

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450148

研究課題名(和文) NPPlotと微生物代謝産物フラクションライブラリーを利用した新規化合物の探索

研究課題名(英文) Application of microbial metabolite fraction library and NPPlot on discovery of new metabolites

研究代表者

野川 俊彦 (Nogawa, Toshihiko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：40462717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：微生物培養液より新規二次代謝産物を探索する方法の構築と、それを利用した新規化合物の単離を目的として以下の4項目について本研究課題を遂行した。(1)フラクションライブラリーの作製、(2)ライブラリーのPDA-LC/MS分析、(3)スペクトルデータベースNPPlotの構築、(4)ライブラリーからの新規化合物探索。始めに放線菌および糸状菌の30L規模培養液より約2000フラクションを作製した。そのLC/MS分析を行いNPPlotを作成した。これを利用してライブラリーより新規化合物を探索した。結果を学会にて報告するとともに学术论文として発表した。本研究により本方法の有効性を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this project is to construct an efficient method for isolating new secondary metabolites from microbes and to isolate new compounds based on the methodology constructed here. For this purpose, following 4 tasks were carried out: (1) construction of a fraction library, (2) PDA-LC/MS analysis of the library, (3) construction of a spectral database named NPPlot, and (4) isolation of new metabolites from the library. As the results, a fraction library containing over 2,000 fractions was constructed from 30 L culture broths of several microbes. The library was analyzed by PDA-LC/MS for constructing the NPPlot. Several new compounds were isolated from the library by NPPlot screening, and the results were presented in conferences and published in academic journals. Through the project, I confirmed the efficiency of the method for isolating new metabolites from microbes.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：微生物代謝産物 フラクションライブラリー スペクトルデータベース NPPlot

1. 研究開始当初の背景

微生物が生産する二次代謝産物は、その多様な構造と生理活性から創薬資源として重要である。製薬企業においても天然物探索研究は重要であった。しかし近年、天然物からの新規化合物の単離報告は減少傾向にあり、特に新しい骨格を有する化合物の単離は困難になってきていた。さらに精製に多くの手間と時間がかかることや量の確保が困難であることなどから、製薬企業では探索研究から手を引かざるを得ない状況にあった。一方で、ゲノム解読などの進展から放線菌などの微生物は、単離が報告されている以上の多種多様な未知の代謝産物を生産する能力を有していることが明らかになってきていた。それら未知の代謝産物は実際には生産されていない可能性もあるが、生産量や構造の多様性などから従来の探索方法では見出されていない可能性もあった。このような背景から従来とは異なる方法での新規代謝産物の探索方法が必要であった。一方、本課題実行者は、微生物二次代謝産物の粗精製物からなるフラクションライブラリーと代謝産物の物性情報を反映・収蔵したスペクトルデータベース (NPPlot: Natural Products Plot*) を組み合わせる方法を構築し、この方法により新規化合物を優位に探索できることを確認していた。そこで、この方法をさらに拡張し新規化合物の探索を行うこととした。

*NPPlot: PDA-LC/MS 分析で得られた化合物の極性 (LC 上の保持時間) と分子量情報 (MS における m/z の値) をそれぞれ横軸と縦軸に取り化合物を二次元プロットしたものの。化合物が二次元上の分布として表現され、そのパターンが菌株固有であるため容易に菌株固有の化合物群を探索可能である。

2. 研究の目的

微生物が生産する二次代謝産物から新規化合物を探索する方法の構築と、その方法を用いた新規天然化合物の単離を目的として課題を遂行した。具体的には微生物大量培養抽出物からのフラクションライブラリーの作製、LC/MS による成分情報の収集とそれをもとにしたスペクトルデータベースの構築、データベースを利用した新規化合物の探索とライブラリーからの単離・構造決定を目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題は大きく以下の4つの項目に沿って行った。

