

昆虫病原性糸状菌が生産する生理活性物質



研究ノート

木下 浩*

Bioactive compounds produced by entomopathogenic fungi

Key Words : bioactive compounds, entomopathogenic fungi,
secondary metabolites

1. はじめに

多剤耐性菌の出現による院内感染の発生、新型インフルエンザなど新疾病の報告や治療薬の見つかっていない病気が存在することなどから、新規抗生物質、抗ウイルス剤への需要は未だ高い。これまで多くの生理活性物質が放線菌をはじめとする様々な微生物から見出されてきたが¹⁾、これまでの探索の結果、土壌から容易に単離される菌からは新規物質は探し尽くされたと考えられている²⁾。そのため近年では海洋生物を始め、生体内を含む多様な環境から取得された菌を用いたり、複数の菌を共培養したりすることによって新規化合物の取得が試みられている^{3) 4)}。我々は近年、昆虫に病原性を示す糸状菌 (Entomopathogenic Fungi: EPF) に着目している。EPF は昆虫へ感染、増殖する菌群の総称であるが、その生育の過程で毒素、免疫不活化物質など様々な生理活性物質を生産していると推測されている^{5) 6) 7)}。しかしながら本菌群は生育環境が特殊であり、生産状況を研究室内で再現することが難しいため、これまで同定された化合物は限られており、いわば未開拓な生物資源と考えられる⁸⁾。本稿ではEPFについて行った複数の解析系による化合物生産性評価、およびスクリーニングにより単離された新規生理活性物質について紹介する。

2. 生物活性に基づいた新規抗植物病原性卵菌物質の単離

EPF はそれ自体が病害虫に対する農薬や土壌改良材として使用されている他に、抗バクテリア剤、抗昆虫性物質、抗マラリア薬、抗腫瘍剤などの生理活性物質生産菌でもある^{9) 10) 11) 12)}。しかしこれまでテンサイ黒根病 (苗立枯病) 菌 (*Aphanomyces cochlioides*)、ダイズ茎疫病菌 (*Phytophthora sojae*) などの植物病原性卵菌に対する効果は調べられていなかった。そこで日本各地より単離した414菌株のEPFを固体培地上で培養し、*A. cochlioides* と *P. sojae* に対する抗菌活性を調べたところ、全体の六割以上の菌株 (61.7%) が少なくともいずれかの卵菌に対する生育阻害活性を有していた。それらのうち高い活性を示した15菌株について静置液体培養を行い、*n*-butanol もしくは酢酸エチルを用いて培養抽出液を調製した。得られた培養抽出液中に存在する二次代謝物質について逆相HPLCにより解析を行ったところ、1つの新規化合物 (farinomalein (3)) と6つの既知物質 (aranorosinol A (1), paecilisetin (2), beauvericin (4), fungerin (5), aurovertin D (6), *N*-(methyl-3-oxodec-6-enoyl)-2 pyrroline (7) and *N*-(methyl-3-oxodecanoyl)-2 pyrroline (8)) を抗卵菌活性を与える物質として同定することができた。(図1)

今回EPFにおいて生産が確認された既知物質については、いずれも抗卵菌活性は報告されておらず、これらについても更に解析、開発を進めることにより新たな抗卵菌化合物として利用できる可能性は高いと考えられる。

3. *Isaria farinosa* HF599 が生産する新規抗卵菌化合物 farinomalein の単離、構造決定および生物学的活性測定

植物病原性卵菌 *P. sojae* によって引き起こされる



*Hiroshi KINOSHITA

1968年10月生
京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻卒 (1996年)
現在、大阪大学 生物工学国際交流センター分子微生物学研究室 助教 博士 (工学) 分子微生物学、応用微生物学
TEL : 06-6879-4086
FAX : 06-6879-7454
E-mail : kinosita@icb.osaka-u.ac.jp

