

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293022

研究課題名(和文) 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生

研究課題名(英文) Discovery of Novel Natural Products from Fungi by Epigenetic Expression of Secondary Metabolite Biosynthetic Genes

研究代表者

大島 吉輝 (Oshima, Yoshiteru)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00111302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ケミカルエピジェネティクスを用い糸状菌の新規天然物を探索して、シヤクヤク葉内生菌から新規ベンゾフェノン、アロエ葉内生菌から新規脂肪族ポリケタイドを単離した。また、Chaetomium属菌から得られる天然物の生合成系をターゲットとして、その中間体の生合成に関わる遺伝子を異種発現させる方法および単離した中間体を化学変換する方法を組み合わせ、40種以上の擬天然型化合物を創生した。なお、上記化合物の薬理作用を検討したところ、現在有効な治療薬がないアデノウイルスに対して抗ウイルス作用を示す化合物が見出された。

研究成果の概要(英文)：Fungi living in plants or arthropods are attractive resources for our natural product exploration using chemical epigenetic method. After the isolation of various fungi from medicinal plants and arthropods, mainly insects and spiders, the chemical epigenetic method was applied to the fungi and found Graphiopsis chlorocephala (*Paeonia lactiflora*) and *Mycosphaerella* sp. (*Aloe arborescens*) were found to enhance the accumulation of their secondary metabolites, from which structurally diverse novel benzophenones and short branched fatty acid dimers were isolated.

Structurally diverse chaetophenols were previously isolated from *Chaetomium* fungi as novel natural products by using chemical epigenetic method, and simple aromatic compound was biosynthesized by a NR-PKS gene as a common intermediate of chaetophenols. Overexpression of the gene in *Aspergillus oryzae* and artificial chemical transformation of the aromatic compound generated various novel pseudo-natural products.

研究分野：天然物化学

キーワード：糸状菌 未利用生合成遺伝子 天然物創出 ケミカルエピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

糸状菌のゲノム解読が進み、数多くの二次代謝物生合成遺伝子が通常培養では休眠状態にあることが示唆されてから、これら未利用生合成遺伝子にコードされる新規物質の取得を目指す研究が天然物化学の主流の1つになってきている。当研究室では、エピジェネティクスを制御する化学修飾酵素の低分子阻害剤を添加して培養することにより、糸状菌の様々な未利用生合成遺伝子の発現を誘導し、従来の培養条件では取得困難であった新規物質の発見を目的として研究を行っている。これまでに、二次代謝活性化に有効な酵素阻害剤の種類や濃度を見出し、それを用いて多様な新規物質の取得に成功した。その後、新規物質の探索資源として内生糸状菌に着目し、酵素阻害剤を用いて培養したところ、多様な新規天然物の取得に成功した。

### 2. 研究の目的

本研究では、糸状菌の二次代謝物生合成に関わる未利用遺伝子を発現させ、特異な化学構造をもつ多様な新規天然物を生産させ、創薬シーズとして有用な天然物のケミカルスペースの拡充をはかる。未利用遺伝子の発現は、ヒストン脱アセチル化酵素などの阻害剤を用いる手法、新規天然物の探索源には、昆虫寄生糸状菌、植物内生糸状菌を取り扱う。さらに、本研究によって得られた新規天然物の薬理活性を検討し、創薬リードとなりえる化合物を探し出す(図1)。