(1) フラクションライブラリーの作製

放線菌または糸状菌の 30 L 規模培養液より酢酸エチルにより抽出することで有機溶媒可溶性および水溶性抽出物を調製した。それぞれを中圧液体クロマトグラフィーおよび逆相 HPLC により分画することで、粗分画物、すなわちフラクションを作製した。この

方法により1菌株当たり約300~400程度のフラクションを作製した。これを化合物探索や各種生物活性評価に利用しやすいようにライブラリーとして整備した。

(2) ライブラリーの PDA-LC/MS 分析

作製したすべてのフラクションを PDA-LC/MS で分析し、含有化合物の物性情報 (保持時間、分子量情報、UV 吸収スペクトル、マススペクトル) を収集した。測定に用いた LC/MS は、イオン源にエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いた。

(3) NPPlot の構築

LC/MS 情報をもとに NPPlot を構築した。(4) NPPlot を利用したライブラリーからの新規化合物の探索・単離

構築した NPPlot の分布パターンより菌株固有の化合物または化合物群の探索を行った。その結果、ある菌株が固有の分布パターンを有することを見出し、それらについてライブラリーより単離し構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) フラクションライブラリーの作製

放線菌および糸状菌の大量培養液を用いて、約 2,000 の粗精製物からなるフラクションライブラリーを作製した。ライブラリーは含有二次代謝産物の単離に備えて乾燥・保存した。

(2) ライブラリーの PDA-LC/MS 分析

作製したライブラリーを全て PDA-LC/MS で分析し、含有する二次代謝産物の UV 吸収スペクトルおよびマススペクトルを測定した。

(3) NPPlot の構築

LC/MS 分析から得られた含有二次代謝産物の保持時間および分子量情報をもとに NPPlot を構築した。一菌株当たりそれぞれ約 200 個のピーク (化合物) を検出することができた。このことから、菌株固有の化合物群探索や菌株間比較に十分な数のピーク (化合物) を確保することができ、菌株ごとに多様性のある NPPlot を構築することができた (図 1)。

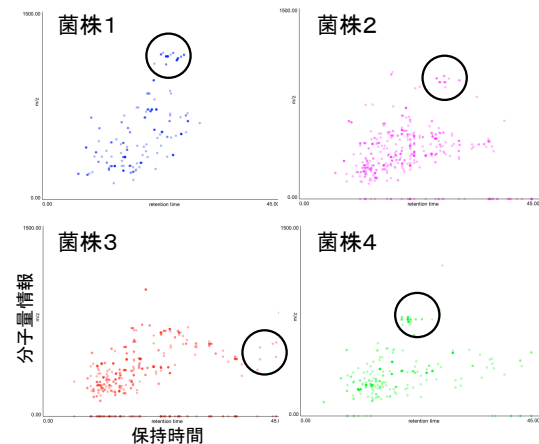


図 1. 4種の放線菌より構築した NPPlot 丸ハイライト: 各菌株に特徴的な分布を示した領域

(4) NPPlotを利用したライブラリーからの新規化合物の探索・単離

Streptomyces sp. RK88-1355 の NPPlot (図 1/菌株 1) において、明らかに他の菌株の NPPlot とは異なる分布を示した領域 (ハイライト部分) の化合物は、UV 吸収スペクトルおよびマススペクトル情報よりキノマイシン類であることを確認した。分子量情報から新規類縁体と推定されるものが含まれていることが示唆されたので、それらについて単離を行い構造の確認を行った。その結果、2 種の新規キノマイシン類縁体を単離し、それらを RK-1355A および B と決定した (発表論文⑫)。それらは分子内にサルホキシド基を含む架橋構造を有しており、この構造はキノマイシン類では天然物として初めての報告であった (図 2)。また、これら化合物は強い抗マラリア活性を示した (発表論文⑨)。

