

## 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 28 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：H23～H24

課題番号：23710259

研究課題名（和文） 未着手微生物からの骨格新規薬物資源の開発

研究課題名（英文） Bioprospecting in untapped microbes for new drug discovery resources

研究代表者

奥 直也 (NAOYA OKU)

富山県立大学・工学部・生物工学科

研究者番号：90525388

研究成果の概要（和文）：新規薬物資源の開拓を目指し、これまで調査報告のない微生物に特化した生理活性物質探索を行った。高温環境や水圏からの分離菌の培養物、活性汚泥・温泉バイオマットなどの微生物集塊よりエキスを調製し、グラム陽性・陰性菌・カビ・酵母に対する微生物生育拮抗作用物質を探索した。その結果、3種の水圏細菌から4系統計7つの新規物質を得た。未着手分類群に特化した調査戦略を継続することにより、薬物資源を効果的に拡張できよう。

研究成果の概要（英文）：As an attempt to enrich the structural diversity of drug discovery resources, untapped microbes were prospected for new bioactive molecules. Extracts prepared from the fermentation products of bacteria collected from hot or aquatic environments and bacterial consortia including activated sludges and a biomat were screened for antibiotic actions against 9 strains composed of Gram-positive/-negative bacteria, yeasts, and fungi. Several of the hit extracts were subjected to detailed chemical studies, which resulted in the discovery of 7 new bioactive metabolites belonging to three structure classes from three aquatic bacteria. Our bioprospecting strategy should facilitate effective expansion of the chemical reservoir for pharmaceutical developments.

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	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：複合新領域

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：生物活性物質の探索

## 1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾病の病態発現機構が分子レベルで解明されるに伴い、創薬標的となり得るタンパク質が次々と提案されている。こういった創薬の機会の増大は、スクリーニング技術の進歩、更にケミカルバイオロジー研究の機運の高まりと相俟って、多様性に富む薬物資源へのニーズを大いに高めることとなった。コンビナトリアル合成による物質創製は薬物資源の量的拡大には威力を発揮した

が、質的拡大、すなわち骨格多様性の創出という面では課題を残している。<sup>1</sup>

一方で動植物や微生物など生物由来の小分子は、脳神経系・がん・感染症・循環器系・臓器移植の分野において多くの画期的新薬の種を提供してきた。<sup>2</sup> これらの事実は、天然小分子が薬物資源として如何に有用かを雄弁に物語っているものの、長年に及ぶ精力的な探索活動の結果、生物素材から骨格新規な生理活性分子を発見することは年々困難になっている。

この“新規骨格の枯渇”問題を解決すべく、バイオアッセイの工夫による検出系の多様化、生合成経路の改変に基づく新規分子の創製、構造新規性のみに着目した物質取得などが試みられてきたが、それぞれ既知物質の排除、不十分な生産量、薬物活性の低さに課題を抱えている。

## 2. 研究の目的

この難題に対し、私は薬物探索の原点に立ち返り、資源生物を開拓することが有効な解決策となると考えた。そこで本研究では、未着手微生物分類群に特化したコレクションを構築し、抗菌スペクトルの固有性を指標にしたスクリーニングで培養物を選抜することにより、従来認知されていなかった物質生産分類群を発掘することを目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) 微生物コレクションの拡大

既に海洋、淡水域から採取した水圏試料から 500 株以上の非放線菌を収集している。また、光照射嫌気パウチ培養による嫌気性光合成細菌の収集も進行中であり、幾つかの着色したスワーム(拡大性のコロニー)を得ている。コレクションの多様性を高め調査対象分類群を広げるため、本研究では研究例の少ない好熱性細菌の取得を温泉や堆肥などの高温環境から試みる。

### 2) 「環境再現培養法」の確立と有用性検証

通常行われる富栄養液体中での純粋培養では、自然環境中において日常的な基質や他の微生物との物理的・化学的な接触が起こり得ない。二次代謝が環境応答を担うことも考慮すると、培養の継続を経て高頻度に発生する二次代謝プロファイルの変化・物質生産の停止は人工培養条件への適応の結果と理解できる。これを防いでコレクションの fresh isolates としての形質を維持し、薬物スクリーニング資源として安定活用するために、粘液細菌をモデル生物として培養条件を生育環境に模した培養法を確立し、その有用性を代謝物解析により検証する。

