

質量分析および主成分解析を利用した 糸状菌由来新規化合物の探索とその応用

感染制御科学専攻 創薬科学履修コース 細胞機能制御科学
DI-17004 宮野 怜

【背景・目的】

1929年、フレミングによって世界初の抗生物質である penicillin が糸状菌 *Penicillium rubruan* から発見された¹⁾。この発見は感染症の臨床治療を一変させ、天然物からの抗生物質の開発及び生産が飛躍的に進むこととなった。このように糸状菌は有用な生物活性物質を生産する重要な微生物資源である。

演者が所属する創薬資源微生物学寄附講座では、大村創薬グループが所有する微生物を培養後、培養物抽出液を作製し、高速液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (LC/MS) を用いて、その中に含まれている化合物の UV 吸収スペクトル、分子量、分子式などの物理化学的性状を収集している。この情報を天然化合物データベース (Dictionary of Natural Products (DNP) など) と照合することにより、培養物抽出液に含まれている化合物の新規性を予測することができる。この方法を physicochemical (PC) screening と称し^{2,3)}、新規化合物を探索している。

演者は、PC screening により糸状菌 *Pochonia chlamydosporia* var. *spinulospora* FKI-7537 株から抗酸化活性およびアクリルアミド生成抑制活性をもつ新規化合物 pochoniolide A, B, C^{4,5)} を取得した。この研究の過程で 18 の既知化合物を LC/MS 解析により同定した。これら 21 化合物のうち、窒素原子を含む化合物はわずか 4 化合物であった。そこで、糸状菌由来化合物における含窒素化合物の割合を DNP を用いて調査した結果、その割合は 3 割程度であった。近年のゲノム解析の結果から、糸状菌はこれまでに取得された化合物を上回る生合成遺伝子クラスターを有していることが分かっている⁶⁾。ゆえに、糸状菌は窒素を含む多くの新規化合物の生産能を有していることは容易に想像できる。また、低分子医薬品における含窒素化合物の割合をゲノム・疾患・医薬品のデータベースである KEGG MEDICUS⁷⁾ で調べたところ、81% が含窒素化合物であることが明らかになった (Fig. 1)。つまり、糸状菌の二次代謝産物から含窒素化合物を選択的に探索することで、医薬品のリードとなる化合物が効率よく得られることが期待できる。

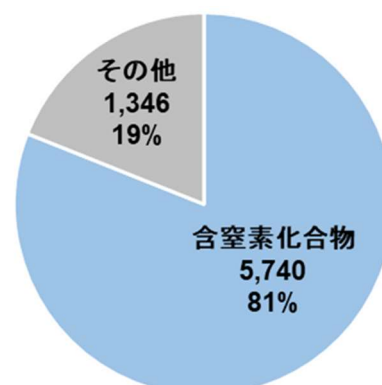


Fig. 1. 医薬品に使われている低分子化合物

そこで本発表では、質量分析および主成分解析ソフトウェアを利用した糸状菌由来選択的含窒素化合物の探索研究を報告する。

【方法・結果】

1. 生産培地の検討

糸状菌の含窒素化合物生産能を最大限活用するため、生産培地の検討を行った。含窒素化合物である gliotoxin 類 (Fig. 2) を生産する糸状菌 *Trichoderma virens* FKI-7573 株をモデル菌株として選択した。米培地 (F36 培地) を基本培地として、各種天然物 (ペプトン、ハイペプトン、NZ アミン、ファーマメディア、カツオエキス、乾燥ブイヨン各 1% 添加)、塩類 (硫酸アンモニウム 0.2%, 塩化アンモニウム 0.1%, 酢酸アンモニウム 0.2%, こはく酸アンモニウム 0.2%, 酒石酸アンモニウム 0.2%, 硝酸ナトリウム 0.2%) の窒素源を添加した培地を作製した。Gliotoxin 類をはじめ複数の二次代謝産物の生産性を指標に検討した結果、硫酸アンモニウムが最も Gliotoxin 類の生産を向上させた。また、全体的な生産性を向上させる目的できなこを添加し、新規含窒素化合物の生産に適した 4 種類の生産培地 (F36, F36+きなこ, F36+硫酸アンモニウム, F36+きなこ+硫酸アンモニウム) を決定した。

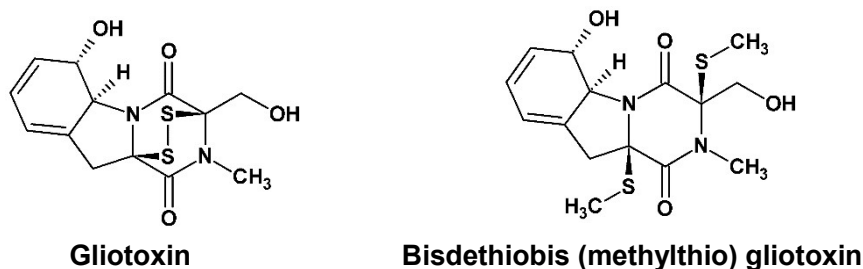


Fig. 2. Gliotoxin 類の構造式

2. 使用菌株の選択

探索源とした菌株は、大村創薬グループで長期保存されている糸状菌を 53 株と新鮮分離株の中で DNP に登録されている化合物の数が 50 件未満の属、すなわち化合物生産例が少ない分類群の糸状菌 48 株を選択した。