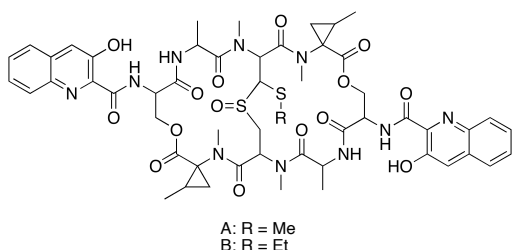


図 2. RK-1355A および B の構造

同菌株においてさらに詳細に NPPlot を確認し、保持時間 27 分、分子量 650 前後の領域に類似の UV 吸収スペクトルを示す化合物群があることを見出した。NPPlot では、UV 吸収スペクトルにおける極大吸収値から収蔵化合物を検索することが可能であるので、この機能を利用し同様の UV 吸収スペクトルを有する化合物群の探索を行った。その結果、分子量 550 前後にも同様のスペクトルを示す一群が存在することが示された (図 3)。

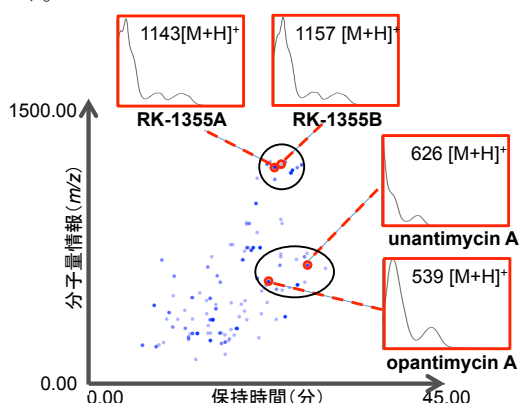


図 3. 菌株 1 の NPPlot

丸ハイライト：それぞれ類似の UV 吸収スペクトルを持つ領域

分子量 650 前後の化合物群は、ネオアンチマイシン類であることが示唆された。しかし、同様の分子量を示すネオアンチマイシン

類の報告がなく新規類縁体であることが示されたので、単離し構造の確認を行った。その結果、その構造を新規ネオアンチマイシン類縁体と決定し、unantimycin A と命名した (図 4)。Unantimycin A は、ネオアンチマイシンおよびアンチマイシン類の特徴である 2-hydroxy-3-formylaminobenzoic acid 構造を持たず、代わりに 3-hydroxy benzoic acid を有していた。このような置換様式の官能基を有するネオアンチマイシン類およびアンチマイシン類の報告は本化合物が初めてであった (発表論文⑦)。

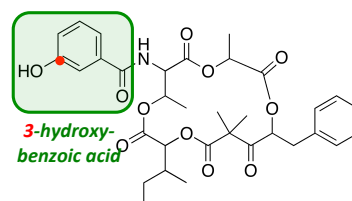


図 4. unantimycin A の構造

分子量 550 前後の化合物群は、UV 吸収スペクトルから unantimycin A と類似のクロモフォアを有することが示された。しかし、分子量が大きく異なったことから新規化合物であることが強く示唆されたため単離し、構造を確認した。その結果、ネオアンチマイシンと類似のクロモフォアを有する新規化合物と決定し、opantimycin A と命名した (図 5)。この化合物はγ-ブチロラクトン構造を有しており、この構造を有する天然物の報告は、ネオアンチマイシンの開裂体である isoneoantimycin のみであり、非常に珍しいものであった (発表論文③)。また、NPPlot からは、unantimycin A および opantimycin A の新規類縁体と考えられる化合物を検出することができた。

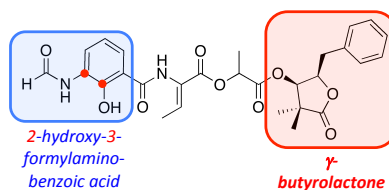


図 5. opantimycin A の構造

Unantimycin A および opantimycin A について、細胞毒性、抗菌活性および抗マラリア活性を評価した。どちらも抗菌活性は示さず、弱い細胞毒性と抗マラリア活性を示した。

