

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16392

研究課題名(和文) 酸性雲霧林及びアルカリ性湖由来微生物からの新規シデロフォアの探索と生合成の解明

研究課題名(英文) Discovery of novel siderophores from microbe in acidic mossy forest and basic lake and investigation of their biosynthesis

研究代表者

WONG CHINPIOW (WONG, CHINPIOW)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：10816226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マレーシア・ブリンチャンにある酸性雲霧林とマレーシア・ペナン州にあるケラカットビーチ湖の土壌から、57種類の放線菌及び好酸性グラム陰性桿菌を単離し、このうちの4種類が放線菌 *Streptomyces koyangensis*, *S. lavendulae*, *S. atratus* 及び *S. miharaensi* であること、及び1種類はプロテオバクテリア *Burkholderia rinojensis* であることを明らかにした。さらに、*S. miharaensi* 由来メタノール抽出液から生物活性成分の単離を試みた結果、強力な細胞毒性を示すことが報告されているエキノマイシンとFD-991を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

科学技術が格段に進歩した今日であっても、医薬品の60%は未だ天然物の化学構造由来である。多剤耐性株に有効な抗生物質の早期開発等が求められる現代にあって、未知の天然生物活性物質を見い出して創薬へと展開していくことは、医薬品開発を進めるうえで極めて重要な位置を占める。今回我々は、マレーシアの土壌由来微生物が生産する化合物を調査することで、マレーシア産微生物の中には、強力な細胞毒性を示すエキノマイシンとFD-991を生産するものがあることを明らかにした。さらなる調査により、これまでに例のない新たな創薬シードが得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Total of 57 actinomycetes and acidophilic Gram-negative bacilli were isolated from soils collected at the acidic mossy forest in Brinchang and the Keracut Beach lake in Penang, Malaysia. Among them, three were identified as actinomycetes, *Streptomyces koyangensis*, *S. lavendulae*, *S. atratu*, and *S. miharaensi* and the other was identified as a Proteobacteria, *Burkholderia rinojensis*. Further investigation of bioactive compounds in a methanol extract from *S. miharaensi* led to the isolation of echinomycin and FD-991, which have be reported to be strong cytotoxic natural compounds.

研究分野：天然物化学

キーワード：生物活性化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品シードの供給源には様々な生物があるが、それらの中でも、微生物は、医薬品シードの供給源として突出した生物である。例えば、微生物からは、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を有することで著名な真菌由来のピリピロペン等、医薬品シードとして有望な数多くの二次代謝産物が最近になっても報告され続けている。しかし、過酷な環境下における微生物は、温和な環境で育つ微生物とは一線を画す化合物を生産していると容易に推測されるものの、その多くは温和な生育環境下にある微生物から得られたものが主で、酸性やアルカリ性環境下で生育する微生物からの報告は極めて少ない。しかも、特殊な環境下で生育する微生物からの化学成分の報告は、酸性環境にある火山地域生息の好酸性微生物から得られたものが大半を占める。しかし、酸性環境にある地域は、火山地域のみならず、雲霧林もその環境にある。これらの雲霧林は、酸性環境にあっても高温多湿で生物多様性に富むことから、数多くの微生物が過酷な火山地域よりも生育していることが容易に推測される。また、過酷な環境としては、アルカリ性の湖等も挙げることができる。これらの厳しい環境下で生き抜くために、温和な環境下で生育する微生物とは一線を画す多種多様な未知の天然生物活性物質が、酸性やアルカリ性環境で生育する微生物には未だ眠っていることが大いに期待された。

2. 研究の目的

科学技術が格段に進歩した今日にあっても、医薬品の 60% は未だ天然物の化学構造由来である。多剤耐性株に有効な抗生物質の早期開発等が求められる現代にあっても、未知の天然生物活性物質を見出して創薬へと展開していくことは、医薬品開発を進めるうえで極めて重要な位置を占める。上述したように、酸性やアルカリ性環境下で生育する微生物の本格的化学成分調査により、医薬品シードとなり得る有用化合物の発掘が十分に可能である。そこで、本研究では、マレーシアの雲霧林プリンチャン及びモンゴルのアルカリ性を示すキャラガス湖とシャズガイ湖に生育する微生物から創薬シードとなり得る生物活性化合物を探索することを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) マレーシア・プリンチャンの土壌採集と土壌菌の分離

