

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18896

研究課題名(和文) 新たな天然資源の発掘とその代謝物の解析

研究課題名(英文) Discovery of new natural resources and analysis of their metabolites

研究代表者

山野 喜(yamano, yoshi)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：70650597

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)：本研究は、これまで広く用いられてきた微生物の培養手法(平板培養法)だけでは培養が困難であった多数の微生物種の培養を可能とし、それらを創薬のための天然資源として活用することを目的として行った。

研究の成果として、自然環境下で微生物を分離培養できる培養器具generalized isolation chip(以下gi-chip)を作成した。自然環境から採取した微生物をgi-chipを用いて分離培養したところ、新種の可能性が高い微生物が多数得られた。またgi-chipを用いて得られた微生物から、寄生虫であるリーシュマニアの生育を強く阻害する化合物を精製し、既知化合物2種と新規化合物1種を単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を行ったことにより、新種の可能性が高い多数の微生物を分離培養することができる新しい培養器具が完成した。また、それら微生物から新薬の候補となる可能性をもつ化合物を精製し、構造解析した。本研究で作成した培養器具は安価に作成することができ、さらに一般的な研究室にある実験器具だけで利用可能であることから汎用性が高く、新種微生物の分離培養を広く普及させられる可能性を有している。今後、本培養器具により、これまで利用することができなかった多数の新種微生物が利用できるようになり、それら微生物が作り出す化合物や、たんぱく質、ゲノム情報などは薬の開発や他の研究分野の発展に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a culture device named generalized isolation chip (gi-chip) in order to cultivate uncultured microorganisms. gi-chip is an instrument capable of separating and culturing microorganisms in a natural environment. By using gi-chip, it has been possible to obtain a large number of new microorganisms with high potential. In addition, two known compounds and one new compound were isolated as anti-leishmania substances from the obtained microorganism.

研究分野：天然物化学

キーワード：難培養性微生物 探索研究 構造解析

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

### 1. 研究開始当初の背景

微生物は、薬のもととなる化合物が得られる最も有望な天然資源の一つとして知られ、薬の開発を目的にこれまで多種多様な微生物が分離培養され、多くの薬が生み出されてきた。しかし近年、これまで利用されてきた微生物は、自然界に存在する微生物のうちのわずか1%以下であり、残りの99%以上の微生物は培養ができないため利用されていなかった可能性が高いことがわかってきた。そのため、残りの99%の微生物の培養法を確立し、それらを利用することができれば、これまで以上に有用な薬が多数開発されることが期待できる。

そこで本研究では、これまでに培養が困難であった微生物の培養手法の構築と、培養された微生物が作る化合物の単離を課題とし研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の人工培地を用いた培養手法(平板培養法)では培養が困難であった微生物を培養可能とするため、自然環境下で微生物を分離培養できる器具の作成と、その器具を用いて分離培養した微生物が作る化合物の精製・構造解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

2015年にLewisらが報告したNature論文によると、isolation chipという培養器具を用いることで、自然環境下で微生物を分離培養することができ、その結果多数の新種微生物が培養可能となることが示されている。そこで、本研究ではこのisolation chipを基に、同様の機能を有し、かつ一般的な研究室の設備でも使用できるような汎用性の高い培養器具を作成し、それらを用いて難培養性微生物の培養を試みることにした。

#### (1) 培養器具の作成

初めに3Dプリンター等を用いて、自然環境下での使用に耐え、かつ汎用性の高い培養器具の形状の大まかな検討を行った。続いて、地元の企業と共同で器具の開発を行い、自然環境下で他の微生物の混入を防ぐ構造、再現性よく分離培養するための操作性の向上、無菌状態を作りだせる材料や構造の検証等を行い、7回の改変を経て、培養器具generalized isolation chip(以下gi-chip)を完成させた。

#### (2) 微生物の自然環境下での培養

土壌、池、海などの自然環境下から微生物を採取し、蛍光染色することにより微生物濃度を測定した。続いて、gi-chipの各ウェルにおよそ1細胞ずつ微生物が入るように微生物数を調整し、寒天を用いて微生物を器具内の各ウェルに固定した。真菌を選択的に培養する場合は、細菌に特異的に作用する薬剤で微生物液を処理したのち生存微生物数をカウントし、ウェル内に固定することにより行った。一方、細菌の選択的培養は、真菌に特異的に作用する薬剤を用いて行った。微生物を固定したgi-chipを微生物を採取した自然環境下に戻し、1か月培養した。培養後、gi-chipをクリーンベンチ内で無菌的に解体し、各ウェル内の寒天を砕き、3種の人工培地上に塗布した。2週間25°Cで培養後、得られた微生物の16SrRNA配列(細菌)もしくは28SrRNA配列(真菌)を解析し、既知の微生物との配列相同性の評価値から新種微生物の割合を推定した。

