

疫病菌交配ホルモン生合成機構の
解明に向けた基盤研究
および
粘液細菌新規二次代謝産物の化学的研究

名古屋大学大学院 生命農学研究科

応用分子生命科学専攻

生命機能化学講座

生理活性物質化学研究分野

戸村 友彦

2017年9月

目次

第1部 疫病菌交配ホルモン生合成機構の解明に向けた基盤研究

第1章 緒論

1-1.	はじめに	2
1-2.	植物疫病菌 <i>Phytophthora</i>	2
1-3.	交配ホルモン α 1、 α 2	6
1-4.	疫病菌の有性生殖システム	7
1-5.	研究目的	8

第2章 本論

2-1.	生化学的手法を用いた生合成酵素の探索	
2-1-1.	異なる V8 ジュース濃度の液体培地での α 2 生産	10
2-1-2.	Phytol モノ水酸化物の探索	12
2-1-3.	Phytol の精製	13
2-1-4.	α 2 生合成酵素アッセイ	15
2-1-5.	<i>P. nicotianae</i> ATCC 38607 を用いた α 1 生合成酵素アッセイ	16
2-1-6.	<i>P. cryptogea</i> NBRC 32326 を用いた α 1 生合成酵素アッセイ	19
2-2.	交配ホルモン生産条件の最適化	
2-2-1.	培養日数	22
2-2-2.	培地の種類	25
2-2-3.	V8 ジュースの成分	28

2-3. RNA-seq による交配ホルモン生合成酵素候補遺伝子の探索	
2-3-1. 菌株の選定	32
2-3-2. RNA 抽出	36
2-3-3. 交配ホルモン生合成酵素遺伝子候補の探索	38
2-4. 考察	52
2-5. 結論	57
第3章 実験の部	
3-1. 基本操作	59
3-2. 使用した菌株	59
3-3. 菌株の継代と保存	60
3-4. 菌体の寒天培養	60
3-5. 菌体の液体培養	61
3-6. Phytol モノ水酸化物の探索	61
3-7. Phytol の精製	62
3-8. 二段階培養による $\alpha 2$ 合成酵素の活性保持時間の検討	62
3-9. $\alpha 2$ 生合成酵素アッセイ	63
3-10. $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイ	63
3-11. 交配ホルモン生産量の経時変化	64
3-12. 培養後の菌体重量	65
3-13. V8 ジュースの分離	65
3-14. RNA-seq 用 total RNA の抽出	66
3-15. RNA アガロースゲル電気泳動	68

3-16. RNA-seq	69
---------------	----

参考文献	72
------	----

第2部 粘液細菌新規二次代謝産物の化学的研究

第1章 緒論

1-1. はじめに	76
1-2. 粘液細菌	78
1-3. 粘液細菌が生産する生理活性物質	81
1-4. 海洋性粘液細菌と生理活性物質	82
1-5. 研究目的	84

第2章 本論

2-1. 細胞毒性成分の単離	85
2-2. 新規化合物 enhygromic acid (TO-II-85-2) の構造解析	91
2-3. TO-II-138-2 の構造解析	99
2-4. TO-II-79-4 の構造解析	102
2-5. ステロイド化合物の由来	110
2-6. TO-II-79-4 と TO-II-138-2 の細胞毒性	111
2-7. Enhygromic acid の量上げ	111
2-8. Enhygromic acid の絶対配置の決定	114
2-9. Deoxyenhygrolide A および B の単離	116

2-10.	Deoxyenhygrolide A および B の構造解析	117
2-11.	生物活性	129
2-12.	新規化合物の生合成経路	131
2-13.	結論	133
第3章 実験の部		
3-1.	基本操作	135
3-2.	菌株の寒天培養	136
3-3.	菌株の保存	136
3-4.	Enhygromic acid の単離	136
3-5.	ステロイド化合物の単離	137
3-6.	ステロイド化合物の由来	138
3-7.	Enhygromic acid の量上げ	138
3-8.	Enhygromic acid の配座解析	139
3-9.	Deoxyenhygrolide A および B の単離	139
3-10.	細胞毒性試験	140
3-11.	PC12 細胞に対する NGF 増強活性試験	141
3-12.	抗疫病菌活性試験	141
3-13.	抗菌活性試験	142
3-14.	抗真菌活性試験	142
	参考文献	145
	謝辞	150

第 1 部

疫病菌交配ホルモン生合成機構の解明に向けた基盤研究

第 1 章 緒論

1-1. はじめに

農耕はヒトが生きる上で欠かすことのできない営みである。農耕の歴史は古く、約 23,000 万年前の麦類を栽培した痕跡がイスラエルで見つかっており¹、我々の主食であるコメの栽培（稲作）の歴史は約 1 万年前の中国に遡ることができる²。ヒトは狩猟に代わり農耕を始め定住したことにより生活の質を向上させてきたが、栽培作物の病害とは常に隣り合わせであった。時には病害、虫害が大飢饉を引き起こし、大量の餓死者を出すこともあった。日本では江戸時代にウンカによる蝗害が発生し、250 万人以上の人々が飢えに苦しんだとされる（享保の大飢饉）。農業技術が発達した現在においてもイネやムギなどの穀類では、病害による損失が年間 9 億トンもあり、これは 10 億人分もの食糧に匹敵する³。このような作物病害による損失の軽減のために、病害の原因や発生、伝染経路を解明し、病害菌を防除することは食糧問題解決にとって非常に重要である。本研究では、イネいもち病、ムギさび病と並び世界三大病害の 1 つである植物疫病を取り上げた。

1-2. 植物疫病菌 *Phytophthora*

植物疫病は、植物が疫病菌 *Phytophthora* に感染することで発生する。疫病菌の学名はギリシャ語の「*phyto*（植物）」と「*phtherio*（破壊）」からつけられており、感染した植物は激しい病変を呈し腐敗する（Figure 1-1）⁴。疫病菌の対策にかかる費用は年間 5 億ドルにもものぼり、莫大な量の農薬が使われるなど環境への悪影響も懸念される⁵。

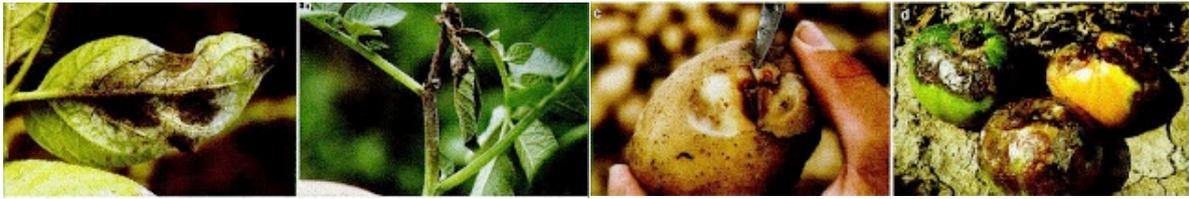


Figure 1-1. ジャガイモ疫病菌による病変⁴

Phytophthora は一見するとカビのように見えるが、実際はクロミスタ界 (Chromista) -卵菌門 (Oomycota) -卵菌綱 (Oomycetes) -べと病菌目 (Peronosporales) -フハイカビ科 (Pythiaceae) に属する卵菌類であり、分類学的には珪藻や褐藻に近く一般的なカビやキノコなどの菌類と区別される。*Phytophthora* 属には 100 種以上が含まれており、その多くは経済的および生態学的に重要な植物種に感染する^{6,7} (Table 1-1)。

Table 1-1. 主な疫病菌種と感染宿主⁷

種	感染宿主
<i>P. infestans</i>	ジャガイモ、トマト
<i>P. capsici</i>	ナス科・ウリ科植物
<i>P. cinnamomi</i>	シナモン、バラ
<i>P. nicotianae</i>	タバコ、イチゴ
<i>P. sojae</i>	マメ科植物

Phytophthora 属疫病菌の中でも最も有名な種は、1840 年代に起こった「アイルランドジャガイモ飢饉 (Irish potato famine)」の原因となった *P. infestans* である。アイルランドではジャガイモが主食であったため、飢餓による死者は 200 万人を超え、100 万人以上が飢饉から逃れるためアメリカやイギリスに渡ったとされている。飢饉発生当時は植物病害は自然発生すると考えられており、微生物が植物に感染するという概念は存在しなかった。しかしドイツ人学者 Anton de Bary は、1861 年にこの大惨事の原因が *P. infestans* であることを突き止め、初めて微生物が病害の原因になることを

明らかにした⁸。

卵菌類である疫病菌は真菌類と異なるユニークな生活環を持つ (Figure 1-2)⁹。その特徴として、無性生殖世代と有性生殖世代の存在が挙げられる。疫病菌は通常は無性生殖を営んでおり、増殖や発育を担う無性生殖器官として遊走子嚢 (Figure 1-3) や遊走子がある。遊走子嚢は卵型をした胞子で内部に運動性の遊走子を 15~30 個形成し、雨水などにより発芽が可能となる。遊走子嚢の先端から、水の膨圧を利用して運動性の遊走子が勢いよく放出される。遊走子は二本のべん毛を持つ運動性の胞子であり、水中を活発に遊泳して土壌中および植物体のいたるところへ広がることができる。遊走子は時間とともに徐々に運動性を失い、やがて停止し、球形の被嚢胞子を形成する。最終的に、この被嚢胞子が発芽して新たな菌体を形成する。放出された遊走子は宿主へ感染し、その後菌糸次いで遊走子嚢を再び形成し、このサイクルを繰り返す。このように、無性生殖世代においては遊走子嚢の形成とそれに続く遊走子の放出による宿主への感染と増殖が主な振る舞いとなっている⁴。一方、有性生殖世代では、疫病菌は菌糸から造卵器及び造精器という有性生殖器官を形成し、その受精によって有性胞子である卵胞子 (Figure 1-3) を形成する。卵胞子は厚い二重膜構造を持ち、厳寒、乾燥といった過酷な環境でも数ヶ月から数年間も生き残る耐久性を持つ。生存に好適な条件が整えば発芽管を形成して発芽し、その発芽管の先に新しい遊走子嚢を形成し次世代が生み出される。また、卵胞子は無性胞子と異なり遺伝的多様性を獲得した次世代を残すことが可能であり⁶、これにより薬剤耐性化や悪性化を招く。疫病菌には単一菌株内で有性生殖を行い卵胞子を形成するホモタリック種と、異なる 2 つの交配型 (A1 交配型、A2 交配型) が会うことで初めて有性生殖が起こるヘテロタリック種が存在する。

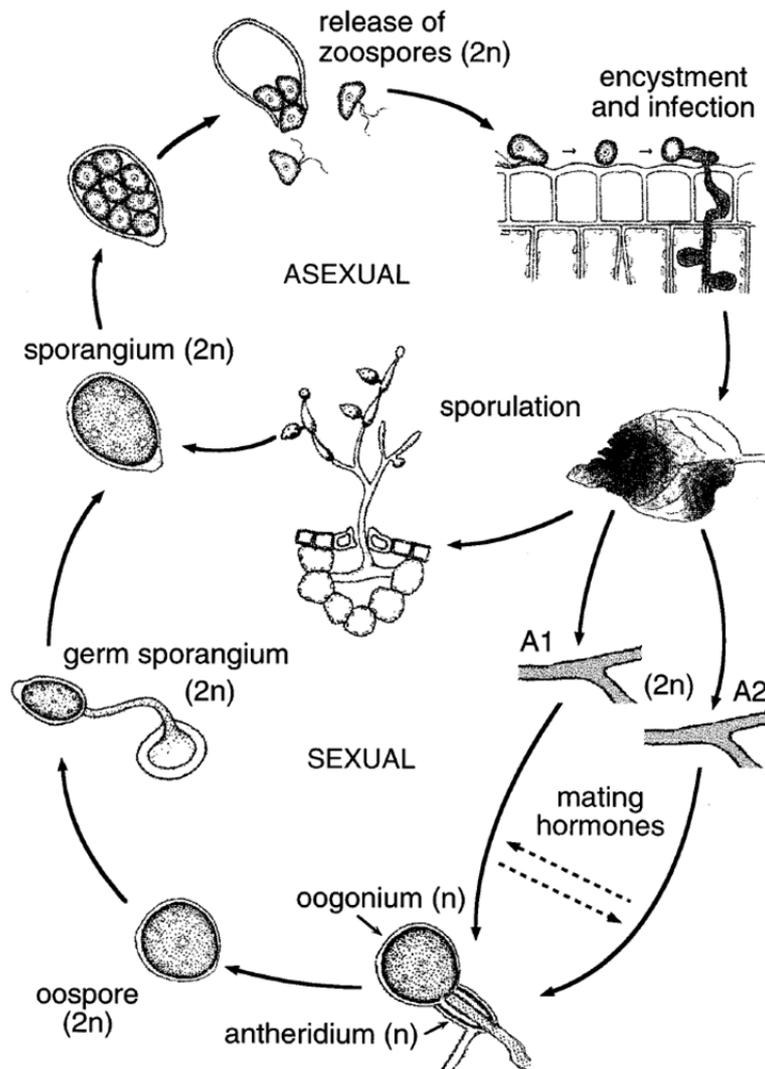


Figure 1-2. *Phytophthora* 属の生活環⁹

Sporangium: 遊走子嚢、zoospore: 遊走子、encystment: 被囊、
 sporulation: 孢子形成、oogonium: 造卵器、antheridium: 造精器、oospore: 卵孢子



Figure 1-3. 疫病菌の遊走子嚢 (左) と卵孢子 (右)

1-3. 交配ホルモン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$

先述したように、ヘテロタリック種ではホモタリック種とは異なり A1 交配型と A2 交配型が共存して初めて有性生殖が起こり卵胞子が形成される。古くからこの有性生殖にはなんらかの化学物質が関与すると考えられていた。1978 年 Ko は、ポリカーボネート膜を用いて A1 交配型と A2 交配型の対峙培養を行ったところ、両交配型はポリカーボネート膜により直接接触していないにも関わらず卵胞子が形成された¹⁰。これにより初めて有性生殖に化学物質すなわち交配ホルモンが関与していることが示され、A1 交配型が分泌する物質は $\alpha 1$ 、A2 交配型が分泌する物質は $\alpha 2$ と命名された。長年交配ホルモンの正体は不明であったが、2005 年に Qi らによって $\alpha 1$ の構造が¹¹、2011 年に Ojika らによって $\alpha 2$ の構造が解明され¹²、両ホルモンはともに鎖状のジテルペンアルコールであることが初めて明らかにされた (Figure 1-4)。

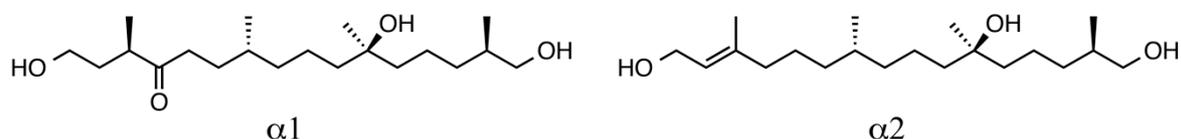


Figure 1-4. 交配ホルモン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の構造

また交配ホルモンの生合成経路は phytol の取り込み実験によりすでに明らかにされている¹²。すなわち、植物中に含まれる phytol を A2 交配型が $\alpha 2$ へと変換し、放出された $\alpha 2$ を A1 交配型が取り込み $\alpha 1$ が生合成される (Figure 1-5)。

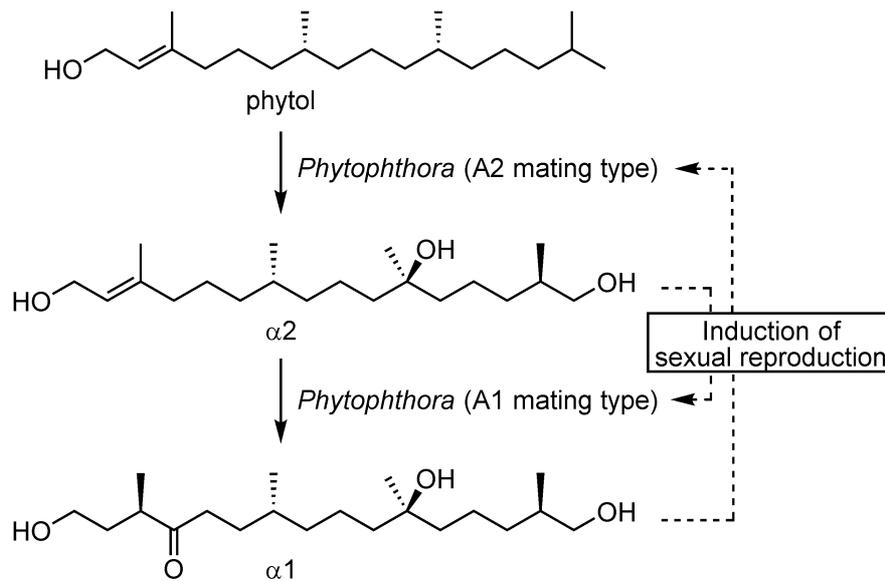


Figure 1-5. 交配ホルモン α_1 、 α_2 の生合成経路¹²

さらに、単離された交配ホルモンは、生産菌である *P. nicotianae* 以外の疫病菌種でも卵孢子形成を誘導したことから、これら交配ホルモンが種間で普遍的に働いていることが示唆された¹²。

1-4. 疫病菌の有性生殖システム

A1 交配型が α_1 を生合成し、A2 交配型が α_2 を生合成することから、A1 交配型には α_1 生合成系が、A2 交配型には α_2 生合成系が備わっていると考えられる。また両交配型は相手が分泌するホルモンを極めて感度よく感知することから、 α_1 、 α_2 に特異的な受容体の存在も予想される。以上を考慮し、現在のところ以下の Figure 1-6 に示すような有性生殖システムを想定している。まず感染宿主である植物中に含まれる phytol を A2 交配型が取り込み、 α_2 生合成系を使い α_2 を生合成し細胞外に分泌する。A1 交配型が共存すると α_2 受容体で α_2 を感知し、A1 交配型の有性生殖が促進され卵孢子が形成される。次に A1 交配型が α_2 を取り込み、 α_1 生合成系を利用し α_1 を生合成し細胞外に分泌する。この α_1 が共存する A2 交配型の α_2 受容体に認識され、A2 の

有性生殖も促進される。これまで当研究室では、有性生殖システムの全容解明を目指し交配ホルモン受容体の探索を行ってきたが、未だ同定には至っていない。また各生合成系についての研究は、全くの手つかず状態である。

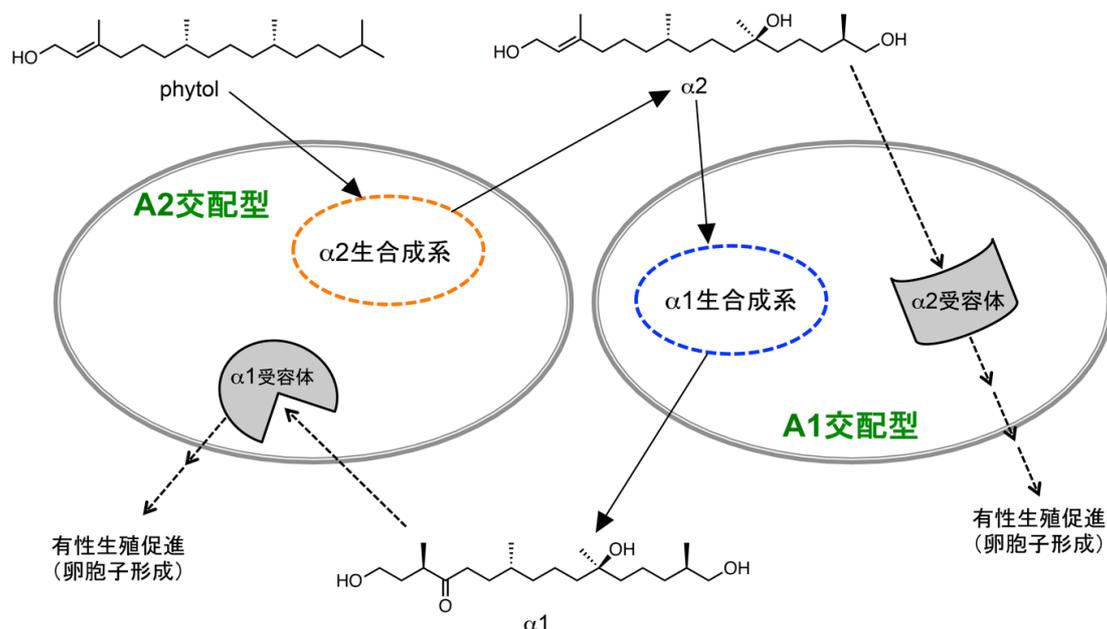


Figure 1-6. 疫病菌の推定有性生殖システム

実線矢印はホルモンの化学的変化、破線矢印はシグナル伝達を示す。

1-5. 研究目的

植物疫病菌は様々な農作物に感染して甚大な被害をもたらす。特に有性生殖による遺伝的多様性の獲得が、薬剤耐性化や悪性化を招き被害を拡大する。そのため有性生殖の分子メカニズムを解明することは、疫病菌防除にとって重要である。これまでに交配ホルモンの化学構造^{11,12}、生合成経路¹²、構造活性相関¹³が明らかにされ化学的基盤が整ったが、交配ホルモンの生合成メカニズム解明や受容体探索などのケミカルバイオロジー的課題が未解明である。そこで本研究では、未だ手つかずで学術的知見が得られていない交配ホルモン生合成機構の解明に向け、以下の3点を目的とした。

1. 生化学的手法を用いたホルモン生合成酵素の取得
2. トランスクリプトーム (RNA-seq) 解析のためのホルモン生産に影響を与える因子の検討
3. RNA-seq 解析によるホルモン生合成酵素の探索

第 2 章 本論

2-1. 生化学的手法を用いた交配ホルモン生合成酵素の探索

2-1-1. 異なる V8 ジュース濃度の液体培地での $\alpha 2$ 生産

通常、疫病菌の培養は 20% V8 ジュース培地を用いて行う。しかし 20% V8 ジュース液体培地では、 $\alpha 2$ は生産されるが菌糸もよく成長するため各細胞当たりの生合成酵素の発現量は低い可能性がある。そこで V8 ジュース濃度が異なる液体培地を用いて $\alpha 2$ 生産量を比較し、酵素抽出用菌体の最適培養条件を検討した。1 ppm の phytol ($\alpha 2$ の生合成前駆体) を含む Milli-Q 水および種々の V8 ジュース濃度の液体培地で *P. nicotianae* ATCC 38606 (A2 交配型) を 4 日間振盪培養し、培養上清中に含まれる $\alpha 2$ を LC/MS で定量した。その結果、最も生産量が多かったのは 0.1% V8 を用いた時であった (Figure 1-7a)。意外なことに、V8 ジュースを含まない Milli-Q 水のみを培地として用いても、菌の生育がほぼ見られないにもかかわらず $\alpha 2$ が多く生産された。この量は培地当たり ($\mu\text{g/L}$) なので、菌体細胞当たりの生産活性は驚くほど高いと言える。さらに 0.1% V8 を用いて $\alpha 2$ 生産量の 1 週間の経時変化を確認したところ、 $\alpha 2$ は培養 2 日後に増加し、4 日後で頭打ちになることが明らかとなった (Figure 1-7b)。このことから、 $\alpha 2$ 合成酵素の活性は、貧栄養下ほど高く、培養 4 日目以降低下するという重要な知見を得ることができた。

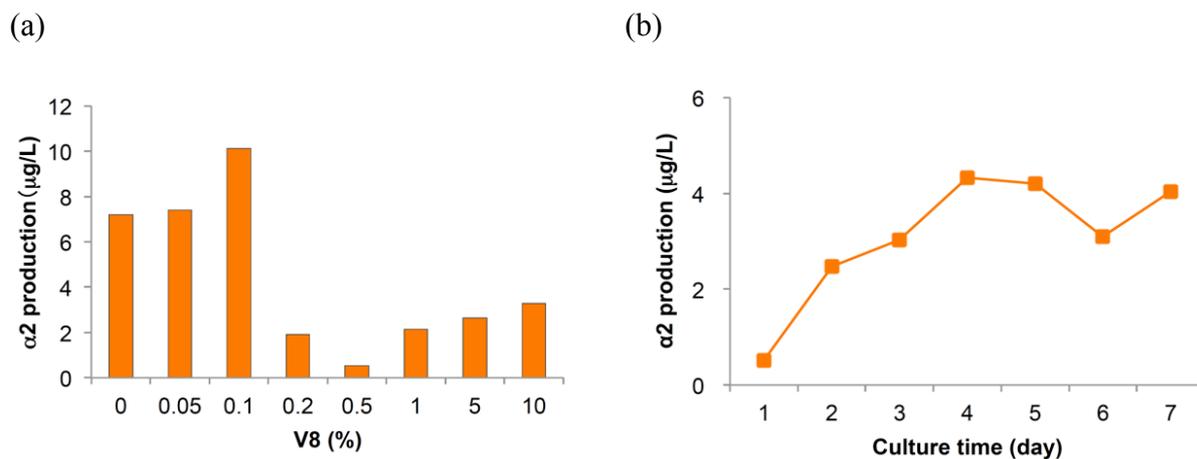


Figure 1-7. 様々な V8 濃度の液体培地での $\alpha 2$ 生産量

(a) V8 ジュース濃度の影響、(b) 0.1% V8 における経時変化

酵素活性試験では、液体培養で得られた菌体を抽出することになるので、少なくとも培養後の生菌体に $\alpha 2$ 合成活性が残存する必要がある。このことを確かめるために二段階培養を行った。すなわち、まず一段階目に 0.1% V8 液体培地 (200 mL) で 1~3 日間培養した。菌体を回収し、二段階目として 1 ppm の phytol を含む新鮮な 0.1% V8 培地 (10 mL) に移植し、1 ないし 2 日間培養した (Figure 1-8a)。各培養液に含まれる $\alpha 2$ を LC/MS で定量したところ、一段階目で 2 日間培養した菌体は二段階目の培養で最も多くの $\alpha 2$ を生産できることがわかった (Figure 1-8b)。一方、一段階目で 3 日間培養した菌体は $\alpha 2$ 生産量が少なく、酵素活性の残存が低かった。以上の結果より、0.1% V8 で 2 日間振盪培養した菌体を酵素抽出に用いるのが妥当であると結論した。

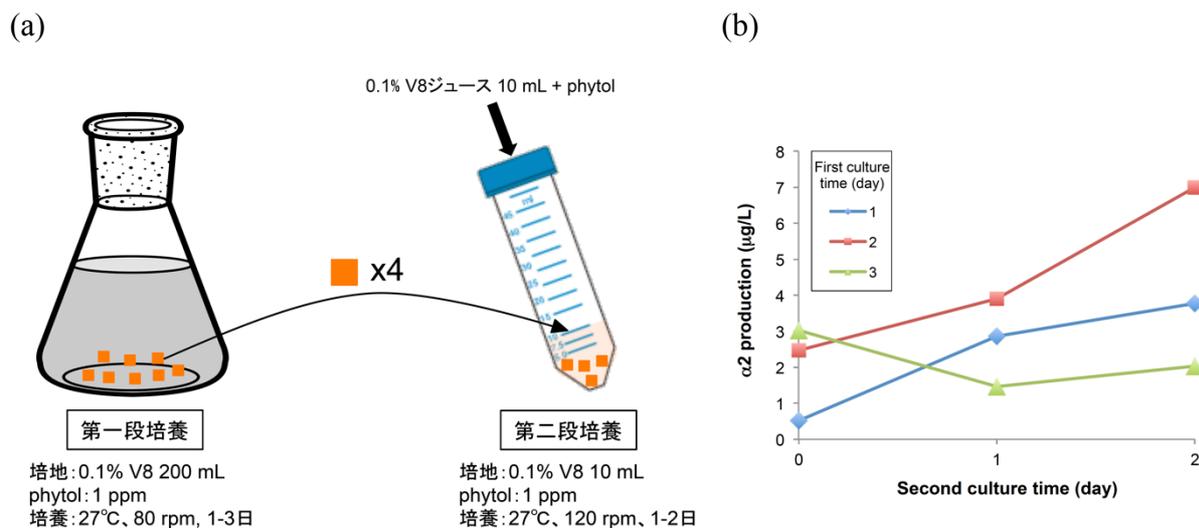


Figure 1-8. $\alpha 2$ 合成酵素の活性保持時間の検討

(a) 二段階培養法、(b) 各培養条件で生成した $\alpha 2$ 量

2-1-2. Phytol モノ水酸化物の探索

$\alpha 2$ アッセイを進める前に、phytol 水酸化機構の解析を行った。 $\alpha 2$ は phytol が 2 ヶ所水酸化されて生合成されるので、この 2 つの水酸基がどのように導入されるかを調べた。*P. nicotianae* ATCC 38606 (A2) を、phytol を添加した Milli-Q 中で 1 週間振盪培養し抽出物を LC/MS 解析したところ、2 つの phytol モノ水酸化物と考えられる m/z 335 $[M+Na]^+$ のピークが検出された (Figure 1-9)。マススペクトルより、脱水ピーク (m/z 295) が目立つ $t_R = 25.8$ min のピークは 11-OH 体、 $[M+H]^+$ が良く観測される $t_R = 23.7$ min のピークは 16-OH 体と推定した。以上より、phytol から $\alpha 2$ への生合成は、2 ヶ所の水酸基が同時に導入されるのではなく、1 ヶ所ずつ順不同で水酸化されることが初めて示された。また、これら水酸化には基質特異性の高いシトクローム P450 が関与すると考えると、 $\alpha 2$ 生合成酵素は少なくとも 2 つ存在すると予想された。

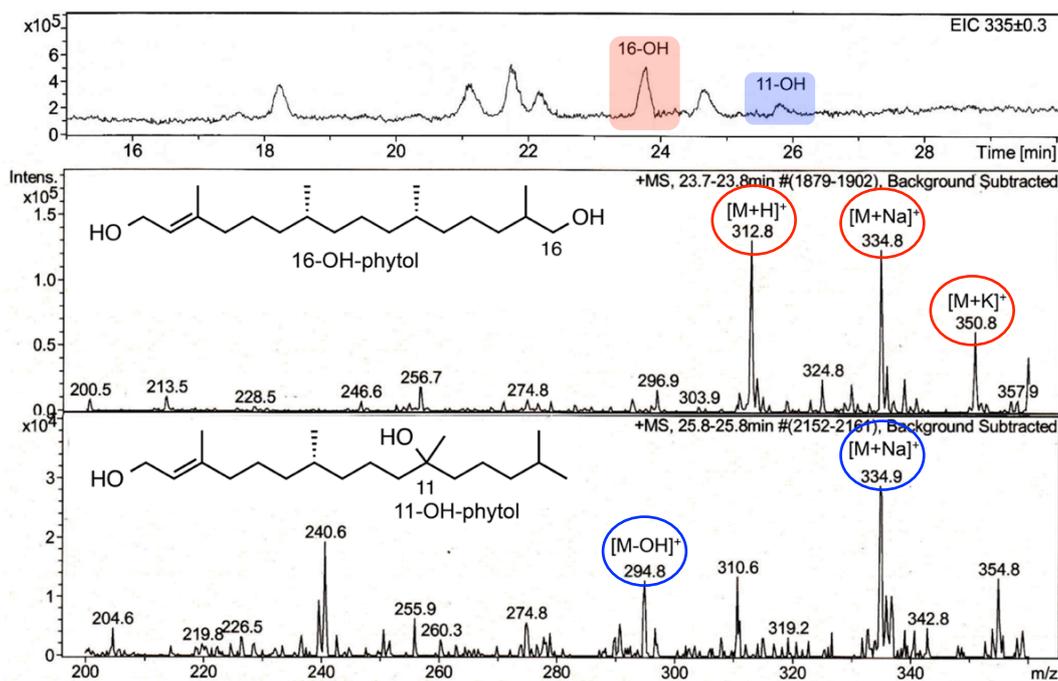
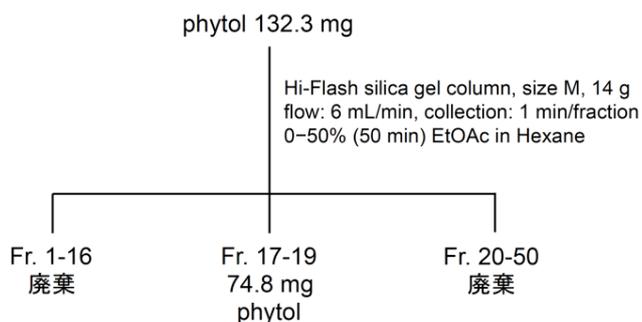


Figure 1-9. LC/MS による phytol モノ水酸化物の検出

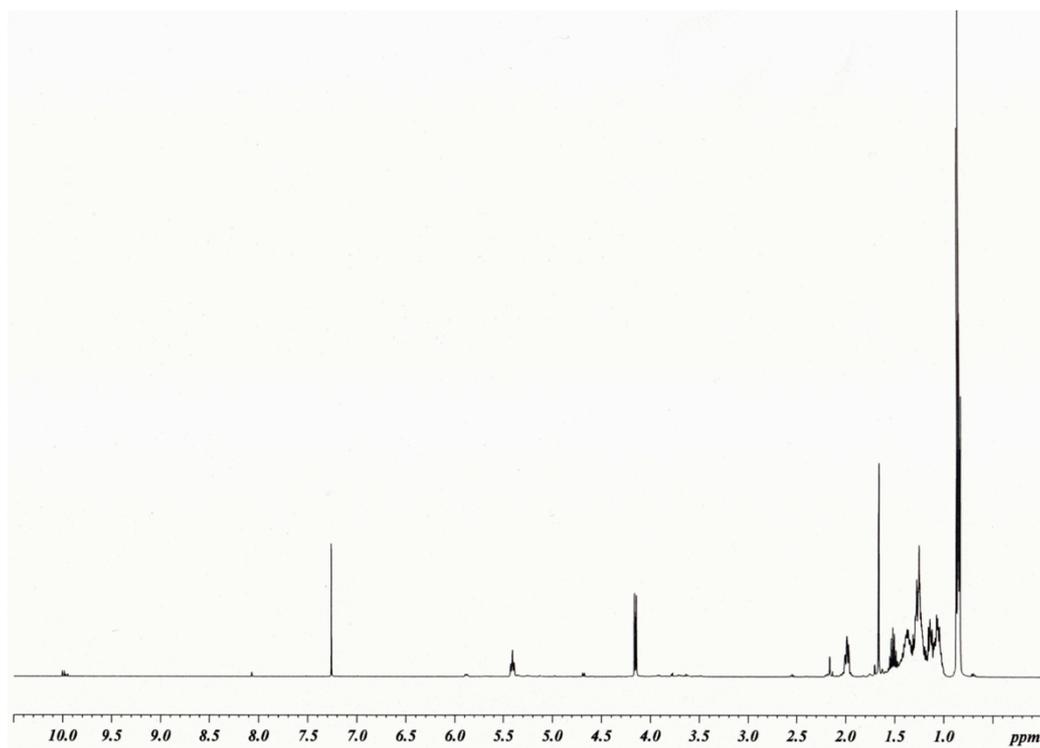
2-1-3. Phytol の精製

$\alpha 2$ 生合成酵素アッセイを行うにあたり、 $\alpha 2$ の前駆体である phytol の精製を行った。 ^1H NMR より、市販の phytol には不純物が混入していたため (Figure 1-10a)、hexane-EtOAc 系を用いたフラッシュクロマトグラフィーで精製した (Scheme 1-1)。 ^1H NMR より (Figure 1-10b)、アッセイに用いる十分な純度の phytol が得られたと判断し、これを $\alpha 2$ 生合成酵素アッセイに用いることにした。



Scheme 1-1. Phytol の精製

(a)



(b)

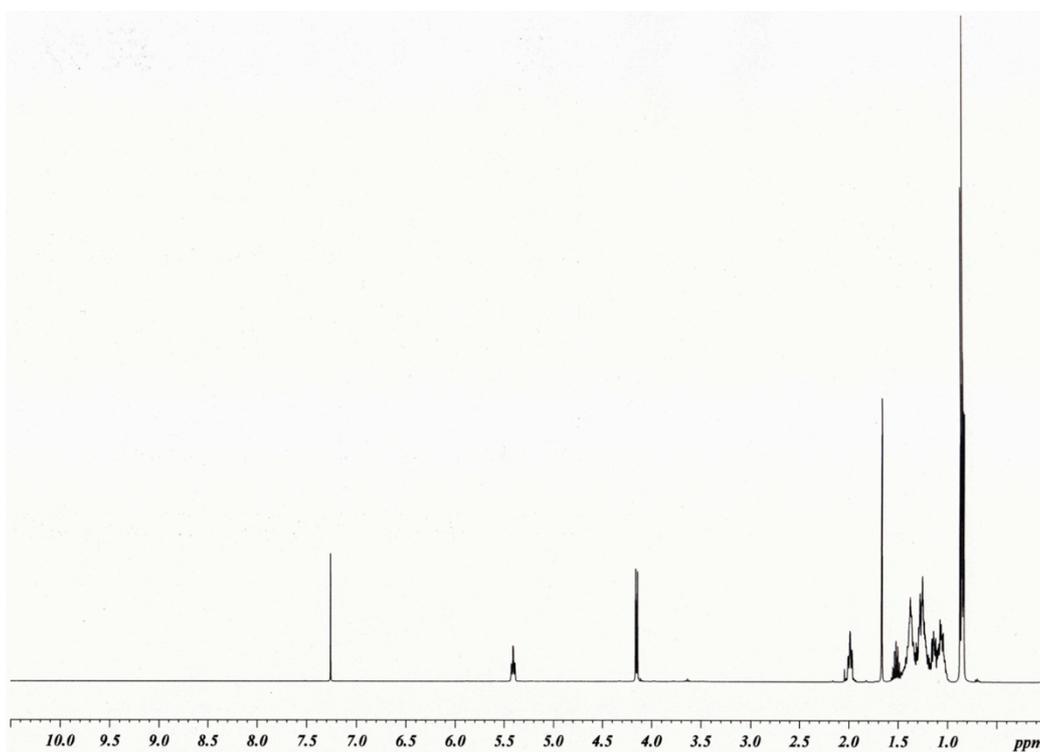


Figure 1-10. Phytol の ^1H NMR (400 MHz、 CDCl_3)