申請者と研究協力者 1 名がマレーシアに渡航し、マレーシア国際イスラム大学基礎歯科医学部 Solachuddin Jauhari Arief Ichwan 准教授の協力のもと、プリンチャンにある酸性雲霧林の 7 カ所から土壌を採集した。また、この際、マレーシア・ペナン州にあるケラカットビーチ湖の土壌も採集した。採集した 8 つの土壌試料は、研究試料として本邦に持ち帰り、これらの土壌からの放線菌及び好酸性グラム陰性桿菌の分離を行った。放線菌と好酸性グラム陰性桿菌の分離は常法に従って行い、培養は、キチン含有培地とフミン酸含有培地の 2 種類について行った。

(2) 単離した好酸性グラム陰性桿菌の種の同定

各菌体から 16s rRNA を常法にて抽出し、その遺伝子配列を解析することで種の同定を試みた。

(3) 生物活性評価

分離した菌体を、YMG 培地にて 25 °C で 14 日間培養後、培養液と菌体を遠心分離にて分離し、遠心して得た菌体からメタノールを用いて化合物を抽出した。次に、各々のメタノール抽出液について、(1) ヒト由来各種がん細胞(子宮頸がん細胞 HeLa、肺癌基底上皮腺がん細胞 A549、乳がん細胞 MCF-7) に対する細胞毒性試験、(2) グラム陽性菌 (*Bacillus subtilis* と *Streptomyces aureus*) とグラム陰性菌 (*Escherichia coli* と *Klebsiella pneumoniae*) に対する抗菌活性試験、(3) α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) と 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) にてメラニン色素の産生を誘導した B16-F10 マウス黒色細胞に対するメラニン産生抑制活性を評価した。これらの各生物活性評価は、常法に従って行った。

(4) *Streptomyces koyangensis* からの化合物の単離・構造決定

YMG 培地中で *S. koyangensis* を 25 °C で 14 日間培養し、培養液を遠心することで菌体を回収し、回収した菌体から酢酸エチルで化合物を抽出した。次いで、酢酸エチル抽出物を、シリカゲルクロマトグラフィーに供し、異なる比率のクロロホルムとメタノールを用いて、化合物を 23 画分に分画した。分画した 23 画分各々を LC-MS に供し、含有化合物を分析した後、各種カラムクロマトグラフィーを繰り返すことで、化合物の精製を試みた。

(5) *Streptomyces miharaensis* からの化合物の単離・構造決定

上記と同様にして酢酸エチル抽出物を調製し、LC-MS にて解析を行った。次いで、後述する培地の条件検討を行った後、各種カラムクロマトグラフィーを繰り返すことで、酢酸エチル抽出物からの化合物の単離・精製を試みた。化合物の化学構造の決定には、主として NMR を用いた。

4. 研究成果

(1) マレーシア・プリンチャン土壌からの土壌菌の分離と抽出物の生物活性評価

マレーシア・プリンチャンにて採集した8つの土壌試料から、土壌菌の分離を行った結果、57種類の放線菌及び好酸性グラム陰性桿菌を単離することができた。そこで、分離した57種類の菌体からメタノールを用いて化合物を抽出し、各々のメタノール抽出液について、生物活性を評価した。その結果、9種類のメタノール抽出液が評価したヒト由来がん細胞の全てに対して細胞毒性を示すことが明らかになった。そのうちの2種類のメタノール抽出液は中程度の細胞毒性を有した。一方、グラム陰性菌に対する抗菌活性は、57種類いずれのメタノール抽出液においても確認することはできなかったものの、細胞毒性が確認された3種類のメタノール抽出液のうち、2種類は、さらにグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示すことが判明した。また、それとは別に、1種類のメタノール抽出液がグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示すことが判明した。さらに、B16-F10 マウス黒色細胞に対するメラニン産生抑制活性試験においては、細胞毒性を示したメタノール抽出液1種が、細胞毒性に加えて、メラニン産生抑制活性をも有すること、及びそれらとは別の8種類のメタノール抽出液に B16-F10 マウス黒色細胞のメラニンの産生を抑制する効果のあることを見いだした。

