

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860080

研究課題名(和文) 遺伝子工学を活用したhuperzine Aの新規供給システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of a New Method for Huperzine A Production using Plant Endophytic Fungi

研究代表者

石内 勘一郎 (Ishiuchi, Kan'ichiro)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70608140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Lycopodium serratum var. longipetiolatumより単離した内生糸状菌Ls13株が、アルツハイマー病改善薬候補huperzine Aを生産することを見出した。分子系統解析の結果Ls13株は、Phoma selaginellicola CBS 122.93に極めて近縁の種であることを明らかにした。また、L. serratum var. longipetiolatumより4種の新規アルカロイドserralongamine A-Dを単離、構造決定した。さらにserralongamine BとDが、動脈硬化の初期病変マクロファージ泡沫化を阻害することを明らかにした。

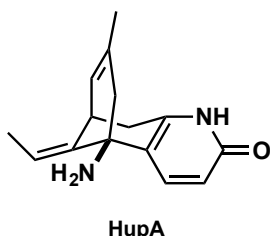
研究成果の概要(英文)：We discovered a fungal strain Ls13 from Lycopodium serratum var. longipetiolatum produced huperzine A, an anti-Alzheimer's disease drug candidate from the traditional Chinese medicine Qian Ceng Ta (Huperzia serrata). The strain Ls13 was classified to the genus Phoma based on molecular phylogenetic analysis. Also we isolated four new alkaloids, serralongamines A-D, from L. serratum var. longipetiolatum and elucidated their structures on the basis of spectroscopic data. Serralongamines B and D exhibited the inhibitory activity against foam cell formation in human macrophages, one of characteristic features of early atherosclerotic lesions.

研究分野：天然物化学

キーワード：huperzine A アルツハイマー病 植物内生糸状菌 Phoma sp. Lycopodium alkaloid serralongamine  
マクロファージ泡沫化阻害活性

### 1. 研究開始当初の背景

フペルジン A (HupA) は、アルツハイマー病改善薬の候補として注目されるヒカゲノカズラ科植物トウゲシバ由来の微量アルカロイドである。同化合物は植物体内における含有量が非常に低く、かつ有機化学合成をはじめとする供給手段が確立されていなかった。またトウゲシバが絶滅を危惧されていることも伴い、HupA の新しい供給法の確立が求められている。近年、抗がん剤パクリタキセルに代表される植物由来の有用二次代謝産物を内生糸状菌が生産することが報告されており、植物内生糸状菌が新たな医薬資源として注目を集めている。天然由来の二次代謝産物は、宿主生物体内において、ゲノム上にコードされた生合成遺伝子が描く設計図に従って生合成される。近年、糸状菌の遺伝子工学を利用した生合成研究は飛躍的に進歩を遂げている。そこで、HupA を生産する糸状菌を獲得できれば、遺伝子工学的手法を活用した新しい物質生産法を確立することが期待された。



### 2. 研究の目的

まず、ヒカゲノカズラ科植物より内生糸状菌を単離し、HupA を生産する糸状菌を獲得する。さらに HupA 生産糸状菌株の分子系統解析を行い、菌種を同定する。HupA 生合成遺伝子を取得し、異種発現系による HupA の大量生物合成を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) ヒカゲノカズラ科植物の HupA 生産確認。まず、12 種のヒカゲノカズラ科植物を入手し、各メタノールエキスを調製した。分配により得られた塩基性画分について、成分分析を行い、HupA 生産性およびリコボジウムアルカロイド成分組成を分析した。

(2) 内生糸状菌の分離と HupA 生産確認。得られた植物体の組織切片を表面殺菌後、寒天培地で培養し、内生糸状菌を分離した。得られた糸状菌を各種培養条件下で培養後、抽出操作を行った。

(3) 内生糸状菌の HupA 生産確認。得られた抽出エキスを調製し、LC-MS による HupA 分析法に供し、HupA の生産確認を行った。

(4) 糸状菌の分子系統解析。HupA 生産糸状菌株について、rRNA の Internal Transcribed Spaser (ITS) 領域の塩基配列を決定し、相同

性検索と近隣結合法による分子系統解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 12 種のヒカゲノカズラ科植物のうち、5 種 (*Lycopodium serratum*, *L. serratum* var. *longipetiolatum*, *Huperzia nummunlariifolia*, *H. carinata*, *H. goebellii*) に HupA の生産を確認した。

(2) 植物体より 94 株の内生糸状菌を単離した。分子系統解析の結果、単離した種々の菌株は、13 属 (*Colletotrichum* 属、*Trichoderma* 属、*Ophioceras* 属、*Anthostomella* 属、*Nemania* 属、*Mycosphaerella* 属、*Cercospora* 属、*Pseudocercospora* 属、*Diaporthe* 属、*Alternaria* 属、*Phoma* 属、*Paraconiothyrium* 属、*Guignardia* 属) 21 種の既知種と近縁であると分類された。

