

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2023

課題番号：18KK0219

研究課題名（和文）多様性に富んだインドネシアの生物資源の収集と有効活用

研究課題名（英文）Collection and utilization of bioresources and natural products from Indonesia

研究代表者

供田 洋（Tomoda, Hiroshi）

北里大学・薬学部・特任教授

研究者番号：70164043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：共同研究先であるハサヌディン大学において、インドネシア各地で採取した土壌から真菌および放線菌合わせて約700株を分離した。ハサヌディン大学、インドネシア科学院および北里大学の三者間で、名古屋議定書や生物多様性条約等の関連法規を遵守した共同研究契約を締結し、これらのサンプルを日本に持ち帰り創薬シーズの探索源として利用できる体制を整えた。また、微生物由来の脂質代謝制御分子の探索を進め、新規化合物3種を含む23の化合物を単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インドネシアの生物多様性は世界3位と言われており、微生物を含む様々な未開拓天然資源が存在すると考えられる。東インドネシアの主要大学であるハサヌディン大学において、土壌から微生物を分離・保管し、それらの分離株を日本へ持ち帰り利用できる体制を整えられたことは、今後の天然物化学の発展に大いに寄与することが期待される。また、新規化合物を含む新たな脂質代謝制御剤を発見できたことから、これらをシードとした新たな医薬品開発への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Approximately 700 strains of fungi and actinomycetes were isolated from soil samples collected in various regions of Indonesia at Hasanuddin University. A joint research agreement was concluded between Hasanuddin University, the Indonesia Institute of Science, and Kitasato University, to establish the system of using Indonesian microbial samples in Japan to be used as a source of drug discovery seeds. In addition, we have been searching for lipid metabolism regulating molecules derived from microorganisms and isolated 23 compounds including 3 new compounds.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然資源 ライブラリ シード探索 創薬

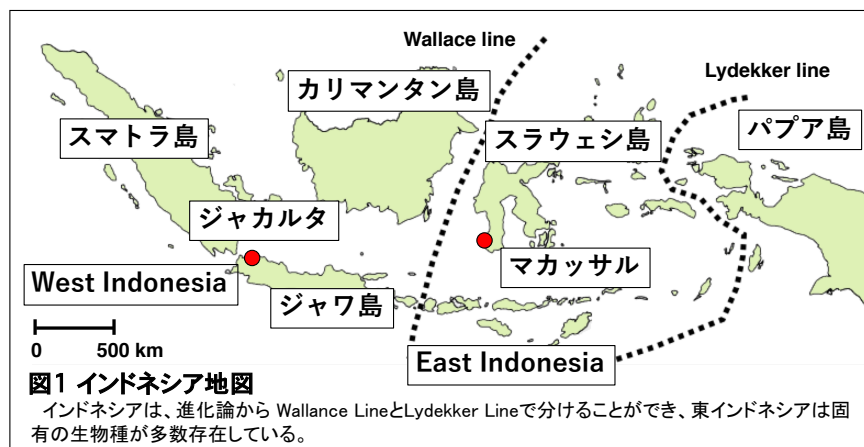
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「生物資源」の中でも細菌、ウイルス、真菌などの微生物は、未発見あるいは未利用なものが多く、開拓の余地を大きく残している。このような微生物は人智を超えた多様な構造を有する化合物を生産する能力を有しており、人類はこれまで抗生物質のみならず様々な医薬品の実用化という恩恵を受け、公衆衛生に大きく貢献してきた。一方、近年、ウイルスを含む病原微生物による新興/再興感染症が地球規模で発生し、大きな社会問題となっている。したがって、このような化合物生産能を有する微生物、病原微生物、そして、それら遺伝子を保存し、管理すること、さらに新しい微生物を開拓し保存/管理することは、今後の医療衛生（医薬品、ワクチン、診断薬や診断方法など）の向上に付随した産業の発展に寄与する。

インドネシアは、東西に 5,000 km 以上と非常に長くのびた世界最多の島々から構成される国で、生物の多様性は世界第 3 位と言われている（第 1 位はブラジル、第 2 位はコロンビア）。その中でも、スラウェシ島、カリマンタン島やパプア島などの東インドネシア地域は、スマトラ島、ジャワ島、バリ島、スンバ島やフロレス島などが連続する島々から外れた東北に位置し、島の成り立ちが全く異なる独自の進化を遂げてきたとされている（図 1）。また、この進化の過程は、インドネシアの南に位置するオーストラリア大陸とも異なる。実際、スラウェシ島は独自の希少な動植物、海洋生物が多数生息しており、依然として新種の齧歯類や昆虫類が発見されている。また、ハンセン病や結核、マラリアなどを含めた新興/再興感染症の罹患者は多く、その地域特有の風土病などもあり、その実態は依然として把握されていない。したがって、ウイルスや病原微生物を含めて、この地域に生息する微生物も多種多様かつ新規な固有種が存在すると考えられる。



