

糸状菌が生産する新たな天然物の探索法の開発と利用

2018 年 1 月

茂本 亮輔

糸状菌が生産する新たな天然物の探索法の開発と利用

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士 (農学) 学位論文

茂本 亮輔

目次

略語.....	i
序章 序論.....	1
第1章 化学反応を活用した糸状菌由来の新規天然物の探索.....	6
1. 序論.....	6
2. 材料および方法.....	7
2-1. Dimethylaminobenzaldehyde との反応性を指標としたスクリーニング.....	7
2-1-1. 糸状菌の培養抽出物の調製.....	7
2-1-2. Dimethylaminobenzaldehyde との反応性を指標としたスクリーニング.....	8
2-2. <i>Onychophora coprophila</i> JCM 9495 が生産する新規二次代謝産物.....	8
2-2-1. 使用菌株.....	8
2-2-2. 培養方法.....	8
2-2-3. Onychophoazaphilone の精製.....	8
2-2-4. Onychophoazaphilone の構造解析.....	9
2-2-5. 生理活性試験.....	10
2-3. <i>Warcupiella spinulosa</i> JCM 2358 の生産する新規二次代謝産物.....	11
2-3-1. 使用菌株.....	11
2-3-2. 培養方法.....	11
2-3-3. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の精製.....	12
2-3-4. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の構造解析.....	12
2-3-5. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl ラジカル消去活性の測定.....	12
3. 結果.....	13
3-1. Dimethylaminobenzaldehyde との反応性を指標としたスクリーニング.....	13
3-2. <i>Onychophora coprophila</i> JCM 9495 が生産する新規二次代謝産物.....	13
3-2-1. Onychophoazaphilone の同定.....	13
3-2-2. Onychophoazaphilone の生理活性.....	15
3-3. <i>Warcupiella spinulosa</i> JCM 2358 が生産する新規二次代謝産物.....	15
3-3-1. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の同定.....	15
3-3-2. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の抗酸化活性.....	17
4. 考察.....	17
第2章 サーチュイン A の活性阻害剤の単離と利用.....	53
1. 序論.....	53
2. 材料および方法.....	55
2-1. <i>Didymobotryum rigidum</i> JCM8837 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤.....	55
2-1-1. 使用菌株.....	55
2-1-2. <i>Didymobotryum rigidum</i> JCM8837 の培養方法.....	55

2-1-2. 5-Methylmellein の精製	55
2-1-3. 5-Methylmellein の構造解析	56
2-1-4. サーチュイン A 組換えタンパク質の精製	57
2-1-5. SirA の HDAC 活性の測定	57
2-1-6. 二次代謝産物の HPLC 解析	58
2-1-7. 5-Methylmellein 生産量の定量	58
2-2. <i>Emericella nidulans</i> JCM10259 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤	59
2-2-1. 使用菌株	59
2-2-2. <i>Emericella nidulans</i> JCM10259 の培養方法	59
2-2-3. Diorcinol およびその類縁体の単離	59
2-2-4. Diorcinol およびその類縁体の構造解析	60
2-2-5. Diorcinol のメチルエステル化	60
2-2-6. サーチュイン A の HDAC 活性の測定	61
2-2-7. 二次代謝産物の HPLC 解析	61
2-2-8. ウェスタンブロッティング	61
2-2-9. 定量リアルタイム PCR	62
2-2-10. クロマチン免疫沈降	63
3 結果	63
3-1. <i>Didymobotryum rigidum</i> JCM8837 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤	63
3-1-1. 5-Methylmellein の構造解析	63
3-1-2. 5-Methylmellein によるサーチュイン A の HDAC 活性の阻害	64
3-1-3. 5-Methylmellein による <i>A. nidulans</i> の二次代謝への影響	64
3-1-4. <i>D. rigidum</i> JCM8837 による 5-methylmellein 生産	65
3-2. <i>Emericella nidulans</i> JCM10259 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤	65
3-2-1. Diorcinol およびその類縁体の構造解析	65
3-2-2. Diorcinol によるサーチュイン A の HDAC 活性の阻害	66
3-2-3. Diorcinol の構造類縁体によるサーチュイン A の HDAC 活性の阻害	66
3-2-4. Diorcinol による <i>A. nidulans</i> の二次代謝への影響	67
3-2-5. Diorcinol による <i>A. nidulans</i> のヒストンアセチル化レベルへの影響	68
3-2-6. Diorcinol による sterigmatocystin 生合成遺伝子の転写への影響	68
3-2-7. Diorcinol による sterigmatocystin 生合成遺伝子のプロモーター領域のヒストン アセチル化レベルへの影響	68
3-2-8. Diorcinol による様々な糸状菌の二次代謝への影響	69
4. 考察	70
総括	95
参考文献	98

謝辭.....	103
---------	-----

略語

AcOEt : Ethyl acetate

BSA : Bovine serum albumin

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

COSY : Correlation spectroscopy

DMAB : Dimethylaminobenzaldehyde

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DO : Diorcinol

DO-Me : 3-(3-Methoxy-5-methylphenoxy)-5-methylphenol

DO-Me₂ : 5,5'-Oxybis(1-methoxy-3-methylbenzene)

DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

HDAC : Histone deacetylase

HMBC : Hetero-nuclear multiple bond coherence

HPLC : High-performance liquid chromatography

HSQC : Hetero-nuclear single quantum coherence

IC₅₀ : Inhibitory concentration 50%

MeCN : Acetonitrile

MeOH : Methanol

MS : Mass spectrometry

NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide

NMR : Nuclear magnetic resonance

PCR : Polymerase chain reaction

PD : Potato dextrose

R_f : Ratio of flow

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

ST : Sterigmatocystin

TLC : Thin-layer chromatography

TMS : Tetramethylsilane

YMS : Yeast malt sucrose

序章 序論

1. 糸状菌が生産する生理活性物質

糸状菌は古くから焼酎、味噌、醤油などの食品の醸造に用いられてきた (村上英也、1986 年)。*Aspergillus oryzae* に代表される麹菌は 2006 年に国菌に認定されるほど日本の食文化にとって重要な微生物である。また、糸状菌は多様な生理活性物質の供給源としても重要な菌群である。1929 年に、フレミングらはアオカビとして知られる *Penicillium chrysogenum* が生産する penicilin を発見した (Dias *et al.*, 2012)。これは、1940 年代に世界初の抗生物質として実用化され、感染症の予防や治療に利用されている (Bush and Bradford, 2016)。また、1969 年に単離された *Tolypocladium inflatum* が生産する cyclosporin は、自己免疫疾患の治療や臓器移植による拒絶反応を抑制するための免疫抑制剤として利用されている (Ramana *et al.*, 1999)。また、*A. terreus* が生産する lovastatin は 1980 年に単離され、冠動脈疾患と脳卒中の予防と治療に利用されている (Grundy, 1988)。これらは糸状菌が生産する生理活性物質のほんの一例であり、これまでに、医学分野において有用な化合物が糸状菌から他にも多数単離されている。

2. 糸状菌に眠る未利用天然物資源

植物や微生物などの代謝産物のうち、生命の維持、成長あるいは増殖に必須ではない物質を二次代謝産物と呼ぶ。上記の penicilin、cyclosporin、lovastatin は全て糸状菌が生産する二次代謝産物である。二次代謝産物には有用な生理活性を示すものが多いことから、医薬品や農薬などの開発を目的にこれらの探索研究が行われてきた。Bérdy らの報告によれば 2002 年までに発見された抗生物質のうち 22,500 が微生物から、13,210 が植物から、7,280 が動物から単離されている (Bérdy, 2005)。また、微生物由来の抗生物質のうち 45%は放線菌によって生産され、38%が糸状菌によって生産されることからこれらの菌群は生理活性物質の最も重要な探索源といえる。また、Pye らは 1941 から 2015

年の 74 年間の間に発見された微生物と海洋生物から単離された新規化合物の数をまとめている (Pye *et al.*, 2017)。それによれば、1970 から 1990 年にかけて高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography、HPLC) や質量分析法 (mass spectrometry、MS)、核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance、NMR) 等の化合物の分析手法の改良に伴って新規化合物の報告数は急増した。その後、1990 年代後半を境に天然資源由来の新規化合物の報告数は減少傾向にあり、微生物は生理活性物質の探索源として枯渇したと考えられてきた。一方で、近年、様々な糸状菌のゲノム DNA 配列が解読され、糸状菌のゲノムにはこれまでに見つかった数をはるかに超える二次代謝産物の生合成遺伝子群が存在することが明らかとなってきた (木下ら、2011)。例えば、*A. fumigatus* では、多くの二次代謝産物の骨格形成を担うポリケチド合成酵素と非リボソーム型タンパク質合成酵素が 14 個、およびインドールアルカロイドの合成の鍵酵素であるジメチルアリルトリプトファン合成酵素が 7 個、および二次代謝産物の合成に関与する脂肪酸合成酵素が 1 個、これらを合わせると 36 個の二次代謝産物の生合成遺伝子が存在する。一方で、本菌の二次代謝産物として報告されている化合物数は 18 個である。これまでに同定されている他のほとんどの糸状菌由来の二次代謝産物の数は *A. fumigatus* のそれよりはるかに少ないことを考えると、糸状菌には膨大な数の化合物が未発見のまま取り残されていると予測できる。このことは、スクリーニングの探索源やスクリーニング手法を工夫することによって、潜在的な糸状菌の二次代謝産物の発見が期待できることを意味する。

3. 糸状菌が生産するアルカロイド

多様な生理活性を有することが知られるアルカロイドは医薬開発において重要な化合物群である。これまでに、様々な探索研究によって 12,000 種を超えるアルカロイドが単離されてきた (Ziegler and Facchini, 2008)。これらの主な単離源は植物であるが、

一部の糸状菌もアルカロイドを生産することが知られる (Guerre, 2015)。糸状菌が生産するアルカロイドとして *Taxomyces andreanae* が生産する paclitaxel や、*Claviceps purpurea* が生産する ergot alkaloid などが知られるが、糸状菌の代表的な二次代謝産物であるポリケチドと比較するとその発見数は非常に少ない (Kinghorn, 1992; Stierle *et al.*, 1993)。一方で、多くの糸状菌のゲノム上にはジメチルアリルトリプトファン合成酵素や非リボソーム型タンパク質合成酵素といったアルカロイドの生合成に関与する遺伝子が複数存在することが明らかとなっている (Pusztahelyi *et al.*, 2015)。これらのことから、糸状菌が生産するアルカロイドには未発見のものが多数存在することが予測できる。アルカロイドの多くは環状構造を有しており、また、環状構造の内部あるいは側鎖に窒素原子を有している。これらの構造的な特徴を標的とした化学反応を活用することによって糸状菌が生産するアルカロイドを発見できると考えられる。

4. 糸状菌のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と二次代謝の関係

真核生物の DNA はヒストンタンパク質とともに折りたたまれたクロマチンと呼ばれる構造を形成し核内に存在している。真核生物に広く保存されるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) はヒストンのアミノ末端側に存在するテールドメイン中のアセチルリジン残基の脱アセチル化を触媒する (Imai *et al.*, 2000)。ヒストンの低アセチル化状態は転写が不活性なヘテロクロマチン形成を促進することから、HDAC は様々な遺伝子の発現の制御に関与する (Grunstein, 1997)。HDAC には、酵素の活性中心に亜鉛イオンを持つ亜鉛イオン型 HDAC と、アセチル化部位の加水分解時に nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) を基質として利用する NAD⁺型 HDAC の 2 種類のタイプが存在する。近年、糸状菌の一部の二次代謝がこれらの HDAC によって制御されることが明らかとなった (Itoh *et al.*, 2017; Kawauchi *et al.*, 2013; Shimizu *et al.*, 2012; Shwab *et al.*, 2007)。また、亜鉛イオン型 HDAC の阻害剤である trichostatin A や suberoyl bis-hydroxamic acid

などは、糸状菌の培養に添加することで糸状菌の二次代謝産物の生産を促進することが報告されている (Asai *et al.*, 2012; Asai *et al.*, 2013; Shwab *et al.*, 2007)。これらの阻害剤によって生産が促進された二次代謝産物の中には、これまでに天然から単離された例がない化合物が複数含まれていたことから、亜鉛イオン型 HDAC の阻害剤は糸状菌の二次代謝の活性化に有効であると考えられる。同様に、NAD⁺型 HDAC の阻害剤である nicotinamide (NAM) は糸状菌の培養に添加することで、二次代謝系の発現が誘引されることが示されている (Asai *et al.*, 2013; Asai *et al.*, 2016)。一方で、NAM を用いた糸状菌の二次代謝の活性化の研究は一部の糸状菌を用いたものに限られており、亜鉛イオン型 HDAC 阻害剤のそれに比べて非常に少ない。また、浅井らは NAM を用いた二次代謝の活性化が有効な糸状菌は 1 割程度の菌種であることを述べている (浅井ら、2013)。また、NAD⁺型 HDAC 阻害剤である sirtinol や splitomicin は、糸状菌の培養に伴い分解されることが知られており糸状菌の二次代謝の活性化に適した NAD⁺型 HDAC の阻害剤は限定的である (Asai *et al.*, 2012)。これらのことから、糸状菌の二次代謝の活性化に有効な NAD⁺型 HDAC の阻害剤を開発することによって、糸状菌が生産する新たな天然物の発見を促進できると考えられる。

5. 本研究の目的および構成

本研究では、化学反応を指標としたスクリーニング手法とサーチチェーンの活性制御の手法の開発と利用を通して、糸状菌由来の新たな二次代謝産物を獲得することを目的とした。これらの手法は天然物の構造多様性を拓げる新たな探索技術として重要であるとともに、新たな生理活性物質の開発の基盤となるものである。

本論文は二章から構成されている。第一章では、化学反応を指標としたスクリーニング手法を活用して糸状菌が生産する新規二次代謝産物の探索を行った。具体的には、アルカロイドと特異的反応する試薬である dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) と

の反応性を指標として、1140 種の糸状菌の培養抽出物を対象としたスクリーニングを行った。また、得られた新規二次代謝産物の生理活性を解明した。第二章では、*Didymobotryum rigidum* JCM8837 と *Emericella nidulans* JCM10259 の培養抽出物より、*A. nidulans* 由来のサーチュイン A (SirA) タンパク質の HDAC 活性を阻害する化合物を精製し、その同定を行った。また、得られた SirA の HDAC 活性の阻害剤を糸状菌の培養に添加し、糸状菌の代謝産物の変化、ヒストンアセチル化レベルの変化、二次代謝系遺伝子の発現量の変化などに及ぼす影響について解析した。

第1章 化学反応を活用した糸状菌由来の新規天然物の探索

1. 序論

天然物の探索研究の多くは、細胞や微生物の増殖阻害活性や表現型の観察、標的分子や酵素に対する阻害活性の測定など生理活性を指標としたスクリーニング手法を用いている (Futamura *et al.*, 2012; Grozinger *et al.*, 2001; Hirao *et al.*, 2003; Kitchen *et al.*, 2004; Sarker *et al.*, 2007)。例えば、以下に示す FK506 の探索研究が挙げられる (Kino *et al.*, 1987)。花粉症や関節リウマチなどの自己免疫疾患の原因となる過剰な免疫反応を抑制するためには、インターロイキン-2 の産生を阻害することが有効であることが知られていた。そこで、糸状菌と放線菌の培養液を探索源として用いた、マウスの細胞を利用したインターロイキン-2 の産生阻害物質のスクリーニングが行われた。これによって得られた FK506 は免疫抑制作用を持つことから臓器移植の際の拒絶反応を抑えるために用いられる他、各種の自己免疫疾患の治療に応用されている。これまでに、生理活性を指標としたスクリーニングによって医薬品やそのリード化合物等として利用される多くの化合物が単離されてきた。しかしながら、近年では構造や生理活性が既知である化合物の再発見の頻度が増加するとともに、新規化合物の取得が困難となっている (Li and Vederas, 2009)。一方で、多くの生理活性物質の探索源として用いられてきた糸状菌の二次代謝産物には、未知な天然物が多数存在することが示されている。このことは、スクリーニング手法の工夫によって糸状菌由来の未知の二次代謝産物を発見できることを示唆する。

多様な生理活性を有することが知られるアルカロイドは医薬開発において重要な化合物群である。序で述べたように、これまでに、様々なアルカロイドが主に植物から単離されてきた。一方で、糸状菌のゲノム解析の結果より、糸状菌は未知のアルカロイドを多数生産することが予測される。アルカロイドの多くは環状構造を有しており、環状構造の内部あるいは側鎖に窒素原子を有している。これらの構造的な特徴を標的とした

化学反応を活用することによって糸状菌が生産するアルカロイドを発見できると考えた。そこで本章では、糸状菌由来の 1,140 種の培養抽出物を探索源として、化学反応を指標としたスクリーニング手法を活用した新たな二次代謝産物の探索を行った。

2. 材料および方法

2-1. Dimethylaminobenzaldehyde との反応性を指標としたスクリーニング

2-1-1. 糸状菌の培養抽出物の調製

1) 使用菌株

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室から分譲された糸状菌 190 株を用いた (Table 1-1)。

2) 培養方法

全容 50 ml の試験管に分注した 10 mL の Potato dextrose 培地 (PD、Table 1-2) および Yeast malt sucrose 培地 (YMS、Table 1-3) を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。予め菌体を生育させた PD 寒天培地から、菌体を 5 mm² の大きさで切り取り植菌し、28°C、280 rpm で 7~14 日振盪培養した。

3) 抽出条件

5 mL の培養液を菌体ごと回収し、2 M NaOH を加えて pH を 10 に調整した。この培養液に 5 mL の ethyl acetate (AcOEt) を加えてボルテックスミキサーを用いて 1 分間攪拌した。しばらく静置した後に、有機層を回収し減圧下で乾燥させたものをアルカリ性抽出画分とした。残った水層に 2 M HCl を加えて pH を 3 に調整した後、5 mL の AcOEt を加えて、1 分間攪拌した。しばらく静置した後、有機層を回収し減圧下で乾燥させたものを酸性抽出画分とした。残った水層から上清を回収し、減圧下で乾燥させたものを水系画分とした。乾燥後の各画分を 40 μL の Methanol (MeOH) に溶解させたものを、スクリーニングに使用した。

2-1-2. Dimethylaminobenzaldehyde との反応性を指標としたスクリーニング

10 μ L の培養抽出物を TLC プレート (silica gel 60 F254 GLP、Merck、Kenilworth、NJ、USA) にスポットした後、展開液として MeOH を用いて展開した。展開後の TLC プレートを室温で乾燥させた後、スプレイヤーを用いて dimethylaminobenzaldehyde (DMAB、Table 1-4) を均一に噴霧した。DMAB と反応し黄色に呈色した化合物を含む培養抽出物を選抜した。

2-2. *Onychophora coprophila* JCM 9495 が生産する新規二次代謝産物

2-2-1. 使用菌株

Onychophora coprophila JCM 9495 を使用した。

2-2-2. 培養方法

1) 前培養

全容 500 mL の羽根つきフラスコに分注した 100 mL の YMS 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、予め *O. coprophila* JCM 9495 を 1~2 週間生育させた PD 寒天培地から、菌体を 5 mm² の大きさで切り取り植菌し、28°C、120 rpm で 1 週間振盪培養した。

2) 本培養

全容 5 L の羽根つきフラスコに分注した 1.5 L の YMS 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、前培養液を全量植菌し、28°C、120 rpm で 1 週間振盪培養した。なお、このフラスコを 4 本準備し合計 6 L の培養を行った。

2-2-3. Onychophoazaphilone の精製

ブフナー漏斗を用いて培養液を濾過し、菌体を取り除いた。培養上清に 60 mL の 5 M NaOH を加えた後、3 L の AcOEt と 3 L の hexane を合わせた混合有機溶媒を加えて 1 時間攪拌した。その後、有機層を回収し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒

を除去した。この混合有機溶媒を用いた抽出と溶媒の除去を3回繰り返すことによって、256 mg の黒色油状物質を得た。これを MeOH に溶解させた後、Wakosil®100C18 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を充填したカラム (φ 20 × 80 mm) に注入し、移動相を 100% 蒸留水から 100% acetonitrile (MeCN) に徐々に変化させ、22 個の画分を溶出させた。全画分を DMAB と反応させた結果、20% MeCN で溶出した画分が DMAB と反応したことから、これを濃縮することによって、10.8 mg の黒色油状物質を得た。これを MeOH に溶解させ、以下に示す条件下で HPLC に供し溶出液を分画した。保持時間 39.1 分に溶出される DMAB と反応した画分を濃縮することによって、5.7 mg の赤色油状物質を得た。

HPLC には 1260 Infinity series instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いた。カラムには 250 × 10-mm Purospher® Star RP-18 end-capped column (particle size = 5 μm, Merck, Kenilworth, NJ, USA) を用いた。この際、MeCN (solvent B) と 0.05% ammonium formate (pH7.0, solvent A) を分離溶液として用いた。流速は 3.0 mL/min、カラムオーブンの温度は 40°C とした。分離溶液の濃度勾配は以下のとおりである。0-7 分 2%B、7-17 分 2-30%B、17-40 分 30-53%B、40-43 分 53-100%B、43-50 分 100%B。

2-2-4. Onychophoazaphilone の構造解析

1) 高分解能質量分析

2-2-3 項の方法で精製した onychophoazaphilone を MeCN に溶解させ、適宜希釈した後、Synapt G2 HDMS (Waters, Milford, MA, USA) を用いて高分解能質量分析を行った。なお、サンプル管には外径 25 mm、キャップ付き高さ 58 mm の細口試薬瓶 (Nalge Nunc International, Penfield, NY, USA) を用いた。

2) NMR 解析

2-2-3 項の方法で精製した onychophoazaphilone を 500 μL の 0.05 % tetramethylsilane

(TMS) を含む Dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) に溶解させ、AVANCE III-500 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) を用いて NMR 解析を行った。なお、測定温度は 25°C とし、サンプル管には外径 5 mm、長さ 180 mm、製品名 DMS-005B (Shigemi, Tokyo, Japan) を用いた。また、¹H ケミカルシフトの値は TMS (0 ppm)、¹³C ケミカルシフトは DMSO (39.5 ppm) を基準とした。

2-2-5. 生理活性試験

Onychophoazaphilone の生理活性の測定は、独立行政法人理化学研究所 長田抗生物質研究室に依頼した。Onychophoazaphilone は DMSO に溶解し、適宜希釈して活性測定に使用した。

1) 動物細胞増殖阻害活性

HeLa 細胞 (4×10^3 cells/well) または C3H10T1/2 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 穴マイクロプレートに播種し、37°C で一晩培養後、onychophoazaphilone を添加した。HL60 細胞、tsFT210 細胞、tsNRK 細胞はそれぞれ 1.5×10^4 cells/well、 1.6×10^4 cells/well、 1.0×10^4 cells/well となるように播種し、37°C で 3 時間培養後に onychophoazaphilone を添加した。いずれの細胞も onychophoazaphilone 処理 48 時間後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いて生細胞数を測定した。

2) 抗菌活性

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 209 (S.a.)、大腸菌 *Escherichia coli* HO141 (E.c.) を 1 白金耳とり一晩前培養した。この前培養液を 1% 接種した本培養液を、96 穴マイクロプレートに播種した。播種直後に onychophoazaphilone を添加し、28°C (S.a.) または 38°C (E.c.) で 24 時間培養後、培養液の濁度 (OD₆₀₀) を測定した。*Candida albicans* JCM1542 (C.a.) の前培養液、病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* Af293 (A.f.) の孢子懸濁液をマックファーランド 0.5 に調整し、96 穴マイクロプレートに播種した。播種直後に onychophoazaphilone を添加し、28°C で 24 時間 (C.a.) または 48 時間 (A.f.) 培養後、

OD₆₀₀ を測定した。いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* kita-1 (M.o.) を二日間前培養した。この前培養液を 2%接種した本培養液を、96 穴マイクロプレートに播種した。播種直後に onychophoazaphilone を添加し、48 時間培養後、OD₆₀₀ を測定した。*Erythricium salmonicolor* MAFF625123 (E.s.) を二日間前培養した。この前培養液を 2%接種した本培養液を、96 穴マイクロプレートに播種した。播種直後に onychophoazaphilone を添加し、25°C で 72 時間培養後、OD₆₀₀ を測定した。

3) 抗マラリア活性評価

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 3D7 株、*P. falciparum* Dd2 株、*Plasmodium falciparum* K1 株を使用し、感染率 0.3%の感染赤血球を 96 穴マイクロプレートに播種し onychophoazaphilone を添加した。薬剤処理 72 時間後、OptiMAL (Flow Inc., Portland, OR, USA) を用いてマラリア原虫の生育を評価した。

2-3. *Warcupiella spinulosa* JCM 2358 の生産する新規二次代謝産物

2-3-1. 使用菌株

Warcupiella spinulosa JCM 2358 を使用した。

2-3-2. 培養方法

1) 前培養

全容 500 mL の羽根つきフラスコに分注した 100 mL の YMS 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、予め *W. spinulosa* JCM 2358 を 1~2 週間生育させた PD 寒天培地から、菌体を 5 mm² の大きさに切り取り植菌し 28°C、120 rpm で 3 日間振盪培養した。

2) 本培養

全容 5 L の羽根つきフラスコに分注した 1.5 L の YMS 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、前培養液を全量植菌し、28°C、120 rpm で 1

週間振盪培養した。なお、このフラスコを 2 本準備し、合計 3 L の培養を行った。

2-3-3. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の精製

ブフナー漏斗を用いて培養液を濾過し、菌体を取り除いた。培養上清に、培養上清の 30 mL の 2 M HCl を加えた後、3 L の AcOEt を加えて 1 時間攪拌した。その後、有機層を回収し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。AcOEt を用いた抽出と溶媒の除去を 3 回繰り返した。これを MeOH に溶解させた後、Wakosil®100C18 を充填したカラムに注入し、20% MeCN によって溶出される画分を経時的に採取した。DMAB と反応する化合物が含まれている画分を濃縮し、これを MeOH に溶解させ、以下に示す条件下で HPLC に供し溶出液を継時的に取得した。この溶出液の内、保持時間 10.2 分および 7.5 分に溶出された画分が DMAB と反応したことから、これらを濃縮することによって、6.8 mg の黄色油状物質 1 および 6.0 mg の黄色油状物質 2 を得た。

HPLC は 2-2-3 項に示した条件を一部変更して行った。具体的には、分離溶液を MeCN と 0.05 % ammonium formate (pH7.0) を 7:3 の比率で混合した溶液に変更した。

2-3-4. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の構造解析

NMR 解析は 2-1-4 項に示した条件を一部変更して行った。具体的には NMR には AVANCE III-600 spectrometer (Bruker) を用いた。また、サンプル管には 509-up-7 (Norell, Landisville, NJ, USA)を用いた。

2-3-5. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl ラジカル消去活性の測定

沖の方法に従って 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を測定した (沖 智之、2009)。精製した cordylactam および 7-hydroxycordylactam は 50% MeOH を用いて 62.5 - 2000 μ M の濃度で希釈したものを試料とした。96 穴マイクロプレート中で 50 μ L の 200 μ M 2-morpholinoethanesulphonic acid 緩衝液 (pH 6.0) と 100 μ L の試料を混