3. 新規含窒素化合物の探索

101 株の糸状菌を 4 種類の生産培地で 2 週間静置培養後、培養物抽出液を作製した。合計 404 サンプルの培養物抽出液を LC/HR-ESI-MS で測定した。LC/MS データを主成分解析ソフトウェア (Marker View) で解析した。Marker View を用いることで、404 サンプルに含まれていた約 13 万化合物の m/z 値、溶出時間および各化合物がどのサンプルに含まれているかを可視化するこ

とが出来る。

本研究では、含窒素化合物を容易に探索するために窒素ルールを利用した。窒素ルールとは、分子内に窒素原子を奇数個含む化合物は奇数の分子量を示すという一般則である。すなわち、分子量が奇数の化合物を選択すれば、容易に含窒素化合物を探索できる。このように、Marker View および窒素ルールを組み合わせた新規含窒素化合物の探索系を構築した。

ESI-MS では、一般的に化合物にプロトンが一個付加した陽イオンが検出されるため、 m/z 値が偶数の化合物が含窒素化合物である。Marker View を用いた約 13 万化合物の解析の結果、偶数の m/z 値を示し、かつ 1 菌株でのみ生産されている 787 化合物を見出した。さらに、基本培地よりも改変培地での生産量が多い化合物を選択し、物理化学的性状情報を DNP で検索し、新規含窒素化合物を探索した。

その結果、「分子量が奇数、1 菌株のみが生産する、改変培地で生産量が増加する」の 3 条件を満たした推定新規含窒素化合物を 4 つ見出した。

4. 新規含窒素化合物 *trichothioneic acid* について

*Trichothioneic acid*⁸⁾ は *T. virens* FKI-7573 株から得られた、分子量 509, 分子式 $C_{24}H_{35}N_3O_7S$ を示す化合物であり、*heptelidic acid* と *ergothioneine* が結合した新規含窒素化合物であった (Fig. 3)。子囊菌由来の化合物で *ergothioneine* を部分構造に有している化合物は初の報告である。*Trichothioneic acid* は活性酸素種であるヒドロキシラジカルと一重項酸素に対する消去活性を示した。この活性は抗酸化活性を示すことが知られている *ergothioneine*^{9, 10)} に起因していると推定された。

5. 新規含窒素化合物 KF-140 物質について

KF-140 物質は、大村創薬グループで発見された脂肪酸合成阻害薬 *cerulenin* の生産菌 *Sarocladium oryzae* KF-140 株より得られた、分子量 381, 分子式 $C_{19}H_{27}NO_7$ を示す新規含窒素化合物である。トリメチルシリル (TMS) ジアゾメタンによるメチル化と MS/MS フラグメント解析の結果から、本化合物は 3-ヒドロキシテトラミン酸というユニークな構造を有していることが明らかになった (Fig. 3)。この構造を有する化合物は *plicatanin A, C*¹¹⁾ 等のような植物から得られた化合物しかなく、微生物由来で初の知見であった。

6. 新規含窒素化合物 FKI-7498 A, B 物質について

FKI-7498 A, B 物質は *Oidiodendron maius* FKI-7498 株から得られた新規含窒素化合物である。FKI-7498 A 物質は分子量 417, 分子式 $C_{22}H_{27}NO_7$, FKI-7498 B

物質は分子量 431, 分子式 $C_{23}H_{29}NO_7$ である。FKI-7498 A, B 物質は 3,5-ジメトキシ-2-(4-ピリドン-3-カルボニル)安息香酸を骨格としている。この骨格を有する化合物は *Penicillium* spp. から発見された penicidone C, D^{12, 13)} のみであり、ユニークな構造である。FKI-7498 A 物質は ^{13}C NMR に置いて 21 個の炭素原子しか観測されなかったため、TMS ジアゾメタンによるカルボン酸のメチルエステル化を行うことで FKI-7498 B 物質へと変換することで構造を決定した。