(a) 精製前、(b) 精製後

2-1-4. α 2 生合成酵素アッセイ

アッセイ条件は過去の報告¹⁴を参考にした。0.1% V8 ジュース液体培地で2日間振盪培養した *P. nicotianae* ATCC 38606 (A2) の新鮮な菌糸 (60 mg、湿重量) から抽出バッファー (50 mM phosphate buffer, 20%(w/v) glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.0) を用いてタンパクを抽出した。ここに α 2 前駆体である phytol と NADPH regenerating system (6.7 mM glucose-6-phosphate (G-6-P), 0.4 unit G-6-P dehydrogenase, 2 mM NADPH) を加え反応液中に含まれる α 2 を LC/MS で定量した (Figure 1-11a)。その結果、phytol の添加の有無にかかわらず標品である α 2 と同じ保持時間 ($t_R = 6.9$ min) を有するピークが確認された (Figure 1-11 b)。しかし α 2 標品は m/z 351.2 であるのに対し、サンプルで検出されたピークは m/z 350.9 と異なる質量であった (Figure 1-11c)。このことから、観測されたサンプル中のピークは α 2 と別の化合物であり、phytol から α 2 への変換は進行していないと判断した。さらに使用する菌糸の量を増やして (200 mg) 同様にアッセイしたが、 α 2 への変換は検出されなかった。凍結乾燥した菌体、弱くホモジェナイズした菌体でも活性は見られなかったことから、 α 2 生合成酵素は非常に不安定である可能性が示唆された。

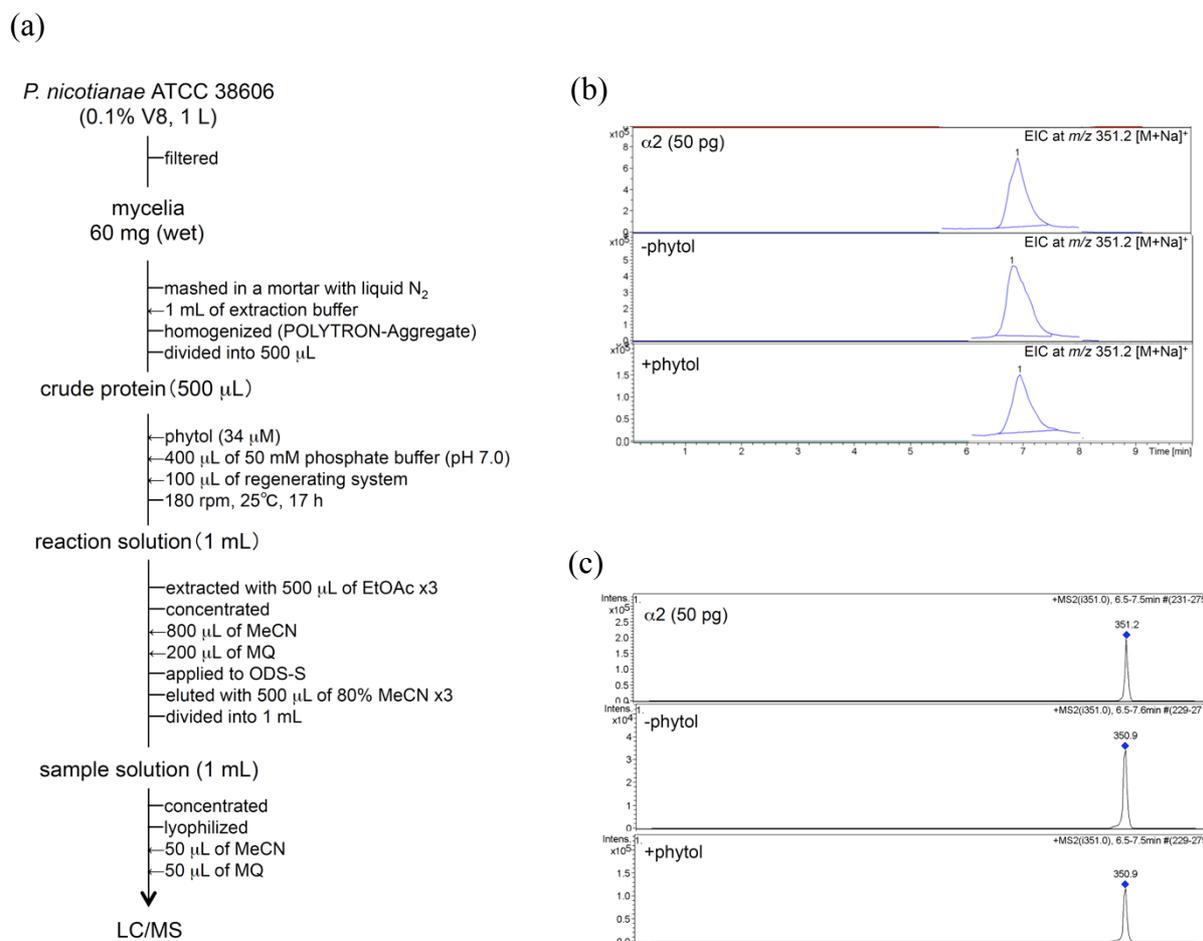


Figure 1-11. $\alpha 2$ 生合成酵素アッセイ

(a) アッセイ方法、(b) $\alpha 2$ の擬似分子イオン $[M+Na]^+$ のマスクロマトグラフ、(c) $t_R = 6.9 \text{ min}$ のピークのマスペクトル

2-1-5. *P. nicotianae* ATCC 38607 を用いた $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイ

$\alpha 2$ 生合成酵素アッセイ系の確立が困難であったため、 $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイ法を検討することにした。1% V8 ジュース液体培地で 2 日間培養した *P. nicotianae* ATCC 38607 (A1) (155 mg、湿重量) から抽出バッファーを用いてタンパクを抽出し、 $\alpha 1$ の前駆体である $\alpha 2$ および regenerating system を添加し、 $\alpha 2$ が $\alpha 1$ に変換されるか調べた (Figure 1-12a)。その結果、 $\alpha 1$ 標品と同じピークが観測された (Figure 1-12b)。

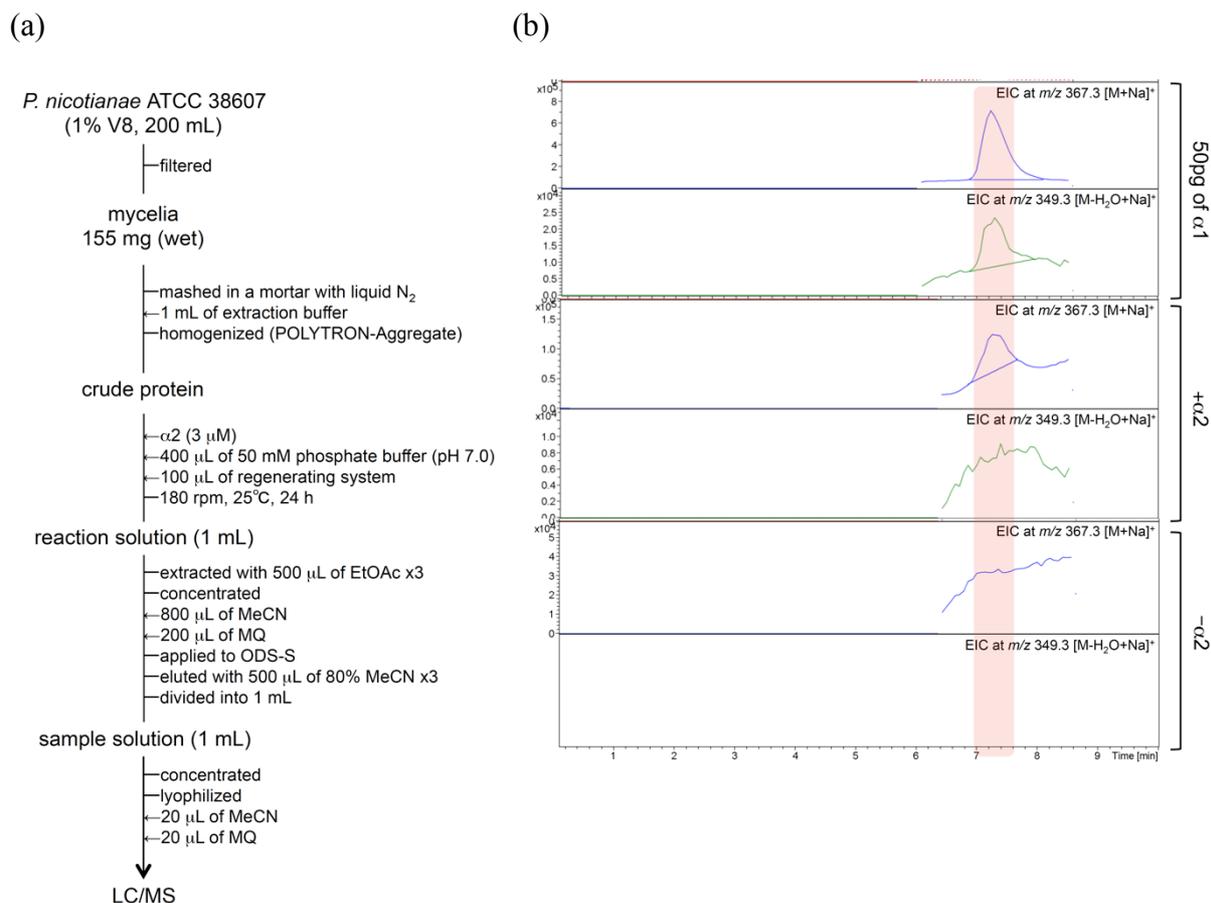
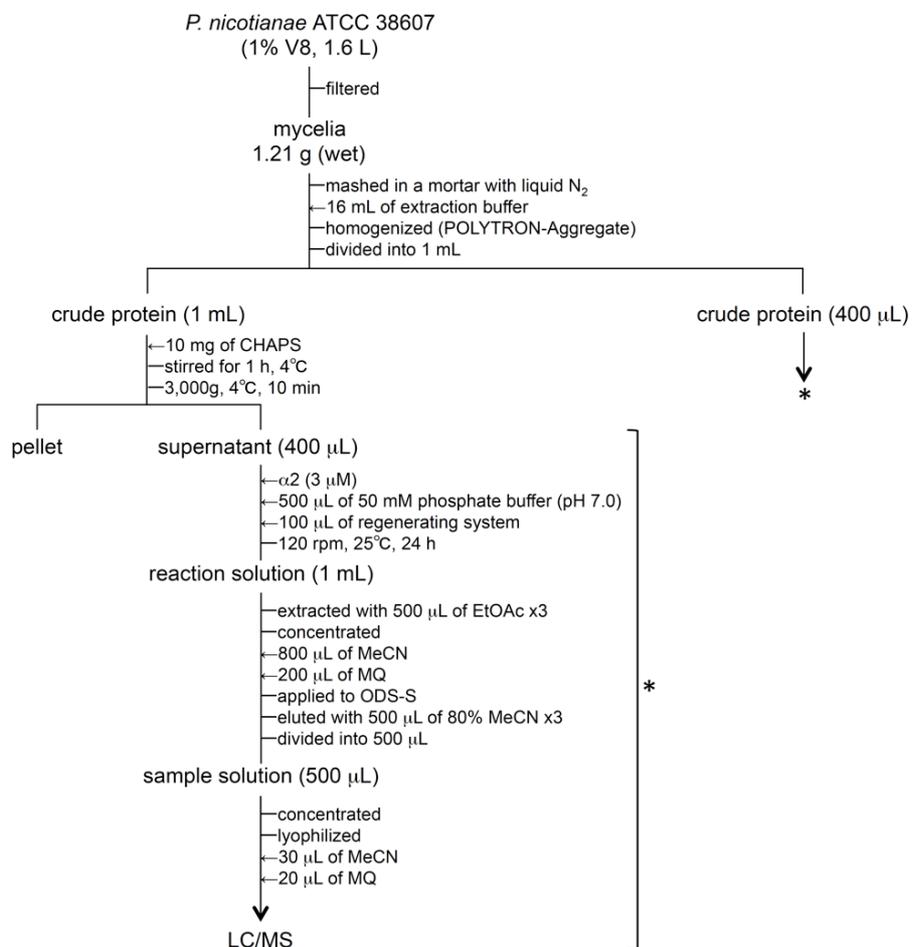


Figure 1-12. *P. nicotianae* ATCC 38607 を用いたα1 生合成酵素アッセイ

(a) アッセイ方法、(b) α1 の擬似分子イオン [M+Na]⁺ のマスクロマトグラフ

次に、この酵素反応の再現性を確認するために、培地体積を 1.6 L に増加し再度 1% V8 ジュース培地で培養した菌糸 (1.21 g、湿重量) の一部を用いてα1 生合成酵素アッセイを行った (Scheme 1-2)。その結果、α2 無添加条件ではα1 は検出されず、α2 を添加した場合のみでα1 のピークが観測された (Figure 1-13a)。しかし膜タンパク抽出を目的に界面活性剤である CHAPS (0.5%) を加えると、目的であるα1 と同様の分子量 m/z 367.3 を有しα1 よりも保持時間が長い別のピークが生じた (Figure 1-13b)。前駆体α2 を加えないとこのピークが生じないことからα1 の類縁体であると予想されるが、微量のため同定していない。以上より、α1 生産アッセイ系の確立に成功したが、生菌を用いた場合ではα2 からα1 への変換がおよそ 5-30%で起こるのに対し、本

アッセイでは約 0.2%と低効率であった。そこで交配ホルモン生産量を指標とし、アッセイに適した菌株を選定した。



Scheme 1-2. $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイの再現

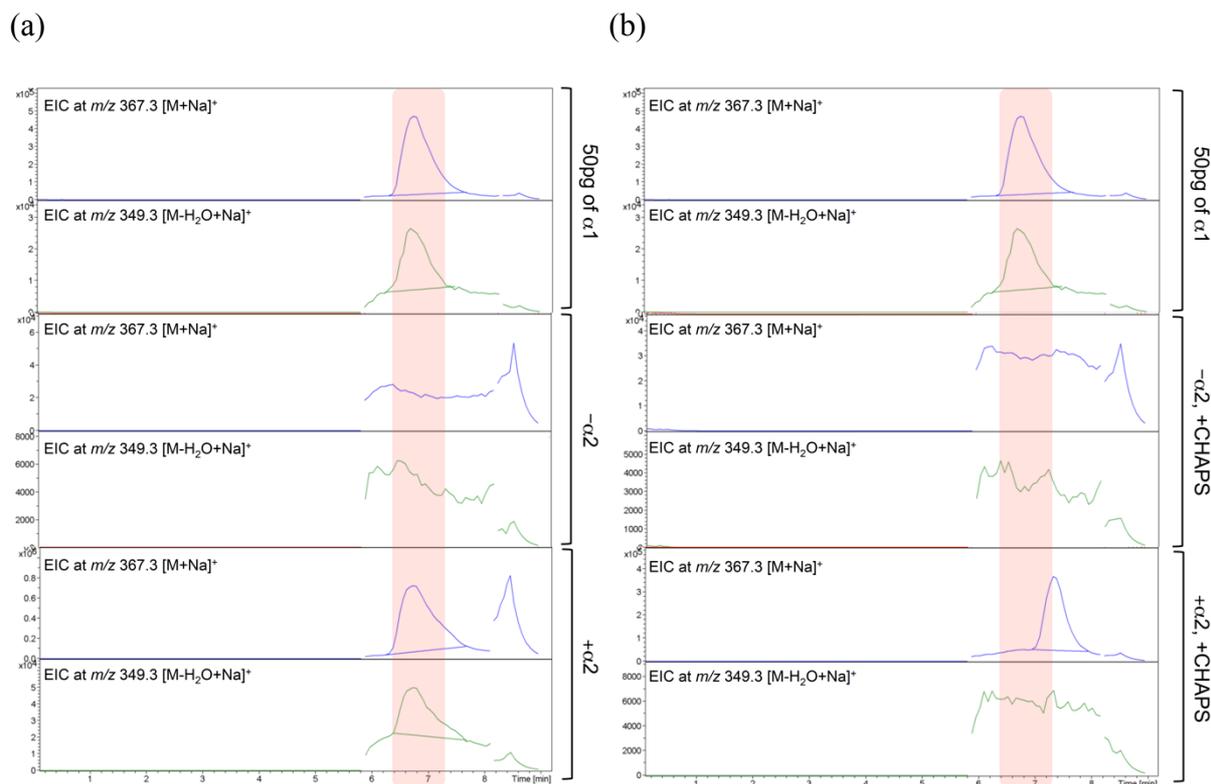


Figure 1-13. $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイの再現

(a) CHAPS 無添加、(b) CHAPS 添加

2-1-6. *P. cryptogea* NBRC 32326 を用いた $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイ

過去のデータから、 $\alpha 1$ 生産量が多い *P. cryptogea* NBRC 32326 ($\alpha 1$ 生産量: 65.3 $\mu\text{g/L}$) を選定し、20% V8 ジュース液体培地での $\alpha 1$ 生産量の 1 週間の経時変化を調べた。その結果、培養開始後 5~6 日目に $\alpha 1$ 量が急上昇したため (Figure 1-14)、 $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイには、20% V8 ジュース培地で 5 日間培養した菌体を用いることにした。

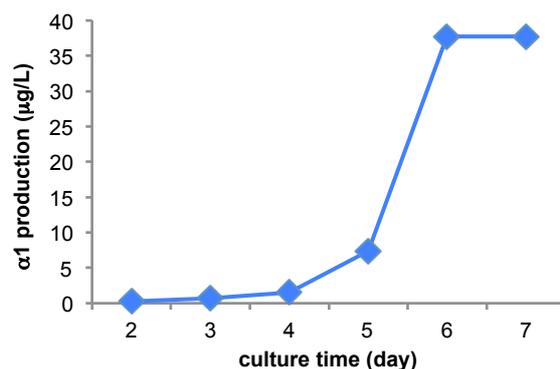
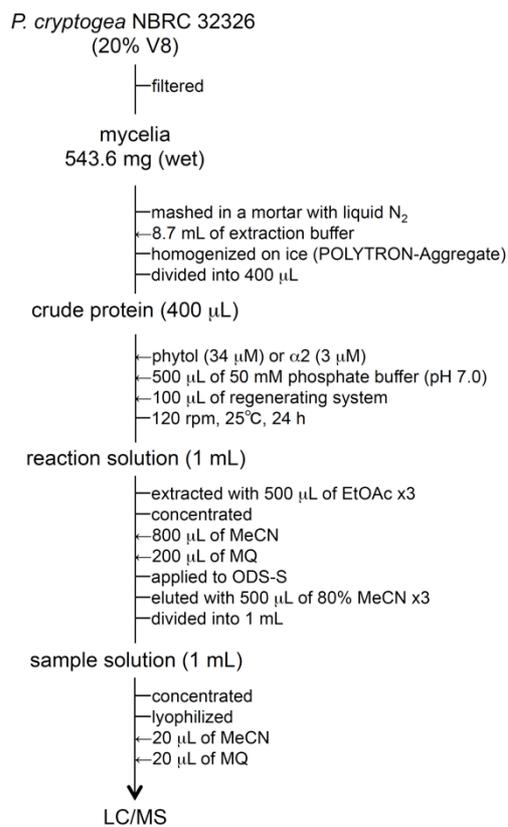


Figure 1-14. *P. cryptogea* NBRC 32326 の 20% V8 での α 1 生産量の経時変化

培養した菌体を用いて α 2 から α 1 への変換を確認したところ (Figure 1-15a)、明瞭ではないが α 2 を添加した場合のみ α 1 と思われるピークが検出され (Figure 1-15b)、 α 2 から α 1 への変換が起きたと判断した。しかしながら、検出したピークを α 1 と仮定しても α 2 から α 1 への変換効率が 0.006%と *P. nicotianae* ATCC 38607 を用いた場合以上に低かった。また *P. cryptogea* NBRC 32326 は phytol を α 1 まで変換できる株であるが、アッセイ時に α 2 の代わりに phytol を加えた場合は α 1 へ変換されなかった (Figure 1-15b)。これらの結果を踏まえて、交配ホルモン生合成酵素を生化学的手法で抽出タンパクより単離・同定することは非常に困難であると考えられる。

(a)



(b)

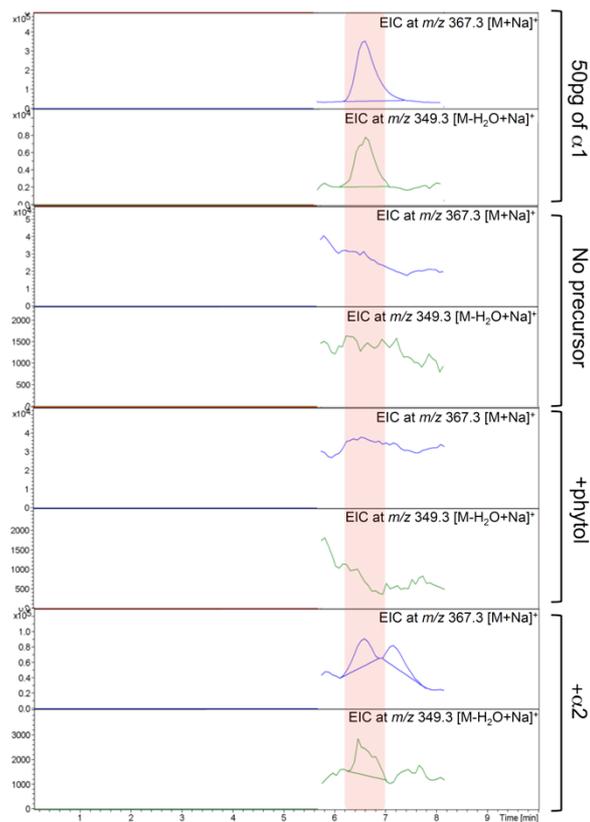


Figure 1-15. *P. cryptogea* NBRC 32326 を用いたα1 生合成酵素アッセイ

(a) アッセイ方法、(b) α1 の擬似分子イオン [M+Na]⁺ のマスクロマトグラフ

2-2. 交配ホルモン生産に影響を与える因子の検討

交配ホルモン生合成酵素を直接抽出、検出することが極めて困難であることが判明したので、次に酵素をコードする遺伝子を探索することで間接的に目的の生合成酵素を同定することにした。そのためには、生合成酵素が高発現また低発現する培養条件の設定が必要不可欠になる。そこで交配ホルモン生産に影響を与える因子を検討することで、発現量の調節が可能であるか調べた。

2-2-1. 培養日数

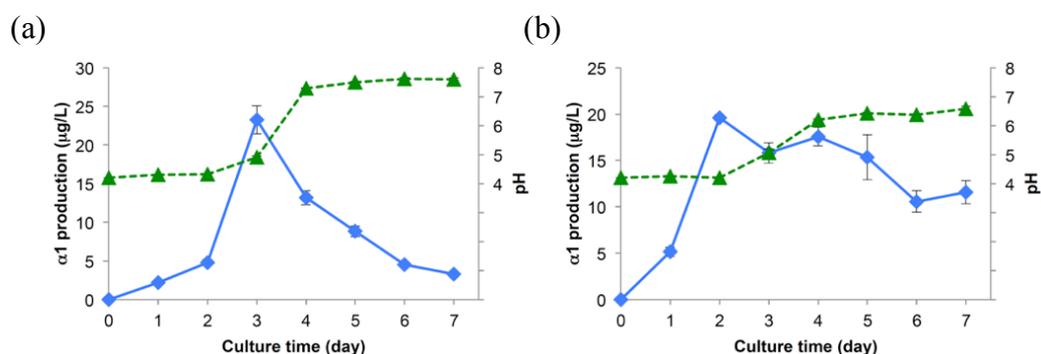
培養日数が交配ホルモン生産に与える影響を調べるために、20% V8 ジュース液体培地に $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の前駆体である $\alpha 2$ (50 $\mu\text{g/L}$) および phytol (1 mg/L) をそれぞれ添加して振盪培養し、培養上清中に含まれる交配ホルモン量を経時的に1週間調べた。交配ホルモンの定量は、1日毎に培養液を抜き取りそこに含まれる交配ホルモンをLC/MSで定量した。用いる菌株は当研究室で保有する菌株のホルモン生産に関するデータを参考にした (Table 1-2)。

Table 1-2. 用いた菌株と交配ホルモン生産量

種	株	交配型	ホルモン生産量 ($\mu\text{g/L}$)	
			$\alpha 1$	$\alpha 2$
<i>P. capsici</i>	NBRC 8386	A2	26.7	24.2
	NBRC 30698	A2	34.8	0.4
<i>P. cinnamomi</i>	NBRC 33180	A1	10.2	0
	NBRC 33181	A1,A2	29	0.6
<i>P. cryptogea</i>	NBRC 32326	A2	65.3	0
<i>P. nicotianae</i>	ATCC 38606	A2	2.1	16.8
	ATCC 38607	A1	1.1	0
	NBRC 33190	A2	0	23.6
	NBRC 33192	A2	0.4	19.4

(1) A1 交配型

A1 交配型は *P. nicotianae* ATCC 38607 および *P. cinnamomi* NBRC 33180 の 2 株について検討した。従来から $\alpha 1$ を生産すると定義されている A1 交配型は、実際に $\alpha 2$ を投与すると $\alpha 1$ に変換した。生産された $\alpha 1$ 量は培養開始後 2~3 日後に最大となり、菌体の生育（目視）によると考えられる pH 上昇と同期して $\alpha 1$ 量が減少するという興味深い結果が得られた (Figure 1-16)。

Figure 1-16. A1 交配型の $\alpha 1$ 生産量の経時変化

(a) *P. nicotianae* ATCC 38607、(b) *P. cinnamomi* NBRC 33180。青は $\alpha 1$ 生産量、緑は pH 値を示した。20% V8 ジュースに $\alpha 2$ ($50 \mu\text{g/L}$) を添加。

(2) A2 交配型

従来 $\alpha 2$ を生産すると定義されていた A2 交配型は、実際は 3 つのタイプ存在し、A1 交配型よりも複雑であることが明らかとなった。1 つ目のタイプ (*P. nicotianae* ATCC 38606、*P. nicotianae* NBRC 33190、*P. nicotianae* NBRC 33192) は、従来の定義と同様に $\alpha 2$ のみを生産するタイプである (Figure 1-17a)。培養開始後 3 日目以降に $\alpha 2$ が産生され始め、4~6 日目に $\alpha 2$ 量は最大となった。また $\alpha 2$ 量の増加は、菌体の生育によると考えられる pH 上昇と同調していた。2 つ目のタイプは phytol から $\alpha 2$ と $\alpha 1$ を両方生産できるタイプ (*P. capsici* NBRC 8386) である (Figure 1-17b)。生産された $\alpha 1$ は 4 日、 $\alpha 2$ は 6 日で最大となったが、他の株と違い培地の pH は上昇しなかった。pH が上昇しなかった理由は、*P. capsici* NBRC 8386 株は他の株と比べ生育が遅いためと考えられる。3 つ目のタイプ (*P. cryptogea* NBRC 32326、*P. cinnamomi* NBRC 33181、*P. capsici* NBRC 30698) は phytol を $\alpha 1$ まで変換でき、かつ $\alpha 1$ のみを生産する (中間体 $\alpha 2$ が検出されない) タイプである (Figure 1-17c)。*P. cryptogea* NBRC 32326 と *P. cinnamomi* NBRC 33181 の $\alpha 1$ の生産量は菌体の生育によると考えられる pH 上昇と同期したが、*P. cinnamomi* NBRC 33181 では 5 日目以降 $\alpha 1$ 生産量が減少した。*P. capsici* NBRC 30698 では $\alpha 1$ 生産量は培養開始後 6 日目で最大となったが、*P. cryptogea* NBRC 32326 と *P. cinnamomi* NBRC 33181 と比べると $\alpha 1$ 生産量が少なかった。また生育が遅かったため、pH は上昇しなかった。以上から、A2 交配型は、従来は $\alpha 2$ のみを生産すると考えられていたが、実際は $\alpha 2$ だけでなく $\alpha 1$ も生産でき、株によっては A1 交配型のように $\alpha 1$ のみを生産することが初めて明らかとなった。これらの結果は、交配ホルモンの生産パターンは菌株によって非常に多様であることを示している。

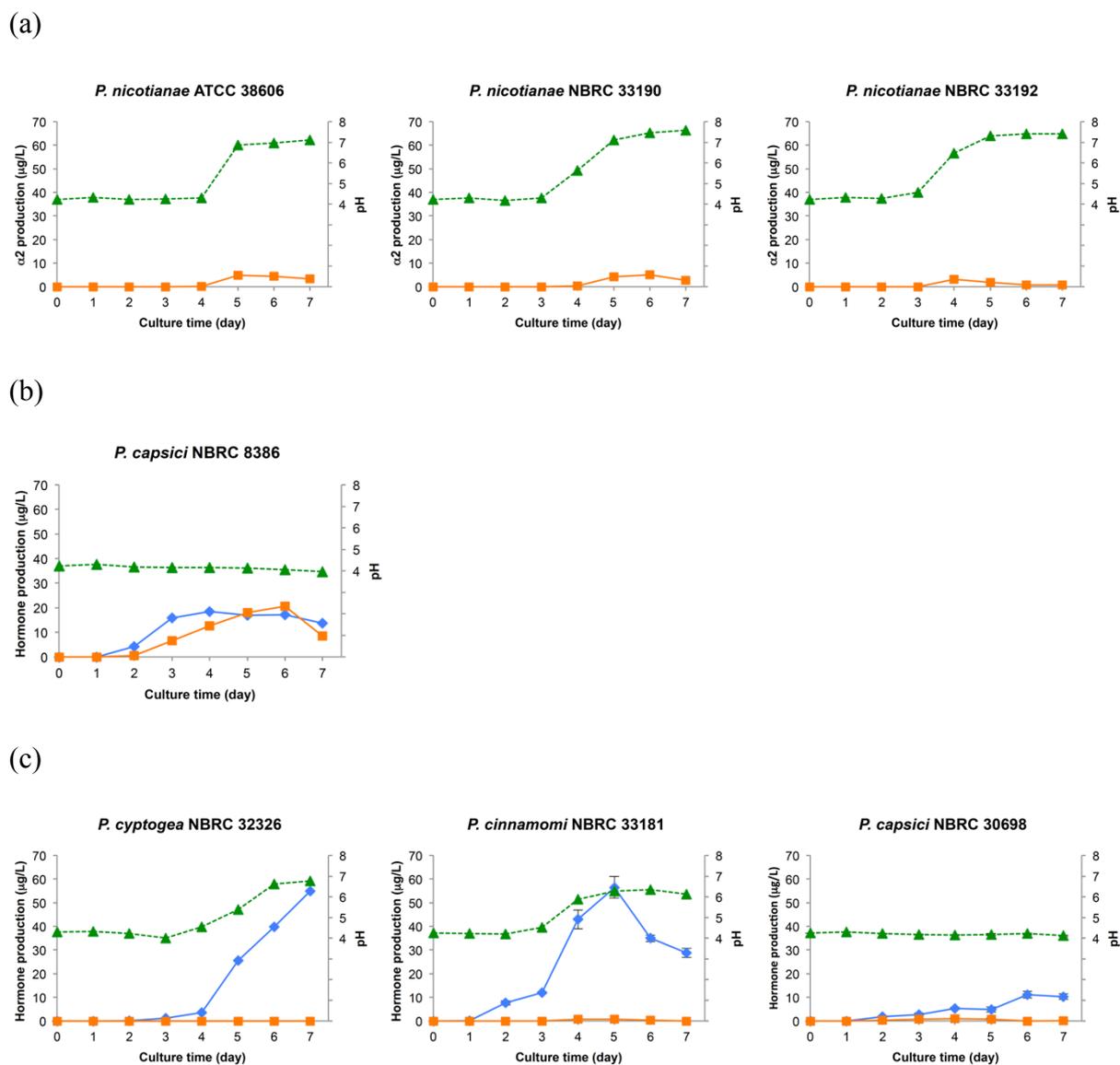


Figure 1-17. A2 交配型のホルモン生産量の経時変化

(a) タイプ 1 (*P. nicotianae* ATCC 38606、*P. nicotianae* NBRC 33190、*P. nicotianae* NBRC 33192)、(b) タイプ 2 (*P. capsici* NBRC 8386)、(c) タイプ 3 (*P. cryptogea* NBRC 32326、*P. cinnamomi* NBRC 33181、*P. capsici* NBRC 30698)。青は $\alpha 1$ 生産量、オレンジは $\alpha 2$ 生産量、緑は pH 値を示した。20% V8 ジュースに phytol (1 mg/L) を添加。

2-2-2. 培地の種類

2-2-1 で交配ホルモン生産パターンは、菌株ごとに大きく異なることがわかった。

次に、培地の種類がホルモン生産に与える影響について A1 交配型である *P.*

cinnamomi NBRC 33180 と A2 交配型の 3 株 (*P. nicotianae* NBRC 33190、*P. capsici* NBRC 8386、*P. cryptogea* NBRC 32326) を用いて検討した。これらの菌株を交配ホルモン前駆体である $\alpha 2$ あるいは phytol を添加した 20% V8 ジュース液体培地またはカビ用の一般的な合成培地である Czapek-Dox 液体培地を用いて 1 週間振盪培養し、培養上清中に含まれる交配ホルモンを LC/MS で定量した。

A1 交配型である *P. cinnamomi* NBRC 33180 は V8 ジュース培地、Czapek-Dox 培地共に $\alpha 1$ を生産したが、Czapek-Dox 培地を用いた場合に $\alpha 1$ が多く生産された (Figure 1-18a)。しかし、生育した菌糸の重量は V8 ジュース培地を用いた場合と比べて Czapek-Dox 培地中では約 1/12 であった (Figure 1-18b)。また菌体重量あたりの $\alpha 1$ 生産量を算出したところ、Czapek-Dox 培地を用いることで $\alpha 1$ 生産量は約 17 倍となった (Figure 1-18c)。以上より、*P. cinnamomi* NBRC 33180 の $\alpha 1$ 生産量を高める ($\alpha 1$ 合成酵素の発現量を増大させる) には基本培地である V8 ジュースよりも Czapek-Dox の方が適していると言える。

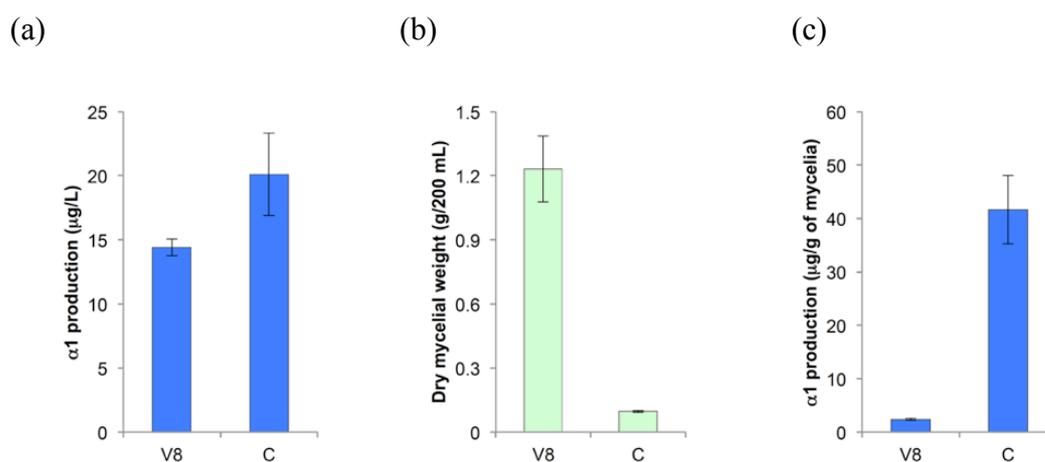


Figure 1-18. 異なる培地での A1 交配型 (*P. cinnamomi* NBRC 33180) のホルモン生産量の比較

(a) ホルモン生産量 ($\mu\text{g/L}$)、(b) 乾燥菌体重量 (g/200 mL)、(c) 菌体あたりのホルモン生産量 ($\mu\text{g/g}$)。V8 : 20% V8 ジュース液体培地、C : Czapek-Dox 液体培地。