放線菌 *Streptomyces* sp. RK85-270 の NPPlot において、分子量 1000 前後の領域に分子量が 14 ずつ異なる 4 つのピークを見出した。スペクトル情報から新規化合物であることが示唆されたので、それらより 2 つの化合物を単離しそれらの構造を確認した。その結果、それらの構造を新規環状デブシペプチドと決定し、octaminomycin A および B と命名した (図 6)。2 つの違いはスレオニンの N アシル基の違いであった。これら化合

物は、分子中に2つの立体の異なるLおよびD-ロイシンを含む非常に珍しいペプチドであった(発表論文①)。これらについて、unantimycin A 同様に各種活性評価を行った。その結果、細胞毒性および抗菌活性は示さず、抗マラリア活性のみを示した。

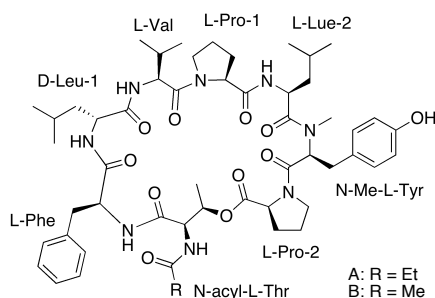


図6. octaminomycin A および B の構造

以上本研究課題を通して、微生物代謝産物フラクションライブラリーの作製とスペクトルデータベース NPPlot の構築を行うとともに、この方法を利用した化合物探索方法についても検討を行った。NPPlot を用いて菌株固有の化合物を探索することで数種の新規活性化化合物を単離した。また、数種の類縁体を NPPlot より容易に探索することができることを確認した。この方法を利用することで優位に新規化合物を探索することができ、ライブラリーより簡単に単離することができることを確認した。以上のように、本研究課題の目的を達成することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ①Jang JP, Nogawa T, Futamura Y, Shimizu T, Hashizume D, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H, Octaminomycins A and B, cyclic octadepsipeptides active against *Plasmodium falciparum*, Journal of Natural Products, 査読有, 80, 2017, 134-140, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00758
- ②Nogawa T, Ogita N, Futamura Y, Negishi S, Watanabe N, Osada H, Trachyspic acid 19-butyl ester, a new inhibitor of Plk1 polo box domain-dependent recognition from uncharacterized fungus RKGS-F2684, The Journal of Antibiotics, 査読有, 70, 2017, 705-707, DOI: 10.1038/ja.2016.167
- ③Nogawa T, Okano A, Lim CL, Futamura Y, Shimizu T, Takahashi S, Ibrahim D, Osada H, Opantimycin A, a new metabolite isolated from *Streptomyces* sp. RK88-1355, The Journal of Antibiotics, 査読有, 70, 2017, 222-225, DOI: 10.1038/ja.2016.113
- ④Jang JP, Takahashi S, Futamura Y, Nogawa T, Jang JH, Ahn JS, Osada H, RK-144171, a new benadrostin derivative produced by *Streptomyces* sp. RK88-1441, The Journal of Antibiotics, 査読有, 70, 2017, 102-104, DOI: 10.1038/ja.2016.65
- ⑤Kim JW, Ko SK, Kim HM, Kim GH, Son S, Kim GS, Hwang GJ, Jeon ES, Shin KS, Hong YS, Oh H, Lee KH, Soung NK, Hashizume D, Nogawa T, Takahashi S, Kim BY, Osada H, Jang JH, Ahn JS, Stachybotrysin, an osteoclast differentiation inhibitor from the marine-derived fungus *Stachybotrys* sp. KGB13F013, Journal of Natural Products, 査読有, 79, 2016, 2703-2708, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00641
- ⑥Miyazawa T, Takahashi S, Kawata A, Panthee S, Hayashi T, Shimizu T, Nogawa T, Osada H, Identification of middle chain fatty acyl-CoA ligase responsible for the biosynthesis of 2-alkylmalonyl-CoA for polyketide extender unit, The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 290, 2015, 26994-27011, DOI: 10.1074/jbc.M115.677195
- ⑦Lim CL, Nogawa T, Okano A, Futamura Y, Kawatani M, Takahashi S, Ibrahim D, Osada H, Unantimycin A, a new neoantimycin analog isolated from a microbial metabolite fraction library, The Journal of Antibiotics, 査読有, 69, 2015, 456-458, DOI: 10.1038/ja.2015.124
- ⑧Kato N, Nogawa T, Hirota H, Jang JH, Takahashi S, Ahn JS, Osada H, A new enzyme involved in the control of stereochemistry in the decalin formation during equisetin biosynthesis, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 460, 2015, 210-215, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.011
- ⑨Hayase H, Watanabe N, Lim CL, Nogawa T, Komatsuya K, Kita K, Osada H, Inhibition of malaria growth by quinomycin A and its derivatives through DNA-intercalating, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 79, 2015, 633-635, DOI: 10.1080/09168451.2014.987205
- ⑩Jang JP, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Futamura Y, Shimizu T, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H, RK-270A-C, new oxindole derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library of

