

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15461

研究課題名(和文) 未研究希少放線菌の二次代謝能の解明を通じた新規植物生長制御物質の探索

研究課題名(英文) Search for novel plant growth regulators through elucidation of the secondary metabolic capacity of unexplored rare actinomycetes

研究代表者

齋藤 駿 (Saito, Shun)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教

研究者番号：20846117

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)：希少放線菌および耐熱性放線菌が生産する二次代謝物を解析した結果、合計17種の新規化合物を単離・構造決定した(ポリケチド、トリペプチド、不飽和脂肪酸、トリプトファン誘導体、アゾキシ含有化合物、等)。さらに、植物生理活性を評価した結果、植物病原菌への抗菌活性やイネ種子の生長促進もしくは生長阻害を示す、希少放線菌由来二次代謝物をいくつか同定するに至った。また、各種薬理活性を評価したところ、細胞毒性や抗菌活性のみならず、抗トリパノソーマ活性(シャーガス病原因原虫)、抗ウイルス活性(インフルエンザおよび新型コロナウイルス)、がん幹細胞選択的な抑制活性等の有望な生理機能を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、天然物からの新規化合物の発見は困難となってきたが、希少放線菌や耐熱性放線菌のような未研究微生物種の二次代謝物を精査することで、新規化合物の発見に結びつく可能性を示した。また、希少放線菌由来の二次代謝物の中には、種々の植物生理活性を示すものが存在していたため、今後詳細な解析を進めることで、放線菌-植物間の共生関係の理解だけでなく、農業用微生物資材への応用も期待される。耐熱性放線菌から発見した二次代謝物は、常温培養と比較して、高温培養特異的な生産もしくは増強する物質であった。今後はその生産制御や生理機能を解析することで、放線菌二次代謝物の生態的意義が明らかになることも期待される。

研究成果の概要(英文)：A total of 17 new compounds were isolated and structurally determined (polyketides, tripeptide, unsaturated fatty acids, tryptophan derivatives, azoxy-containing compound) by analyzing the secondary metabolites produced by rare actinomycetes and thermotolerant actinomycetes. Furthermore, we indicated that several rare actinomycete-derived secondary metabolites exhibit antibacterial activity against the plant pathogen and growth promotion or growth inhibition activities in rice seeds through evaluating plant physiological activities. On the other hand, when various pharmacological activities were evaluated, not only cytotoxicity and antibacterial activity, but also antitrypanosomal activity (Chagas disease causative protozoan), antiviral activity (influenza virus and corona virus), cancer stem cell selective suppressive activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：希少放線菌 二次代謝物 植物生長 植物病原菌 農業用資材 化学コミュニケーション 耐熱性放線菌 休眠遺伝子

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

近年、放線菌が生産する二次代謝物の中には、生物間のコミュニケーションを担うシグナル分子が存在することが報告され、生態的な意義を有する可能性が示唆されている。一方、近年のゲノム解析や *in silico* 解析技術の進展に伴い、放線菌二次代謝物の探索が迅速化・効率化したことで、放線菌の中には二次代謝能が未解明な「希少放線菌」種が数多く取り残されていることが明らかとなった。このような希少放線菌は、「植物」から分離された新属新種が多く存在し、土壌よりもその出現頻度が高く、希少放線菌と植物の間には生態的に意味があることが示唆される。しかし、*Streptomyces* 属放線菌と植物の相互作用は多く研究されているものの、植物生長を制御する希少放線菌やその二次代謝物についての報告はほとんどなかった。

2. 研究の目的

希少放線菌の中でも、形態分化を示し二次代謝の期待できるものは 17 科 158 属に及ぶが、約 7 割もの希少放線菌に二次代謝物の報告がない。しかし、ゲノムデータを調べると、未研究属種においても PKS や NRPS 等の生合成遺伝子が存在し、二次代謝能が期待された。一方、研究代表者の前所属研究室(富山県立大学)では、*Streptomyces* 属放線菌が生産する clethramycin や herbimycin 等の二次代謝物が、イネ幼苗の成長を促進することを示している。このことは、希少放線菌が生産する二次代謝物の中にも、植物生長を制御する物質が存在する可能性を示唆している。以上より本研究では、未研究希少放線菌の二次代謝能を明らかにし、植物生長制御物質を探索することで、放線菌-植物間の共生関係の理解、さらには農業用微生物資材へ応用することを目的としてきた。