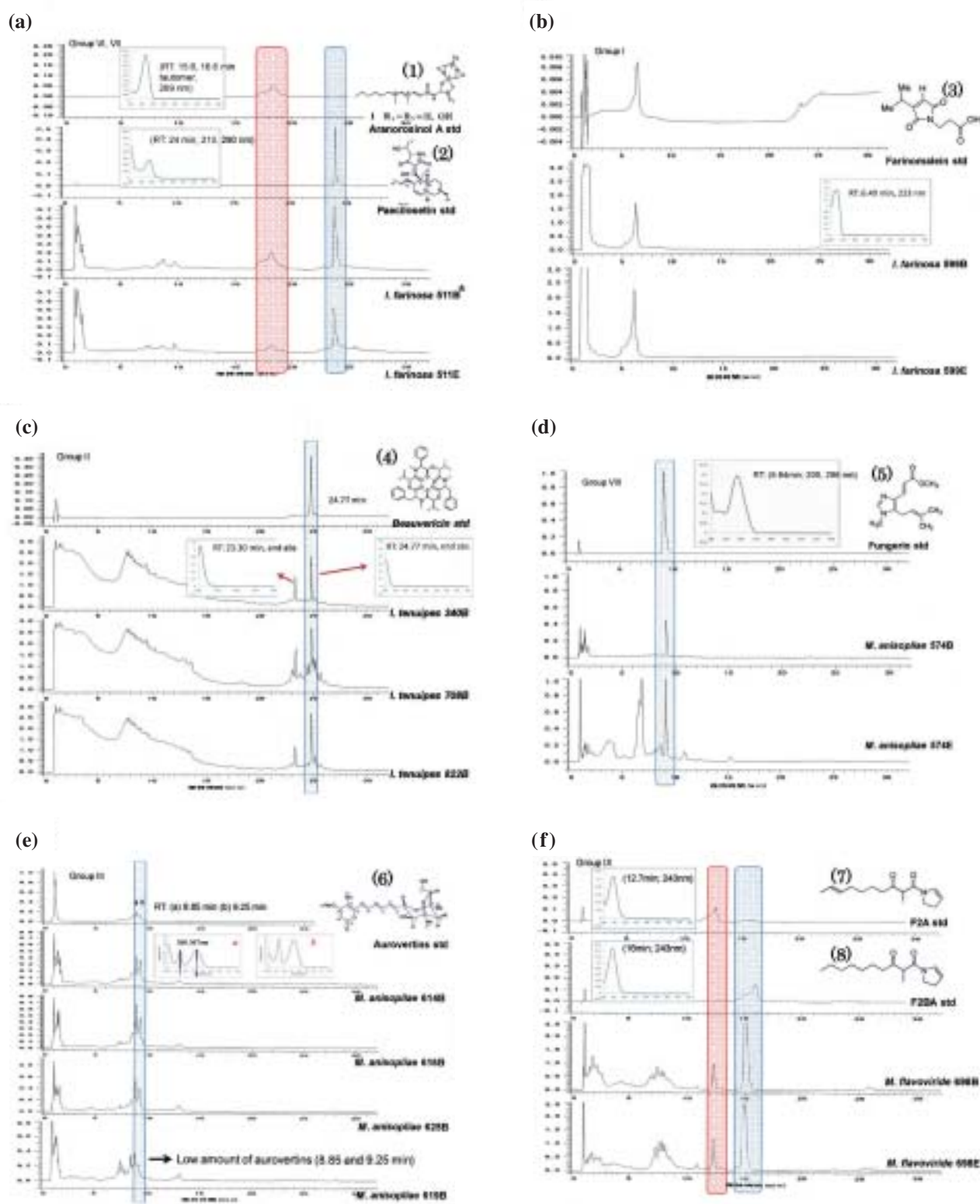


図1. EPF 各菌株培養抽出液中の抗卵菌物質.
 (a) *I. farinosa* HF511: Aranorosinol A (1) と paecilosetin (2)
 (b) *I. farinosa* HF599: Farinomalein (3)
 (c) *I. tenuipes* HF340, HF740, HF822: Beauvericin (4)
 (d) *M. anisopliae* HF574: Fungerin (5)
 (e) *M. anisopliae* HF614, HF616, HF619, および HF625: Aurovertins (6)
 (f) *M. flavoviridae* HF698: N-(methyl-3-oxodec-6-enoyl)-2-pyrroline (7), N-(methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline (8)
 *B: n-butanol 抽出, E: 酢酸エチル抽出