2. 研究の目的

本研究では、東インドネシアに位置するハサヌディン大学と、インドネシアの拠点研究機関である LIPI (Indonesia Institute of Science, ジャカルタ。2021 年にインドネシア国立研究革新庁 (BRIN) と合併) の協力のもと、(1) 東インドネシア地域を含めた豊富で多様な天然/微生物資源を収集し、(2) その代謝産物を包括的に単離精製した化合物群からなるライブラリを構築する。また、(3) 東インドネシアで脅威となっている結核やハンセン病などの感染症について、環境中のこれら病原微生物やヒト患者サンプル（血液や粘液など）を収集し、病原微生物及びその遺伝子のライブラリを構築する。これらのライブラリを名古屋議定書に基づいて共有し、インドネシア特有の風土病を含めた感染症などの創薬シーズの発見や新しい診断方法、ワクチンの開発に発展させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 天然生物資源の収集と保管

東インドネシア地域を中心とした土壌、海洋生物、植物等から微生物（真菌および放線菌）を分離した。分離した菌は、締結した共同研究契約（後述）に基づき、オリジナルをハサヌディン大学に保管し、レプリカを北里大学に保管した。

(2) 天然化合物の収集と保管・創薬シーズの検索

様々な条件で培養した微生物の抽出液、または植物の抽出物を対象に、抗酸菌や真菌などに対する抗菌活性評価、中性脂質蓄積・分解に対する評価、シグナル伝達に着目した抗がん活性評価を行ない、感染症、脂質異常症、がんなどに対するリード化合物を検索した。活性が確認されたサンプルから、溶媒抽出および各種クロマトグラフィーによる精製を行い、活性化化合物を単離し、各種機器分析によりその構造を決定した。

(3) 病原微生物資源の収集と保管

スラウェシ島を中心に、ハンセン病発生地域の住民から鼻粘膜スワブサンプルおよび血清サンプルを採取した。

4. 研究成果

(1) 共同研究契約の締結

本研究を進めるにあたり、インドネシアから日本（北里大学）に微生物（菌株）などの生物資源/遺伝子資源を持ち込むために、共同研究先であるハサヌディン大学、LIPI と北里大学の三者間で、名古屋議定書や生物多様性条約等の関連法規を遵守した共同研究契約（LoA および MTA）を締結した（2019年10月2日）。これによって、ハサヌディン大学に保管したインドネシア土壌由来微生物やハンセン病サンプルを北里大学に持ち込むことが可能となった。しかし、この締結後、COVID-19によるパンデミックにより、フィールドワークを中心とする本研究は大きな影響を受けた（実際に、インドネシアに渡航を再開したのは2023年11月であった。）

本研究実施期間中のフィールドワークおよび打ち合わせ状況

2018年度：北里グループ 2回 インドネシア訪問

2019年度：北里グループ 1回 インドネシア訪問、ハサヌディン大学グループ 1回 来日

2020年度-2021年度（COVID-19のため渡航制限あり）：なし

2022年度（COVID-19のため渡航制限あり）：ハサヌディン大学グループ 1回 来日

2023年度：北里グループ 1回 インドネシア訪問、ハサヌディン大学グループ 1回 来日

(2) 微生物資源の収集と保管

スラウェシ島を中心に、インドネシアのさまざまな地域から土壌を収集した（Table 1）。まず、2018年12月に共同研究先であるハサヌディン大学とLIPIを訪問し、微生物資源の収集の方法について、講義および技術指導を行なった。そして、本研究実施期間中、さまざまな土地や環境から土壌を収集し、微生物を分離し、ハサヌディン大学において放線菌と真菌を約700株分離して保管した。次に2019年には、ハサヌディン大学で土壌から微生物を分離・培養を行うにあたり、ハサヌディン大学の研究者を招聘研究員（2名）として北里大学に招聘し、土壌からの微生物の分離培養方法の指導を行なった（2019年12月-2020年1月）。ハサヌディン大学に保管した微生物については、研究実施期間中に発生した新型コロナウイルス感染症の