3. 研究の方法

(1) 未研究希少放線菌の選抜

本研究の開始に先立ち、ドラフトゲノム配列が公開されている未研究希少放線菌 12 科 72 属を対象に二次代謝遺伝子の有無を「antiSMASH」により *in silico* 解析した。その結果、二次代謝物の報告がないにも関わらず、PKS や NRPS 等の二次代謝遺伝子クラスターを保有する属が多数存在することが明らかとなった。そこで本研究では、これまでに二次代謝物報告のない属の中から、1) PKS や NRPS 等の二次代謝遺伝子を多数保有する属、2) ゲノム情報が公開されておらず二次代謝能が全く不明な属、を選抜し、網羅的な二次代謝物解析を実施した。

(2) 耐熱性放線菌の選抜

一方、本研究の開始当初には対象としていなかったが、*in house* の放線菌ライブラリーから発見した「耐熱性放線菌」にも着目した。16S rRNA 解析の結果、耐熱性放線菌の大半は *Streptomyces* 属であったものの、二次代謝物研究はほとんど行われていなかったため希少な放線菌群であると考えた。そこで、常温培養では生産されず、高温培養特異的に生産される代謝物の解析を試みた。

(3) 植物生理活性

植物生長への影響は、研究代表者の前所属研究室が報告した「イネ種子発根試験」により評価した(霞田ら、植物化学調節学会第 37 回大会)。尚、植物ホルモンであるインドール酢酸は発根誘導を促進するため、ポジティブコントロールとして用いた。植物病原菌への抗菌活性は、根頭癌腫病菌 *Rhizobium radiobacter* NBRC14554 及びナス科枯病菌 *Ralstonia solanacearum* SUPP1541、炭疽病菌 *Glomerella cingulata* NBRC5907 を使用し評価した。

4. 研究成果

希少放線菌および耐熱性放線菌が生産する二次代謝物を解析した結果、合計 17 種の新規化合物を単離・構造決定した。さらに、各種植物生理活性や薬理活性を評価し、有望な生理機能を見出すに至っている(引用文献①—⑥)。

(1) 希少放線菌が生産する二次代謝物

本研究において、未研究希少放線菌が生産する二次代謝物を解析した結果、以下の希少放線菌 4 属から様々な新規化合物を発見した(図 1)。

- ・ *Pseudosporangium* 属 : Pseudosporamide, Pseudosporamicin A-C
- ・ *Couchioplanes* 属 : (2*E*,4*E*)-2,4-dimethyl-2,4-octadienoic acid, (2*E*,4*E*)-2,4,7-trimethyl-2,4-octadienoic acid, (*R*)-(-)-phialomustin B, (2*E*,4*E*)-7-hydroxy-2,4-dimethyl-2,4-octadienoic acid, (2*E*,4*E*)-7-hydroxy-2,4,7-trimethyl-2,4-octadienoic acid, 6-(3,3-dimethylallyl)-*N*-acetyl-L-tryptophan.
- ・ *Actinomycetospira* 属 : Mycetoindole
- ・ *Phytohabitans* 属 : Phytohabitol A-C

中でも、Pseudosporamide (*Pseudosporangium* 属) は、トリペプチド化合物であり、インドールとベンゼン環との間でビアリル結合により環化する珍しい構造を有していた。また、Phytohabitols 類 (*Phytohabitans* 属) は、 δ ラクトンを有する新規ポリケタイド化合物であった。一方、新規化合物の取得には至らなかったものの、未だ化合物報告のない *Goodfellowiella* 属からも種々の二次代謝物を取得した。

