

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20880014
 研究課題名（和文） 土壌微生物間のシグナル物質の探索
 研究課題名（英文） Research on signal compounds between soil bacteria
 研究代表者
 小谷 真也（KODANI SHINYA）
 静岡大学・創造科学技術大学院・助教
 研究者番号：20510621

研究成果の概要（和文）：放線菌の気菌糸誘導シグナル物質に関して、天然物有機化学的方法を用いて研究を行った。まず、放線菌 *Streptomyces coelicolor* に対する気菌糸誘導活性を指標としたスクリーニングを行い、*S. aureofaciens* および *S. hawaiiensis* のアセトン抽出物に顕著な活性を見出した。それぞれの株を大量培養後、気菌糸誘導物質の単離を行い、2 つの新奇性の高い化合物を得た。

研究成果の概要（英文）：Regarding the aerial hypha inducing signal compounds of the actinomycetes, the research was accomplished using organic chemistry of natural product.. First of all, screening of the aerial hyphae inducing activity on *Streptomyces coelicolor* was performed, and the prominent activity was found to the acetone extract of *S. aureofaciens* and *S. hawaiiensis*. The two new compounds were isolated from the mass-cultured materials..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,250,000	675,000	2,925,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：土壌微生物、気菌糸誘導物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の目的は、土壌微生物に共通に存在する‘シグナル物質’を発見し、その作用メカニズムを明らかにすることである。ホルモンやフェロモンなどの生命現象の鍵物質は、生体内外にごく微量存在し、自己もし

くは他生物に対し劇的な作用を引き起こす。特に人間を含めた哺乳類では医学的な見地から研究が進んでいる。一方で、微生物に関してはその研究が遅れていると言える。例えば、マツタケ-アカマツの特異的共生関係は古くから知られているが、その共生メカニズ

ムと関与するシグナル物質に関してほとんど知見が得られていない。というのも、土壤中においては複雑な微生物相が形成され、マツタケ-アカマツだけの単純な共生系ではないからである。申請者は土壤中の微生物間においてシグナル物質を介したコミュニケーションがあるのではないかという可能性に着目し、土壤微生物の産生するシグナル物質の探索研究を着想した。

(2) 土壤微生物の中でも着目したのは放線菌とカビである。この二者は原核生物と真核生物で進化的に大きく異なるが、よく似た生活環を有している。寒天培地で培養を行うと寒天培地下にまず基底菌糸を形成し、その後気菌糸を空中に伸ばす。最終的に気菌糸は形態変化-分節を起こし胞子を形成する(左下)。放線菌やカビにとって胞子形成は、乾燥や栄養源の枯渇といった環境変化への適応のための重要な生存戦略である。申請者の最近の研究によって抗生物質様物質が気菌糸形成を誘導するということが明らかとなった。この結果は、ある種の抗生物質がもともとは自己制御因子であった可能性を示唆する。また、従来のスクリーニング法では気菌糸誘導活性など人間にとって有益な活性を持つ物質以外は発見されないことから、まだ微生物にとって重要な生理活性物質が数多く未発見のまま存在すると考えられる。そこで、本研究は放線菌-カビ間の気菌糸誘導シグナル物質の探索と機能解析を目指すものである。

2. 研究の目的

(1) 申請者が土壤微生物間のシグナル物質という研究課題を着想した理由の一つに hydrophobin というタンパク質の存在がある。スエヒロタケ *Schizophyllum commune* から得られている疎水性タンパク hydrophobin はカビに広く存在する自己の気菌糸誘導物質として知られている。申請者の研究によって、この hydrophobin が、種の壁を越えて放線菌の気菌糸を誘導することが明らかとなった。この結果は、放線菌とカビにおいて共通した形態分化システムが存在することを示している。そこから、土壤中のカビ-放線菌において共通するシグナル物質が存在するのではないか? という着想が生まれた。他のシグナル物質の例では、グラム陰性菌に分布する

アシルホモセリンラクトン、2002年に発見されたオートインデューサー2 はグラム陰性陽性両方の細菌に広く分布していることが明らかとなり、細菌間の cell-cell communication の重要な因子であることが証明されている。もし土壤微生物間に共通するシグナル物質の発見がなされれば、これらのシグナル物質の発見に匹敵する微生物学における大きなブレイクスルーになると考えられる。

(2) スクリーニングから気菌糸誘導シグナル物質の単離・構造決定と研究を進め、新たなシグナル物質が得られた場合、その作用気序の解明を行う。放線菌とカビの形態分化に関してはまだ不明な点が多く、得られたシグナル物質を“道具”として用い、トランスクリプトームとプロテオームの研究手法を用いて形態分化システムの解明を目指す。

1970年代から微生物の形態分化システムに関して精力的に研究が行われて来た。しかしながら、その全貌の解明にはほど遠い現状がある。放線菌においては、その二次代謝産物の生産と気菌糸形成が同期していることが知られており、形態分化システムの研究が、二次代謝産物の制御システムの理解につながる事が考えられる。放線菌やカビにおいて病原性を持つものが多く存在し、気菌糸形成システムの理解が特異的阻害剤の開発に結び付き、本研究は応用微生物学の観点からも重要度が高い。