### 3) 抗菌・抗真菌スペクトルの固有性評価に基づく有望株の選定と活性分子の単離・構造同定

微生物二次代謝産物は、微生物間で機能する直接または間接的な「化学兵器」として合目的に生産されており、cyclosporin 類に例証されるように動物細胞においてユニークな標的分子を持つ物質も、狭いスペクトルを持つ抗生物質である場合が多い。<sup>3</sup>この事実

に基づき、現在計 9 株の細菌・カビ・酵母を検定菌としてスクリーニングを行っており、ユニークな生育阻害スペクトルを持つ有望株が浮かび上がりつつある。これらの活性成分の構造同定により、新たな薬物資源となり得る分類群を明らかにすることができる。

得られた骨格新規分子は、化合物バンクへ寄託して薬物資源としての活用を促すと共に、生理活性エビデンスに根ざした実践的ケミカルバイオロジー研究のテーマとして、作用機序解明に向けた共同研究を積極提案・打診して行く。

## 4. 研究成果

### 1) 微生物コレクションの拡大

#### ①嫌気性細菌のコレクション収蔵

平成 22 年度に岩手県大槌湾にて採集した海洋試料から得た嫌気性細菌の単菌化を継続した。分離培地より釣菌したコロニーを 30°C、光照射条件下、アネロパウチにて固体培養したが、2 度目の継代において生育したコロニーは皆無であった。嫌気性菌の菌分離を阻害する要因を明確にするため、培地調製法を含めて原因究明中である。

#### ②好熱性および水圏粘液細菌のコレクション収蔵

平成 23 年度に富山県朝日町小川温泉および岐阜県高山市平湯温泉にてサンプリングを行った。泉源付近のバイオマット、堆積物、植物遺骸、硫黄芝など計 28 検体を採集し延べ 9 種類の分離培地にて菌分離を行った結果、好熱菌 39 株と粘液細菌 17 株を得ることが出来た。

### 2) 「環境再現培養法」の確立と有用性検証

粘液細菌の子実体形成を指標としてコレクション中の *Myxococcus* 属 8 株を、滅菌した植物遺骸 75 g に餌料としての大腸菌培養液 30 mL と V22 液体培地 100 mL を添加した組成中で 500 mL フラスコにて静置培養した。

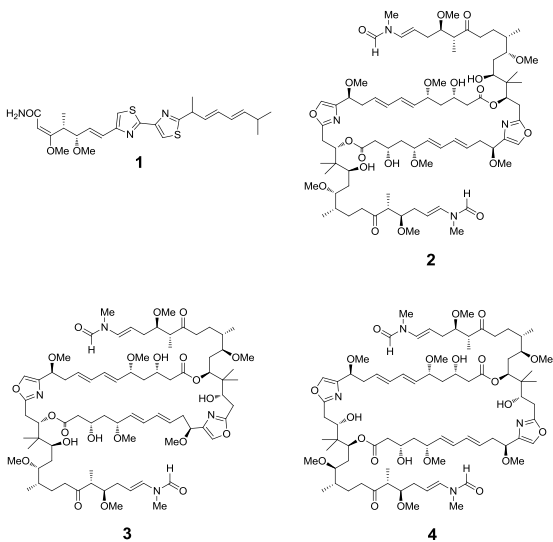
7 株が 2 週間後までに子実体形成を完了した。培養器を毎日動かしただけのものよりも静置したもののほうが早く子実体を形成したことから、振動は子実体形成を阻害することが判明した。EtOH で抽出したものの十分な試料量が得られず、HPLC 分析での比較が不可能であった。なお、抗微生物試験において液体培養抽出物との差異は見られなかった。