一方、A2 交配型である *P. nicotianae* NBRC 33190 と *P. cryptogea* NBRC 32326 は 20% V8 ジュース液体培地中では交配ホルモンを生産したが、Czapek-Dox 液体培地中では生産しなかった (Figure 1-19a)。このことから、少なくともこの 2 株では Czapek-Dox 液体培地はホルモン生産に適しておらず、20% V8 ジュース液体培地が適していると言える。一方、*P. capsici* NBRC 8386 では 20% V8 ジュース液体培地中では $\alpha 1$ と $\alpha 2$ はほぼ同等に生産された ($\alpha 1$:21.2 $\mu\text{g/L}$ 、 $\alpha 2$:17.4 $\mu\text{g/L}$) (Figure 1-19a)。また Czapek-Dox 液体培地中でも両ホルモンは生産されたが、生産された $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の比は大きく $\alpha 2$ にシフトした ($\alpha 1$: 6.3 $\mu\text{g/L}$ 、 $\alpha 2$: 40.6 $\mu\text{g/L}$) (Figure 1-19a)。*P. capsici* NBRC 8386 では 2 種類の液体培地において総ホルモン生産 ($\alpha 1$ 生産量と $\alpha 2$ 生産量の和) がほぼ一定であったため、V8 野菜ジュースは $\alpha 2$ から $\alpha 1$ への生合成促進因子を含む可能性が考えられる。しかしながら、V8 ジュース液体培地は Czapek-Dox 液体培地よりも菌体の生育を促進しており、培養後の菌体量が両培地間で大きく異なっていた。(Figure 1-19b)。そこで培養 7 日後のホルモン生産量と菌体量から菌体あたりのホルモン生産量を算出したところ、Czapek-Dox 液体培地を用いた場合では、V8 ジュース液体培地を用いた場合と比べ、 $\alpha 1$ 生産量は約 2 倍、 $\alpha 2$ 生産量は約 16 倍に増加していることがわかった (Figure 1-19c)。菌体あたりの交配ホルモン生産量は、細胞レベルでの交配ホルモン生合成酵素の発現量を反映しているとみなすことができるため、両ホルモン生産株である *P. capsici* NBRC 8386 株では Czapek-Dox 液体培地が V8 ジュース液体培地より生合成酵素の発現量を増大させるのに優れていると言える。

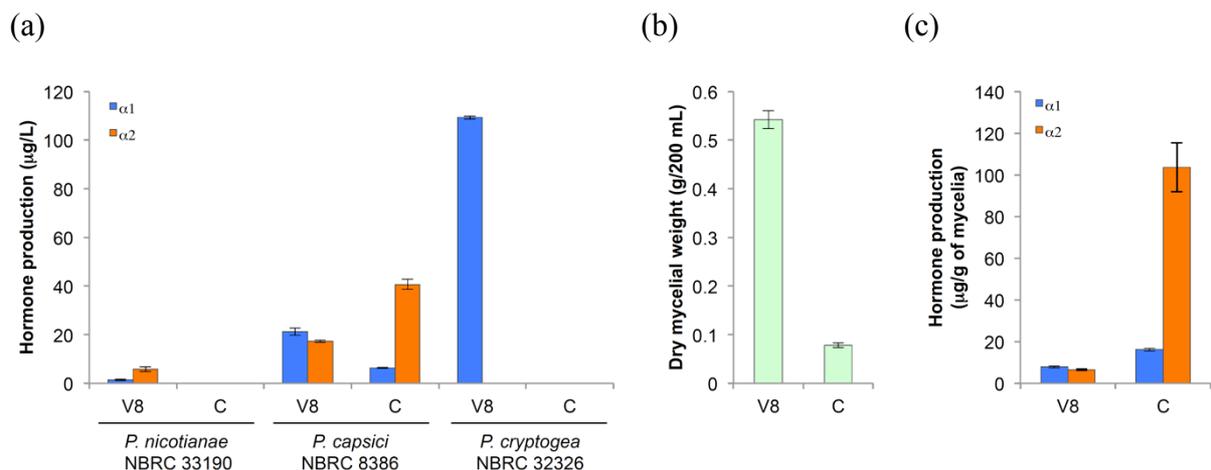


Figure 1-19. 異なる培地での A2 交配型のホルモン生産量の比較

(a) 3 株のホルモン生産量 (µg/L)、(b) *P. capsici* NBRC 8386 の乾燥菌体重量 (g/200 mL)、(c) *P. capsici* NBRC 8386 の菌体あたりのホルモン生産量 (µg/g)。V8 : 20% V8 ジュース液体培地、C : Czapek-Dox 液体培地。

2-2-3. V8 ジュースの成分

A1 交配型である *P. cinnamomi* NBRC 33180 と A2 交配型で両ホルモン生産株である *P. capsici* NBRC 8386 とは異なり、*P. nicotianae* NBRC 33190 と *P. cryptogea* NBRC 32326 のホルモン生産量は Czapek-Dox (低栄養) よりも V8 ジュース液体培地 (高栄養) 中で促進された (Figure 1-19a)。したがって、これら 2 株では、V8 ジュース成分がホルモン生産に必須である可能性がある。そこで V8 ジュースに含まれるどの成分がこれらの株のホルモン生産に影響を与えているのか調べた。まず V8 ジュースを遠心分離により上清と沈殿に分け、得られた上清を ODS オープンカラムクロマトグラフィーで非吸着画分 (高極性成分、P) と吸着画分 (低極性成分、NP) に分離した。これらフラクションを 20% V8 ジュース相当になるように水に加えたものを液体培地として用い、1 週間振盪培養した後に培養上清中に含まれる交配ホルモンを LC/MS で定量した。その結果、*P. nicotianae* NBRC 33190 では α2 生産は P ではなく NP によって強く促進され (Figure 1-20a-左)、菌体の生育は P により促進された (Figure 1-20a-

中)。このことから V8 ジュース中の低極性かつ低栄養成分には $\alpha 2$ 生合成の促進物質が含まれると考えられる。この傾向は、菌体あたりのホルモン生産量を算出するとより顕著に見られ、NP では水のみで培養した場合の約 2 倍に菌糸あたりの生産量が増加していた (Figure 1-20a-右)。V8 ジュースそのものを用いて培養した時のホルモン生産量よりも、P と NP を混合した場合 (P+NP) の方がホルモン生産量が多い (Figure 1-20a-左) 理由は明らかではないが、P 培地における $\alpha 2$ 生産量は疎水性画分である NP を加えることにより回復した (Figure 1-20a-右)。A2 交配型でありながら $\alpha 1$ のみを生産する *P. cryptogea* NBRC 32326 も *P. nicotianae* NBRC 33190 と類似のパターンを示した (Figure 1-20b)。栄養成分を含まない NP 培地における高い菌体あたりのホルモン生産量 (Figure 1-20b-右) は菌体が生育していないためと考えられる (Figure 1-20b-中)。培地中の栄養欠乏による類似した効果は、水中で培養した場合でも確認され、これらの菌株は、水のみではほとんど生育しなかったにもかかわらず、菌体重量あたりのホルモン生産量から考えるとコントロールである V8 ジュースそのものを用いた場合と同等あるいはそれをはるかに凌ぐ効率で交配ホルモンを生産した (Figure 1-20a-右、1-20b-右)。これらの結果は、*P. nicotianae* NBRC 33190 および *P. cryptogea* NBRC 32326 の交配ホルモンの生合成を促進する疎水性因子が V8 ジュース中に存在していることを示唆している。

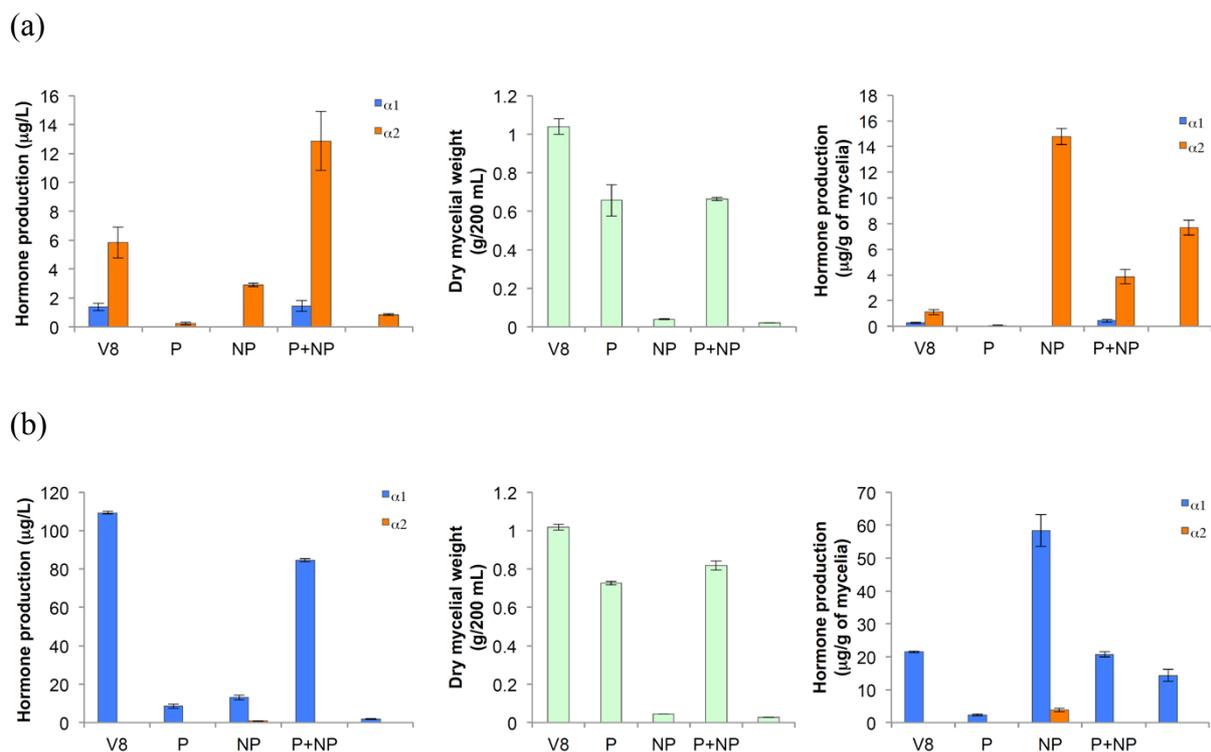


Figure 1-20. V8 ジュース成分の A2 株ホルモン生産への影響

(a) *P. nicotianae* NBRC 33190、(b) *P. cryptogea* NBRC 32326

左のグラフは培地あたりのホルモン生産量 ($\mu\text{g/L}$)、中のグラフは培地 200 mL あたりの菌体の乾燥重量 ($\text{g}/200 \text{ mL}$)、右のグラフは菌体あたりのホルモン生産量 ($\mu\text{g/g}$ of mycelia) を示す。V8 は 20% V8 ジュース培地、P は V8 ジュースの ODS 非吸着画分、NP は同吸着画分、V8 以外の培地は純水で無印は純水のみを表す。

A1 交配型である *P. cinnamomi* NBRC 33180 についても $\alpha 1$ 生産量に対する V8 成分の影響を調べた。その結果、どの培地を用いても $\alpha 1$ は生産されたが (Figure 1-21a)、菌糸あたりの生産量は NP と水を用いた場合に特に多かった (Figure 1-21c)。しかし A2 交配型である *P. nicotianae* NBRC 33190 と *P. cryptogea* NBRC 32326 の場合とは異なり、NP と水のみでの生産量に大きな違いは見られなかった。したがって、*P. nicotianae* NBRC 33190 と *P. cryptogea* NBRC 32326 の $\alpha 2$ 生産が V8 ジュース中の成分で促進されるのに対し、*P. cinnamomi* NBRC 33180 では $\alpha 1$ 生産は V8 ジュース中の成分で促進されるのではなく、培地の栄養成分が欠乏している状態すなわち貧栄養環境であるこ

とが重要であるかもしれない。

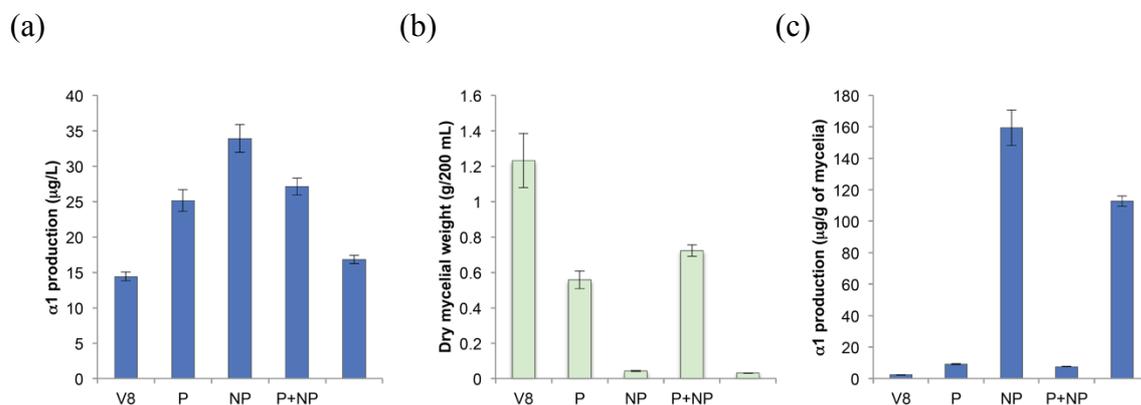


Figure 1-21. V8 ジュース成分の A1 株ホルモン生産への影響

A1 株として *P. cinnamomi* NBRC 33180 を用いた。(a) 培地あたりのホルモン生産量 ($\mu\text{g/L}$) (b) 培地 200 mL あたりの菌体の乾燥重量 (g/200 mL) (c) 菌体あたりのホルモン生産量 ($\mu\text{g/g}$ of mycelia) を示す。V8 は 20% V8 ジュース培地、P は V8 ジュースの ODS 非吸着画分、NP は同吸着画分、V8 以外の培地は純水で無印は純水のみを表す。

2-3. RNA-seq による交配ホルモン生合成酵素候補遺伝子の探索

2-3-1. 菌株の選定

交配ホルモン生合成酵素をコードする遺伝子の探索では、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行うこととした。その際、交配ホルモンを生産する株としない株の遺伝子発現を比較し、生産している株で発現量が多く生産しない株で低くなっている遺伝子を生合成酵素遺伝子の候補とする。また、遺伝子発現の比較は同種で行う必要がある。そこで、A1 交配型と A2 交配型の両交配型が揃いゲノムデータが公開されている *P. nicotianae* と *P. capsici* の 2 種を用いることにした。2-2 でホルモン生産に影響を与える因子を検討した結果、ホルモン生産のパターンは株ごとに大きく異なること、および培地の種類、V8 ジュース成分にも影響を受け、その影響も株ごとに異なることがわかった。しかし、液体培地に V8 ジュースを用いるとジュース中に含まれる固形物が菌糸の間に取り込まれ RNA 抽出に影響を与える可能性があるため、培地には合成培地である Czapek-Dox 液体培地を用いることにした。まずは RNA 抽出のタイミングを決定するために A1 交配型 2 株と A2 交配型 2 株について Czapek-Dox 液体培地での 1 週間のホルモン生産量の経時変化を調べた。培養は全て 200 mL スケールで交配ホルモンの前駆体 phytol (1 mg/L) あるいは $\alpha 2$ (50 $\mu\text{g/L}$) を加えた。

(1) A1 交配型

A1 交配型として、*P. nicotianae* ATCC 38607 と *P. capsici* NBRC 31402 を選定し、ホルモン生産量の経時変化を調べた (Figure 1-22)。その結果、*P. nicotianae* ATCC 38607 では $\alpha 1$ 生産量は 3 日目に最大となり、その後減少した (Figure 1-22a)。一方、*P. capsici*

NBRC 31402 では培養開始から直線的に $\alpha 1$ 量が増加した (Figure 1-22b)。以上より、*P. nicotianae* ATCC 38607 は 2 日培養した菌糸を、*P. capsici* NBRC 31402 は 6 日培養した菌糸を RNA 抽出に用いることにした。

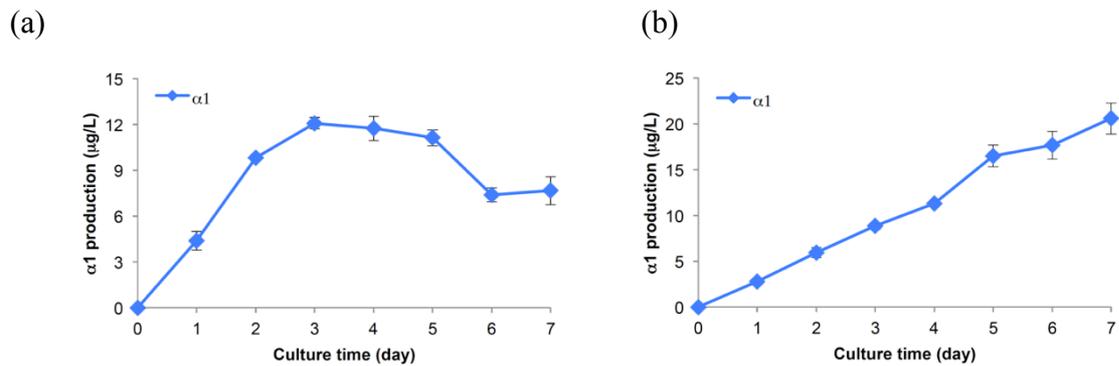


Figure 1-22. Czapek-Dox 培地中での A1 交配型の交配ホルモン生産量の経時変化
(a) *P. nicotianae* ATCC 38607、(b) *P. capsici* NBRC 31402

(2) A2 交配型

A2 交配型として *P. nicotianae* NBRC 33193 と *P. capsici* NBRC 8386 を選定した。*P. nicotianae* NBRC 33193 では $\alpha 2$ 生産量は培養開始後 3 日で最大となった (Figure 1-23a)。一方 *P. capsici* NBRC 8386 では $\alpha 2$ 生産量は 6 日で最大となり、 $\alpha 1$ 生産量は直線的に増加した (Figure 1-23b)。以上より、*P. nicotianae* NBRC 33193 は 2.5 日培養した菌糸を、*P. capsici* NBRC 8386 は 5.5 日培養した菌糸を RNA 抽出に用いることにした。

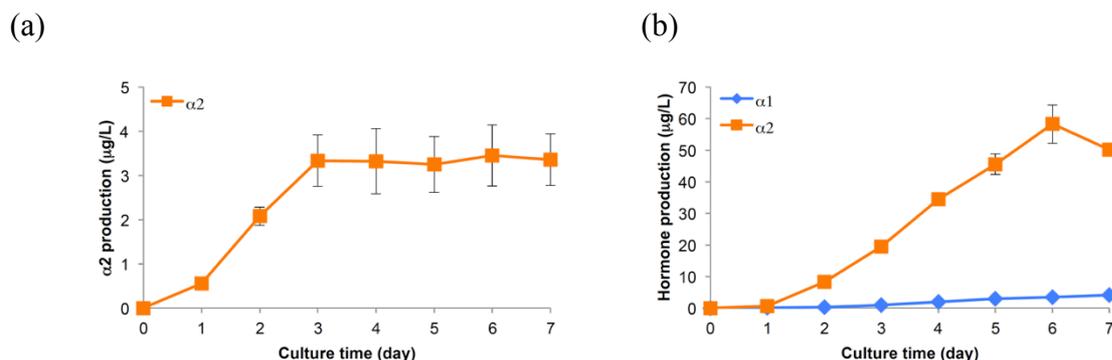


Figure 1-23. Czapek-Dox 培地中での A2 交配型の交配ホルモン生産量の経時変化
(a) *P. nicotianae* NBRC 33193、(b) *P. capsici* NBRC 8386

同種間で遺伝子発現量を比較する場合、同じ株を用いたほうが遺伝子発現の差を正確に解析しやすい。そこで両ホルモンを生産株できる *P. capsici* NBRC 8386 に注目し、Czapek-Dox をベースとした培地でホルモン生産量の制御の可能性を調べるため、2-2-3 と同様の実験を行ったところ、V8 ジュースの低極性成分 (NP) を用いることで、ホルモン生産量が抑えられることがわかった (Figure 1-24a)。また菌糸あたりのホルモン生産量では、水の場合に比べ、NP では大きく生産量が抑えられていた (Figure 1-24c)。ここからホルモン生産量が減った理由は培地が低栄養であるからではなく、V8 ジュース中の低極性成分によってホルモン生産すなわち $\alpha 2$ 生合成酵素の発現量が抑えられたためと考えられる。

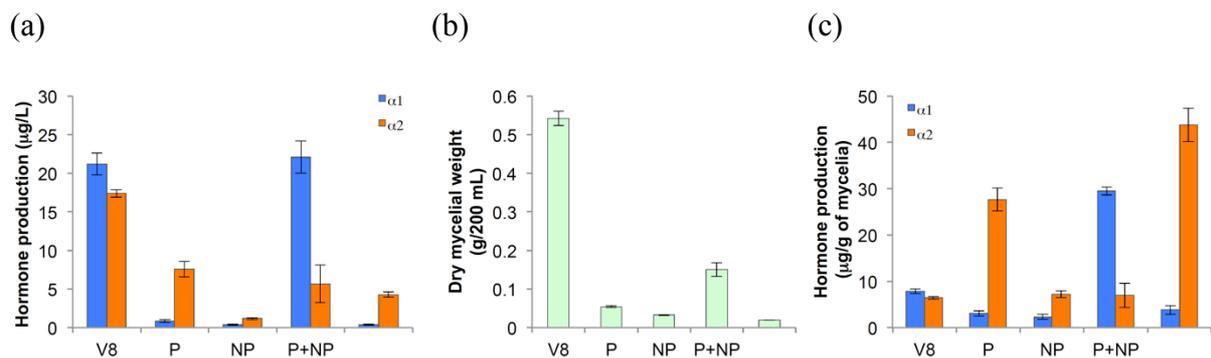


Figure 1-24. *P. capsici* NBRC 8386 の V8 ジュース成分のホルモン生産への影響

(a) 培地あたりのホルモン生産量 (µg/L) (b) 培地 200 mL あたりの菌体の乾燥重量 (g/200 mL) (c) 菌体あたりのホルモン生産量 (µg/g of mycelia) を示す。V8 は 20% V8 ジュース培地、P は V8 ジュースの ODS 非吸着画分、NP は同吸着画分、V8 以外の培地は純水で無印は純水のみを表す。

したがって、Czapek-Dox 液体培地に V8 ジュースの低極性成分を加えることにより同様の結果が得られると期待し、V8 ジュースの低極性成分を Czapek-Dox 培地に加えた場合の *P. capsici* NBRC 8386 の α2 生産量の経時変化と 7 日目の菌糸あたりのホルモン生産量を調べた。その結果、予想通りに α2 生産量が抑えられ (Figure 1-25a)、菌糸あたりの α2 生産量は低極性成分 (NP) を加えたことにより 1/10 に低下した (Figure 1-25c)。しかし α1 については、菌糸あたりの生産量が NP の影響を受けなかったため、生合成酵素の発現量を調節することはできなかった。以上より、Czapek-Dox 培地に V8 ジュースの低極性成分 (NP) を加えた培地で 5.5 日間培養した *P. capsici* NBRC 8386 を α2 生合成のネガティブコントロールとした。

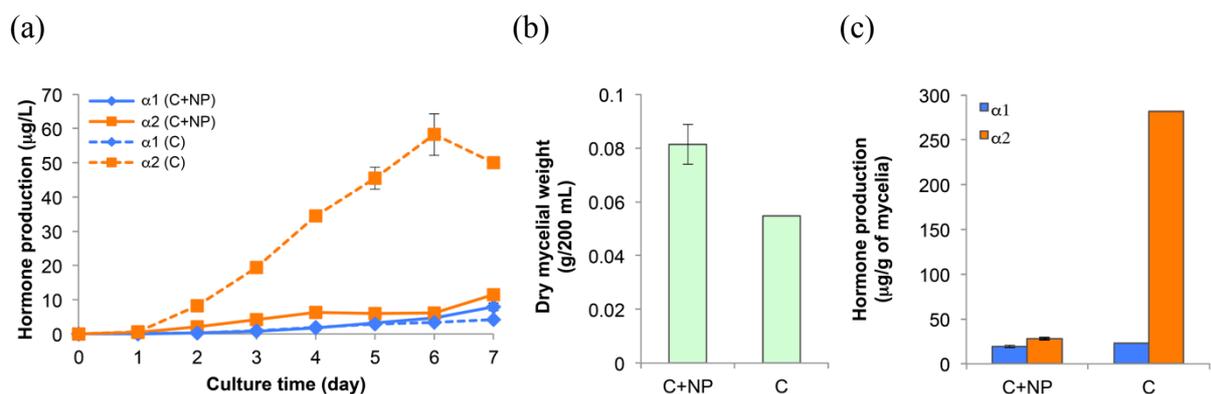


Figure 1-25. V8 ジュース低極性成分が *P. capsici* NBRC 8386 の $\alpha 2$ 生産量に与える影響

(a) 1 週間の経時変化 ($\mu\text{g/L}$)、(b) 7 日後の乾燥菌体重量 ($\text{g}/200 \text{ mL}$)、(c) 7 日後の菌糸あたりのホルモン生産量 ($\mu\text{g/g}$ of mycelia)。C は Czapek-Dox、NP は V8 ジュースの低極性成分を表す。

以上より、RNA-seq 解析には以下の Table 1-3 に示す 4 株 5 パターンを用いた。

Table 1-3. RNA 抽出用菌体

種	株	交配型	生合成酵素			培地	培養日数 (日)
			$\alpha 1$	$\alpha 2$	記号		
<i>P. capsici</i>	NBRC 31402	A1	+	-	S1	Czapek-Dox	6
<i>P. capsici</i>	NBRC 8386	A2	±	±	S0	Czapek-Dox+NP	5.5
<i>P. capsici</i>	NBRC 8386	A2	±	++	S2	Czapek-Dox	5.5
<i>P. nicotianae</i>	NBRC 33193	A2	-	+	S2	Czapek-Dox	2.5
<i>P. nicotianae</i>	ATCC 38607	A1	+	-	S1	Czapek-Dox	2

2-3-2. RNA 抽出

Table 1-3 に示した菌株を最適な培養条件で培養し、得られた菌糸から total RNA を抽出した。RNA の抽出は以下の手順で行った。培養後の菌体をろ過で回収し、菌体に含まれる寒天を取り除いた後、素早く DEPC 処理水で菌体を洗浄した。菌体は液体窒素で瞬間凍結したのち、乳棒で粉末状に破碎して RNA を抽出した。RNA 抽出は

RNAiso Plus (TaKaRa) を用い、付属のプロトコルに従った。抽出した total RNA は DNase 処理し、夾雑する DNA を除いた。抽出した RNA の品質は、NanoDrop と電気泳動で確認した (Table 1-4、Figure 1-26)。

Table 1-4. 抽出した RNA の品質

Lane No.	Sample	ng/ μ L	260/280	260/230
1	<i>P. capsici</i> NBRC 31402	752.4	2.17	2.31
2	<i>P. capsici</i> NBRC 8386 (+NP)	776.9	2.25	2.36
3	<i>P. capsici</i> NBRC 8386	487.9	2.21	2.09
4	<i>P. nicotianae</i> NBRC 33193	683.1	2.26	2.16
5	<i>P. nicotianae</i> ATCC 38607	463.2	2.06	2.01

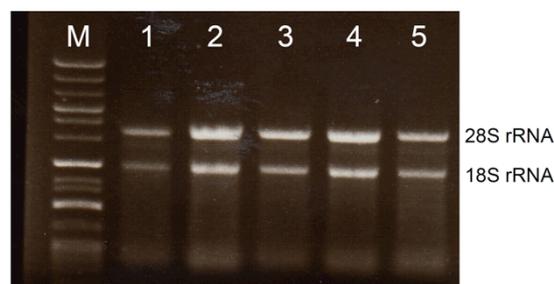


Figure 1-26. RNA 電気泳動 (1 μ g of RNA/lane)

M: マーカー、1 : *P. capsici* NBRC 31402、2 : *P. capsici* NBRC 8386 (+NP)、3 : *P. capsici* NBRC 8386、4 : *P. nicotianae* NBRC 33193、5 : *P. nicotianae* ATCC 38607

電気泳動および NanoDrop の結果より、良好な total RNA が抽出できたと判断し、理化学研究所ゲノムネットワーク解析支援施設 (GeNAS) に RNA-seq 解析を依頼した。GeNAS による Nanodrop および Bioanalyzer を用いたサンプルの品質再検査の結果を Table 1-5 に示した。260/280 および 260/230 は 1.8 以上、RIN (RNA Integrity Number) は 8 以上が解析可能条件であったが、RIN 値に関しては 5 サンプル中 4 サンプルで値を下回っており、RNA の分解がみられた。しかし幸いなことに、シーケンシング、

マッピングおよび発現解析は問題なく実施でき、良好な解析結果が得られた。

Table 1-5. GeNAS による RNA の品質

Sample	260/280	260/230	RIN
<i>P. capsici</i> NBRC 31402	2.11	2.36	6.2
<i>P. capsici</i> NBRC 8386 (+NP)	2.14	2.42	7.1
<i>P. capsici</i> NBRC 8386	2.09	1.75	6.6
<i>P. nicotianae</i> NBRC 33193	2.12	2.14	8.0
<i>P. nicotianae</i> ATCC 38607	2.00	2.11	6.6

2-3-3. 交配ホルモン生合成酵素遺伝子候補の探索

GeNAS から納品された RNA-seq 発現解析データから交配ホルモン生合成酵素遺伝子候補を探索した。今回取得した発現解析データは、リード数が大きいほど遺伝子の発現量が多いものである。そこで、 $\alpha 2$ 生産株と非生産株の発現量を比較し $\alpha 2$ 生産株で発現量が多い遺伝子が $\alpha 2$ 生合成酵素遺伝子の候補となり、また $\alpha 1$ 生産株と非生産株を比較し $\alpha 1$ 生産株で発現量が多い遺伝子が $\alpha 1$ 生合成酵素遺伝子の候補となる。

(1) *P. capsici* の交配ホルモン生合成酵素候補遺伝子の探索

交配ホルモン生合成酵素は水酸化酵素すなわちシトクローム P450 であると予想される。したがって、参照ゲノム中に存在するシトクローム P450 候補遺伝子に探索対象を絞り込み、発現量を比較した。発現量の比較は logratio すなわち $\log_2(\text{case のリード数/control のリード数})$ で表した。*P. capsici* に存在する 19,805 遺伝子のうち、推定 P450 遺伝子は 34 個含まれていた。これら遺伝子の発現量比を、*P. capsici* NBRC 31402 ($\alpha 1$ 合成株 : S1)、*P. capsici* NBRC 8386 ($\alpha 2$: 合成株 S2) および *P. capsici* 8386 (+NP) (非合成株 : S0) の組み合わせで計算し、 logratio (S2/S1) 、 logratio (S0/S1) および

logratio (S2/S0) を算出した (Table 1-6)。S2 は α 2 生産株、S1 は α 1 生産株、S0 は α 2 を生産するが生産量が抑えられた株なので、logratio (S2/S1)、logratio (S0/S1)、logratio (S2/S0) の全てが 1 以上となる遺伝子が α 2 生合成酵素の候補と言える。一方、 α 1 生合成酵素の候補は今回解析に用いた *P. capsici* は全て α 1 を生産する株なので今回は絞り込むことはできなかった。算出した発現量比をグラフ化したものを Figure 1-27 に示した。発現量比から、No. 10 (e_gw1.6.785.1)、16 (e_gw1.55.136.1)、17 (e_gw1.55.146.1) が全ての値で 1 以上となったため、これら 3 つが *P. capsici* の α 2 生合成酵素の候補と考えられる。

Table 1-6. *P. capsici* における P450 候補遺伝子の発現量比較

No.	gene name	logratio (S2/S1)	logratio (S0/S1)	logratio (S2/S0)
1	fgenesl1_pm.PHYCAscaffold_10_#_67	3.49	3.56	-0.13
2	fgenesl1_pm.PHYCAscaffold_35_#_105	0.32	0.00	0.25
3	fgenesl1_pg.PHYCAscaffold_100_#_25	2.37	1.58	0.73
4	gw1.5.24.1	-2.75	-4.40	1.59
5	gw1.55.62.1	-Inf*	0.08	-Inf*
6	gw1.65.87.1	Inf*	NaN**	Inf*
7	gw1.55.137.1	-0.63	-0.82	0.13
8	e_gw1.2.1138.1	NaN**	NaN**	NaN**
9	e_gw1.2.343.1	1.31	1.52	-0.28
10	e_gw1.6.785.1	2.64	1.22	1.36
11	e_gw1.10.174.1	1.72	0.45	1.21
12	e_gw1.12.517.1	1.32	3.60	-2.35
13	e_gw1.12.539.1	2.49	2.78	-0.35
14	e_gw1.24.311.1	-0.98	-1.51	0.47
15	e_gw1.36.409.1	-0.85	-1.09	0.18
16	e_gw1.55.136.1	7.22	4.64	2.52
17	e_gw1.55.146.1	2.39	1.29	1.04

18	e_gw1.151.19.1	0.99	-0.66	1.59
19	e_gw1.798.2.1	-Inf*	-Inf*	NaN**
20	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_5_#_144_#_Contig3242.1	-0.20	-0.11	-0.14
21	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_15_#_91_#_4100369:1	-1.01	-0.12	-0.95
22	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_15_#_93_#_Contig4739.1	0.08	0.19	-0.18
23	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_55_#_21_#_4098099:2	0.87	0.36	0.45
24	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_100_#_20_#_Contig1444.1	-1.19	1.28	-2.53
25	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_352_#_1_#_Contig1018.1	8.76	9.01	-0.31
26	estExt2_fgenesh1_pm.C_PHYCAscaffold_460050	0.06	0.20	-0.20
27	estExt2_fgenesh1_pg.C_PHYCAscaffold_240059	-1.12	-1.09	-0.09
28	estExt2_fgenesh1_pg.C_PHYCAscaffold_2550002	-4.19	-0.33	-3.92
29	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_100249	-0.01	-0.27	0.20
30	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_120175	5.31	5.98	-0.73
31	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_240293	1.21	2.98	-1.83
32	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_1000072	-4.04	-0.20	-3.91
33	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_20806	1.62	1.75	-0.19
34	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_610084	0.62	1.36	-0.80

S0: *P. capsici* NBRC 8386 (+NP), S1: *P. capsici* NBRC 31402, S2: *P. capsici* NBRC 8386
 logratio: $\log_2(\text{case/control})$, *Inf: infinity, **NaN: Not a number

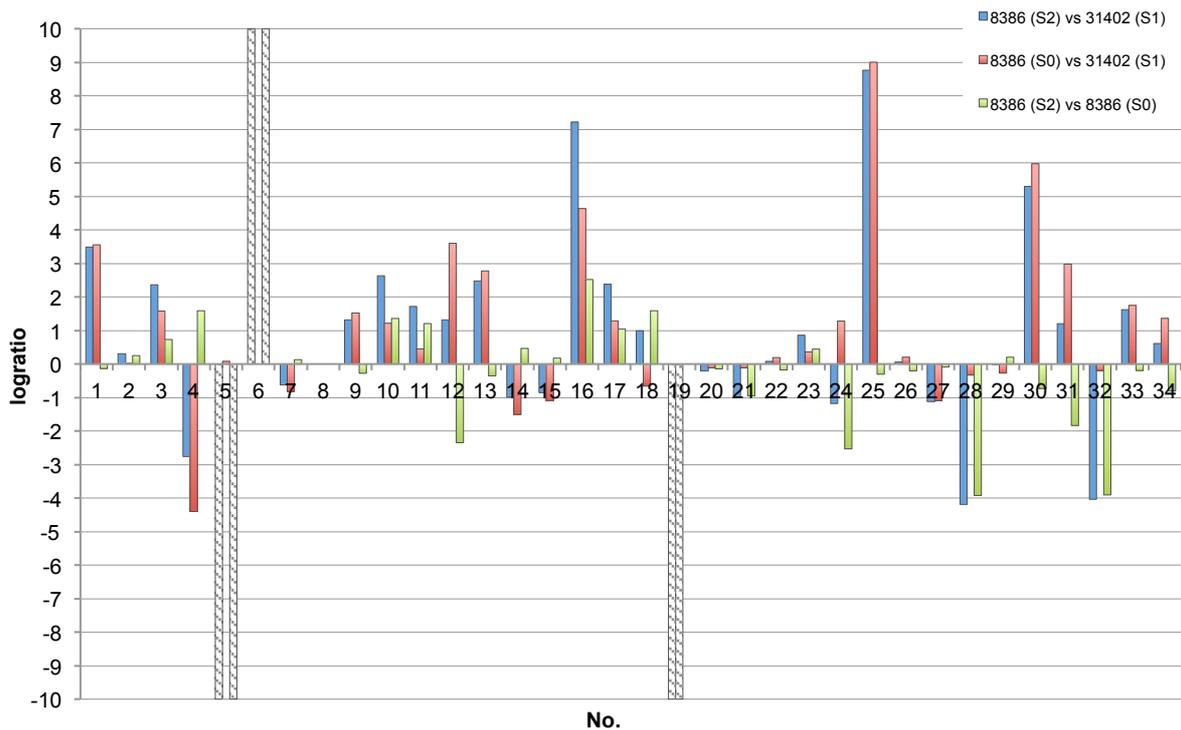


Figure 1-27. P450 候補遺伝子の発現量比較

No.は Table 1-6 とリンクしている。Inf は斜めの塗りつぶし、NaN は 0 で表した。

(2) *P. capsici* の P450 以外の水酸化酵素と酸化酵素の発現量比

交配ホルモンの生合成を担う酵素はシトクローム P450 と考えられるが、他の水酸化酵素や酸化酵素が担っている可能性もある。そこでシトクローム P450 を絞り込んだ方法と同様に、参照ゲノム中に存在する水酸化酵素候補遺伝子と酸化酵素候補遺伝子についても発現量比を調べ、交配ホルモン生合成酵素遺伝子候補が存在するか調べた。水酸化酵素候補遺伝子はゲノム中に 11 個存在した。logratio (S2/S1)、logratio (S0/S1) および logratio (S2/S0) の全てが 1 以上である遺伝子は存在しなかった (Table 1-7、Figure 1-28)。したがって P450 以外の水酸化酵素は α 2 生合成酵素の候補ではないと結論付けた。

