. Fujimori, Y. Igarashi. Marianins A and B, prenylated phenylpropanoids from *Mariannaea camptospora* *J. Nat. Prod.*, **74**, 1327-1330 (2011)
- Y. Igarashi, Y. Kim, Y. In, T. Ishida, Y. Kan, T. Fujita, T. Iwashita, H. Tabata, H. Onaka, T. Furumai. Alchivemycin A, a bioactive polycyclic polyketide with an unprecedented skeleton from *Streptomyces* sp. *Org. Lett.*, **12**, 3402-3405 (2010)
- Y. Igarashi, T. Mogi, S. Yanase, S. Miyanaga, T. Fujita, H. Sakurai, I. Saiki, A. Ohsaki. Brartemicin, an inhibitor of tumor cell invasion from the actinomycete *Nonomuraea* sp. *J. Nat. Prod.*, **72**, 980-982 (2009)

3. 研究の方法

(1) 安定同位体標識化合物の取り込みによる生合成解析

Thermosporothrix 属細菌を四日間前培養した後、生産用培地に移し、48 時間経過後から 24 時間毎に四回にわたり、¹³C 標識化合物(培地 100 mL あたり 10~20 mg)を添加し、更に 24 時間培養した後、1-ブタノールで抽出した。抽出物は順相および逆相シリカゲルカラムにより精製し、得られた標識化合物の ¹³C NMR スペクトルのピーク強度変化から標識炭素を決定した。

(2) ドラフトゲノム解析

放線菌ならびに細菌株のドラフトゲノム解析は、GS FLX+ (Roche)によるショットガン法と MiSeq (Illumina)によるペアエンド法を組み合わせて行った。得られたリードは Newbler v2.8 software を用いてアセンブルし、GenoFinisher software により Finishing した。遺伝子予測には Prodigal を用いた。得られた遺伝子情報から、ポリケタイド合成酵素(PKS) と非リボソーム性ペプチド合成酵素(NRPS) を検索し、ドメイン配列から生産物の構造を予測した。

(3) ECD 計算

CONFLEX7 により発生させた初期配座のうち最安定配座から 2 kcal/mol 以内のものについて、Gaussian 16 を用いて DFT/B3LYP/6-31G(d) での最適化を行った。さらに得られた安定配座に基づき Gaussian 16 上で ECD スペクトルを計算により求めた。

4. 研究成果

(1) Chloroflexi 門 Ktedonobacteria 綱に属する *Thermosporothrix* 属好熱性細菌の代謝物解析

Ktedonobacteria 綱細菌は、分岐した気菌系に胞子を着生し、セルロースやキチンなどの繊維質を分解するなど放線菌と類似した性質を示すにも関わらず、放線菌門とは遠縁のクロロフレクサス門に属し、その多くが好熱性を示す。また放線菌に匹敵するゲノムサイズ (~8 Mbp) を有し、複数の二次代謝遺伝子を保有することから、その二次代謝能に興味を持たれるが、生産物に関しては 5 化合物が報告されているに過ぎない。本研究では、同綱の一種である *Thermosporothrix hazakensis* NBRC 105916 株の二次代謝物を網羅的に解析し、その生合成能力の解明を試みた。その結果、7 種のベンゼン環もしくはインドール環を含む既知化合物に加えて、新規化合物 ktedonoketone と、合成化合物としては知られるが天然物では最初の単離となる 2'-oxosattabacin を同定するに至った(発表論文)。Ktedonoketone はシクロペンテノンの α -位にベンゼン環が置換しているが、類縁化合物としては糸状菌から二例報告されているのみである。一方で、2'-oxosattabacin は既知物質 sattabacin の水酸基がケトンへ酸化された類縁体であるが天然物としての報告は前例がない。いずれの化合物もマウス前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導を促進した。また、本株の生産物として同定されたアシロイン系化合物 hazakacin の生合成に興味を持たれたため、安定同位体標識の取り込み実験により、その生合成起源を解析した。すなわち、sattabacin ではロイシンとフェニルアラニンに由来する β -ケト酸が前駆物質となり、脱炭酸を伴う縮合により生合成されるが、hazakacin においては β -ケトブタン酸とフェニルアラニンが前駆物質と推定されたものの、 β -ケトブタン酸の起源は予測困難であった。そこで考えられうる前駆物質として、 ^{13}C 標識された β -ケトブタン酸とスレオニンを添加培養したところ、いずれも高効率で hazakacin の炭素骨格へと取り込まれた。以上より、hazakacin の生合成では、スレオニンが原料となり、水酸基の脱離、脱アミノ化を経て、 β -ケトブタン酸が供給される経路が関与すると強く示唆された。なお、その経路はスレオニンからイソロイシンが生合成される一次代謝経路の一部であることより、*Thermosporothrix hazakensis* においてはアミノ酸から派生する代謝経路が活発に働いている可能性が推察された。

