

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651212

研究課題名（和文） エピジェネティックな化学修飾酵素阻害剤を用いた新規有用物質の創出

研究課題名（英文） Search for novel natural products using chemical inhibitors modifying epigenetics

研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA YOSHITERU)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：00111302

研究成果の概要（和文）：エピジェネティックな遺伝子発現に関与する酵素である HDAC や DNA メチル化酵素を阻害する低分子物質を用いて、昆虫寄生糸状菌、植物内生糸状菌、*Chaetomium* 属糸状菌を培養することにより新たな二次代謝物を創出した。本法は、糸状菌に潜在する二次代謝物生産に関係する未利用生合成遺伝子を発現させ、多様性に富む新規天然物を創生するための新たな手法であることを示した。加えて、新規医薬品リードの探索源としての天然物ライブラリーを拡充することができた。

研究成果の概要（英文）：Epigenetic manipulation of fungal gene expression using HDAC and DNA methyltransferase inhibitors indeed seems to be an effective method for accessing natural products obtained from cryptic biosynthetic pathways. We applied the inhibitors to our natural product exploration from fungal cultures. Thus, we have demonstrated that the method is definitely efficient to enhance the fungal secondary metabolite productions and discover novel natural products.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：糸状菌、二次代謝物、エピジェネティクス、酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

最近、ヒストンや DNA のアセチル化やメチル化などのエピジェネティックな化学修飾が二次代謝物の生産に大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた。例えば、ヒストンに数多くのアセチル基が存在すると転写活性型クロマチン構造をとり遺伝子発現が上昇し、二次代謝物が生産される。実際、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を添加して培養した糸状菌では二次代謝物生合成遺伝子の発現が上昇し、既に網羅的な成分研究がなされていた菌種から数種の新規化合物が単離されている。ヒストンのアセチル化と同様に、DNA のメチル化も遺伝子発

現に関与していることが明らかになっている。われわれは、HDAC 阻害剤および DNA メチル化酵素阻害剤を添加して数種の糸状菌を培養し、生産される二次代謝物を解析して、いずれの菌も非添加時では見られなかった多くの二次代謝物を確認した。

2. 研究の目的

様々な HDAC 阻害剤や DNA メチル化酵素阻害剤を用いて、糸状菌のクロマチン構造を変化させ未利用生合成遺伝子を発現させて、創薬に有用な新規天然物を創出する。

3. 研究の方法

(1) 各種阻害剤の最適条件の設定

エピジェネティックな化学修飾酵素阻害剤(図1)の有効濃度および使用方法を検討し、二次代謝物の組成変化を指標に最適条件を設定した。各々の最適条件を設定後、阻害剤のコンビネーションによる有効性についても検討した。

(2) 昆虫寄生糸状菌からの新規物質の探索

HDAC 阻害剤、DNA メチル化阻害剤添加条件下で様々な昆虫寄生糸状菌を培養した。その後、酵素阻害剤添加で二次代謝物に顕著な変化が認められた糸状菌の菌体、培養液に含まれる成分を単離した。

(3) 植物内生菌からの新規物質の探索

東北大学大学院薬学研究科附属薬用植物園において栽培されている薬用植物からそこに含まれる内生菌を分離し、培養した。その後、(2)と同様な方法で、植物内生菌に含まれる成分を単離した。

(4) *Chaetomium* 属糸状菌からの新規物質の探索

特徴ある化学構造や生物活性をもつ有用化合物が知られている *Chaetomium* 属糸状菌について(2)と同様な方法で含有成分を単離した。

4. 研究成果

(1) 昆虫寄生糸状菌からの新規物質の探索

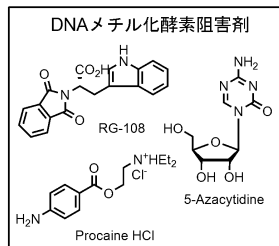
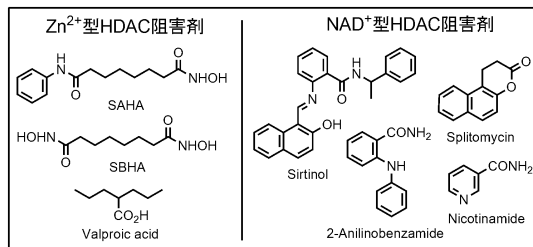