### 3) 抗菌・抗真菌スペクトルの固有性評価に基づく有望株の選定と活性分子の単離・構造決

定

### ①粘液細菌株のスクリーニングと新規 rhizopodin 類縁体の発見

コレクションに収蔵した水圏由来粘液細菌全株を 4 種類の培地で培養し、その *n*-BuOH 抽出物を 9 種の検定菌に対する生育阻害試験にてスクリーニングした。その結果、カビと酵母全 4 菌株に対して活性を示したものが 10 株、酵母株 *Saccharomyces cerevisiae* 特異的に生育を阻害したものが 3 株得られた。エキスを HPLC にて分析したところ、先の 10 株は全て既知物質 myxothiazole A (**1**)<sup>4</sup> を生産している一方、*S. cerevisiae* 特異的に生育阻害活性を示した 3 株は本物質を含んでいなかった。このうち 2 株が P388 マウス白血病細胞に対して顕著な活性を示したことから、未知の細胞毒性物質の存在が予想されたため、同定を試みた結果、対称型マクロジオリド rhizopodin (**2**)<sup>5</sup> とともにその一重および二重ラクトン交換体 isorhizopodin (**3**) および isoirhizopodin (**4**) を得た。化合物 **2-4** の P388 細胞に対する細胞毒性はそれぞれ IC<sub>50</sub> 5.2±2.1, 17±4.6, 27.2±8.1 μM であり、環サイズの縮小により活性が低下する傾向が見られた。



### ②微生物集塊からの生理活性物質探索

「環境再現培養法」は培養器内を自然な生育環境に近づけることで、fresh isolate としての形質を発現させることを意図している。発想を転換すれば、自然環境中で安定的に存在する微生物集塊は、fresh isolate としての形質を発現した構成種を共培養していることに等しい。

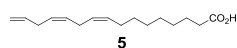
この仮説を検証するため、温泉バイオマット、活性汚泥、塊状群形成ラン藻より生理活性物質の探索を試みた。

温泉バイオマットは好温性ラン藻と

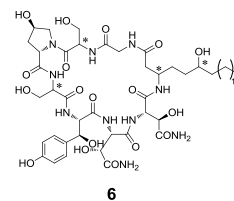
*Chloroflexi* 門細菌より構成される微生物集塊である。朝日町小川温泉にて採集したバイオマットの抽出物は、グラム陽性菌および陰性菌に対し生育阻害作用を示した。前者に対する作用を指標に活性物質の精製を試みたが、活性の濃縮が進まず同定には至っていない。

大学近郊の浄化センター3 か所から採取された活性汚泥を調査した結果、1 か所の抽出物が大腸菌に対して生育阻害作用を示した。イオン交換クロマトに対する挙動から、塩基性物質であることが示唆されるものの、精製は難航している。

アシツキ (*Nostoc verrucosum*) は 15 度前後の清流に寒天質の塊状群体を形成する藍藻で、嘗て北陸から中国地方にかけて食された。食経験のある生物材料は人体に対する安全性が高く有望である。富山県某所にて採集した試料の抽出エキスは幾つかのグラム陽性菌の生育を阻害した。ブドウ球菌に対する活性を指標に精製を進めた結果、末端二重結合を持つ脂肪酸 **5** を得た。本脂肪酸は GC での検出報告はあるものの、その生物活性が報告されたのは今回が初めてとなる。他のアッセイ系での評価に向けて、現在増量中である。



イシクラゲ (*Nostoc commune*) は水没と乾燥を繰り返す地表に生育するラン藻の群体であり、日本各地で食用に供されてきた。富山県立大学キャンパス周辺で採集したイシクラゲ試料の抽出エキスが *Penicillium chrysogenum* の生育を阻害した。活性の本体を追跡したところ、既知抗カビ性リポペプチド nostofungicidine (**6**)<sup>6</sup> であった。未決定であった本物質の立体化学の決定を行い、現在までに 12 不斉点のうち 8 箇所を Marfey 法により決定した。なお、β-hydroxytyrosine のキラリティ決定法を確立した。

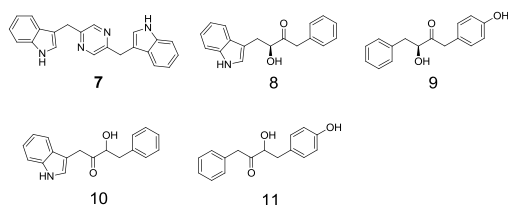


### ③その他未着手微生物株からの物質探索

沖縄県石垣島で採集した未同定海綿より分離した *Firmicutes* 門細菌の一種 *Lysinibacillus fusiformis* の抽出エキスを HPLC-UV 分析に供したところ、データベースには存在しない 3 つのピークが確認された。それらを精製したところ、1 つは既知の対称