(2) Firmicutes 門に属する好熱性細菌 *Laceyella* の代謝物解析

Laceyella 属は、16S rRNA 遺伝子相同性に基づく系統解析によると *Bacillus* 属に近縁な好熱性細菌であるが、気菌系を形成するなど、その性状は放線菌に類似する。また 30 付近での生育は極めて遅く、50 付近で活発に増殖する。本属の二次代謝物については報告がないことから、富山県内の河川から分離した *Laceyella sacchari* IT-2L 株の生産物を精査し、除草活性を示す二種類のアントラニル酸誘導体を同定した(H. Akiyama et al, J. Antibiot. 2014)。その後、さらに生産物の解析を行い、未知の鎖状ポリエン系化合物を微量、生産することを見出した。精製過程における光、熱、酸などの影響を細かく検討したが、ポリエン構造が不安定なため、純粋に単離することができず、完全な構造決定には至っていない。不純物を含む状態での構造解析の結果、5 個の二重結合が共役したペンタエン構造を有すること、末端がメチル基と *exo*-メチレン基であること、酸素または窒素が置換した極性官能基を有しており、通常脂肪酸やポリケタイドのように末端にカルボキシに相当する官能基を有さないことを明らかにした。完全な構造決定に向けて、精製条件の検討を継続している。また本菌株のドラフトゲノム解析を行い、二次代謝遺伝子として NRPS クラスター 3 個、type I PKS および type II PKS クラスターがそれぞれ 2 個存在することを明らかにした。以上より、*Laceyella* 属細菌が、上述の Ktedonobacteria 綱細菌あるいは放線菌とは異なる二次代謝能を有する可能性が示されており、その全貌を明らかにするためには、今後のさらなる検討が必要である。

(3) 希少放線菌 *Sphaerimonospora* 属の代謝物解析

Sphaerimonospora 属は放線菌門に属する希少糸状菌の一種である。本属は *Microbispora* 属から独立したシノニムであるため、既知代謝物の数の判定は慎重でなければならないが、*Sphaerimonospora* 属としてはこれまでに二次代謝物の報告がない。タイ産薬用植物の根から分離した *S. mesophila* GMKU363 株は当初通常の培養温度(30)で生育させ、フラノン系新規ポリケタイド linfuranone A と B を単離した(発表論文)。同系統の化合物はこれまでに糸状菌や海洋軟体動物、*Streptomyces* 属放線菌からの単離報告があるが、*Microbispora* 属あるいは *Sphaerimonospora* 属からの報告はない。GMKU363 株のドラフトゲノム解析を通じて、DNA 配列中から linfuranone 生合成に関わるポリケタイド合成酵素(type I PKS)遺伝子を探索したところ、該当する遺伝子群を見つけることができた。ところが、その配列を詳しく解析すると、PKS モジュールの配列から予測される生産物は、linfuranone A あるいは B よりもポリケタイド骨格の炭素鎖が 5 炭素分長い構造となり、遺伝子情報と実際に単離した化合物の構造とが一致しなかった(発表論文)。そこで、改めて GMKU363 株の培養液、さらには培養条件の検討を行い、遺伝子配列から予測された構造の化合物を探索した。結果として同株の温度勾配試験により至適生育温度が通常の放線菌とは異なり 37~40 であることを見出した。そして実際に 37 で液体培地の生産培養を行うことにより、30 培養では見られなかった複数の化合物が生産誘