3. 研究の方法

多数種の放線菌およびカビを用いてスクリーニングを行う。スクリーニングは、簡便なクロストーク法で行う。クロストーク法とは寒天培地を真中で二つに区切り、右半分は放線菌、左半分に試験微生物を塗布、共培養を行う生物試験法である。生育過程でシグナルの受け渡しが起こり、活性を持つ株は相手の気菌糸を誘導する。このスクリーニング法によって、シグナル産生が見られる株を選別する。なお申請者は放線菌 *S. coelicolor* に関しては複数の *blt* 株(気菌糸を作らなくなった変異株)を有しており、この変異株をスクリーニングに用い、放線菌への気菌糸誘導シグナル物質を探索する。活性が見られた株においては、大量培養を行い十分な試料を得た

後、菌糸体と培養濾液に分け、それぞれを有機溶媒で抽出する。得られた抽出物を減圧濃縮後、アッセイにより活性を確認する。活性画分を各種クロマトグラフィーによる溶媒分画に付す。活性を指標に分画し、最終的にHPLCを用いて精製する。生成した物質をNMRおよびMSスペクトルを用いた分析を行い、化学構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 放線菌 20 株について、放線菌に対する気菌糸誘導活性スクリーニングを行ったところ、放線菌 *Streptomyces hawaiiensis* および *S. aereofaciens* のアセトン抽出物に顕著な気菌糸誘導活性を見出した。そこで、この 2 株について I S P 2 寒天培地を用いて大量培養を行い、活性物質の単離を行った。すなわち、アセトン抽出を行った後に減圧濃縮装置を用いて濃縮後、三菱化学 CHP 20 P 合成疎水性樹脂を用いた有機溶媒による分画を行った。最終的に、HPLCを用いたその結果、*S. hawaiiensis* から推定分子量 262 の化合物 SH1004 を得た。SH1004 はHPLCクロマトチャート上において交換可能な 2 つの成分で検出された。これは、SH1004 において水溶液中で交換可能な部分化学構造を有していることを意味する。そこで、NMRスペクトルを用いた化学構造の決定を試みたところ、ピークの重なりが多く、さらに溶媒に対する溶解性が低く、分解能が低く、構造解析が行えなかった。そこで、無水酢酸/ピリジンを用いたアセチル化を行い、より安定な誘導体に変換後、NMRスペクトルの解析を行ったところ、部分化学構造が得られた。部分構造のみで、Scifinder というインターネットデータベースで類似化合物を検索したところ、全く類似化合物は見られず、非常に新奇性の高い物質であることが示唆された。また、SH1004 は、気菌糸誘導活性を示した。この結果は、新しい気菌糸誘導物質 SH1004 の有用性が高いことを示す。

(2) 放線菌 *S. aereofaciens* に関しても同様の有機化学的手法を用いて新しい気菌糸誘導物質を単離することに成功した。NMRスペクトルの解析によってこの *S. aereofaciens* から単離された物質の基本骨格はSH1004 と類似していることが示唆された。さらにグルコースが分子内に共有結合を介して結合しているこ

とも明らかとなり、新奇骨格を有することが明らかとなった。本物質もまた、気菌糸誘導活性を示した。

(3) まとめると、放線菌から、2 つの新奇性の高い気菌糸誘導物質の単離に成功し、部分的化学構造の決定に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① T. Hosaka, OM. Kamayama, H. Marumatsu, K. Murakami, Y. Tsurumi, S. Kodani, M. Yoshida, A. Fujie, K. Ochi
Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12
Nature Biotechnology, 27, 462-4 (2009)
査読有り
- ② S. Kodani, K. Hayashi, M. Hashimoto, T. Kimura, M. Domobo, and H. Kawagishi
A new sesquiterpenoid from the mushroom *Sparassis crispa*
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 73, 228-229 (2009)
査読有り
- ③ JH. Choi, M. Horikawa, H. Okumura, S. Kodani, K. Nagai, D. Hashizume, H. Koshino, H. Kawagishi
Endoplasmic reticulum (ER) stress protecting compounds from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*
Tetrahedron, 65, 221-224 (2009)
査読有り
- ④ S. Kodani, K. Hayashi, S. Tokuyama, M., Hashimoto, T. Kimura, M. Domobo, H. Kawagishi
Occurrence and identification of chalcones from the culinary-medicinal cauliflower mushroom *Sparassis crispa*
International Journal of Medicinal Mushrooms, 10, 331-336 (2008).
査読有り
- ⑤ K. Ueda, M. Tsujimori, S. Kodani, A. Chiba, M. Kubo, K. Masuno, A. Sekiya,

K. Nagai, H. Kawagishi
An endoplasmic reticulum (ER)
-stress-suppressive compound and its
analogues from the mushroom *Hericium
erinaceum*
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16,
9467-9470 (2008).
査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① “放線菌の形態分化と抗生物質生産の制御”

小谷真也

第2回早稲田大学総合研究機構ケミカル
バイオロジー研究所シンポジウム
動的平衡としての微生物共生系と天然
物化学

平成 21 年 12 月 25 日 早稲田大学大久
保キャンパス

- ② “放線菌の気菌糸誘導物質からケミカル
コミュニケーションを探る”

小谷真也

第1回早稲田大学総合研究機構ケミカル
バイオロジー研究所シンポジウム
天然物化学の新展開 -ケミカルバイオ
ロジー研究との融合-

平成 21 年 2 月 4 日 早稲田大学大久保
キャンパス

- ③ “放線菌の気菌糸誘導物質について”

小谷真也

第3回化学生態学研究会

平成 20 年 7 月 5 日 函館市湯の川プリ
ンスホテル渚亭

[その他]

ホームページ等

[http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~askodan/
index.htm](http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~askodan/index.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 真也 (KODANI SHINYA)

静岡大学・創造科学技術大学院・助教

研究者番号：20510621