#### (3) 分離培養した微生物が作り出す化合物の精製・構造解析

gi-chipを用いて分離した微生物の培養物をアセトンで抽出し、抽出物のライブラリーを作成した。その抽出物ライブラリーの中でリーシュマニア原虫に対して生育阻害活性を示すものを選別し、活性の強い抽出エキスから活性化化合物の精製を行った。精製は有機溶媒を用いた液液分配と、各種精製用樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー、HPLCを用いて行った。単離した化合物の構造解析はNMRやMSなどの機器分析結果を解析することにより行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養器具の作成

幾度かの改変を経て、最終的にFig.1左に示す培養器具(gi-chip)を完成させた。gi-chipの断面図はFig.1右のようになっており、ウェル内に微生物を固定し、その両端を半透膜で仕切った構造になっている。半透膜には水分や養分は通過することができるが、他の微生物は通過できない大きさの孔が開いているため、ウェル内に固定された微生物に自然環境下に存在する水分や養分が供給され、かつ他の微生物の混入を防げるようになっていく。この構造により自然環境下での分離培養が可能になる。また、本器具は1つ数千円で作成可能であり、一般的な研究室にある実験器具だけで微生物を分離培養できるように汎用化されている。

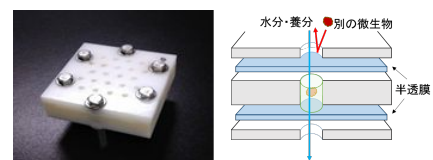


Fig.1 gi-chip の写真(左)とその断面図(右)

## (2) 微生物の自然環境下での培養

広島大学周辺の池から微生物液を採取し、従来の平板培養法（微生物液を直接人工培地に撒く方法）で得られた微生物 10 種と、同じ微生物液を用いて gi-chip を用いて分離培養した微生物 15 種の 16SrRNA 配列の解析を行った(Fig.2)。その結果、従来の手法を用いて分離培養した微生物はすべて 100%~99%の範囲内で相同性を示したのに対し、gi-chip を用いた微生物は 100%~89%まで幅広い相同性分布を示した。一般的に 97%以下の相同性の場合、新種の可能性が高いと言われていることから、gi-chip を用いた分離培養法では、分離培養された微生物のおよそ 30%が新種の可能性が高いことが示された。土壌から分離培養した微生物も同様の傾向を示したことから、gi-chip を用いることで、周辺環境中からも新種微生物が多数得られることが強く示唆された。

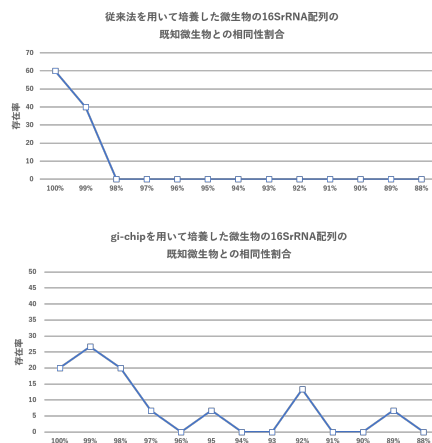


Fig.2 従来法と gi-chip を用いて分離培養した微生物の 16SrRNA 配列の既知微生物との相同性比較

## (3) 分離培養微生物が作り出す化合物の精製・構造解析

gi-chip を用いて分離培養した微生物の培養抽出エキスから抗リ-シュマニア活性試験を用いたスクリーニングを行った結果、10 ng/mL 程度の非常に低い濃度でも強力な生育活性を示す抽出エキスを見出した。そこで、該当する微生物を大量培養し、その抽出エキスから活性物質を精製・構造解析し、既知化合物 2 種と新規化合物 1 種を単離、構造解析した。

## (4) 現在の課題と今後の展望

本研究の成果として、当初の計画通り、培養器具の作成とその培養器具を用いて得られた微生物が作り出す化合物の単離に成功した。一方、研究を進めるに従い、研究課題申請時には予期しきれなかったいくつかの課題が明らかになった。

まず、gi-chip を用いて分離培養した微生物の多くが、培養速度が非常に遅いことから、化合物を単離するのに十分な培養抽出物量が得られないという問題が生じている。本研究の目的は新たに得られた微生物から化合物を単離・構造解析することであるため、培養抽出物量が十分に得られないことは研究の進展を妨げる重大な課題となっている。増殖速度の改善の試みとして、様々な組成の培地での培養や培養条件を種々検討してみたが、現在までに十分な解決には至っていない。

また、成果の欄の(3)に記載したように、微生物が新種であっても、そこから得られてくる化合物が新しい（新規化合物）とは限らないという課題も浮き彫りになった。本研究の目的は、難培養性微生物からこれまでに見いだされたことのない化合物を単離するというものであることから、今後は培養抽出エキスの活性を指標に化合物を精製するだけでなく、微生物のゲノム情報や発現している遺伝子の解析、培養抽出物の既知種との HPLC や MS を用いた成分比較解析などを併用することにより、単離目標とする化合物の新規性を確保する必要がある。

現状では、上記に記載した解決すべき課題が残っているが、gi-chip を作成したことでこれまで分離培養が難しかった微生物を多数培養できるようになったことは大きな進展である。今後さまざまな特殊環境を含む自然環境下で微生物を採取し、gi-chip を用いて分離培養することで、これまでに培養が困難であったことから研究対象とならなかった多くの微生物が発見され、その代謝物やゲノム情報は創薬だけでなく広く周辺分野の発展にも寄与することが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計3件)

Nagashima, Kazumi; Yamano, Yoshi; Sugimoto, Sachiko; Ishiwata, Kenji; Kanuka, Hiroataka; Otsuka, Hideaki; Matsunami, Katsuyoshi

Nematicidal compounds of *Peperomia japonica*, *Phytochemistry Letters* (2018), 27, 30-35. 査読あり

Sasaki, Ayano; Yamano, Yoshi; Sugimoto, Sachiko; Otsuka, Hideaki; Matsunami, Katsuyoshi; Shinzato, Takakazu

Phenolic compounds from the leaves of *Breynia officinalis* and their tyrosinase and melanogenesis inhibitory activities, *Journal of Natural Medicines* (2018), 72(2), 381-389. 査読あり

Sugimoto, Sachiko; Yamano, Yoshi; Khalil, Hany Ezzat; Otsuka, Hideaki; Kamel, Mohamed Salah; Matsunami, Katsuyoshi

Chemical structures of constituents from the leaves of *Polyscias balfouriana*, *Journal of Natural Medicines* (2017), 71(3), 558-563. 査読あり

〔学会発表〕(計 20 件)

末田 正太, Harinantenaina LIVA, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, Claudine Aimee RASOLOHERY, Marcelle RAKOTOVAO, Heriniaina RANDRIAMAMPIONONA RAZAFINDRAKOTO, Saholinirina Marie Hortensia RANDRIANARIVO, 松浪 勝義: マダガスカル産植物 *Distephanus trinervis* 葉部の成分研究 日本薬学会第 139 回年会 (千葉), 2019. 3. 21.

網本 久美子, 長島 佳純, 山野 喜, 杉本 幸子, 山口 卓朗, 大塚 英昭, 松浪 勝義: 沖縄県産植物ヒイラギズイナ (*Itea oldhamii*) のがん細胞増殖抑制活性成分の探索 日本薬学会第 139 回年会 (千葉), 2019. 3. 21.

Melanny Ika Sulistyowaty, Yoshi Yamano, Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami: Chemical Conversion of *Alpinia galanga* (L.) 日本生薬学会第 65 回年会 (広島), 2018.09.16.

尾崎 葵, 山野 喜, 杉本 幸子, 大塚 英昭, 松浪 勝義: 病原微生物代謝産物の探索 日本生薬学会第 65 回年会 (広島), 2018.9.17.

山口 卓朗, 山野 喜, 杉本 幸子, 大塚 英昭, 松浪 勝義: 「非天然型」天然物を対象としたシート化合物の探索 日本生薬学会第 65 回年会 (広島), 2018.9.17.