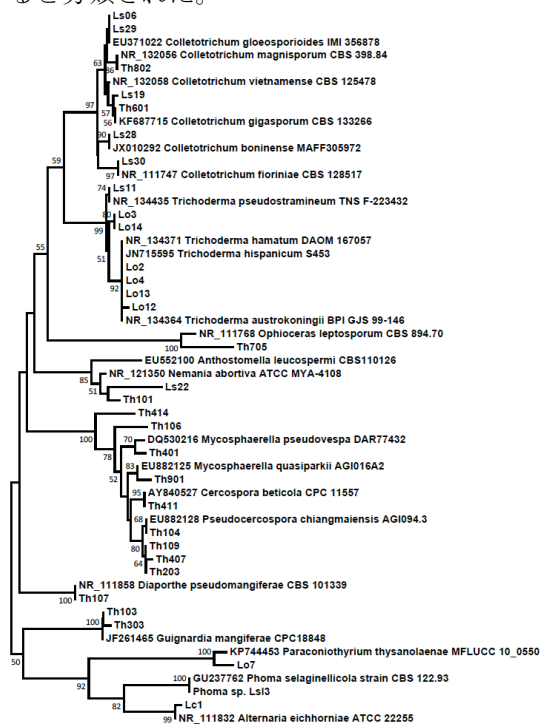


図 1. 内生糸状菌の分子系統解析の基づく系統樹

(3) 得られた 94 株の抽出物を LC-MS 分析に供した結果、Ls13 株において、HupA が他のリコボジウムアルカロイドとともに生産されることを確認することに成功した。

(3) 分子系統解析の結果、Ls13 株は *Phoma selaginellicola* CBS122.93 と極めて近縁の種であることが明らかとなった。形態観察の結果も考慮し、*Phoma* sp. Ls13 とした。

(4) HupA 生産種 *L. serratum* var. *longipetiolatum* より 4 種の新規アルカロイド、セラロンガミン A-D (Ser A-D) を単離し、NMR 等の分光学的手法および化学変換反応を

駆使することで、その構造を相対配置まで決定した。さらに Ser B および D に動脈硬化の初期病変であるヒトマクロファージ泡沫化阻害活性を見出した。

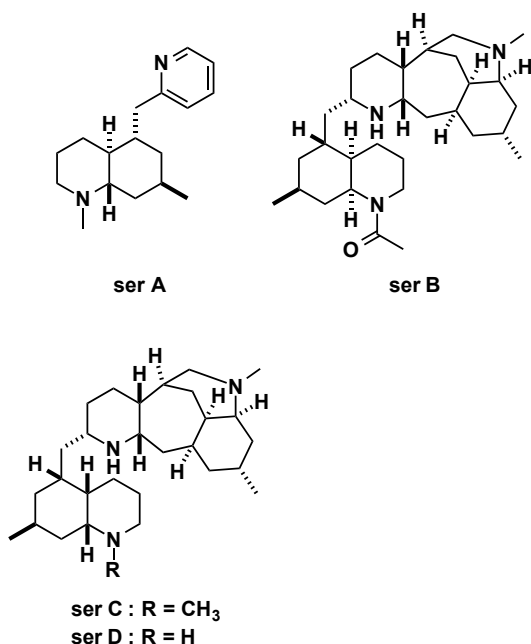


図 2. *L. serratum* var. *longipetiolatum* より単離した新規アルカロイドの構造

(5) 本研究では、*L. serratum* var. *longipetiolatum* より HupA 生産糸状菌を発見することに成功したが、その一方で、同糸状菌は HupA の生産安定性が低く目的とする HupA 生合成遺伝子の特定には至らなかった。今後、他の微量植物由来有用二次代謝産物に対して、同様の研究展開を行う上で、糸状菌の化合物生産安定性の獲得は、重要な鍵となることが予想される。化合物の生産安定性を向上させる条件を検討し、そのメカニズムを解明する必要がある。

#### 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 2 件)

- 1) Ishiuchi, K.; Jiang, W.-P.; Fujiwara, Y.; Wu, J.-B.; Kitanaka, S. Serralongamines B-D, Three New *Lycopodium* Alkaloids from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum*, and their inhibitory effects on foam cell formation in macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2636-2640. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.04.019
- 2) Jiang, W.-P.; Ishiuchi, K.; Wu, J.-B.; Kitanaka, S. Serralongamine A, a New *Lycopodium*

Alkaloid from *Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum*. *Heterocycles* **2014**, *89*, 747-752. (査読有)  
DOI: 10.3987/COM-13-12928

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 石内勘一郎, 姜文平, 藤原章雄, 呉金濱, 北中進  
*Lycopodium serratum* var. *longipetiolatum* より単離した新規アルカロイドの構造とマクロファージ泡沫化阻害活性  
日本薬学会 第 136 年会  
2016 年 3 月 26-29 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- 2) 石内勘一郎, 廣瀬大, 高橋依子, 宮川龍, 北中進  
コメツガ落葉より分離した糸状菌 *Penicillium* sp. R0369 由来新規 azaphilone 化合物の構造  
日本生薬学会 第 62 回年会  
2015 年 9 月 11-12 日  
長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)
- 3) 石内勘一郎, 姜文平, 藤原章雄, 呉金濱, 北中進  
台湾産オニトウゲシバ由来リコポジウムアルカロイドの構造とマクロファージ泡沫化阻害活性  
日本生薬学会 第 61 回年会  
2014 年 9 月 13-14 日  
福岡大学中央図書館 (福岡県・福岡市)
- 4) 石内勘一郎, 姜文平, 呉金濱, 北中進  
台湾産オニトウゲシバ由来新規アルカロイドの構造  
日本薬学会 第 134 年会  
2014 年 3 月 27-30 日  
熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市)

[図書] (計 1 件)

- 北中進, 寺林進, 高野昭人, 石内勘一郎, 他 18 名  
廣川出版  
カラーグラフィック薬用植物 第 4 版  
2015 年  
総ページ数 178 (38, 117-151)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ホームページ等  
<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page-2432.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石内 勘一郎 (KAN' ICHIRO ISHIUCHI)  
名古屋市立大学・薬学研究科 (研究院)  
助教

研究者番号 : 70608140

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし