

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：21401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23668

研究課題名(和文)キサントン含有地衣類をモデルとした化学コミュニケーション機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the chemical communication system in xanthone producing lichens

研究代表者

川上 寛子(Kawakami, Hiroko)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：70772359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：キサントン含有地衣類を構成する微生物群の次世代シーケンシングによる多様性解析と分離培養株ライブラリーの構築、分離培養株及び共培養株の一次代謝物と二次代謝物を網羅的解析を進めた。その結果、*Pertusaria laeviganda*と*P. glauca*由来の地衣菌と藻類を初めて分離培養した。これら地衣菌単独では元の地衣体で産生する化合物を生産しないことを確認した。一方、地衣菌と藻類を共培養した結果、目的化合物のキサントンは生産しないものの、元の地衣体に含まれるその他の化合物を数種生産した。本研究で地衣体内に存在する複数微生物間の化学コミュニケーションが二次代謝に重要であることを改めて示す知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独特な構造の化合物を生産する地衣類を対象として、体内の複数微生物間の化学コミュニケーションが二次代謝に重要であることを実証できた点は、地衣類学において非常に意義深い。また、本研究で構築した分離培養株ライブラリーでは強い抗酸化活性を有する化合物を生産する株も見出した。活性成分の化学構造を決定し、更には培養手法による大量生産が可能になれば、持続的に有用物質を生産でき、医薬化粧品素材の開発への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have researched about two topics that the diversity analysis by next generation sequencing (NGS) and tissue culture of micro-organisms composed in lichen natural thalli containing xanthenes and metabolomics of primary and secondary metabolites produced by single or co-cultured lichen mycobionts and photobionts. As the results, lichen mycobionts and photobionts were isolated from *Pertusaria laeviganda* and *P. glauca*. These single cultured strains did not produce any lichen substances originally in each mother lichen thalli. On the other hands, these co-cultured strains combined with each lichen mycobionts and photobionts produced some compounds corresponding with lichen substances contained in each mother lichen thalli excepted for targeted xanthenes.

In this study, we indicated that chemical communications between lichen mycobionts and other micro-organisms composed in lichen natural thalli are important for secondary metabolisms.

研究分野：植物工学

キーワード：地衣類 二次代謝 化学コミュニケーション キサントン

1. 研究開始当初の背景

地衣類の主要な構成生物は菌類(地衣菌)と藻類もしくはシアノバクテリアであるが、実際には酵母や地衣生菌、地衣内生菌と呼ばれる複数の微生物が体内に存在する共生生物である。地衣類が産生する二次代謝物(地衣成分)は様々な薬理活性を有しており、民間薬や香料、染料として古くから用いられてきた。これまで、地衣成分は主要な菌類が産生すると考えられていたが、最近では地衣体内の「化学コミュニケーション」が二次代謝に重要であることが示されている(図1)。例えば、酵母の存在下のみで地衣菌が二次代謝物を生産する例や、単一のシアノバクテリアだけでは産生しない二次代謝物が共生状態でのみ生産される例が報告されている(Calcott *et al.*, 2018)。しかし、地衣体内の化学コミュニケーション機構と二次代謝の関係は非常に重要な学問的問いでありながら、その詳細なメカニズムは解明されていない。

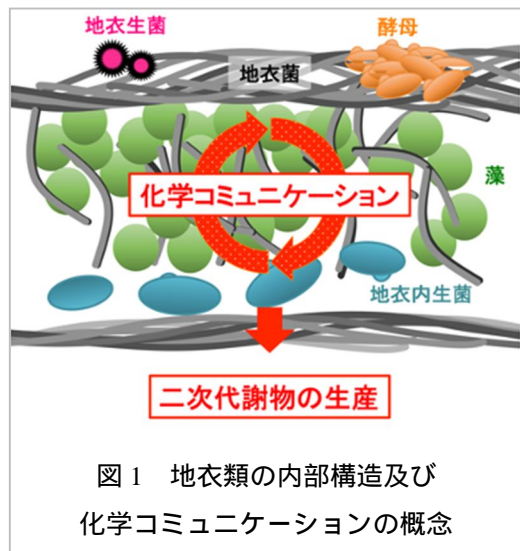


図1 地衣類の内部構造及び化学コミュニケーションの概念

これまで、*Pertusaria laeviganda* 由来地衣内生菌 PtsLa が強い抗酸化活性を示すノルリヘキサントン(NL)を産生することを報告した(Kawakami *et al.*, 2019)。しかし、共生状態下にある *P. laeviganda* 天然地衣体では NL を産生せず、NL に塩素が付加したチオパニン酸(TPA)が多量に検出された。この現象から、*P. laeviganda* 天然地衣体でも化学コミュニケーションを介した二次代謝が存在すると考えた。具体的には、内生菌 PtsLa では酢酸マロン酸経路を介して NL が生合成され、地衣菌や藻類などのその他構成微生物が持つ酵素によって NL がハロゲン化されて TPA が生合成されると仮説を立てた(図2)。この仮説の証明によって、地衣体内の化学コミュニケーション機構について有益な知見が得られる上、将来的には共生関係を利用した物質生産システムの構築への応用も期待できると考えられる。

