

令和元年6月13日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15471

研究課題名(和文) 新たな生物資源の創製を目的とした多様性エキストラライブラリの構築

研究課題名(英文) Production of diversity extract library for creation of new biological resources

研究代表者

若菜 大悟 (Wakana, Daigo)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80700129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回、天然物化学研究のための新たな探索源の創成を目的に、国内で広く流通している生薬と一般的な菌類である *Aspergillus* 属真菌を組み合わせ、これまでにない多様化エキスの作成を行った。10種の生薬抽出物を添加した培地で *A. fumigatus* CBS101355 株、*A. nidulans* CBS112.46 株および *A. oryzae* IFM59478 株を 25℃ で 0、3、5、7 および 11 日間培養し、150種の培養エキスを作成した。特に顕著な含有成分の多様化が観測された培養エキスについては、変化した物質の特定を行い、どのような変化が生じたのか検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、新たな天然物化学研究に用いるため、一般的に国内で流通している生薬と、一般的な菌類である *Aspergillus* 属菌を組み合わせ、新たな多様化エキスの作成に成功した。天然物化学研究に用いることができる国内資源は年々減少しており、また、国外試料の利用が難しくなっているなか、本研究は国内で調達可能な資源を利用し、これまでにない研究資源作成の可能性を示した。また、多様化エキス中の成分探索を行うことにより、これまでに未発見の物質発見の可能性が示された。さらに、本研究により、物質の構造を変換する未報告の酵素の発見につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The searching source usable in Japan is decreasing year by year. For the purpose of production of new searching source for natural product chemistry, the diversity extracts were produced by combination of crude drugs widely distributed in Japan and common fungus belong to genus *Aspergillus*. *A. fumigatus* CBS101355, *A. nidulans* CBS112.46 and *A. oryzae* IFM59478 were cultured on PDB with crude drug extract at 25℃ for 0, 3, 5, 7 and 11 days, and the 150 kinds of cultured extract were produced. These culture extracts were analyzed by HPLC for confirm the containing compounds. For the extract showed significant component diversification, changed substances were isolated and identified and what kind of change occurred was researched.

研究分野：天然物化学

キーワード：生物資源 *Aspergillus* 真菌 生薬

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

1. 研究開始当初の背景

天然物からの医薬品ソースの探索はペニシリンの発見以降盛んに行われており、現在でも新たな生物活性物質の報告は続いている。しかし、近年、医薬品ソースとしての天然物資源の枯渇や生物多様性条約の締結などの理由により、天然物化学研究に欠かせない探索源の確保が困難になりつつあり、新たな研究資源の創成は重要な問題である。今回、市場で一般的に流通しており、多様に富んだ物質が報告されている日本薬局方収載生薬および普遍的な真菌である *Aspergillus* 属真菌に着目し、両者を組み合わせることで含有物質の多様性が拡大した多様化エキスが得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

新たな天然物化学研究の開発を目的に、生薬抽出エキスを添加した培地で *Aspergillus* 属真菌を経時的に培養し、得られた多様化エキスライブラリを構築した。これらの含有成分が実際に変化したか確認するため、HPLC 分析を行い、そのプロファイルの比較を行った。特に顕著な含有物質の変化が観測されたものに関してはその物質の同定を行った。

3. 研究の方法

(1) 機器・試薬

HPLC 分析は多波長検出器 SPD-M-20A (島津製作所) を接続した prominence LC-20 シリーズ (島津製作所) を用いた。NMR スペクトルの測定には ECA-600 型核磁気共鳴装置 (JEOL) を用いた。分析用溶媒は HPLC グレードのものを、それ以外は 1 級のものを用いた。生薬はウチダ和漢薬より購入した。

(2) 生薬エキス添加培養方法

生薬末 90 g に精製水 900 mL を加え、30 分加熱抽出した。得られた抽出物を 2.4 mg/mL の濃度で PDB 培地に添加し、24 well plate に 2 mL ずつ分注した。次に、各 well に *A. fumigatus* を植菌し、25 °C で 3, 5 および 8 日間培養を行った。培養後、凍結乾燥し、well 毎に 2 mL のメタノールで抽出し、得られた培養エキスを HPLC 分析した。