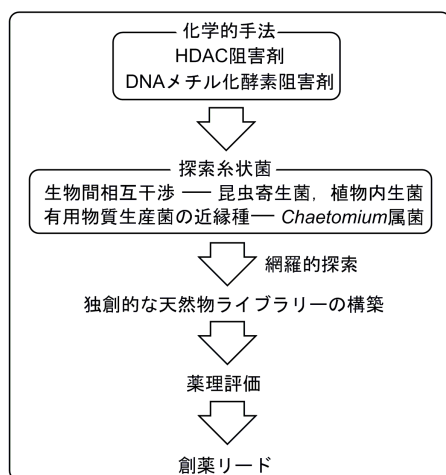


図1 本研究の概略

### 3. 研究の方法

#### (1) 化学的手法による新規天然物の創生

ケミカルエピジェネティクスを用いた糸状菌の新規天然物探索

酵素阻害剤添加下、培養した昆虫寄生糸状菌や植物内生糸状菌から新たな有用二次代謝物を探索する。

生合成中間体の活用と多様な擬天然型ポリケタイド化合物の創生

Chaetomium 属菌から得られる天然物の中間体の生合成遺伝子を麹菌 (Aspergillus

oryzae) で異種発現させる方法および単離した中間体を化学変換する方法により擬天然型化合物を創生する。

#### (2) 新規天然物の薬理作用

東北大学アカデミア発創薬拠点事業(文部科学省)において実施されているハイスループットスクリーニング等により、上記化合物の薬理作用を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 化学的手法による新規天然物の創生

ケミカルエピジェネティクスを用いた糸状菌の新規天然物探索

採取した薬用植物や節足動物から内生糸状菌を分離した。それらの D1/D2 領域の塩基配列を基に系統樹を作成したところ、宿主ごとに分離される菌種が異なること、多様性に富んだ菌が分離されることがわかった。分離した内生糸状菌を、エピジェネティック酵素阻害剤を添加する培養法を用いてスクリーニングし、二次代謝物の組成が大きく変化した内生糸状菌を大量培養し、そこに含まれる新規天然物を探索した。その結果、シャクヤク葉の内生菌である *Graphiopsis chlorocephala* からは、新規ベンゾフェノン 1-6 を単離した(図2)。また、アロエ葉から分離した *Mycosphaerella* 属菌からは、新規脂肪族ポリケタイド 7-10 を単離した(図3)。シャクヤク内生菌が生産するベンゾフェノン類は構造多様性に富み、塩素原子、高度に酸化されたプレニル基、7員環構造といった特徴があり、特に、6 は C-C 結合を介するユニークな二量体構造を有している。一方、キダチアロエ内生菌が生産するポリケタイドは、天然には稀な多置換シクロヘキセンジオン骨格を有している。