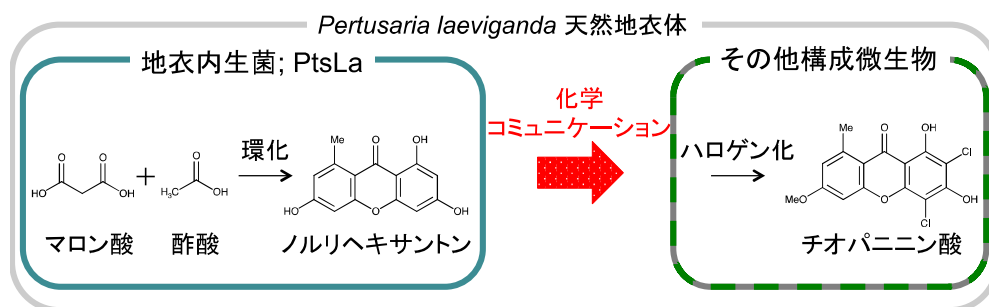


図2 *Pertusaria laeviganda* 天然地衣体内で行われる化学コミュニケーションに関する仮説

2. 研究の目的

本研究は「キサントン含有地衣類をモデルとした化学コミュニケーション機構の解明」を目的として、以下の小課題(1),(2)に取り組んだ。

- (1) キサントン含有地衣類を構成する微生物群の次世代シーケンシングによる網羅的解析及び分離培養株ライブラリーの構築
- (2) 分離培養株及び共培養株の一次代謝物と二次代謝物の網羅的解析

3. 研究の方法

(1) キサントン含有地衣類を構成する微生物群の次世代シーケシングによる網羅的解析及び分離培養株ライブラリーの構築

キサントン含有地衣類として *Pertusaria laeviganda* の他、*Pertusaria glauca*、*Pyxine endochrysin*、*Pyxine subcinerea* を材料として選抜した。まず、それぞれの地衣類に含まれる微生物の多様性を把握するために、次世代シーケンサー（MiSeq（Illumina 社））を用いて解析した。その後、構成微生物を分離培養するために、麦芽酵母培地（MY）、サブローデキストロース寒天培地（SDA）、ポテトデキストロース寒天培地（PDA）の斜面培地を作成し、山本法によって地衣類組織片を植え付け、18℃、明条件の培養室内で管理した。試験管培地で初期誘導した後、固体平板培地へ分離培養し、液体培地へスケールアップした後、増殖した培養株から DNA を抽出した。核リボソームの ITS 領域の塩基配列を決定し、得られた配列を用いて BLAST 検索によって同定した。

(2) 分離培養株及び共培養株の一次代謝物と二次代謝物の解析

まず、事前に分離培養していた内生菌 *PtsLa* と *P. laeviganda* 近縁種由来緑藻を共培養し、内生菌と藻類間の化学コミュニケーションに関するデータを収集した。液体培養した内生菌 *PtsLa*、*P. laeviganda* 近縁種由来緑藻及びそれらの共培養株を回収し、凍結乾燥した後、メタノールに一晩浸漬し、減圧濃縮し、粗抽出物を得た。その後、粗抽出物に含まれる一次代謝物と二次代謝物をそれぞれ分析した。一次代謝物の解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社へ委託し、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS, Agilent CE-TOFMS system（Agilent Technologies 社））によるメタボローム解析を実施した。二次代謝物の解析はエレクトロスプレーイオン化質量分析計高速液体クロマトグラフィー（LC-ESI-MS, TSQ Quantum Ultra mass spectrometer system（Thermo Fisher Scientific 社））を用いて実施し、NL 及び塩素が付加した TPA の他、元の天然地衣体に含まれる化合物を生産するのかが評価した。

次に、新たに分離培養に成功した *P. laeviganda* 及び *P. glauca* 由来地衣菌と 2 種の藻類（*Trebouxia* sp., *Coccomyxa* sp.）を共培養し、上記と同様の手法で粗抽出物を得た後、二次代謝物を解析した。

4. 研究成果

(1) キサントン含有地衣類を構成する微生物群の次世代シーケシングによる網羅的解析及び分離培養株ライブラリーの構築

次世代シーケシングによる網羅的解析微生物群の解析の結果、*Pertusaria* 属地衣類に比べ *Pyxine* 属地衣類に含まれる微生物は科レベルの分類において非常に多様性に富んでいた。本種の地衣類に対して網羅的に微生物群を解析した例は無く、生物学的にも価値のある知見が得られた。