図1 酵素阻害剤

昆虫寄生糸状菌にHDAC 阻害剤 (Zn²⁺型HDAC 阻害剤: suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), suberoyl hydroxamic acid (SBHA), valproic acid; NAD⁺依存型HDAC 阻害剤: nicotinamide, 2-anilinobenzamide, sirtinol, splitomycin)、DNAメチル化阻害剤 (RG-108, 5-azacytidine, procaine) を添加して培養した。培養条件に関しては、次の項目を検討した。培地としてYM、SDY、PDB、CDPYの4種類

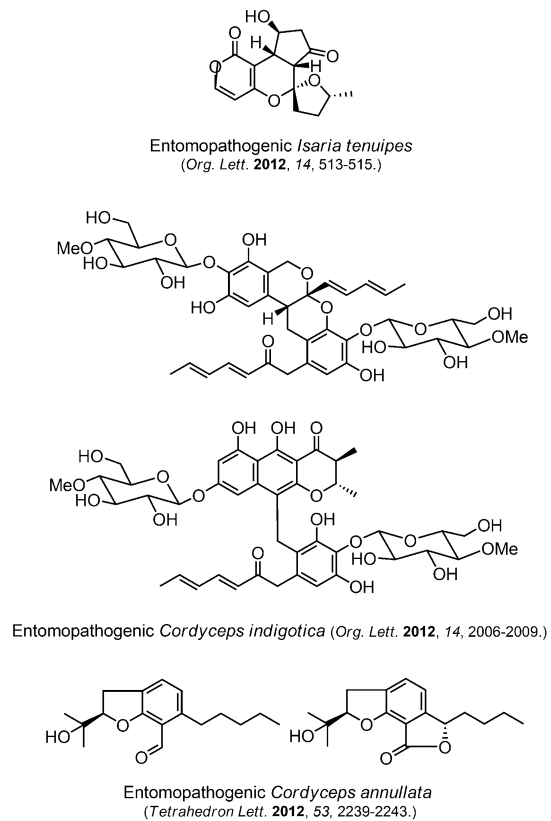


図2 昆虫寄生菌成分(1)

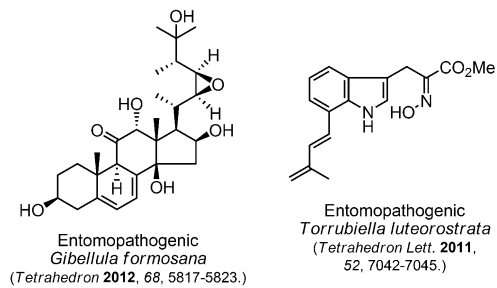


図3 昆虫寄生菌成分(2)

を用いた。液体培地、固形培地、半固形培地による二次代謝物の変化を確認した。酵素阻害剤の添加方法(単一の阻害剤・複数の阻害剤の同時添加、添加時期、回数、濃度)による二次代謝物の生産への影響を検討した。

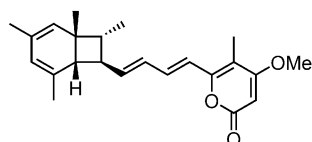
その結果、HDAC 阻害剤であるSBHA 500 μM、1 mM 添加、あるいはSBHAとDNAメチル化阻害剤RG-108の同時添加による *Torrubiella luteoestrata*、*Cordyceps indigotica*、*Cordyceps annullata*、*Gibellula formosana*、*Isaria tenuipes*の培養培地には、無添加による培養に比べて多様な二次代謝物が生産されたことが明らかになった。

得られた二次代謝物の構造は、NMR等の機器分析データおよび化学変換反応などにより決定した。その結果、数多くの新規化合物が存在することが明らかとなった(図2、3)。

それらの多くはポリケチドに属する構造を有しているが、新規なステロイドやトリプトファン類縁体も含まれる。

(2) 植物内生菌からの新規物質の探索

本研究科附属薬用植物園で栽培されているニチニチソウから *Penicillium* 属糸状菌を分離し、培養した。その結果、培養液から、カビ毒ポロケチド(citreoviridin)に加え、その生合成前駆体である新たな α -ピロン環をもつ二次代謝物を単離した(図4)。



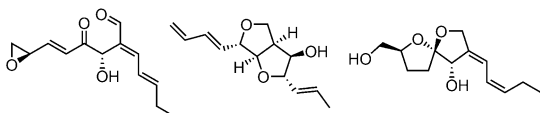
Endophytic *Penicillium* sp.
(*Org. Lett.* 2013, 15, 1020-1023.)

