

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K15467
研究課題名（和文）有用物質生産基盤の確立へ向けた糸状菌における二次代謝発現調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on regulation machinery of biosynthetic gene expression in filamentous fungi

研究代表者
石内 勘一郎 (Ishiuchi, Kan'ichiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・講師

研究者番号：70608140
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒカゲノカズラ科植物オイトウゲシバに内生する糸状菌（*Paraboeremia* sp. Ls13）より、紫外線照射による変異誘導株を作出することで、アルツハイマー病改善薬の候補化合物である huperzine A の潜在的な生産能力を覚醒させることに成功した。また、同化合物の生産調節機構を解明する手がかりとして、Ls13株の分子遺伝学実験を行うためのシステムを整備し、さらに同菌株の全ゲノム配列の解読に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アルツハイマー病改善薬候補である huperzine A は、植物により生産される有効成分であることで知られるが、その生産メカニズムはいまだ明らかにされていない。本研究では、新種の植物内生糸状菌が huperzine A を潜在的に生産する能力を持つことを証明し、同菌の遺伝子実験システムを整備することで、生合成機構の解明に向けて大きく前進することができた。このことは、huperzine A の大量生産システム構築への足がかりにもなり、医薬品開発における新しい供給戦略となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：An ultraviolet-irradiated strain of *Paraboeremia* sp. Ls13, a Lycopodiaceae plant-derived endophytic fungus was successfully prepared, and the potential production ability of huperzine A, a candidate natural product of Alzheimer's disease treatment, has been proved. Furthermore, a facile gene manipulation system of Ls13 strain was established, and the whole genome sequence has been completed.

研究分野：天然物化学

キーワード：植物内生糸状菌 *Paraboeremia* sp. Ls13 huperzine A 生産メカニズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Huperine A (HupA)は、ヒカゲノカズラ科植物により生産されることで知られるアルツハイマー病の改善薬候補である。HupAは、植物内でごく微量にしか生産されないことから、医薬品開発を指向する上で、新しい大量生産法の確立が期待されている。近年、抗がん剤 paclitaxel に代表される植物由来の有用成分を内生糸状菌が生産することが報告されており、植物内生糸状菌が新たな医薬資源として注目を集めている。研究代表者は、これまで HupA を生産する糸状菌の発見に成功した一方で、同菌株が安定的に化合物を生産しないという課題に直面していた。

2. 研究の目的

HupA 生産菌に紫外線照射することで遺伝子変異株を作出し、化合物生産性の回復を目指した。さらに、同糸状菌株の遺伝子実験システムの整備ならびに全ゲノム配列の解読を行い、HupA の生産調節メカニズム解明のための研究基盤確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 紫外線照射による変異株誘導と代謝物分析。

HupA 生産菌 *Paraboeremia* sp. Ls13 の菌糸よりプロトプラストを誘導し、これに紫外線を一定時間照射することで遺伝子変異株を作出した。得られた変異株をメタノールで抽出後、分配により得られて塩基性画分について、MS および LC-MS 分析を行った。

(2) 目的化合物を生産するヒカゲノカズラ科植物の探索

代謝物分析により、Ls13K1076 株が *Lycopodium* アルカロイドを生産していることが明らかとなった。生産化合物の同定を行ったところ、同化合物は、既知化合物に該当しなかったため、9 種のヒカゲノカズラ科植物のアルカロイド画分について、LC-MS 分析を行った。

(3) *Phlegmariurus nummulariifolius* の抽出分離

P. nummulariifolius の全草をメタノールで抽出分配後、得られた塩基性画分をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC で分離精製を行った。単離した目的化合物の構造を NMR 等の各種スペクトルデータにより解析した。

(4) Ls13K1076 株による生産化合物の同定

P. nummulariifolius より単離した 12-*epi*-lycopodine を標品として、Ls13K1076 株の塩基性画分を LC-MS 分析した。

(5) Ls13 株の形質転換条件の検討

菌糸前培養培地、菌糸量、細胞壁溶解酵素組成、酵素処理時間およびプロトプラストのろ取法について検討を行い、Ls13 株のプロトプラスト誘導条件を最適化した。さらに、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子発現ベクターを構築後、プロトプラスト-PEG 法により、Ls13 株の形質転換を試みた。