(3) HPLC 分析条件

HPLC 分析はカラムとして mightysil RP-18GPII (3.0 x 250 mm, 5 μ m, 関東化学) を用い、カラム温度 40 °C で行った。分析は linear gradient mode で行い、17 分で 30% B から 100% B にするタイムプログラムを用いた (移動相 A: 0.5% ギ酸水溶液, 移動相 B: 0.5% ギ酸アセトニトリル溶液)。この時の流速は 0.5 mL/min とした。

(4) 多様化エキスの調製

オウゴン、オウバク、オウヒ、キジツ、ケイヒ、シャクヤク、ダイオウ、チクセツニンジン、チンピ、トウキ、ハング オよびブシ抽出エキスを添加した培地で、*A. fumigatus* CBS101355 株、*A. nidulans* CBS112.46 株 および *A. oryzae* IFM 59478 (=RIB40) 株を 25 °C、0, 3, 5, 8, 11 日間培養した。培養後、凍結乾燥、メタノール抽出し、多様化エキスを調製した。得られたエキスは HPLC 分析によりその含有成分の多様化を評価した。

(5) オウヒ添加 *A. fumigatus* 培養エキス及びオウヒ抽出エキスからの 1-7 の単離

オウヒ抽出エキスを 2.4 mg/mL 添加した PDB 培地 800 mL をルーフラスコに 200 mL ずつ分注後、*A. fumigatus* CBS101355 株を植菌し、25 °C で 10 日間培養した。培養後、凍結乾燥、メタノール抽出を行い、得られた培養エキス 1.5 g をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、1-ブタノールを用いて液々分配した。得られた酢酸エチル分画 85.5 mg をウルトラパック (ODS, 26 x 300 mm, 山善株式会社) を用いた MPLC により分離し (移動相 0-30 min: 40%CH₃CN, 30-60 min: 50%CH₃CN)、化合物 1, 3-6 を得た。クロロホルム層を Sephadex LH-20 (GE ヘルスケア)、Inertsustain ODS (10 x 250 mm, GL science) を用いた HPLC (移動相 40%CH₃CN, 35%CH₃CN) により分離・精製し、2 を得た。また、オウヒ抽出エキスを ODS MPLC により精製し、7 を得た。

(6) チクセツニンジン添加 *A. fumigatus* 培養エキスからの 8 の単離

チクセツニンジン抽出エキスを 2.4 mg/mL 添加した PDB 培地 200 mL に *A. fumigatus* CBS101355 株を植菌し、25 °C で 10 日間培養した。培養後、凍結乾燥、メタノール抽出を行い、得られた培養エキス 3.2 g をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルおよび 1-ブタノールを用いて液々分配した。得られた酢酸エチル分画 (266 mg) を Sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー、ODS HPLC (移動相 75%CH₃CN) により分離・精製し、8 (13 mg) を得た。

(7) オウゴンからの 9 の単離

オウゴン末 90 g に精製水 900 mL を加え、30 分加熱抽出した。得られた抽出液をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルおよび 1-ブタノールを用いて液々分配した。得られたクロロホルム層を sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー、ODS HPLC を用いて分離・精製し、9 を得た。

(8) ダイオウからの 10 の単離

ダイオウ末 90 g に精製水 900 mL を加え、30 分加熱抽出した。得られた抽出液をクロロホルム、酢酸エチル、1-ブタノールを用いて液々分配した。得られた酢酸エチル層を sephadex

LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー, ODS HPLC を用い分離・精製し, 10 (4.8 mg) を得た.

(9) ダイオウからの 11 の, ダイオウ添加 *A. oryzae* 培養エキスからの 12 の単離

ダイオウ末 90 g に精製水 900 mL を加え, 30 分加熱抽出した. 得られた抽出液をクロロホルム 酢酸エチル, 1-ブタノールを用いて液々分配した. 得られたクロロホルム層を sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー, ODS HPLC (40%CH₃CN) を用い分離・精製し, 11 (8.5 mg) を得た.

ダイオウ抽出エキスを 2.4 mg/mL 添加した PDB 培地 200 mL に *A. oryzae* IFM59478 株を植菌し, 25 °C で 8 日間培養した. 培養後, 自然ろ過により菌体と培養液を分離し, 培養液を酢酸エチルで液々分配した. 得られた酢酸エチル層をクロロホルム 酢酸エチルおよび 1-ブタノールを用いて順次液々分配し, 得られたクロロホルム層 (43 mg) を Sephadex LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー, ODS HPLC (15%CH₃CN) により分離・精製し, 12 (2.7 mg) を得た.

4. 研究成果

(1) 多様化エキスの調製と含有成分変化の検討

A. fumigatus, *A. nidulans* および *A. oryzae* を 10 種の生薬抽出エキスをそれぞれ添加した培地で 0, 3, 5, 7, 11 日間培養し, 150 種の多様化エキスを得た. これらを HPLC 分析し, 多様化エキス中の成分変化を観測した. その結果, *A. fumigatus* をオウヒ添加培養した場合に 1-7 の (Fig. 1), チクセツニンジン添加培養した場合に 8 の (Fig. 2), オウゴンを添加した場合に 9 および tr 14.4 min の含有量が減少した (Fig. 3). *A. nidulans* をダイオウ添加培養した際には複数の成分の含有量の低下が観測されたが, 特に tR 7.9 min の物質 (10) の減少が観測された (Fig. 4). また, *A. oryzae* をダイオウ添加培養した際には tR 6.5 min の物質 (11) が経時的に減少した (Fig. 5A).

(2) *A. fumigatus* のオウヒエキス添加培養時に得られた物質の探索

オウヒ抽出物添加培養を行ったところ, 化合物 1-7 の含有量の変化が観測された (Fig. 1). これらの物質を単離, 構造決定したところ, sakuranetin (1), monomethylsulochrin (2), sterubin (3), persinol (4), padmatin (5), pseurotin A (6) および sakuratin (7) と同定された (Fig. 2). これらのうち, 2 および 6 は *A. fumigatus* の産生する二次代謝産物として知られている物質であり, 1, 3-5, 7 はオウヒ由来物質およびその代謝物と考えられた. 特に 3-5 は 1 が酸化され産生されたと推測されたため, 1 を 50 μg/mL 添加した培地で *A. fumigatus* を経時的に培養した結果, 1 の減少と共に 3 が産生され, 次いで 4 および 5 の産生が観測された.

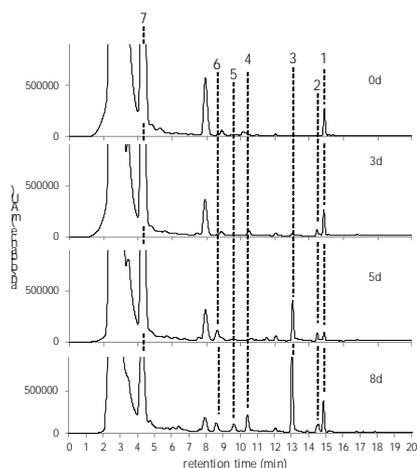


Fig. 1 *A. fumigatus* の経時的オウヒ添加培養

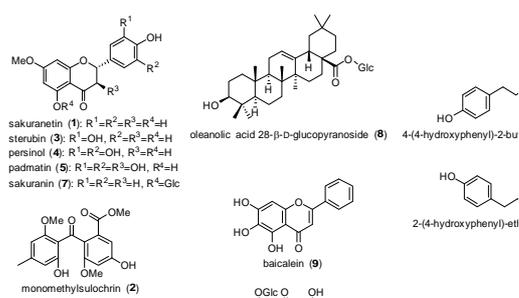


Fig. 2 生薬エキス添加培養により含有量の変化が見られた物質

(3) *A. fumigatus* のチクセツニンジンエキス添加培養時に得られた物質の探索

A. fumigatus をチクセツニンジンエキス添加培養したところ、培養 3 日目に 8 (tR 18.3 min) の産生が観測され (Fig. 3), 培養 11 日まで産生量はほぼ変化しなかった。これを単離した結果, oleanolic acid 28-β-D-glucopyranoside と同定された (Fig. 2)。

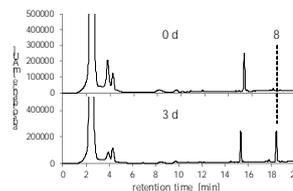


Fig. 3 *A. fumigatus* の経時的チクセツニンジン添加培養

(4) *A. fumigatus* のオウゴンエキス添加培養時に代謝されたオウゴン成分の探索

A. fumigatus をオウゴンエキス添加培養した結果, tR 11.8 min (9) の経時的な減少が観測された (Fig 4) . 本物質を単離, 構造決定した結果, オウゴンに含有されるフラボノイドである baicalein と同定された (Fig. 2) .

(5) *A. nidulans* のダイオウエキス添加培養時に代謝されたダイオウ成分の探索

A. nidulans をダイオウエキス添加培養した結果, tR 7.9 min (10) の経時的な減少が観測された (Fig. 5) . 本物質を単離, 構造決定した結果, ダイオウに含有されるアントラキノン配糖体である chrysophanol 8-O-β-D-glucoside と同定された .

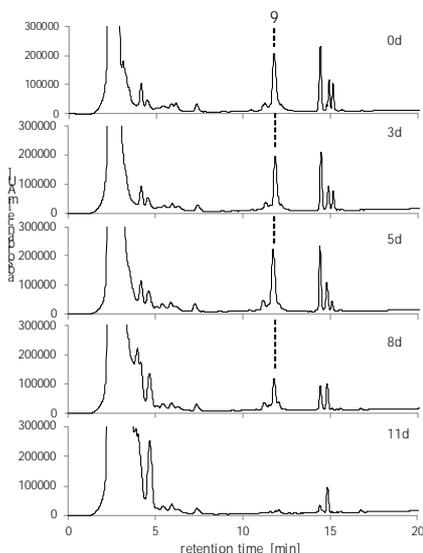


Fig. 4 *A. fumigatus* の経時的オウゴン添加培養

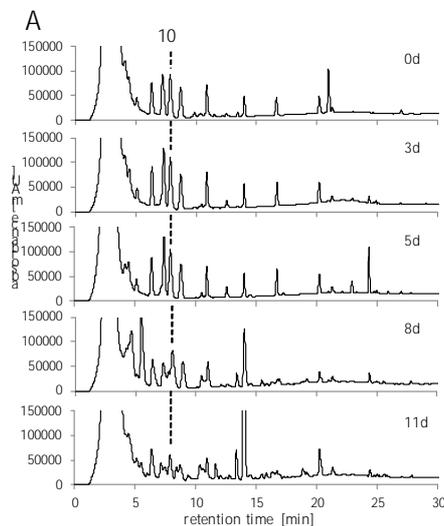


Fig. 5 *A. nidulans* の経時的ダイオウ添加培養

(6) *A. oryzae* のダイオウエキス添加培養時に産生量が変化した物質の探索

A. oryzae をダイオウエキス添加培養した結果, tR 6.3 min (11) の経時的な減少が観測された (Fig. 6A) . 本物質を単離, 構造決定した結果, ダイオウに含有されるフェニルプロパノイド, 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone と同定された (Fig. 2) . 次に, 11 が *A. oryzae* による代謝を受けるか, また, 代謝された結果何が産生されるか検討するため, 11 を 0.1 mg/mL の濃度で添加した PDB を用い, *A. oryzae* の培養を行った . その結果, 11 の減少と共に tR 3.6 min の物質 (12) が増加した (Fig. B) . 本物質は単離・構造決定した結果, 2-(4-hydroxyphenyl)-ethanol と同定された (Fig. 2) .