Table 1-7. *P. capsici* における水酸化酵素候補遺伝子の発現量比

No.	gene name	logratio (S2/S1)	logratio (S0/S1)	logratio (S2/S0)
1	e_gw1.31.436.1	NaN*	NaN*	NaN*
2	gw1.3.128.1	0.83	1.13	-0.36
3	e_gw1.2.382.1	0.25	0.26	-0.06
4	e_gw1.9.366.1	0.36	0.07	0.23
5	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_28_#_108_#_4103841:2	NaN*	NaN*	NaN*
6	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_76_#_45_#_4101945:241	0.16	-0.04	0.14
7	estExt2_fgenesh1_pm.C_PHYCAscaffold_40274	-0.61	-0.77	0.11
8	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_10414	-0.85	-0.82	-0.10
9	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_11188	-1.73	-2.18	0.39
10	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_80085	0.57	-0.15	0.65
11	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_240061	1.24	2.01	-0.83

S0: *P.capsici* NBRC 8386 (+NP), S1: *P. capsici* NBRC 31402, S2: *P. capsici* NBRC 8386
 logratio: $\log_2(\text{case/control})$, *infinity, **Not a number

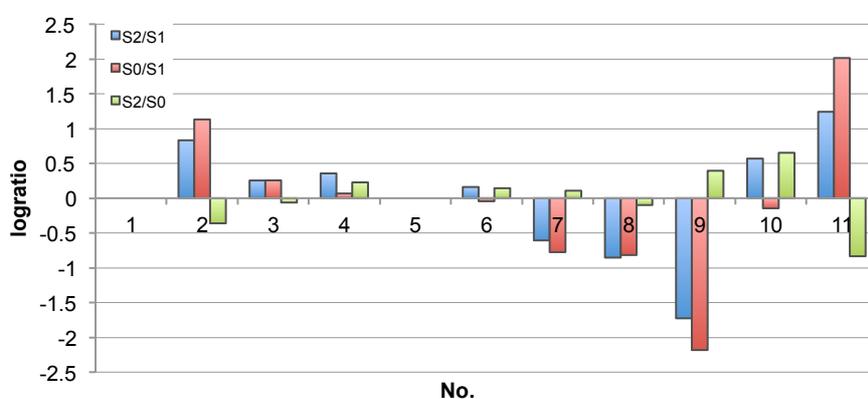


Figure 1-28. 水酸化酵素候補遺伝子の発現量比

No.は Table 1-7 とリンクしている。NaN は 0 で表した。

一方、酸化酵素候補遺伝子はゲノム中に 83 個存在した (Table 1-8、Figure 1-29)。この中で全ての logratio で値が 1 以上になったものは、No. 24 (e_gw1.23.378.1)、29 (e_gw1.28.108.1)、69 (estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_360286) の 3 つが

存在した。しかしアノテーション結果より、No. 24 と 29 は multicopper oxidases、No. 69 は peroxidase/oxygenase と予想されており、目的としている phytol 水酸化酵素ではないと考えられる。

Table 1-8. *P. capsici* における酸化酵素候補遺伝子の発現量比

No.	gene name	logratio (S2/S1)	logratio (S0/S1)	logratio (S2/S0)
1	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_700091	0.41	0.59	-0.24
2	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_27_#_156	-0.72	-0.76	-0.01
3	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_29_#_35	Inf*	NaN**	Inf*
4	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_31_#_76	-0.73	0.65	-1.44
5	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_52_#_16	-1.23	-1.68	0.39
6	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_60_#_12	-0.28	-0.36	0.02
7	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_72_#_46	0.09	0.10	-0.07
8	fgenesh1_pm.PHYCAscaffold_82_#_24	0.82	-0.58	1.35
9	fgenesh1_pg.PHYCAscaffold_4_#_212	-2.43	-2.66	0.18
10	fgenesh1_pg.PHYCAscaffold_10_#_29	-2.36	-2.11	-0.31
11	fgenesh1_pg.PHYCAscaffold_25_#_87	-0.52	-0.41	-0.17
12	gw1.1.14.1	-2.25	-2.03	-0.28
13	gw1.382.1.1	0.68	0.62	0.00
14	gw1.77.153.1	-1.02	-1.26	0.18
15	e_gw1.2.748.1	3.28	3.11	0.11
16	e_gw1.4.581.1	1.84	1.20	0.59
17	e_gw1.5.389.1	-0.83	-1.08	0.19
18	e_gw1.13.519.1	1.40	-0.57	1.91
19	e_gw1.13.545.1	1.13	0.08	0.99
20	e_gw1.14.179.1	0.67	0.02	0.59
21	e_gw1.14.173.1	0.26	0.34	-0.15
22	e_gw1.17.16.1	1.15	0.93	0.16
23	e_gw1.18.675.1	-0.68	0.08	-0.82
24	e_gw1.23.378.1	3.76	1.99	1.71
25	e_gw1.25.637.1	0.51	0.27	0.18

26	e_gw1.25.164.1	-0.49	-1.14	0.59
27	e_gw1.27.177.1	1.78	1.35	0.36
28	e_gw1.28.153.1	2.50	4.00	-1.56
29	e_gw1.28.108.1	3.23	1.32	1.84
30	e_gw1.28.124.1	5.11	4.07	0.98
31	e_gw1.34.184.1	1.11	0.91	0.14
32	e_gw1.36.506.1	-0.60	0.44	-1.09
33	e_gw1.36.172.1	3.12	0.79	2.27
34	e_gw1.37.46.1	-0.48	-0.69	0.15
35	e_gw1.60.195.1	0.62	0.56	0.00
36	e_gw1.61.218.1	-2.49	-1.56	-0.99
37	e_gw1.66.62.1	1.34	0.56	0.72
38	e_gw1.94.12.1	-0.47	-0.21	-0.31
39	e_gw1.94.57.1	0.55	0.30	0.19
40	e_gw1.99.70.1	0.52	0.51	-0.05
41	e_gw1.112.19.1	-1.12	-1.39	0.22
42	e_gw1.118.10.1	-0.14	0.04	-0.24
43	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_2_#_154_#_gi 189084469 gb B T031985.1	-1.36	0.27	-1.69
44	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_3_#_159_#_Contig624.1	-0.52	-0.48	-0.10
45	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_4_#_80_#_gi 189084024 gb BT 031540.1	0.63	0.15	0.42
46	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_4_#_251_#_gi 189084849 gb B T032380.1	-0.74	-0.48	-0.32
47	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_4_#_253_#_4101534:1	0.02	-0.37	0.32
48	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_4_#_266_#_Contig7.1	0.83	0.10	0.68
49	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_9_#_89_#_Contig1309.1	NaN**	NaN**	0.00
50	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_10_#_50_#_4101945:248	0.57	1.09	-0.59
51	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_13_#_8_#_Contig2902.1	-0.57	-0.63	0.00
52	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_18_#_87_#_4097447:1	-0.33	-1.01	0.61
53	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_33_#_17_#_gi 189084583 gb B T032099.1	-0.74	-0.82	0.01
54	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_34_#_57_#_Contig1043.1	NaN**	NaN**	0.00
55	fgenes2_kg.PHYCAscaffold_58_#_49_#_Contig1541.1	-0.18	0.07	-0.32

56	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_71_#_31_#_Contig2472.1	0.28	-0.31	0.53
57	fgenesh2_kg.PHYCAscaffold_94_#_3_#_4100822:1	0.14	0.02	0.06
58	estExt2_fgenesh1_pm.C_PHYCAscaffold_10159	-1.70	-1.63	-0.14
59	estExt2_fgenesh1_pm.C_PHYCAscaffold_50210	0.06	0.49	-0.49
60	estExt2_fgenesh1_pm.C_PHYCAscaffold_140048	-0.46	-0.12	-0.40
61	estExt2_fgenesh1_pg.C_PHYCAscaffold_650056	0.31	-0.18	0.43
62	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_20791	-0.23	-0.77	0.48
63	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_140016	1.58	0.76	0.75
64	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_170368	0.23	-0.39	0.55
65	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_170411	-0.08	-0.42	0.28
66	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_270253	2.92	3.39	-0.54
67	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_290110	Inf*	Inf*	-0.82
68	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_330151	0.01	0.24	-0.29
69	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_360286	5.43	4.00	1.37
70	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_550220	-0.46	-0.99	0.47
71	estExt2_Genewise1Plus.C_PHYCAscaffold_600071	-7.33	-7.89	0.50
72	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_10126	0.09	-0.02	0.05
73	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_140261	0.10	-0.26	0.30
74	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_170345	NaN**	NaN**	0.00
75	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_190431	0.88	1.14	-0.32
76	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_220534	1.67	1.02	0.58
77	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_290021	-0.58	-0.87	0.23
78	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_340188	0.56	0.16	0.35
79	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_400305	-0.65	-0.70	-0.02
80	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_700091	0.41	0.59	-0.24
81	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_840036	-2.79	-4.03	1.18
82	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_840038	-1.51	-1.74	0.16
83	estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_1120048	-4.31	-2.89	-1.48

S0: *P.capsici* NBRC 8386 (+NP), S1: *P. capsici* NBRC 31402, S2: *P. capsici* NBRC 8386
logratio: $\log_2(\text{case/control})$, *infinity, **Not a number

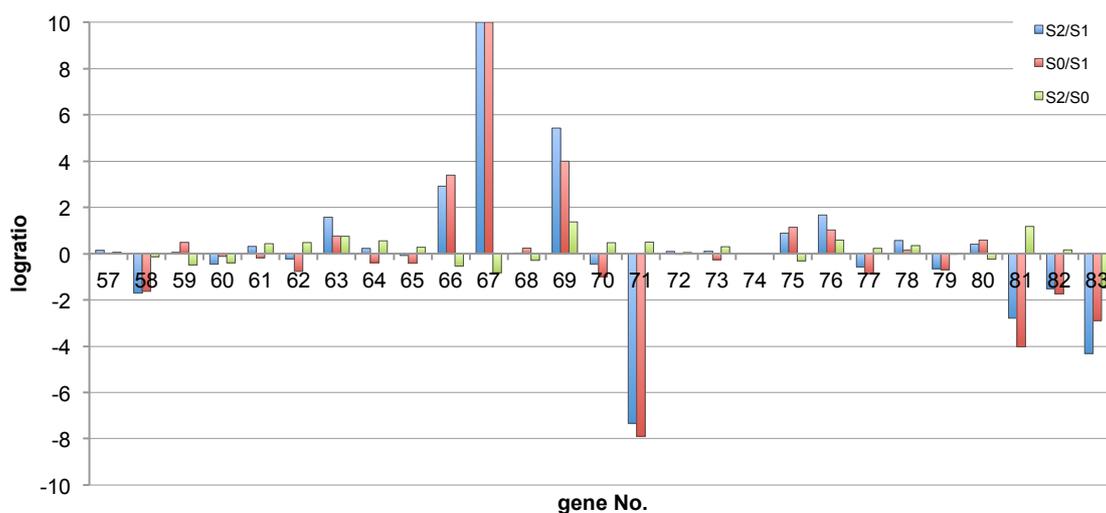
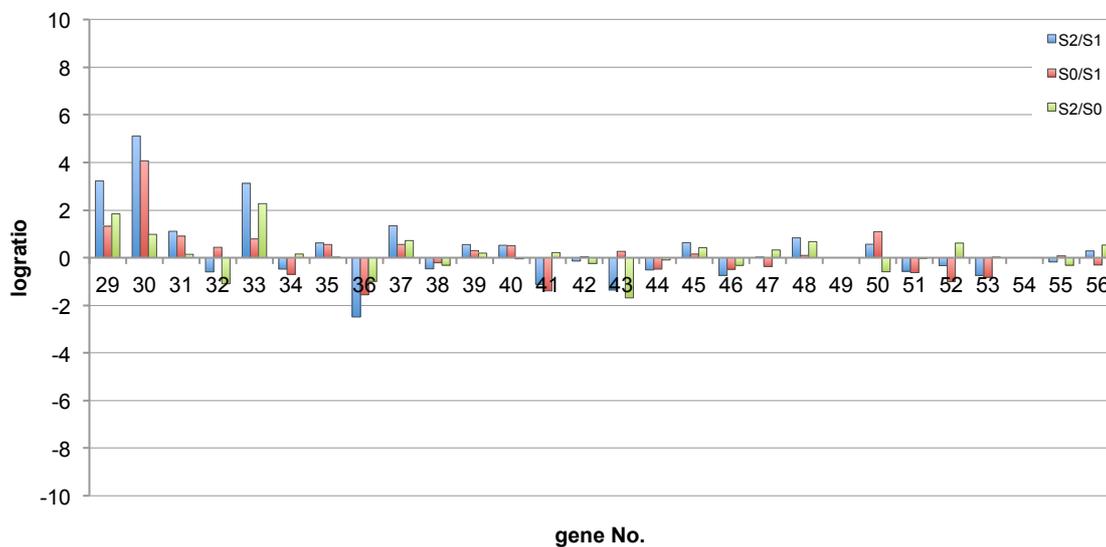
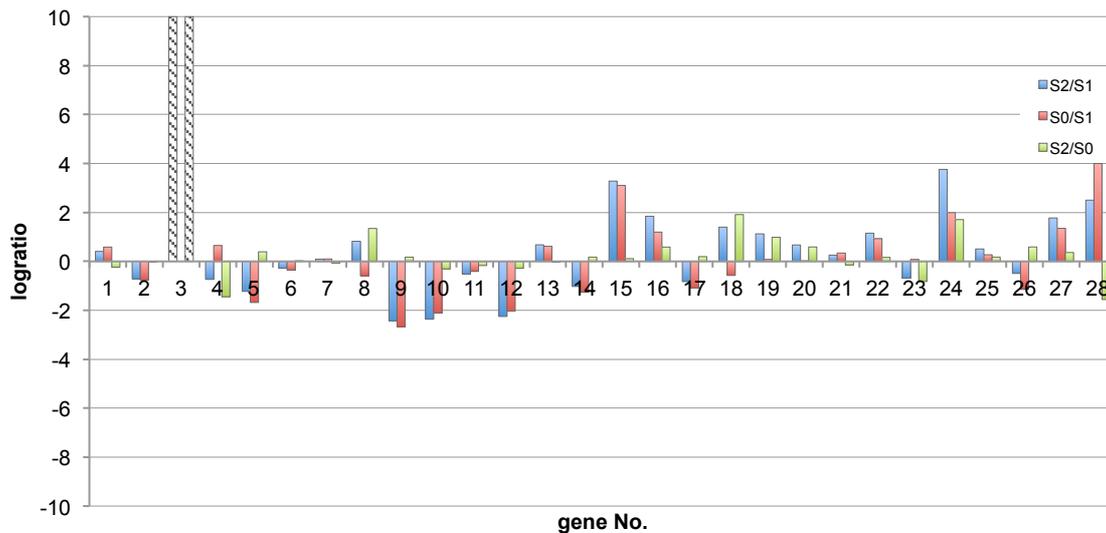


Figure 1-29. 酸化酵素候補遺伝子の発現量比

No. は Table 1-8 とリンクしている。Inf は斜めの塗りつぶし、NaN は 0 で表した。

(3) *P. nicotianae* の交配ホルモン生合成酵素候補遺伝子の探索

交配ホルモンが *Phytophthora* 属間で普遍的に働くことから、交配ホルモン生合成経路およびその生合成酵素は保存されていると言える。したがって *P. nicotianae* の $\alpha 2$ 生合成酵素は *P. capsici* で見つかった $\alpha 2$ 生合成酵素遺伝子と相同性を有すると考えられる。したがって参照ゲノム情報をデータベースとし、 $\alpha 2$ 生合成酵素候補の3配列 (No. 10 (e_gw1.6.785.1)、16 (e_gw1.55.136.1)、17 (e_gw1.55.146.1)) をクエリとした Local BLAST^{15,16} を行うことでその候補を探索した。

P. nicotianae には 11,743 個の遺伝子が存在しており、BLAST 検索の結果、No. 10、gene No. 16、gene No. 17 と相同性を示した配列はそれぞれ 32 個、33 個、31 個存在した。これら全てについて blastp 検索を行った結果を以下の Table 1-9~11 に示した。

Table 1-9. *P. capsici* No. 10 遺伝子と相同性を示す配列

No.	ID	Description	Organism	E value	Logratio
1	10010024	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.89
2	10001766	Cytochrome P450 86B1	<i>P. nicotianae</i>	0	2.64
3	10003472	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.80
4	10000279	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.75
5	10010824	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.49
6	10008399	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.99
7	10009396	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	0	-1.70
8	10006161	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	6.93
9	10001159	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	2.00
10	10005742	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	-0.50
11	10000832	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	2.84
12	10005740	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	0.79
13	10011488	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	0	0.57
14	10007162	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.04
15	10008402	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	3.00E-161	1.27

16	10001736	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.32
17	10010025	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.11
18	10000045	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	1.00E-115	0.00
19	10011487	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	4.00E-159	-0.65
20	10008094	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	1.14
21	10005892	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.74
22	10000087	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	2.00E-141	0.00
23	10002681	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	5.00E-76	0.19
24	10003470	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	8.00E-49	0.28
25	10000349	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	4.00E-70	-0.23
26	10009035	hypothetical protein AM587_10013759	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.07
27	10003902	hypothetical protein AM588_10003902	<i>P. nicotianae</i>	0	-1.63
28	10005848	hypothetical protein PPTG_05269	<i>P. parasitica</i> INRA-310	0	0.17
29	10008643	L-aspartate oxidase	<i>P. parasitica</i> INRA-310	0	-0.11
30	10000266	hypothetical protein AM587_10002336	<i>P. nicotianae</i>	3.00E-121	0.00
31	10009218	Translation initiation factor IF-2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.00
32	10008925	ABC transporter A family member 1	<i>P. nicotianae</i>	0	1.10

S1: *P. nicotianae* ATCC 38607, S2: *P. nicotianae* NBRC 33193, logratio: $\log_2(S2/S1)$

ID は全て数字の前に HJI_GLEAN_が付く。

Table 1-10. *P. capsici* No. 16 遺伝子と相同性を示す配列

No.	ID	Description	Organism	E value	logratio
1	10008399	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.99
2	10008402	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	2.00E-161	1.27
3	10010824	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.49
4	10011488	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	0	0.57
5	10001159	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	2.00
6	10007162	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.04
7	10010024	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.89
8	10001766	Cytochrome P450 86B1	<i>P. nicotianae</i>	0	2.64
9	10003472	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.80
10	10006161	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	6.93
11	10009396	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	0	-1.70

12	10000832	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	2.84
13	10005742	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	-0.50
14	10005740	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	0.79
15	10000279	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.75
16	10001736	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.32
17	10011487	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	3.00E-159	-0.65
18	10008094	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	1.14
19	10005892	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.74
20	10010025	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.11
21	10000045	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	9.00E-116	0.00
22	10000349	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	4.00E-70	-0.23
23	10002681	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	4.00E-76	0.19
24	10000087	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	1.00E-141	0.00
25	10003470	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	7.00E-49	0.28
26	10008133	hypothetical protein AM587_10010391	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.11
27	10004025	hypothetical protein PPTG_14748	<i>P. parasitica</i> INRA-310	0	-0.11
28	10005912	hypothetical protein L917_10756, partial	<i>P. parasitica</i>	0	-0.30
29	10009319	hypothetical protein AM588_10009319	<i>P. nicotianae</i>	0	0.33
30	10003374	Arrestin domain-containing protein A	<i>P. nicotianae</i>	0	1.11
31	10004715	ABC transporter G family member 29	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.89
32	10008280	Intraflagellar Transport Protein 72/74	<i>P. nicotianae</i>	0	0.25
33	10006129	hypothetical protein F442_16557	<i>P. parasitica</i> P10297	0	2.69

S1: *P. nicotianae* ATCC 38607, S2: *P. nicotianae* NBRC 33193, logratio: $\log_2(S2/S1)$

ID は全て数字の前に HJI_GLEAN_が付く。

Table 1-11. *P. capsici* No. 17 遺伝子と相同性を示す配列

No.	ID	Description	Organism	E value	logratio
1	10008399	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.99
2	10010824	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.49
3	10008402	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	3.00E-161	1.27
4	10007162	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.04
5	10010024	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.89
6	10001766	Cytochrome P450 86B1	<i>P. nicotianae</i>	0	2.64

7	10001159	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	2.00
8	10003472	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.80
9	10011488	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	0	0.57
10	10009396	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	0	-1.70
11	10006161	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	6.93
12	10000832	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	2.84
13	10005740	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	0.79
14	10005742	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	0	-0.50
15	10000279	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.75
16	10001736	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.32
17	10011487	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	4.00E-159	-0.65
18	10008094	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	1.14
19	10005892	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.74
20	10010025	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	0	0.11
21	10000045	Cytochrome P450 86A2	<i>P. nicotianae</i>	1.00E-115	0.00
22	10000349	Cytochrome P450	<i>P. nicotianae</i>	4.00E-70	-0.23
23	10000087	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	2.00E-141	0.00
24	10002681	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	5.00E-76	0.19
25	10003470	cytochrome P450, putative	<i>P. infestans</i> T30-4	8.00E-49	0.28
26	10008257	hypothetical protein AM588_10008257	<i>P. nicotianae</i>	0	0.70
27	10005712	hypothetical protein AM588_10005712	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.91
28	10004873	hypothetical protein AM588_10004873	<i>P. nicotianae</i>	0	0.00
29	10010987	TKL protein kinase	<i>P. parasitica</i>	0	-0.71
30	10007761	helicase	<i>P. nicotianae</i>	0	-0.57
31	10005534	hypothetical protein AM588_10005534	<i>P. nicotianae</i>	0	1.26

S1: *P. nicotianae* ATCC 38607, S2: *P. nicotianae* NBRC 33193, logratio: $\log_2(S2/S1)$

ID は全て数字の前に HJI_GLEAN_ が付く。

Table 1-9~11 に示す候補のうち、上位 25 個の logratio (S2/S1) をグラフ化したものが Figure 1-30 であるが、全てシトクローム P450 と推定されるものであった。したがってこの中に生合成酵素の候補が含まれると考えられる。これらのうち logratio (S2/S1) 値が 1 以上を示すものを $\alpha 2$ 生合成酵素候補とすると、No. 2、8、9、11、15、

20 の 6 個が *P. nicotianae* の α 2 生合成酵素候補となる。一方で発現量比は logratio (S2/S1)で表されているため、これが負の値であれば α 1 生合成酵素の可能性はある。生合成酵素候補のうち No. 7 のみが logratio 値-1.70 を示したため、これが *P. nicotianae* の α 1 生合成酵素候補であるかもしれない。

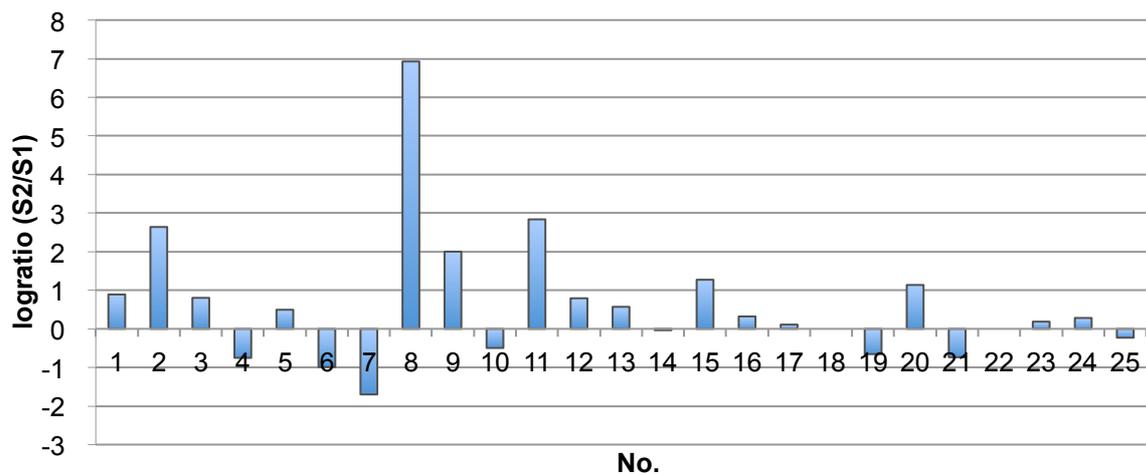


Figure 1-30. *P. nicotianae* の交配ホルモン生合成酵素候補の発現量比

No.は Table 1-9 とリンクしている。

S1: *P. nicotianae* ATCC 38607, S2: *P. nicotianae* NBRC 33193

2-4. 考察

交配ホルモン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ は *Phytophthora* 属疫病菌ヘテロタリック種の有性生殖を引き起こす必須因子である。それらの構造は長年不明であったが、15年もの歳月をかけ $\alpha 1$ が、ついで $\alpha 2$ の構造が解明され、それらは単純なジテルペンアルコールであった。その後、生合成経路、構造活性相関および普遍性が示され、疫病菌交配ホルモンの化学的基盤が整った。しかし交配ホルモンが「どのように合成されて、どのように作用するのか」というケミカルバイオロジー的課題が未解明である。当研究室では、「交配ホルモンがどのように作用するのか」すなわち交配ホルモンに特異的な受容体を蛍光プローブ、アフィニティー精製用プローブ、光親和性プローブを用いて探索しているが、未だ成功していない。一方で「どのように合成されるのか」すなわち交配ホルモンの生合成機構についての研究は全くの手つかずである。そこで本研究では、交配ホルモン生合成機構解明に向け、生化学的手法による生合成酵素の探索と分子生物学的手法 (RNA-seq) を用いた発現解析により生合成酵素候補遺伝子の探索を行った。

第一に疫病菌菌体からタンパク質を抽出し、生合成酵素の単離・同定を試みた。疫病菌交配ホルモンのうち、 $\alpha 2$ は phytol の 2ヶ所の炭素の水酸化により、 $\alpha 1$ は $\alpha 2$ のアリル位の酸化 (水酸化と二重結合のシフト) により生合成されると考えられる (Figure 1-5)。したがって生合成酵素はシトクローム P450だと予想し実験を進めた。疫病菌を含めた卵菌類のゲノムはすでに数種で解読されている¹⁷⁻²³。しかしながら卵菌類のシトクローム P450については研究が進んでおらず²⁴、シトクローム P450を疫病菌から生化学的に取得した報告はない。そこで疫病菌が藻類に近縁であることから、藻類からシトクローム P450を生化学的に取得した報告¹⁴を参考にした。ホルモン生産量が多い時に生合成酵素が多く存在すると考え、0.1% V8 ジュース液体培地で2日間培養した *P. nicotianae* ATCC 38606 からタンパクを抽出し、シトクローム P450の検

出に用いられる NADPH、glucose-6-phosphate (G-6-P) および G-6-P dehydrogenase 存在下で $\alpha 2$ 生合成酵素アッセイを行ったが、前駆体 phytol は $\alpha 2$ へ変換されなかった。そこでプロテアーゼインヒビターを加える方法、ホモジェナイズの程度を変えた方法など幾つかの条件検討を行ったが、4 °C のバッファー中で菌体を弱く潰しただけでも活性が完全に失われたため、 $\alpha 2$ 生合成酵素は非常に不安定であると考えられる。一方 $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイでは、 $\alpha 2$ 生合成酵素の場合と同様の方法を用いて $\alpha 2$ から $\alpha 1$ への変換に成功した。この結果から、少なくとも $\alpha 1$ 生合成酵素はシトクローム P450 の可能性が高いと考えられる。しかしその変換効率は非常に低く、 $\alpha 1$ 生産量が多い菌株を用いても改善されなかった。さらにシトクローム P450 は膜タンパク質であるため、精製には界面活性剤を使って可溶化する必要があるが、界面活性剤をアッセイ系に加えると $\alpha 1$ は生産されなくなった。以上の点から、交配ホルモン生合成酵素を粗タンパクから精製することは非常に困難であると判断し、生化学的手法は諦め RNA-seq 解析による発現解析から生合成酵素を探索する方法に切り替えた。上述したように $\alpha 2$ は phytol の 2 ヶ所が水酸化された構造を持つ。しかしこの水酸化機構は不明であったが、Milli-Q 水培養物を LC/MS 分析したところ水酸基が 1 つずつ導入された phytol モノ水酸化物と同等の分子量 (m/z 335) を持つピークが検出されたため (Figure 1-9)、phytol は 1 ヶ所ずつ 2 段階で水酸化される可能性が示唆された。シトクローム P450 は基質特異性が高い酵素であることから、 $\alpha 2$ 生合成酵素は少なくとも 2 つ存在するという有益なデータを得ることができた。しかしながら phytol モノ水酸化物を実際に単離し構造解析していないため、今後の課題の 1 つである。また生産された $\alpha 2$ 量から概算するとこの 2 つの phytol モノ水酸化物は含有量が少ないことから、phytol モノ水酸化物から $\alpha 2$ への生合成は迅速に進むと推定される。2 段階で生合成が進行することを証明するために、重水素などでラベル化された phytol モノ水酸化物の

取り込み実験を行い、実際に $\alpha 2$ へ変換されるか、すなわち $\alpha 2$ の前駆体であるか確認することも今後の課題と言える。

第二に交配ホルモン生産に影響を与える因子の検討を行ったところ興味深い結果が得られた。従来 A1 交配型は $\alpha 1$ を生産すると定義されており、本研究でも実際に $\alpha 2$ から $\alpha 1$ を生産した (Figure 1-16)。一方、A2 交配型は $\alpha 2$ を生産すると定義されているにもかかわらず、実際は $\alpha 2$ のみを生産する株、 $\alpha 2$ と $\alpha 1$ を生産する株、 $\alpha 1$ のみを生産する株の3タイプ存在した (Figure 1-17)。1週間のホルモン生産量の経時変化を確認したところ、最も交配ホルモンが生産される培養日数は2~7日と菌株ごとに異なり、必ずしも培養日数に比例してホルモンが生産されるわけではなかった。したがって交配ホルモン生産量を調べることは、ホルモン生合成酵素の最大発現に最適な培養日数を知るための有益な手法であると言える。またホルモン生産量も菌株ごとに異なり、交配ホルモンの生産パターンは交配型だけでなく、菌株ごとに多様であることが明らかとなった。さらに今回使用した菌株の多くは培養開始7日後より早く最大ホルモン生産量を迎え、その後培地中のホルモン量が減少する傾向が見られた。この原因としては、疫病菌が放出した交配ホルモンを自身で代謝している可能性や、交配ホルモンが脂溶性であることからプラスチック壁に吸着した可能性が考えられるが、本研究では確認していないため原因は不明である。さらに興味深いことに、この多様なホルモン生産パターンは培地の種類の影響を受けることがわかった (Figure 1-19)。特に V8 ジュース中でのみ交配ホルモンを生産する株が存在したため、V8 ジュース中の成分のホルモン生産への影響を調べたところ、ホルモン生産促進作用は栄養成分が除かれた低極性画分に見られた (Figure 1-20)。本研究では、促進作用を示す本体は同定できていないが、この結果は将来交配ホルモン生合成機構に関する研究を行う際に、生合成酵素の発現量を調節した菌体を取得することが可能であることを示した。

第三に、培養条件を検討し RNA-seq 解析を行った。ホルモン生合成酵素はシトクローム P450 であると仮定し、参照ゲノムに存在するシトクローム P450 候補遺伝子を探索対象にした。*P. capsici* のゲノムには 34 個の推定 P450 遺伝子が存在し、発現量比から 3 つの $\alpha 2$ 生合成酵素候補遺伝子を絞り込むことができたが、 $\alpha 1$ 生合成酵素遺伝子を絞り込むことはできなかった。*P. nicotianae* については、*P. capsici* で絞り込んだ 3 つの候補と相同性を示す配列をゲノムから Local BLAST 検索で探索し、発現量比から 6 個の $\alpha 2$ 生合成酵素候補遺伝子、1 個の $\alpha 1$ 生合成酵素候補遺伝子を絞り込むことができた。しかし、受容体探索用菌体と同時に RNA-seq を行ったため、一度に解析できるサンプル数が減ってしまいバイオリジカルデュープリケイトがない状態で解析を行ったため、データの信憑性が低くなってしまった。そのため、再度サンプル数を増やして RNA-seq 解析を行う必要があるかもしれない。発現解析は同株間で比較した場合に最も効率的に生合成酵素が探索できるため、両ホルモン生産株である *P. capsici* NBRC 8386 株の生合成酵素の発現量を調節することが最も有効であると考えたが、Czapek-Dox 培地では $\alpha 2$ 生合成酵素の発現量は調節できたものの、 $\alpha 1$ 生合成酵素の発現量を調節することはできなかった。そのため *P. capsici* の $\alpha 1$ 生合成酵素の候補を絞り込むことができなかった。しかし、*P. capsici* NBRC 8386 のホルモン生産量に対する V8 成分の影響を調べたところ、菌体あたりのホルモン生産量は水のみで培養した場合は $\alpha 2$ 生産量が $\alpha 1$ 生産量より多く、ここに V8 の低極性成分を添加することで生産量は逆転した (Figure 1-24c)。つまりこの条件で培養した菌糸から RNA を抽出して解析を行えば、より容易に両ホルモンの生合成酵素候補を絞り込むことができたかもしれない。今回の発現解析で *P. capsici* の $\alpha 2$ 生合成酵素候補が 3 つ、*P. nicotianae* の $\alpha 2$ 生合成酵素候補が 6 つ、*P. nicotianae* の $\alpha 1$ 生合成酵素候補が 1 つ見つけたが、これらはシトクローム P450 であると推定されたにすぎないため、これ

ら酵素を大腸菌をはじめとした最適な発現系で異種発現させることで機能を証明することが今後の大きな課題である。

2-5. 結論

植物疫病菌 (*Phytophthora* 属糸状菌) は、世界三大植物病害の1つの原因菌として知られ、ジャガイモなどの重要農作物に感染し甚大な被害を与える。疫病菌は有性生殖により急速な変異 (薬剤耐性化や悪性化) を起こすため、有性生殖のメカニズムの分子レベルでの解明は、疫病菌防除に繋がる重要な課題と言える。ヘテロタリック種疫病菌の有性生殖は交配ホルモン $\alpha 1$ と $\alpha 2$ を認識することで開始され、これまでに両ホルモンの構造、生合成前駆体、構造活性相関などの化学的基盤が整った。しかしその生理的意義や生合成機構などケミカルバイオロジー的課題が未解明である。そこで本研究では未だ手つかずで学術的知見が得られていない交配ホルモン生合成機構解明に向けた基盤研究を行い、交配ホルモン生合成機構解明の足がかりとした。

第一に、生化学的手法を用いて生合成酵素の単離を試みた。交配ホルモン生合成酵素はその生合成経路からシトクローム P450 と予想されるため、シトクローム P450 を単離した報告を参考に実験を行ったが、A2 交配型を用いた $\alpha 2$ 生合成酵素アッセイでは、phytol から $\alpha 2$ への変換を検出することができなかった。一方で A1 交配型を用いた $\alpha 1$ 生合成酵素アッセイでは、低効率ながら $\alpha 2$ を $\alpha 1$ へ in vitro で変換することに初めて成功した。また phytol 水酸化機構を解析した結果、phytol モノ水酸化物が2種類検出され、水酸化は2段階で起こることが初めて明らかとなった。この結果から、 $\alpha 2$ 生合成酵素は少なくとも2種類存在することが示唆された。

第二に交配ホルモン生産に影響を与える因子の検討を行った。従来 A1 交配型は $\alpha 1$ を生産すると定義されており、実際に $\alpha 2$ から $\alpha 1$ を生産した。一方 A2 交配型は $\alpha 2$ を生産すると定義されているにもかかわらず、実際は3タイプ ($\alpha 2$ のみ、 $\alpha 1$ のみ、両方) 存在した。20% V8 ジュース液体培地での1週間のホルモン生産量の経時変化を確認したところ、ホルモン生産量が最大となるのは培養開始後2~7日と菌株ごとに