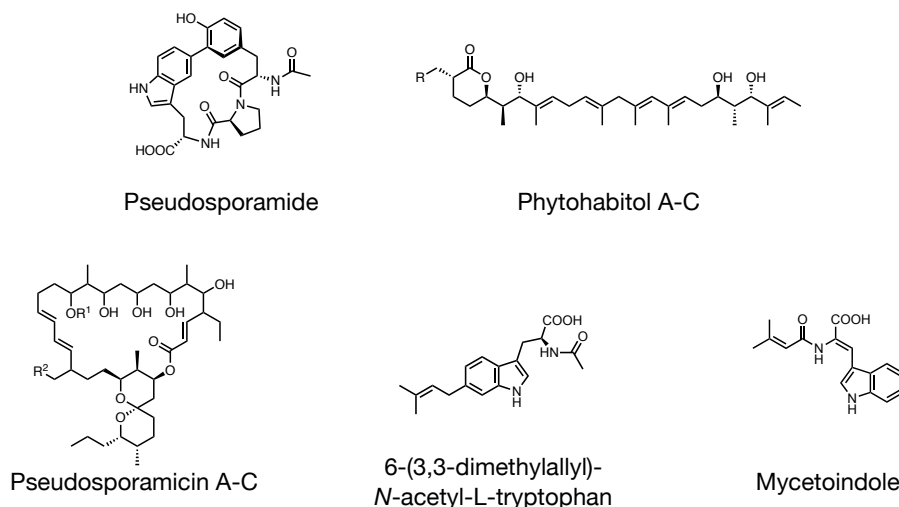


図 1. 希少放線菌から発見した二次代謝物

このうち、Pseudosporamicin A-C (*Pseudosporangium* 属) は植物病原菌である *Glomerella cingulata* に対して抗菌活性を示した。また、イネ種子発根試験により、6-(3,3-dimethylallyl)-N-acetyl-L-tryptophan (*Couchioplanes* 属) はイネ種子の生長促進、Mycetoindole (*Actinomycetospora* 属) は生長阻害活性を示すことを見出した。以上のように、植物に影響を与え得る希少放線菌由来二次代謝物をいくつか同定するに至った。一方、各種薬理活性評価も実施したところ、Phytohabitols A-C は、がん細胞の遊走阻害活性や抗トリパノソーマ活性を示すことが明らかとなった。

(2) 耐熱性放線菌が生産する二次代謝物

本研究において、耐熱性放線菌が生産する二次代謝物を解析した結果、*Streptomyces* 属ではあったものの、以下の耐熱性放線菌から様々な新規化合物を発見した (図 2)。

- *Streptomyces* sp. HR41 : Noaoxazole
- *Streptomyces* sp. JA74 : Dihydrmaniawamycin E, Streptolactam D

中でも、*Streptomyces* sp. HR41 が生産する Noaoxazole は、メチルオキサゾール構造を有する新規化合物であった。また、*Streptomyces* sp. JA74 が生産する Dihydrmaniawamycin E も、アゾキシ構造を有する新規化合物であった。Streptolactam D は、既知物質である Streptolactam B の幾何異性体であったものの、未だに報告例の少ない、マクロラクタム中に 6-4 員環構造を有する珍しい化合物であった。

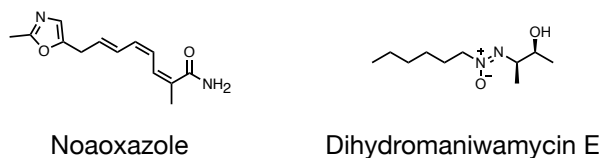


図 2. 耐熱性放線菌から発見した二次代謝物

このうち、Noaoxazole については植物生理活性を評価したものの、顕著な活性は見られなかったが、各種薬理活性評価により、Notch シグナル活性化作用を見出した。Notch シグナルの活性化は、一部の Notch 不活性化型がんに対して薬理活性を示す可能性を秘めている。また、Dihydrmaniawamycin E については、抗ウイルス活性 (インフルエンザおよび新型コロナウイルス) やがん幹細胞選択的な抑制活性等の有望な薬理活性を有することがわかった。アゾキシ構造を有する天然物については生物活性の報告例が少ないため、新たな作用機構を有することが期待される。