組織培養の材料に用いた 4 種の地衣類から 150-200 個の培養物を得た後、分離培養が成功した 321 個の培養株を分離培養株ライブラリーとして維持管理するシステムを構築した。本ライブラリーには地衣菌、内生菌、藻類、バクテリアなどが含まれ、有用な生物資源である。*P. laeviganda* 及び *P. glauca* から主たる構成微生物である地衣菌と、共生パートナーとなる藻類として、*Trebouxia* sp., *Coccomyxa* sp. を本材料から初めて分離培養した。さらに、それぞれの微生物について液体培養によるスケールアップにも成功し、本研究の基盤となる実験系を

構築した。

Pyxine 属地衣類からは地衣菌が分離培養できなかった。*Pertusaria* 属地衣類と比較して非常に多様な微生物が含まれることから、地衣菌を分離培養できる確率が下がったためと予想される。

P. glauca からは非常に強い抗酸化活性成分を生産する *Cytospora* sp. を分離培養し、有用物質生産に応用可能な新たな生物資源を見出した。

(2) 分離培養株及び共培養株の一次代謝物と二次代謝物の解析

単独で培養した内生菌 *PtsLa*、緑藻及び共培養株の 3 検体の一次代謝物のメタボローム解析によって合計 291 個の代謝物が検出され、35 個の代謝物が共培養株で特異的に高生産された。二次代謝物の分析において、内生菌 *PtsLa* と共培養株間の NL 生産量に有意な差はなく、更には元の地衣体で産生する TPA などの化合物を含まないことを確認した。よって、共培養株で高生産された一次代謝物は直接的には NL 及び TPA の生産に関与しないことが示唆された。

P. laeviganda 及び *P. glauca* 由来培養地衣菌単独では NL や、元の地衣体で産生する TPA などの化合物を含まないことを確認した。一方、これら地衣菌と藻類を共培養した際には、単独で培養した場合は異なり、元の地衣体に含まれる数種の化合物を生産したが、TPA は生産しなかった。このことは地衣類が体内に存在する複数微生物間の化学コミュニケーションを介して様々な二次代謝物を産生している現象を証明する有益な証拠となった。これまで地衣菌を用いた共培養株の代謝物を網羅解析した例はなく、新規性が高い。

内生菌 *PtsLa* 及び *P. laeviganda* 及び *P. glauca* 由来培養地衣菌と藻類を用いたいずれの共培養系においても目的産物の TPA の生産には至らなかった。他の地衣類の例にもあったように、*Pertusaria* 属地衣類においても地衣菌と藻類の 2 者の主要な共生関係以外にその他の微生物を含む、より複雑な共生関係から生じる化学コミュニケーションが重要であることが示唆された。今後は分離培養した微生物が有する二次代謝に関する遺伝子を網羅解析し、キサントン生合成やハロゲン化に機能する遺伝子を有する分離培養株をスクリーニングした後に、共培養に用いることで、目的の二次代謝物である TPA の生産が可能になると期待できる。

< 引用文献 >

Calcott M. J., Ackerley D. F., Knight A., Keyzers R. A., & Owen J. G., Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 2018, 1730-1760

Kawakami H., Suzuki C., Yamaguchi H., Hara K., Komine M., & Yamamoto Y., Norlichexanthone produced by cultured endolichenic fungus induced from *Pertusaria laeviganda* and its antioxidant activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(6), 2019, 996-999

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川上 寛子、鈴木 千尋、松井 敏生、原 光二郎、小峰 正史、山本 好和
2. 発表標題 培養地衣菌及び地衣内生菌が産生する抗酸化活性成分の探索と同定
3. 学会等名 日本地衣学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 寛子、阿部 杏樹、原 光二郎、小峰 正史、福島 淳
2. 発表標題 緑膿菌のクオラムセンシングを抑制する地衣類の培養物由来成分の探索
3. 学会等名 日本地衣学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松淵 優子、野手 友貴、川上 寛子、原 光二郎、小峰 正史
2. 発表標題 地衣類由来培養物が産生する抗酸化成分の探索と分析
3. 学会等名 日本地衣学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野手 友貴、松淵 優子、バリシュ・ゴカルスン、川上 寛子、小峰 正史、原 光二郎
2. 発表標題 地衣類に内生する微生物群の培養と多様性解析
3. 学会等名 日本地衣学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公開講座 講師
県大・読売講座 - 県大20年の研究力で秋田の未来を読む、 - 第2講 生き物の機能を利用したモノづくり - 秋田で生まれ育った女の子が母校で研究者になって - ,
2021

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