Streptomyces sp. RK85-270, The Journal of Antibiotics, 査読有, 68, 2015, 293-295, DOI: 10.1038/ja.2014.141

①Takahashi S, Nagano S, Nogawa T, Kanoh N, Uramoto M, Kawatani M, Shimizu T, Shiro Y, Osada H, Structure function analysis of cytochrome P450revI involved in reveromycin A biosynthesis and evaluation of the biological activity of its substrate, reveromycin T, The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 299, 2014, 32446-32458, DOI: 10.1074/jbc.M14.598391

②Lim CL, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Hongo Y, Nakamura T, Koshino H, Takahashi S, Ibrahim D, Osada H, RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening, The Journal of Antibiotics, 査読有, 67, 2014, 323-329, DOI: 10.1038/ja.2013.144

③野川俊彦、長田裕之、NPPlot (Natural Products Plot) を活用した天然化合物の探索、科学と生物、査読有、52 巻、2014、395-402、https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=175&back_bn_show=15&bt=on

[学会発表] (計 19 件)

①Nogawa T, Osada H, Application of microbial and plant metabolites fraction library for a chemical biology study, 2017 年 2 月 27~2017 年 2 月 28 日、ペナン (マレーシア)

②Nogawa T, Okano A, Otaka J, Osada H, Application of a fraction library for new metabolites search, CSRS-ITbM joint workshop, 2017 年 1 月 12 日、名古屋大学(愛知・名古屋)

③野川俊彦、Lim CL、岡野亜紀子、二村友史、清水猛、高橋俊二、長田裕之、放線菌 *Streptomyces* sp. RK88-1355 より単離した新規 Opantimycin A の構造、第 58 回天然有機化合物討論会、2016 年 9 月 15、東北大学 (宮城・仙台)

④Jang JP, Nogawa T, Takahashi S, Ahn JS, Osada H, RK144171, a new beadrostin derivative produced by *Streptomyces* sp. RK88-1441, 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)

⑤野川俊彦、Lim CL、岡野亜紀子、二村友史、川谷誠、高橋俊二、Ibrahim D、長田裕

之、微生物フラクションライブラリーより単離した新規ネオアンチマイシン類縁体ウンチマイシン A の構造、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)

⑥Nogawa T, Okano A, Jang JP, Shimizu T, Takahashi S, Osada H, Isolation of new metabolites from a microbial metabolites fraction library by NPPlot screening, 環太平洋国際化学会議、2015 年 12 月 18 日、ホノルル (アメリカ)