異なった。またホルモン生産量も菌株ごとに異なり、交配ホルモンの生産パターンは交配型だけでなく、菌株ごとに多様であることが初めて明らかとなった。さらに興味深いことに、この多様なホルモン生産パターンは培地の種類の影響を受けることがわかった。V8 ジュース中でのみ交配ホルモンを生産する株が存在したため、V8 ジュース中の成分の影響を調べたところ、ホルモン生産促進作用は低極性画分のみに見られた。これらの結果から、RNA-seq 解析用に生合成酵素の発現量を調節した菌体を取得することが可能であることを示すことができた。

第三に、適切な培養条件で得た 2 種 5 株の菌体の RNA-seq 解析を行い、交配ホルモン生合成酵素をシトクローム P450 と仮定することで、*P. capsici* の $\alpha 2$ 生合成酵素候補を 3 つ、*P. nicotianae* の $\alpha 2$ 生合成酵素候補を 6 つ、*P. nicotianae* の $\alpha 1$ 生合成酵素候補を 1 つに絞り込むことに成功した。今後は異種発現系を用いてこれら酵素の機能解析を行い、生合成酵素であることを証明することが課題である。

農薬に耐性を持った疫病菌の出現など疫病菌の変異しやすさは有性生殖に強く依存すると考えられている。したがって、本研究の成果を足がかりに生合成機構が解明されれば、変異を対象とした疫病菌予防方法や生合成酵素を対象にした農薬の開発につながると期待できる。

第3章 実験の部

3-1. 基本操作

LC-ESI-IT-MS は、Agilent 1200 HPLC system (Hewlett Packard) をつないだ HCTplus mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) を用いて陽イオンモードで測定した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は Cadenza CD-C18 カラム (2.0 i.d. × 75 mm, Imtakt, Kyoto, Japan) を用いた。移動相は、 α 1 分析では 34 % MeCN、 α 2 分析では 45% MeCN を用い、流速 0.2 mL/min で行った。 α 1 および α 2 は m/z 367.2 $[M+Na]^+$ および m/z 351.2 $[M+Na]^+$ でおよそ 6.7 min および 6.4 min にそれぞれ検出された。

1H NMR スペクトルは、Avance 400 (400 MHz) (Bruker BioSpin, Yokohama, Japan) で測定した。重溶媒は $CDCl_3$ を使用した。

菌体の保存は冷凍機付インキュベーターMIR-254S (Panasonic) 中で、寒天培養は恒温器 KCL-2000 (EYELA)、液体培養は低温恒温槽付回転式振とう培養機 TB-98RS (高崎科学器械) を用いて行った。

LC/MS 測定用のサンプルの前処理は全章で共通して ODS カートリッジ [TOYOPAK ODS-S (90 mg ODS); Tosoh, Tokyo, Japan] を用いた。

RNA の品質確認は NanoDrop ND-1000 を用いて行った。

3-2. 使用した菌株

本研究で用いた菌株は、American Type Culture Collection (ATCC) あるいは独立行政法人製品評価技術基盤機構生物資源部門 (NBRC) から購入した。使用した菌株は以下の Table 1-12 にまとめた。

Table 1-12. 本研究で用いた疫病菌株

種	株	交配型	ホルモン生産量 (μg/L)	
			α1	α2
<i>P. capsici</i>	NBRC 8386	A2	26.7	24.2
	NBRC 30698	A2	34.8	0.4
	NBRC 31402	A1	0	0
<i>P. cinnamomi</i>	NBRC 33180	A1	10.2	0
	NBRC 33181	A1,A2	29	0.6
<i>P. cryptogea</i>	NBRC 32326	A2	65.3	0
	ATCC 38606	A2	2.1	16.8
<i>P. nicotianae</i>	ATCC 38607	A1	1.1	0
	NBRC 33190	A2	0	23.6
	NBRC 33192	A2	0.4	19.4

3-3. 菌株の継代と保存

菌体の継代および保存には 20% V8 野菜ジュース寒天培地 (V8 野菜ジュース 200 mL、CaCO₃ 3 g、寒天 20 g、脱イオン水 800 mL) を用いた。三角フラスコに CaCO₃、寒天および脱イオン水を入れ電子レンジで加熱して溶解した後、V8 野菜ジュースを加え再度加熱した。スターラーバーで攪拌させながら試験管 (φ18 x 180 mm) に 10 mL ずつ分注し、シリコ栓をして 121 °C で 15 分間オートクレーブ滅菌した後、試験管を傾けながら常温で放冷し斜面培地を作製した。クリーンベンチ内で斜面培地の中央に保存用菌株を白金線で接種し、25 °C、暗黒下、湿度 60% で 7 日間 (*P. capsici* NBRC 8386 は 10 日間) 培養した。その後 15 °C、暗黒下で保存した。菌株の継代は 3 ヶ月に 1 回以上行った。

3-4. 菌体の寒天培養

ビーカーに上記と同様の組成で 20% V8 野菜ジュース寒天培地を作製し、クリーン

ベンチ内でシャーレ (BIO-BIK) に 20 mL ずつ分注し、寒天培地を作製した。培地の中央に保存用菌株を白金線で接種し、25 °C、暗黒下、湿度 60% で 7 日間 (*P. capsici* NBRC 8386 は 10 日間) 培養した。

3-5. 菌体の液体培養

200 mL の三角フラスコに各種 V8 野菜ジュース液体培地 (V8 野菜ジュース、脱イオン水) あるいは Czapek-Dox 液体培地 [NaNO₃ 3 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g、スクロース 30 g (1 L 脱イオン水中)] を 200 mL 加え 121 °C で 15 分間オートクレーブ滅菌した後、室温まで放冷した。クリーンベンチ内で交配ホルモン前駆体 [phytol 200 µg/200 µL あるいはα2 10 µg/200 µL (ともに EtOH に溶解)] を加えた。寒天培地上に生育したコロニーの成長先端をスパチュラで 1 cm 角に 2 枚切り出し、これを液体培地に摂取 (1 枚/100 mL) したのち暗黒下で 27 °C、80 rpm で振盪培養した。

3-6. Phytol モノ水酸化物の探索

Phytol を添加した Milli-Q 水 200mL 中で *P. nicotianae* ATCC 38606 を 1 週間振盪培養した。吸引ろ過でろ液を回収し、100 mL の EtOAc で 3 回抽出した。濃縮後、800 µL の MeCN でサンプルを溶解し、200 µL の Milli-Q 水を加え 1 mL の 80% MeCN 溶液とした。ODS カートリッジ (TOYOPAK ODS-S) を 500 µL の MeCN で 2 回洗浄後 1 mL の 80% MeCN で置換し、そこにサンプル溶液を全量アプライした。1.5 mL の 80% MeCN で溶出させ、2.5 mL の 80% MeCN サンプル溶液を得た。得られたサンプル溶液 5 µL (400 µL 培地相当) を Agilent 1200 HPLC system (Hewlett Packard) をつないだ HCTplus mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) に注入し、phytol モ

ノ水酸化物の分子量である m/z 335 $[M+Na]^+$ を抽出した。HPLC は Cadenza CD-C18 カラム (ϕ 2.0 \times 75 mm, Imtakt) を用い、流速は 0.2 mL/min、移動相は 0–7 min は 45% MeCN、7–30 min は 45–100% MeCN (23 min) のグラジエントを使用した。MS は陽イオンモードで測定した。

3-7. Phytol の精製

Phytol (wako) 132.2 mg をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー [HI-FLASHTM silica gel column (size M, 14 g, Yamazen Co., Osaka, Japan)、0–50% (50 min) EtOAc in hexane、流速 6 mL/min] で分離し、50 フラクションを得た。分離前の phytol と得られたフラクションを TLC (hexane-EtOAc 5-1) で比較したところ (Figure 1-31)、フラクション 17–19 に phytol が含まれていたため、これらを合わせて濃縮し純粋な phytol (74.8 mg) を得た。

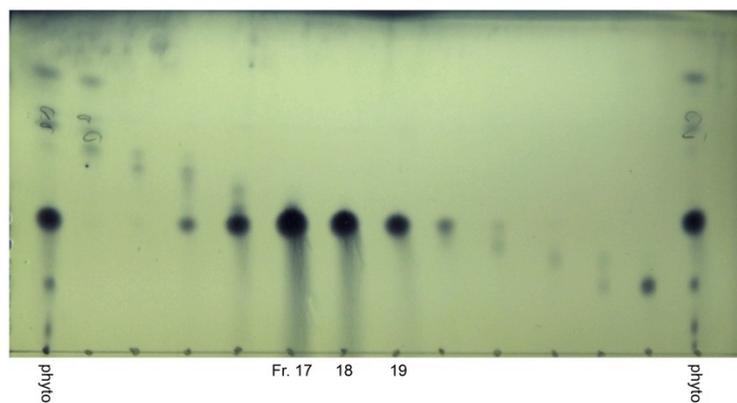


Figure 1-31. phytol と分離したフラクションの TLC

3-8. 二段階培養による α 2 合成酵素の活性保持時間の検討

Phytol を添加した 0.1 % V8 ジュース液体培地 200 mL に寒天培地上に生育した *P. nicotianae* ATCC 38606 を 8 枚 (0.5 cm 角) 接種した。1–3 日間振盪培養したのち、1

日ごとの $\alpha 2$ 生産量を測定した。生育した菌体は、1日ごとに4枚ずつ新鮮な0.1% V8 ジュース 10 mL (50 mL ファルコンチューブ中) に再接種し、120 rpm、27 °Cで1~2日間振盪培養したのち、上清中に含まれる $\alpha 2$ をLC/MSで定量した。

3-9. $\alpha 2$ 生合成酵素アッセイ

0.1% V8 ジュース液体培地 1 L で2日間振盪培養した *P. nicotianae* ATCC 38606 の菌糸をミラクロスで回収し、回収した菌体は脱イオン水でよく洗浄し、吸引ろ過で回収した。回収した菌糸 (60 mg, wet) を液体窒素で瞬間凍結し、液体窒素で冷却した乳鉢と乳棒で粉碎した。粉末状になった菌体を 15 mL のファルコンチューブに入れ、ここに抽出バッファー (50 mM phosphate buffer, 20%(w/v) glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.0) を 1 mL を加え、氷上で POLYTRON-Aggregate PT-DA 1207/2EC (KINEMATICA AG, Luzern, Switzerland) でさらに5分間ホモジェナイズし粗タンパク液とした。500 μ L の粗タンパク液に EtOH に溶解した phytol (1 mg/mL) を 10 μ L (34 μ M) と 100 μ L の NADPH regenerating system (6.7 mM glucose-6-phosphate (G-6-P), 0.4 unit G-6-P dehydrogenase, 2 mM NADPH) を加え、180 rpm、25 °Cで17時間インキュベートした。反応液を 500 μ L の EtOAc を加えよくボルテックスしたのち、10,000 rpm で5分間遠心し上清を回収した。この操作を3回繰り返した。回収した上清を濃縮し、80% MeCN に溶解し ODS カートリッジで前処理した。得られた 80% MeCN サンプル溶液を10倍濃縮し、10 mL 培養液相当 (10 mL broth/5 μ L) を LC/MS に供し、含有される $\alpha 2$ を定量した。

3-10. $\alpha 1$ 産生アッセイ

200 mL の 1% V8 ジュース液体培地で2日間培養した *P. nicotianae* ATCC 38607 菌

体を 3-9 と同様の方法で回収し (155 mg、wet)、粗タンパク液を得た。粗タンパク液 500 μ L に EtOH に溶解した α 2 (1 mg/mL) を 1 μ L (3 μ M)、50 mM リン酸バッファ (pH 7.0) を 500 μ L、regenerating system を 100 μ L 添加し、180 rpm、25 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。反応液を 3-と同様の方法で処理し、2 mL 培養液相当 (2 mL broth/5 μ L) に含まれる α 1 を定量した。再現実験も同様の操作で行った。CHAPS は粗タンパク液に終濃度 0.5 % となるように粉末で加え、1 時間混和し膜タンパクを抽出しこれをアッセイに用いた。

P. cryptogea NBRC 32326 は、phytol 無添加の 20% V8 ジュースで 5 日間振盪培養した。培養液をミラクロスでろ過して菌糸を回収し、脱イオン水で洗浄後秤量した (540 mg、wet)。液体窒素下で菌糸を粉砕し、抽出バッファ 8.7 mL を加えて粗タンパク液を調製した。400 μ L (1 mL 培養液相当) の粗タンパク液に、 α 2 (3 μ M)、500 μ L の 50 mM リン酸バッファ (pH 7.0) および 100 μ L の regenerating system を添加し、120 rpm、4 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。反応液を EtOAc で抽出した後、ODS カートリッジで前処理し、50 μ L 培地相当 (50 μ L broth/5 μ L) を LC/MS に供し、 α 1 を定量した。

3-11. 交配ホルモン生産量の経時変化

液体培養は 3-5 と同様の方法で行った。培養液 5 mL を培養開始から 1 週間、1 日ごとにクリーンベンチ内で取り出した。取り出した培養液を 4,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清の pH を測定したのちに全量を直接 ODS カートリッジに吸着させた。ODS カートリッジは使用前に 500 μ L の MeCN で 2 回洗浄したのち、500 μ L の MilliQ 水を 2 回流し平衡化した。上清の吸着後、1.5 mL の MilliQ 水で洗浄し、2.5 mL の 80% MeCN で交配ホルモンを溶出させた。80% MeCN 溶出液は、2.5 mL の 20% MeCN で

希釈し、5 mL の 50% MeCN 溶液とした。この溶液を 5 μ L を LC/MS 分析し、 α 1、 α 2 を検出した。ホルモン生産量は標品の面積値 (α 1 : 50 pg、 α 2 : 100 pg) から算出した。

3-12. 培養後の菌体重量

1 週間液体培養した後、交配ホルモン定量用に 5 mL の培養液を抜き取った。残りの培養液を吸引ろ過し菌体を回収して Milli-Q 水で 2 回洗浄した。凍結乾燥後、菌体の乾燥重量を測定した。

3-13. V8 ジュースの分離

2 L の V8 ジュースを 7,000 g で 5 分間遠心分離し、上清と沈殿に分けた。上清と等量の Milli-Q 水を沈殿に加え、よくボルテックスしたのちに再度 7,000 g で 5 分間遠心分離し上清と沈殿に分けた。2 回の遠心で得られた上清を合わせ 50% V8 ジュース相当 (3.4 L) とし、ODS オープンカラム [Cosmosil 140C18-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), 1.2 kg, 10 (i.d.) \times 70 cm] に吸着させた。吸着中のフラクションは回収し、Milli-Q 水 (6 L) で溶出したフラクションと合わせたのち Milli-Q 水で 10 L (20% V8 ジュース相当) に希釈し、高極性成分 (P) とした。ODS 吸着成分は MeOH (6 L) および 50% MeOH in CHCl₃ (4 L) の順で溶出させ合わせて濃縮した。これをクロロホルム-H₂O で分配し、脂溶性画分を得た。2 回目の遠心分離で得られた沈殿は、EtOAc を加え常温で 2 時間攪拌し抽出した (500 mL、3 回)。抽出液を吸引ろ過し、濃縮することで V8 ジュース沈殿由来の EtOAc エキスを得た。最終的に両者を合わせて V8 ジュースの低吸着画分 (NP) とした。P はそのまま培地として用い、NP は EtOH に溶解し (200 mL V8 相当/mL)、20% V8 ジュース相当になるように培地に添加し使用した。

3-14. RNA-seq 用 total RNA の抽出

Table 1-3 に示した条件で各種疫病菌株を液体培養した。抽出は手袋およびマスクを着用して行った。また使用するデスクにはアルミ箔を敷き、器具のすべてを RNase 除去剤である RNase Quiet (nacalai tesque) で処理し RNase の混入に最善の注意を払った。使用した水はすべてピロ炭酸ジエチル (DEPC) 処理を行った。Milli Q 水に終濃度 0.1% となるように DEPC (SIGMA-ALDRICH) を加えて 2 時間室温で反応させ、121 °C で 15 分間オートクレーブ処理を 2 回行い放冷し DEPC 水を調製した。使用した 1.5 mL、5 mL エッペンチューブ (BIO-BIK) は RNase free のものを使用した。液体培養後の培養液をミラクロスでろ過し菌体を回収した。回収した菌体は寒天を取り除き DEPC 水で 2 回洗浄した。菌体をよく絞り、1.5 mL のエッペンチューブに入れ湿重量を測定し、そのまま液体窒素で凍結させた。この菌体を液体窒素で冷却した乳鉢、乳棒を使用して、融解しないよう液体窒素を加えながら粉末状になるまで磨砕した。その後、菌体 50 mg あたり 1 mL を目安に RNAiso Plus (TaKaRa) を 5 mL エッペンチューブに分注し、そこに磨砕した菌体を加えよくふり混ぜた。室温で 5 分間放置した後、12,000 g、4 °C で 5 分間遠心分離し、上清を新しい 5 mL エッペンチューブに移した。ここに使用した RNAiso Plus の 0.2 倍量のクロロホルムを加え、乳白状になるまでよく振り混ぜた。室温で 5 分間放置し、12,000 g、4 °C で 15 分間遠心し、上層 (RNA を含む水層) を中間層に触れないように新しい 5 mL エッペンチューブに移した。ここに使用した RNAiso Plus の 0.5 倍量のイソプロパノールを加えてよく混和し、室温で 10 分間静置したのちに 12,000 g、4 °C で 10 分間遠心し RNA を沈殿させた。上清を捨て、用いた RNAiso Plus と等量の 75% 冷エタノール (DEPC 水で調製) を加え、ボルテックス後 7,500 g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を捨て RNA を洗浄した。エッペンチューブのフタを開けて室温で 5 分間乾燥させ、100 µL の DEPC 水

に溶解させ total RNA 抽出液とした。抽出液 2 μL を NanoDrop ND-1000 で測定し、濃度と A260/A280、A260/A230 を確認した (Table 1-13)。

Table 1-13. DNase 処理前の RNA の品質

Sample	ng/ μL	260/280	260/230
<i>P. capsici</i> NBRC 31402	476.97	2.17	2.31
<i>P. capsici</i> NBRC 8386 (+NP)	525.79	2.16	1.36
<i>P. capsici</i> NBRC 8386	401.15	2.11	1.21
<i>P. nicotianae</i> NBRC 33193	492.95	1.96	1.01
<i>P. nicotianae</i> ATCC 38607	362.52	1.92	1.07

抽出した RNA には DNA が混入しているため Recombinant DNase I (RNase-free、TaKaRa) で処理し、DNA を除去した。方法はプロトコルに従った。まず、反応液 (Table 1-14) を 1.5 mL エッペンチューブに調製した。加える RNA 溶液の量は Table 1-13 の濃度から算出し、反応液中に RNA 量が 40~100 μg となるにした。用いた試薬はすべて DEPC 水で調製した。

Table 1-14. DNase 処理の反応液の組成

RNA 抽出液	全 RNA 40~100 μg 相当
10x DNase I buffer	10 μL
Recombinant DNase I	4 μL
DEPC 水	100 μL にメスアップ

反応液を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートしたのち、0.5 M EDTA (pH 8.0) を 5 μL 加えて 80 $^{\circ}\text{C}$ でさらに 2 分間インキュベートした。そこに 3 M 酢酸ナトリウム 20 μL と冷エタノール 500 μL を加えて -80 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間静置したのち、12,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心し、沈殿を回収した。70% 冷エタノールで沈殿を洗浄し、12,000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$

で5分間遠心し上清を捨てた。チューブのフタを開けて5分間乾燥し50 μ LのDEPC水に溶解させ total RNA 溶液とし、RNA 溶液の濃度と A260/A280、A260/A230 を確認した。

3-15. 変性アガロースゲル電気泳動

RNA の分解の有無は電気泳動で確認した。まず、使用する試薬を以下の Table 1-15 ~18 にまとめた。

Table 1-15. 10x FA gel buffer の組成

MOPS	20.9 g
酢酸ナトリウム	2.05 g
EDTA・2Na	1.86 g
DEPC 水	500 mL にメスアップ
pH 7.0 (NaOH)	

Table 1-16. FA agarose gel の組成

アガロース	1.0 g
10x FA gel buffer	10 mL
DEPC 水	90 mL

Table 1-17. 1x FA gel running buffer の組成

10x FA gel buffer	100 mL
37%ホルムアルデヒド液	20 mL
DEPC 水	880 mL

Table 1-18. 5x RNA loading buffer の組成

ブロモフェノールブルー	0.25 mg
250 mM EDTA, pH 8	16 μ L
37% ホルムアルデヒド液	72 μ L
グリセロール	200 μ L
ホルムアミド	308 μ L
10x FA gel buffer	400 μ L
DEPC 水	4 mL

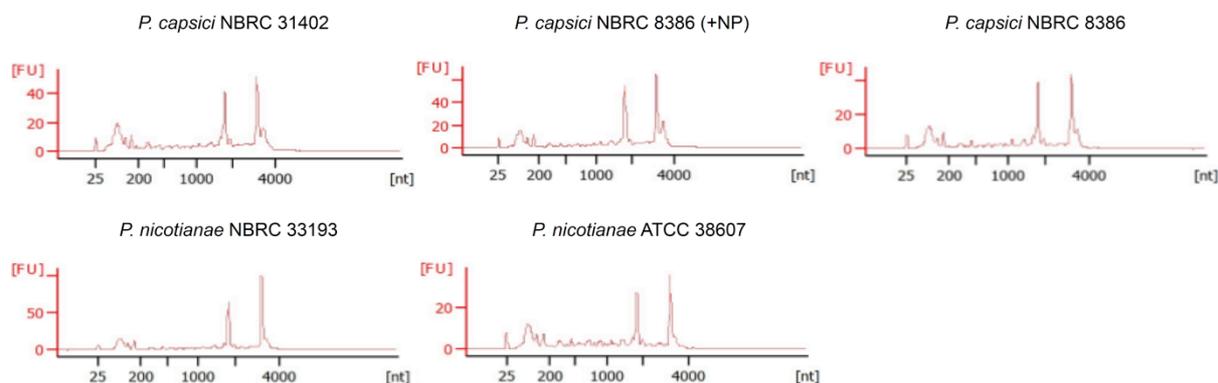
10x FA gel buffer (Table 1-15) を調製し、これを 10 倍希釈してアガロースゲルの混合溶液 100 mL (Table 1-16) をつくり、電子レンジで加熱して溶かした。スターラーで攪拌しながら、65 °C まで放冷したら、37% ホルムアルデヒド液 1.8 mL とエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/mL) 5 μ L 加えてさらに攪拌した。52 mm \times 60 mm (4 mm 幅 \times 8 ウェルのコームを使用) の型に 20 mL 程度流し込み、アルミ箔で覆って常温で固めたのち 1x FA gel running buffer (Table 1-17) に 30 分以上浸した。泳動サンプルは、RNA 抽出液 8 μ L に 5x RNA loading buffer (Table 1-18) 2 μ L を加え、65 °C で 5 分間インキュベートし、直ちに氷上で 5 分間冷却し調製した。1x FA gel running buffer で満たした電気泳動槽にゲルを置き、well 内部を 200 μ L のマイクロピペッターで洗浄し、20 bp 遺伝子マーカー 5 μ L (Wako)、サンプル 10 μ L をそれぞれ well にアプライし、50 V で 5 分間、135 V で 15 分間泳動した後、UV (302 nm) 下でバンドを観察した。

3-16. RNA-seq

RNA-seq の全ての操作は GeNAS に行っていた。各 RNA サンプルから 4 μ g の total RNA を cDNA ライブラリー作製に使用した。Total RNA の品質は NanoDrop と Agilent Bioanalyzer で確認した。Bioanalyzer による品質検査は、Eukaryote Total RNA

Nano と Plant RNA Nano の 2 種類の方法で実施した (Figure 1-32)。

(a)



(b)

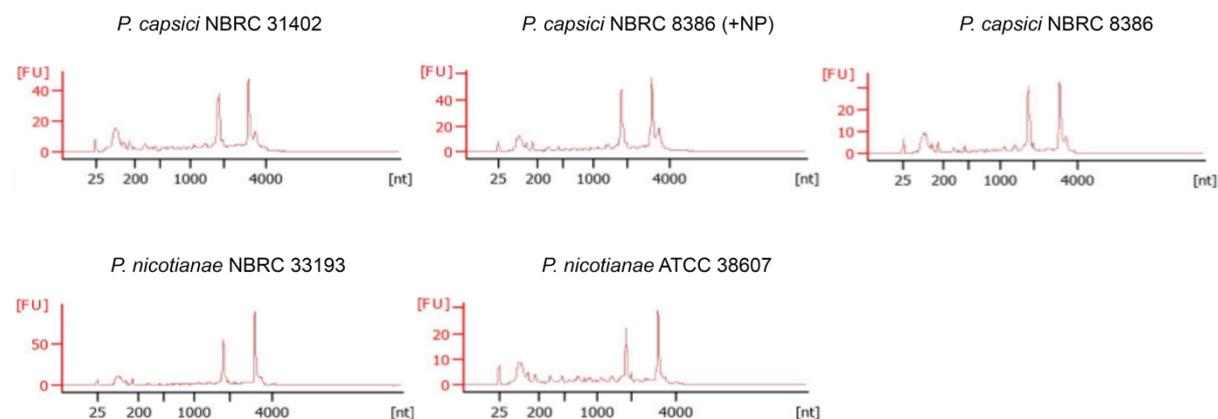


Figure 1-32. Bioanalyzer による RNA の品質検査

(a) Eukaryote Total RNA Nano (b) Plant RNA Nano

まず oligo dT で mRNA を濃縮したのち、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (illumina) を用いてプロトコルに従い RNA-seq ライブラリーを作製した。作製したライブラリーの品質は Bioanalyzer で確認し (Figure 1-33)、qPCR (Kapa Library Quantification Kit, Kapabiosystems) で定量した (Table 1-19)。

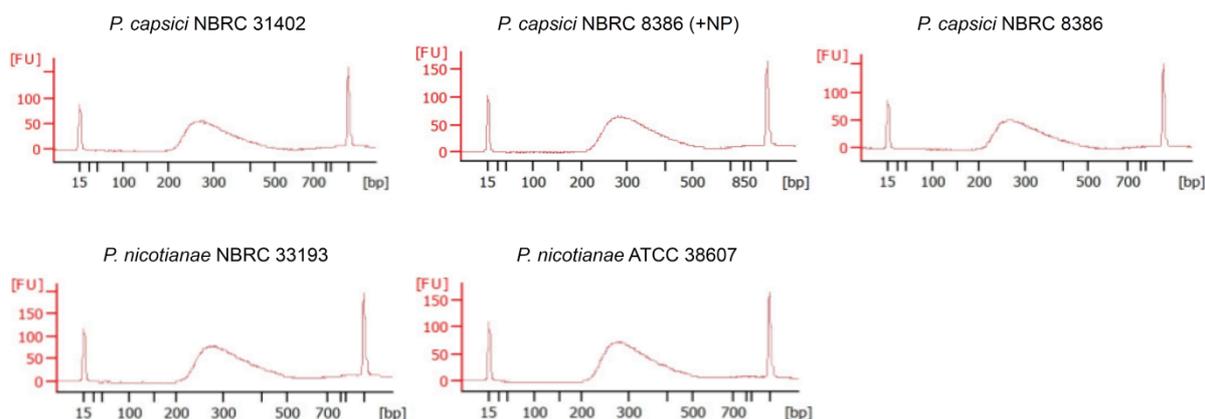


Figure 1-33. Bioanalyzer によるシーケンスライブラリーの品質検査

Table 1-19. qPCR によるシーケンスライブラリーの定量

GeNAS ID	Sample	Lib. Conc. (nM)
LS2971-010	<i>P. capsici</i> NBRC 31402	442
LS2971-013	<i>P. capsici</i> NBRC 8386 (+NP)	393
LS2971-012	<i>P. capsici</i> NBRC 8386	455
LS2971-006	<i>P. nicotianae</i> NBRC 33193	446
LS2971-002	<i>P. nicotianae</i> ATCC 38607	433

11 pM に調製した RNA-Seq ライブラリーを、次世代シーケンサーHiSeq2500 (illumina) を用いて high output mode 50-base single read シーケンシングを実施した。得られたデータセットに対して、TopHat (v2.0.12、<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) を用いてリードを参照ゲノム *Phytophthora_nicotianae_race_v1_0_genome.fa* もしくは *Phyca11_masked_genomic_scaffolds.fa* にマッピングしたのち、HTSeq (version 0.6.1pl、<http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/overview.html>)、DESeq (version 1.14.0、<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq.html>) により比較発現解析を行った。

参考文献

1. Snir, A.; Nadel, D.; Groman-Yaroslavski, I.; Melamed, Y.; Sternberg, M.; Bar-Yosef, O.; Weiss, E., The Origin of Cultivation and Proto-Weeds, Long Before Neolithic Farming, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131422.
2. Huang, X., *et al*, A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice, *Nature* **2012**, *490*, 497-501.
3. 白石 友紀ほか, 新植物病理学概論, 養賢堂, **2012**.
4. Fry, W. E.; Goodwin, S. B., Resurgence of the Irish Potato Famine Fungus, *BioScience*, **1997**, *47*, 363-371.
5. Judelson, H. S.; Blanco, F. A., The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 47–58.
6. Baldauf, S. L.; Roger, A. J.; Wenk-siefert, I.; Doolittle, W. F, A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **2000**, *290*, 972-977.
7. Erwin D. C.; Ribeiro O. K., *Phytophthora* Diseases Worldwide (St Paul, American Phytopathological Society, MN, USA, 1996).
8. 大木理, 植物病理学, 東京化学同人, **2007**.
9. Judelson, H. S., The Genetics and Biology of *Phytophthora infestans*: Modern Approaches to a Historical Challenge, *Fungal Genet. Biol.* **1997**, *22*, 65–76.
10. Ko, W. H. Heterothallic *Phytophthora*: Evidence for Hormonal regulation of sexual reproduction. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, 15-18.
11. Qi, J.; Asano, T.; Jinno, M.; Matsui, K.; Atsumi, K.; Sakagami, Y.; Ojika, M., Characterization of a *Phytophthora* mating hormone, *Science* **2005**, *309*, 1828.

12. Ojika, M.; Molli, S. D.; Kanazawa, H.; Yajima, A.; Toda, K.; Nukada, T.; Mao, H.; Murata, R.; Asano, T.; Qi, J.; Sakagami, Y., The second *Phytophthora* mating hormones defines the interspecies biosynthetic crosstalk, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 591-593.
13. Molli, S. D.; Qi, J.; Yajima, A.; Shikai, K.; Imaoka, T.; Nukada, T.; Yabuta, G.; Ojika, M., Structure-activity relationship of α hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 681–686.
14. Pflugmacher, S.; Sandermann, H., Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotics in Marine Macroalgae, *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 123–128.
15. Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
16. Schäffer, A. A.; Aravind, L.; Madden, T. L.; Shavirin, S.; Spouge, J. L.; Wolf, Y. I.; Koonin, E. V.; Altschul S. F., Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2994–3005.
17. Tyler, B. M. *et al.*, *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis, *Science* **2006**, *313*, 1261–1266.
18. Haas, B. J. *et al.*, Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*, *Nature* **2009**, *461*, 393–398.
19. Lévesque, C. A. *et al.*, Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire, *Genome Biol.* **2010**, *11*, R73.
20. Baxter, L.; Tripathy, S.; Ishaque, N.; Boot, N.; Cabral, A.; Kemen, E.; Thines, M.,

Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome, *Science* **2010**, *330*, 1549–1551.

21. Lamour, K. H.; Stam, R.; Jupe, J.; Huitema, E., The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*, *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 329–337.
22. Adhikari, B. N.; Hamilton, J. P.; Zerillo, M. M., Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75072.
23. Jiang, R. H. Y. *et al.*, Distinctive expansion of potential virulence genes in the genome of the Oomycete Fish Pathogen *Saprolegnia parasitica*, *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003272.
24. Sello, M. M. *et al.*, Diversity and evolution of cytochrome P450 monooxygenases in oomycetes, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11572.