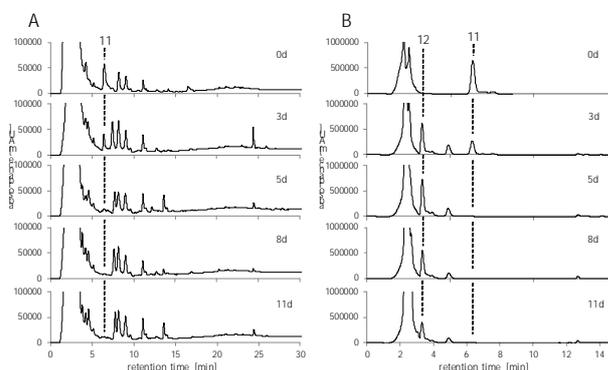


Fig. 6 *A. oryzae* の経時的ダイオウ添加培養

A: ダイオウ抽出エキス添加,

B: 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone 添加

(7)考察

A. fumigatus のオウヒ添加培養により、これまでオウヒから単離例のない sterubin (3), persinol (4), padmatin (5) が産生された。このことから、生薬エキスと *Aspergillus* 属菌の組み合わせにより、これまででない多様化エキスが創成されたと考えられる。*A. fumigatus* のチクセツニンジン添加培養では oleanolic acid 28- β -D -glucopyranoside (8) の産生が観測された。本物質はチクセツニンジンに含有される chikusetsusaponin 類の脱糖反応により生じると考えられ、*A. fumigatus* の糖加水分解酵素の存在が示唆された。また、*A. fumigatus* はオウゴン中の baicalein (9) を、*A. nidulans* はダイオウ中の chrysophanol 8-O- β -D-glucoside (10) をそれぞれ代謝することが明らかとなった。今後、これらがどのような化合物に代謝されるか検討することにより、これらの組み合わせによりどのような多様化エキスが創成できるか検討可能である。

A. oryzae のダイオウ添加培養により、ダイオウ含有成分である 11 から 12 への変換が生じることが明らかとなった。本変換反応は糸状菌 *Beauveria bassiana* による変換が Fugantiらにより報告されており¹⁾、その反応は Baeyer-Villiger (BV) 酸化およびエステル結合の開裂によるとされている。*A. oryzae* による BV 酸化の例はこれまで 4-methylcyclohexanone の酸化反応が報告されているが^{2),3)}、11 から 12 のような鎖状構造の酸化反応はこれまでに報告されていない。また、本反応は BV monooxygenase (BVMO) により触媒されると考えられるが、*Aspergillus* 属菌の産生する BVMO のうち 11 の代謝が報告されているものとして、*A. flavus* が産生する BVMO_{AFL838} がある⁴⁾。今回用いた *A. oryzae* IFM 59478 (=RIB40) 株はゲノム解析済み菌株であるため⁵⁾、BVMO_{AFL838} のアミノ酸配列を本菌株のものと同源性検索したところ、非常に高い同源性を示す機能不明のタンパク (Acc. Number: XP_023091383) が存在した。そのため、*A. oryzae* が BVMO_{AFL838} と同様の機能を示す酵素を産生する可能性が示唆された。

以上の結果から、生薬と *Aspergillus* 属菌を組み合わせることにより、多様化エキスライブラリの構築が可能であり、本ライブラリ中の成分研究をすることが新たな酵素の発見につながり、有用物質の産生の可能性が示唆された。

(6)引用文献

- 1) C. Fuganti, et. al., *J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 3616-3619 (1996).
- 2) R. A. C. Goncalves, et. al., *Food Technol. Biotechnol.*, **42**, 355-361 (2004).
- 3) R. Sicard, et. al., *Adv. Synth. Catal.*, **347**, 1041-1050 (2005).
- 4) F. M. Ferroni, et. al., *PLOS ONE*, **11**, e0160186 (2016).
- 5) M. Machida, et. al., *Nature*, **438**, 1157-1161 (2005).

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。