図4 植物内生菌成分

(3) *Chaetomium* 属糸状菌からの新規物質の探索

Chaetomium 属糸状菌は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌とともに、有用化合物を生産することが知られている。そこで、*Chaetomium mollipilium* を HDAC 阻害剤存在下培養し、その培養液から炭素数 13 個の脂環式ポリケチドを単離した(図5)。

本研究により、糸状菌に潜在する二次代謝物生産に関係する未利用生合成遺伝子をエ



Chaetomium mollipilium (*Org. Lett.* 2012, 14, 5456-5459.)

図5 *Chaetomium* 属糸状菌成分

ピジェネティックに発現させ、構造多様性に富む新規天然物を創生した。その結果、新規医薬品リードの探索源としての天然物ライブラリーを拡充することができた。本法を様々な真核生物に適応することにより、

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Teigo Asai, Dan Luo, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Structures and Biomimetic Synthesis of Polyketides of an Endophytic *Penicillium* sp. of *Cataranthus roseus*, *Org. Lett.*, 15, 1020-1023 (2013). 査読有
DOI: 10.1021/o1303506t
- ② 糸状菌二次代謝のエピジェネティック制御と天然物探索(解説), 浅井禎吾、大島

吉輝, 化学と生物, Vol.51, No.1, pp.13-21 (日本農芸化学会編集・発行, 国際文献社刊行, 2013). 査読無

- ③ Teigo Asai, Takashi Yamamoto, Yu-Ming Chung, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Aromatic Polyketide Glycosides from an Entomopathogenic Fungus, *Cordyceps indigotica*, *Tetrahedron Lett.*, 53, 277-280 (2012). 査読有
DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.10.013
- ④ Teigo Asai, Yu-Ming Chung, Hiroaki Sakurai, Tomoji Ozeki, Fang-Rong Chang, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Tenuipyronone, a Novel Skeletal Polyketide from the Entomopathogenic Fungus, *Isaria tenuipes*, Cultivated in the Presence of Epigenetic Modifiers, *Org. Lett.*, 14, 513-515 (2012). 査読有
DOI: 10.1021/o1203097b
- ⑤ Teigo Asai, Dan Luo, Yutaro Obara, Toru Taniguchi, Kenji Monde, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Dihydrobenzofurans as Cannabinoid Receptor Ligands, from *Cordyceps annullata*, an Entomopathogenic Fungus, Cultivated in the Presence of HDAC Inhibitor, *Tetrahedron Lett.*, 53, 2239-2243 (2012). 査読有
DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.02.088
- ⑥ Teigo Asai, Takashi Yamamoto, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Aromatic Polyketide Production in *Cordyceps indigotica*, an Entomopathogenic Fungus, Induced by Exposure to a Histone Deacetylase Inhibitor, *Org. Lett.*, 14, 2006-2009 (2012). 査読有
DOI: 10.1021/o13005062
- ⑦ Teigo Asai, Yu-Ming Chung, Hiroaki Sakurai, Tomoji Ozeki, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Highly Oxidized Ergosterols and Isariotin Analogs, from an Entomopathogenic Fungus, *Gibellula formosana*, Cultivated in the Presence of Epigenetic Modifying Agents, *Tetrahedron*, 68, 5817-5823 (2012). 査読有
DOI: 10.1016/j.tet.2012.05.020
- ⑧ Teigo Asai, Shuntaro Morita, Naoki Shirata, Tohru Taniguchi, Kenji Monde, Hiroaki Sakurai, Tomoji Ozeki and Yoshiteru Oshima, Structural Diversity of New C₁₃-Polyketides Produced by *Chaetomium mollipilium* Cultivated in the Presence of NAD⁺-Dependent Histone

Deacetylase Inhibitor, Org. Lett., 14, 5456-5459 (2012). 査読有
DOI: 10.1021/ol302539s

- ⑨ Teigo Asai, Takashi Yamamoto and Yoshiteru Oshima, Histone Deacetylase Inhibitor Induced the Production of Three Novel Prenylated Tryptophan Analogs in the Entomopathogenic Fungus, *Torrubiella luteoestrata*, Tetrahedron Lett., 52, 7042-7045 (2011). 査読有
DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.10.020

〔学会発表〕(計15件)