Table 1. インドネシアにおける土壌収集場所と地域

Sampling Place	Location
Aralle	West Sulawesi
Barru	South Sulawesi
Bolmong	Central Sulawesi
Donggala	Central Sulawesi
Lindu	Central Sulawesi
Majene	West Sulawesi
Manado	North Sulawesi
Maroneng	South Sulawesi
North Bolmong	North Sulawesi
North Gorontalo	Gorontalo
Palu	Central Sulawesi
Pasangkayu	West Sulawesi
Petobo	Central Sulawesi
Tamalanrea	South Sulawesi
Tomohon	North Sulawesi
Unhas	South Sulawesi

影響により当初計画よりも大きく遅れたものの、2023年に微生物資源267株を北里大学へ持ち帰り、保管した。北里大学において様々な条件でこれらの微生物を培養し、その培養抽出液を創薬シーズの探索源として供給、保管した。なお、インドネシア産微生物については、植物防疫法の輸入禁止品（未同定微生物）に該当することから、植物防疫法に基づき農林水産大臣の許可を受けて輸入した。

(3) 天然化合物の収集と保管・創薬シーズの検索

インドネシアで分離、保管した微生物を日本へ持ち込むまでの間に、ハサヌディン大学からの留学生 (北里大学大学院薬学研究科博士課程) により、日本国内で分離した微生物、生薬および植物抽出物を用いて、天然化合物の収集・創薬シーズの検索を進めた。その結果、ステロール-O-アシル転移酵素 (SOAT) 阻害活性物質として、真菌 *Volutella citrinella* BF-0440 株の培養液から、3 つの新規テルペン化合物 terpendole N, terpendole O および terpendole P を含む 11 個の関連化合物を単離した (図 2) (発表論文 1: Nur Elyza, *et. al.*, *Molecules*, **25**, 3079, 2020)。また、白朮 (*Atractylodes rhizome*) 抽出物より SOAT 阻害活性物質としてテルペン化合物の atractylenolide III と、ポリアセチレン化合物である 14-acetoxy-12-seneciolyxotetradeca-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol および 14-acetoxy-12- α -methylbutyl-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol と 14-acetoxy-12- β -methylbutyl-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol の混合物を単離した (図 2) (発表論文 2: Nur Elyza, *et. al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 126997, 2020)。SOAT 阻害活性は 2 種類のアイソザイム (SOAT1 および SOAT2) をそれぞれ選択的に発現させた CHO-K1 細胞を用い、 $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸を添加した際に生成する細胞内 $[^{14}\text{C}]$ コレステリルエステル (CE) 量を定量することで評価した (Lada AT., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **45**, 378-386, 2004)。SOAT アイソザイムのうち、SOAT1 はがん (*Front. Oncol.*, **13**, 1197502, 2023) やアルツハイマー (*Future Med. Chem.*, **7**, 2451-2467, 2015) に、SOAT2 は高脂血症に関与する (*Nat. Med.*, **6**, 1341-1347, 2000) ことが報告されている。取得した化合物の多くは SOAT1 と SOAT2 どちらに対しても同程度の阻害活性を示したが、4 や 5 は SOAT2 選択的な阻害活性を示した (Table 2)。これらの化合物は高脂血症治療薬のリードとなる可能性が期待される。一方、化合物 8 は SOAT1 に対する選択性を示したことから、抗がん剤やアルツハイマー治療薬としての可能性が期待される。

Table 2. 取得した化合物の SOAT 阻害活性

化合物	IC ₅₀ (μM)	
	SOAT1	SOAT2
1	>14	>14
2	2.8	2.4
3	5.9	6.9
4	0.67	0.24
5	6.12	0.073
6	6.7	3.5
7	2.0	2.2
8	0.8	2.1
9	6.8	1.8
10	>18	>18
11	18.6	10.7
12	174.9	187.3
13	32.8	36.2
14/15	42.5	50.5