合した。これに 50 μ L の 800 μ M DPPH 溶液を加えることによって反応を開始した。25°C で反応し、20 分後の 520 nm の吸光度を測定した。吸光度を 50%減少させる試料濃度を inhibitory concentration 50% (IC₅₀) の値として算出した。

3. 結果

3-1. Dimethylaminobenzaldehyde との反応性を指標としたスクリーニング

アルカロイドと特異的に反応する試薬を検索して DMAB を選抜した。DMAB は HCl を触媒として常温常圧の条件下でアニリンやインドールと反応し、黄色の呈色を示す化合物を生成する (Figure 1-1、Jin *et al.*, 2008)。TLC プレート上にスポットしたクロロアニリンに対して DMAB の反応性を検討したところ、その検出限界は 10 mg/L であった (Figure 1-2)。また、糸状菌の培養抽出物には様々な色素が含まれていた。そこで、予め TLC プレート上で培養抽出物を展開し、それぞれの培養抽出物中に含まれる化合物を分離した上で DMAB を用いて呈色させることによって、DMAB との反応により呈色する化合物を特異的に検出できた (Figure 1-3)。1,140 個の糸状菌の培養抽出物に対して DMAB を指示薬としたスクリーニングを行ったところ、44 株の菌株に由来する 74 個の培養抽出物に DMAB と反応し黄色の呈色を示す化合物が含まれていたことから、これらをアルカロイド含有培養抽出物として選抜した (Table 1-5)。使用培地ごとの内訳は PD 培地由来の培養抽出物 29 個、YMS 培地由来の培養抽出物 45 個であった。また、抽出条件ごとの内訳では、酸性抽出画分 28 個、アルカリ性抽出画分 28 個、水系画分 18 個であった。

3-2. *Onychophora coprophila* JCM 9495 が生産する新規二次代謝産物

3-2-1. Onychophoazaphilone の同定

精製した化合物は赤色油状であった。また、これを HPLC に供したところ、純度は

99%であった (Figure 1-4)。精製した化合物は $m/z=275.1695$ を示す $[M+H]^+$ イオンピークを与えたことから、その分子式は $C_{16}H_{18}O_4$ ($[M+H]^+=275.1714$) であると予測された。DMSO 中で測定した精製した化合物の 1H および ^{13}C NMR、 1H - 1H Correlation spectroscopy (COSY)、Hetero-nuclear single quantum coherence (HSQC)、Hetero-nuclear multiple bond coherence (HMBC) スペクトルを Figure 1-5、1-6、1-7、1-8、1-9 にそれぞれ示した。精製した化合物の 1H -および ^{13}C -NMR スペクトルから得られたケミカルシフトの値を Table 1-6 にまとめた。ケミカルシフトの値と HSQC スペクトルの解析によって、本化合物は 2 個のカルボニル炭素、6 個のオレフィン炭素、2 個の芳香族四級炭素、四級炭素、メチン炭素、メチレン炭素、3 個のメチル炭素、 D_2O 交換性水素を有することが明らかとなった。 1H - 1H COSY および HMBC 解析で観測された相関を Figure 1-10 に示した。HMBC スペクトルにおいて H-1 と C-8a との相関、H-4 と C-3、C-4a、C-8a との相関、H-5 と C-4、C-6、C-7、C-8a との相関、H-8 と C-8a との相関がそれぞれ観測されたことから、本化合物が dihydroisochromen-6-one 構造を骨格として持つアザフィロンであることが示された。また、 1H - 1H COSY スペクトルにおいて、H-10 と H-11 および H-11 と H-12 の相関が観測され、HMBC スペクトルにおいて H-10 と C-3 との相関が観測されたことから、3 位の炭素にプロピレンが結合することが明らかとなった。加えて、H-10 と H-11 とのカップリング定数が 16.6 Hz であることから、このプロピレン中の二重結合がトランスの立体配置にあることが示された。また、HMBC スペクトルにおいて H-9 と C-7 および C-6 との相関と 7-OH と C-7 および C-8 との相関が観測されたことから 7 位の炭素にメチル基と水酸基が結合することが示された。また、HMBC スペクトルにおいて H-15 と C-13 および C-14 への相関が観測されたことと、 1H - 1H COSY スペクトルにおいて H-8 と H-13 との相関が観測されたことから 8 位の炭素に 14 位の炭素がケトンに置換されたブタンが結合することが示された。これらのことから、本化合物の構造は (E)-7-hydroxy-7-methyl-8-(2-oxopropyl)-3-(prop-1-en-1-yl)-7,8-dihydro-6H-

isochromen-6-one であることが示された (Figure 1-11)。本化合物は新規化合物であり、これまでに *Onychophora* 属の糸状菌からアザフィロンが単離された報告はないことから、本化合物を onychophoazaphilone と名付けた。

3-2-2. Onychophoazaphilone の生理活性

Onychophoazaphilone の生理活性を Table 1-8 に示した。Onychophoazaphilone は抗菌および抗真菌活性とマラリア原虫に対する増殖阻害活性を示さなかった。Onychophoazaphilone の HeLA および HL-6 細胞に対する IC₅₀ の値はそれぞれ 60、53 μM であったことから、本化合物はがん細胞に対する増殖阻害活性を有することが明らかとなった。

3-3. *Warcupiella spinulosa* JCM 2358 が生産する新規二次代謝産物

3-3-1. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の同定

W. spinulosa JCM 2358 の培養液中には、DMAB と反応し呈色を示す化合物が 2 種含まれていた。精製したこれらはともに黄色油状であった。また、これらを HPLC に供したところ、純度はともに 99% であった (Figure 1-12)。黄色油状物質 1 は、 $m/z = 250.1085$ を示す $[M+H]^+$ イオンピークを与えたことから、その分子式は C₁₃H₁₅NO₄ ($[M+H]^+ = 250.1074$) であると予測された。DMSO 中で測定した黄色油状物質 1 の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルから得られたケミカルシフトの値を Table 1-9 にまとめた。ケミカルシフトの値と HSQC スペクトルの解析によって、本化合物は 2 個のカルボニル炭素、2 個のオレフィン炭素、4 個の芳香族四級炭素、メチン炭素、2 個のメチレン炭素、2 個のメチル炭素、2 個の D₂O 交換性水素を有することが明らかとなった。また、¹H-¹H COSY および HMBC 解析で観測された相関を Figure 1-13 に示した。HMBC スペクトルにおいて 3-OH と C-2 および C-4 との相関、6-NH と C-4a、C-5、C-7、C-7a との相関、H-8 と C-7a との相関がそれぞれ観測されたことから、本化合物が γ -lactam と 4-pyrone からな

る縮合環構造を有することが示された。また、 ^1H - ^1H COSY スペクトルにおいて H-9 と H-10、H-10 と H-11、H-11 と H-12、H-12 と H-13 の相関がそれぞれ観測され、HMBC スペクトルにおいて H-9 と C-2 との相関が観測されたことから、2位の炭素にペンタンが結合することが明らかとなった。また、H-9 と H-10 とのカップリング定数が 16.1 Hz であることから、この鎖中の二重結合がトランスの立体配置にあることが示された。これらのことから、本化合物は既知のアルカロイドである cordylactam であると同定した (Figure 1-14)。

黄色油状物質 2 は、 $m/z = 266.1014$ を示す $[\text{M}+\text{H}]^+$ イオンピークを与えたことから、その分子式は $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 266.1023$) であると予測された。DMSO 中で測定した本化合物の ^1H および ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC スペクトルを Figure 1-15、1-16、1-17、1-18、1-19 にそれぞれ示した。 ^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルの解析から得られたケミカルシフトの値を Table 1-10 にまとめた。ケミカルシフトの値と HSQC スペクトルの解析によって、本化合物は 2 個のカルボニル炭素、2 個のオレフィン炭素、4 個の芳香族四級炭素、四級炭素、2 個のメチレン炭素、2 個のメチル炭素、3 個の D_2O 交換性水素を有することが明らかとなった。 ^1H -および ^{13}C -NMR のケミカルシフトの値は cordylactam と類似していたが、C-7 が 32.1 ppm 高磁場側にシフトしていることと、この炭素が四級炭素である点が異なっていた。また、cordylactam と比べて D_2O 交換性水素の数が一つ多かった。また、本化合物の ^1H - ^1H COSY および HMBC スペクトルにおいて観測される相関は、cordylactam の解析の際に観測されたものと類似していた。また、HMBC スペクトルにおいて 7-OH と C-7 および C-7a との相関が観測された (Figure 1-13)。これらのことから、本化合物の構造は (*E*)-3,7-dihydroxy-7-methyl-2-(pent-1-en-1-yl)-6,7-dihydropyrano[2,3-*c*]pyrrole-4,5-dione であることが示された (Figure 1-14)。本化合物は新規化合物であり、cordylactam の 7 位の炭素に水酸基が結合した構造であることから 7-hydroxycordylactam と名付けた。

3-3-2. Cordylactam および 7-hydroxycordylactam の抗酸化活性

DPPH は化学的に安定なラジカルであり、520 nm の波長の光を吸収する。抗酸化活性を示す化合物は DPPH を 520 nm に吸収をもたない非ラジカル体へと変換する (Figure 1-20)。Cordylactam および 7-hydroxycordylactam を添加していない時の DPPH 溶液が示す 520 nm の吸光度 100%とし、これらを添加した時の吸光度を相対値で示した (Figure 1-21)。Cordylactam および 7-hydroxycordylactam は濃度依存的に 520 nm の吸光度を減少させたことから、DPPH のラジカル消去活性を有することが示された。また、Figure 1-21 で得られた近似直線から算出された cordylactam および 7-hydroxycordylactam の DPPH ラジカル消去活性の IC₅₀ は、それぞれ 340 ± 4、340 ± 9 μM であった。

4. 考察

本章では、糸状菌由来の培養抽出物を探索源として、化学反応を指標としたスクリーニング手法を活用した新たな二次代謝産物の探索を行った。化学反応を指標としたスクリーニング手法として、アルカロイドと DMAB の反応を利用した。DMAB は常温常圧の条件下でアルカロイドと呈色反応することから、この手法によって簡便に多検体をスクリーニングすることができた。また、chloroaniline の DMAB に対する検出限界は 10 mg/L であった (Figure 1-2)。DMAB は縮合する相手によって生成する化合物が異なるため、その検出限界も異なることが考えられる。本スクリーニングの対象とした糸状菌の培養抽出物は、培養液を 125 倍に濃縮した濃度に相当することから、糸状菌の生産するアルカロイドの検出限界が chloroaniline のそれと同程度であると仮定すると、理論的には糸状菌が 80 μg/L 以上の濃度で生産するアルカロイドを検出可能である。第二章の Figure 2-13 において、*A. nidulans* の代表的な二次代謝産物である sterigmatocystin (ST) の生産量は 2 mg/L 程度であったことを考慮すると、本スクリーニング法の検出限界は、糸状菌の生産するアルカロイドのスクリーニングに適用可能な範囲であることが推察

される。

190 種の糸状菌に由来する 1,140 種の培養抽出物を対象としたスクリーニングを行った結果、44 株の糸状菌に由来する 74 種の培養抽出物が選抜された。また、DMAB と呈色反応する化合物の R_f 値がそれぞれ異なることから、多種の糸状菌が様々なアルカロイドを生産していることが推察された。選抜された培養抽出物から DMAB と反応する化合物を精製し、その構造を解析することによって、*O. coprophila* JCM 9495 と *W. spinulosa* JCM 2358 由来の培養抽出物から新規化合物を発見することができた。*O. coprophila* JCM 9495 の生産する onycofhoazaphilone はアザフィロンに属する化合物であった。これまでに、主に子囊菌類に属する糸状菌由来の 370 種以上のアザフィロンが単離されている (Gao *et al.*, 2013)。Onycofhoazaphilone はこれまでに報告されたいずれのアザフィロンとも異なる構造を有している新規化合物であった。ヒトのガン細胞である HeLa および HL-90 株の生育に対する Onycofhoazaphilone の IC_{50} は 60 および 53 μM であった。一方で、*Monascus purpureus* B0708 が産生する onycofhoazaphilone の構造類縁体である monapurone A のヒトのガン細胞である A549 株の生育に対する IC_{50} は 3.8 μM である (Figure 1-22、Li *et al.*, 2010)。Onycofhoazaphilone のガン細胞に対する阻害活性と monapurone A のそれを比較すると 15 倍以上弱い活性であった。Onycofhoazaphilone の絶対立体配置は明らかとなっていないが、monapurone A と同じ (7*R*,8*R*) であるならば 8 位の炭素に結合する側鎖の伸張と抗ガン活性に相関があることが推察される。今後、側鎖を伸張させた化合物を合成することによって、これらのアザフィロンの抗ガン活性のより詳細な作用解析が可能となり、新たな抗ガン剤の創出につながることを期待される。一方で、*W. spinulosa* JCM 2358 からは既知のアルカロイドである cordylactam と新規アルカロイドである 7-hydroxycordylactam が同定された。Cordylactam がこれまでに本生産菌から単離された報告はないが、本生産菌と同じ子囊菌類に属する糸状菌 *Cordyceps sp.* BCC12671 が cordylactam を生産することが知られる (Isaka *et al.*, 2013)。

7-Hydroxycordylactam はこれまで単離されたことのない新規化合物である。また、これらの化合物の骨格を形成する γ -lactam と 4-pyrone からなる縮合環構造を有する化合物は、天然物と合成化合物を合わせてもごくわずかししか知られていない。Cordylactam の構造類縁体である pyranonigrin A は抗酸化活性を有することが知られているが、cordylactam の同活性はこれまでに報告されていなかった。Cordylactam と 7-hydroxycordylactam の DPPH のラジカル消去活性に対する IC₅₀ はそれぞれ 340 ± 4、340 ± 9 μ M であったことから、これらの化合物が抗酸化活性を有することが示された。

本章では、糸状菌由来の培養抽出物に対して DMAB との反応性を指標としたスクリーニングを実施することによって、新規アザフィロンである onyphozaphilone と新規アルカロイドである 7-hydroxycordylactam を発見することができた。このスクリーニングによってアザフィロンが単離されたことから、DMAB はアルカロイド以外の化合物とも反応し呈色を示すことが分かった。スクリーニングにおけるアルカロイドに対する特異性を高めるためには、DMAB に加えてその他の呈色試薬を利用することが有効であると考えられる。例えば、ドラーゲンドルフ試薬の利用が考えられる (Furgiuele *et al.*, 1962)。これはアルカロイドと反応し橙色に呈色する。TLC プレート上で DMAB とドラーゲンドルフ試薬をそれぞれ反応させ、呈色を示す化合物の R_f 値が一致するかどうかを確かめることによって、より特異的にアルカロイドが検出できると考えられる。また、Onyphozaphilone の生産菌である *O. coprophila* JCM9495 は 1984 年に単離されており、7-hydroxycordylactam の生産菌である *W. spinulosa* JCM2358 は 1965 年に単離された糸状菌である。これらの糸状菌はそれぞれ 20 年以上前に独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室に保存されており、従来の生理活性を指標としたスクリーニングにも使用されていたことが推察される。一方で、本研究によって取得された新規化合物はそれぞれ抗ガン活性と抗酸化活性を示したが、その活性は既知化合物のそれと比較すると弱いものであった。これらのことから、発見した新規化合物は

生理活性を指標としたスクリーニング手法では見逃されてきた糸状菌の二次代謝産物であることが推察される。すなわち、本章で利用した **DMAB** との化学反応を指標としたスクリーニング手法は、従来のスクリーニングでは発見することができなかった糸状菌由来の新規化合物の取得に有効であると考えられる。天然資源からの新規化合物の発見が困難となりつつある現代において、本研究で使用したスクリーニング手法は天然物の構造多様性を広げるためのブレイクスルーとなる重要なものである。

Table 1-1 Strains used in this screening.

<u>Ascomycota (134 strains)</u>	
<i>Eurotium repens</i> JCM 1580	<i>Rhizostilbella hibisci</i> JCM 8209
<i>Cirrenalia japonica</i> JCM 1753	<i>Paecilomyces nostocoides</i> JCM 8372
<i>Edyullia athecia</i> JCM 1850	<i>Amphiporthe aculeans</i> JCM 8373
<i>Neosartorya aureola</i> JCM 1854	<i>Sordaria fimicola</i> JCM 8439
<i>Phaeocreopsis hypoxyloides</i> JCM 1880	<i>Chloridium virescens chlamydosporum</i> JCM 8806
<i>Trichoderma saturnisporum</i> JCM 1884	<i>Phaeoisaria clematidis</i> JCM 8840
<i>Chalara thielavioides</i> JCM 1933	<i>Bionectria ochroleuca</i> JCM 8906
<i>Ulocladium consortiale</i> JCM 1940	<i>Pseudaegerita corticalis</i> JCM 8986
<i>Petromyces alliaceus</i> JCM 1948	<i>Virgatospora echinofibrosa</i> JCM 9128
<i>Tolyposporium bullatum</i> JCM 2006	<i>Volutella ciliata</i> JCM 9201
<i>Hemicarpenales thaxteri</i> JCM 2264	<i>Acremonium murorum</i> JCM 9204
<i>Warcupiella spinulosa</i> JCM 2358	<i>Plectosporium tabacinum</i> JCM 9207
<i>Emericella violacea</i> JCM 2725	<i>Beverwykella pulmonaria</i> JCM 9230
<i>Fennellia nivea</i> JCM 2732	<i>Clathrosphaerina zalewskii</i> JCM 9246
<i>Sporothrix inflata</i> JCM 2920	<i>Helicoon fuscosporum</i> JCM 9262
<i>Graphilbum pleomorphum</i> JCM 3810	<i>Helicosporium lumbricoides</i> JCM 9264
<i>Alternaria alternata</i> JCM 5800	<i>Ophiostoma japonicum</i> JCM 9366
<i>Didymostilbe matsushimae</i> JCM 5953	<i>Verticillium dahliae</i> JCM 9509
<i>Pesotum piceae</i> JCM 6017	<i>Onygena corvina</i> JCM 9546
<i>Arthrimum phaeospermum</i> JCM 6018	<i>Pestalotiopsis sp.</i> JCM 9685
<i>Cephalophora tropica</i> JCM 6019	<i>Chaetopsina fulva</i> JCM 9754
<i>Cladosporium herbarum</i> JCM 6023	<i>Ceratocystis fujiensis</i> JCM 9810
<i>Exophiala calicioides</i> JCM 6030	<i>Kionochaeta spissa</i> JCM 9817
<i>Trochophora simplex</i> JCM 6038	<i>Sesquicillium candelabrum</i> JCM 9871
<i>Paecilomyces carneus</i> JCM 6870	<i>Gibberella zeae</i> JCM 9873
<i>Ceratocystis paradoxa</i> JCM 6961	<i>Penicillium arenicola</i> JCM 9929
<i>Conioscypha japonica</i> JCM 7247	<i>Chaetomella raphigera</i> JCM 9995
<i>Acremonium alcalophilum</i> JCM 7366	<i>Spicellum roseum</i> JCM 10014
<i>Graphium putredinis</i> JCM 7866	<i>Monocillium indicum</i> JCM 10146
<i>Claussenomyces prasinulus</i> JCM 7915	<i>Niesslia exosporioides</i> JCM 10147
<i>Nectria gracilipes</i> JCM 7938	<i>Aspergillus terreus</i> JCM 10257
<i>Trichothecium roseum</i> JCM 7951	<i>Emericella nidulans</i> JCM 10259
<i>Tubercularia lateritia</i> JCM 8183	<i>Emericellopsis robusta</i> JCM 10464
<i>Emericellopsis synnematicola</i> JCM 10467	<i>Katumotoa bambusicola</i> JCM 13131
<i>Leptographium pini-densiflorae</i> JCM 10479	<i>Triplosphaeria acuta</i> JCM 13171
<i>Remersonia thermophila</i> JCM 10583	<i>Ciborinia gentianae</i> JCM 13253
<i>Cladobotryum longiramosum</i> JCM 10756	<i>Lophiotrema vitigenum</i> JCM 13534
<i>Hypomyces laeticolor</i> JCM 10758	<i>Massarina japonica</i> JCM 13537
<i>Fulvia fulva</i> JCM 10817	<i>Phaeosphaeria brevispora</i> JCM 13543
<i>Hormoconis resinae</i> JCM 11226	<i>Arthrobotryum stilboideum</i> JCM 13607
<i>Mycovellosiella natrassii</i> JCM 11228	<i>Bactrodesmium cubense</i> JCM 14126
<i>Amorphotheca resinae</i> JCM 11497	<i>Monodictys putredinis</i> JCM 14128

Continued on next page.

Table 1-1 Strains used in this screening.

<i>Zasmidium cellare</i> JCM 11499	<i>Byssosphaeria schiedermayeriana</i> JCM 14417
<i>Raffaelea quercivora</i> JCM 11526	<i>Glonium clavisorum</i> JCM 14418
<i>Epicoccum nigrum</i> JCM 11533	<i>Hysterographium fraxini</i> JCM 14420
<i>Ophiostoma botuliforme</i> JCM 11706	<i>Kirschsteiniothelia incrustans</i> JCM 14421
<i>Hypocrea ampulliformis</i> JCM 11982	<i>Rhytidhysterium rufulum</i> JCM 14423
<i>Sarocladium oryzae</i> JCM 12450	<i>Pycnostysanus azaleae</i> JCM 14516
<i>Lindgomyces breviappendiculatus</i> JCM 12701	<i>Versicolorisporium triseptatum</i> JCM 14775
<i>Nomuraea rileyi</i> JCM 12790	<i>Lophiostoma sagittiforme</i> JCM 15100
<i>Byssochlamys verrucosa</i> JCM 12807	<i>Sphaerulina myriadea</i> JCM 15565
<i>Talaromyces byssochlamydoides</i> JCM 12813	<i>Sepedonium chlorinum</i> JCM 15812
<i>Discostroma botan</i> JCM 12836	<i>Tingoldiagio graminicola</i> JCM 16485
<i>Pleomassaria swidae</i> JCM 12839	<i>Asterosporium asterospermum</i> JCM 16962
<i>Asteromassaria macroconidica</i> JCM 12843	<i>Prothemium orientale</i> JCM 16964
<i>Kalmusia scabrispora</i> JCM 12851	<i>Zygosporium echinosporum</i> JCM 17044
<i>Pseudotetraploa curviappendiculata</i> JCM 12852	<i>Zygosporium masonii</i> JCM 17058
<i>Ascocoryne sarcoides</i> JCM 12900	<i>Penicillium viticola</i> JCM 17636
<i>Bisporella citrina</i> JCM 12901	<i>Aspergillus niger</i> JCM 22282
<i>Dumontinia tuberosa</i> JCM 12903	<i>Chaetomium globosum</i> JCM 22615
<i>Gelatinipulvinella astraicola</i> JCM 12904	<i>Neurospora crassa</i> JCM 22625
<i>Lachnellula suecica</i> JCM 12908	<i>Trichoderma reesei</i> JCM 22676
<i>Lachnum palmae</i> JCM 12909	<i>Eleutherascus tuberculatus</i> JCM 22727
<i>Leptosphaeria collinsoniae</i> JCM 13073	<i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i> JCM 22783
<i>Ophiobolus anguillidus</i> JCM 13080	<i>Aspergillus aculeatus</i> JCM 22898
<i>Caryospora langloisii</i> JCM 13112	<i>Hirsutella rhossiliensis</i> JCM 23109
<i>Rousoella pustulans</i> JCM 13127	<i>Monascus pilosus</i> JCM 23155
<u>Basidiomycota (19 strains)</u>	
<i>Ustilago maydis</i> JCM 2005	<i>Exobasidium gracile</i> JCM 12917
<i>Sphacelotheca pamparum</i> JCM 2007	<i>Termitomyces</i> sp. JCM 13351
<i>Tilletia barclayana</i> JCM 2008	<i>Coprinus cinereus</i> JCM 15699
<i>Phleogena faginea</i> JCM 7930	<i>Wallemia sebi</i> JCM 8329
<i>Graphiola cylindrica</i> JCM 8214	<i>Aegerita candida</i> JCM 9227
<i>Stachycoremium parvulum</i> JCM 8826	<i>Peyronelina glomerulata</i> JCM 9266
<i>Platyglaea disciformis</i> JCM 9896	<i>Cerinosterus luteoalbus</i> JCM 2923
<i>Exidiopsis plumbescens</i> JCM 9898	<i>Rogersiomyces okefenokeensis</i> JCM 10951
<i>Flagelloscypha japonica</i> JCM 12855	<i>Calocera cornea</i> JCM 12916
<i>Marasmius maximus</i> JCM 12915	
<u>Mucoromycota (8 strains)</u>	
<i>Rhizopus delemar multiplici-sporus</i> JCM 5564	<i>Absidia glauca</i> JCM 5611
<i>Rhizopus oryzae</i> JCM 5582	<i>Mucor genevensis</i> JCM 10585
<i>Rhizopus semarangensis</i> JCM 5590	<i>Cokeromyces recurvatus</i> JCM 13612
<i>Gongronella butleri</i> JCM 5607	<i>Coemansia mojavenensis</i> JCM 11385

Continued on next page.

Table 1-1 Strains used in this screening.

<u>Deuteromycete (32 strains)</u>	
<i>Mammaria echinobotryoides</i> JCM 1930	<i>Onychophora coprophila</i> JCM 9495
<i>Wardomyces simplex</i> JCM 1937	<i>Blastophorum truncatum</i> JCM 9819
<i>Parasymphodiella longispora</i> JCM 3884	<i>Phoma glomerata</i> JCM 9944
<i>Didymostilbe aurantiospora</i> JCM 5089	<i>Ordus tribrachiatus</i> JCM 10155
<i>Endocalyx melanoxanthus melanoxanthus</i> JCM 5162	<i>Botryosporium longibrachiatum</i> JCM 11070
<i>Scytalidium flavobrunneum</i> JCM 6268	<i>Fusarium oxysporum</i> JCM 11502
<i>Bahusutrabeeja dwaya</i> JCM 6357	<i>Coremiella cubispora</i> JCM 11619
<i>Pleurodesmospora coccorum</i> JCM 6975	<i>Albophoma yamanashiensis</i> JCM 11844
<i>Papulaspora funabasensis</i> JCM 7689	<i>Synnemapestaloides rhododendri</i> JCM 12838
<i>Endocalyx cinctus</i> JCM 7946	<i>Sclerographium fuligineum</i> JCM 13424
<i>Hyalotrochophora lignatilis</i> JCM 8092	<i>Berkleasium micronesiicum</i> JCM 14127
<i>Podosporium beccarianum</i> JCM 8095	<i>Petrakia echinata</i> JCM 14130
<i>Stilbella jaapii</i> JCM 8831	<i>Neoheteroceras macrosporum</i> JCM 14566
<i>Didymobotryum rigidum</i> JCM 8837	<i>Pseudolachnella yakushimensis</i> JCM 15101
<i>Didymobotryum verrucosum</i> JCM 8839	<i>Ochroconis constricta</i> JCM 15943
<i>Spirosphaera floriformis</i> JCM 8982	<i>Candelabrum brocciatum</i> JCM 8984

Table 1-2. Composition of PD medium.

Potato Dextrose Broth	24 g
Distilled water	1000 mL
Adjust pH to 5.5	

Table 1-3. Composition of YMS medium.

Sucrose	10 g
Peptone	5 g
Yeast extract	3 g
Malt extract	3 g
Distilled water	1000 mL

Table 1-4. Composition of DMAB reagent for detection of alkaloid.