第 2 部

粘液細菌新規二次代謝産物の化学的研究

第 1 章 緒論

1-1. はじめに

太古の昔から、人々は、植物・動物を医薬品として様々な疾患に利用してきた。その習慣は、西洋医学が浸透した現在でも、世界三大伝統医学（アーユルヴェーダ、中国医学、ユナニ医学）としてアジアを中心に継承されている。1804年に morphine が F. W. A. Sertürner によりアヘンから単離されて以来、動植物が示す薬理作用は含有有機化合物によるものであることが判明した。ここから医薬品開発は飛躍的な発展を遂げた。現在の医薬品開発の主流は、有機合成化学が主流となっている。しかしながら、その多くは生理活性を有する天然物を模倣しているケースも少なくない。1981年から2010年に承認された小分子医薬品のうち約3割が天然物あるいは関連した構造（半合成化合物など）、約2割が天然物を模した全合成によって製造された。このことから、天然から有用化合物を探索することは、合成化学が進んだ今日でも重要な医薬品開発手法の1つと言える¹。

抗生物質の歴史は、1928年の S. A. Fleming による penicillin の発見から始まる（Figure 2-1）。Penicillin はアオカビ *Penicillium noctum* 培養物から偶然発見され、後の第二次世界大戦では多くの人々を感染症から救った。これを機に天然からの抗生物質探索は黄金期を迎え、1940年から1960年代にかけて erythromycin、kanamycin（Figure 2-1）など多くの抗生物質が天然から見出された。また1979年には、大村らにより放線菌 *Streptomyces avermectinius* から抗寄生虫活性を有する avermectin が発見され²、その誘導体 ivermectin がアフリカを中心にオンコセルカ症治療薬として利用されている（Figure 2-1）。大村らはこの業績が称えられ、2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。現在までに、微生物から5,000種以上の生理活性物質が発見され、実際に

150 種類以上が医薬品や農薬として利用されている³。その例として、抗がん剤 actinomycin D、免疫抑制剤 cyclosporine、コレステロール合成阻害剤 mevalotin などが臨床薬として活躍している (Figure 2-1)。

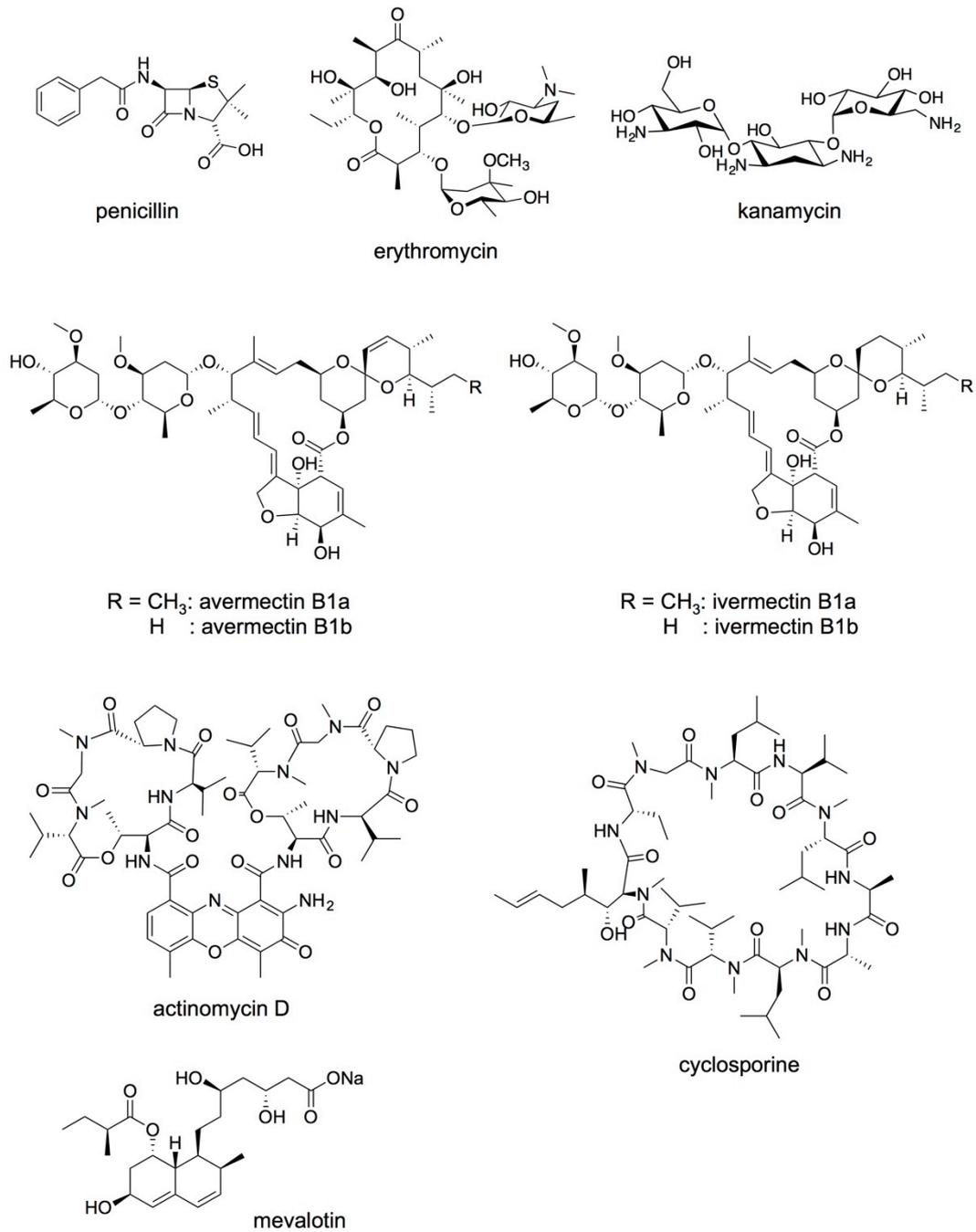


Figure 2-1. 微生物由来医薬品の例

しかし、抗生物質の発見と薬剤耐性菌の出現は、常に隣り合わせであった。その例の1つとして Methicillin 耐性黄色ブドウ球菌が挙げられる。Methicillin は penicillin 耐性菌を対象に penicillin からの半合成により開発された。しかしながら、その2年後に methicillin に耐性を持つ黄色ブドウ球菌 (MRSA) が発見され瞬く間に世界中に蔓延した。MRSA の出現後、vancomycin が MRSA を対象に開発されたが、残念なことに vancomycin 耐性腸球菌 (VRE) や vancomycin 耐性ブドウ球菌 (VRSA) が出現した。現在のところ VRE や VRSA に効果的な抗生物質は完全化学合成により開発された linezolid であるが、近年耐性菌の出現が報告されている⁴。しかし、この現状を打破する発見が 2006 年に報告された。抗生物質 platensimycin の発見である⁵。Platensimycin の作用機序は既存のものと異なり、細菌の脂肪酸合成経路を阻害するため耐性菌が出現しにくいと考えられている。このように、薬剤耐性を招かない新しいタイプの医薬品候補の発見が急務となっているが、微生物をはじめとする天然からの新規抗生物質の発見は滞ってきている。そこで近年注目されている探索源の1つは、難培養性微生物の粘液細菌である。

1-2. 粘液細菌

難培養性微生物である粘液細菌は、その取扱いの難しさからあまり注目されてこなかった。しかし近年、培養方法が確立されてきており、生産する二次代謝産物は新規骨格をもつものが多いため、医薬品シードの探索源として注目されている。

粘液細菌は、 δ -プロテオバクテリアに属するグラム陰性桿菌である⁶。粘液細菌は、熱帯から極地と幅広く生息しており⁷、土壌や腐敗植物片、動物の排泄物、樹皮などから単離されている。近年になり、海洋環境や温泉 (高温)、嫌気環境下である地中深くにも粘液細菌が生息していることが報告され^{8,9}、粘液細菌が地球上ありとあ

あらゆる環境に生息している可能性が示唆された。粘液細菌の重要な特徴の1つは、寒天培地上で一団となって滑走し、様々な色や形の子実体 (Figure 2-2) を形成する¹⁰ など極めて特徴的な生活環を持ち、社会性を有した多細胞生物のようにそれぞれの細胞がコミュニケーションをとることである。

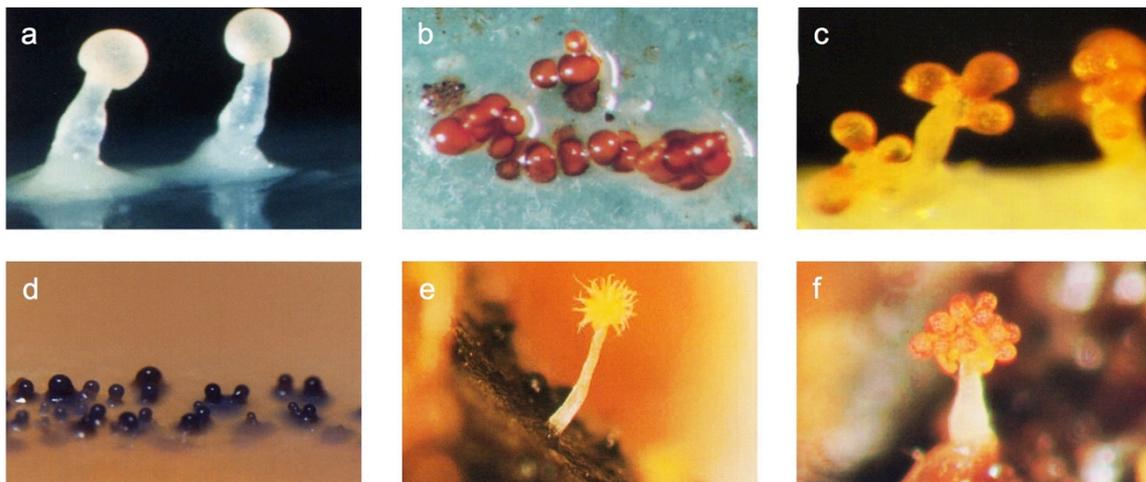


Figure 2-2. 粘液細菌が形成する子実体¹¹

- (a) *Myxococcus stipetatus*、(b) *Cystobacter fuscus*、(c) *Stigmatella* sp.
 (d) *Myxococcus fulvus*、(e) *Chondromyces apiculatus*、(f) *Chondromyces pediculateus*

粘液細菌は、1809年に植物学者である H. F. Link によって発見された。しかし、Link は粘液細菌を細菌とは思わず、子実体を形成するという特徴から、腹菌類であると判断し、*Polyangium vitellinum* と命名した。その後も M. J. Berkeley によって粘液細菌 *Stigmatella aurantica* と *Chondromyces crocatus* が発見されたが、依然として細菌とは分類されず、糸状不完全菌として分類された。その後、1892年に R. Thaxter により初めて粘液細菌が細菌 (*Myxococcus*) であると報告された。こうした事実から、粘液細菌が他の細菌にはないユニークな生態を持っているということが垣間見える。粘液細菌は、栄養が豊富であれば通常二分裂により増殖し、栄養飢餓に陥ると細胞同士が集合・凝集し、子実体と呼ばれる細胞と粘質物からなる精緻な多細

胞的な構造体へと分化する。子実体には、乾燥耐性を持つ孢子細胞が多数（数千～数万個）含まれており、細胞を休眠状態で保つことで乾燥や高温化で長期間生きながらえることができる。孢子は栄養状態が回復すれば発芽し、再び栄養増殖を行う。また、子実体に多数の孢子細胞を含むことで、発芽後の増殖の際に細胞密度を高くすることができるため、その後の捕食活動を有利に進められると考えられる（Figure 2-3）。

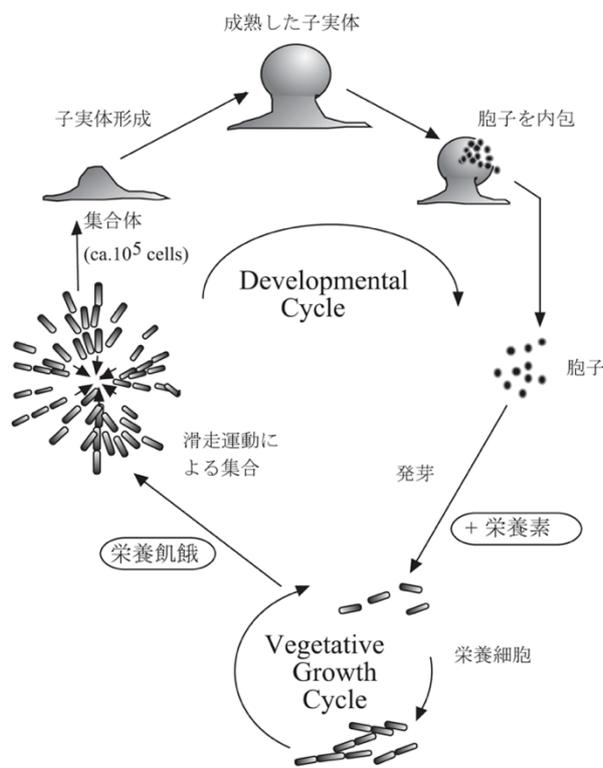


Figure 2-3. 粘液細菌の生活環¹²

粘液細菌は捕食の際に粘液質とともにタンパク質分解酵素や、細胞壁分解酵素を分泌するが、これは餌となる周りの微生物を溶菌し栄養素を得るためである。ゲノム解析の結果から、タンパク質分解系の酵素遺伝子はモデル粘液細菌である *Myxococcus xanthus* においては 146 個あると推定されている。一方、それとは対照的にセルロー

ス分解性の *Sorangium cellulosum* は 70 個と少ない。しかし糖質代謝関連酵素遺伝子に関しては、*S. cellulosum* は 504 個の遺伝子をもつのに対して、*M. xanthus* は 270 個と少ない。*M. xanthus* は菌体由来のタンパク質の分解物から主に栄養を得ているのに対して、*S. cellulosum* はセルロースの分解物やその他の糖質を主たる栄養素としていることを意味している。このように同じ粘液細菌でも栄養源に応じて異なる代謝遺伝子構成をもつ。

1-3. 粘液細菌が生産する生理活性物質

粘液細菌の重要な特徴の中で忘れてはならないことは、生産される二次代謝産物の多様性である。粘液細菌の二次代謝産物の研究は、1977 年に *S. cellulosum* から単離された鎖状ポリケチド ambruticin (Figure 2-4) の発見を皮切りに¹³、現在までに新規骨格約 100 種、その類縁体約 500 以上の類縁体が報告されており、それらの多くはポリケチドや非リボソームペプチド、あるいはそのハイブリッド型である¹⁴。これらの化合物の多くは、強力な抗菌あるいは抗真菌活性を示すため、医薬品リード化合物として期待されている¹⁵。またそれらの化合物の多くが、ミトコンドリアにおける電子伝達を阻害する（例：myxalamide、myxothiazol など、Figure 2-4）ことや細胞骨格を標的にする（例：chondramide、tubulysin など、Figure 2-4）ことで活性を示すことも興味深い¹⁶。粘液細菌が生産する二次代謝産物で最も有名な化合物は epothilone 類であろう。Epothilone 類は、*S. cellulosum* の培養物から抗真菌物質として単離された 16 員環マクロライドである¹⁷。Epothilone 類は、微小管を安定化させることによって脱重合を阻害し、細胞毒性を示す¹⁸。この作用機構は、現行の抗がん剤である paclitaxel と同様であり、さらには paclitaxel 耐性を獲得したがん細胞にも効果を示したため、「post-paclitaxel」として期待された。Epothilone 類は生体内で不安定であったため、

epothilone B の環内 O 原子（ラクトン構造）を NH（ラクタム構造）に置き換え安定性を向上させた ixabepilone (Ixempra™) が開発された (Figure 2-4) が、Ixabepilone は 2007 年に FDA の認可を受け、現在乳がん治療薬として利用されている。当研究室でも *Cystobacter fuscus* より cystothiazole 類 (Figure 2-4) が発見されている¹⁹。

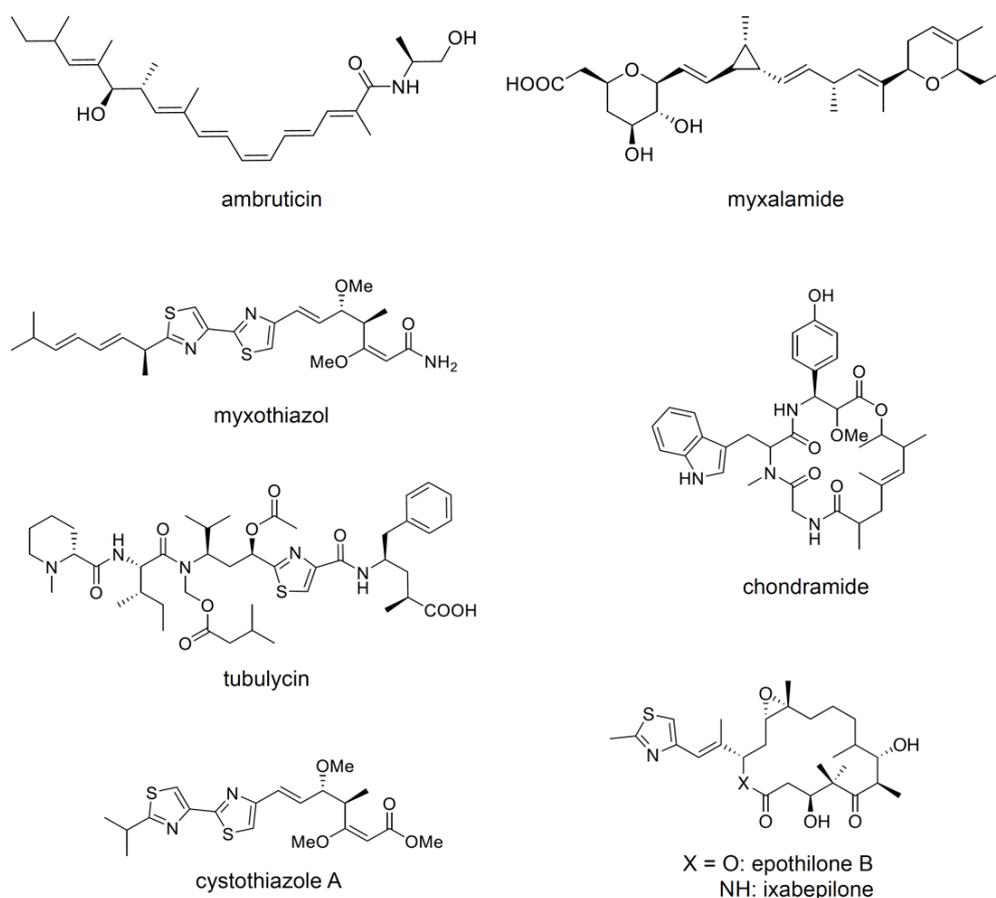


Figure 2-4. 粘液細菌由来の生理活性物質

1-4. 海洋性粘液細菌と生理活性物質

従来、粘液細菌は陸性細菌であると考えられていたが、上述したように、海洋環境にも生息することが明らかとなった。しかしながら、単離・培養の難しさから、陸性粘液細菌の報告例に比べ、海洋性粘液細菌の報告は少ない。今までに、海洋性好塩性

粘液細菌として *Haliangium ochraceum*²⁰、*Enhygromyxa salina*²¹、*Plesiocystis pacifica*²²、*Praraliomyxa miuraensis*²³ の 4 種が、海洋性耐塩性粘液細菌として *Pseudoenhygromyxa salsginis*²⁴ が報告されており、これらは全て Nannocystineae 亜目に属する。海洋性粘液細菌由来の生理活性物質も研究されており (Figure 2-5)、*H. ochraceum* からは *haliangicin* 類^{25,26} と *haliamide*²⁷ が、*P. miuraensis* からは *miuraenamide* 類^{23,28} が、*E. salina* からは *salimabromide* 類²⁹、*salimyxin* 類³⁰ および *enhygrolide* 類³⁰ が報告されている。一方、*P. pacifica* はドラフトゲノム解析の結果、ゲノム上に PKS および NRPS 遺伝子クラスターが計 12 存在しているにも関わらず含有生理活性物質の報告はなく、同様に *P. salsginis* からも二次代謝産物は報告されていない³¹。また *H. ochraceum* には 8 つの生合成遺伝子クラスターが存在するが、報告された二次代謝産物は *haliangicin* 類と *haliamide* のみである³¹。このようにゲノム上に存在する生合成遺伝子クラスターの数に比べ、報告されている二次代謝産物の数が少ないため、海洋性粘液細菌は新規二次代謝産物探索の対象として高いポテンシャルを有していると考えられる。

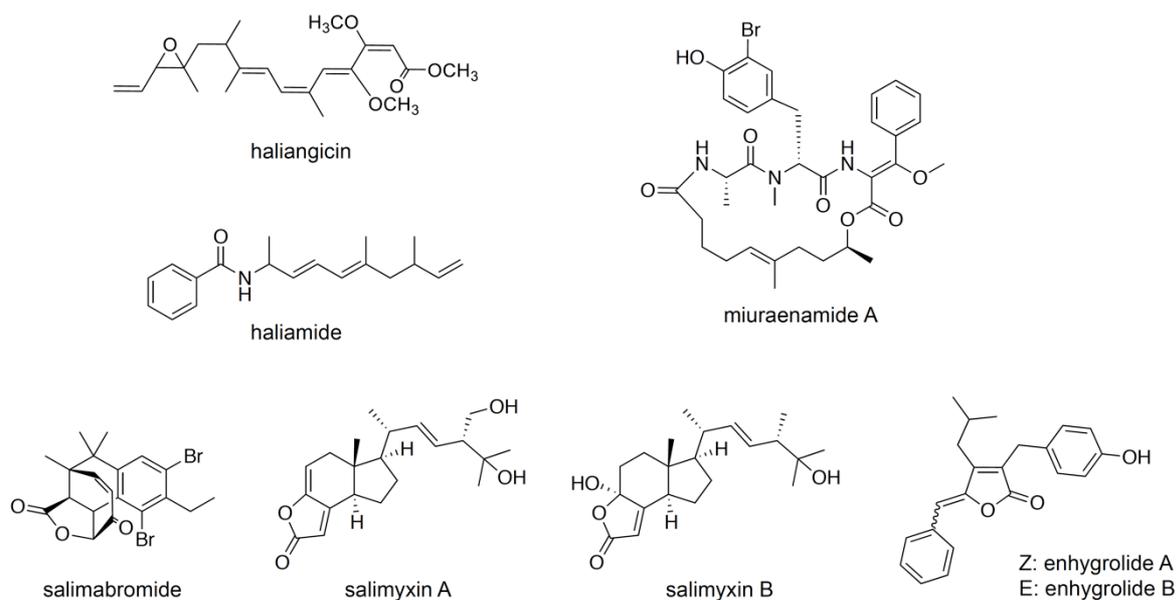


Figure 2-5. 海洋性粘液細菌から単離された二次代謝産物

1-5. 研究目的

上述のように、海洋性粘液細菌は新規医薬品リード化合物探索源として高いポテンシャルを有している。そこで本研究では、未だ二次代謝産物の報告がされていない *Enhygromyxa niigataensis* SNB-1 から新規二次代謝産物を探索し、それらの生理活性を評価することを目的とした。

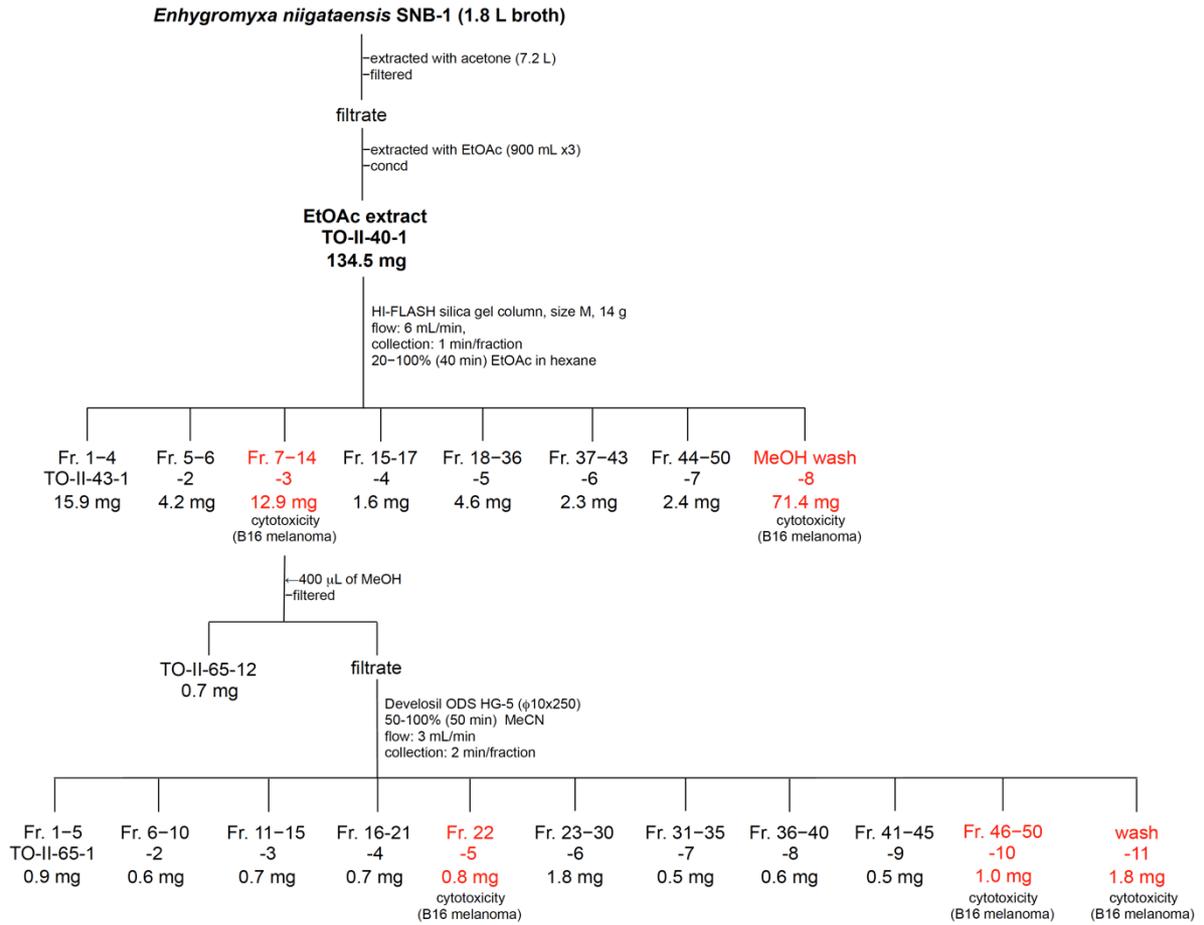
第 2 章 本論

2-1. 細胞毒性成分の単離

0.1% (w/v) 酢酸ナトリウムを添加した VY/2-SWS 寒天培地で 2 週間培養した *E. niigataensis* SNB-1 を 2% 塩化ナトリウムおよび 100 mM 酢酸ナトリウムを含む VY/4-SWS 液体培地に植菌し 10 日間振盪培養した。培養液 1.8 L を菌体ごと 7.2 L のアセトンで抽出し、得られた抽出物を EtOAc 抽出(2.7 L)することで脂溶性画分(134.5 mg)を得た。これをヘキサン-EtOAc 系を用いたシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーで分離し、得られた 8 フラクション (TO-II-43 シリーズ) の B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性を調べたところ、TO-II-43-3 (32-48% EtOAc 溶出画分) および 8 (MeOH 画分) に細胞毒性がみられた (Figure 2-6a)。まず活性が強かった TO-II-43-8 の活性本体の同定を試みたが、分離が非常に困難であったため断念した。そこで TO-II-43-3 を分離することにした (Scheme 1)。TO-II-43-3 を MeCN-水系を用いて ODS-HPLC で分離し (Figure 2-6b)、TO-II-65 シリーズを得た (Scheme 2-1)。TO-II-65 シリーズの細胞毒性を調べたところ、TO-II-65-5、10、11 の 3 フラクションに活性が見られたため (Figure 2-7)、これら 3 フラクションに含まれる活性成分を同定することにした。しかし、分離を進めるにはサンプル量が少なかったため、培養液の EtOAc 抽出物である TO-II-56-1、TO-II-70-1、TO-II-74-1 を合わせて (241.9 mg、3.6 L 相当)、活性成分の量上げを行った (Scheme 2-2)。ヘキサン-EtOAc 系を用いたシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで得られた 4 フラクション (TO-II-77 シリーズ) のうち、TLC (ヘキサン : EtOAc=2 : 1) より、TO-II-77-2 に TO-II-65-5 と同じ成分が含まれていると考えられた。したがって、TO-II-77-2 (16.8 mg) を MeOH-水系を用いて ODS-HPLC で分離し、TO-II-79 シリーズを得た (Figure 2-8a)。TO-II-79-2 は

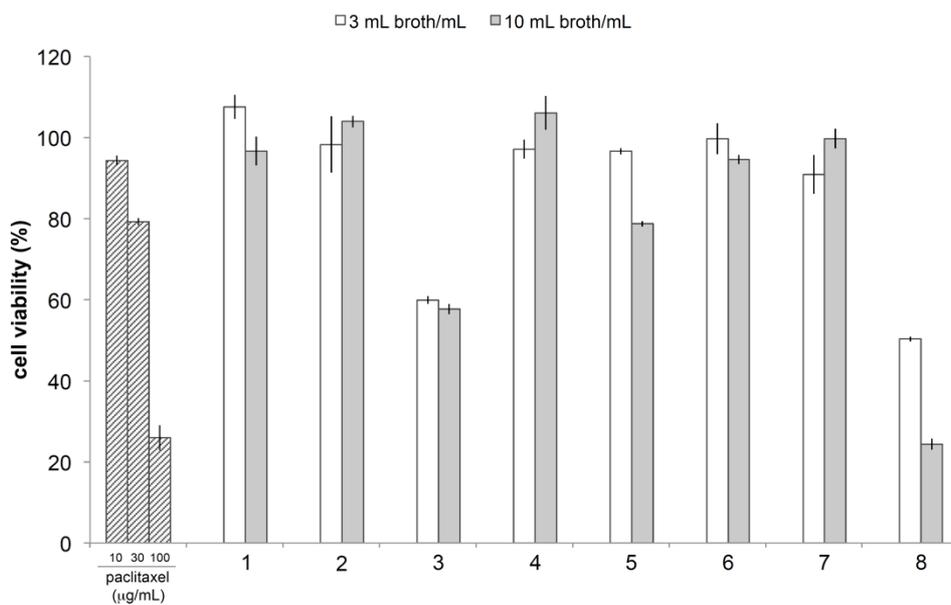
単ピークで得られたが、 $^1\text{H NMR}$ より不純物が見られたため、再度 MeCN–MeOH–水の混合溶媒を用いて ODS-HPLC で分離することで活性成分である TO-II-85-2 (2.0 mg) を得た (Figure 2-8b)。

$^1\text{H NMR}$ より、細胞毒性が見られた TO-II-65-11 と TO-II-79-5 (4.2 mg) に主成分として同じ化合物が含まれると考えられたので、これらを MeCN–MeOH の混合溶媒を用いて ODS-HPLC で分離し、TO-II-105 シリーズを得た (Figure 2-9a)。 $^1\text{H NMR}$ より、主成分でありかつ単ピークで得られた TO-II-105-2 には高い割合で不純物が含まれていたため、MeOH–水系を用いてリサイクル ODS-HPLC で精製し、主成分として TO-II-138-2 (1.6 mg) を得た (Figure 2-9b、Scheme 2-2)。また、細胞毒性が見られた TO-II-65-10 については、重クロロホルム (CDCl_3) を用いて $^1\text{H NMR}$ の測定を試みたが、化合物が分解してしまった。そこで TO-II-65-10 と同様の吸収波長をもつ TO-II-79-4 を TO-II-65-10 の主成分とみなし、構造決定した。



Scheme 2-1. TO-II-43 シリーズと 65 シリーズの分離

(a)



(b)

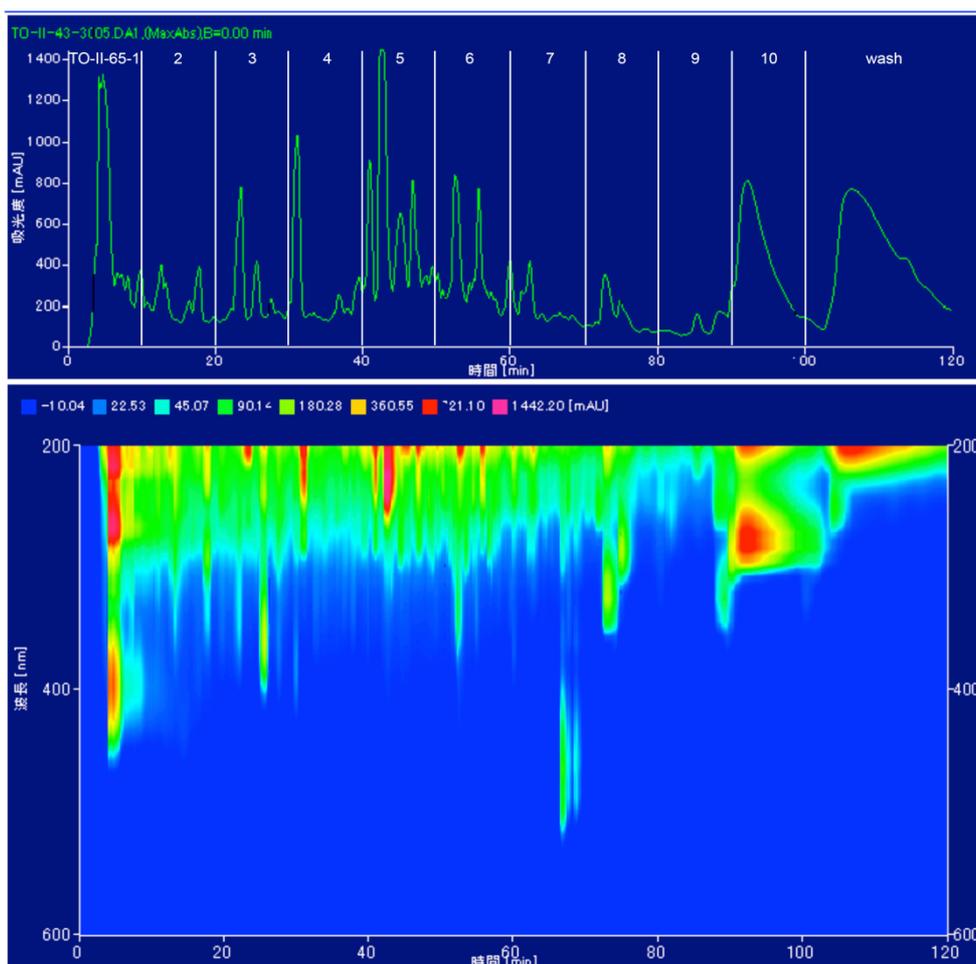


Figure 2-6. TO-II-43 シリーズの細胞毒性 (a) と TO-II-43-3 の分取 HPLC (b)

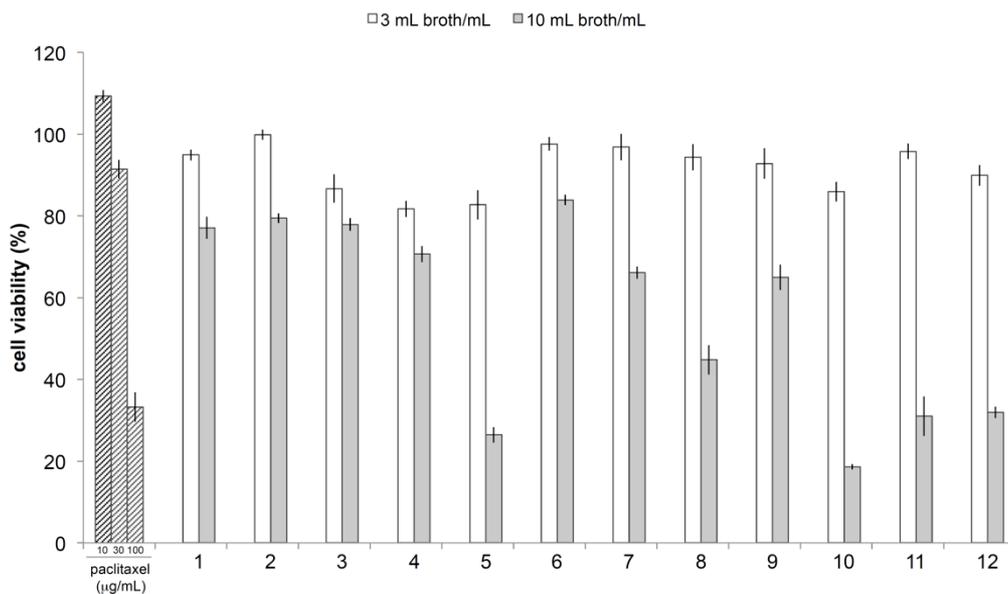
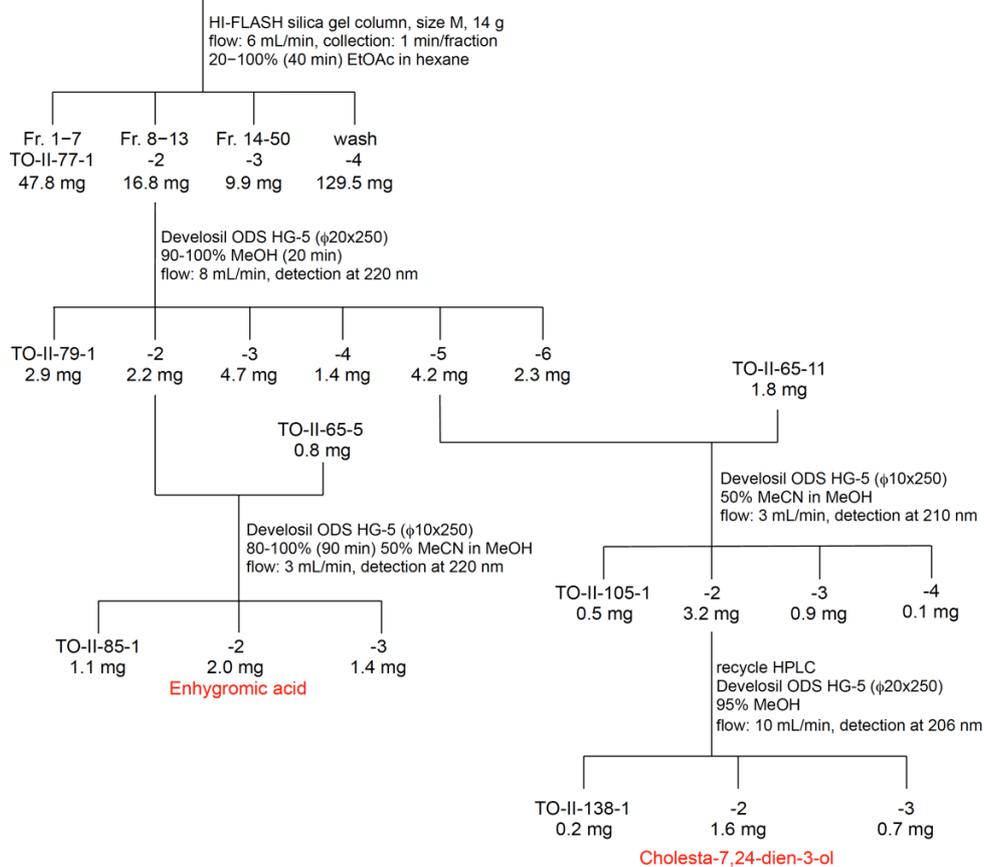


Figure 2-7. TO-II-65 シリーズの細胞毒性

E. niigataensis 培養物 (3.6 L) の EtOAc 抽出物

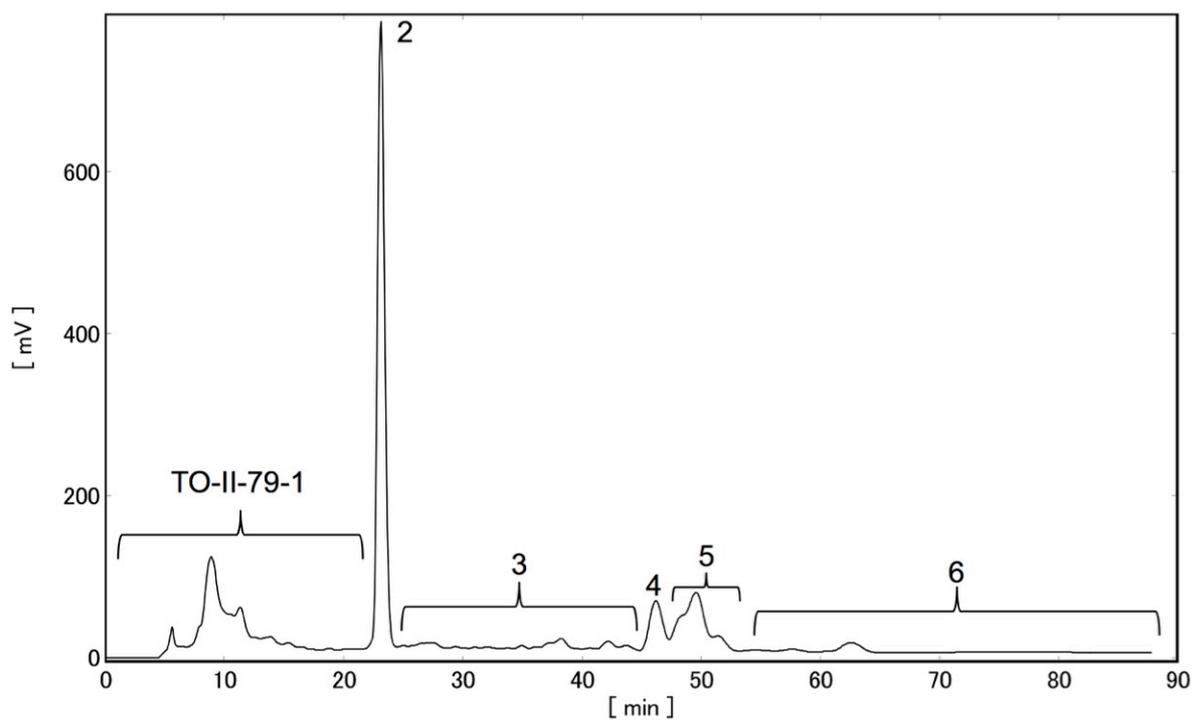
TO-II-56-1, 70-1, 74-1

241.9 mg (3.6 L broth)