⑦加藤直樹、野川俊彦、廣田洋、高橋俊二、Jang JH, Ahn JS、長田裕之、エキセチン合成における立体選択的なデカリン環形成に関わる新規酵素遺伝子 *fsa2* の発見、第 57 回天然有機化合物討論会、2015 年 9 月 9 日、県民ホール (神奈川・横浜)

⑧野川俊彦、Jang JP、Lim CL、岡野亜紀子、本郷やよい、中村健道、高橋俊二、長田裕之、フラクションライブラリーとスペクトルデータベースを利用した新規化合物探索、第 63 回質量分析総合討論会、2015 年 6 月 18 日、つくば国際会議場 (茨城・つくば)

⑨Jang JP, Nogawa T, Hongo Y, Shimizu T, Okano A, Futamura Y, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H, Isolation of new cyclic depsipeptides from a microbial metabolites fraction library by NPPlot screening, RIKEN-KRIBB Chemical Biology Joint Symposium, 2015 年 5 月 22 日、理研 (埼玉・和光)

⑩Nogawa T, Okano A, Lim CL, Osada H, A microbial metabolites fraction library with NPPlot for discovery of new metabolites, RIKEN-Max Plank Research Center Center for Systems Chemical Biology The Fourth Symposium, 2015 年 5 月 13 日、ポートアイランド (兵庫・神戸)

⑪岡野亜紀子、野川俊彦、高橋俊二、長田裕之、微生物代謝産物フラクションライブラリーとスペクトラムデータベースを用いた新規化合物の探索、第一回産総研・理研 触媒化学分野ジョイントワークショップ、2015 年 4 月 27 日、理研 (埼玉・和光)

⑫長田麻由佳、野川俊彦、鈴木龍一郎、高橋俊二、白瀧義明、長田裕之、マメ科植物クララ *Sophora flavescens* の LC/MS を用いたメタボロミクスによる産地比較、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山・岡山)

⑬Jang JP, Nogawa T, Hongo Y, Shimizu T, Okano A, Futamura Y, Takahashi S, Ahn

JS, Osada H, Isolation of new cyclic depsipeptides from a microbial metabolites fraction library by NPPlot screening, 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山・岡山)

⑭野川俊彦、高橋俊二、高木海、関山恭代、岡野亜紀子、川谷誠、清水猛、長田裕之、アルコール添加による新規リペロマイシン誘導体の創製と生合成機構の考察、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学 (岡山・岡山)

⑮Nogawa T, Okano A, Lim CL, Takahashi S, Osada H, Construction of a microbial metabolite fraction library with NPPlot for discovery of novel metabolites, Natural product discovery & development in the post genomic era, 2015 年 1 月 11 日～2015 年 1 月 14 日, サンディエゴ (アメリカ)

⑯寺井敦高、高橋俊二、野川俊彦、橋本絢子、新家一男、池田治生、川崎寿、長田裕之、Verticilactam 生合成遺伝子クラスターの解析、生物生産工学研究センターシンポジウム、2014 年 12 月 8 日、東京大学 (東京)

⑰渡邊信元、早瀬大貴、Lim CL、野川俊彦、小松谷啓介、北潔、長田裕之、キノマイシン誘導体は DNA 挿入活性で抗マalaria 効果を示す、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

⑱野川俊彦、新規機能性成分探索に向けたじゃがいもフラクションライブラリーの作製、次世代バレイショセミナー、2014 年 11 月 8 日、十勝川温泉 (北海道・帯広)

⑲野川俊彦、Jang JP、本郷やよい、清水猛、浦本昌和、岡野亜紀子、二村友史、高橋俊二、Ahn JS、長田裕之、微生物代謝産物フラクションライブラリーより単離した新規環状デプシペプチドの構造、第 56 回天然有機化合物討論会、2014 年 10 月 15 日、県民文化ホール (高知県・高知)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.cbrg.riken.jp/csrs/ja/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
野川 俊彦 (NOGAWA, Toshihiko)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源
科学研究センター・研究員

研究者番号：40462717