(6) Ls13 *ku* 株の作出

Ls13 株のゲノムより、非相同末端結合修復に関与する *ku* 遺伝子と高い相同性を示す PAB0_00870 を見出した。PAB0_00870 の外領域の配列を PCR により増幅後、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を挟む形で、出芽酵母の相同組換えにより、*ku* 遺伝子破壊ベクターを構築した。作成した遺伝子破壊ベクターを制限酵素処理後、Ls13 株の形質転換を行った。さらに、得られた形質転換体よりゲノム DNA を抽出し、PCR により遺伝子破壊の確認を行った。

4. 研究成果

(1) Ls13 株の紫外線照射による変異誘導により、1,267 株の遺伝子変異株を作出した。得られた遺伝子変異株の代謝物分析を行った結果、Ls13K1076 株において、*Lycopodium* アルカロイドの生産が示唆された。続いて、生産化合物の同定を行った結果、Ls13K1076 株は、huperzine A および lycopodine と共に、天然物として初の報告となる 12-*epi*-lycopodine を生産することを明らかにした。

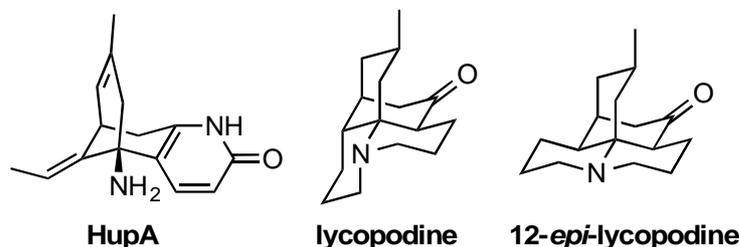


図 1. *Paraboeremia* sp. Ls13K1076 により生産された *Lycopodium* アルカロイドの構造

(2) *Phlegmariurus nummulariifolius* より、5 種の新規アルカロイド phlendumine A-E を単離構造決定した。また、Ls13 株により生産される 12-*epi*-lycopodine の生物活性について評価した結果、同化合物の誘導体である 12-*epi*-lycopodine-*N*-oxide が、インターロイキン-10 により誘導されるヒト単球由来マクロファージの CD163 発現に対して抑制効果を示すことを明らかにした。同抑制効果は、*P. nummulariifolius* より単離した phlendumine A、E および hupermine A についても有意に認められた。

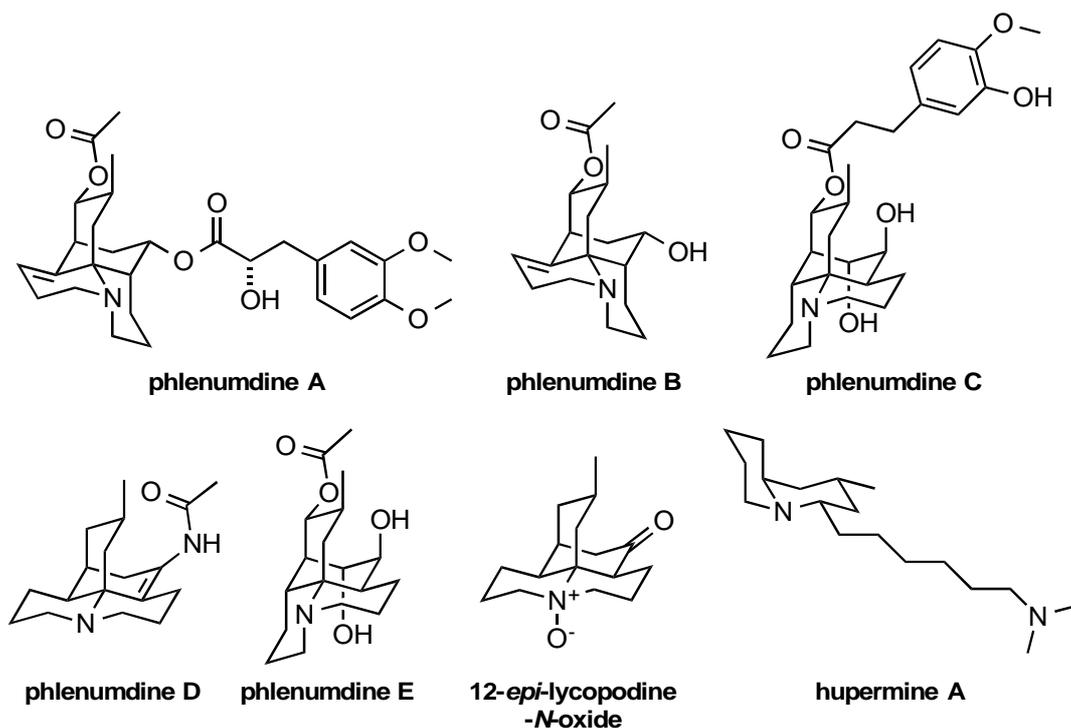


図 2. *P. nummulariifolius* より単離した *Lycopodium* アルカロイドの構造

(3) Ls13 株は、分生子を形成しないため、形質転換が困難な菌株であったが、プロトプラスト誘導条件を検討した結果、検討前と比較して約 10 倍量のプロトプラスト化に成功し、プロトプラスト-PEG 法による形質転換実験を可能とした。

(4) Ls13 株の遺伝子ターゲティングを可能とするため、*ku70* 遺伝子と相同性の高い PAB0_00870 の破壊を試みた結果、96 株の形質転換体のうち 1 株のみにおいて、*ku* 遺伝子の破壊が確認された。

(5) 本研究では、紫外線照射による植物内生糸状菌の *Lycopodium* アルカロイド生産性回復に成功した。さらに、Ls13 のゲノム情報の取得および遺伝子実験システムの整備をはじめ、鍵となる研究基盤が確立できたことから、今後、変異箇所の特特定および遺伝子破壊実験を継続し、目的とする化合物生産メカニズム解明の達成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Waka Nakayama, Yukio Fujiwara, Yasuhiro Kosuge, Orawan Monthakantirat, Kazumi Fujikawa, Santi Watthana, Susumu Kitanaka, Toshiaki Makino, Kan'ichiro Ishiuchi	4. 巻 29
2. 論文標題 Phlenumdines D and E, new Lycopodium alkaloids from <i>Phlegmariurus nummulariifolius</i> , and their regulatory effects on macrophage differentiation during tumor development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 98-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytol.2018.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kan'ichiro Ishiuchi, Dai Hirose, Takuma Suzuki, Waka Nakayama, Wen-Ping Jiang, Orawan Monthakantirat, Jin-Bin Wu, Susumu Kitanaka, and Toshiaki Makino	4. 巻 81
2. 論文標題 Identification of Lycopodium alkaloids produced by an ultraviolet-irradiated strain of <i>Paraboeremia</i> , an endophytic fungus from <i>Lycopodium serratum</i> var. <i>longipetiolatum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1143-1147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.7b00627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Waka Nakayama, Orawan Monthakantirat, Kazumi Fujikawa, Santi Watthana, Susumu Kitanaka, Toshiaki Makino, and Kan'ichiro Ishiuchi	4. 巻 94
2. 論文標題 Phlenumdines A-C, new Lycopodium alkaloids isolated from <i>Phlegmariurus nummulariifolius</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 2247-2261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-17-13797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木卓馬、杉浦由姫、牧野利明、石内勲一郎
2. 発表標題 Lycopodiumアルカロイド生産糸状菌 <i>Paraboeremia</i> sp. Le13の形質転換系構築
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石内勘一郎
2. 発表標題 植物由来有用二次代謝産物を生産する内生糸状菌の探索
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山和香、Monthakantirat Orawan、藤川和美、Watthana Santi、北中進、牧野利明、石内勘一郎
2. 発表標題 Phlegmarius nummulariifoliusより単離した新規リコポジウムアルカロイドの構造
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石内勘一郎、鈴木卓馬、中山和香、廣瀬大、姜文平、Monthakantirat Orawan、呉金濱、北中進、牧野利明
2. 発表標題 ヒカゲノカズラ科植物由来内生糸状菌が生産するリコポジウムアルカロイドの構造
3. 学会等名 第59回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中山和香、Orawan Monthakantirat、藤川和美、Santi Watthana、北中進、牧野利明、石内勘一郎
2. 発表標題 タイ産ヒカゲノカズラ科植物由来新規リコポジウムアルカロイドの構造
3. 学会等名 日本生薬学会第64回年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学生薬学分野
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syg/index.html>
名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syg/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----