Scheme 2-2. 海洋性粘液細菌 *E. niigataensis* からの細胞毒性成分の分離

(a)



(b)

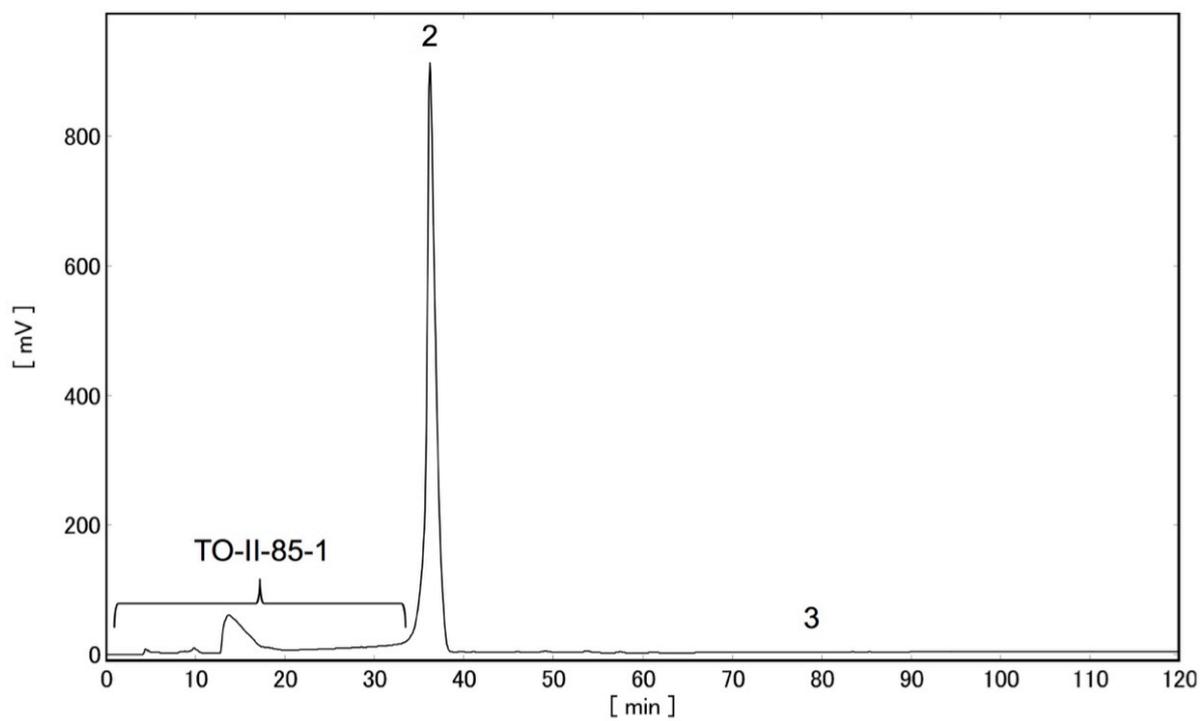
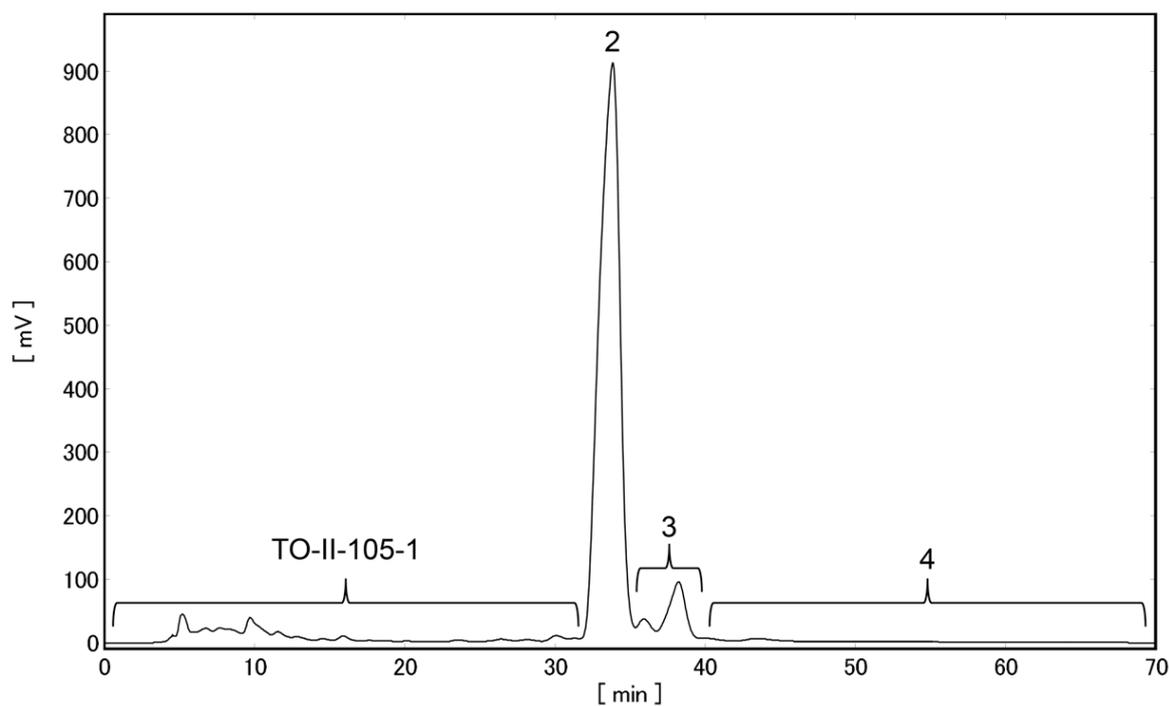


Figure 2-8. Enhygromic acid (TO-II-85-2) の精製

(a) TO-II-77-2 の分取 HPLC、(b) TO-II-79-2 の分取 HPLC

(a)



(b)

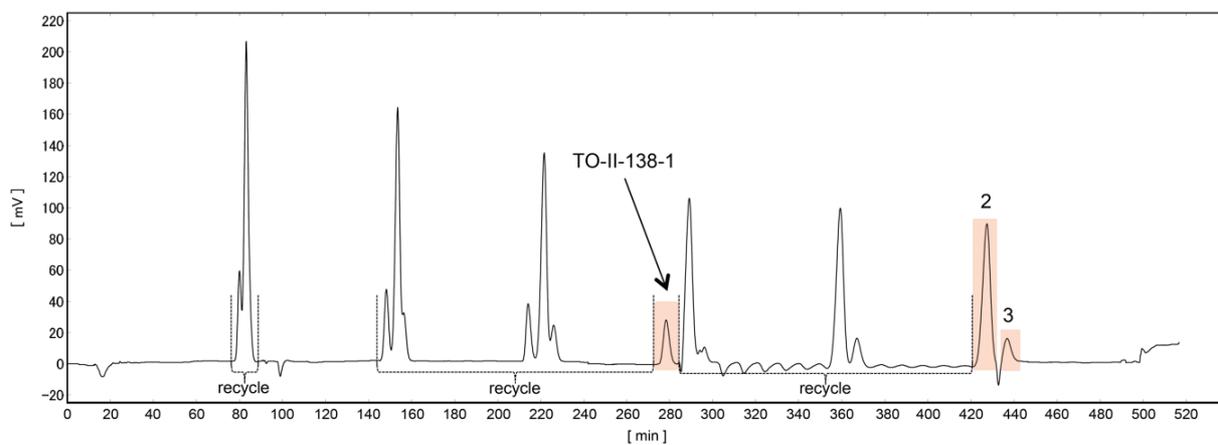


Figure 2-9. ステロイド化合物 (TO-II-138-2) の精製

(a) TO-II-79-5 の分取 HPLC、(b) TO-II-105-2 のリサイクル HPLC

2-2. 新規化合物 enhygromic acid (TO-II-85-2) の構造解析

TO-II-85-2 の構造は各種スペクトル解析により決定した。その結果、TO-II-85-2 は新規化合物であったため、以下では enhygromic acid と呼ぶことにする。高分解能

ESI-TOF-MS により、 m/z 303.2299 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{20}H_{31}O_2$ 303.2319) が確認されたため、enhygromic acid の分子式は $C_{20}H_{30}O_2$ であると決定した。IR スペクトルの 1685 cm^{-1} の強い吸収および $3640\text{--}2390\text{ cm}^{-1}$ の幅広いブロードの吸収が観測されたため、カルボキシ基の存在が示唆された。Enhygromic acid の物理化学的性質は以下の Table 2-1 に示した。

Table 2-1. Enhygromic acid の物理化学的性質

Appearance	colorless powder
Melting point	209–213 °C
Specific rotation	$[\alpha]_D^{26} -33.6$ (c 0.06, MeOH)
HR ESI-TOF-MS (+)	m/z 303.2299 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{20}H_{31}O_2$ 303.2319)
IR (film)	ν_{\max} 3640–2390 (br), 3084, 1685, 888, 757 cm^{-1}
UV (1% MeOH in MeCN)	λ_{\max} (ϵ) 223 (11,000) nm
CD (1% MeOH in MeCN)	λ_{ext} 226 ($\Delta\epsilon -9.0$), 196 ($\Delta\epsilon +8.0$) nm

Enhygromic acid の重ジメチルスルホキシド ($DMSO-d_6$) 中の 1H および ^{13}C NMR データを Table 2-2 に示した。 ^{13}C NMR スペクトルにより 1 つのカルボニル炭素 (δ_C 170.2)、4 つのアルケン炭素 (δ_C 108.1、127.2、145.9、148.9) の存在が示唆された。Enhygromic acid の構造は、二次元 NMR 解析により明らかにした (Figure 2-10)。まず HSQC 測定により C-H の直接結合を調べ、DQF-COSY より 2 つの部分構造すなわち $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-$ と $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ が存在することが明らかとなった。これらの部分構造と 4 つの 4 級炭素の結合は HMBC 測定により決定した (Figure 2-10a)。解明した enhygromic acid の構造は、縮重した三環、すなわち天然では非常に稀な decahydroacenaphthylene 骨格に α -methylacrylic acid 鎖が結合したものであった。C-2 位の二重結合の幾何異性は、H-20/H-5 および H-20/H-9 の NOESY 相関の存在と H-3/H-20 の相関の欠如から、*E* 配置と決定した。また、相対立体配置は NOESY 相関

から $4S^*$, $5S^*$, $9R^*$, $10R^*$, $13S^*$ と決定した (Figure 2-10b)。

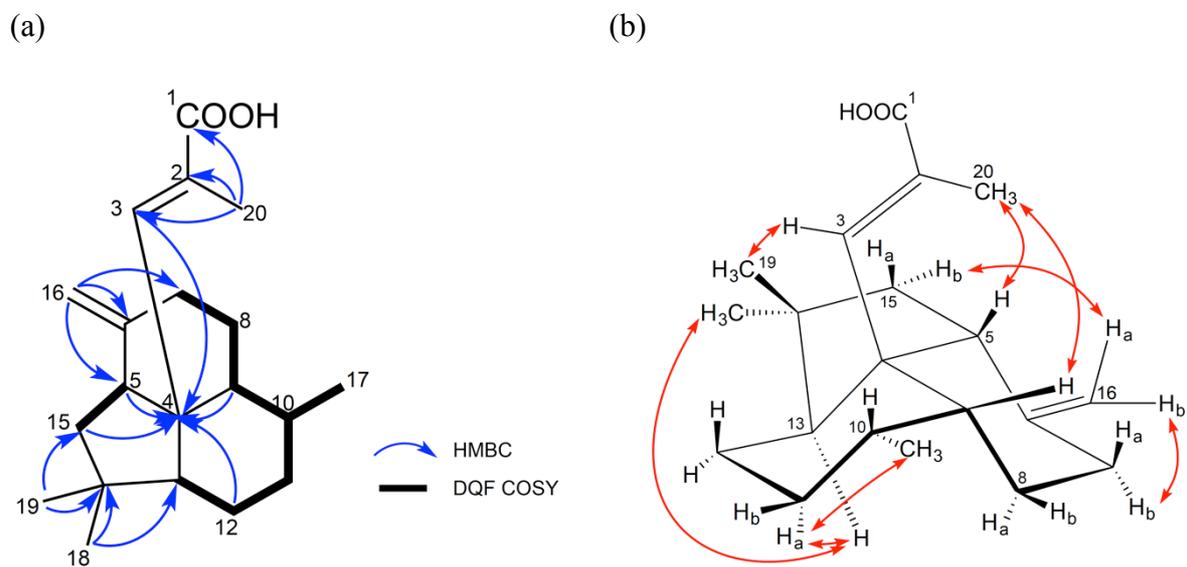


Figure 2-10. Enhygromic acid の二次元 NMR 相関と構造

(a) DQF-COSY (太線) と HMBC 相関 (矢印)、(b) NOESY 相関 (両矢印)

Table 2-2. Enhygromic acid の ^1H および ^{13}C NMR データ (DMSO- d_6)

Position	δ_{C} (150 MHz)	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J in Hz) (600MHz)
1	170.2	
2	127.2 (br)	
3	145.9 (br)	7.27 s
4	52.2	
5	46.7	2.81 brd (7.1)
6	148.9	
7a	35.3	2.08 m
7b		2.39 dt (13.1, 3.0)
8a	21.7	1.36 m
8b		1.55 m
9	45.2	2.04 m
10	31.7	1.55 m
11a	29.4	1.09 m
11b		1.42 m
12	21.6	1.43 m, 1.45 m
13	46.9	1.49 dd (12.7, 3.4)
14	35.6	
15a	40.6	1.35 m
15b		1.92 m
16a	108.1	4.76 s
16b		4.85 d (1.5)
17	19.6	0.76 d (6.9)
18	32.6	1.00 s
19	26.7	0.86 s
20	14.7	1.92 s

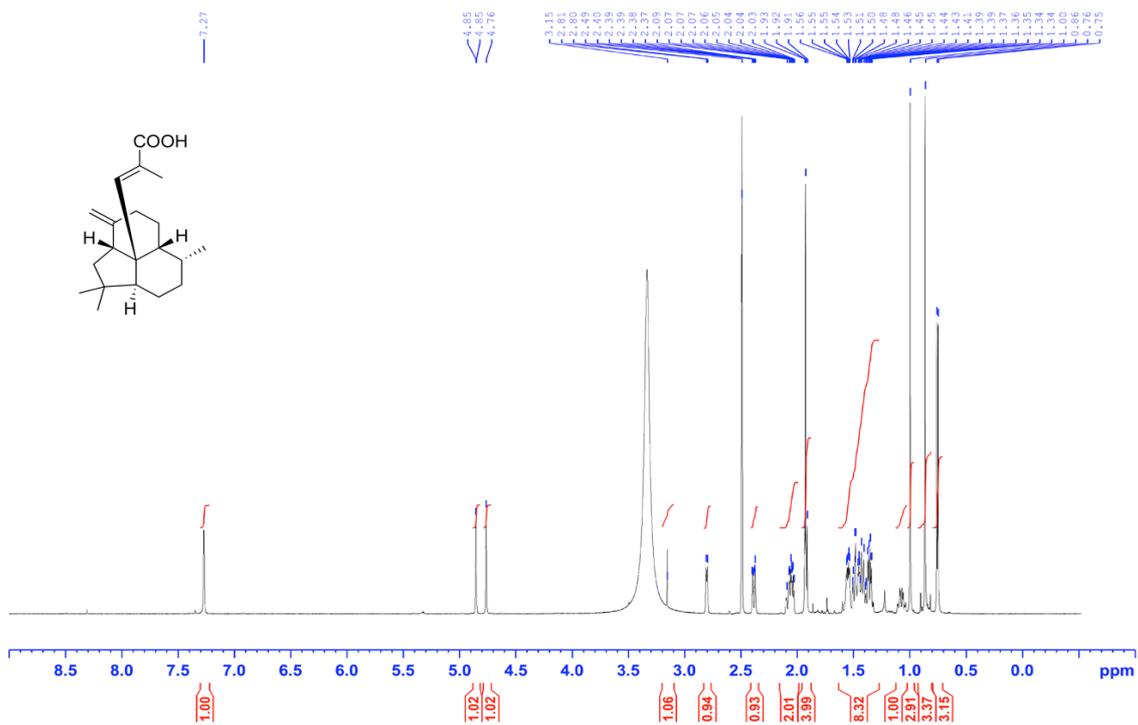


Figure 2-11. Enhygromic acid の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

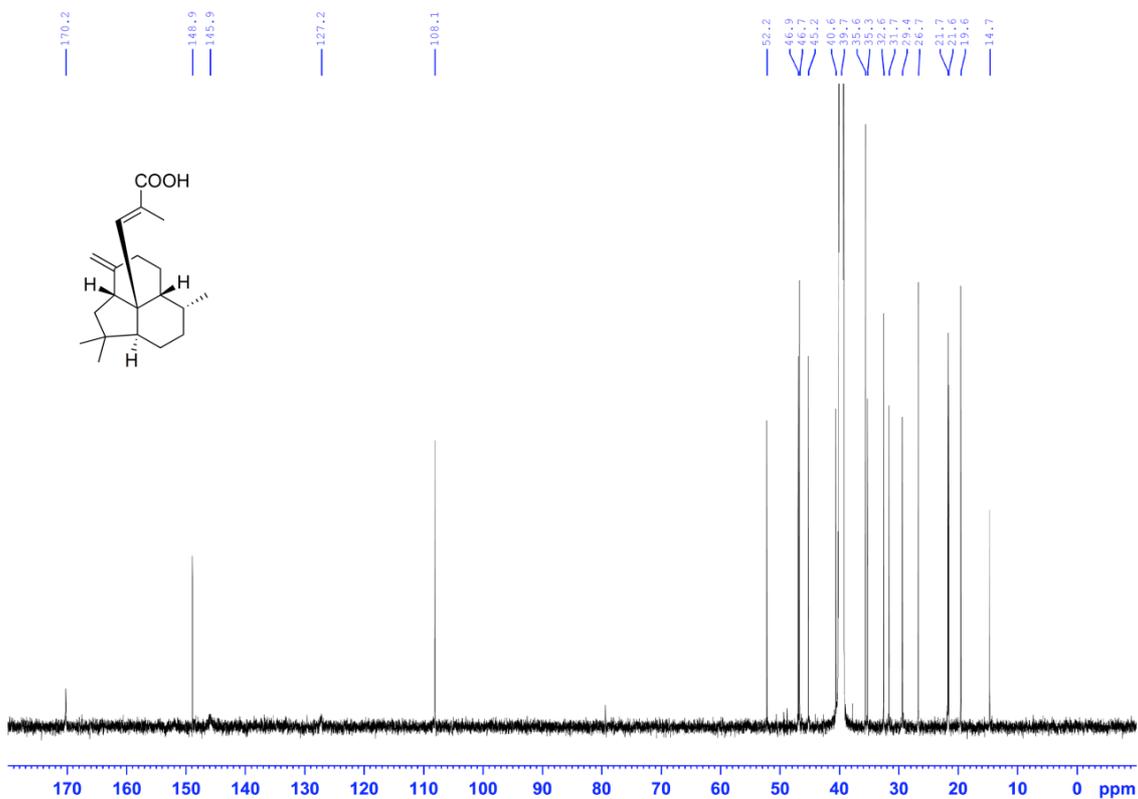


Figure 2-12. Enhygromic acid の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

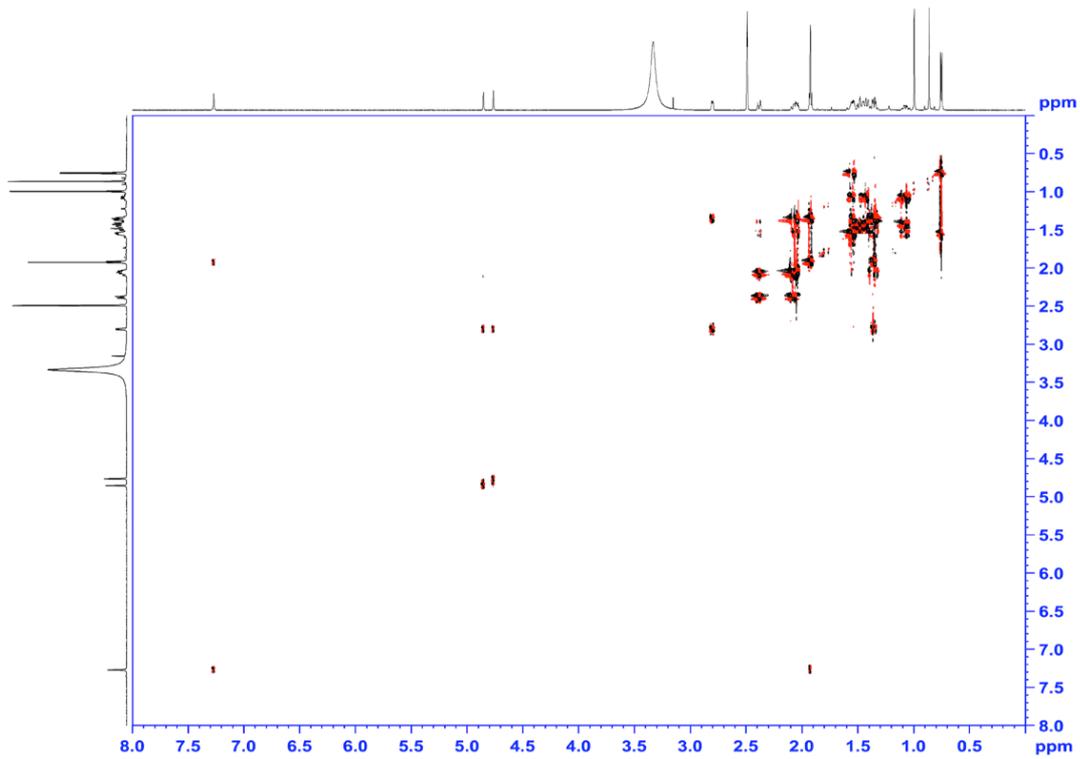


Figure 2-13. Enhygromic acid の DQF-COSY (600 MHz, DMSO- d_6)

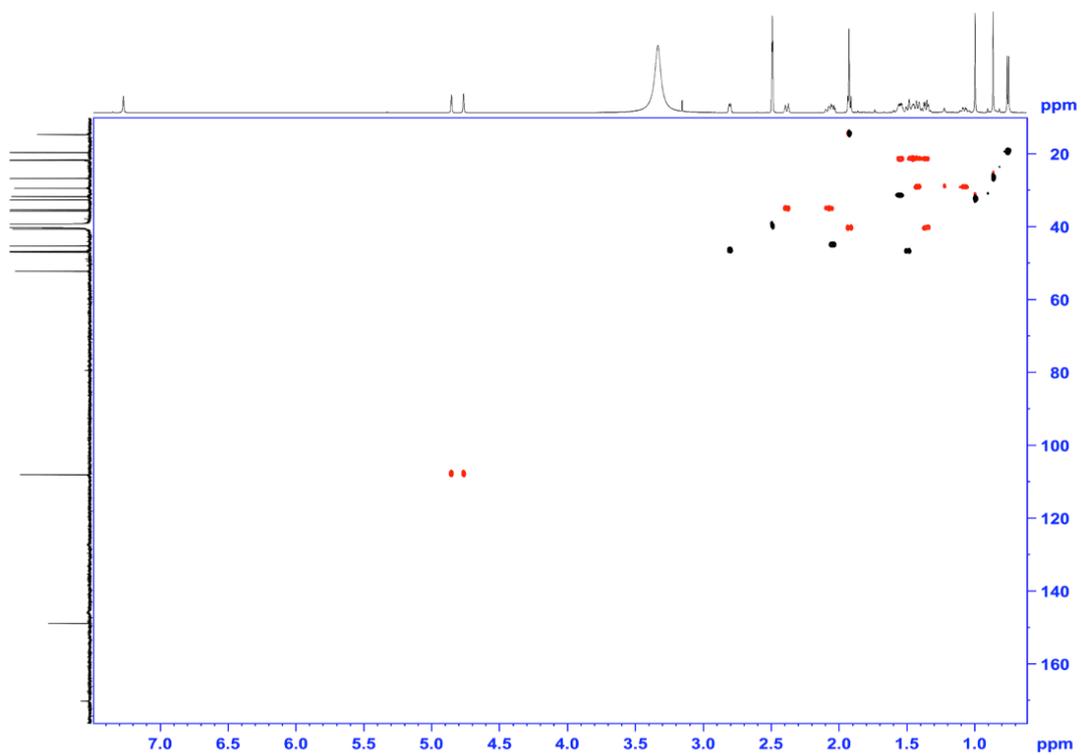


Figure 2-14. Enhygromic acid の HSQC スペクトル (600 MHz, DMSO- d_6)

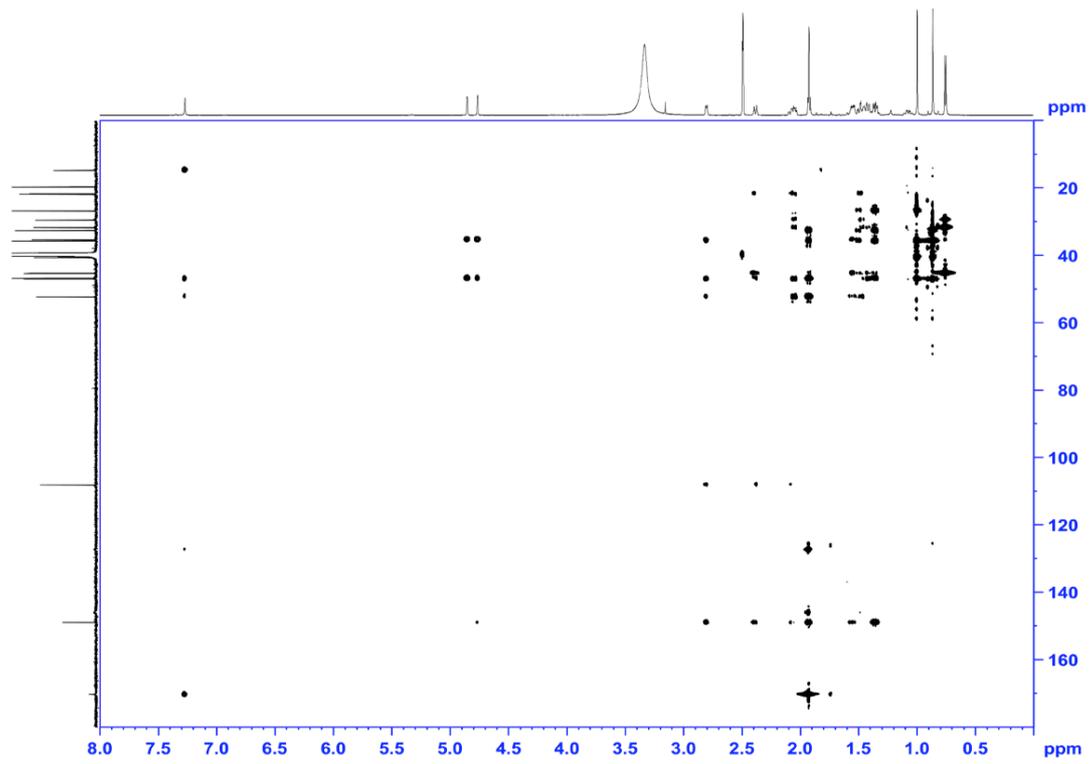


Figure 2-15. Enhygromic acid の HMBC スペクトル (600 MHz, DMSO- d_6)

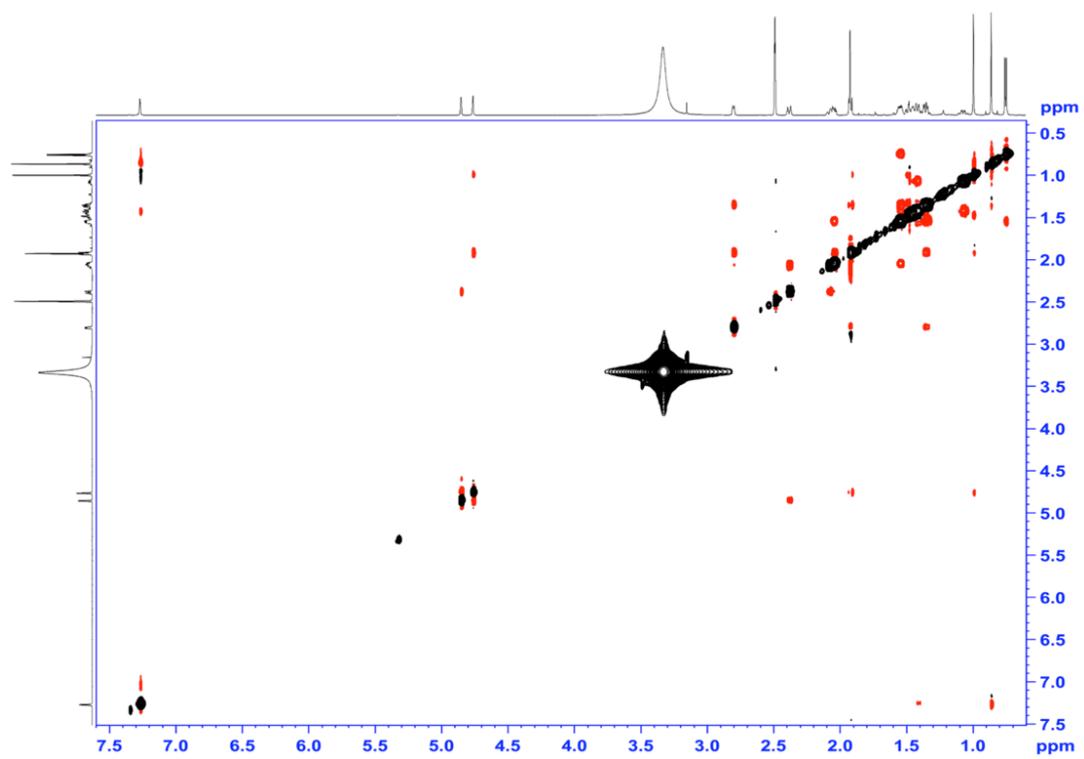


Figure 2-16. Enhygromic acid の NOESY (600 MHz, DMSO- d_6)

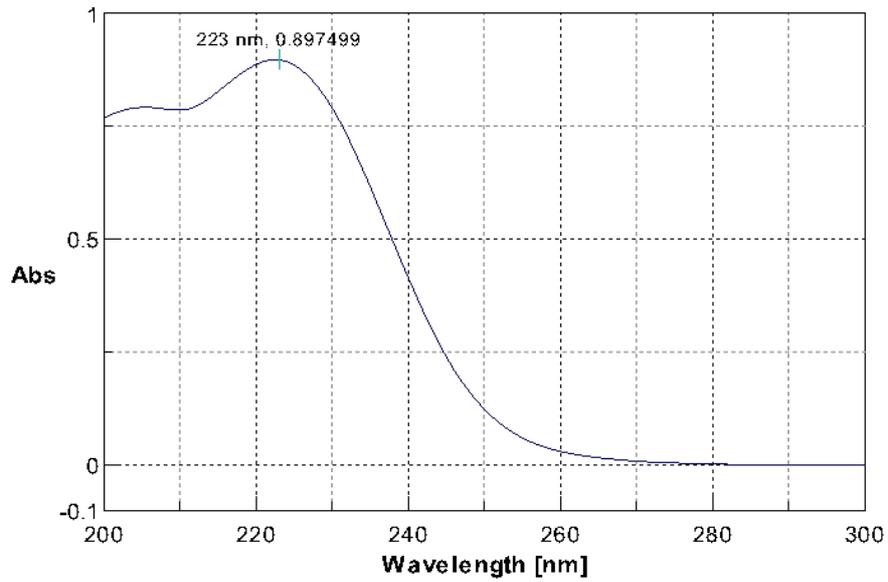


Figure 2-17. Enhygromic acid の UV スペクトル (MeOH, $c=79 \mu\text{M}$)

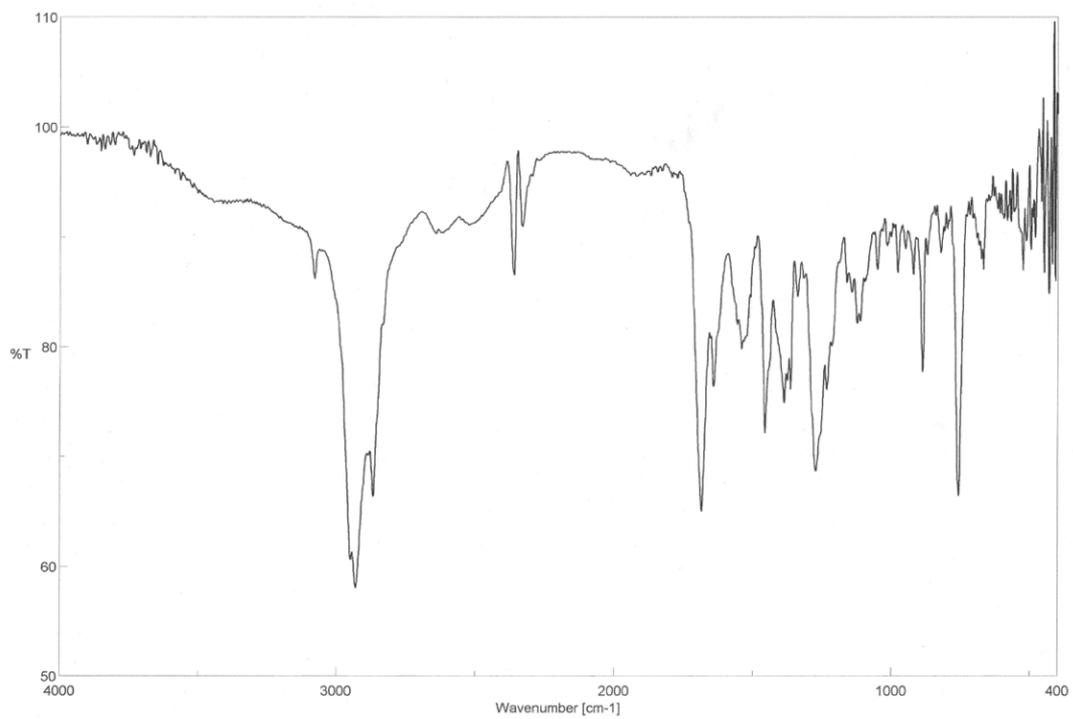


Figure 2-18. Enhygromic acid の IR スペクトル (film)

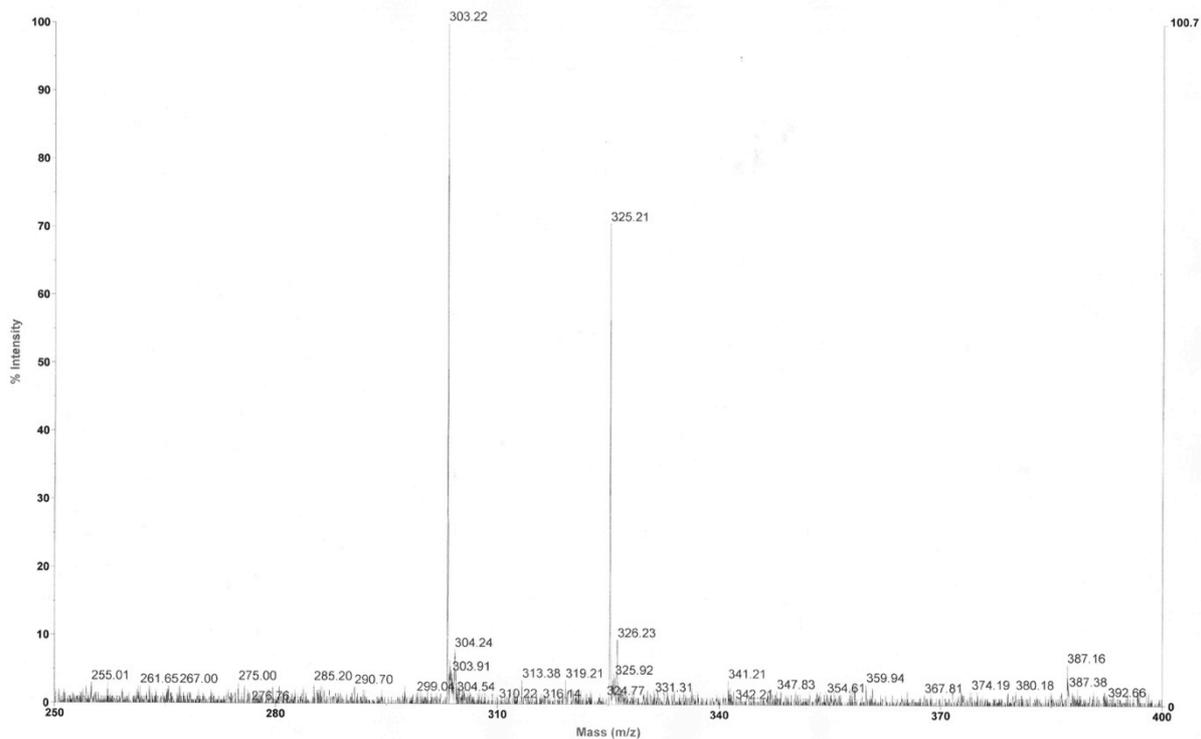


Figure 2-19. Enhygromic acid の ESI-TOF-MS (+)スペクトル

2-3. TO-II-138-2 の構造解析

TO-II-138-2 は、その ^{13}C NMR ケミカルシフトが文献値³²と完全に一致したため (Table 2-3)、cholesta-7,24-dien-3-ol と決定した (Figure 2-20)。 ^1H NMR より、同時に得られた TO-II-138-1 および TO-II-138-3 も TO-II-138-2 と同様にステロイド化合物と考えられたが、主成分ではなかったため構造は未決定である。