(2) 単離した好酸性グラム陰性桿菌の種の同定

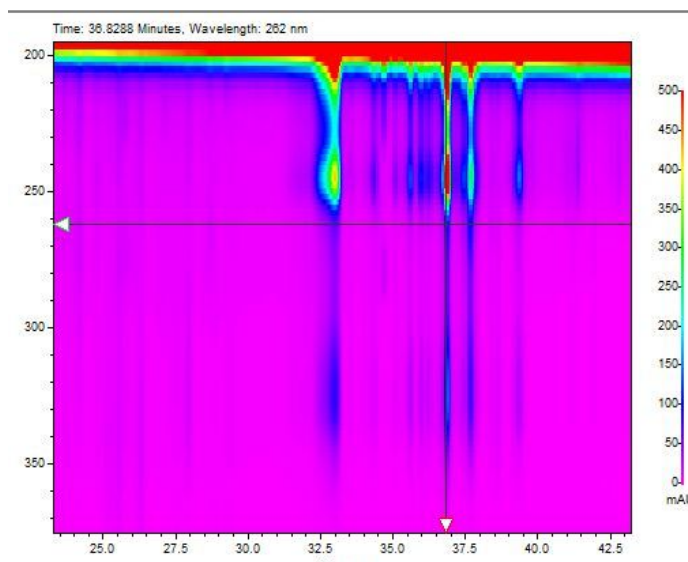
メタノール抽出液に活性のあることが確認された菌体について、16s rRNA の遺伝子配列を解析した結果、これらのうち、4種類は放線菌 *Streptomyces koyangensis*, *S. lavendulae*, *S. atratus* 及び *S. miharaensi* であること、1種類はプロテオバクテリア *Burkholderia rinojensis* であることが明らかになった。

(3) *S. koyangensis* からの化合物の単離・構造決定

同定した菌体のうち、*S. koyangensis*, *S. atratus* 及び *B. rinojensis* の化学成分については、これまでに報告が殆どない。特に、*S. koyangensis* の化学成分に関しては、これまでに2報の論文が公表されているのみである。また、*S. koyangensis* のメタノール抽出液は、抗菌活性及びメラニン産生抑制活性を有していることが確認された。そこで、YMG 培地中にて培養した *S. koyangensis* から、酢酸エチル抽出物を得、シリカゲルクロマトグラフィーを用いることで、化合物を23画分に分離した。23画分各々を LC-MS にて分析した結果、この23画分中には、これまで *S. koyangensis* から単離した化合物とは異なる分子量の化合物が含まれていることが明らかになった。そこで、さらに、各種カラムクロマトグラフィーを繰り返し、未知の分子量を示す化合物の精製を試みた。しかし、いずれの操作においてもこれらの化合物を高純度に精製することはできなかった。現在、化学修飾を施して誘導体化したこれらの化合物について精製を進めているところである。