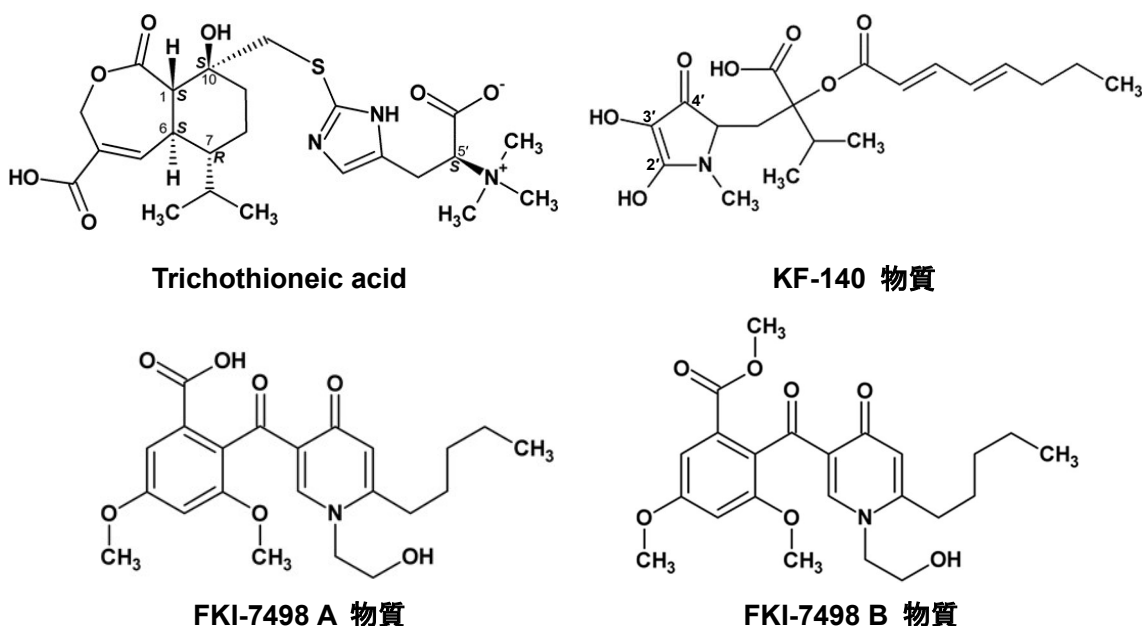


Fig. 3. 本研究で得られた新規化合物の構造式

【総括】

Glitoxin 類を生産する糸状菌 *T. virens* FKI-7573 株をモデル菌株とした培地検討を行い、含窒素化合物の生産に適した 4 種類の生産培地を決定した。101 株の糸状菌を 4 培地で培養後、培養物抽出液 404 サンプルを LC/MS で測定した。その LC/MS データを Marker View で解析し、「分子量が奇数、1 菌株のみが生産する、改変培地で生産量が増加する」の 3 条件を満たす化合物を探索し、DNP で検索した。その結果、4 つの化合物が新規含窒素化合物であると推定されたため、単離精製および構造解析を行った。

T. virens FKI-7573 株から得られた trichothioneic acid は、子囊菌由来の化合物では初となる ergothioneine を部分構造に有する化合物であり、抗酸化活性を示した。*S. oryzae* KF-140 株から得られた KF-140 物質は、微生物由来で初となる 3-ヒドロキシテトラミン酸を部分構造に有する新規含窒素化合物であった。*O. maius* FKI-7498 株から得られた FKI-7498 A, B 物質は、3,5-ジメトキシ-

2-(4-ピリドン-3-カルボニル) 安息香酸を骨格とするユニークな化合物であった。

このように、演者は窒素ルールを PC screening に取り入れ、Markew View による効率的な新規含窒素化合物の探索を行い、4 つの新規含窒素化合物を得ることが出来た。このような探索方法を実施したのは本研究が初の報告である。

【参考文献】

- 1) Fleming, A., On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Br. J. Exp. Pathol.*, **10**, 226-236 (1929).
- 2) Nakashima, T., Takahashi, Y. and Ōmura, S., Search for new compounds from Kitasato microbial library by physicochemical screening, *Biochem. Pharmacol.*, **134**, 42-55 (2017).
- 3) Takahashi, Y., and Nakashima, T., Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics, *Antibiotics*, **7**, 45-61 (2018).
- 4) Miyano, R. *et al.*, Pochoniolides A and B, new antioxidants from the fungal strain *Pochonia chlamydosporia* var. *spinulospora* FKI-7537, *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 661-666 (2018).
- 5) 新規ポコニオライド化合物及びその使用, 特願 2017-050861.
- 6) Keller, N. P., Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 167-180 (2019).
- 7) Kanehisa, M. *et al.*, KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs, *Nucleic Acids Res.*, **38**, D355-360 (2010).
- 8) Miyano, R. *et al.*, Trichothioneic acid, a new antioxidant compound produced by the fungal strain *Trichoderma virens* FKI-7573, *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2019).
- 9) Akanmu, D. *et al.*, The antioxidant action of ergothioneine, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 10-16 (1991).
- 10) Aruoma, O. *et al.*, Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 389-391 (1997).
- 11) Tabussum, A. *et al.*, α -Glucosidase inhibitory constituents from *Chrozophora plicata*, *Phytochem. Lett.*, **6**, 614-619 (2013).
- 12) Ge. H. M. *et al.*, Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp., *Phytochemistry*, **69**, 571-576 (2008).
- 13) Liu, Y. *et al.*, Polyketides with α -Glucosidase inhibitory activity from a mangrove endophytic fungus, *Penicillium* sp. HN29-3B1, *J. Nat. Prod.*, **78**, 1816-1822 (2015).