導され、そのうちの 하나가 linfuranone A あるいは B よりも炭素鎖が 5 炭素分長く、遺伝子配列から予測された構造を有する新規化合物 linfuranone C であることを明らかにした。Linfuranone 生合成遺伝子クラスターには PKS 遺伝子と並んで 3 つのオキシゲナーゼ遺伝子が存在していた。そのうち 2 つはポリケタイド鎖を酸化的にフラノンへと変換する酵素に相当し、残りの 1 つが Baeyer-Villiger 酸化を触媒し、linfuranone C の炭素鎖に酸素を挿入して linfuranone B へ変換する酵素に相当すると推測された。Baeyer-Villiger 酸化はさまざまな天然物の生合成に関与しているが、鎖状の炭素鎖を切断する例は極めて稀である。Linfuranone 類はマウス前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導活性を示し、linfuranone B には癌細胞の浸潤阻害活性が見られた。

(4) 好熱性希少放線菌 *Actinomadura* 属の代謝物解析

Actinomadura 属は比較的高温を好む放線菌であり、タイ産薬用植物の葉から分離した *Actinomadura* sp. AMW41E2 株は 50 °C 付近を至適生育温度とする。本株を 50 °C で液体培養した際の生産物を精査したところ、3 種のアンスラキノン誘導体が得られ、そのうち 1 つが既知化合物、残り 2 つは新規化合物であった。興味深いことに、その既知アンスラキノンは以前に他の植物の根から単離されたものであり、これまでに微生物による生産の報告はない。また新規化合物の 1 つは、これまでに類縁化合物が糸状菌に見出されているものの、放線菌からの単離報告はない。加えて、本菌株からはノルジテルペンが 1 化合物単離され、NMR 解析により、テストステロン 5 α -還元酵素の阻害剤として特許文献に記載されている k4610422 に一致することが判明した。k4610422 の立体構造は未解明であったことから、今回単離した化合物を用いて絶対配置の決定を試みた。不斉炭素 4 つに関する相対立体配置は、NOESY とプロトン間のカップリング定数を解析することにより決定した。また絶対配置は誘導体化が困難と予測されたため、ECD 理論計算の適用を試みた。実測の ECD では 200 nm と 245 nm 付近に正のコットン効果を示し、ECD 計算では 5*R*, 9*S*, 10*R*, 13*S*-体が実測 ECD スペクトルに良い一致を示したことから絶対配置を確定することができた(投稿準備中)。k4610422 と同一骨格を有するノルジテルペンは放線菌の二次代謝物としては珍しく k4610422 を含めて 5 化合物しか知られていない。

(5) 子囊菌門に属する希少糸状菌の代謝物解析

Robillarda 属

糸状菌には二次代謝物の報告が皆無の種が多数残されている。実際に NITE NBRC が保有する分譲株 640 属のうち、ほぼ半数の 309 属について二次代謝物の報告がなされていない。我々はフランス Mycosphere 社と共同で、同社が収集した糸状菌ライブラリーからスクリーニングを行い、フランス領ギアナで分離された *Robillarda* sp. MS9788 株の培養物から新規フラン誘導体 robillafuran と新規 α -ピロン化合物 robillapyrone、既知 α -ピロン化合物 monascuspyrone を得た。Robillapyrone と monascuspyrone はいずれも α -ピロンの 6 位にアルキル側鎖を有し、ピロン環に直結する炭素にはメチル基と水酸基が置換し、不斉点が 1 個存在する。Monascuspyrone の立体化学も未解明であることから、両化合物の絶対配置の解析を検討した。当初、ピロン環の酸化分解を計画したが困難であったため、ECD 理論計算の応用を試みた。両化合物ともに ECD 実測では 300 nm 付近に正のコットン効果を示した。一方で、ECD 計算では両化合物とも (*R*)-体が同じく 300 nm 付近に正のコットン効果を示したことより、天然物の絶対配置を *R* と決定した(発表論文)。また、いずれの化合物もマウス前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導を促進した。

Phacidiopicnys 属

二次代謝物報告のない糸状菌として前出の *Robillarda* と同じく子囊菌門に属する *Phacidiopicnys* 8550 株の代謝物を精査したところ、デカリン骨格にポリエン側鎖が置換した新規化合物を見出した。本化合物は、デカリン環上に水酸基 3 個、メチル基 3 個が置換基として存在し、橋頭位も含めて 9 個の不斉炭素を有している。今後は絶対配置の決定と生理活性評価を行う。