DMAB	0.8 g
H ₂ SO ₄	10 mL
Ethanol	90 mL

Table 1-5. Fungal extracts containing DMAB-reactive compounds.

strain	medium	extraction	R_f value
<i>Neosartorya aureola</i> JCM 1854	YMS	H ₂ O	0.86
<i>Trichoderma saturnisporum</i> JCM 1884	YMS	base	0.95
<i>Trichoderma saturnisporum</i> JCM 1884	PD	acid	0.96
<i>Ustilago maydis</i> JCM 2005	YMS	acid	0.88
<i>Warcupiella spinulosa</i> JCM 2358	YMS	acid	0.93
<i>Emericella violacea</i> JCM 2725	YMS	H ₂ O	0.80
<i>Emericella violacea</i> JCM 2725	PD	base	0.91
<i>Emericella violacea</i> JCM 2725	PD	H ₂ O	0.63
<i>Sporothrix inflata</i> JCM 2920	YMS	base	0.96
<i>Absidia glauca</i> JCM 5611	YMS	H ₂ O	0.35
<i>Alternaria alternata</i> JCM 5800	YMS	acid	0.86
<i>Alternaria alternata</i> JCM 5800	YMS	base	0.77
<i>Alternaria alternata</i> JCM 5800	PD	base	0.91
<i>Alternaria alternata</i> JCM 5800	PD	acid	0.94
<i>DidYMSostilbe matsushimae</i> JCM 5953	YMS	base	0.93
<i>DidYMSostilbe matsushimae</i> JCM 5953	PD	base	0.98
<i>DidYMSostilbe matsushimae</i> JCM 5953	PD	acid	0.94
<i>Pesotum piceae</i> JCM 6017	YMS	H ₂ O	0.48
<i>Bahusutrabeeja dwaya</i> JCM 6357	YMS	base	0.90
<i>Acremonium alcalophilum</i> JCM 7366	YMS	acid	0.91
<i>Acremonium alcalophilum</i> JCM 7366	YMS	base	0.88
<i>Graphiola cylindrica</i> JCM 8214	PD	acid	0.96
<i>Graphiola cylindrica</i> JCM 8214	YMS	base	0.92
<i>Graphiola cylindrica</i> JCM 8214	YMS	acid	0.93
<i>DidYMSobotryum rigidum</i> JCM 8837	PD	base	0.96
<i>DidYMSobotryum rigidum</i> JCM 8837	PD	acid	0.94
<i>DidYMSobotryum verrucosum</i> JCM 8839	PD	base	0.94
<i>DidYMSobotryum verrucosum</i> JCM 8839	YMS	base	0.96
<i>DidYMSobotryum verrucosum</i> JCM 8839	PD	acid	0.96
<i>Pseudaegerita corticalis</i> JCM 8986	YMS	base	0.96
<i>Beverwykella pulmonaria</i> JCM 9230	PD	H ₂ O	0.73
<i>Clathrosphaerina zalewskii</i> JCM 9246	PD	base	0.94
<i>Onychophora coprophila</i> JCM 9495	YMS	base	0.86

Continued on next page.

Table 1-5. Fungal extracts containing DMAB-reactive compounds.

strain	medium	extraction	R_f value
<i>Pestalotiopsis</i> sp. JCM 9685	YMS	acid	0.91
<i>Pestalotiopsis</i> sp. JCM 9685	YMS	base	0.92
<i>Ceratocystis fujiensis</i> JCM 9810	YMS	acid	0.91
<i>Ceratocystis fujiensis</i> JCM 9810	PD	acid	0.91
<i>Ceratocystis fujiensis</i> JCM 9810	YMS	base	0.92
<i>Ceratocystis fujiensis</i> JCM 9810	PD	base	0.96
<i>Penicillium arenicola</i> JCM 9929	YMS	H ₂ O	0.48
<i>Penicillium arenicola</i> JCM 9929	PD	acid	0.88
<i>Penicillium arenicola</i> JCM 9929	PD	H ₂ O	0.41
<i>Spicellum roseum</i> JCM 10014	YMS	H ₂ O	0.43
<i>Monocillium indicum</i> JCM 10146	YMS	base	0.90
<i>Monocillium indicum</i> JCM 10146	YMS	H ₂ O	0.54
<i>Monocillium indicum</i> JCM 10146	PD	acid	0.92
<i>Monocillium indicum</i> JCM 10146	YMS	acid	0.86
<i>Monocillium indicum</i> JCM 10146	PD	base	0.92
<i>Niesslia exosporioides</i> JCM 10147	YMS	H ₂ O	0.35
<i>Ordus tribrachiatus</i> JCM 10155	YMS	H ₂ O	0.96
<i>Leptographium pini-densiflorae</i> JCM 10479	YMS	H ₂ O	0.37
<i>Mycovellosiella natrassii</i> JCM 11228	PD	base	0.93
<i>Raffaelea quercivora</i> JCM 11526	YMS	acid	0.84
<i>Ophiostoma botuliforme</i> JCM 11706	PD	base	0.94
<i>Albophoma yamanashiensis</i> JCM 11844	YMS	base	0.95
<i>Sarocladium oryzae</i> JCM 12450	PD	acid	0.90
<i>Asteromassaria macroconidica</i> JCM 12843	YMS	acid	0.90
<i>Kalmusia scabriscpora</i> JCM 12851	YMS	acid	0.88
<i>Lachnum palmae</i> JCM 12909	PD	acid	0.96
<i>Lophiotrema vitigenum</i> JCM 13534	PD	acid	0.55
<i>Cokeromyces recurvatus</i> JCM 13612	YMS	H ₂ O	0.74
<i>Bactrodesmium cubense</i> JCM 14126	YMS	base	0.88
<i>Byssosphaeria schiedermayeriana</i> JCM 14417	YMS	acid	0.93
<i>Byssosphaeria schiedermayeriana</i> JCM 14417	YMS	H ₂ O	0.87

Continued on next page.

Table 1-5. Fungal extracts containing DMAB-reactive compounds.

strain	medium	extraction	R_f value
<i>Hysteroglyphium fraxini</i> JCM 14420	YMS	base	0.94
<i>Hysteroglyphium fraxini</i> JCM 14420	PD	base	0.90
<i>Hysteroglyphium fraxini</i> JCM 14420	PD	acid	0.96
<i>Rhytidhysterion rufulum</i> JCM 14423	YMS	base	0.94
<i>Rhytidhysterion rufulum</i> JCM 14423	YMS	H ₂ O	0.96
<i>Rhytidhysterion rufulum</i> JCM 14423	PD	H ₂ O	0.96
<i>Lophiostoma sagittiforme</i> JCM 15100	YMS	acid	0.93
<i>Sepedonium chlorinum</i> JCM 15812	PD	acid	0.94
<i>Penicillium viticola</i> JCM 17636	YMS	H ₂ O	0.46
<i>Penicillium viticola</i> JCM 17636	YMS	acid	0.92

Table 1-6. NMR Data for onychophorazaphilone in DMSO- d_6
(^{13}C :125 MHz, ^1H :500 MHz)

Position	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)
1	144.2	7.13, <i>s</i>
3	154.2	
4	106.3	6.28, <i>s</i>
4a	145.4	
5	105.8	5.31, <i>s</i>
6	198.1	
7	72.9	
8	40.1	3.09, <i>m</i>
8a	119.3	
9	20.6	0.93, <i>s</i> , 3H
10	123.3	6.15, <i>dd</i> (16.6, 1.1)
11	133.0	6.40, <i>qd</i> (16.6, 6.9)
12	18.2,	1.85, <i>dd</i> (6.9, 1.1), 3H
13 α	39.3	2.79, <i>m</i>
13 β	39.3	2.93, <i>dd</i> (18.3, 2.2)
14	207.1	
15	29.9	2.19, <i>s</i> , 3H
OH-7		4.99, <i>s</i>

Table 1-7. Table IC₅₀ values of onyco-phoazaphilone against various cancer cell lines, bacteria, fungi, and malaria

onycopho- azaphilone [μ M]	HeLa growth	HL60 growth	tsFT210 growth	tsNRK growth	C3H10 growth	S.a. growth	E.c. growth
0.3	98	103	102	99	100	104	97
1	100	101	104	98	103	107	96
3	101	101	105	100	102	105	97
10	100	104	110	95	109	107	95
30	95	93	109	95	116	105	94
100	18	3	70	73	128	87	97
IC ₅₀ [μ M]	60	53	>100	>100	>100	>100	>100

onycopho- azaphilone [μ M]	A.f. growth	M.o. growth	C.a. growth	E.s. growth	3D7 growth	Dd2 growth	K1 growth
0.3	103	96	120	90	100	101	101
1	141	109	118	86	100	99	98
3	105	100	125	119	100	99	99
10	87	92	127	125	99	95	97
30	74	93	125	92	97	82	85
100	141	105	116	95	10	6	14
IC ₅₀ [μ M]	>100	>100	>100	>100	57	50	54

Table 1-8. NMR summary of cordylactam and 7-hydroxycordylactam in DMSO- d_6
(^{13}C :150 MHz, ^1H :600 MHz)

Position	Cordylactam		7-Hydroxycordylactam	
	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} , multi. (J in Hz)
2	145.5		145.3	
3	141.5		142.1	
4	169.1		169	
4a	111.8		110.1	
5	165.2		163.7	
7	49.7	4.58, q (11.2)	81.8	
7a	177.3		175.4	
8	17.2	1.38, d (7.02), 3H	23.3	1.59, s
9	117.7	6.50, s	117.7	6.55, d
10	135.7	6.40, s	135.9	6.49, m
11	34.5	2.24, se (6.7), 2H	34.5	2.25, m , 2H
12	21.4	1.48, se (7.29), 2H	21.4	1.49, q (7.3), 2H
13	13.5	0.92, t (7.38)	13.5	0.92, t (6.0), 3H
6 (NH)		8.29, s		8.62, s
3-OH		9.57, s		9.68, s
7-OH				6.59, s

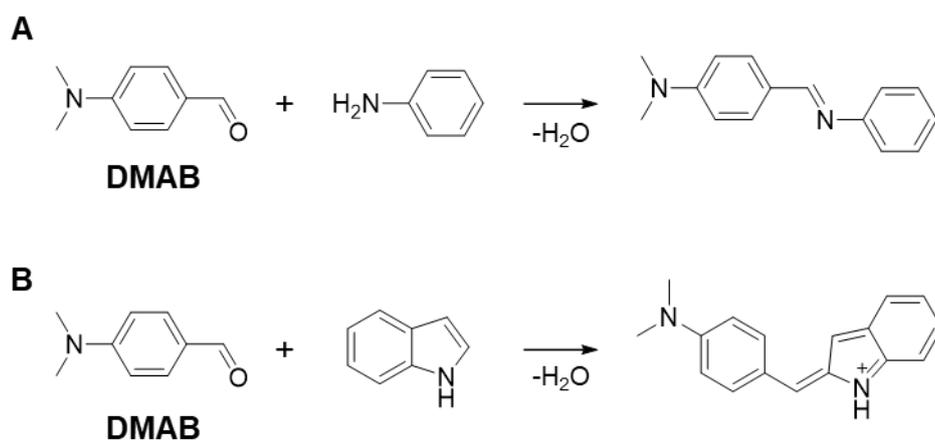


Figure 1-1. Condensation of aniline (A) and indole (B) with DMAB.

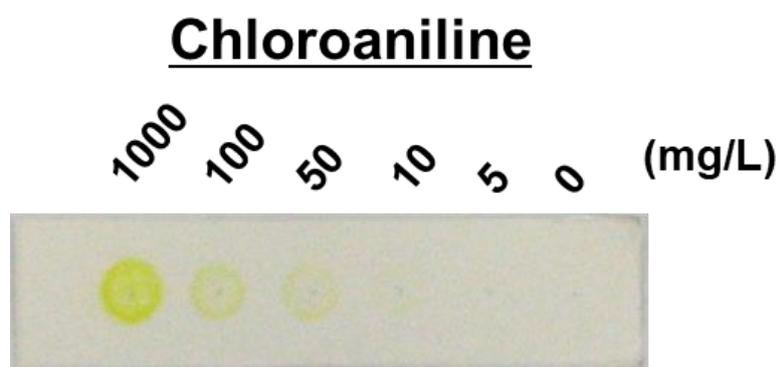


Figure 1-2. Colorimetric reaction between chloroaniline and DMAB.
The detection limit of chloroaniline was 10 mg/L.

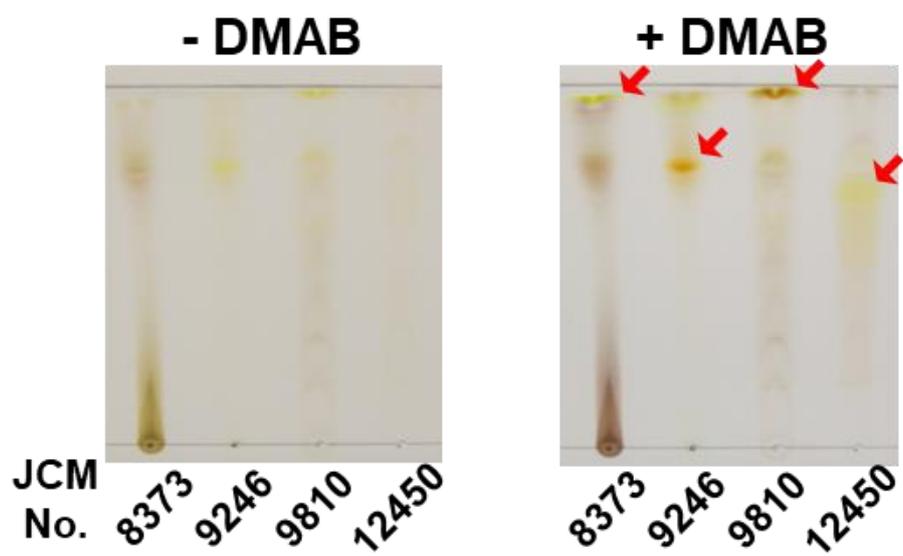


Figure 1-3. Reactions between fungal metabolites and DMAB were performed on TLC plate. Arrows indicated DMAB-reactive compounds.

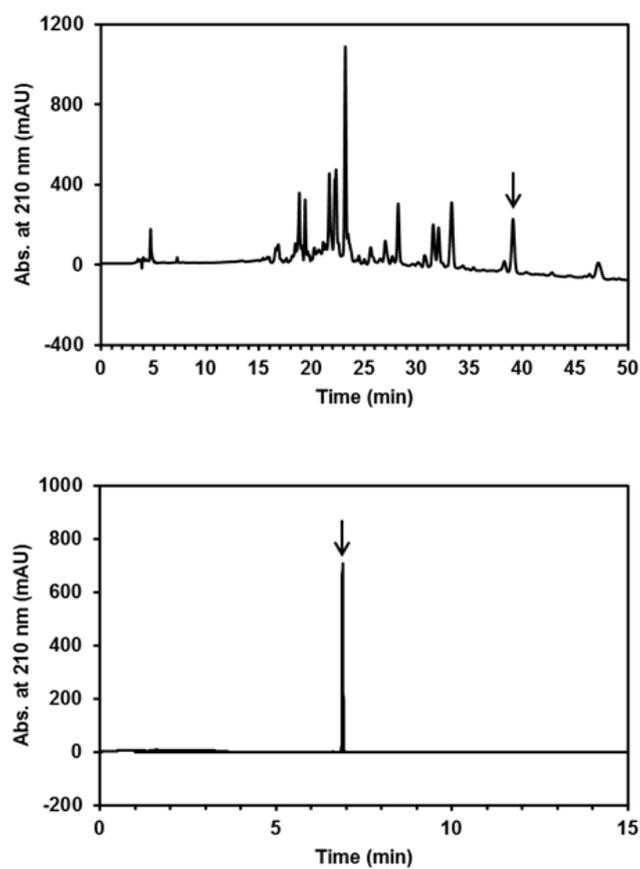


Figure 1-4. HPLC profiles of the ethyl acetate extract (above) and purified onychophoazaphilone (below) from *O.coprophila* JCM 9495. The peak of onychophoazaphilone was labeled with an arrow.

AVANCE 500 TAKAYA no JCM9495-130909

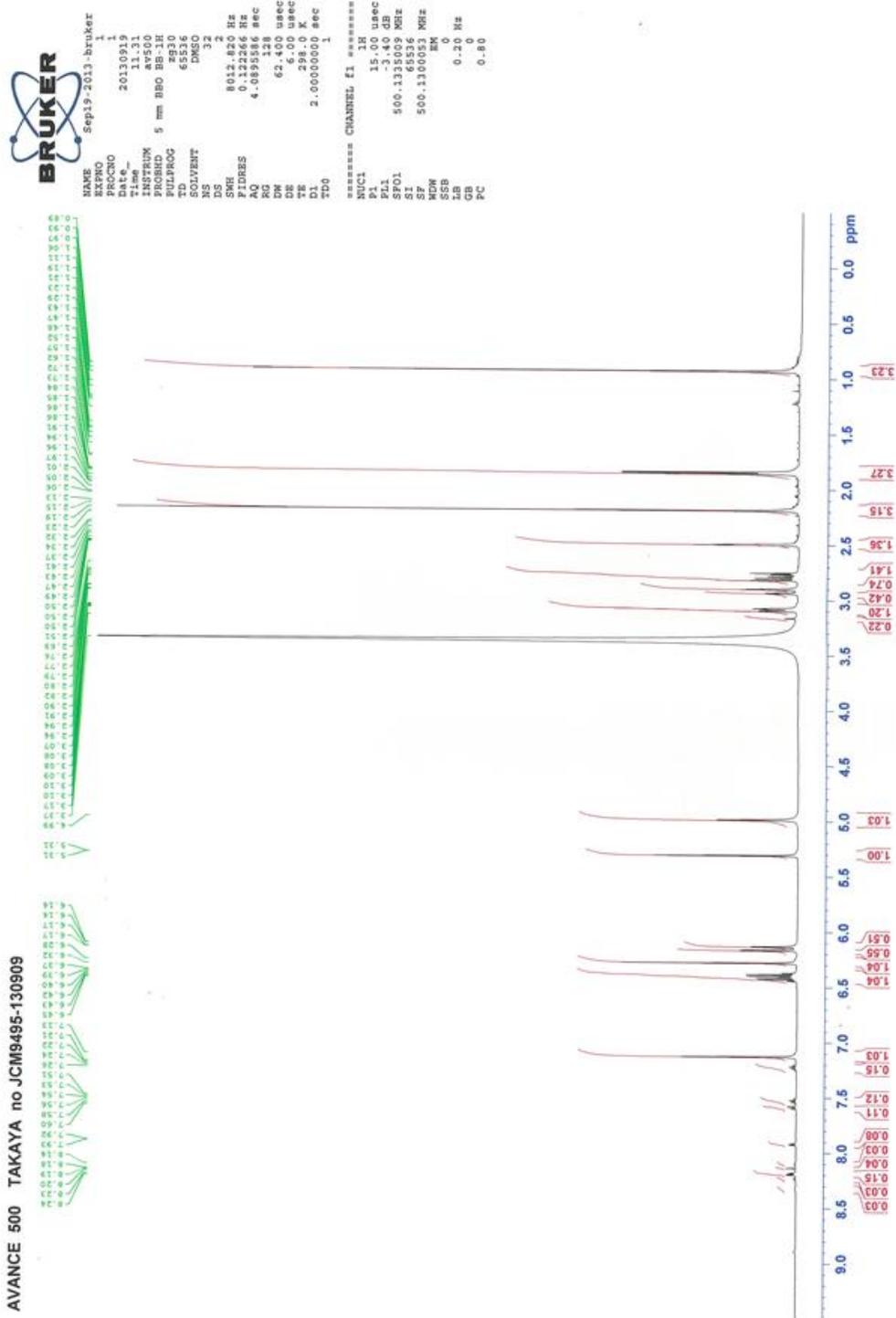


Figure 1-5. ¹H-NMR spectrum of onychophoazaphilone.

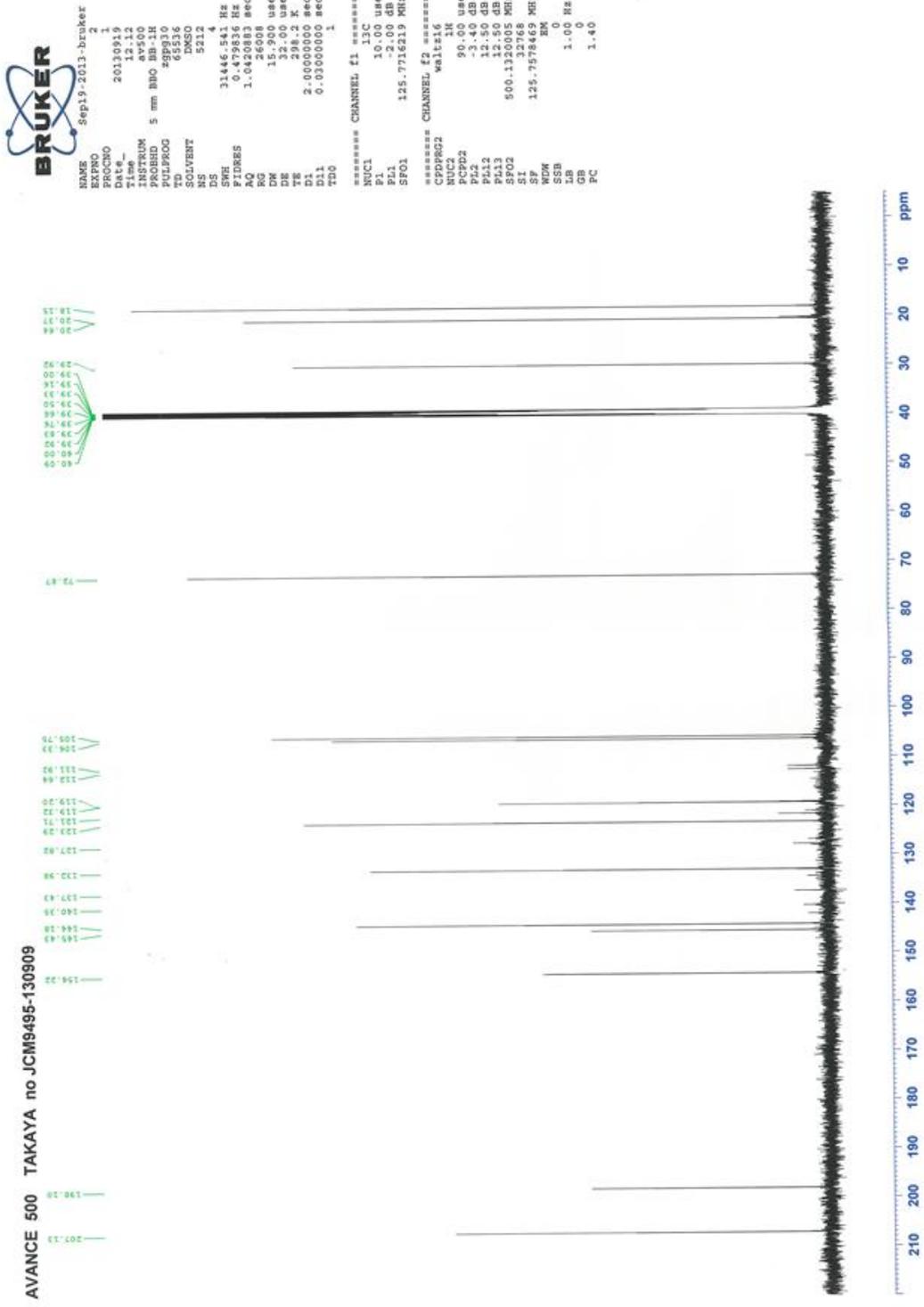


Figure 1-6. ¹³C-NMR spectrum of onychophozaphilone.

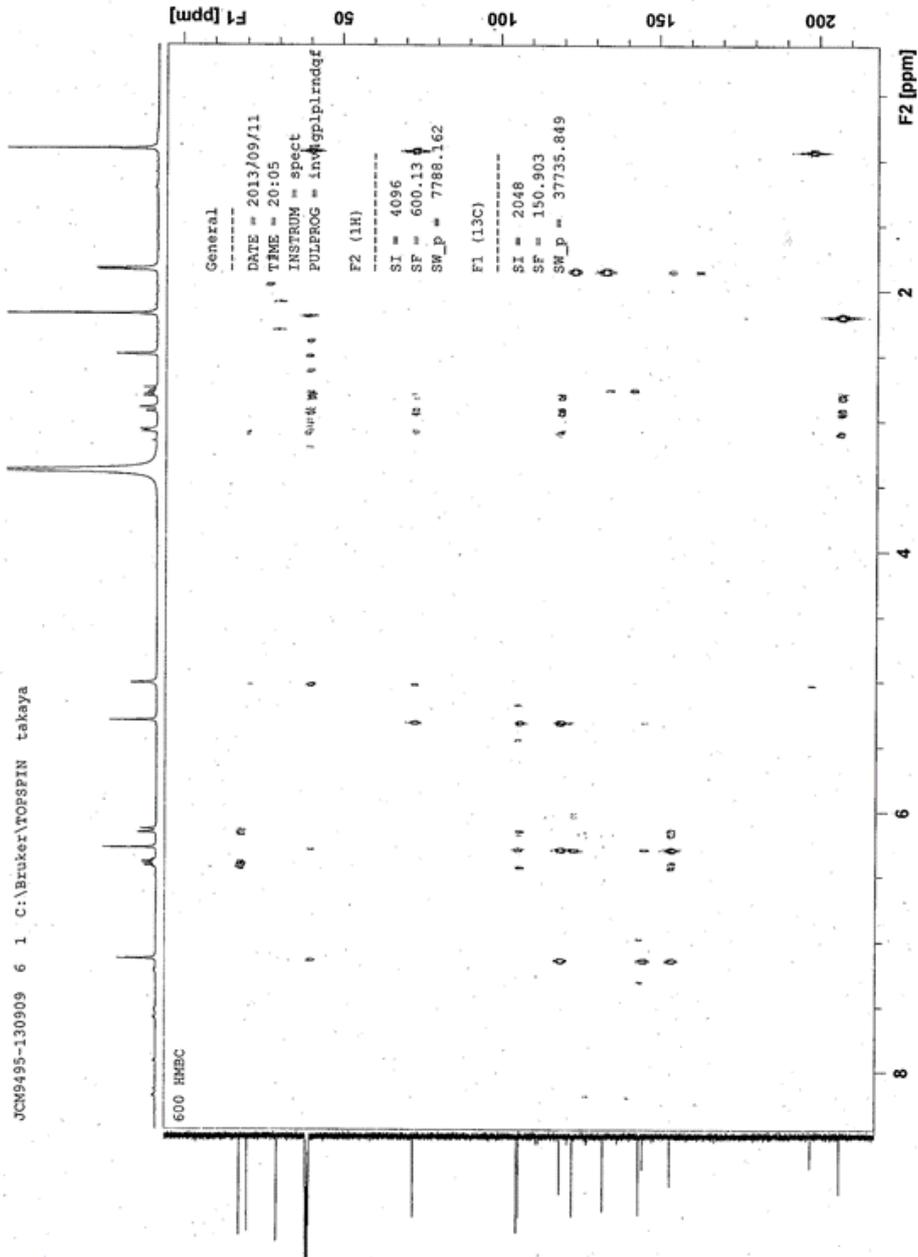


Figure 1-9. HMBC spectrum of onychophozaphilone.

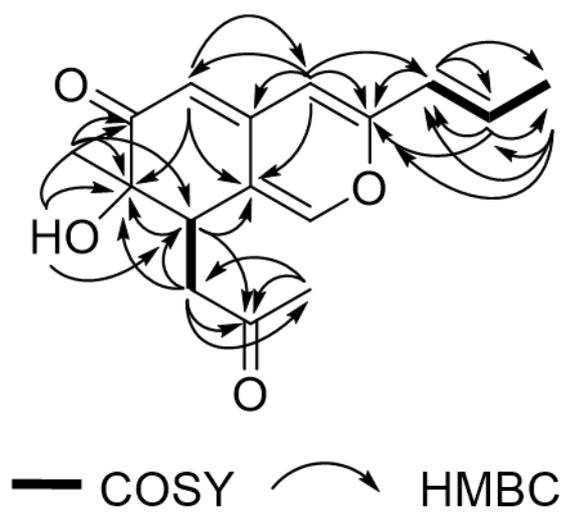


Figure 1-10. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of onychophorazaphilone.

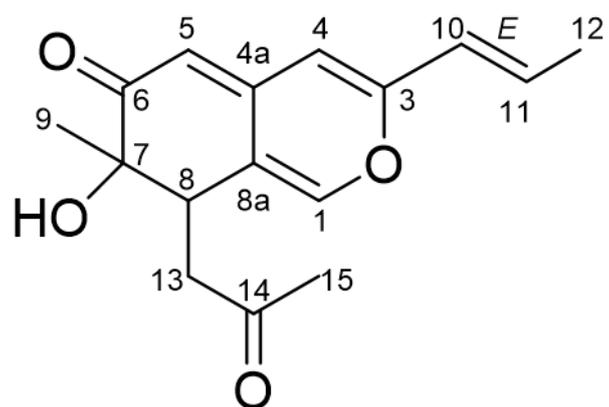


Figure 1-11. Structure of onychophorazaphilone.

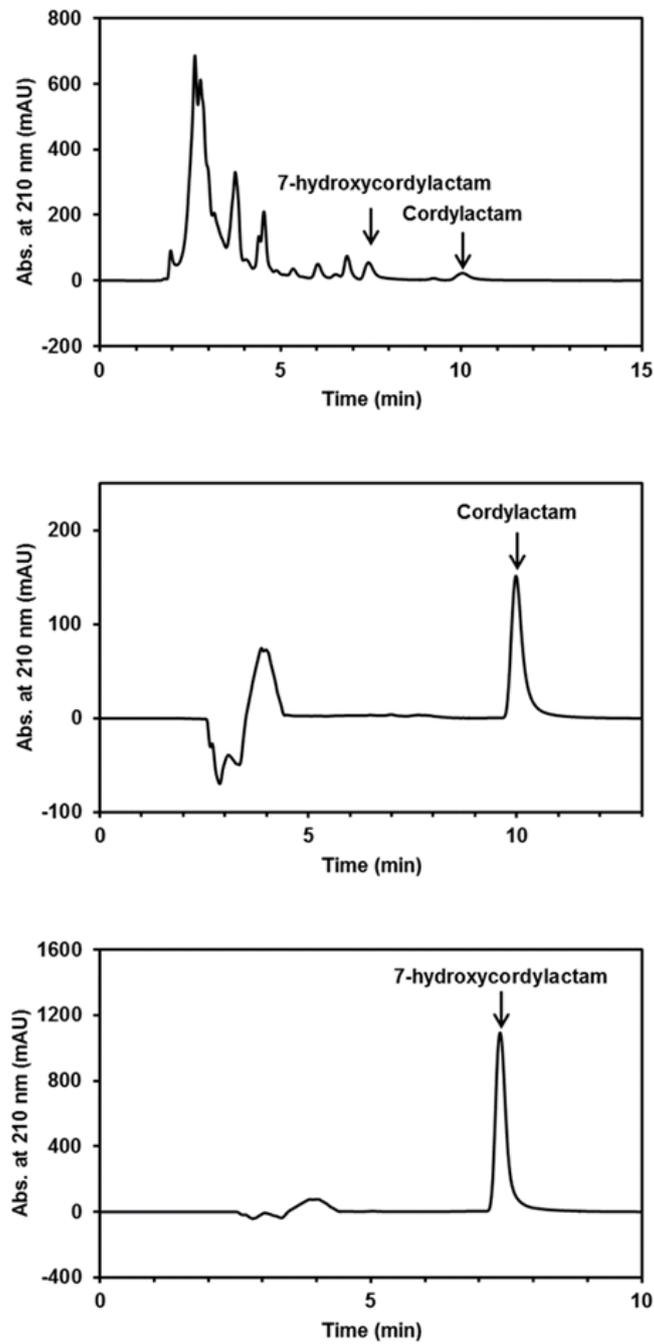


Figure 1-12. HPLC profiles of the etylacetate extract (upper) and purified cordylactam (middle) and 7-hydroxycordylactam (lower) from *W. spinulosa* JCM 2358. The peaks of cordylactam and 7-hydroxycordylactam were labeled with arrows.

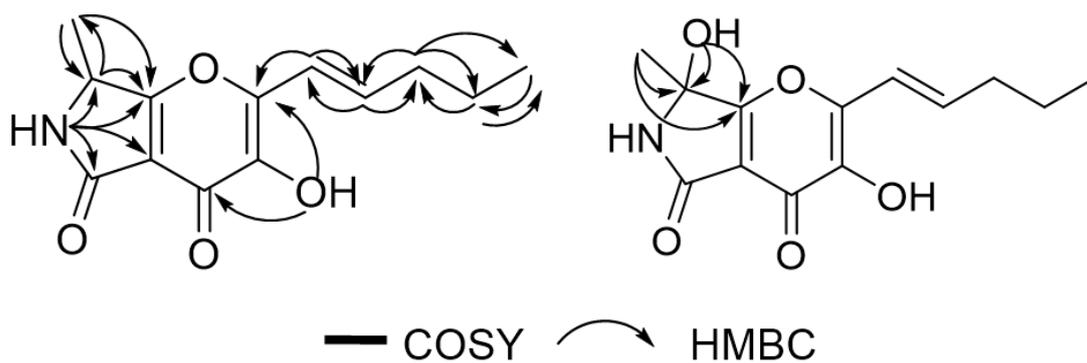


Figure 1-13. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of cordylactam (*left*) and 7-hydroxycordylactam (*right*).

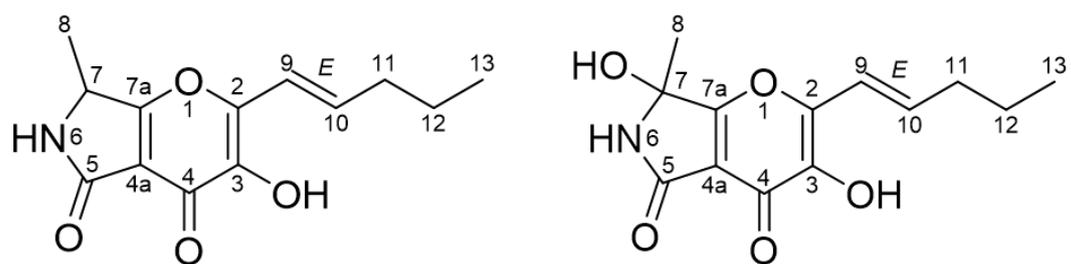


Figure 1-14. Structures of cordylactam (*left*) and 7-hydroxycordylactam (*right*).

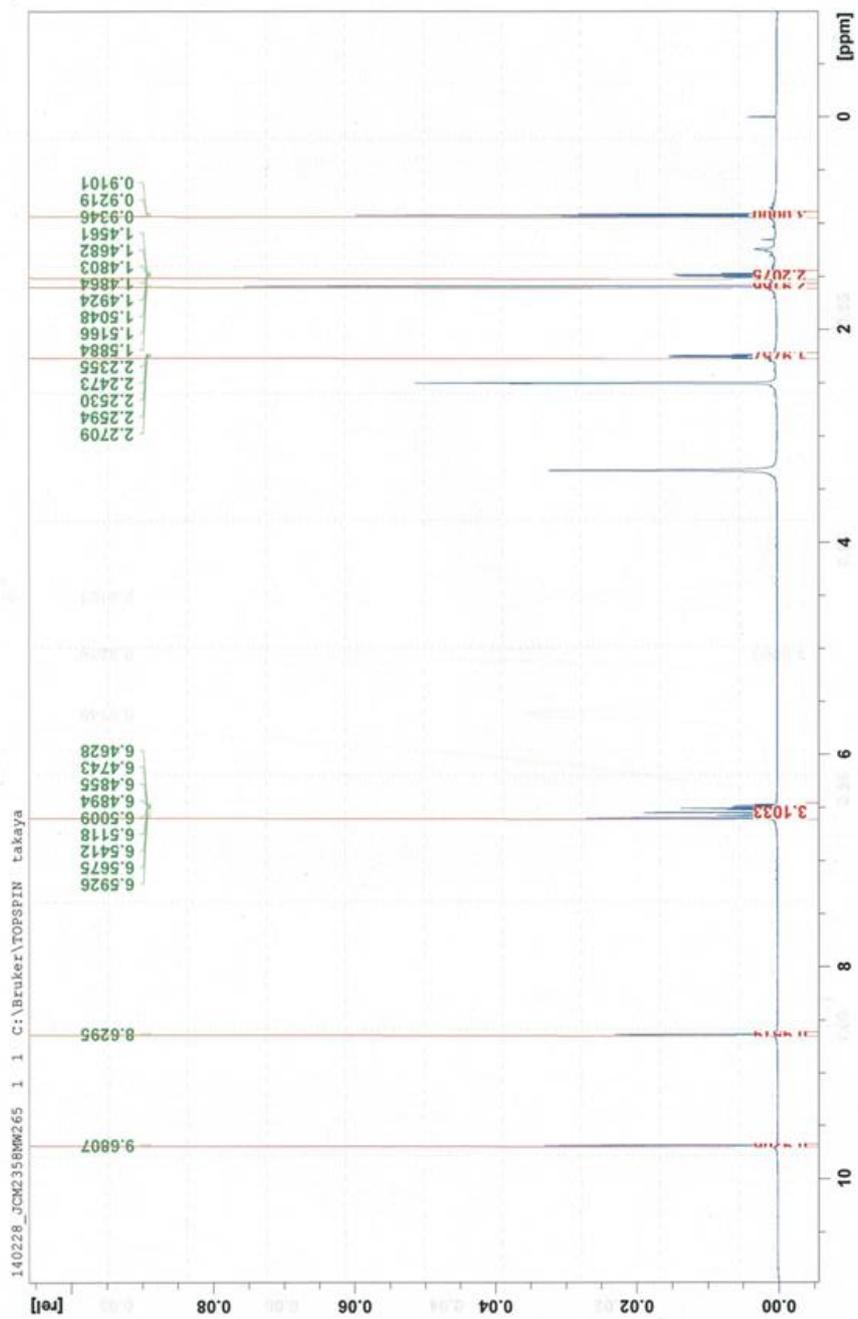


Figure 1-15. ^1H -NMR spectrum of 7-hydroxycordylactam.

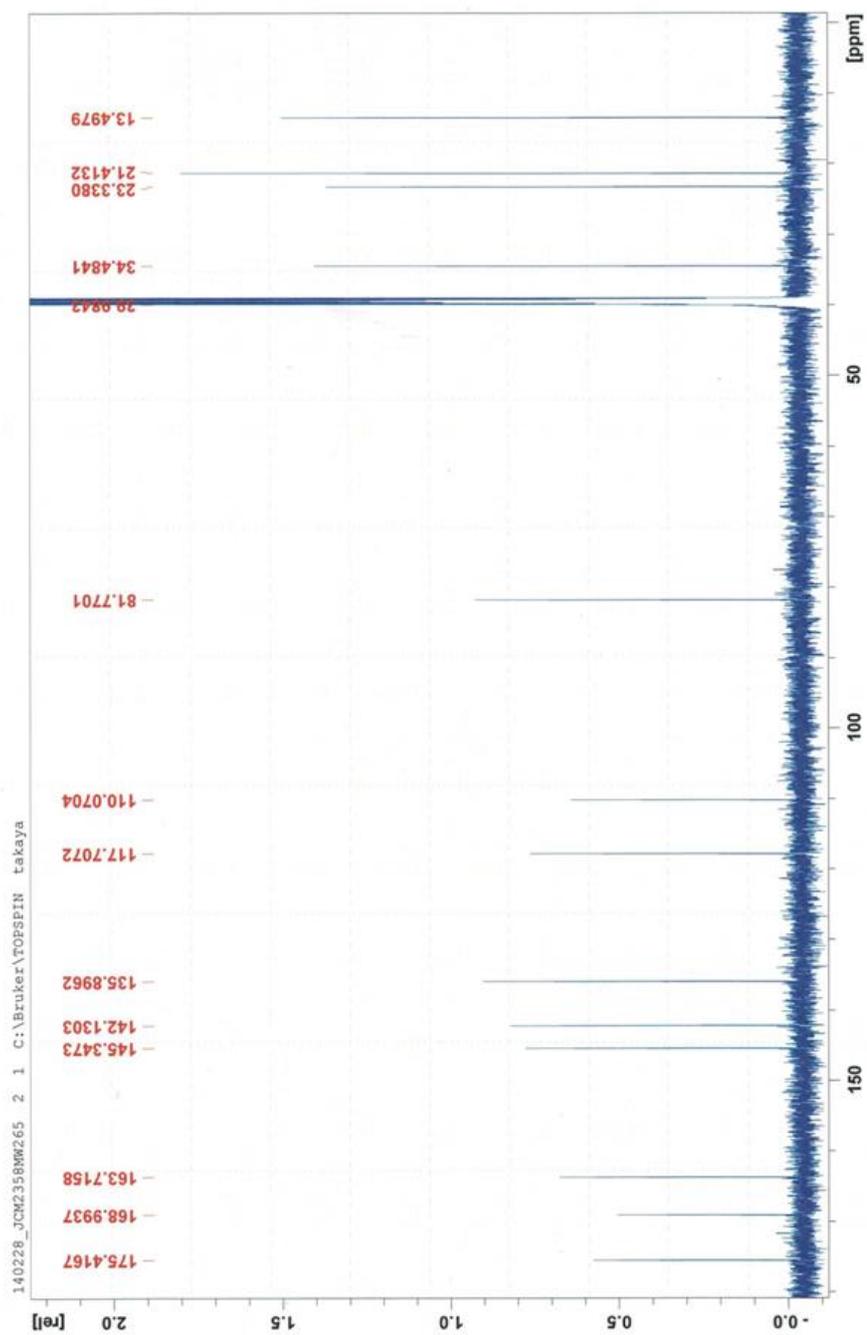


Figure 1-16. ^{13}C -NMR spectrum of 7-hydroxycordylactam.

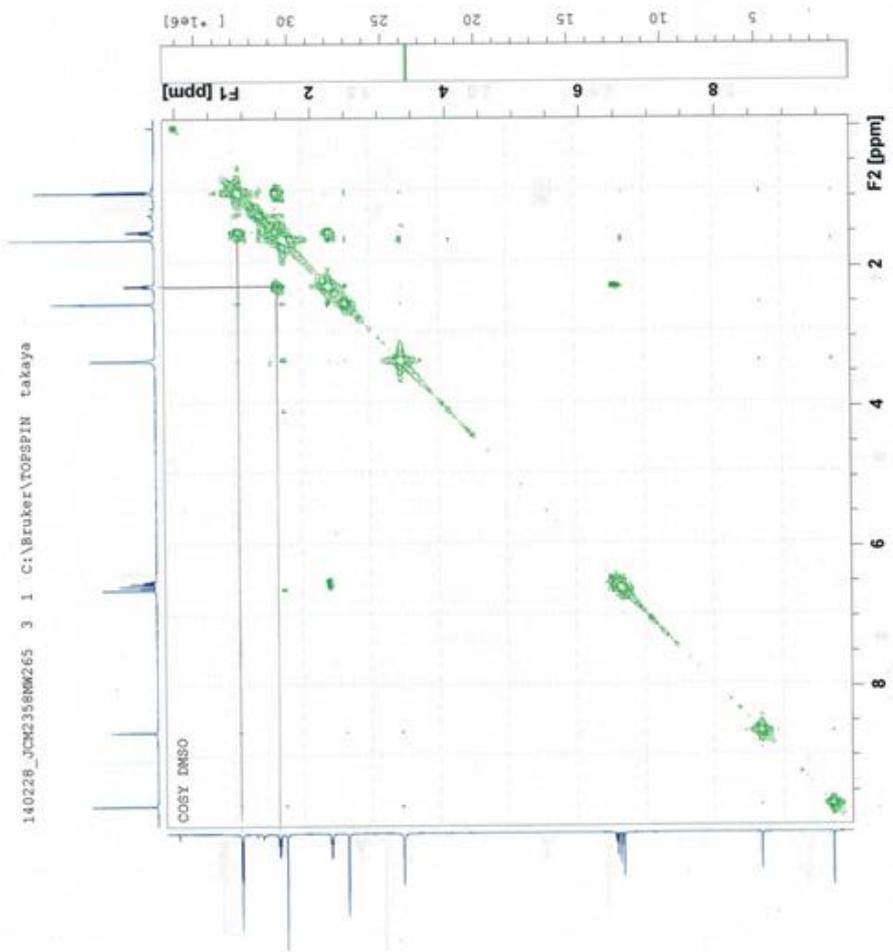


Figure 1-17. ^1H - ^1H COSY spectrum of 7-hydroxycordylactam.

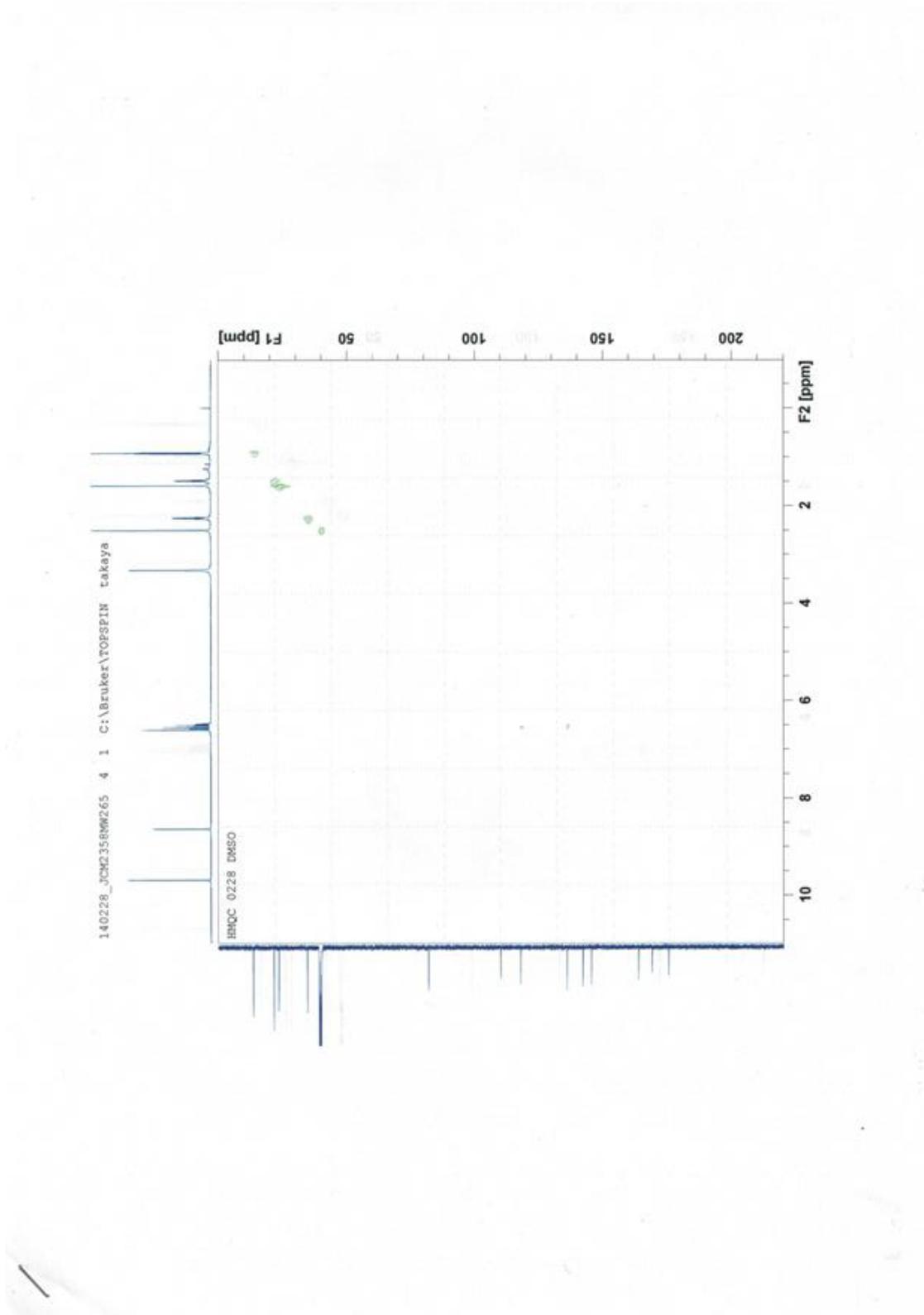


Figure 1-18. HSQC spectrum of 7-hydroxycordylactam.

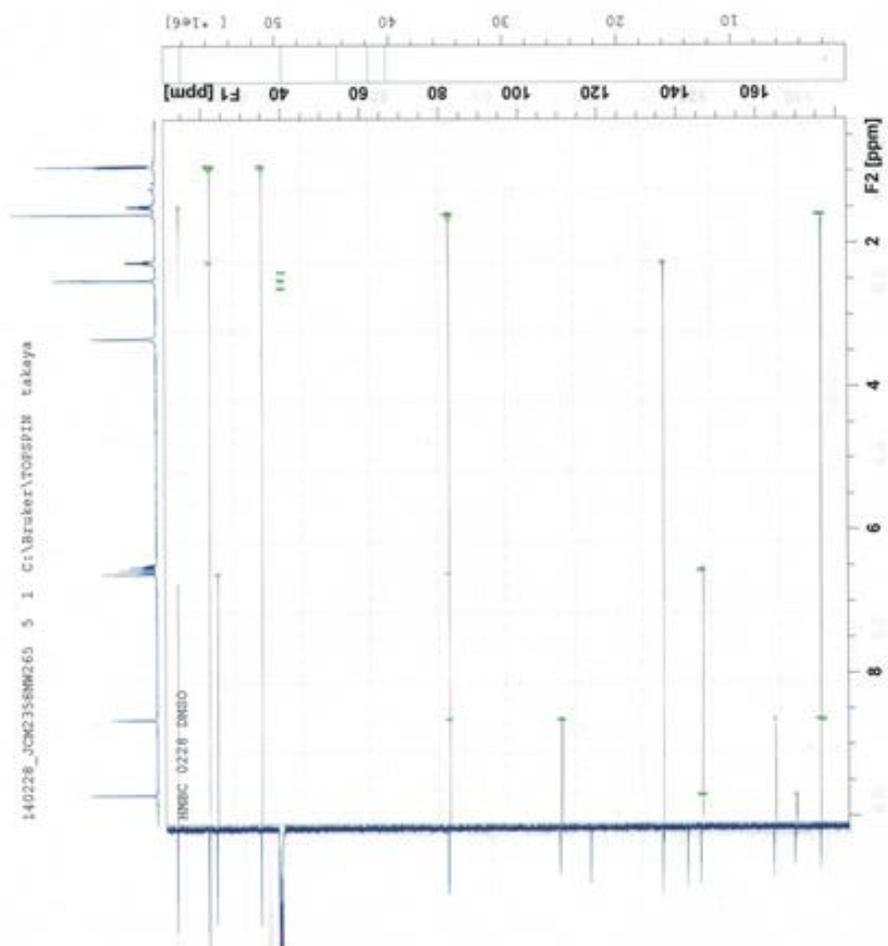


Figure 1-19. HMBC spectrum of 7-hydroxycordylactam.

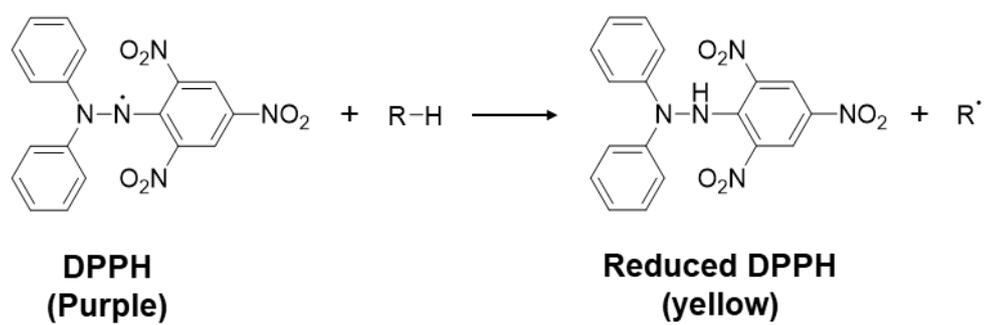


Figure 1-20. Reaction mechanism of DPPH with antioxidant.

DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

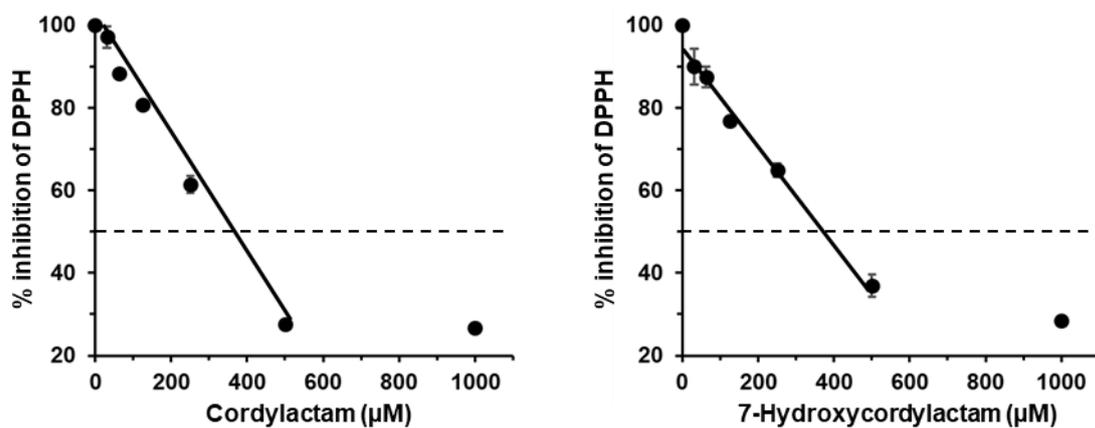


Figure 1-21. Antioxidative activities of cordylactam and 7-hydroxycordylactam against DPPH. Antioxidative activity was measured based on absorbance at 520 nm in the presence of cordylactam (left) and 7-hydroxycordylactam (right). IC_{50} value was calculated by a fitted line. Data are representative of three independent experiments.

