

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22720

研究課題名（和文）糸状菌の休眠遺伝子を覚醒するハイグロマイシンBを利用した新規天然活性物質の探索

研究課題名（英文）Screening of new bioactive natural compound using hygromycin B awakening fungal cryptic genes

研究代表者

加藤 翔（Kato, Sho）

北里大学・大村智記念研究所・特任助教

研究者番号：70875757

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はタンパク質合成阻害剤であるハイグロマイシンBを糸状菌に添加し培養することで、創薬資源と期待される新規天然物質を発見した。また、本手法は糸状菌の分類群の70%以上に適応可能であり、新規二次代謝産物を複数見出した。このような汎用性の高い代謝物生産誘導化合物は世界的に見ても例がなく、ハイグロマイシンBと糸状菌の有する新たな代謝物生産能力を見出し、創薬資源の拡充と本手法の汎用性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では化合物を添加し糸状菌を培養するという比較的簡便な手法により、新規天然物質を取得するに至った。また広範な分類群の糸状菌に対して同様に適応できることから、創薬資源としての微生物由来天然物質の生産性を大幅に向上させることが可能となった。また、糸状菌とハイグロマイシンB存在下で天然物を生産するようになることは広く保存された普遍的な現象であることが考えられるが、そのメカニズムは不明であり世界的に見ても例がないことから学術的に見ても新奇性が高い。今後詳細な分子メカニズムが明らかになればより人為的に通常不活化している未利用な天然物資源を呼び起こすことが可能となり、創薬資源の拡充になると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research, I identified new natural products expected as druggable seed treating with protein synthesis inhibitor hygromycin B. This method is enable to adapt over 70% of fungi and discovered new secondary metabolites. Such high induction of metabolite production compound don't been discovered in the past. I proved that hygromycin B and fungus have new ability of metabolite production and established expansion of drug space and effectiveness of this method.

研究分野：糸状菌生合成研究

キーワード：創薬 微生物 糸状菌 天然物 二次代謝産物 抗生物質 新規化合物

1. 研究開始当初の背景

微生物の生産する二次代謝産物は様々な構造を有し、その生理活性は長きにわたり新薬の探索源となっている(Berdy *J Antibiot.*, 2012)。申請者の研究グループにおいても、殺虫剤 inscaris のリード化合物である pyripropene、脂肪酸合成阻害剤 cerulenin など数多くの新規生物活性物質を糸状菌より発見してきた(Omura et al. *J Antibiot.*, 1993; Sano et al., *J Antibiot.*, 1967)。

近年の糸状菌ゲノム情報の進展により、実験室環境下で利用できる二次代謝産物生合成遺伝子は 8 割が休眠遺伝子であり、1~2 割程度しか活用できていない。このような遺伝子を発現することができれば新たな二次代謝産物を得ることにつながるため、新たな活性化手法が求められている。現在までに直接的な遺伝子操作による活性化や異なる微生物同士を混合培養することが取り組まれてきた。しかし、遺伝子操作にはゲノム解読や遺伝子操作等の手間や時間がかかるという問題点や、混合培養では必ずしもすべての組み合わせにおいて生産誘導が認められるわけではないため難度が高い。

このような中、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤を処理するといった簡便な手法で遺伝子の発現を変動させるケミカルエピジェネティクスという手法が確立された。しかし、10%未満の菌株に対してのみ有効であること、化合物が高価であり大量のサンプルへ供することができないという問題点がある(浅井&大島, 科学と生物, 2013)。

2. 研究の目的

現在までにハイグロマイシン B 濃度 300 µg/ml が代謝物生産へ最も有効的であり、5 つの二次代謝産物の生産誘導と、未同定であった生合成遺伝子クラスターの同定に成功した。

そこで、本申請では ハイグロマイシン B が化合物生産に与える有効性を示す糸状菌の探索、機器分析や生物活性を指標とした新規二次代謝産物のスクリーニング、生物活性を有する新規二次代謝産物の取得を目指す。

3. 研究の方法

ハイグロマイシン B が化合物生産に与える有効性を示す糸状菌の解明

申請者は既に、Fusarium 属菌以外の *Pyricularia oryzae* や *Tolypocladium album* においてハイグロマイシン B 添加により HPLC プロファイルが変化することを見出している(未発表)。当グループの一万菌株の糸状菌ライブラリーの中から種を同定した多様性に富んだ分類群の菌株を抽出する。選出された土壌由来糸状菌 100 株と植物内生糸状菌 100 株に対し、ハイグロマイシン B の有効性について検証する。