Cladobotryum 属

Cladobotryum もまた子囊菌門に属する糸状菌であり、これまでに約 30 化合物が報告されているが、研究事例が比較的僅少なため、東京都で分離された *C. varium* TAMA 582 株について代謝物解析を行った。その結果、既知物質として cladoboryal, melinacidin IV, ternatin の 3 化合物を同定した。加えて、新規物質として 3 種の環状ペプチド化合物 cladoamide A, B, C を発見することに成功した(投稿準備中)。Cladoamide A は、L-*N*-メチルフェニルアラニンが 2 個、L-プロリンと L-イソロイシンが各 1 個、さらに (*S*)-ロイシン酸 1 個から成る環状デブシペプチドであり、その全体構造は NMR 解析により、アミノ酸の絶対配置は改良 Marfey 法、ロイシン酸の絶対配置はキラル HPLC 分析により決定した。Cladoamide B は、cladoamide A のイソロイシンが L-バリンに置換された類縁体であった。一方で、cladoamide C は、2 個の D-フェニルアラニンと、各 1 個の L-フェニルアラニン、L-イソロイシン、L-ロイシンから成る環状ペプチドであり、その構成成分の比較より、cladoamide A と B とは異なる生合成経路に由来する化合物と推察された。Cladoamide C の構造中、3 個のフェニルアラニンが連続して結合しており、いずれが D-体、L-体であるかは決定に至ることができず、理論計算予測を取り入れた全合成による、絶対配置の決定を検討している。いずれの化合物も顕著な抗菌性、細胞毒性を示さず、

cladoamide A のみが強いオートファジー誘導活性を示した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Y. Igarashi, K. Yamamoto, C. Ueno, N. Yamada, K. Saito, K. Takahashi, M. Enomoto, S. Kuwahara, T. Oikawa, E. Tashiro, M. Imoto, X. Ye, T. Zhou, E. Harunari, N. Oku. Ktedonoketone and 2'-oxosattabacin, benzenoid metabolites from a thermophilic bacterium *Thermosporothrix hazakensis* in the phylum *Chloroflexi*. *J. Antibiot.*, in press. 査読有

T. Shimoyama, M. Miyoshi, T. Nehira, A. Motojima, T. Oikawa, O. Laurence, Y. Igarashi. Two new secondary metabolites from a fungus of the genus *Robillarda*. *J. Antibiot.*, **71**, 432-437 (2018) 査読有

H. Akiyama, C. Indananda, A. Thamchaipenet, A. Motojima, T. Oikawa, H. Komaki, A. Hosoyama, A. Kimura, N. Oku, Y. Igarashi. Linfuranones B and C, Furanone-containing Polyketides from a Plant-associated *Sphaerimonospora mesophila*. *J. Nat. Prod.*, **81**, 1561-1569 (2018) 査読有

H. Komaki, N. Ichikawa, A. Hosoyama, N. Fujita, A. Thamchaipenet, Y. Igarashi. Draft genome sequence of linfuranone producer *Microbispora* sp. GMKU363. *Gonome Announc.* **3**, e01471-15 (2015) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

T. Xing, T. Zhou, Y. Igarashi “ New bioactive cyclic peptides produced by a fungus belonging to the genus *Cladobotryum* ” The 4th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco-Development (Semarang, 2018.10.31)

T. Zhou, H. Akiyama, K. Sumida, N. Oku, Y. Igarashi “Thermophilic bacteria as a new source of novel chemical entities: secondary metabolite analysis in *Laceyella saccchari*” The 3rd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco-Development (Yogyakarta, 2017.10.4)

T. Oikawa, A. Motojima, N. Matsuura, Y. Igarashi “Monascuspyrone stimulates adiponectin expression” 17th Tetrahedron Symposium (Barcelona, 2016.6.29)

下山猛夫, 三由美都季, Olivier Laurence, 五十嵐康弘, *Pseudorobillarda* 属糸状菌の生産する二次代謝産物の構造研究 2015 年度日本農芸化学会中部支部大会, (富山, 2015.9.19)

H. Akiyama, N. Oku, C. Indananda, A. Thamchaipenet, Y. Igarashi “Absolute configuration of linfuranones, new polyketides from Thai endophytic *Microbispora* sp.” 15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (Sapporo, 2015.8.31)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。