(4) *S. miharaensi* からの化合物の単離・構造決定

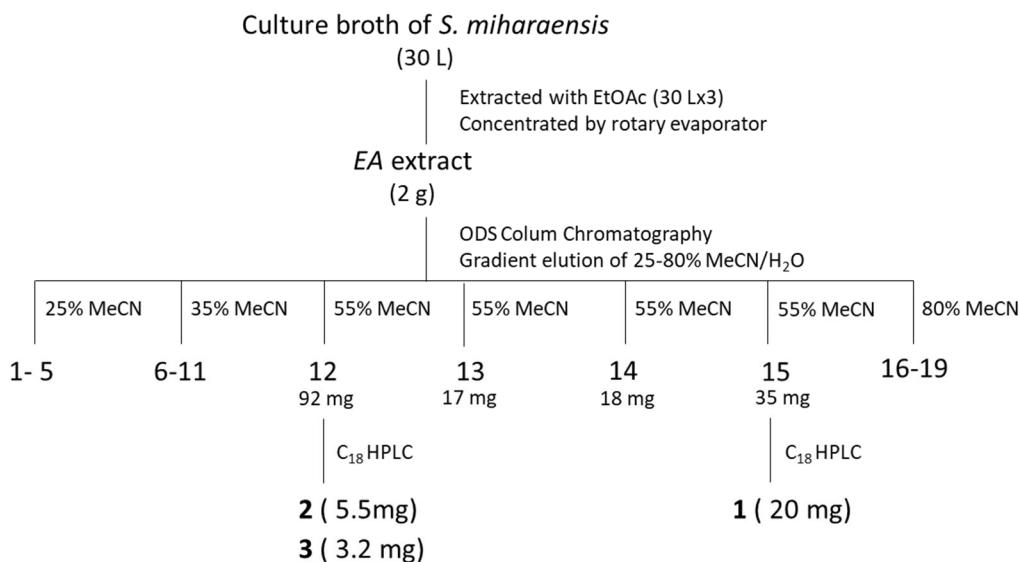
ヒト由来がん細胞の全てに対して中程度の細胞毒性を示した *S. miharaensi* 由来メタノール抽出液から活性成分の単離を試みた。本菌体から上記と同様にして調製した酢酸エチル抽出物について、LC-MS にて解析を行ったところ、本酢酸エチル抽出物には、分子量 1,000 程度かつ 243 nm と 321 nm に特徴的な吸収波長を有する中分子化合物が多数含まれていることが確認できた。



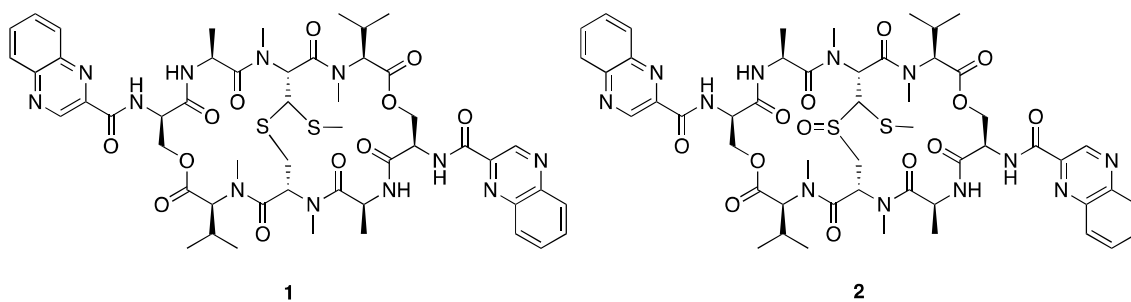
HPLC elution pattern of EtOAc extract of *Streptomyces* sp.

中分子化合物は、タンパク質-タンパク質相互作用を阻害する化合物として興味を持たれる。そこで、*Streptomyces* sp. を、(1) oatmeal, (2) M19, (3) SGG, (4) Medium A, (5) M400 培地にて 28 °C で 7 日間培養し、培地条件が上記中分子化合物の生産量に及ぼす効果について検討した。その結果、oatmeal 培地が最も生産量が高めることが判明した。

そこで、*Streptomyces* sp. を 30 L の oatmeal 培地 28 °C で 7 日間培養し、培養液から調製した酢酸エチル抽出物を逆相 HPLC に供し、アセトニトリル-水混液の濃度交配を用いて、19 画分に分画した。次に、細胞毒性を示した画分についてさらに HPLC を用いて化合物の精製を進めた結果、3 種の化合物 (1-3) を得ることができた。さらにこれら 3 種の化合物について NMR にて構造決定を行ったところ (Table 1 と 2), 化合物 1 と 2 は、それぞれ、強力な細胞毒性を示すことが報告されている既知環状ペプチド、エキノマイシン (1) と FD-991 (2) であることが判明した。さらに、化合物 3 については、1 と 2 の類縁体であることが明らかとなった。現在、この類縁体の化学構造について詳細な解析を進めている。



Isolation scheme from culture broth of *S. miharaensis*



Structures of **1** and **2** isolated from EtOAc extract of *Streptomyces* sp. culture broth

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
マレーシア	マレーシア国際イスラム大学			