ダイズ茎疫病は、ダイズの主要な疫病であり、世界中で甚大な損害を与えている¹³⁾。現在、この病気に対してはアシル化アラニン誘導体のメタラキシルが主として用いられるが、世界規模での抵抗性菌株の出現、および食への意識の高まりから、天然物由来の、より安全で効果的な化合物の開発が待たれている¹⁴⁾。前述の抗卵菌化合物のスクリーニングにおいて *Isaria farinosa* HF599 の酢酸エチル抽出液が *P. sojae* に対して高い生育阻害を示したことから、これまで *Isaria* 属からは抗卵菌物質は報告されていなかったことから、活性成分が新規化合物である可能性が高いと考え、本菌からの単離を行うこととした。多段階の過程を経て最終的に C₁₈ 逆相 HPLC により精製された化合物について、様々な分光学的解析を利用して構造を決定した結果、活性化化合物は自然界ではまれなマレイミド環を持っていることが示され、*farinomalein* と命名した¹⁵⁾。(図2) *Farinomalein* について大腸菌、酵母を始め各種微生物を被検菌とする生育阻害活性を測定したが、卵菌以外の物質には顕著な活性は示さなかった。一方卵菌には、特に植物病原性の *P. sojae* 8 菌株に対しては 0.15-5 µg/disk

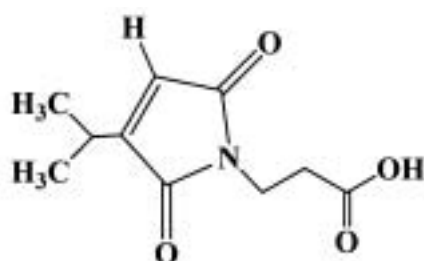


図2. *Farinomalein* (3) の構造

という極めて低い濃度でも生育阻害効果を示した。(Table 1) 以上の結果から *farinomalein* はダイズ茎疫病に対する特異的な処置薬として大変有望であると考えられ、誘導体化等によるさらなる活性の改善を通じて広く利用されることが期待できる。

4. 構造的特徴に基づいた EPF からの新規化合物探索

新規化合物の探索は従来、化合物が有する生物活性、酵素活性を手かりに行われてきた。しかしながら、この手法では、時間、労力、コストを考慮に入れると構築できるハイスループットなアッセイ系には限りがあるため、多くの物質はスクリーニングに掛からず見落とされてきたと考えられる。様々な生理活性以外に化合物が保持する固有な性質として、化合物分子を形作る化学構造がある。構造に由来する情報は、分光学的手法により迅速に測定できることから、この情報を有効に利用できれば生物活性に依存せず、新規な構造を持った化合物を効率的に単離できると期待される。

本研究においては各菌体の培養抽出液中に存在する物質を逆相 HPLC で分離し、各化合物ピークの紫外吸収スペクトルをフォトダイードアレイ検出器により測定した。得られたスペクトルを化合物の固有な構造情報と考え、研究室が保有するライブラリーに登録されている化合物のスペクトルと比較することにより新規性を評価することにした。代表的な 38 菌株の EPF について培養抽出液を調製し、上記の構造情報に基づいたスクリーニングを行い、新規物質と見なされた化合物について精製、解析を進め

Table 1. *In vitro* antioomycete activities of *farinomalein* against plant pathogenic oomycetes determined by disk diffusion method

Indicator strain	Host plant	Type of disease	MIC (µg/disk) ^a
<i>Phytophthora sojae</i>	Soybean	Stem rot	1.25-5
<i>Phytophthora infestans</i>	Potato	Late blight or potato blight	>10
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Widehost range	Black shank of tobacco	>10
<i>Phytophthora capsici</i>	Pepper		
<i>Phytophthora vignae</i>	Redbean		
<i>Aphanomyces cochlioides</i>	Sugar beet	Black rot	>10
<i>Pythium ultimum</i>	Wide host range	Damping-off, seedling disease	>10
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Wide host range	Damping-off, root & stem rots	>10