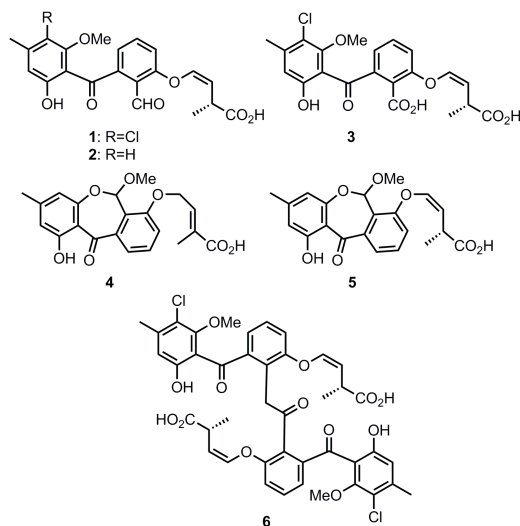


図2 シャクヤク内生 G. chlorocephala が生産するベンゾフェノン

生合成中間体の活用と多様な擬天然型ポリケタイド化合物の創出

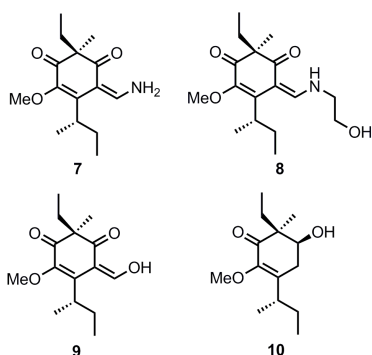


図3 アロエ内生Mycospherella属菌が生産するポリケタイド

*Chaetomium indicum* では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を作用させると chaetophenol 類の生産が誘導される。これらの化学構造の多様性は、休眠型ポリケタイド遺伝子 *pksCH-2* にコードされる生合成中間体を起点に広がっている。多様な天然物の生合成の起点となる化学構造は、潜在的に優れた分子展開力を有している可能性があると考え、chaetophenol 類の生合成系をターゲットとして、中間体の生合成に関わる遺伝子を麹菌 (*Aspergillus oryzae*) で異種発現させる方法および単離した中間体を化学変換する方法を組み合わせた半合成的なアプローチにより、擬天然型ポリケタイド化合物の創生を試みた。その結果、12, 13 をはじめとする 40 種以上の多様性に富む擬天然型化合物を創生した (図 4)。

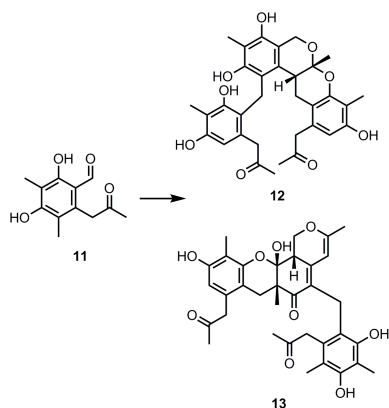


図4 糸状菌NR-PKS遺伝子の異種発現によって生成するポリケタイド

## (2) 新規天然物の薬理作用

上記化合物に関して、東北大学アカデミア発創薬拠点事業 (文部科学省) において実施しているハイスループットスクリーニング等により薬理作用を検討した。その結果、現在有効な治療薬がないアデノウイルスに対して抗ウイルス作用を示す化合物が見出された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Teigo Asai, Kento Tsukada, Satomi Ise, Naoki Shirata, Makoto Hashimoto, Isao Fujii, Katsuya Gomi, Kosuke

Nakagawara, Eiichi N. Kodama and Yoshiteru Oshima, Use of a Biosynthetic Intermediate to Explore the Chemical Diversity of Pseudo-natural Fungal Polyketides, *Nature Chemistry*, 7, 737-743 (2015). 査読有

DOI: 10.1038/NCHEM.2308

Teigo Asai, Shuntaro Morita, Tohru Taniguchi, Kenji Monde and Yoshiteru Oshima, Epigenetic stimulation of polyketide production in *Chaetomium cancroideum* by an NAD(+)-dependent HDAC inhibitor, *Org. Biomol. Chem.*, 14, 646-51 (2015). 査読有

DOI: 10.1039/c5ob01595b

ケミカルエピジェネティクスによる未利用生合成遺伝子の活用と多様な天然物の創出 (最前線), 浅井禎吾, 大島吉輝, *ファルマシア*, Vol. 50, No. 2, pp. 112-116 (日本薬学会発行, 2014). 査読無

Teigo Asai, Sae Otsuki, Hiroaki Sakurai, Tomoji Ozeki, Kouwa Yamashita and Yoshiteru Oshima, Benzophenones of an Endophytic Fungus, *Graphiopsis chlorocephalum*, from *Paeonia lactiflora* Cultivated in the Presence of an NAD<sup>+</sup> Dependent HDAC Inhibitor, *Org. Lett.*, 15, 2058-2061 (2013). 査読有

DOI: 10.1021/ol400781b

Teigo Asai, Sae Otsuki, Tohru Taniguchi, Kenji Monde, Kouwa Yamashita, Hiroaki Sakurai, Tomoji Ozeki and Yoshiteru Oshima, Structures and Absolute Configurations of Short-branched Fatty Acid Dimers from an Endophytic Fungus of *Aloe arborescens*, *Tetrahedron Lett.*, 54, 3402-3405 (2013). 査読有

DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.04.063

Yu-Ming Chung, Chien-Kei Wei, Da-Wei Chung, Mohamed El-Shazly, Chi-Ting Hsieh, Teigo Asai, Yoshiteru Oshima, Tusty-Juan Hsieh, Tsong-Long Hwang, Yang-Chang Wu and Fang-Rong Chang, An Epigenetic Modifier Enhances the Production of Anti-diabetic and Anti-inflammatory Sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*, *Bior. Med. Chem.*, 21, 3866-3872 (2013). 査読有