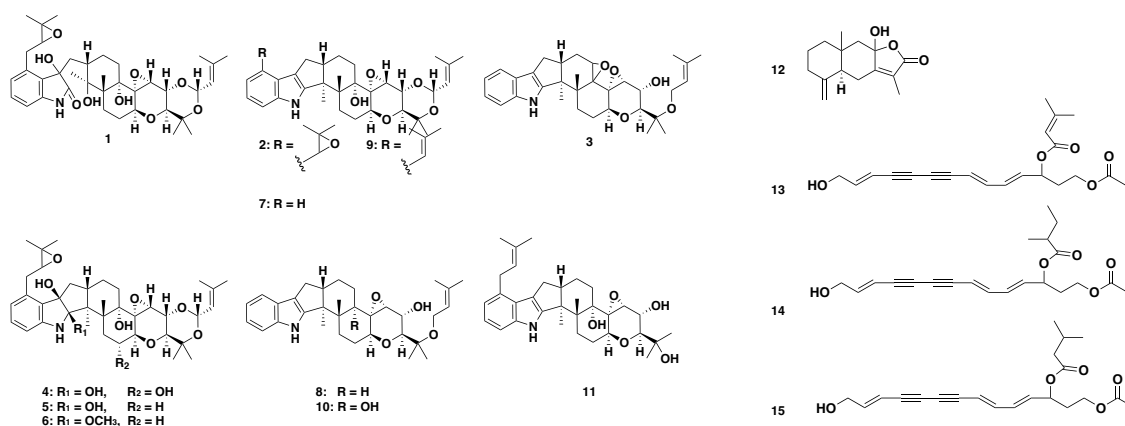


図 2. 取得した SOAT 阻害活性物質

Terpendole N (1), terpendole O (2), terpendole P (3), voluhemin A (4), voluhemin B (5), NK12838 (6), terpendole C (7), terpendole D (8), terpendole L (9), tolypocladin A (10), terpendole J (11), atractylenolide III (12), 14-acetoxy-12-seneciolyxotetradeca-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol (13), 14-acetoxy-12- α -methylbutyl-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol (14), and 14-acetoxy-12- β -methylbutyl-2E,8E,10E-trien-4,6-diyn-1-ol (15).

さらに、野生型 CHO-K1 細胞に [¹⁴C]オレイン酸を添加し、蓄積した細胞内中性脂質 ([¹⁴C]トリグリセリド (TG) および [¹⁴C]CE) の分解を評価する細胞評価系を構築し、細胞内中性脂質分解促進活性物質の探索を行なった。その結果、真菌の培養抽出液からラクトン化合物の brefeldin A, 環状デブシペプチド化合物の beauveriolide I, beauveriolide III, beauverolide A, beauverolide B および beauverolide K を、放線菌の培養抽出液からマクロライド化合物の oxohygroolidin および hygroolidin を単離した (図 3) (発表論文 3: Nur Elyza, *et. al.*, *Drug Discov. Ther.*, **16**, 273-279 (2022))。これらの化合物のうち、**23** は TG と CE の両方の分解を促進し、**16** は TG に対する選択的な分解促進活性、その他の化合物は CE に対する選択的な分解促進活性を示した (Table 3)。中性脂質分解を促進する化合物は肥満や脂質異常症の治療薬シーズとなることが期待される。TG や CE の分解に対して、両方を促進する化合物やどちらかに選択性を示す化合物など、異なるプロファイルを示す化合物が得られたことで、創薬シーズとしての可能性が広がることが期待される。

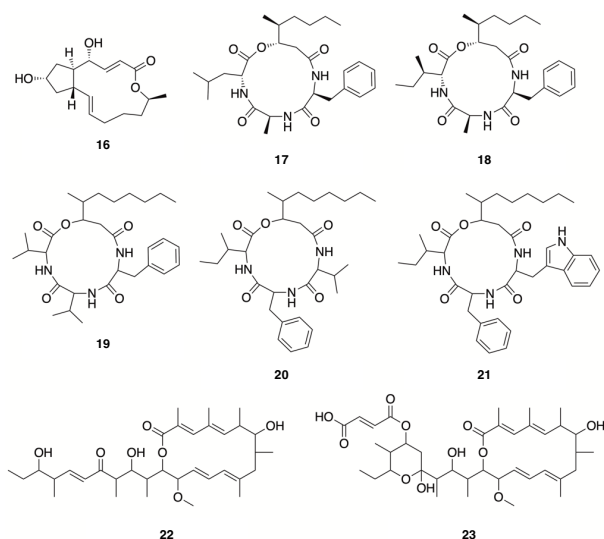


Table 3. 取得した化合物の細胞内中性脂質分解促進阻害活性

化合物	EC ₅₀ (μM)	
	[¹⁴ C]TG	[¹⁴ C]CE
16	2.6	>34
17	>2.0	0.02
18	>2.0	0.13
19	>1.8	0.10
20	>1.8	0.06
21	>1.5	0.02
22	>1.7	0.80
23	0.08	0.004

図 3. 取得した細胞内中性脂質分解促進活性物質

Brefeldin A (**16**), beauveriolide I (**17**), beauveriolide III (**18**), beauverolide A (**19**), beauverolide B (**20**), beauverolide K (**21**), oxohygroolidin (**22**), hygroolidin (**23**).