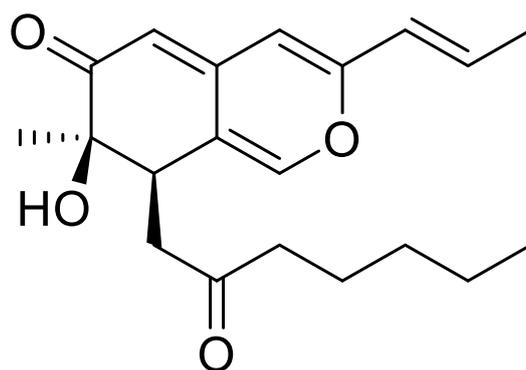


Figure 1-22. Structure of monapurone A.

第2章 サーチュイン A の活性阻害剤の単離と利用

1. 序論

天然物は有用な生理活性を示すものが多いことから、医薬品やそのリード化合物等として利用される。一方で、近年、天然物の探索研究において、構造や生理活性が既知である化合物の再単離の頻度が増加するとともに新規化合物の取得が困難となっている (Li and Vederas, 2009)。今後も有用な生理活性を示す新規天然物を獲得し続けるためには、生理活性物質の探索源となる天然資源を拡充させることは重要である。近年、新たな生理活性物質の探索源として海綿やホヤなどの海洋無脊椎動物が注目を集めている (Manning *et al.*, 2006; Ueoka *et al.*, 2010)。これらの天然物の多くは海洋無脊椎動物に共生する微生物によって生産することが示されている (Sakai *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2014)。しかしながら、これらの共生微生物の多くは培養が困難な難培養微生物である。これに加えて、これらの化合物は海洋無脊椎動物から得られる量が極めて少ないことから物質供給が医薬開発の課題となっている。一方で、既に多くのスクリーニング研究で探索源として利用されてきた培養可能な微生物から新しい生理活性物質を取得することができれば、得られた化合物をはるかに容易に生産することが可能であることが考えられる。

糸状菌のゲノム上には通常の実験室条件下では生産が確認されていない二次代謝産物の生合成遺伝子が多数存在する。これらを人為的に活性化することができれば、培養可能な糸状菌から新たな生理活性物質を発見できると期待される。近年、これらの遺伝子群の発現制御にはヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな因子が関与することが明らかとなった。糸状菌のモデル生物である *A. nidulans* では、HDAC の一種であるサーチュイン A (SirA) が *sterigmatocystin* や *penicillin G* などの二次代謝産物の生合成遺伝子の発現を抑制する (Shimizu *et al.*, 2012)。また、麴菌である *A. oryzae* のサーチュイン AoHst4 は *kojic acid* の生産を抑制する (Kawauchi *et al.*, 2013)。また、*Chaetomium*

属糸状菌の培養にサーチュインの活性阻害剤である NAM を添加することによって、多種のポリケチドの生産が促進されることが示されている (Asai *et al.*, 2012; Asai *et al.*, 2013; Asai *et al.*, 2016) 。これらのことから、通常は生産されていない糸状菌の二次代謝産物を発見するためには細胞内のサーチュイン活性を阻害することが有効であると考えられる。

これまでに、当研究室において SirA の HDAC 活性の阻害剤の探索が行われた。具体的には、第 1 章で作製した糸状菌培養抽出物のうち 380 種の酸性抽出画分を用いて、*A. nidulans* 由来の組換え SirA タンパク質の HDAC 活性を阻害する化合物が探索された。その結果、SirA の HDAC 活性を阻害する 15 株の糸状菌由来の 16 種の培養抽出物が選抜された (Table 2-1) 。その中から、*Dumontia tuberosa* JCM 12903 および *Penicillium arenicola* JCM 9929 が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤の単離が試みられた。しかしながら、これらの菌株が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤は精製操作過程でいくつかの化合物に分解したことから構造の決定には至らなかった。また、*Didymobolus rigidum* JCM 8837 と *Emericella nidulans* JCM 10259 由来の培養抽出物は SirA の HDAC 活性を阻害することが示されていたが、その阻害活性を示す単一の化合物の構造に関する知見は得られていなかった。そこで、本章では、*D. rigidum* JCM 8837 と *E. nidulans* JCM 10259 が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤の精製と同定を試みた。さらに、得られた SirA の HDAC 活性の阻害剤を糸状菌の培養に添加し、代謝産物の変化、ヒストンアセチル化レベルの変化、二次代謝系遺伝子の発現量の変化など糸状菌の二次代謝に及ぼす影響について解析を行った。

2. 材料および方法

2-1. *Didymobotryum rigidum* JCM8837 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤

2-1-1. 使用菌株

5-Methylmellein の精製には *D. rigidum* JCM8837 を使用した。SirA 組換えタンパク質の作製には、*sirA* 遺伝子を連結させたプラスミド pET-21a(+) を導入した *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS 株 (Shimizu *et al.*, 2012) を用いた。5-methylmellein の添加培養には、*A. nidulans* FGSC A89 (*biA1*、*argB2::argB*) を使用した。

2-1-2. *Didymobotryum rigidum* JCM8837 の培養方法

1) 前培養

全容 500 mL の羽根つきフラスコに分注した 100 mL の PD 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、予め *D. rigidum* JCM8837 を 1~2 週間生育させた PD 寒天培地から菌体を 5 mm² の大きさに切り取り植菌し、28°C、120 rpm で 1 週間振盪培養した。

2) 本培養

全容 5 L の羽根つきフラスコに分注した 1.5 L の PD 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、前培養液を全量植菌し、28°C、120 rpm で 1 週間振盪培養した。

2-1-2. 5-Methylmellein の精製

ブフナー漏斗を用いて培養液を濾過し菌体を取り除いた。培養上清に 2 M HCl を加えて pH を 2.0 に調整した後、1.5 L の AcOEt を加えて 1 時間攪拌した。その後、有機層を回収し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。AcOEt を用いた抽出と溶媒の除去を 3 回繰り返すことによって、545.5 mg の黒色油状物質を得た。これを MeOH に溶解させた後、Wakosil®100C18 を充填したカラム (φ 20 × 80 mm) に注入し、移動相を 100% 蒸留水から 100% MeCN に徐々に変化させ 13 個の画分を溶出させた。2-1-4 項

に示した方法で得られた画分の SirA の HDAC 活性の阻害活性を測定した結果、60% MeCN で溶出した画分が SirA の HDAC 活性を阻害した。これを濃縮することによって、18.5 mg の黒色油状物質を得た。これを MeOH に溶解させ、以下に示す条件下で HPLC に供し溶出液を継時的に取得した。この溶出液の内、保持時間 18.5 分に溶出された画分が SirA の HDAC 活性を阻害した。これを濃縮することによって、5.1 mg の黄色粉状物質を得た。

HPLC には 1260 Infinity series instrument を用いた。カラムには 250 × 10-mm Purospher® Star RP-18 end-capped column (particle size = 5 µm) を用いた。分離溶液としては MeCN と蒸留水を 1:1 の比率で混合した溶液を用いた。流速は 3.0 mL/min、カラムオーブンの温度は 40°C とした。

2-1-3. 5-Methylmellein の構造解析

1) 質量分析

2-1-2 項の方法で精製した 5-methylmellein を MeOH に溶解させ、適宜希釈した後、Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan) に検出器として LCMS-8030 (Shimadzu) を連結したものをを用いて解析した。この際、カラムには 250 × 4.6-mm Purospher® Star RP-18 end-capped column (particle size = 5 µm) を用いた。分離溶液としては MeCN と 0.05% ammonium formate (pH 4.0) を 1:1 の比率で混合した溶液を用いた。流速は 0.8 mL/min、カラムオーブンの温度は 40°C とした。

2) NMR 解析

2-1-2 項の方法で精製した 5-methylmellein を 500 µL の 0.05% TMS を含む DMSO-*d*₆ に溶解させ、AVANCE III-600 spectrometer を用いて解析した。なお、測定温度は 25°C とし、サンプル管には 509-up-7 を用いた。また、¹H ケミカルシフトの値は TMS (0 ppm) 、¹³C ケミカルシフトは DMSO (39.5 ppm) を基準とした。

2-1-4. サーチュイン A 組換えタンパク質の精製

sirA の cDNA を連結させたプラスミド pET-21a (+) を導入した *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS 株 (Shimizu *et al.*, 2012) を、50 µg/ml の ampicillin sodium salt を加えた LB 寒天培地に植菌し、37°C で 12 時間培養した。培養後、菌体を試験管に分注した同液体培地 5 mL に植菌し、120 rpm で振盪しながら 37°C で 12 時間前培養した。この前培養液を 500 mL の同液体培地に加え、前培養と同じ条件で本培養を行った。OD₆₀₀ の値が 0.5 に達した時点で isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside を終濃度で 0.1 mM となるように添加し、30°C、120 rpm で 5 時間培養した。培養後の菌体を遠心分離によって回収し、-80°C で保存した。保存した菌体を氷上で融解し、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した後、超音波破碎した。破碎液を 100,000 × g で 5 分間遠心分離し、得られた上清を HisTrap Chelating HP 1 mL Columns (GE Healthcare、Chicago、IL、USA) を用いて精製した。この時、得られた上清をカラムに吸着させた後、20 mM imidazole を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液を用いてカラムを平衡化し、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、500 mM の imidazole を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いてタンパク質を溶出させた。各溶出画分を sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、目的タンパク質の溶出を確認した。その後、目的タンパク質の含まれる画分を透析し、画分に含まれるイミダゾールを除去した。透析には Dialysis Membrane, size 8 (Wako) を用いた。得られたタンパク質を SirA 組換えタンパク質とし、-80°C で冷凍保存した。

2-1-5. SirA の HDAC 活性の測定

SirA の HDAC 活性は SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit Ver. 2 (Cyclex Co. Ltd、Nagano、Japan) を用いて測定し、説明書の方法を一部改変して測定を行った。具体的には、試験試料の添加量を 2.5 µL とした。全量 50 µL 中に 1.0 µg の SirA 組換えタンパク質を添加し、直ちにマイクロプレートリーダー (Synergy HTX、Biotek、Winooski、

VT、USA) を用いた蛍光分析に供した。このとき励起波長 340 nm、蛍光波長 430 nm を継時的に測定することによって、蛍光強度を指標に SirA 組換えタンパク質の酵素活性を測定した。なお DMSO に溶解させた 5-methylmellein (AdipoGen Life Sciences, Inc., San Diego, CA, USA)、mellein (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)、NAM (Wako) を使用して SirA の HDAC 活性に対する IC₅₀ を測定した。

2-1-6. 二次代謝産物の HPLC 解析

全容 20 mL の羽根つきフラスコに分注した 5 mL の GMM 培地 (Takasaki *et al.*, 2004) を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、*A. nidulans* FGSC A89 の分生子 0.5×10^7 個を播種し、28°C、120 rpm で振盪培養した。培養 2 日目に、DMSO に溶解させた 5-methylmellein を終濃度 100 μ M となるように培養液に添加した。培養 7 日目に培養液を回収し、50 μ L の 2M HCl と 5 mL の AcOEt を添加し、さらに 12 時間振盪した。しばらく静置した後、有機層を回収し、減圧下で乾燥した。乾燥後の固体を 500 μ L の MeOH に溶解させ、HPLC 解析を用いて二次代謝産物を解析した。

HPLC には 1260 Infinity series instrument を用いた。カラムには 250 \times 4.6 mm Purospher® Star RP-18 end-capped column (particle size of 5 μ m) を用いた。分離溶液としては MeCN (solvent B) と 0.05% ammonium formate (pH 4.0, solvent A) を用いた。流速は 0.8 mL/min、カラムオープンの温度は 40 °C とした。二次代謝産物は 210 nm の吸光度を計測することで定量した。分離溶液の濃度勾配は以下のとおりである。0-5 分 40% B、5-10 分 40-80% B、10-15 分 80% B、15-25 分 80-100% B、25-27 分 100% B、27-29 分 100-60% B、29-35 分 60% B。

2-1-7. 5-Methylmellein 生産量の定量

D. rigidum JCM8837 を 2-1-1 項に示した前培養方法に従って培養した。ブフナー漏斗を用いて培養液を濾過し、培養上清と菌体を分離した。得られた菌体を 60°C で 6 時間

乾燥した。乾燥後の菌体を破碎した後、5 mL の AcOEt を添加して 1 時間攪拌した。しばらく静置した後、有機層を回収し減圧下で溶媒を除去した。乾燥後の固体を 500 μ M の MeOH に溶解させた。この MeOH 溶液および培養上清を 2-1-6 項の方法に従って HPLC 解析することによって、細胞内および細胞外に存在する 5-methylmellein を定量した。

2-2. *Emericella nidulans* JCM10259 が生産するサーチェイン A の活性阻害剤

2-2-1. 使用菌株

Diorcinol、cordyol C、violaceol I および violaceol II の精製には *E. nidulans* JCM10259 を使用した。Diorcinol の添加培養には、*A. nidulans* FGSC A89 (*biA1*、*argB2::argB*)、*A. nidulans* SirA Δ 株 (*biA1*、*sirA Δ ::argB*、Shimizu *et al.*, 2012)、*A. nidulans* YMT 株 (*yA2*; *pyroA4*; *pyrG89::pyrG*、Zhou *et al.*, 2011)、*A. nidulans* SirA-GFP 株 (*biA1*; *argB2*; *pyrG89*; *yA2*; *pyroA4*; *sirA Δ ::argB*; *gpdA-sirA-gfp::pyrG*、Itoh *et al.*, 2017)、*E. violacea* JCM2725、*Rhizopus semarangensis* JCM5590、*Penicillium arenicola* JCM9929、*A. terreus* JCM10257、*Fusarium oxysporum* JCM11502、*Sarocladium oryzae* JCM12450、*C. globosum* JCM22615 を使用した。

2-2-2. *Emericella nidulans* JCM10259 の培養方法

全容 500 mL の羽根つきフラスコに分注した 150 mL の PD 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、予め *E. nidulans* JCM10259 を 1~2 週間生育させた PD 寒天培地から、菌体を 5 mm² の大きさに切り取り植菌し 28°C、120 rpm で 1 週間振盪培養した。なお、このフラスコを 20 本準備し、合計 3 L の培養を行った。

2-2-3. Diorcinol およびその類縁体の単離

ブフナー漏斗を用いて培養液を濾過し、菌体を取り除いた。培養上清に 2 M HCl を加えて pH を 2.0 に調整した後、1.5 L の AcOEt を加えて 1 時間攪拌した。その後、有機層

を回収し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除去した。AcOEt を用いた抽出と溶媒の除去を 3 回繰り返すことによって、1,215.1 mg の黒色油状物質を得た。これを MeOH に溶解させた後、Wakosil®100C18 を充填したカラム (ϕ 20 × 80 mm) に注入、移動相を 100% 蒸留水から 100% MeCN に徐々に変化させ、13 個の画分を溶出させた。全画分を 2-1-4 項に示した方法によって SirA の HDAC 活性の阻害活性を測定した結果、40%および 50%MeCN で溶出させた画分が SirA の HDAC 活性を阻害した。これらを濃縮することによって、113.8 および 301.0 mg の黒色油状物質を得た。これらを MeOH に溶解させた後、2-1-2 項に示した方法によって HPLC に供し、溶出液を継時的に取得した。SirA の HDAC 活性を阻害した画分を濃縮することによって、2.8 mg の赤褐色油状物質 1、5.0 mg の赤褐色油状物質 2、23.2 mg の赤色油状物質、143.2 mg の赤褐色油状物質 3 を得た。

2-2-4. Diorcinol およびその類縁体の構造解析

1) 高分解能質量分析

精製された violaceol II、violaceol I、cordyol C、および diorcinol (DO) をアセトニトリルに溶解させ、適宜希釈した後、Synapt G2 HDMS を用いて高分解能質量分析解析を行った。なお、サンプル管には外径 25 mm、キャップ付き高さ 58 mm の細口試薬瓶を用いた。

2) NMR 解析

2-1-3 項に示した方法に従った。

2-2-5. Diorcinol のメチルエステル化

青山らの方法を一部改変して行った (Aoyama et al., 1984) 。5 mg の DO を 1.5 mL の MeCN と 0.5 mL の MeOH の混合溶媒に溶解した。これに 90 mg の *N,N*-diisopropylethylamine (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) と 250 μ L の 2 M trimethylsilyldiazomethane (TMS-CHN₂, sigma-aldrich) を加えて、遮光条件下、28°C で保

温した。24 時間後、1 mL の 1 M HCl を加えることによって反応を停止した。この反応液を減圧下で乾燥させた。得られた固体を MeOH に溶解させた後、Wakosil®100C18 を充填したカラム (ϕ 20 × 40 mm) に注入し、移動相を 100% 蒸留水から 100% MeCN に徐々に変化させ溶出液を経時的に採取することによって、0.5 mg の 3-(3-methoxy-5-methylphenoxy)-5-methylphenol (DO-Me) および 2.5 mg の 5,5'-oxybis(1-methoxy-3-methylbenzene) (DO-Me₂) を得た。

2-2-6. サーチュイン A の HDAC 活性の測定

2-1-4 項に示した方法に従った。DO、cordyol C、violaceol I、violaceol II、DO-Me、DO-Me₂、phenol (wako)、orcinol (wako)、toluene (wako)、di-*p*-tolyl ether (TCI) は DMSO に溶解させて使用した。

2-2-7. 二次代謝産物の HPLC 解析

全容 50 mL の羽根つきフラスコに分注した 10 mL の GMM 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、*A. nidulans* FGSC A89 および *A. nidulans* SirAΔ 株の分生子 1.0×10^7 個を播種し、28°C、120 rpm で振盪培養した。培養 2 日目に、MeOH に溶解した DO を終濃度 100 μ M となるように培養液に添加した。培養 7 日目に培養液を回収し、100 μ L の 2M HCl と 15 mL の AcOEt を添加し、さらに 12 時間振盪した。しばらく静置した後、有機層を回収し減圧下で溶媒を除去した。乾燥後の固体を 500 μ M の MeOH に溶解させ、2-1-7 項に示した方法によって二次代謝産物を解析した。

2-2-8. ウェスタンブロッティング

全容 500 mL の羽根つきフラスコに分注した 100 mL の GMM 培地を 121°C で 15 分間、オートクレーブを用いて滅菌した。滅菌後、*A. nidulans* FGSC A89 および *A. nidulans* SirAΔ 株の分生子 1.0×10^8 個を播種し、28°C、120 rpm で振盪培養した。培養 2 日目に、MeOH に溶解した DO を終濃度 100 μ M となるようにそれぞれ培養液に添加した。培養

3 日目に培養液を回収し、ブフナー漏斗を用いて菌体を回収し、Lee らの方法に従って核タンパク質を抽出した (Lee *et al.*, 2009)。これを、5 × SDS sample buffer (10% SDS、50% glycerol、0.25% bromophenol blue、25% 2-mercaptoethanol、0.3 M Tris-HCl、pH 6.8) と混合し、5 分間煮沸した。これを Laemmli のゲル (Laemmli, 1970、分離ゲルのアクリルアミド濃度は 15%とした) を用いた SDS-PAGE に供し、ニトロセルロース膜に転写した。これを、5%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む TBST 緩衝液 (25 mM Tris、140 mM NaCl、3 mM KCl、0.1 % Tween 20、pH 8.0) に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした後、0.05 %BSA を含む TBST 緩衝液を用いて 1,000 倍に希釈した抗ヒストン H4 抗体 (ab10158、abcam)、または抗アセチル化ヒストン H4 (Lys16Ac) 抗体 (Millipore) に浸して 2 時間室温で静置した。これを TBST 緩衝液を用いて 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、0.05 %BSA を含む TBST 緩衝液を用いて 10,000 倍に希釈した抗ウサギ IgG 二次抗体 (711-035-152、Jackson Immuno Reserch Laboratories、West Grove、PA、USA) に浸して 1 時間室温で静置した。これを TBST 緩衝液を用いて 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いてタンパク質を検出した。

2-2-9. 定量リアルタイム PCR

菌株の培養は 2-2-8 項の方法に従った。培養後、ブフナー漏斗を用いて菌体を回収した。回収した菌体を液体窒素を用いて凍結および破碎し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて菌体 100 mg から total RNA を抽出した。これを鋳型として PrimeScript II Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いた逆転写反応を行い、cDNA を作製した。作製した cDNA を鋳型として GoTaq® qPCR Master Mix を用いて Table 2-2 のプライマーを使用した定量リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) を行った。方法はそれぞれの付属の説明書に従った。各遺伝子の転写産物の量は、アクチン遺伝子 (*actA*) の発現量を用いて補正して得られる相対値として表した。

2-2-10. クロマチン免疫沈降

菌株の培養は 2-2-8 項の方法に従った。Bernreiter らの方法に従ってクロマチン免疫沈降解析 (Chromatin Immunoprecipitation、ChIP) を行った (Bernreiter et al., 2006)。ウェスタンブロットに用いた抗アセチル化ヒストン抗体と抗ヒストン抗体を 2 µg/ml、抗 GFP 抗体 (3999-100、BioVision、California、USA) を 1 µg/mL の濃度で使用した。QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて DNA を精製し、Table 2-2 のプライマーを使用した定量リアルタイム PCR によって、DNA 量をインプット DNA に対する相対値として算出した。*A. nidulans* A89 株および *A. nidulans* SirAΔ 株の各遺伝子プロモーターのアセチル化ヒストンの量は、抗アセチル化ヒストン抗体と抗ヒストン抗体によって免疫沈降された DNA 量の比で定量した。*A. nidulans* YMT 株および *A. nidulans* SirA-GFP 株は各遺伝子プロモーターの SirA-GFP 融合タンパク質の免疫沈降のために用いた。

3 結果

3-1. *Didymobotryum rigidum* JCM8837 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤

3-1-1. 5-Methylmellein の構造解析

精製された化合物は黄色粉状であった。また、これを HPLC 解析することにより、その純度を確認したところ 98%であった (Figure 2-1)。精製された化合物は、 $m/z = 191.2$ を示す [M-H]⁻イオンピークを与えたことから、その分子式は C₁₁H₁₂O₃ であると予測された。精製された化合物の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルから得られたケミカルシフトの値を Table 2-2 にまとめた。ケミカルシフトの値と HSQC スペクトルの解析によって、本化合物はカルボニル炭素、4 個の芳香族四級炭素、2 個の芳香族性のメチン、メチン、メチレン、2 個のメチル、D₂O 交換性水素を有することが明らかとなった。また、¹H-¹H COSY および HMBC 解析でみられた相関を Figure 2-3 に示した。¹H-¹H COSY スペクトルにおいて、H-6 と H-7、H-3 と H-4、H-4 と H-10、H-3 と H-11 の相関がそれぞれ観測

された。HMBC スペクトルにおいて H-4 と C-5 および C-9、H-6 と C-8 および C-10、H-7 と C-5 および C-9、H-12 と C-5 および C-6、D₂O 交換性水素から C-7、C-8、C-9 との相関が観測されたことから、本化合物は既知のポリケチド 5-methylmellein であると同定した (Figure 2-2)。また、精製された化合物と市販の(-)-5-methylmellein の UV/Vis スペクトルおよび HPLC 解析における保持時間が一致したことから、精製された化合物が(-)-5-methylmellein であることが示された (Figure 2-4)。

3-1-2. 5-Methylmellein によるサーチュイン A の HDAC 活性の阻害

5-Methylmellein とその構造類縁体である mellein およびサーチュインの汎用的な阻害剤である NAM による SirA の HDAC 活性に対する阻害活性を測定した。通常の測定条件下での SirA の HDAC 活性を 100%とし、5-Methylmellein、mellein、NAM を添加した時の活性を相対値で示した (Figure 2-5)。5-Methylmellein、mellein、NAM は濃度依存的に SirA の HDAC 活性を阻害することが示された。また、Figure 2-5 に示した近似曲線から算出された 5-Methylmellein、mellein、NAM による SirA の HDAC 活性の阻害に対する IC₅₀ はそれぞれ 120 ± 20、160 ± 30、280 ± 40 μM であった。5-Methylmellein および mellein の SirA の HDAC 活性の阻害に対する IC₅₀ は既知の Sirtuin 阻害剤である NAM の IC₅₀ の 50%および 60%であることから、5-methylmellein と mellein は NAM よりも強く SirA の HDAC 活性を阻害することが示された。5-methylmellein と mellein の構造は、5位の炭素にメチル基が付加している点で異なる。これらの化合物の IC₅₀ の値は同程度であったことから、5位の炭素に付加しているメチル基は SirA の HDAC 活性の阻害にはほとんど影響を与えないことが明らかになった。

3-1-3. 5-Methylmellein による *A. nidulans* の二次代謝への影響

終濃度 100 μM となるよう 5-methylmellein を添加して *A. nidulans* を培養し、*A. nidulans* が生産する二次代謝産物を解析した。5-Methylmellein を添加して培養することによって、*A. nidulans* の代表的な二次代謝産物である ST の生産量は、未添加の条件と同程度であ

った (2.4 ± 0.1 、 2.0 ± 0.2 $\mu\text{g/mL culture}$)。しかしながら保持時間 6.9 分、12.8 分、18.2 分、19.8 分に検出される化合物 (Figure 2-6。*で示した) の生産量は 5-methylmellein を添加することによって、1.5 倍以上増加していた。また、5-methylmellein を添加することによって保持時間 7.3 分に検出される化合物が新たに生産された (Figure 2-6。†で示した)。これらの結果から、培養時に 5-methylmellein を添加することによって *A. nidulans* の二次代謝が変化することが示された。

3-1-4. *D. rigidum* JCM8837 による 5-methylmellein 生産

100 mL の PD 培地を用いて *D. rigidum* JCM8837 を 7 日間培養した。培養液を培養上清と菌体に分離し、それぞれに含まれる 5-methylmellein を定量した (Figure 2-7)。培養液 100 mL に含まれる 5-methylmellein の量は、培養上清中に 61 ± 11 、菌体中に 0.21 ± 0.05 μg であった。このことから、*D. rigidum* JCM8837 は 5-methylmellein のほとんどを菌体外へ分泌生産していることが示された。

3-2. *Emericella nidulans* JCM10259 が生産するサーチュイン A の活性阻害剤

3-2-1. Diorcinol およびその類縁体の構造解析

精製された赤褐色油状物質 3 は $m/z = 229.0869$ 、赤色油状物質は $m/z = 245.081$ 、赤褐色油状物質 1 と 2 は $m/z = 261.0775$ を示す[M-H]⁻イオンピークをそれぞれ与えたことから、その分子式は $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_3$ 、 $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_4$ 、 $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_5$ ([M-H]⁻ = 229.0870、245.0819、261.0768) であると予測された。これらの化合物の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルから得られたケミカルシフトの値を Table 2-3 にまとめた。4 つの化合物は ¹H-および ¹³C-NMR ケミカルシフトの値が類似していることと、これらの組成式の違いから、水酸基の数が異なる類縁体であることが推察された。赤褐色油状物質 3 のケミカルシフトの値と HSQC スペクトルの解析より、本化合物は 6 個の芳香族四級炭素、6 個の芳香族性のメチン、メチン、2 個の D₂O 交換性水素を有することが明らかとなった。¹H-¹H COSY および HMBC