- ① 山本崇史, 浅井禎吾, 谷口透, 門出健次, 山下幸和, 大島吉輝, HDAC 阻害剤を用いた多様な糸状菌ポリケチド類の創出 - *Chaetomium indicum* 由来スピロラクトン型新規ポリケチド類の単離構造決定, 日本薬学会第133年会, 2013年3月27-30日, 横浜.
- ② 森田峻太郎, 浅井禎吾, 谷口透, 門出健次, 櫻井博章, 尾関智二, 山下幸和, 大島吉輝, 糸状菌二次代謝を活性化する NAD⁺依存型 HDAC 阻害剤の探索とそれを用いた新規天然物の創出, 日本薬学会第133年会, 2013年3月27-30日, 横浜.
- ③ 白田直樹, 浅井禎吾, 大島吉輝, *Chaetomium indicum* が生産する新規ポリケチドの生合成遺伝子の同定および HDAC 阻害剤を用いた発現制御に関する研究, 第51回日本薬学会東北支部大会, 2012年10月7日, 青森.
- ④ 森田峻太郎, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝, NAD⁺依存型 HDAC 阻害剤を用いた新規ポリケチドの創出, 第51回日本薬学会東北支部大会, 2012年10月7日, 青森.
- ⑤ 浅井禎吾, 山本崇史, 森田峻太郎, 白田直樹, 大島吉輝, エピジェネティクスを制御する化学修飾酵素阻害剤を用いた多様な糸状菌ポリケチドの創出, 第54回天然有機化合物討論会, 2012年9月18-20日, 東京.
- ⑥ 浅井禎吾, Chung Yu-Ming, 櫻井博章, 尾関智二, 山下幸和, 大島吉輝, エピジェネティック制御を利用した新規有用物質の探索; 昆虫寄生糸状菌 *Isaria tenuipes* 由来新規四環式ポリケチド tenuipyron の単離構造決定, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日, 札幌.
- ⑦ 山本崇史, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝, HDAC 阻害剤を用いた昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps indigotica* および植物内生糸状菌 *Chaetomium indicum* 由来新規芳香族ポリケチドの創出, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日, 札幌.
- ⑧ 羅丹, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝, エピジェネティック制御を利用した新規有

用物質の探索; 昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps annullata* の生産する新規ジヒドロベンゾフラン類の構造と CB 受容体アゴニスト活性, 日本薬学会第132年会, 2012年3月28-31日, 札幌.

- ⑨ 大島吉輝, 未利用遺伝子のエピジェネティックな発現制御を介する糸状菌二次代謝物の創出, 日本薬学会第132年会シンポジウム (天然物化学の新しい潮流), 2012年3月29日, 札幌.
- ⑩ 大島吉輝, 未利用遺伝子のエピジェネティックな発現制御を介する糸状菌二次代謝物の創出, 第36回理化学研究所「ケミカルバイオロジー研究領域」勉強会, 2012年2月21日, 和光.
- ⑪ 羅丹, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝, HDAC 阻害剤を利用した昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps annullata* 由来新規ジヒドロベンゾフラン類の単離構造決定, 第50回日本薬学会東北支部大会, 2011年10月30日, 仙台.
- ⑫ 山本崇史, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝, エピジェネティックな酵素阻害剤を利用した昆虫寄生糸状菌 *Cordyceps indigotica* 由来新規芳香族ポリケチド類の単離構造決定, 第50回日本薬学会東北支部大会, 2011年10月30日, 仙台.
- ⑬ 浅井禎吾, 山本崇史, Chung Yu-Ming, 羅丹, 森田峻太郎, 白田直樹, 山下幸和, 大島吉輝, エピジェネティック制御に基づく新規二次代謝物の創出, 第53回天然有機化合物討論会, 2011年9月27-29日, 大阪.
- ⑭ 浅井禎吾, 山本崇史, 鐘ユーミン, 森田峻太郎, 羅丹, 山下幸和, 大島吉輝, 低分子阻害剤を用いたエピジェネティック制御に基づく糸状菌由来新規二次代謝物の探索, 第9回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2011年5月27-28日, 東京.
- ⑮ 浅井禎吾, 山本崇史, 鐘ユーミン, 森田峻太郎, 羅丹, 山下幸和, 大島吉輝, エピジェネティックな遺伝子発現制御を利用した新規有用物質の創出, 日本薬学会第131年会, 2011年3月28-31日, 静岡.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA YOSHITERU)
東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 00111302