現在、(1) より供給されたインドネシアの微生物資源由来の培養液を、脂質異常症や脂肪性肝疾患などの生活習慣病、がん、感染症および骨代謝疾患に関する評価系 (10 種以上) を用いてスクリーニングを行なっている。

(4) 病原微生物資源の収集と保管

ハサヌディン大学グループとスラウエシ島西スラウエシ州ママサ周辺アラレ村で現地調査を行い、ハンセン病患者を含む住民の鼻粘膜スワブサンプルを 41 検体採取した。また、南スラウエシ州マカッサル周辺コディガレン地区の 20 名のハンセン病患者から血清および鼻粘膜スワブサンプルも採取した。採取したサンプルは日本に持ち帰り、保管している。血清については PGL-1 抗体検査を行うことで、ハンセン病を判定した。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nur Elyza Aiman Azizah, Kobayashi Keisuke, Ohte Satoshi, Tomoda Hiroshi, Ohshiro Taichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Screening for microbial potentiators of neutral lipid degradation in CHO-K1 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 273 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01087	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 -

1. 著者名 Nur Elyza Aiman Azizah, Kobayashi Keisuke, Amagai Ai, Ohshiro Taichi, Tomoda Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 New Terpendole Congeners, Inhibitors of Sterol O-Acyltransferase, Produced by <i>Volutella citrinella</i> BF-0440	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3079 ~ 3079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25133079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nur Elyza Aiman Azizah, Ohshiro Taichi, Kobayashi Keisuke, Wu Jing, Wahyudin Elly, Zhang Huiping, Hayashi Fumiaki, Kawagishi Hirokazu, Tomoda Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Inhibition of cholesteryl ester synthesis by polyacetylenes from <i>Atractylodes rhizome</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126997 ~ 126997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.126997	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Elyza Aiman Azizah Nur, Keisuke Kobayashi, Satoshi Ohte, Hiroshi Tomoda, and Taichi Ohshiro
2. 発表標題 Searching for Lipid Metabolism Regulators in Mammalian Cells from Microorganism
3. 学会等名 13th ISISM, 10th ISIBio, and 20th ACM meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nur Elyza, Keisuke Kobayashi, Hiroshi Tomoda, Taichi Ohshiro
2. 発表標題 Fungal drimane sesquiterpenoids from BF-1613 strain as sterol O-acyltransferase (SOAT) inhibitors
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nur Elyza, 小林 啓介, 供田 洋, 大城 太一
2. 発表標題 真菌 <i>Volutella citrinella</i> BF-0440 株が生産する新規 voluhemin 類と terpendole 類に関する研究
3. 学会等名 第12回AKPS北里化学シンポジウム (優秀ポスター賞)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Elyza Nur, 小林 啓介, 大城 太一, 供田 洋
2. 発表標題 真菌 <i>Volutella citrinella</i> BF-0440株が生産する新規テルペンドール類に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Tomoda
2. 発表標題 Discovery of anti-mycobacterial compounds from microorganisms
3. 学会等名 International Seminar on Bioscience and Drug Discovery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Elyza Aiman Azhiza Nur
2. 発表標題 真菌Volutella citrinella BF-0440株が生産する新規SOAT阻害剤に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Elyza Nur, Taichi Ohshiro, Jing Wu, Hirokazu Kawagishi, Hiroshi Tomoda
2. 発表標題 Inhibition of cholesteryl ester accumulation by polyacetylenes isolated from Atractylodes rhizome
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Tomoda
2. 発表標題 New Anti-Mycobacterial Compounds from Microorganisms.
3. 学会等名 BIT's 7th Annual World Congress of Infectious Diseases 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北里大学薬学部微生物薬品製造学教室HP https://www.kitasato-u.ac.jp/pharm/research/laboratory/laboratory-detail/?lab_pk=1669807811 北里大学薬学部 低・中分子創薬講座 http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/discovery/index.html 北里大学 海外国際交流協定校一覧 https://www.kitasato-u.ac.jp/jp/globalization/exchange/college.html</p>
--

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
研究分担者	大城 太一 (Ohshiro Taichi) (30458765)	北里大学・薬学部・講師 (32607)	2019年6月13日に削除 (2019年5月31日で講師時に名古屋大学へ異動)。
研究分担者	大手 聡 (Ohte Satoshi) (00547979)	北里大学・薬学部・講師 (32607)	
研究分担者	小林 啓介 (Kobayashi Keisuke) (80794734)	北里大学・薬学部・講師 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	インドネシア	ハサヌディン大学	インドネシア科学院