を用いて、原子間の相関を解析した結果、本化合物は DO であることが示された。赤色油状物質は HMBC 解析において、2'-OH と C-2' との相関が観測されたことから、cordyol C であることが示された。赤褐色油状物質 1 はケミカルシフトの値から左右対称の構造を有することが分かった。また、HMBC 解析において、2-OH (2'-OH) と C-2 (C-2') との相関が観測されたことから、violaceol I であることが示された。赤褐色油状物質 2 は HMBC 解析において、2-OH および 6-OH と C-1 との相関が観測されたことから、violaceol II が同定された。

3-2-2. Diorcinol によるサーチュイン A の HDAC 活性の阻害

DO による SirA の HDAC 活性に対する阻害活性を測定した。DO を添加してない時の SirA の HDAC 活性を 100% とし、DO を添加した時の活性を相対値で示した (Figure 2-9)。DO は濃度依存的に SirA の HDAC 活性を阻害することが示された。また、Figure 2-9 に示した近似曲線から算出された DO による SirA の HDAC 活性の阻害に対する IC₅₀ は 210 ± 25 μM であった。この値は既知のサーチュイン阻害剤である NAM のその 80% であった。

3-2-3. Diorcinol の構造類縁体によるサーチュイン A の HDAC 活性の阻害

DO、cordyol C、violaceol I、violaceol II、orcinol、phenol、toluene、di-*p*-tolyl ether をそれぞれ終濃度 1 mM で反応系に添加した時の SirA の HDAC 活性に対する阻害活性を測定した (Figure 2-10)。DO は 21% の HDAC 活性を阻害した。ジフェニルエーテル構造を持つが芳香族性水酸基を持たない di-*p*-tolyl ether は HDAC 活性を阻害しなかった。このことから、DO による HDAC 活性を阻害には芳香族性水酸基が重要であることが示された。また、ジフェニルエーテル構造を持たないが芳香族性水酸基を持つ phenol と orcinol はそれぞれ 80、78% の HDAC 活性を阻害した。ジフェニルエーテル構造と芳香族性水酸基のどちらも持たない toluene は HDAC 活性に影響を与えなかった。これらのことから、ジフェニルエーテル構造は HDAC 活性の阻害に必須ではないが、DO による

HDAC 活性の阻害活性を強めることが示された。また、DO と cordyol C による HDAC 活性の阻害活性は同程度であり、その値は 21%であった。Violaceol I と violaceol II の HDAC 活性の阻害活性はそれぞれ 64%、56%であった。これらのことから、芳香族性の水酸基の位置によって、DO の HDAC 活性が変化することが明らかになった。

DO による HDAC 活性の阻害活性と芳香族性水酸基の関連を明らかとするために、TMS-CHN₂を用いて DO の芳香族性水酸基のメチルエステル化を試みた。その結果、芳香族性水酸基が 1 つメチルエステル化された DO-Me と、2 つメチルエステル化された DO-Me₂ が得られた (Figure 2-11)。これらを終濃度 1 mM で反応系に添加した時の SirA の HDAC 活性に対する阻害活性の測定を試みたが、どちらの化合物も水への溶解性が低く、反応系内で析出したため、HDAC 活性の阻害活性を測定できなかった。そこで、終濃度 125 μM の DO、DO-Me、DO-Me₂ を反応系に添加した時の SirA の HDAC 活性に対する阻害活性を測定した (Figure 2-12)。DO、DO-Me の HDAC 活性の阻害活性はそれぞれ 60、83%であった。DO-Me₂ は SirA の HDAC 活性に影響を与えなかった。これらのことから、DO による SirA の HDAC 活性の阻害には芳香族性水酸基が重要であることが示された。

3-2-4. Diorcinol による *A. nidulans* の二次代謝への影響

終濃度 100 μM となるように DO を添加して *A. nidulans* A26 株および SirAΔ を培養し、それらが生産する二次代謝産物を解析した (Figure 2-15)。DO を添加して A26 株を培養することによって、*A. nidulans* の代表的な二次代謝産物である ST の生産量は、未添加の条件と比べて 1.5 倍上昇した (4.1 ± 0.2 、 2.7 ± 0.5 μg/mL culture)。また、SirAΔ 株の ST の生産量は $4.4 \mu\text{g} \pm 0.2 \mu\text{g/mL culture}$ であり、DO を添加して培養した A26 株と同程度であった。また、SirAΔ 株では DO を添加しても ST の生産量に影響を与えなかった。これらのことから、*A. nidulans* の細胞内において、DO は SirA の活性を阻害することによって ST の生産を増加させることが示された。

3-2-5. Diorcinol による *A. nidulans* のヒストンアセチル化レベルへの影響

終濃度 100 μM となるように DO を添加して *A. nidulans* A26 株および SirA Δ 株を培養して得られた菌体から核タンパク質を抽出し、ウェスタンブロットング解析を行った。16 番目のリジン残基がアセチル化されたヒストン H4 (H4K16Ac) とヒストン H4 の存在量の比を Figure 2-14 に示した。A26 株では、DO を添加して培養することによって、ヒストン H4 に対する H4K16Ac の割合が 2.8 倍増加した。一方、SirA Δ 株のヒストン H4 に対する H4K16Ac の割合は、A26 株のその 2.1 倍であった。SirA Δ 株では DO の添加によって H4K16Ac の割合は変化しなかった。これらのことから、DO を *A. nidulans* の培養に添加することによって、SirA によるヒストン H4 の 16 番目のリジン残基の脱アセチル化が阻害されることが示された。

3-2-6. Diorcinol による sterigmatocystin 生合成遺伝子の転写への影響

終濃度 100 μM となるように DO を添加して *A. nidulans* A26 株および SirA Δ 株を培養して得られた菌体から調製した cDNA を用いて、ST の生合成に関与する遺伝子 (Brown *et al.*, 1996) の転写産物の量を測定した (Figure 2-15)。A26 株では、DO を添加することによって、ST 生合成遺伝子クラスターの転写因子である *aflR* の発現が 3.2 倍上昇した。また、ST 生合成遺伝子である *stcJ*、*stcU*、*stcB* の発現がそれぞれ 2.3、4.2、4.8 倍上昇した。これらのことから、DO を培養に添加することによって、*A. nidulans* による ST の生合成が転写レベルで活性化されることが示された。一方、SirA Δ 株では A26 株と比べ *stcJ*、*stcU*、*stcB*、*aflR* の発現がそれぞれ 2.3、4.2、4.8、3.2 倍上昇した。SirA Δ 株では DO を添加してもこれらの遺伝子の発現が増加しなかった。これらのことから、DO を培養に添加することによって、SirA 依存的に ST 生合成遺伝子の転写が活性化されることが示された。

3-2-7. Diorcinol による sterigmatocystin 生合成遺伝子のプロモーター領域のヒストンア

セチル化レベルへの影響

A. nidulans YMT 株および SirA-GFP 株を用いて、*stcJ*、*stcU*、*aflR* のプロモーター領域に SirA-GFP タンパク質が結合するかどうかを検証した (Figure 2-16)。SirA-GFP 株では、YMT 株と比べ、抗 GFP 抗体によって免疫沈降された *stcJ*、*stcU*、*aflR* のプロモーター領域の DNA 量が増加した。このことから、これらの遺伝子のプロモーター領域に SirA-GFP タンパク質が結合することが示された。また、*A. nidulans* A26 株および SirAΔ を用いて、抗ヒストン抗体および抗アセチル化ヒストン抗体を使用して *stcJ*、*stcU*、*aflR* のプロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを ChIP 解析した。A26 株では、DO を培養に添加することによってアセチル化されたヒストン H4 が結合した *aflR*、*stcJ*、*stcU* のプロモーター領域の DNA 量の割合が増加されることが示された。また、SirAΔ 株では A26 株と比較してアセチル化されたヒストン H4 が結合した *aflR*、*stcJ*、*stcU* のプロモーター領域の DNA 量の割合が増加されることが示された。一方で、DO を培養に添加しても SirAΔ 株の *aflR*、*stcJ*、*stcU* のプロモーター領域の DNA 量の割合は増加しなかった。これらのことから DO を培養に添加することによって、SirA による ST 生合成遺伝子のプロモーター領域のヒストンの脱アセチル化が阻害されることが示された。

3-2-8. Diorcinol による様々な糸状菌の二次代謝への影響

終濃度 100 μM となるように DO を添加した CY、PD、YMG、GGP 培地を用いて 2-2-1 項に示した 7 種の糸状菌を培養した。DO を添加することによって、*Fusarium oxysporum* JCM11502 を除く 6 種の菌株で代謝産物に変化が見られた (Figure 2-17、Figure 2-18)。これらの 6 種の菌株の培養に DO を添加することによって、DO 類縁体の存在量が増加した。これらの化合物は、培養に添加した DO が菌によって代謝されたことによって、生成量が増加された可能性がある。一方で、DO の添加によって 2 倍以上生産量が増加した化合物が複数みられた (Figure 2-17、Figure 2-18。*で示した)。また、DO の添加によって新たに生産された化合物も検出された (Figure 2-17、Figure 2-18。†で示した)。

これらのことから、DOによる糸状菌の二次代謝の活性化は、様々な糸状菌に対して有効であることが示された。

4. 考察

本章では、*D. rigidum* JCM 8837 と *E. nidulans* JCM 10259 が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤を精製し、それらの同定を行った。また、得られた SirA の HDAC 活性の阻害剤を糸状菌の培養に添加し、代謝産物の変化、ヒストンアセチル化レベルの変化、二次代謝系遺伝子の発現量の変化などの糸状菌の二次代謝に及ぼす影響について解析を行った。*D. rigidum* JCM 8837 が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤は既知のポリケチドである 5-methylmellein であった。また、5-methylmellein の構造類縁体である mellein も SirA の HDAC 活性を阻害することが示された。これらの化合物がサーチュインの HDAC 活性を阻害する報告はなく新規な発見である。*D. rigidum* JCM 8837 は生産した 5-methylmellein の大部分を菌体外へ分泌していたことから、本菌の生育環境において、5-methylmellein は他の生物のサーチュインの活性制御に利用されるのかも知れない。5-Methylmellein を *A. nidulans* の培養に添加することによって、1 種の化合物が新たに生産され、4 種の化合物の生産が 1.5 倍以上増加したことから、5-methylmellein は *A. nidulans* の二次代謝の活性化に有効であることが示された。一方で、5-methylmellein の添加によって、ST の生産量は増加しなかった。このことは、5-methylmellein が *A. nidulans* の細胞内で、SirA とは異なるタンパク質を標的とすることを示唆するものである。例えば、サーチュインのアミノ酸配列に基づいた分子系統解析によって *A. nidulans* には SirA を含む 6 つのサーチュインアイソザイムが存在することが予測されている (Shimizu *et al.*, 2012)。それらのサーチュインのうち、SirE は ST の生産を促進することが示されている (Itoh *et al.*, 2017)。HstA は norsolorinic acid や penicillin の生産を抑制するが、ST の生産には影響を与えないことが示されている (Shwab *et al.*, 2007)。その他のサーチュイ

ンは二次代謝の生産との関連がほとんど分かっていない。5-methylmellein は細胞内で、SirA とは異なるサーチェーンを標的としていること、あるいは SirA を含む複数のサーチェーンを標的とすることで、SirA の活性の阻害による ST の生産への影響が打ち消されている可能性が考えられる。

E. nidulans JCM 10259 が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤は DO およびその類縁体であった。これらの化合物がサーチェーンの HDAC 活性を阻害する報告はなく新規な発見である。DO とその構造類縁体の解析によって、DO による SirA の HDAC 活性の阻害には芳香族性水酸基が重要であること、また、芳香族性水酸基とジフェニルエーテル構造を合わせて持つことによって、強い阻害活性を示すことが示された。また、5-methylmellein と mellein も芳香族性水酸基を有する化合物であることから、異なる骨格を有する化合物であっても芳香族性水酸基と SirA の HDAC 活性の阻害活性に関連があるのかも知れない。また、DO を *A. nidulans* の培養に添加することによって、ST の生産量が増加することが示された。また、ST 生合成遺伝子の転写産物の定量と ChIP 解析の結果から、DO は SirA による ST 生合成遺伝子のプロモーター領域の脱アセチル化を阻害することによって、これらの遺伝子の転写を活性化し、ST の生産量を増加させることが示された。また、DO を添加して培養した 7 種の糸状菌のうち 6 種の糸状菌が二次代謝産物の生産を増加させたことから、DO は汎用的な糸状菌の二次代謝の活性化剤として活用できることが期待された。

A. nidulans の培養に 5-methylmellein を添加することによって有意に生産量が増加した化合物は保持時間 6.9 分、12.8 分、18.2 分、19.8 分に検出される化合物であった。一方、DO の添加によって生産量が有意に増加した化合物は、保持時間 12.5 分に検出される ST のみであった。このことから、SirA の HDAC 活性の阻害剤の種類によって、活性化する二次代謝産物が異なることが明らかとなった。

以上、本章では、新たな SirA の HDAC 活性の阻害剤である 5-methylmellein と DO を

発見し、これらが糸状菌の二次代謝の活性化に有効であることを示した。糸状菌由来のサーチュインの阻害剤の発見は本研究が初めての報告である。糸状菌のゲノム上に未知の二次代謝産物の生合成遺伝子が多数存在することが示されてから、様々な手法でこれらの二次代謝産物の取得が試みられてきた。例えば、Bergmann らは、*A. nidulans* の持つポリケチド合成酵素と非リボソーム型タンパク質合成酵素のハイブリッド酵素に着目し、本菌のゲノム上において、この酵素遺伝子の転写因子のプロモーターを高発現プロモーターに置換することによって、この酵素遺伝子の発現を活性化させ、産物の同定に成功している (Bergmann *et al.*, 2007)。また、Alberti らは *Clitopilus passeckerianus* の持つテルペノイド合成酵素を *A. oryzae* 中で異種発現することによって、この酵素遺伝子の産物を同定している (Alberti *et al.*, 2017)。しかしながら、これらの手法には形質転換などの煩雑な操作が必要となる。また、これらの手法にはゲノム情報が必須であり、これらの手法が適用可能な糸状菌は限られている。一方で、5-methylmellein や DO を利用した糸状菌の二次代謝の活性化手法は、これらの化合物を糸状菌の培養に添加するといった簡便な操作で利用可能である。また、この手法はゲノム情報を必要としないことから、理論的にはすべての糸状菌に対して適用可能である。すなわち、本研究で見出された 5-methylmellein や DO を利用した糸状菌の二次代謝の活性化は、多くの糸状菌に適用可能な汎用的な手法であり、これらを利用することで、糸状菌由来の新規化合物が取得できることが期待される。

Table 2-1. Strains produced SirA inhibitor.

Strain	Medium	Division	Class	Order
<i>Ophiobolus anguillidus</i> JCM13080	YMS	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales
<i>Dumontinia tuberosa</i> JCM12903	PD	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales
<i>Penicillium arenicola</i> JCM9929	PD/YMS	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
<i>Didymobotryum rigidum</i> JCM8837	PD	Deuteromycete	Unclassified	Unclassified
<i>Rhytidhysteron rufulum</i> JCM14423	PD	Ascomycota	Dothideomycetes	Patellariales
<i>Monascus pilosus</i> JCM23155	YMS	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
<i>Eleutherascus tuberculatus</i> JCM22727	YMS	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales
<i>Lophiotrema vitigenum</i> JCM13534	YMS	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales
<i>Eupenicillium cinnamopurpureum</i> JCM22783	YMS	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
<i>Pseudolachnella yakushimensis</i> JCM15101	PD	Ascomycota	Unclassified	Unclassified
<i>Asteromassaria macroconidica</i> JCM12843	YMS	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales
<i>Petrakia echinata</i> JCM14130	PD	Deuteromycete	Unclassified	Unclassified
<i>Monodictys putredinis</i> JCM14128	PD	Ascomycota	Sordariomycetes	Microascales
<i>Emericella nidulans</i> JCM10259	PD	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales
<i>Caryospora langloisii</i> JCM13112	YMS	Ascomycota	Dothideomycetes	Unclassified

Table 2-2. Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Target gene
<i>Quantitative PCR</i>		
aflR RT_Fw	CTGCCTTGCGAGTATATGGTTTC	<i>aflR</i>
aflR RT_Rv	TTGGTGATGGTGCTGTCTTG	
stcJ RT_Fw	AGCCAATACCGGACACG	<i>stcJ</i>
stcJ RT_Rv	TGTGAGTGTGGACTTGCCGC	
stcU RT_Fw	CATTTCCATTCAAGCCGATGT	<i>stcU</i>
stcU RT_Rv	CCAGGTATCCGAAGTGCTCAA	
stcB RT_Fw	GCCAAAGGTGTCAAGGAACC	<i>stcB</i>
stcB RT_Rv	GAGCGAAGTGCTTGAGCAGA	
actA RT Fw	GAAGTCCTACGAACTGCCTGATG	<i>actA</i>
actA RT Rv	AAGAACGCTGGGCTGGAA	
<i>ChIP assay</i>		
aflR#1_Fw	GACTCCTAGACCCCGACAGG	<i>aflR</i>
aflR#1_Rv	TACTGCGGGCTAGAACTGGT	
aflR#2_Fw	ATCTCCTCATGGCGAATCTC	<i>aflR</i>
aflR#2_Rv	TATTCCTCGCAGGGATTACAG	
stcJ#3_Fw	CGAGAAACGGTGATGGAGTC	<i>stcJ</i>
stcJ#3_Rv	GGTCCCGGCTACACGATATAC	
stcJ#4_Fw	GCCTACGAGCTACTGATTGAGC	<i>stcJ</i>
stcJ#4_Rv	CGCAGTCGCTATTGACCTAC	
stcU#5_Fw	GCTCGCATACCTGCTTCAC	<i>stcU</i>
stcU#5_Rv	CCTCATCACTGAGCTCTACACC	
stcU#6_Fw	GAGTGTGCCTAAGCCGAGAG	<i>stcU</i>
stcU#6_Rv	CGATCCATCTGCTTGTACCC	

Table 2-3. NMR summary of 5-methylmellein in DMSO-*d*₆.
(¹³C:150 MHz, ¹H:600 MHz)

Position	δ_C	δ_H, multi. (<i>J</i> in Hz)
1	169.9	
3	75.51	4.75, <i>m</i>
4α	31.0	3.05, <i>dd</i> (3.4, 16.8)
4β		2.73, <i>dd</i> (11.6, 16.8)
5	125.2	
6	137.8	7.38, <i>d</i> (8.6)
7	114.9	6.79, <i>d</i> (8.6)
8	159.4	
9	108.1	
10	138.2	
11	20.4	1.45, <i>d</i> (6.3), 3H
12	17.6	2.17, <i>s</i>, 3H
8-OH		10.91, <i>s</i>

Table 2-4. NMR summary of diorcinol, cordyol C, violaceol I and violaceol II in DMSO- d_6 . (^{13}C :150 MHz, ^1H :600 MHz)

position	diorcinol		cordyol C		violaceol I		violaceol II	
	δ_{C}	δH (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} , multi.	δH (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} , multi.	δH (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} , multi.	δH (<i>J</i> in Hz)
1	158.3		159.1		146.5		128.1	
2	102.8	6.15, <i>s</i>	100.7	6.02, <i>s</i>	145.3		150.6	
3	157.5		158.2		133.9		109.8	6.20, <i>s</i>
4	111.0	6.33, <i>s</i>	109.7	6.22, <i>s</i>	127.2	6.34, <i>s</i>	126.6	
5	140.0		139.4		111.4		109.8	6.20, <i>s</i>
6	109.9	6.23, <i>s</i>	107.9	6.13, <i>s</i>	110.1	6.03, <i>s</i>	150.6	
7	21.0	2.18, <i>s</i> , 3H	21.2	2.15, <i>s</i> , 3H	20.6	2.06, <i>s</i>	20.8	1.98, <i>s</i> , 3H
1'	158.3		143.1		146.5		146.1	
2'	102.8	6.15, <i>s</i>	135.2		145.3		131.7	
3'	157.5		146.8		133.9		147.1	
4'	111.0	6.33, <i>s</i>	112.7	6.20, <i>s</i>	127.2	6.34, <i>s</i>	108.2	6.19, <i>s</i>
5'	140.0		127.6		111.4		134.1	
6'	109.9	6.23, <i>s</i>	112.6	6.44, <i>s</i>	110.1	6.03, <i>s</i>	105.6	5.75, <i>s</i>
7'	21.0	2.18, <i>s</i> , 3H	20.4	2.11, <i>s</i> , 3H	20.6	2.06, <i>s</i> , 3H	21.0	2.14, <i>s</i> , 3H
2-OH		-		-		8.70, <i>br</i>		9.45, <i>br</i>
3-OH		9.45, <i>s</i>		9.28, <i>s</i>		8.70, <i>br</i>		-
6-OH		-		-		-		9.45, <i>br</i>
2'-OH		-		8.33, <i>s</i>		8.70, <i>br</i>		8.86, <i>br</i>
3'-OH		9.45, <i>s</i>		9.17, <i>s</i>		8.70, <i>br</i>		9.45, <i>br</i>

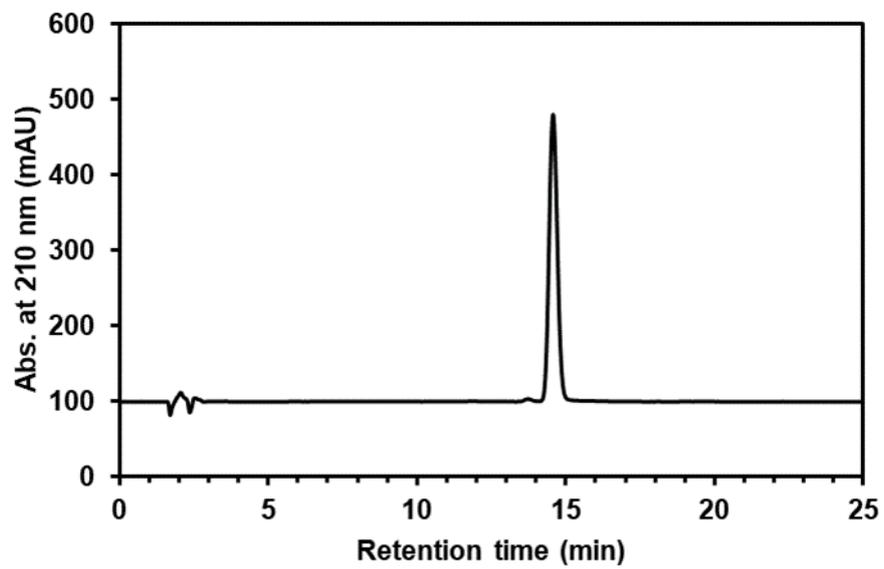


Figure 2-1. HPLC profile of purified 5-methylmellein produced by *D. rigidum* JCM8837.

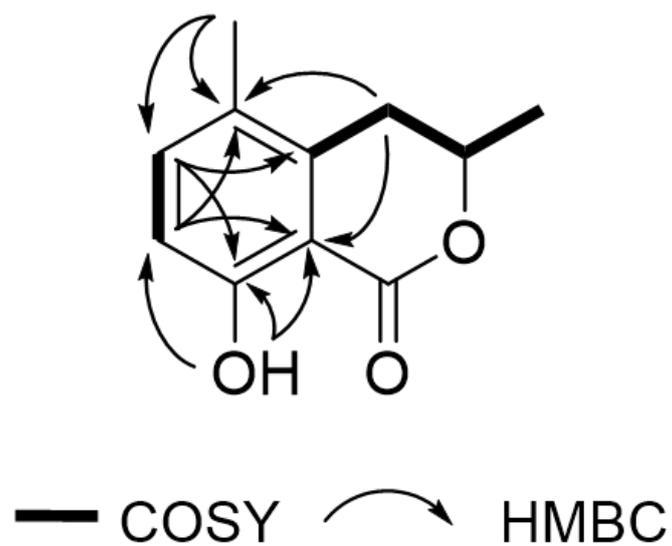


Figure2-2. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of 5-methylmellein.

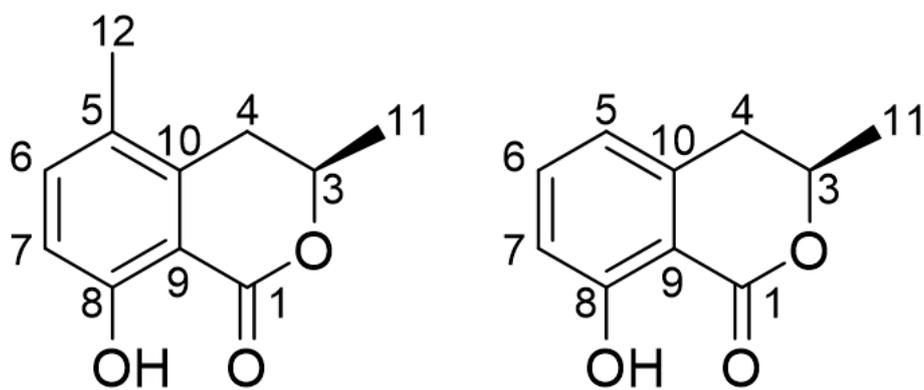


Figure 2-3. Structures of 5-methylmellein (left) and mellein (right).

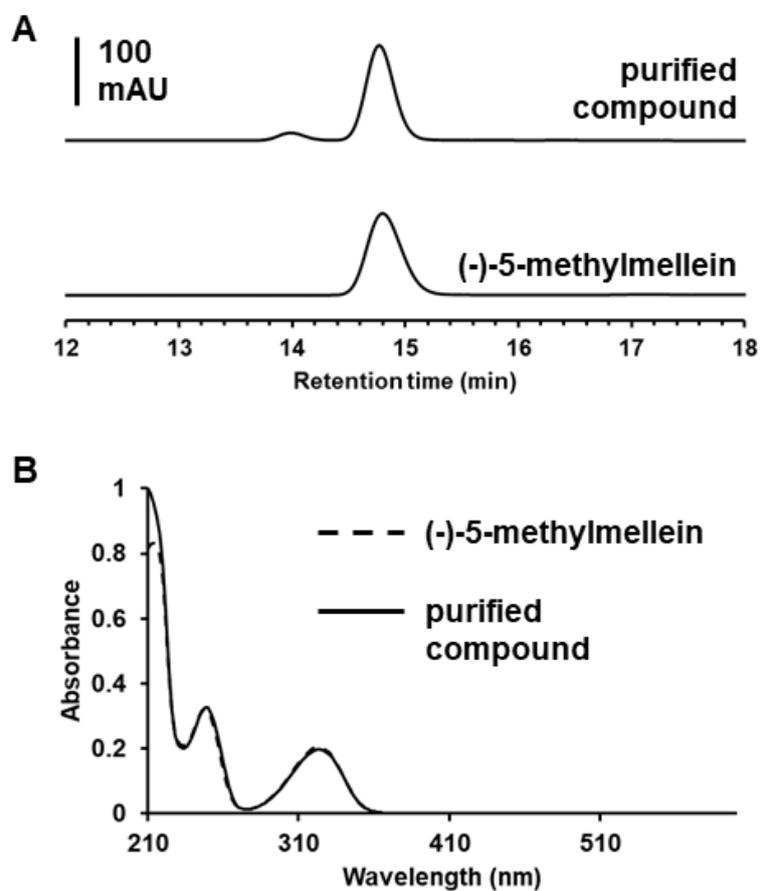


Figure 2-4. Identification of 5-methylmellein. A. HPLC profiles of purified and commercial (-)-5-methylmellein. B, UV/visible spectra of purified and commercial (-)-5-methylmellein.