<引用文献>

- ① Saito, S.; Funayama, K.; Kato, W.; Okuda, M.; Kawamoto, M.; Matsubara, T.; Sato, T.; Sato, A.; Otsuguro, S.; Sasaki, M.; Orba, Y.; Sawa, H.; Maenaka, K.; Shindo, K.; Imoto, M.; Arai, M. A. “Dihydromaniwamycin E, a Heat-Shock Metabolite from Thermotolerant *Streptomyces* sp. JA74, Exhibiting Antiviral Activity against Influenza and SARS-CoV-2 Viruses” *J. Nat. Prod.* **2022**, *85*, 2583-2591.
- ② Saito, S.; Suzuki, S.; Arai, M. A. “Noaoxazole, a new heat shock metabolite produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. HR41” *J. Antibiot.* **2022**, *75*, 509-513.
- ③ Saito, S.; Xiaohanyao, Y.; Zhou, T.; Nakajima-Shimada, J.; Tashiro, E.; Triningsih, D. W.; Harunari, E.; Oku, N.; Igarashi, Y. “Phytohabitols A-C, δ -Lactone-Terminated Polyketides from an Actinomycete of the Genus *Phytohabitans*” *J. Nat. Prod.* **2022**, *85*, 1697-1703.
- ④ Saito, S.; Oku, N.; Igarashi, Y. “Mycetoindole, an *N*-acyl dehydrotryptophan with plant growth inhibitory activity from an actinomycete of the genus *Actinomycetospora*” *J. Antibiot.* **2022**, *75*, 44-47.
- ⑤ Saito, S.; Indo, K.; Oku, N.; Komaki, H.; Kawasaki, M.; Igarashi, Y. “Unsaturated fatty acids and a prenylated tryptophan derivative from a rare actinomycete of the genus *Couchioplanes*” *Beilstein J. Org. Chem.* **2021**, *17*, 2939-2949.
- ⑥ Saito, S.; Atsumi, K.; Zhou, T.; Fukaya, K.; Urabe, D.; Oku, N.; Karim, M. R. U.; Komaki, H.; Igarashi, Y. “A cyclopeptide and three oligomycin-class polyketides produced by an underexplored actinomycete of the genus *Pseudosporangium*” *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, *16*, 1100-1110.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Shun, Xiaohanyao Ye, Zhou Tao, Nakajima-Shimada Junko, Tashiro Etsu, Triningsih Desy Wulan, Harunari Enjuro, Oku Naoya, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Phytohabitols A-C, γ -Lactone-Terminated Polyketides from an Actinomycete of the Genus <i>Phytohabitans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1697 ~ 1703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00137	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 Saito Shun, Suzuki Shiina, Arai Midori A.	4. 巻 75
2. 論文標題 Noaoxazole, a new heat shock metabolite produced by thermotolerant <i>Streptomyces</i> sp. HR41	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 509 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-022-00551-5	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 Saito Shun, Funayama Kayo, Kato Wataru, Okuda Mayu, Kawamoto Meiko, Matsubara Teruhiko, Sato Toshinori, Sato Akihiko, Otsuguro Satoko, Sasaki Michihito, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Maenaka Katsumi, Shindo Kazutoshi, Imoto Masaya, Arai Midori A.	4. 巻 85
2. 論文標題 Dihydromaniwamycin E, a Heat-Shock Metabolite from Thermotolerant <i>Streptomyces</i> sp. JA74, Exhibiting Antiviral Activity against Influenza and SARS-CoV-2 Viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2583 ~ 2591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00550	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 Saito Shun, Indo Kanji, Oku Naoya, Komaki Hisayuki, Kawasaki Masashi, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Unsaturated fatty acids and a prenylated tryptophan derivative from a rare actinomycete of the genus <i>Couchioplanes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Beilstein Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2939 ~ 2949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3762/bjoc.17.203	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 Saito Shun, Oku Naoya, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Mycetoindole, an N-acyl dehydrotryptophan with plant growth inhibitory activity from an actinomycete of the genus Actinomycetospora	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 44 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00474-7	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 Shun Saito, Kota Atsumi, Tao Zhou, Keisuke Fukaya, Daisuke Urabe, Naoya Oku, Md Rokon Ul Karim, Hisayuki Komaki, Yasuhiro Igarashi	4. 巻 16
2. 論文標題 A cyclopeptide and three oligomycin-class polyketides produced by an underexplored actinomycete of the genus Pseudosporangium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Beilstein J Org Chem	6. 最初と最後の頁 1100-1110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3762/bjoc.16.97	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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 奥村 薫里香
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株が生産する熱ショック代謝物 (HSM) の単離・構造決定および耐熱性に与える影響
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 駿
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株が生産する熱ショック代謝物 (HSM) Maniwamycin 類の単離・構造決定および生物活性
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 駿
2. 発表標題 放線菌が生産する熱ショック代謝物 (HSM) の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井澤 ののは
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株が生産する熱ショック代謝物maniwamycin類の単離・構造決定および生物活性評価
3. 学会等名 2022年度 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村 薫里香
2. 発表標題 耐熱性放線菌HN66およびJA74株が生産する熱ショック代謝物 (HSM) の単離・構造決定および耐熱性促進活性評価
3. 学会等名 2022年度 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 駿
2. 発表標題 耐熱性放線菌AY2株が生産する熱ショック代謝物 (HSM) の生産制御機構解析
3. 学会等名 2022年度 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 駿
2. 発表標題 Chemical biology of heat shock metabolites (HSM) produced by Streptomyces species
3. 学会等名 Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井澤 ののは
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株が生産する熱ショック代謝物maniwamycin類のがん幹細胞選択的抑制活性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥村 薫里香
2. 発表標題 耐熱性放線菌HN66およびJA74株が生産する熱ショック代謝物 (HSM) の単離・構造決定および耐熱性促進活性評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船山 佳世
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株の熱ショック法による休眠遺伝子活性化
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 駿
2. 発表標題 希少放線菌Couchioplanes属が生産する二次代謝物の解析研究
3. 学会等名 第35回日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船山 佳世
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株が生産する熱ショック代謝物maniwamycin類の全合成及び生物活性評価
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 齋藤 駿
2. 発表標題 放線菌が生産する熱ショック代謝物のケミカルバイオロジー
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船山佳世
2. 発表標題 耐熱性放線菌JA74株が生産する熱ショック代謝物 (HSM) に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------