DOI: 10.1016/j.bmc.2013.04.004

Teigo Asai, Takashi Yamamoto, Naoki Shirata, Tohru Taniguchi, Kenji Monde, Isao Fujii, Katsuya Gomi and Yoshiteru Oshima, Structurally Diverse Chaetophenol Productions Induced by Chemically Mediated Epigenetic Manipulation of Fungal Gene Expression, *Org. Lett.*, 15, 3346-3349 (2013). 査読有

DOI: 10.1021/ol401386w

Yu-Ming Chung, Mohamed El-Shazly,

Da-Wei Chuang, Tsong-Long Hwang, Teigo Asai, Yoshiteru Oshima, Mohamed L. Ashour, Yang-Chang Wu and Fang-Rong Chang, Suberoylanilide Hydroxamic Acid, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces the Production of Antiinflammatory Cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*, J. Nat. Prod., 76, 1260-1266 (2013). 査読有  
DOI: 10.1021/np400143j  
Teigo Asai, Tohru Taniguchi, Kenji Monde and Yoshiteru Oshima, Structures of Spiroindicumides A and B, Unprecedented Carbon Skeletal Spirolactones from *Chaetomium indicum* and Determination of the Absolute Configuration by VCD Exciton Approach, Org. Lett., 15, 4320-4323 (2013). 査読有  
DOI: 10.1021/ol401741z

[学会発表](計9件)

大島吉輝, 天然物の再興を目指して:ケミカルエビジェネティクスと天然物の創出, 創薬懇話会 2015 in 徳島, 2015年7月2-3日, 鳴門.

布木純, 大槻紗恵, 浅井禎吾, 大島吉輝, 身近な生物に内生する多様な糸状菌を資源とした新規天然物探索, 第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2014年11月5-6日, 東京.

塚田健人, 伊勢里見, 橋元誠, 藤井勲, 五味勝也, 浅井禎吾, 大島吉輝, Chaetophenol 類の生合成中間体を活用したポリケタイド分子多様性の拡大, 第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2014年11月5-6日, 東京.

伊藤史織, 山本崇史, 塚田健人, 浅井禎吾, 大島吉輝, *Chaetomium indicum* の休眠遺伝子を活用した新規二次代謝物の獲得, 第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2014年11月5-6日, 東京.

浅井禎吾, 塚田健人, 伊勢里見, 橋元誠, 藤井勲, 五味勝也, 浅井禎吾, 大島吉輝, 糸状菌 NR-PKS が生合成する芳香族ポリケタイド中間体を活用した多様な分子構造への展開, 第56回天然有機化合物討論会, 2014年10月15-17日, 高知.

浅井禎吾, 白田直樹, 森田峻太郎, 塚田健人, 藤井勲, 五味勝也, 大島吉輝, Chaetophenol 類の生合成とエビジェネティクス制御に関する研究, 日本薬学会第134年会, 2014年3月28-30日, 熊本.

大槻紗恵, 浅井禎吾, 山下幸和, 大島吉輝, ツツジ科植物内生糸状菌を資源とした新規天然物の探索, 日本薬学会第134年会, 2014年3月28-30日, 熊本.

布木純, 浅井禎吾, 山下幸和, 河治久実, 児玉栄一, 大島吉輝, エビジェネティックな二次代謝活性化法を利用するイチイ内生糸状菌からの新規生物活性物質の探

索, 日本薬学会第134年会, 2014年3月28-30日, 熊本.

塚田健人, 浅井禎吾, 白田直樹, 藤井勲, 五味勝也, 大島吉輝, 糸状菌の単純芳香族ポリケタイドから複雑な二量ポリケタイドの創生, 日本薬学会第134年会, 2014年3月28-30日, 熊本.

[その他]

ホームページ

<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