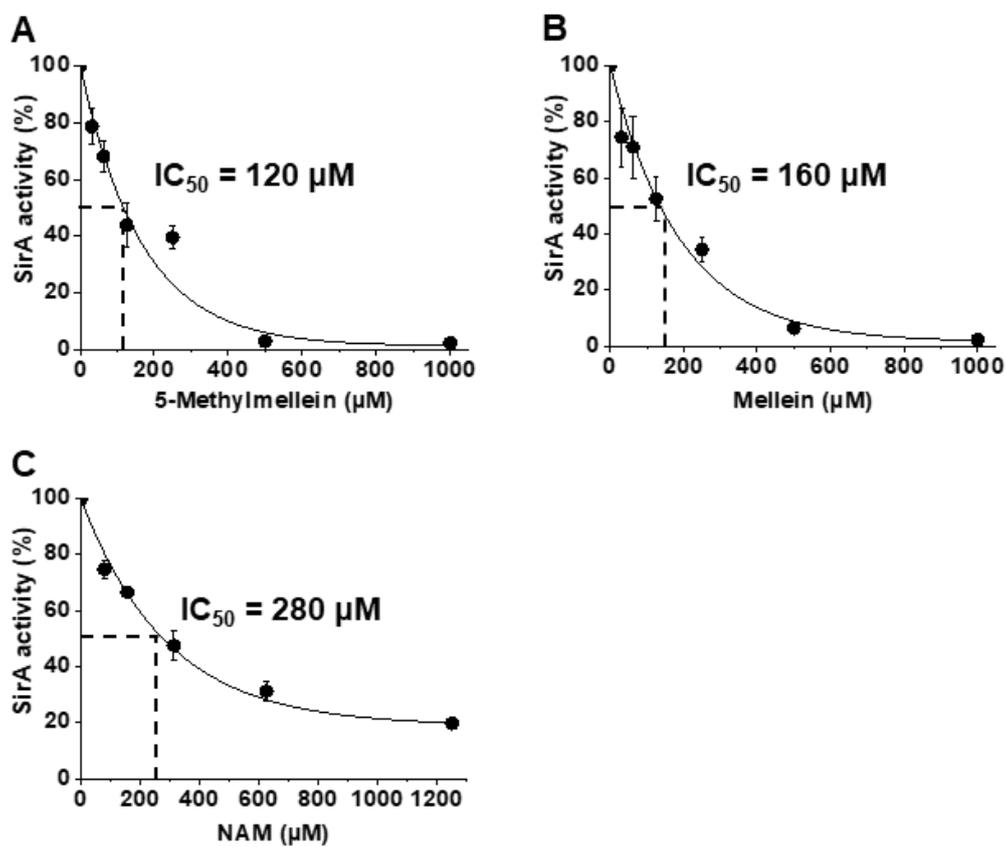


Figure 2-5. Inhibition of SirA activity.

SirA activity was measured by fluolometric assay. 5-Methylmellein (A), mellein (B), and NAM (C) showed dose-dependent inhibition of SirA *in vitro*. IC_{50} was calculated from fitted curves. Data are means \pm standard error of three experiments.

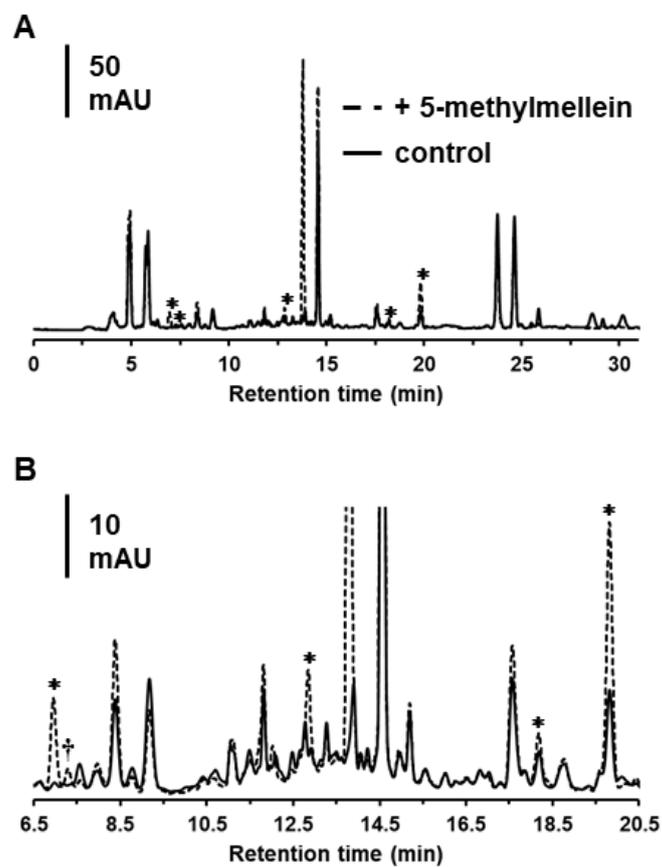


Figure 2-6. 5-Methylmellein modulates *A. nidulans* secondary metabolism.

A, HPLC profiles of ethylacetate extracts of *A. nidulans* cultured with or without 100 μ M 5-methylmellein. B, An enlarged view of HPLC. Metabolites increased in the presence of diorcinol (*) and newly metabolites produced by cells in the presence of diorcinol (†) are highlighted.

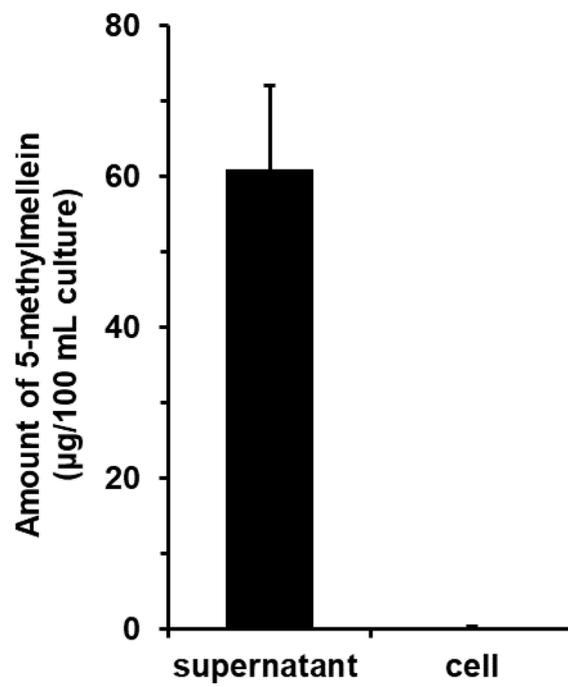


Figure 2-7. 5-Methylmellein production by *D. rigidum* JCM8837.
Data are means \pm standard error of three experiments.

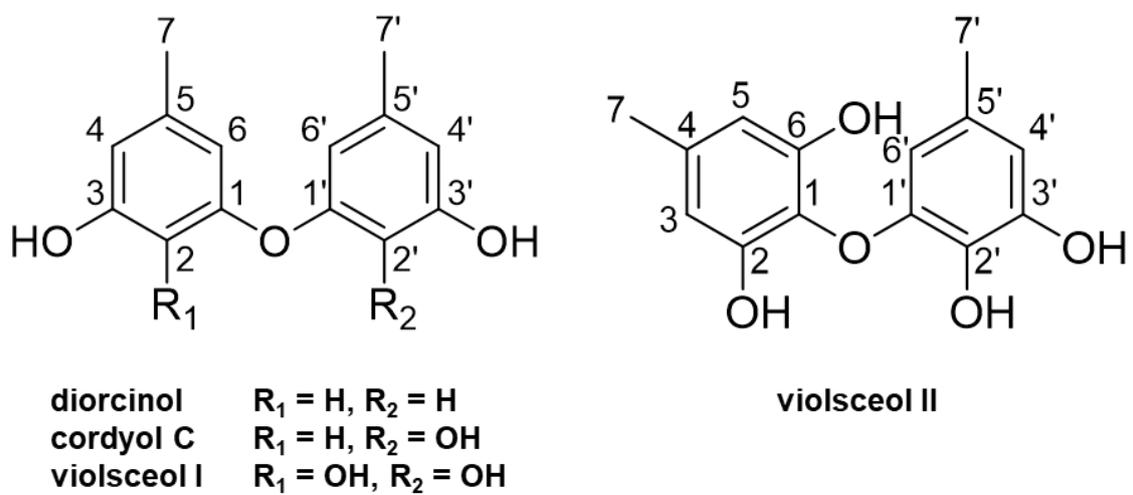


Figure 2-8. Structures of diorcinol, cordyol C, violaceol I and violaceol II.

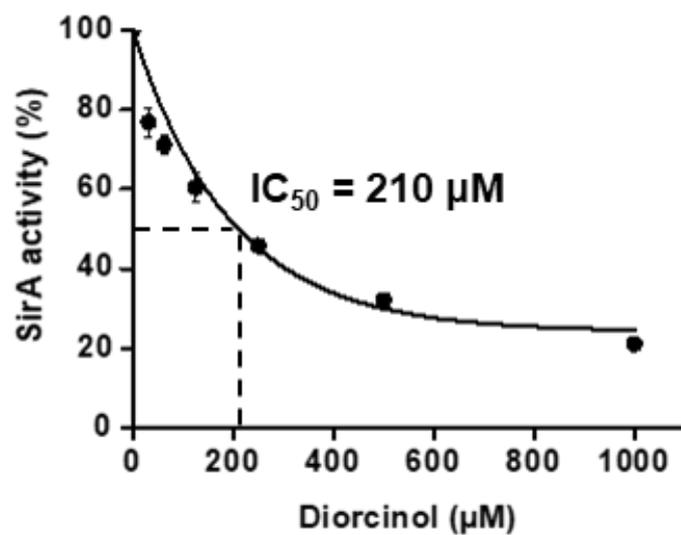
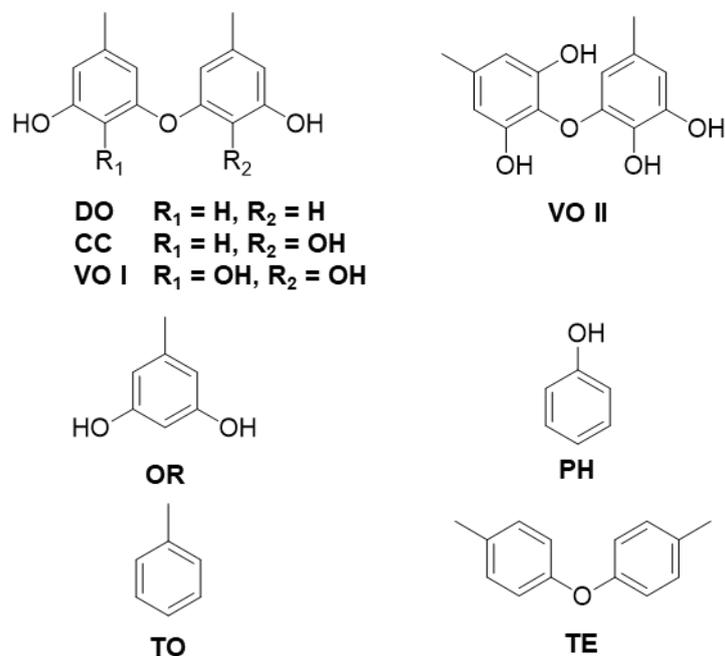


Figure 2-9. Inhibition of SirA activity by diorcinol.

SirA activity was measured by fluolometric assay. Diorcinol showed dose-dependent inhibition of SirA *in vitro*. IC₅₀ was calculated from fitted curve. Data are means \pm standard error of three experiments.

A



B

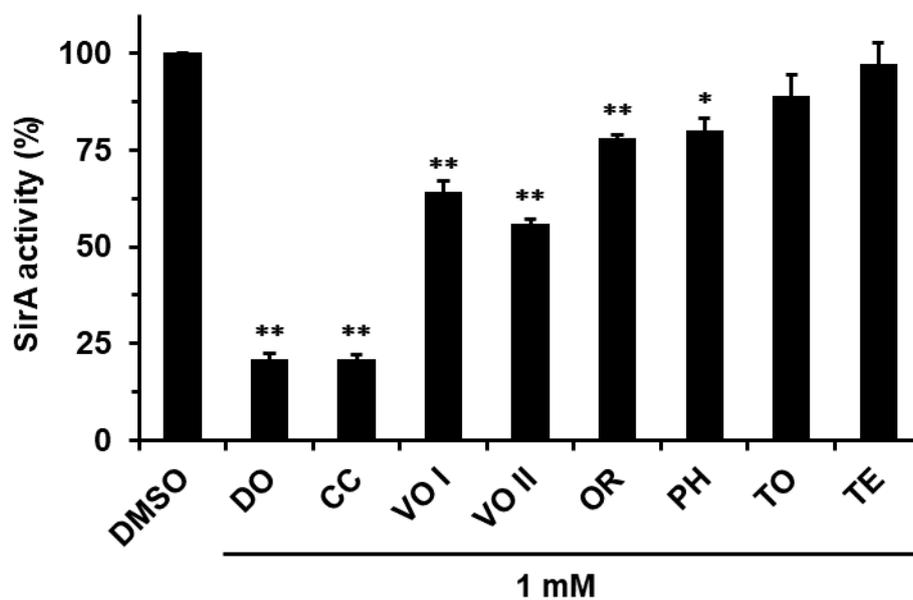


Figure 2-10. Inhibition of SirA activity by various diorcinol analogues. A. Structures of compounds used in this assay. DO, diorcinol; CC, cordyol C; VO I, violaceol I; VO II, violaceol II; OR, orcinol; PH, phenol; TO, toluene; TE, di-*p*-tolyl ether. B. SirA activity was calculated based on fluorometric assay in the presence of 1 mM each compound. Data are means \pm standard error of three experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.003$ versus DMSO.

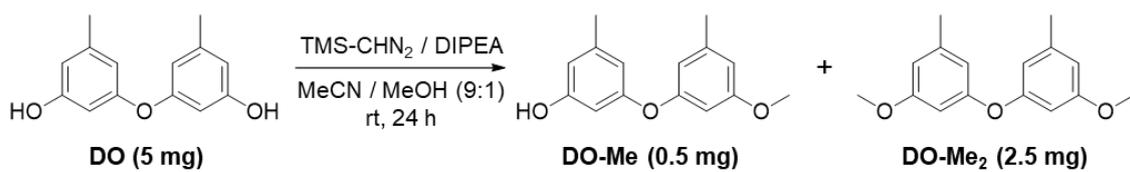


Figure 2-11. *O*-methylation of diorcinol.

DO, diorcinol; TMS-CHN₂, trimethylsilyldiazomethane; DIPEA, diisopropylethylamine;

MeCN, acetonitrile; MeOH, methanol; rt, room temperature.

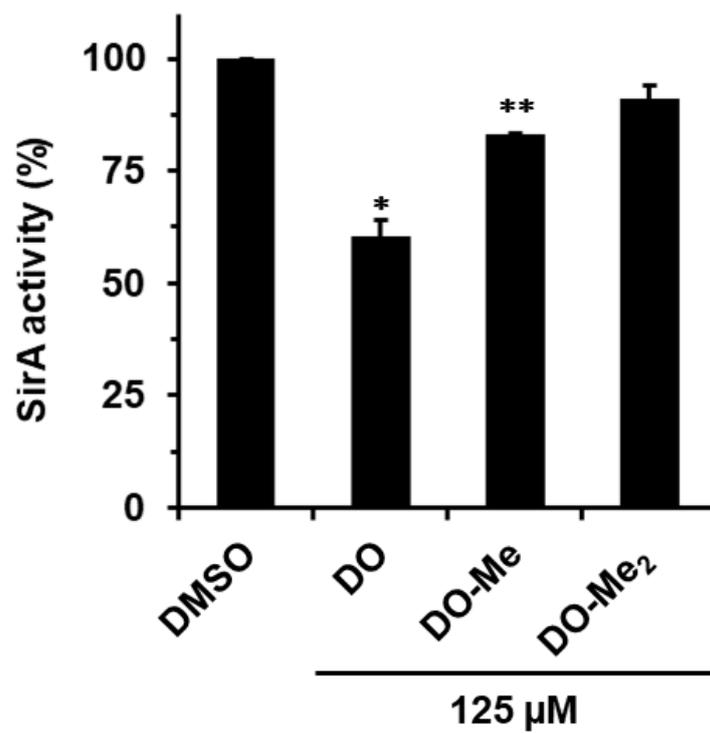


Figure 2-12. Phenolic groups play an important role in inhibition of SirA. SirA activity was calculated by fluolometric assay in the presence of 125 μM each compound. Data are means ± standard error of three experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.003$ versus DMSO.

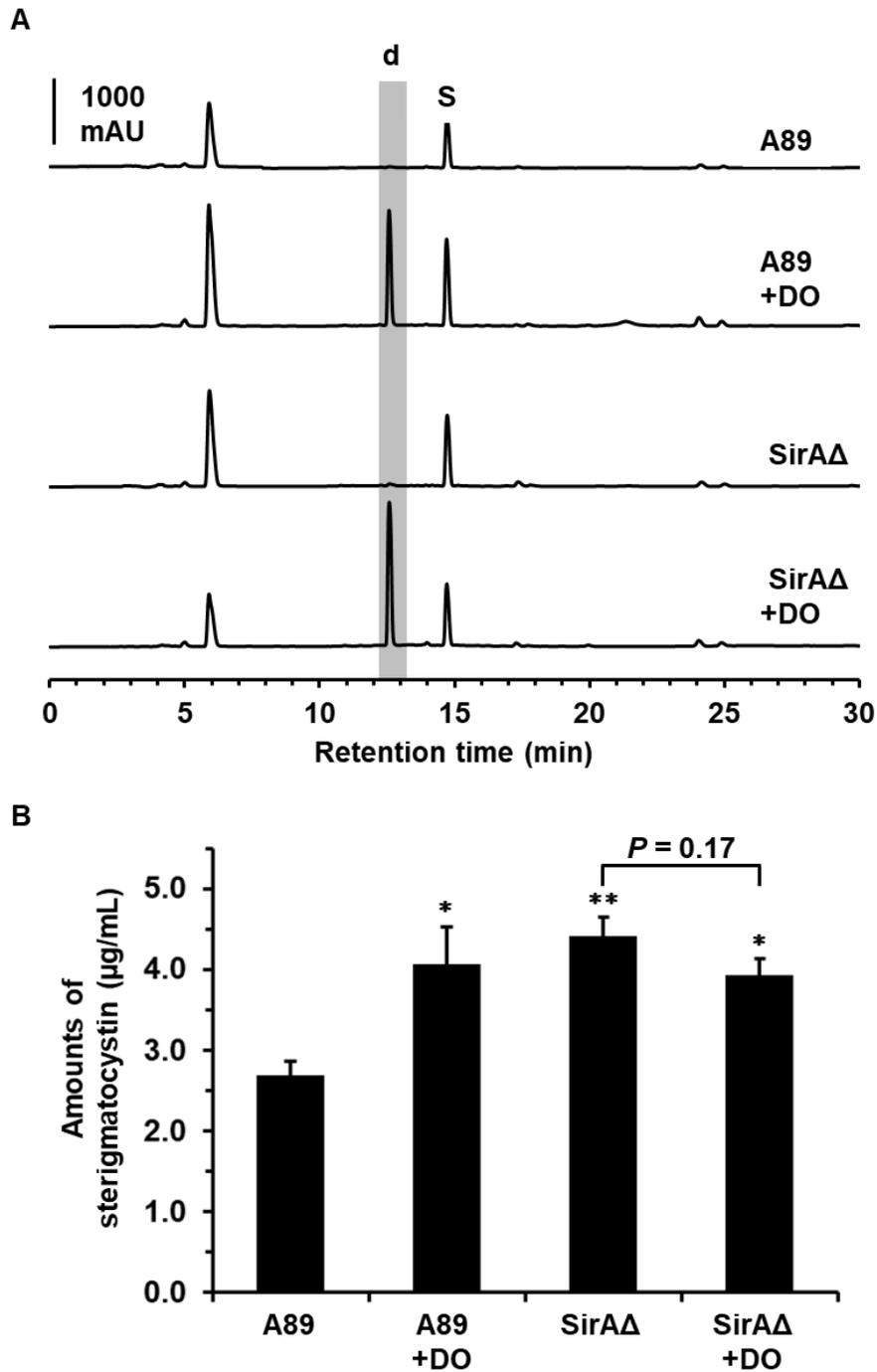


Figure 2-13. Diorcinol up-regulates sterigmatocystin production through inhibition of SirA. *A. nidulans* A89 and *sirAΔ* were cultured in GMM medium for 7d and metabolites were extracted with ethyl acetate. +DO, *A. nidulans* A89 and *sirAΔ* were cultured in the presence of 100 µM diorcinol. A. HPLC profiles of the ethyl acetate extracts. Sterigmatocystin (s) and diorcinol (d) are highlighted. B. Sterigmatocystin production. Data are means ± standard error of three experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ versus A89.

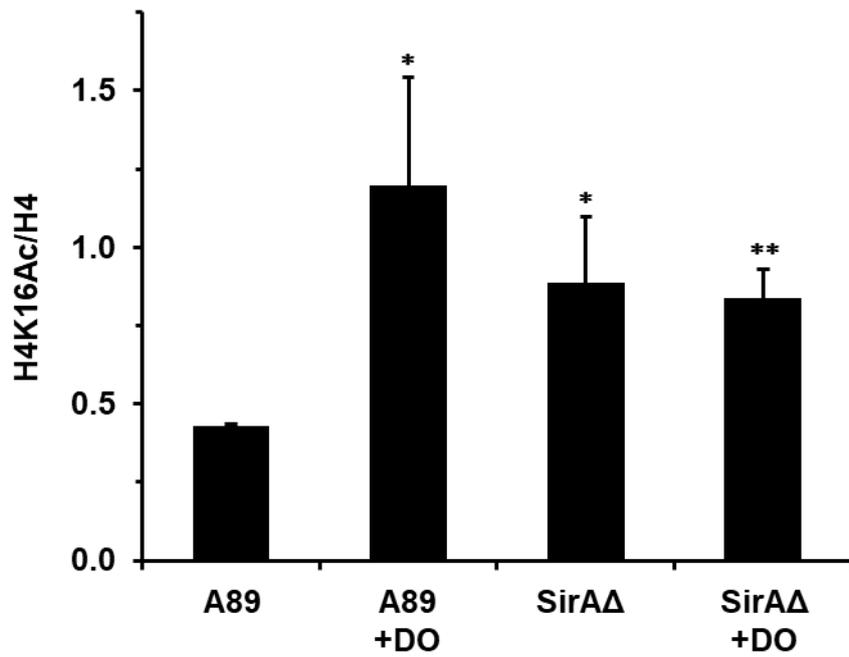


Figure 2-14. Western blot analysis of histone H4 and acetylated histone H4. *A. nidulans* A89 and *sirAΔ* were cultured in GMM medium for 3d. +DO, *A. nidulans* A89 and *sirAΔ* were cultured in the presence of 100 μ M diorcinol. Data are means \pm standard error of three experiments. *, $P < 0.08$; **, $P < 0.01$ versus A89

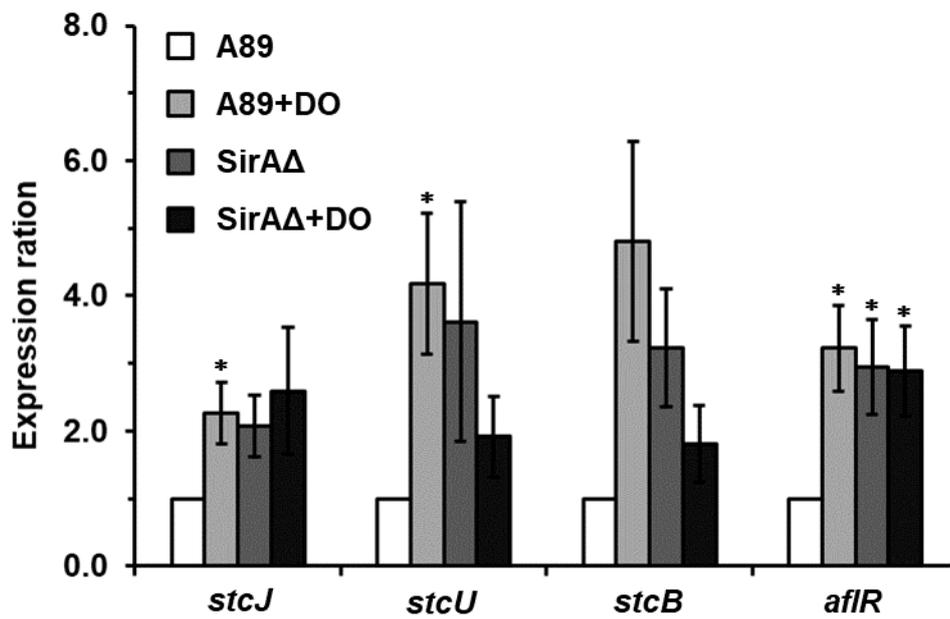


Figure 2-15. Transcript of biosynthetic genes of sterigmatocystin.

A. nidulans A89 and *sirAΔ* were cultured in GMM medium for 3d. +DO, *A. nidulans* A89 and *sirAΔ* were cultured in the presence of 100 μ M diorcinol. Data are means \pm standard error of three experiments. *, $P < 0.05$ versus A89.