型 pyrazine 誘導体 (7)<sup>7</sup>と判明したが、残る 2 つについては何れも分離不能な 2 成分混合物であった。NMR および MS による詳細な構造解析の結果、主要成分は既知アシロイン kurasoin B (8)<sup>8</sup>および soraphinol A (9)<sup>9</sup>であったが、副成分はそれらのアシロイン ( $\alpha$ -hydroxyketone)互変異性体であり、新規物質であったため、それぞれ isokurasoin B (10)および isosoraphinol A (11)と命名した。

8 および 9 は光学活性化合物として報告されている。10 および 11 の立体化学を検討するため、キラルカラム(CHIRALCEL OD-H, ダイセル) による分離を行ったところ、8-11 何れもラセミ体であることが明らかとなった。*L. fusiformis* がラセミ体として生産するのか、精製過程で互変異性が進行するのか、現在検討中である。



以上、高温環境や水圏から分離した菌の培養物および活性汚泥・温泉バイオマットなどの微生物集塊よりエキスを調製し、これらよりグラム陽性・陰性菌・カビ・酵母に対する微生物生育拮抗作用物質を探索した。その結果、3 種の水圏細菌から 3 系統計 7 つの新規物質を得、うち 5 化合物は微生物二次代謝産物の典型であるポリケタイドや非リボソーム性ペプチドには分類されないものだった。

近年、ゲノム中に未知生合成遺伝子を探索することにより新規物質を得る手法、いわゆる「ゲノムマイニング」が注目を集めているが、得られる物質は生合成経路の解明されたものに限定される。薬物資源の拡充には、生合成経路を予想できない物質の発見も欠かせず、この点においても本研究の物質探索戦略が有効であることも示せた。

薬物資源の持続的な拡充のためにも、未着手生物資源探査の発展的継続が望まれる。

#### 参考文献

- <sup>1</sup>*J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218-227.
- <sup>2</sup>*J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
- <sup>3</sup>*Eur. J. Appl. Microbiol.* **1976**, *3*, 125-133.
- <sup>4</sup>*J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1480-1490.
- <sup>5</sup>*Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5796-5799.
- <sup>6</sup>*Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3737-3740.
- <sup>7</sup>*J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1660-1663.
- <sup>8</sup>*J. Antibiot.* **1996**, *49*, 886-889.
- <sup>9</sup>*Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*,

835-836.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- ①米島洗佑、奥直也、五十嵐康弘：食用ラン藻由来リボペプチド nostofungicidine の絶対化学の解明. 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、仙台.
- ②松本綾香、奥直也、朝野裕貴、松永孝之、笠井宏朗、五十嵐康弘：水圏由来粘液細菌の生産する新規 rhizopodin 類縁体の構造. 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、仙台.
- ③朝野裕貴、奥直也、宮永賢、笠井宏朗、五十嵐康弘：海洋由来 *Firmicutes* 門細菌の生産する新規 acyloin 化合物の構造. 日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、仙台.
- ④奥直也：薬物資源の新たなる鉱脈を求めて. 第 5 回北陸合同バイオ若手シンポジウム、2012.11.3、福井.
- ⑤朝野裕貴、奥直也、宮永賢、五十嵐康弘：海洋由来 *Firmicutes* 門細菌の生産する二次代謝産物に関する研究. 日本農芸化学会中部支部第 166 例会若手シンポジウム、2012.11.2、福井.
- ⑥米島洗佑、奥直也、須河隆夫、五十嵐康弘：富山県オリジナル食材「アシツキ」の有用成分調査. 日本農芸化学会中部支部第 166 例会若手シンポジウム、2012.11.2、福井.

#### 6. 研究組織

研究代表者

奥直也 (OKU NAOYA)

富山県立大学・工学部・生物工学科

研究者番号：90525388