NGUYEN HOANG UYEN, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, 松浪 勝義: フシグロ (*Silene firma*) 地上部の成分探索 日本生薬学会第 65 回年会 (広島), 2018.09.16.

Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Amira S. Wanas, Samar yehia Desoukey, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami: New Sesquiterpene Alkaloids from *Onopordum alexandrinum* Boiss. 18th Annual Oxford International Conference in the Science of Botanicals (USA:Oxford Conference Center), 2018.4.9.

Yoshi Yamano, Moemi Shiga, Sachiko Sugimoto, Toru Hosoi, Koichiro Ozawa, Katsuyoshi Matsunami. Isolation and mechanism analysis of anti-obesity substances from *Wolfiporia extensa*. 18th Annual Oxford International Conference in the Science of Botanicals (USA:Oxford Conference Center), 2018.4.9.

杉本 幸子, 山野 喜, AMIRA S. Wanas, 片川 和明, SAMAR YEHIA Desoukey, 大塚 英昭, 松浪 勝義: *Onopordum alexandrinum* 地上部から得られた新規セスキテルペンアルカロイドの構造 第 138 回年会日本薬学会 (金沢), 2018.3.26.

尾崎 葵, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, 松浪 勝義: ハシカンボク (*Bredia hirsta*) 地上部の抗 *Leishmania* 活性を指標とした成分探索 第 138 回年会日本薬学会 (金沢), 2018.3.27.

松井 満生, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, 松浪 勝義: ヤマビワソウ (*Rhynchotechum discolor*) 地上部の抗 *Leishmania* 活性を指標とした成分探索 第 56 回日本薬学会中国四国支部大会 (徳島), 2017.10.21.

亀谷 綾子, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, 松浪 勝義: 沖縄産植物アカハダノキのがん細胞増殖抑制成分の探索 第 56 回日本薬学会中国四国支部大会 (徳島), 2017.10.21.

権藤 一哉, 網本 久美子, 三角 知子, 相良 俊典, 末田 正太, 杉本 幸子, 山野 喜, Hany E. Khalil, 大塚 英昭, 松浪 勝義: マカダミア (*Macadamia integrifolia*) 葉部の成分研究 第 56 回日本薬学会中国四国支部大会 (徳島), 2017.10.21.

長島 佳純, 杉本 幸子, 山野 喜, Liva Harinantenaina Rakotondraibe, 大塚 英昭, 松浪 勝義: *Mystroxydon aethiopicum* 葉部の成分探索 日本生薬学会第 64 回年会 (千葉), 2017.09.09.

山野 喜, 志賀 もえみ, 杉本 幸子, 細井 徹, 小澤 光一郎, 松浪 勝義: 茯苓由来抗肥満活性物質の単離とメカニズム解析 日本生薬学会第 64 回年会 (千葉), 2017.09.10.

柳田 容瑠, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, 松浪 勝義: *Artabotrys siamensis* 葉部より単離した新規カロラン型セスキテルペン 第 137 年会日本薬学会 (仙台), 2017. 3.26.

山口 卓朗, 山野 喜, 杉本 幸子, 大塚 英昭, 松浪 勝義: ヤブムラサキ (*Callicarpa mollis*) 葉部からの新規化合物及び抗 *Leishmania* 活性成分の探索 第 137 年会日本薬学会 (仙台), 2017. 3.26.

宮崎 友里, 杉本 幸子, 山野 喜, 大塚 英昭, 松浪 勝義: ミツバウツギ (*Staphylea bumalda* DC.) 葉部の機能性成分の研究 第 55 回日本薬学会中国四国支部大会 (岡山), 2016.11.05.

杉本 幸子, 山野 喜, Hany Ezzat Khalil, Mohamed Salah Kamel, 大塚 英昭, 松浪 勝義: *Polyscias balfouriana* 葉部の成分研究 日本生薬学会第 63 回年会 (富山), 2016.09.25.

志賀 もえみ, 山野 喜, 杉本 幸子, 松浪 勝義: 茯苓由来抗肥満活性物質の探索 日本生薬学会第 63 回年会 (富山), 2016.09.24.

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/shoyaku/member.html>

## 6．研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松浪 勝義

ローマ字氏名：(matsunami katsuyoshi)

研究協力者氏名：杉本 幸子

ローマ字氏名：(Sugimoto sachiko)

※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。