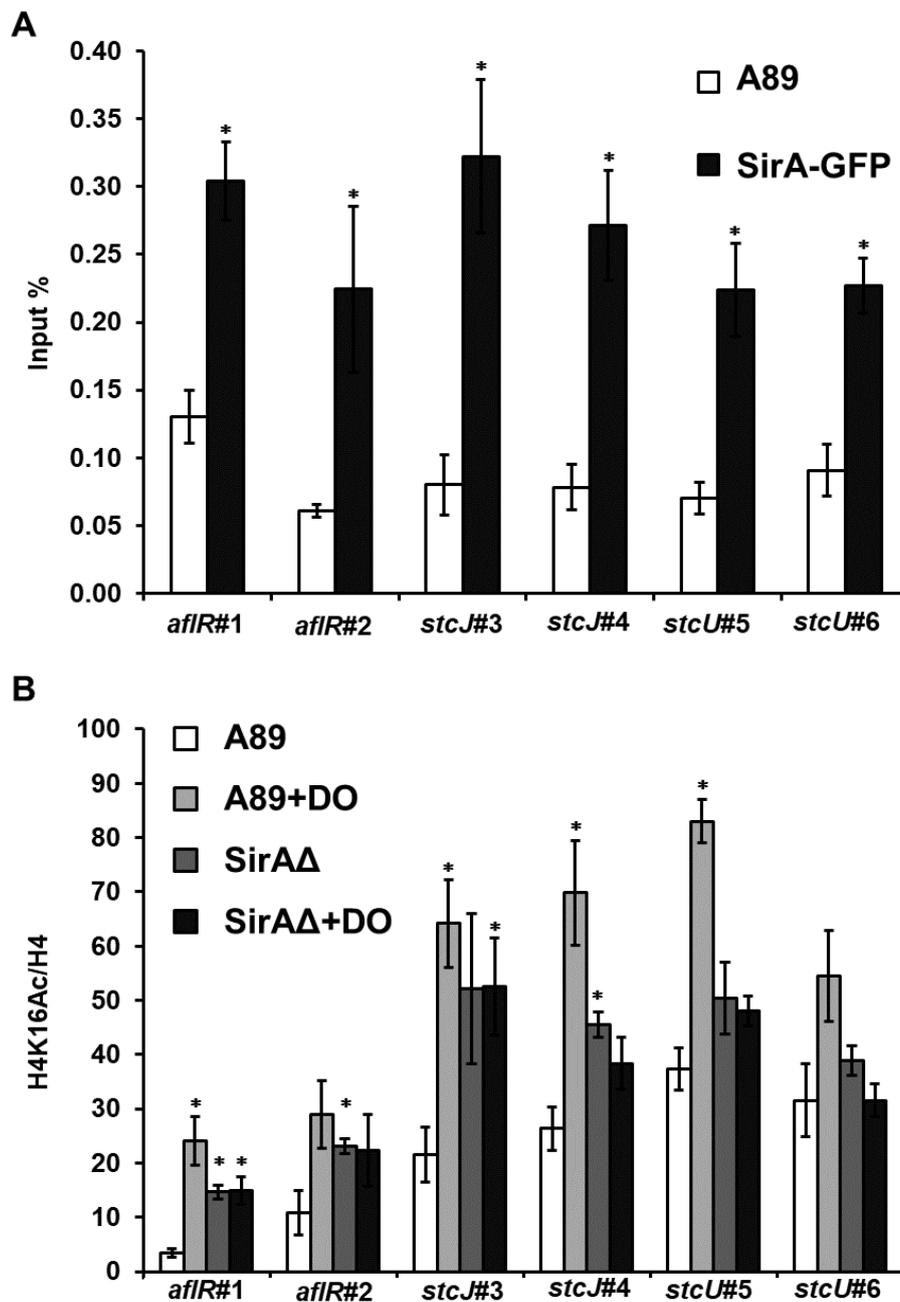


Figure 2-16. ChIP analysis of biosynthetic genes of sterigmatocystin.

A. nidulans A89 and *sirAΔ* were cultured in GMM medium for 3d. +DO, *A. nidulans* A89 and *sirAΔ* were cultured in the presence of 100 μ M diorcinol. A. ChIP analysis using anti-GFP antibody. B. ChIP analysis using anti-H4K16 (Ac) antibody and anti-H4 antibody. H4K16Ac/H4 were shown as fold enrichment of anti-H4K16 (Ac) antibody versus anti-H4 antibody. Data are means \pm standard error of three experiments. *, $P < 0.05$ versus A89.

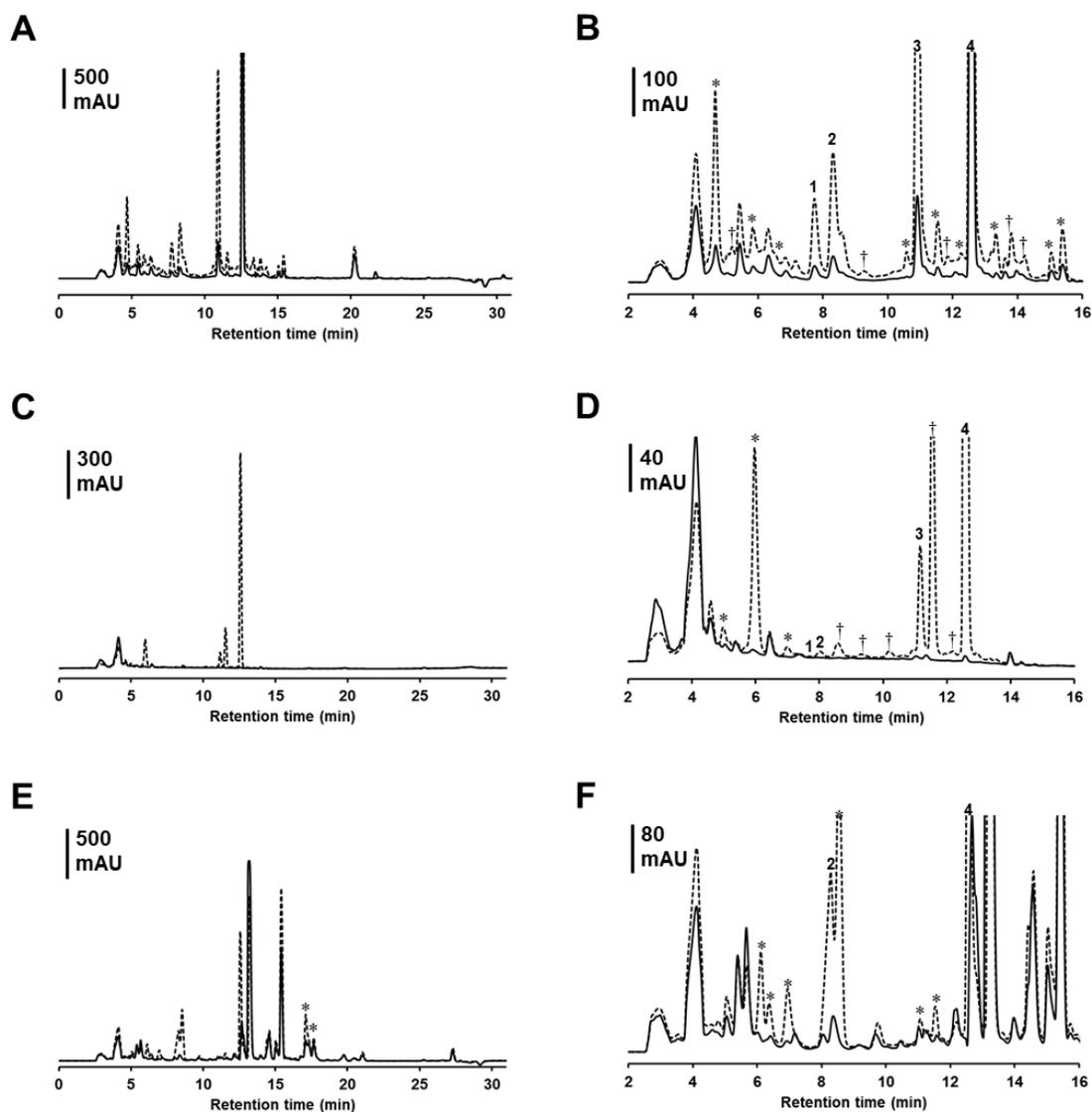


Figure 2-17. Effect of diorcinol on secondary metabolisms of various fungal strains.

A. HPLC profiles of ethyl acetate extracts of *Emericella violacea* JCM2725 cultured in PD medium with or without 100 μ M diorcinol for 7 d. B. An enlarged view of panel A. C. HPLC profiles of ethyl acetate extracts of *Rhizopus semarangensis* JCM5590 cultured in PD medium with or without 100 μ M diorcinol for 7 d. D. An enlarged view of panel C. E. HPLC profiles of ethyl acetate extracts of *Penicillium arenicola* JCM9929 cultured in CY medium with or without 100 μ M diorcinol for 7 d. F. An enlarged view of panel E. Violaceol II (1), violaceol I (2), cordyol C (3), diorcinol (4), metabolites increased in the presence of diorcinol (*) and newly metabolites produced by cells in the presence of diorcinol (†) are highlighted.

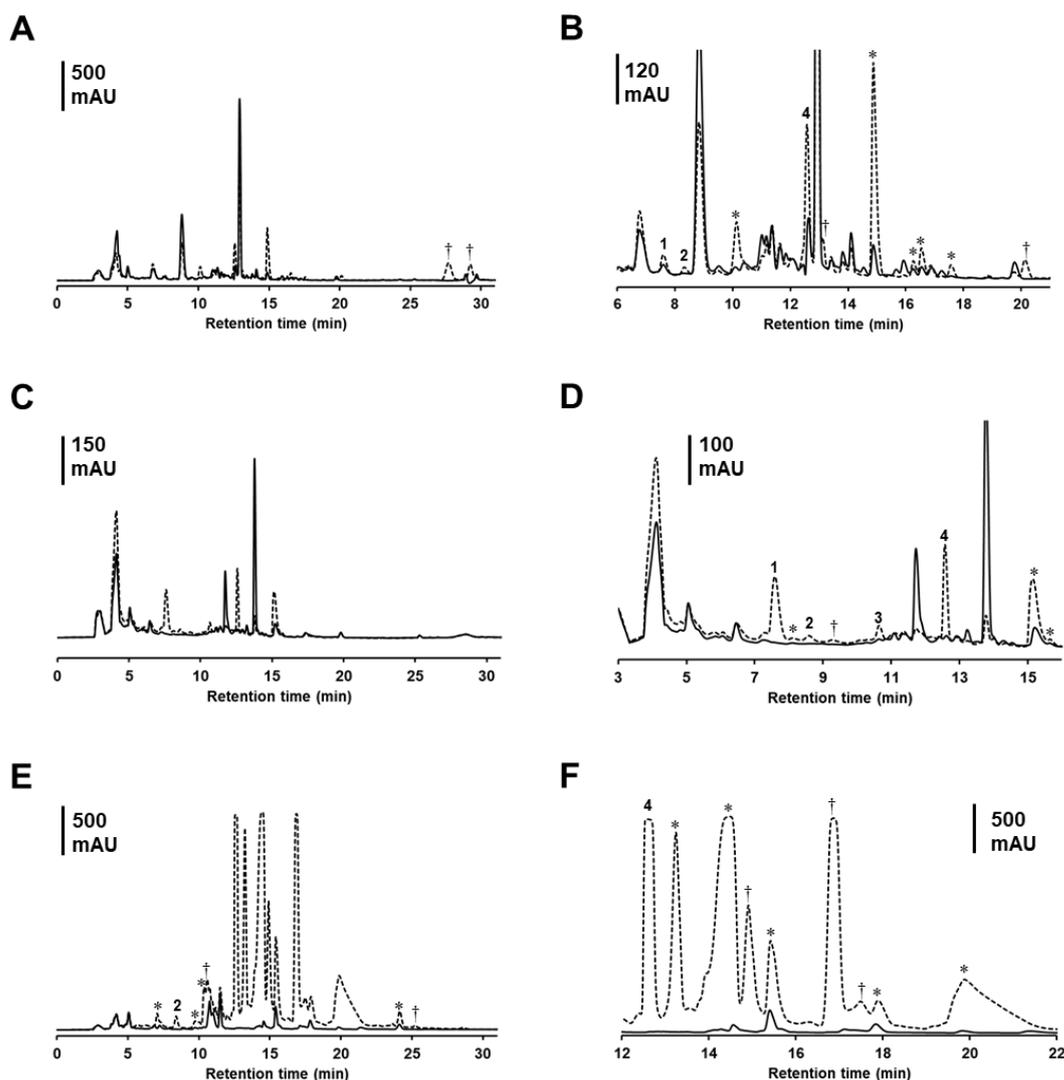


Figure 2-18. Effect of diorcinol on secondary metabolisms of various fungal strains.

A. HPLC profiles of ethyl acetate extracts of *Aspergillus terreus* JCM10257 cultured in YMG medium with or without 100 μ M diorcinol for 7 d. B. An enlarged view of panel A. C. HPLC profiles of ethyl acetate extracts of *Chaetomium globosum* JCM22615 cultured in YMG medium with or without 100 μ M diorcinol for 7 d. D. An enlarged view of panel C. E. HPLC profiles of ethyl acetate extracts of *Sarocladium oryzae* JCM12450 cultured in GGP medium with or without 100 μ M diorcinol for 3 d. F. An enlarged view of panel E. Violaceol II (1), violaceol I (2), cordyol C (3), diorcinol (4), metabolites increased in the presence of diorcinol (*) and newly metabolites produced by cells in the presence of diorcinol (†) are highlighted.

総括

近年、様々な糸状菌のゲノム DNA 配列が解読され、糸状菌のゲノムにはこれまでに見つかった数をはるかに超える二次代謝産物の生合成遺伝子群が存在することが明らかとなってきた。糸状菌由来の二次代謝産物は有用な生理活性を示すものを多く含むことから、この探索は医薬や農薬の開発における重要な課題である。本研究では、化学反応を指標としたスクリーニング手法とサーチインの活性制御の手法の開発と利用を通して、糸状菌が生産する未知の二次代謝産物の発見を目指した。

第一章では、一般的に用いられる生理活性を指標としたスクリーニングではなく、二次代謝産物の化学反応性に基づくスクリーニング手法を用いることによって、糸状菌由来の未知の二次代謝産物の探索を行った。190 種の糸状菌に由来する 1140 種の培養抽出物を対象として DMAB による呈色反応を指標としたスクリーニングを行った結果、44 株の糸状菌に由来する 74 種の培養抽出物に DMAB と反応し呈色する化合物が含まれていた。この培養抽出物から DMAB との反応性を指標に単一化合物の精製と構造解析を行った結果、*O. coprophila* JCM 9495 由来の新規化合物 onycophoazaphilone、および *W. spinulosa* JCM 2358 由来の新規化合物 7-hydroxycordylactam を発見することができた。種々の生理活性試験の結果、これらの化合物はそれぞれ抗ガン活性と抗酸化活性を示す化合物であることが分かった。これまでに、生理活性を指標としたスクリーニング手法を用いることによって多くの化合物が単離されてきたが、近年では既知化合物の再発見の頻度が増加するなど、新規化合物の取得が困難となりつつある。一方で、本研究では、二次代謝産物の化学反応性に基づくスクリーニング手法を用いることによって、糸状菌由来の未知の二次代謝産物を発見できることを示した。

第二章では、*D. rigidum* JCM 8837 と *E. nidulans* JCM 10259 が生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤を同定した。*D. rigidum* JCM 8837 の生産する SirA の HDAC 活性の阻害剤は既知のポリケチドである 5-methylmellein であった。5-Methylmellein を *A. nidulans* の

培養に添加することによって、1種の化合物が新しく生産され、4種の化合物の生産が1.5倍以上増加したことから、5-methylmelleinは*A. nidulans*の二次代謝の活性化に有効であることが示された。また、*E. nidulans* JCM 10259が生産するSirAのHDAC活性の阻害剤はDOおよびその類縁体であった。DOを*A. nidulans*の培養に添加することによって、STの生産量が増加することが示された。また、ST生合成遺伝子の転写産物の定量とChIP解析の結果から、DOはSirAによるST生合成遺伝子のプロモーター領域の脱アセチル化を阻害することによって、これらの遺伝子の転写を活性化し、STの生産量を増加させることが示された。また、DOを添加して培養することによって、6種の糸状菌が二次代謝産物の生産を増加させたことから、DOは汎用的な糸状菌の二次代謝の活性化剤として活用できることが期待された。糸状菌のゲノム上に産物が未知の二次代謝産物合成遺伝子が多数存在することが明らかとなつてから、遺伝子破壊や高発現プロモーターの利用など、様々な手法でこれらの二次代謝産物の同定が試みられてきた。しかしながら、多くの糸状菌ではゲノム情報や形質転換系が利用できないことから、これらの手法は多種の糸状菌の二次代謝産物の網羅的な探索には適用が難しい。本研究で発見したDOや5-methylmelleinのようなサーチュインの活性阻害剤を糸状菌の培養に添加することによって二次代謝を活性化させる方法は、操作が簡便であり、糸状菌の種を問わず適用が可能なことから、糸状菌の二次代謝産物の探索研究への応用が容易である。また、糸状菌のサーチュインの活性阻害剤の発見は本研究が初めての報告である。ヒトのサーチュインの活性阻害剤として知られるNAMは糸状菌の二次代謝の活性化に有効であることが示されているが、NAMを用いた二次代謝の活性化が有効な糸状菌は1割程度であると言われている。一方で、DOは7種の糸状菌の内、6種の糸状菌の二次代謝を活性化できたことから、NAMより広範な種の糸状菌に対して二次代謝の活性化剤として利用できることが期待される。また、5-methylmelleinとDOはそれぞれ異なる二次代謝産物の生産を活性化したことから、今後も糸状菌のサーチュインの活性阻害剤

を開発していくことは、糸状菌由来の新たな二次代謝産物を獲得するために重要である。

以上、DMAB との化学反応を指標としたスクリーニングとサーチェインの活性阻害剤の利用という新たな手法が、糸状菌由来の新たな二次代謝産物のスクリーニングに有効であることが示された。糸状菌を含めた菌類は約 8 万種が知られており、地球上には 150 万種を超える菌類が存在すると推察されている (国立科学博物館、2008 年)。また、ゲノムが解読された糸状菌は、これまで発見された化合物数をはるかに超える二次代謝産物の生合成遺伝子を持つことから、糸状菌には膨大な数の二次代謝産物が未発見のまま取り残されていると言える。本研究で開発した 2 つの手法は糸状菌の種を問わず適用可能であり、糸状菌に取り残された二次代謝産物を発見する技術として有効である。糸状菌由来の二次代謝産物の多様性を導く本研究成果は、天然物の構造多様性を広げる新たな探索技術として重要であるとともに、今後の医薬品等の開発研究にも大きく貢献するものである。

参考文献

- 村上英也 (1986). 麹学. (財)日本醸造協会
- 国立科学博物館 (2008). 菌類のふしぎ. 東海大学出版会
- 沖智之 (2008). DPPH ラジカル消去活性評価法. 「食品機能性評価マニュアル集第 II 集」(食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編). 食品科学工学会, 71-78
- 木下浩, 仁平卓也. (2011). 糸状菌ゲノムに眠る生理活性物質生合成遺伝子の有効利用. *生物工学会誌*, **89**, 313-318
- 浅井禎吾, 大島吉輝 (2013). 糸状菌二次代謝のエピジェネティック制御と天然物探索. *化学と生物*, **51**, 13-21
- Alberti, F., Khairudin, K., Venegas, E., Davies, J., Hayes, P., Willis, C., Bailey, A. and Foster, G. (2017). Heterologous expression reveals the biosynthesis of the antibiotic pleuromutilin and generates bioactive semi-synthetic derivatives. *Nature Communications*, **8**, 1831
- Aoyama, T., Terasawa, S., Sudo, K. and Shioiri, T. (1984). New methods and reagents in organic synthesis. 46. Trimethylsilyldiazomethane: A convenient reagent for the O-methylation of phenols and enols. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **32**, 3759-3760.
- Asai, T., Morita, S., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Sakurai, H., Ozeki, T. and Oshima, Y. (2012). Structural diversity of new C13-polyketides produced by *Chaetomium mollipilium* cultivated in the presence of a NAD⁺-dependent histone deacetylase inhibitor. *Organic Letters*, **14**, 5456-5459.
- Asai, T., Otsuki, S., Sakurai, H., Yamashita, K., Ozeki, T. and Oshima, Y. (2013). Benzophenones from an endophytic fungus, *Graphiopsis chlorocephala*, from *Paeonia lactiflora* cultivated in the presence of an NAD⁺-dependent HDAC inhibitor. *Organic Letters*, **15**, 2058-2061.
- Asai, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., Monde, K. and Oshima, Y. (2013). Structures of Spiroindicumides A and B, unprecedented carbon skeletal spiro lactones, and determination of the absolute configuration by vibrational circular dichroism exciton approach. *Organic Letters*, **15**, 4320-4323.
- Asai, T., Morita, S., Taniguchi, T., Monde, K. and Oshima, Y. (2016). Epigenetic stimulation of polyketide production in *Chaetomium cancroideum* by an NAD⁺-dependent HDAC inhibitor. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **14**, 646-651.

- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, **58**, 1-26.
- Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. and Hertweck, C. (2007). Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature Chemical Biology*, **3**, 213-217.
- Bernreiter, A., Ramon, A., Fernandez-Martinez, J., Berger, H., Araujo-Bazan, L., Espeso, E., Pachlinger, R., Gallmetzer, A., Anderl, I., Scazzocchio, C. and Strauss, J. (2006). Nuclear Export of the Transcription Factor NirA Is a Regulatory Checkpoint for Nitrate Induction in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 791-802.
- Brown, D., Yu, J., Kelkar, H., Fernandes, M., Nesbitt, T., Keller, N., Adams, T. and Leonard, T. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, **93**, 1418-1422.
- Bush, K. and Bradford, P. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**, 025247.
- Dias, D., Urban, S. and Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2**, 303-336.
- Furgieuele, A., Farnsworth, N. and Buckley, J. (1962). False-positive alkaloid reactions obtained with extracts of piper methysticum. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **51**, 1156-1162.
- Futamura, Y., Kawatani, M., Kazami, S., Tanaka, K., Muroi, M., Shimizu, T., Tomita, K., Watanabe, N. and Osada, H. (2012). Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. *Chemistry & Biology*, **19**, 1620-1630.
- Gao, J., Yang, S. and Qin, J. (2013). Azaphilones: chemistry and biology. *Chemical Reviews*, **113**, 4755-4811.
- Grozinger, C., Chao, E., Blackwell, H., Moazed, D. and Schreiber, S. (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 38837-38843.
- Grundy, S. (1988). HMG-CoA Reductase Inhibitors for Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*, **319**, 1222-1223.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.

- Guerre, P. (2015). Ergot Alkaloids Produced by Endophytic Fungi of the Genus *Epichloë*. *Toxins*, **7**, 773-790.
- Hirao, M., Posakony, J., Nelson, M., Hraby, H., Jung, M., Simon, J. and Bedalov, A. (2003). Identification of selective inhibitors of NAD⁺-dependent deacetylases using phenotypic screens in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 52773-52782.
- Imai, S., Armstrong, C., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.
- Isaka, M., Chinthanom, P., Rachtawee, P., Somyong, W., Luangsa-ard, J. and Hywel-Jones, N. (2013). Cordylactam, a new alkaloid from the spider pathogenic fungus *Cordyceps* sp. BCC 12671. *Phytochemistry Letters*, **6**, 162-164.
- Itoh, E., Odakura, R., Oinuma, K., Shimizu, M., Masuo, S. and Takaya, N. (2017). Sirtuin E is a fungal global transcriptional regulator that determines the transition from the primary growth to the stationary phase. *Journal of Biological Chemistry*, **292**, 11043-11054.
- Itoh, E., Shigemoto, R., Oinuma, K., Shimizu, M., Masuo, S. and Takaya, N. (2017). Sirtuin A regulates secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **63**, 228-235.
- Kawauchi, M., Nishiura, M. and Iwashita, K. (2013). Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA. *Eukaryotic Cell*, **12**, 1087-1096.
- Kinghorn, A. (1992). Ergot alkaloids: chemistry, biological effects, biotechnology. *The Quarterly Review of Biology*, **67**, 357-358.
- Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *The Journal of Antibiotics*, **40**, 1249-1255.
- Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J. and Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 935-949.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- Lee, I., Oh, J., Keats Shwab, E., Dagenais, T., Andes, D. and Keller, N. (2009). HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 782-790.
- Li, J. and Vederas, J. (2009). Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier?. *Science*, **325**, 161-165.
- Li, J., Shang, X., Li, L., Liu, M., Zheng, J. and Jin, Z. (2010). New cytotoxic azaphilones from *Monascus purpureus* fermented rice (Red Yeast Rice). *Molecules*, **15**, 1958-1966.
- Manning, T., Rhodes, E., Loftis, R., Phillips, D., Demaria, D., Newman, D. and Rudloe, J. (2006). ET743: Chemical analysis of the sea squirt *Ecteinascidia turbinata* ecosystem. *Natural Product Research*, **20**, 461-473.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. and Pácsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 573.
- Pye, C., Bertin, M., Lokey, R., Gerwick, W. and Linington, R. (2017). Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114**, 5601-5606.
- Ramana Murthy, M., Mohan, E. and Sadhukhan, A. (1999). Cyclosporin-A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **34**, 269-280.
- Sakai, R., Yoshida, K., Kimura, A., Koike, K., Jimbo, M., Koike, K., Kobiyama, A. and Kamiya, H. (2008). Cellular origin of dysiherbaine, an excitatory amino acid derived from a marine sponge. *ChemBioChem*, **9**, 543-551.
- Sarker, S., Nahar, L. and Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, **42**, 321-324.
- Shimizu, M., Masuo, S., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y. and Takaya, N. (2012). Hydrolase controls cellular NAD, sirtuin, and secondary metabolites. *Molecular and Cellular Biology*, **32**, 3743-3755.
- Shwab, E., Bok, J., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S. and Keller, N. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell*, **6**, 1656-1664.
- Stierle, A., Strobel, G. and Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, **260**, 214-216.

- Takasaki, K., Shoun, H., Yamaguchi, M., Takeo, K., Nakamura, A., Hoshino, T. and Takaya, N. (2004). Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 12414-12420.
- Ueoka, R., Ise, Y., Ohtsuka, S., Okada, S., Yamori, T. and Matsunaga, S. (2010). Yaku'amides A and B, cytotoxic linear peptides rich in dehydroamino acids from the marine sponge *Ceratopsion* sp. *Journal of American Chemical Society*, **132**, 17692-17694.
- Wilson, M., Mori, T., Rückert, C., Uria, A., Helf, M., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E., Brachmann, A., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüseemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H. and Piel, J. (2014). An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature*, **506**, 58-62.
- Yuzuru, I., Juichi, A., Tadataka, K., Haruki, Y., Satoshi, O. and Toju, H. (1973). Selective production of cerulenin by *Cephalosporium caerulens* KF-140. *Journal of Fermentation Technology*, **51**, 575-581.
- Zhou, S., Narukami, T., Nameki, M., Ozawa, T., Kamimura, Y., Hoshino, T. and Takaya, N. (2011). Heme-biosynthetic porphobilinogen deaminase protects *Aspergillus nidulans* from nitrosative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 103-109.
- Ziegler, J. and Facchini, P. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 735-769.

謝辞

本研究を行うにあたり、研究指導教員として終始御指導、御助言頂きました筑波大学生命環境科学研究科教授 高谷直樹先生に心より御礼申し上げます。

また研究を行ううえでの心構え、方向性について終始御指導頂きました筑波大学生命環境科学研究科教授 星野貴行先生、筑波大学生命環境科学研究科教授 中村顕先生、筑波大学生命環境科学研究科教授 野村暢彦先生、筑波大学生命環境科学研究科准教授 橋本義輝先生、筑波大学生命環境科学研究科准教授 應蓓文先生に心より感謝致します。

本研究に多大な御指導、御助言を賜りました、大阪市立大学大学院医学研究科細菌学助教 老沼研一先生、筑波大学生命環境科学研究科助教 竹下典男先生、筑波大学生命環境科学研究科助教 榎尾俊介先生に心より感謝致します。

東京大学農学生命科学研究科講師 勝山陽平先生、筑波大学生命環境科学研究科助教 熊野匠人先生には核磁気共鳴スペクトル解析の際に御指導、御助言を頂き、心より御礼申し上げます。

独立行政法人理化学研究所長田抗生物質研究室訪問研究員 二村友史先生には生理活性試験に御協力頂き、深く感謝致します。

そして、私が大学院の生活を送るにあたり、公私にわたり多大な御協力、御指導を賜りつつ楽しく過ごさせてくださいました、筑波大学生命環境科学研究科負荷適応分子生物学研究室の先輩、同輩、後輩に心から感謝致します。