機器分析や生物活性評価を指標とした生産誘導化合物の同定

当研究グループで確立した抗細菌、抗真菌、抗原虫など 10 の生物活性評価を実施し、増殖阻害活性を示した化合物を候補化合物とする。また、HPLC と LC-MS の二種の機器分析のプロファイルから、生産誘導されたピークを選出する。生産誘導された生物活性物質を NMR、MS を用いて構造決定する。

4. 研究成果

ハイグロマイシン B が化合物生産に与える有効性を示す糸状菌の解明

当研究室が保有する糸状菌ライブラリーから分離源の異なる糸状菌 400 株に対してハイグロマイシン B 処理と未処理の条件で培養し外見と代謝物の変化を解析した。その結果、門レベルで異なる生物種に対して効果を示した。

種同定されている 258 菌株のうちハイグロマイシン B 処理による形態変化や色調変化が観察されたもの(○)は 76.7%、hygromycinB 処理により変化が観察されなかったもの() は 8.9%、評価できないもの(x, -)は 15.4%となった(Table 1)。ハイグロマイシン B 処理によって形態や色調の変化する株は子囊菌門、担子菌門、ケカビ門の株において共通していることが明らかとなった。子囊菌門は綱レベルで幅広く色調の変化や形態変化が観察された。担子菌門の菌類 FKI-10297 (*Vanrija pseudolonga*) は未処理では赤色であるが、ハイグロマイシン B 存在下では暗赤色になる。また、ケカビ門の FKI-10298 (*Mortierella humilis*) は未処理では灰色だが、ハイグロマイシン B 存在下では赤色となる。これらの結果から、ハイグロマイシン B 処理による二次代謝産物の生産誘導が門レベルで広範囲の真菌に共通して起きることが示唆された。

Table 1 種同定済み糸状菌 258 株に対するハイグロマイシン B 添加の影響

phylum	class	strain	%	○	△	×	—
Ascomycota	Dothideomycetes	50	82	41	7	0	2
	Eurotiomycetes	41	98	40	1	0	0
	Sordariomycetes	148	76	112	13	19	4
	Saccharomycetes	1	0	0	1	0	0
Basidiomycota	Agaricomycetes	3	33	1	1	1	0
	Tremellomycetes	8	25	2	1	5	0
	Cystobasidiomycetes	1	0	0	1	0	0
	Mortierellomycetes	3	33	0	0	0	0
Mucoromycetes	3	33	1	1	1	0	

機器分析や生物活性評価を指標とした生産誘導化合物の同定

代謝物比較のスクリーニングから *Phialemoniopsis prulioiculosa* FKI-10220 の F36 培養時にハイグロマイシン B 添加培養時に生産が誘導される代謝物が新規ポリケチド化合物であることが明らかとなった (Fig. 1)。糸状菌 40 株のプロススクリーニングによって生物活性がハイグロマイシン B 添加時に現れた菌株は 4 株となり、UPLC 分析によって代謝物が変化しているものは 8 株あることが明らかとなった。それらの活性物質を精製したところ *Colletotrichum simmondsii* FKI-10288 株は Colletofragarone A1 を生産し、活性本体であることが明らかとなった。また、*Aspergillus fumigatus* FKI-10241 から新規 Truncateol 類縁体や化合物生産報告のない *Bhatiellae* sp. FKI-10517 から新規 Terezine 類縁体を出来た (Fig. 2)。これらの結果より、ハイグロマイシン B が新規化合物探索研究に有用なツールであることが示唆された。

Phialemoniopsis prulioiculosa FKI-10220 (F36)