^atested concentrations: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 µg/disk

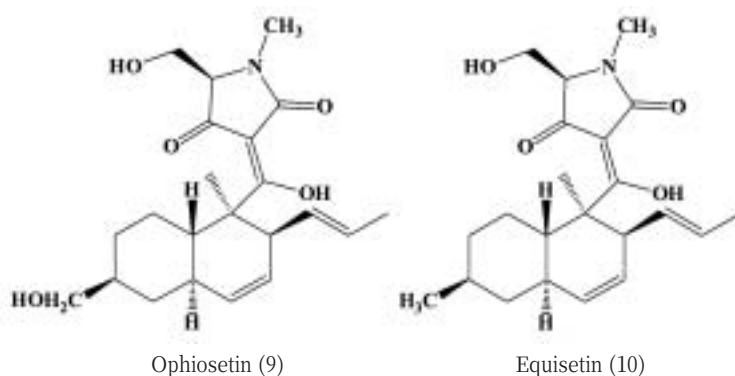


図3. ophioisetin (9), および equisetin (10) の構造

た。その結果、稀少種 *Elaphocordyceps ophioglossoides* HF272 からテトラミン酸骨格を有する抗菌物質 equisetin とその新規アナログ ophioisetin が単離できた。(図3) Equisetin は HIV-integrase に阻害効果を示し、抗バクテリア活性があることが知られているが、抗カビ効果や抗卵菌活性は示さない。また、新規化合物 ophioisetin は試した様々な被検菌の何れに対しても顕著な活性は示さなかった。この結果は今回用いたスクリーニング法はバイオアッセイ手法が限られている状況で、広い生物学的活性を持つ化合物を得る方法として有用であることを示すものと言える。

5. 結論

本研究では、これまで検討されてなかった生物活性を指標としたスクリーニングおよび化学構造に基づく情報を利用したスクリーニングという二つの手法において、EPF の多様な物質生産性を示すことができたことから、EPF は化合物資源としての高いポテンシャルを有していることが明らかとなった。その結果、EPF から異なった二つの新規化合物 (farinomalein, ophioisetin) の単離、同定に成功した。今回の構造情報に基づいたスクリーニングはどのような生理活性物質についても適用可能であるが、単離、同定後、化合物が実際はいかなる生理活性を示すのか調べる必要がある。一方、生物活性を指標とすれば、既存のアッセイ法を利用する限り、既知物質を再単離する可能性は避けられないが、生理活性を改めて同定する必要は無いなど、各々一長一短が

ある。本研究では、両法を採用することによって各々の方法だけでは単離できなかった化合物を補完的に捉えることができており、これらの方法を組み合わせることで同一のスクリーニング源を用いても新規化合物の単離の可能性が広がることが期待できる。本研究のさらなる進捗により EPF の生産する二次代謝物質について新たな知見が得られれば、新規化合物の医薬、農業への利用だけでなく、農薬としての高い能力を持った EPF の開発に繋がることが期待される。

Reference

- Putri, S. P., Kinoshita, H., Ihara, F. Igarashi, Y., Nihira, T. 2009. Farinomalein, a maleimide-bearing compound from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus* *J. Nat. Prod.* 72:1544-1546
- Putri, S. P., Kinoshita, H., Ihara, F. Igarashi, Y., Nihira, T. 2010. Ophioisetin, a new tetramic acid derivative from the mycopathogenic fungus *Elaphocordyceps ophioglossoides*. *J. Antibiotics*. 63, 195 – 198
- Putri, S. P., Ishidoh, K., Kinoshita, H., Kitani, S., Ihara, F. Sakihama, Y., Igarashi, Y., Nihira, T. 2010. Production of antioomycete compounds active against the phytopathogens *Phytophthora sojae* and *Aphanomyces cochlioides* by clavicipitoid entomopathogenic fungi. *J. Agr. Food. Chem.* to be submitted