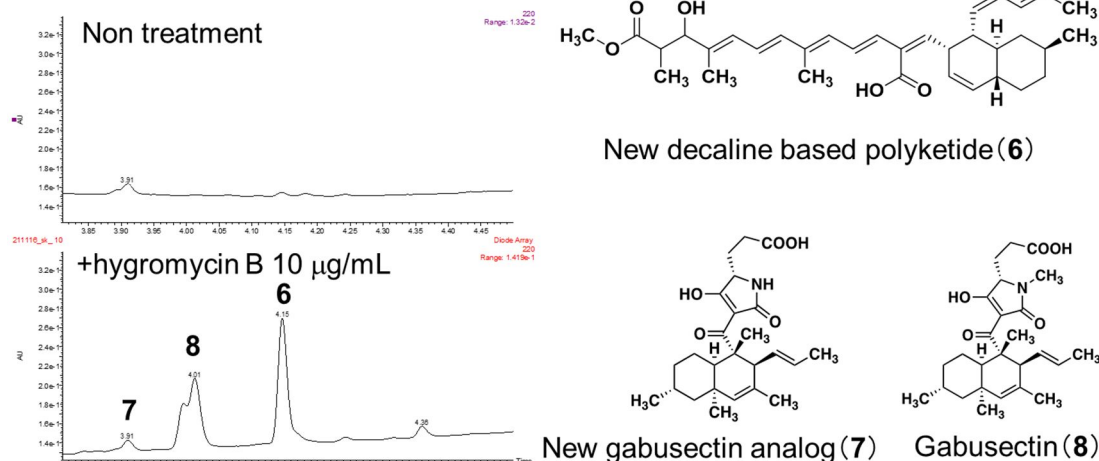


Fig. 1 FKI-10220 のハイグロマイシン B 添加によって生産される新規二次代謝産物

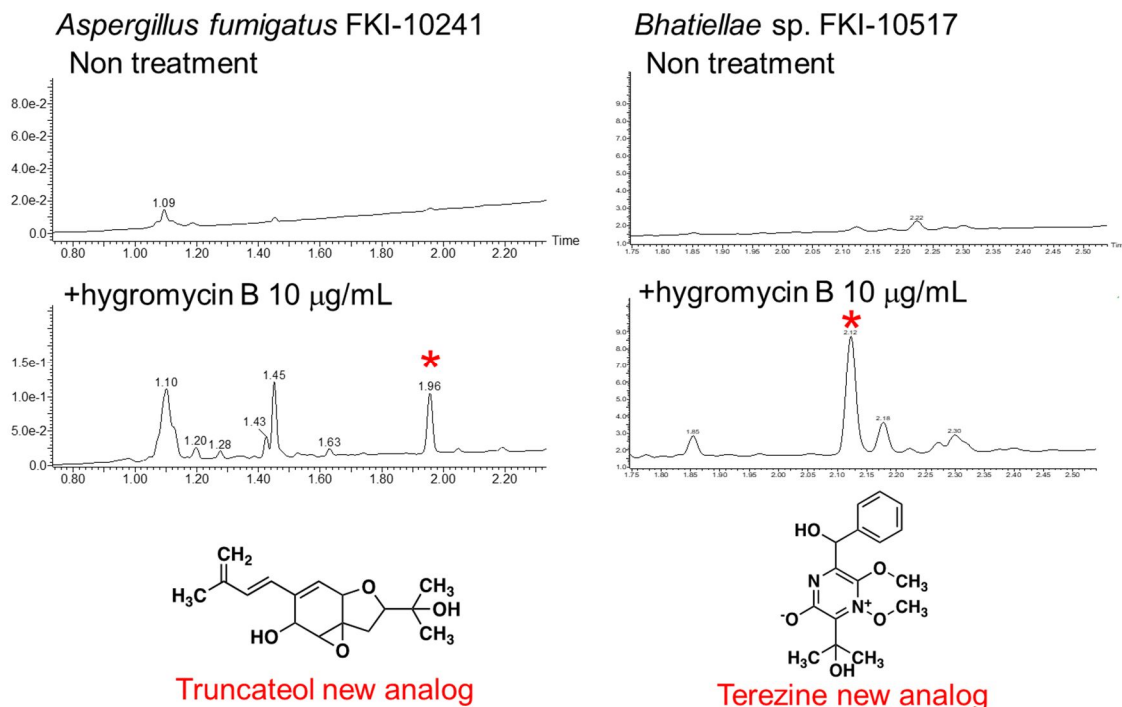


Fig. 2 FKI-10241、FKI-10517 のハイグロマイシン B 添加によって生産される新規類縁化合物

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤翔（北里大）、本山高幸（理研）、浦本雅和（理研）、野川俊彦（理研）、鎌倉高志（東理大）、長田裕之（理研）
2. 発表標題 糸状菌Fusarium sp. RK97-94におけるタンパク質合成阻害剤hygromycin B処理による二次代謝の誘導と1233A生合成遺伝子クラスターの発見
3. 学会等名 第八回目糸状菌コンファレンス若手の会ワークショップ
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------