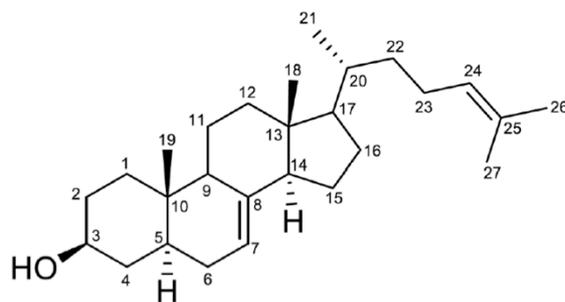


Figure 2-20. Cholesta-7,24-dien-3-ol の構造

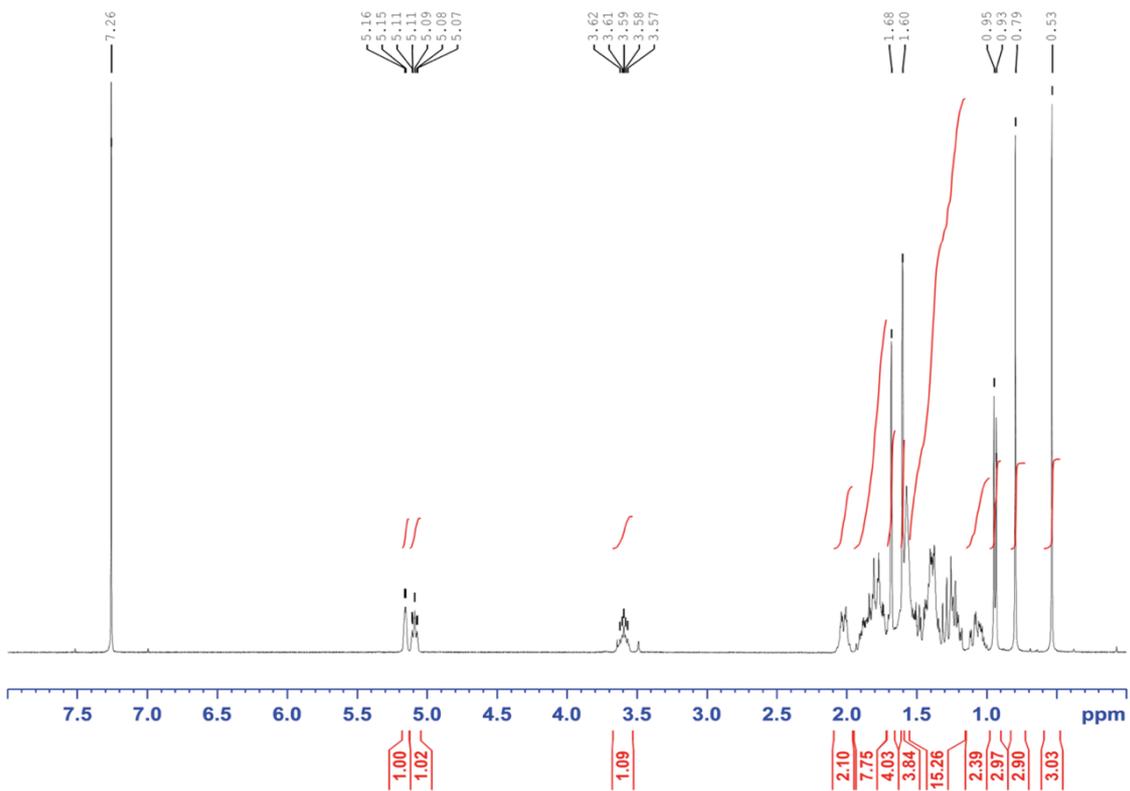


Figure 2-21. TO-II-138-2 の ^1H NMR スペクトル (400 MHz, CDCl_3)

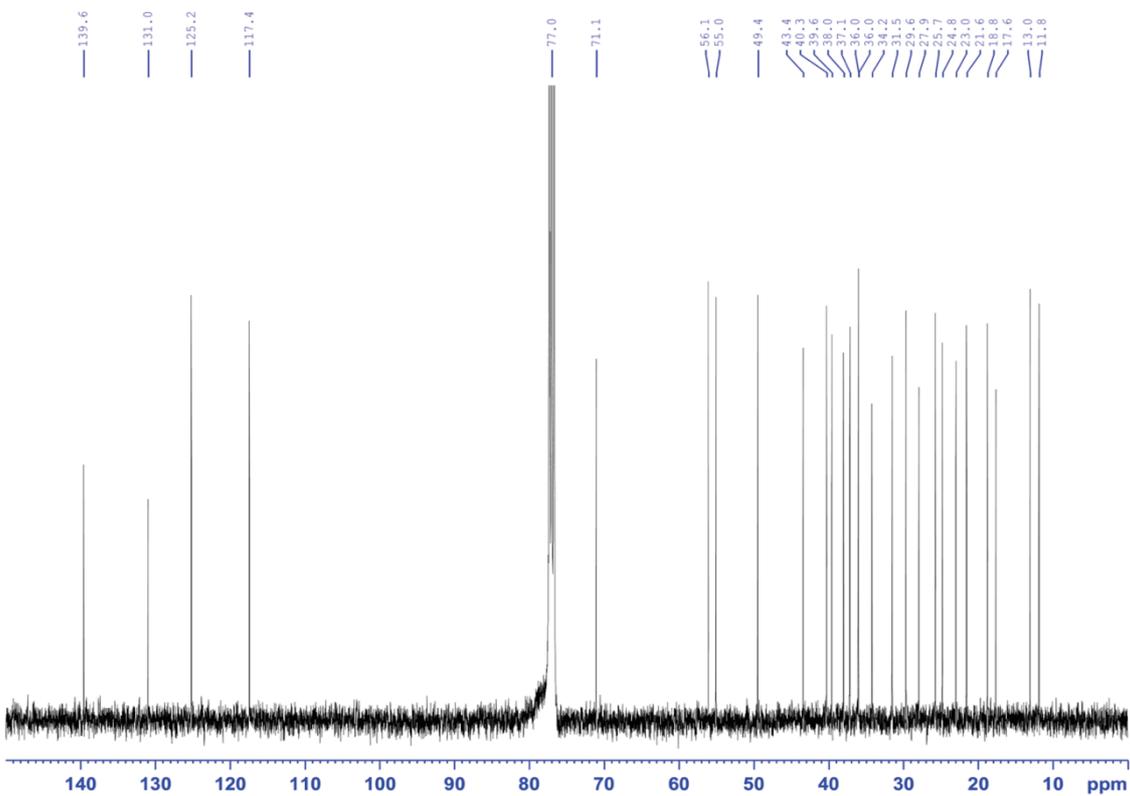


Figure 2-22. TO-II-138-2 の ^{13}C NMR スペクトル (100 MHz, CDCl_3)

Table 2-3. TO-II-138-2 の ^{13}C NMR ケミカルシフトと文献値³²の比較

Position	TO-II-138-2 (100 MHz, CDCl_3)	Ref. (125 MHz, CDCl_3)	差
1	37.1	37.1	0
2	31.5	31.5	0
3	71.1	71.1	0
4	38	38	0
5	40.2	40.2	0
6	29.6	29.6	0
7	117.4	117.4	0
8	139.6	139.6	0
9	49.4	49.4	0
10	34.2	34.2	0
11	21.5	21.5	0
12	39.5	39.5	0
13	43.4	43.4	0
14	55	55	0
15	23	23	0
16	27.9	27.9	0
17	56	56	0
18	11.8	11.8	0
19	13	13	0
20	36	36	0
21	18.7	18.7	0
22	36	36	0
23	24.8	24.8	0
24	125.2	125.2	0
25	131	131	0
26	25.7	25.7	0
27	17.6	17.6	0

2-4. TO-II-79-4 の構造解析

TO-II-79-4 の構造は、各種スペクトル解析により決定した (Figure 2-23)。TO-II-79-4 の重ベンゼン (C_6D_6) 中の 1H および ^{13}C NMR データを Table 2-3 に示した。二次元 NMR 解析および文献検索より、TO-II-79-4 は既知化合物 cholesta-5,7,24-trien-3-ol (7-dehydrodesmosterol) と考えられた。また MS 解析より、cholesta-5,7,24-trien-3-ol のナトリウム付加体と考えられる m/z 405.3 $[M+Na]^+$ が検出された (Figure 2-29)。しかしながら、cholesta-5,7,24-trien-3-ol の NMR データが文献から入手できなかったため、完全に比較することはできなかった。そこで測定溶媒を $CDCl_3$ に変更し、cholesta-5,7,24-trien-3-ol と類縁化合物の NMR データを比較することにした (Figure 2-30、2-31)。まずステロイド核の A-D 環の ^{13}C NMR ケミカルシフトについて検討した。cholesta-5,7,24-trien-3-ol は、B 環に共役した 2 つの二重結合を有している。そこで文献³¹ からこの構造を持つ cholesta-5,7-dien-3-ol を選定し、TO-II-79-4 と比較した (Table 2-4)。その結果、両化合物のケミカルシフトは良好な一致を示したため、A-D 環の構造は、 $\Delta^{5,7}$ であると決定した。次にステロイド核側鎖部分の構造について解析した。構造解析より、TO-II-79-4 は側鎖部分に二重結合を 1 つ有していると考えられたため、A-D 環の場合と同様に、類似化合物 cholesta-7,24-dien-3-ol と TO-II-79-4 の側鎖部分のケミカルシフトと比較した (Table 2-5)。その結果、両者は良好な一致を示したため、側鎖部分は Δ^{24} と決定した。以上より、TO-II-79-4 は既知化合物 cholesta-5,7,24-trien-3-ol であると結論付けた。

Table 2-4. TO-II-79-4 の ^1H および ^{13}C NMR データ (C_6D_6)

Position	δ_{C} (150 MHz)	$\delta_{\text{H mult.}}$ (J in Hz) (600 MHz)
1	38.7	1.12 m, 1.67 m
2	32.4	1.36 m, 1.69 m
3	70.2	3.44 m
4	41.3	2.23 m, 2.38 m
5	140.3	
6	120.0	5.60 dd (5.6, 2.3)
7	117.2	5.50 m
8	140.8	
9	46.6	1.93 m
10	37.3	
11	21.4	1.43 m, 1.63 m
12	39.5	1.12 m, 2.03 m
13	43.1	
14	54.7	1.80 m
15	23.4	1.41 m, 1.66 m
16	28.4	1.28 m, 1.88 m
17	56.1	1.15 m
18	12.0	0.65 s
19	16.4	0.93 s
20	36.3	1.42
21	19.0	1.01 d (6.5)
22	36.5	1.15 m, 1.54 m
23	25.2	1.99 m, 2.15 m
24	125.7	5.27 t (7.0)
25	130.9	
26	25.9	1.70 s
27	17.7	1.61 s

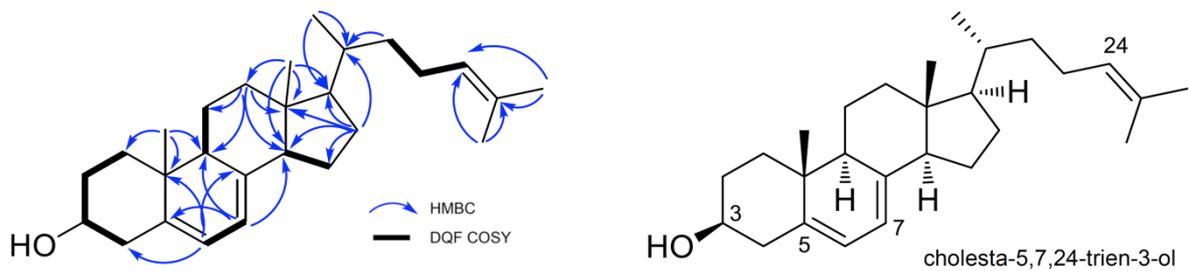


Figure 2-23. TO-II-79-4 (cholesta-5,7,24-trien-3-ol) の二次元 NMR 相関と構造

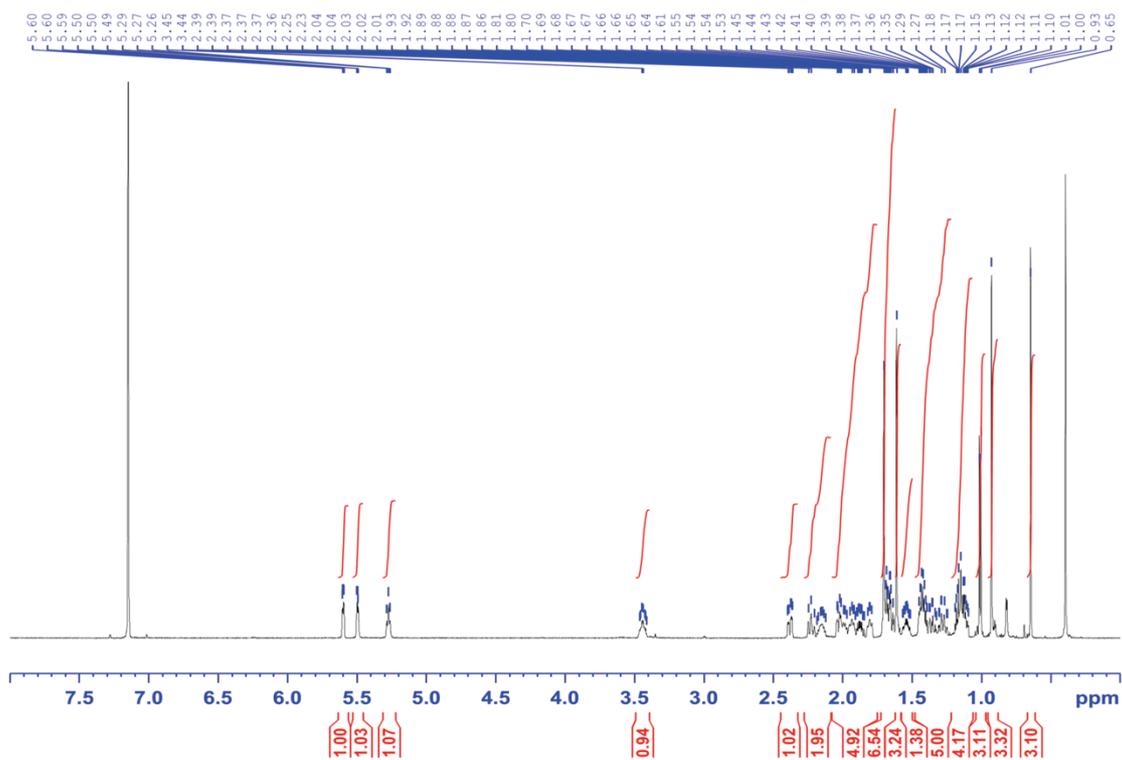


Figure 2-24. TO-II-79-4 の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, C_6D_6)

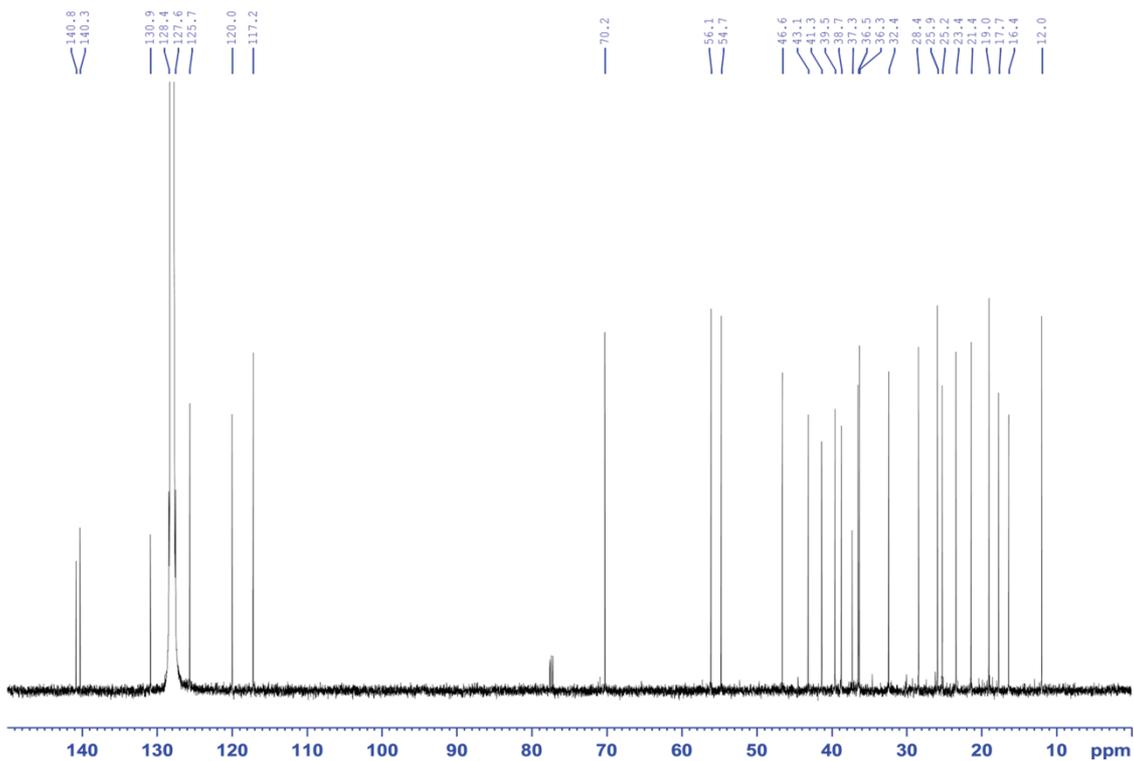


Figure 2-25. TO-II-79-4 の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, C_6D_6)

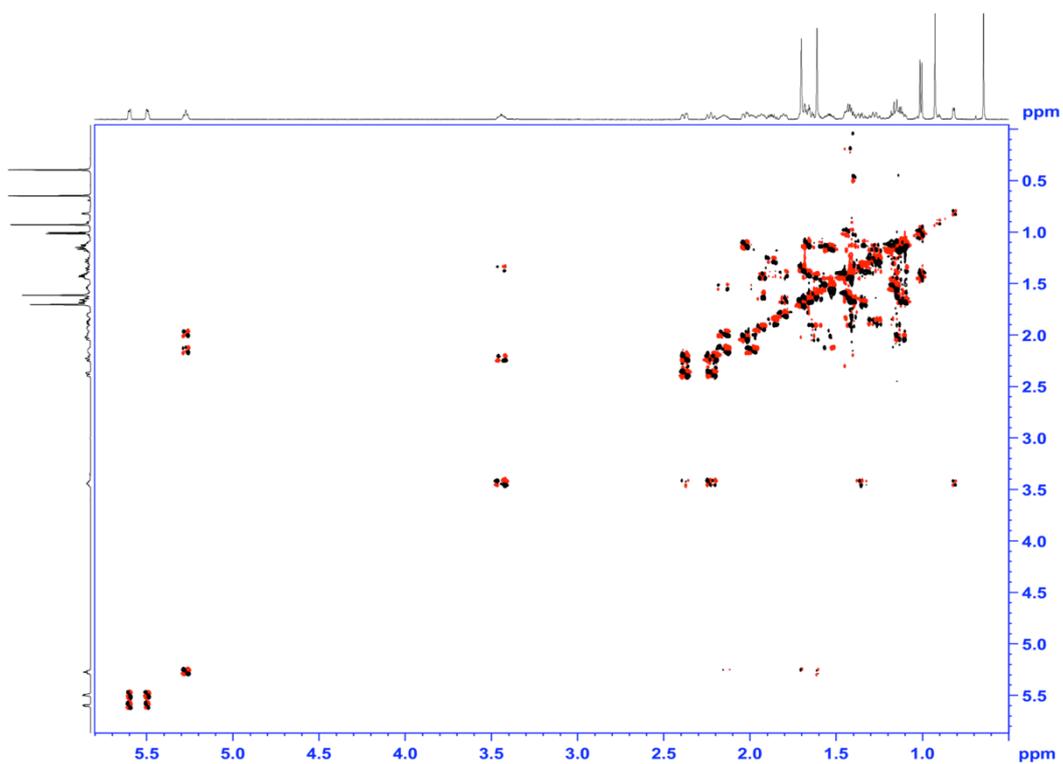


Figure 2-26. TO-II-79-4 の DQF-COSY (600 MHz, C_6D_6)

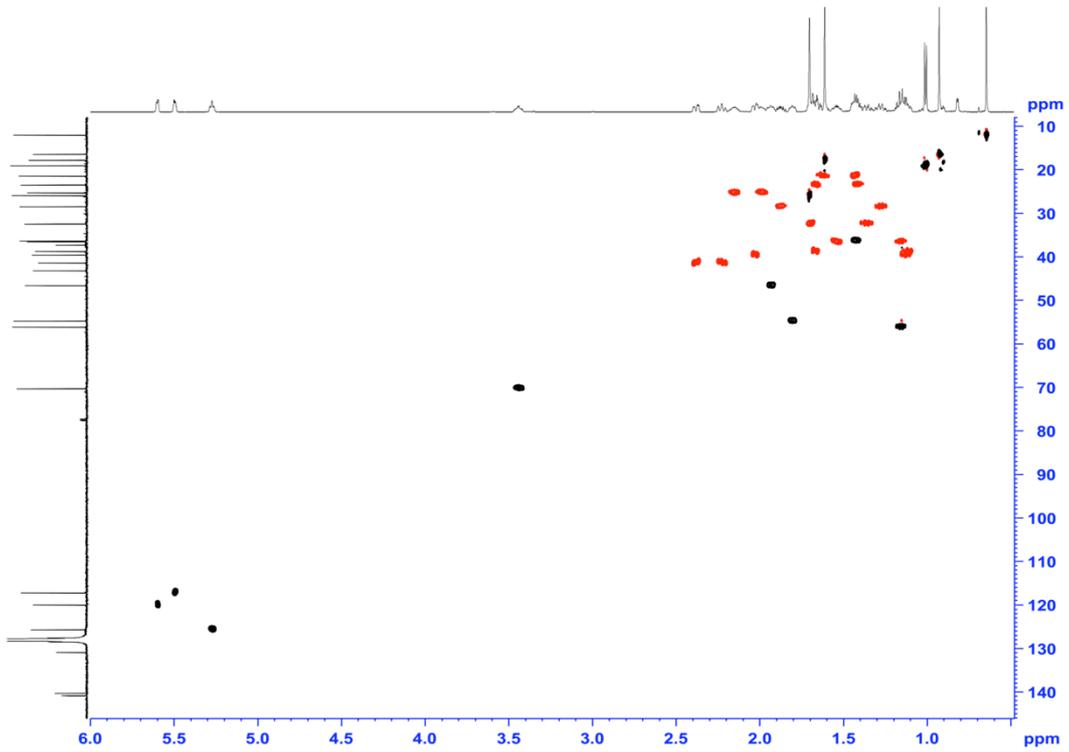


Figure 2-27. TO-II-79-4 の HSQC スペクトル (600 MHz, C₆D₆)

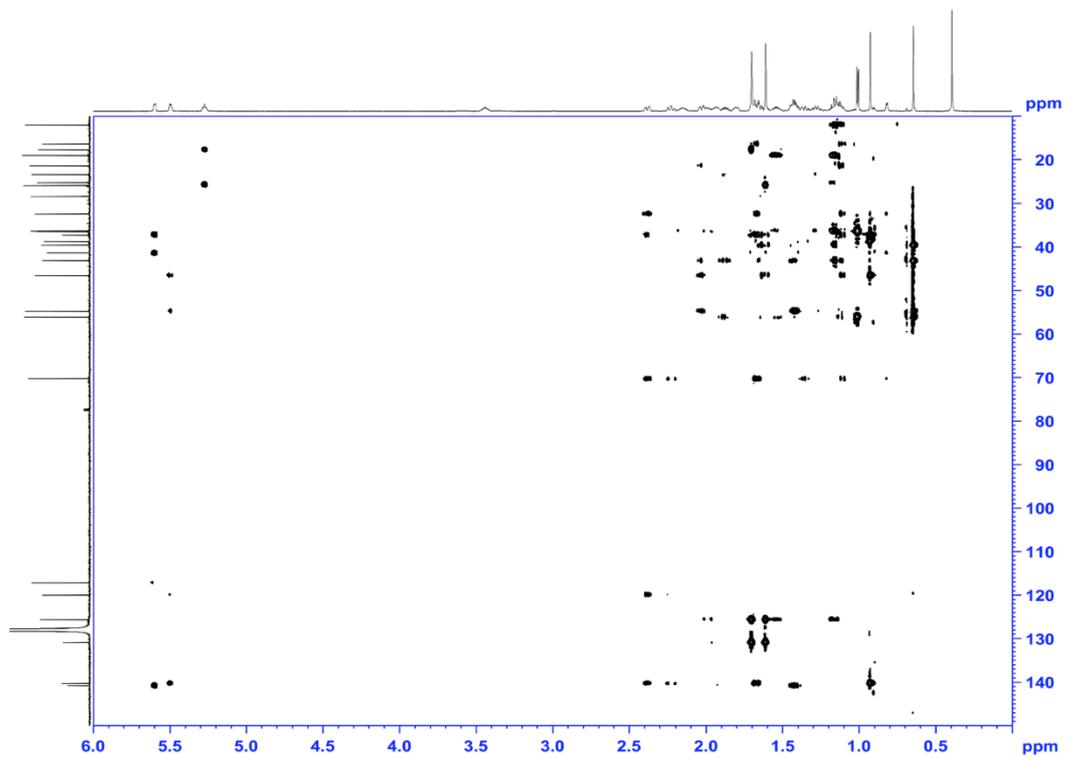


Figure 2-28. TO-II-79-4 の HMBC スペクトル (600 MHz, C₆D₆)

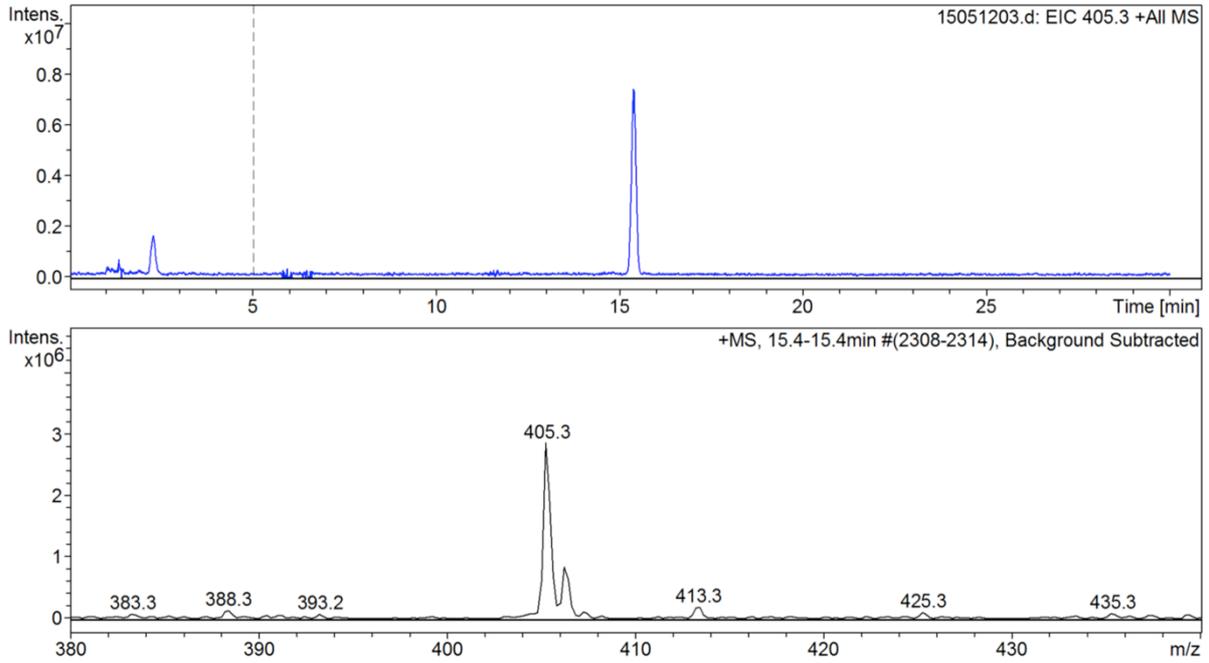


Figure 2-29. TO-II-79-4 の LC-ESI-IT-MS (+)スペクトル

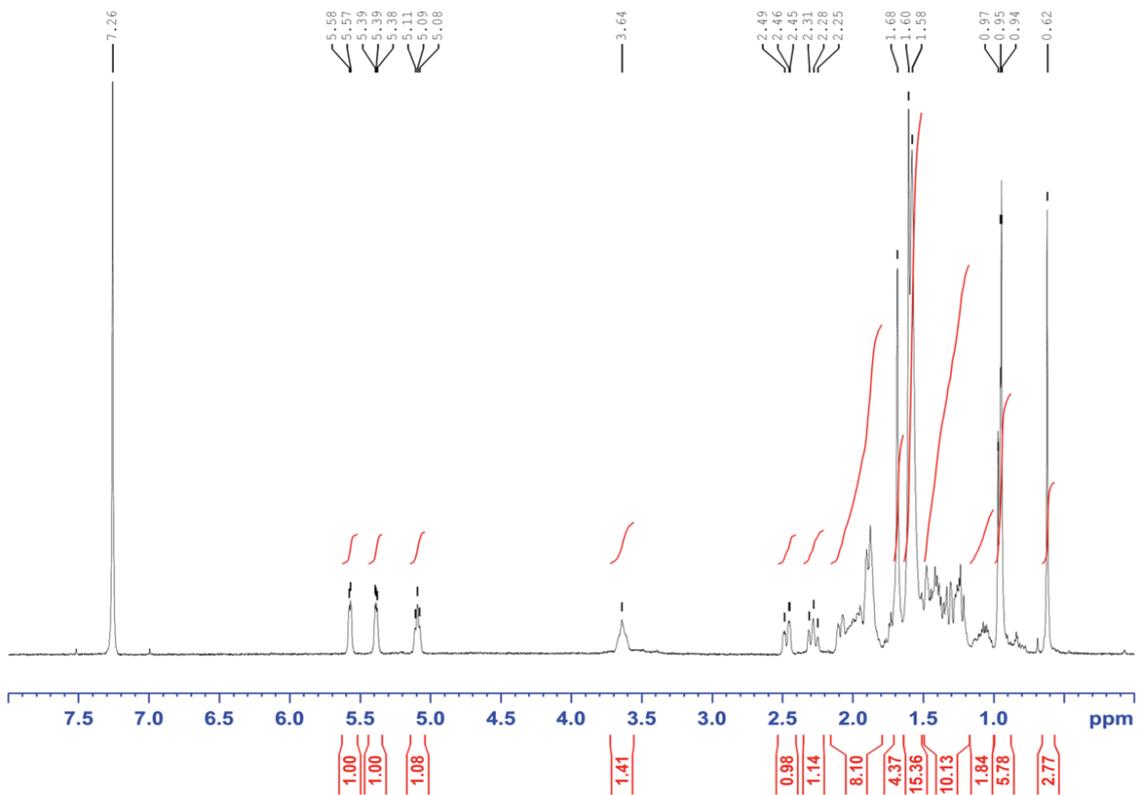


Figure 2-30. TO-II-79-4 の ^1H NMR スペクトル (400 MHz, CDCl_3)

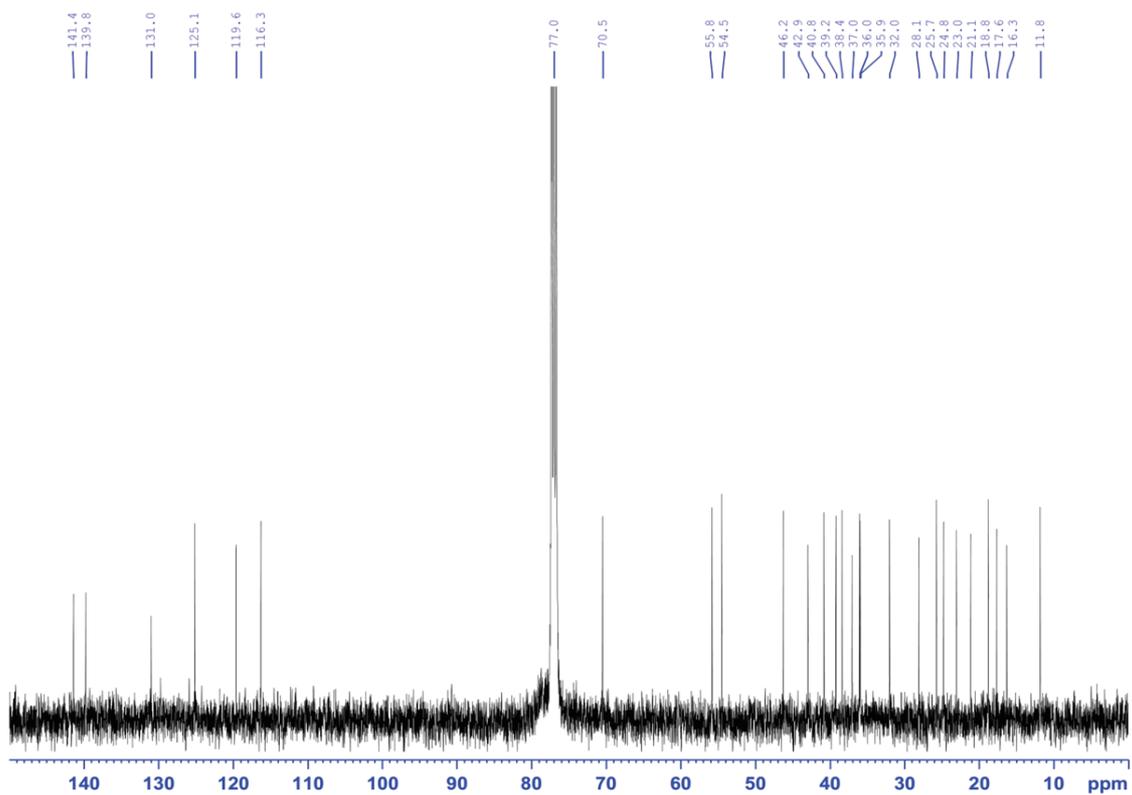


Figure 2-31. TO-II-79-4 の ^{13}C NMR スペクトル (100 MHz, CDCl_3)

Table 2-5. TO-II-79-4 の ^{13}C NMR ケミカルシフト値と文献値³¹

Position	TO-II-79-4 (100 MHz, CDCl_3)	Ref. (125 MHz, CDCl_3)	差
(環状部分)			
1	38.4	38.4	0.0
2	32.0	32.0	0.0
3	70.5	70.4	0.1
4	40.8	40.8	0.0
5	139.8	139.7	0.1
6	119.6	119.6	0.0
7	116.3	116.2	0.1
8	141.4	141.4	0.0
9	46.2	46.2	0.0
10	37.0	37.0	0.0
11	21.1	21.1	0.0
12	39.2	39.2	0.0
13	42.9	42.9	0.0
14	54.5	54.5	0.0
15	23.0	23.0	0.0
16	28.1	28.1	0.0
17	55.8	55.8	0.0
18	11.8	11.8	0.0
19	16.3	16.3	0.0
(側鎖部分)			
20	35.9	36	-0.1
21	18.8	18.7	0.1
22	36	36	0
23	24.8	24.8	0
24	125.1	125.2	-0.1
25	131	131	0
26	25.7	25.7	0
27	17.6	17.6	0

2-5. ステロイド化合物の由来

一般的にバクテリアはステロイド化合物を生産しないため、単離したステロイド化合物 TO-II-138-2 (cholesta-7,24-dien-3-ol)、TO-II-79-4 (cholesta-5,7,24-trien-3-ol) は培地に加えた乾燥酵母由来である可能性が考えられる。そこでこれらステロイド化合物の由来を調べるために、菌体のみおよび乾燥酵母を抽出した後、その成分を HPLC 分析し、純粋なステロイド化合物と比較した (Figure 2-32)。その結果、乾燥酵母抽出物中には単離したステロイド化合物と思われるピークは確認できなかった。また粘液細菌からは、過去にステロイド化合物が報告されている³³⁻³⁶。以上より、本研究で単離した既知ステロイド化合物は、*E. niigataensis* SNB-1 が生産していると判断した。また、過去に報告されたステロイド化合物は全て陸性粘液細菌由来であり、海洋性粘液細菌からの報告はまだなく、本研究が初めての報告である。

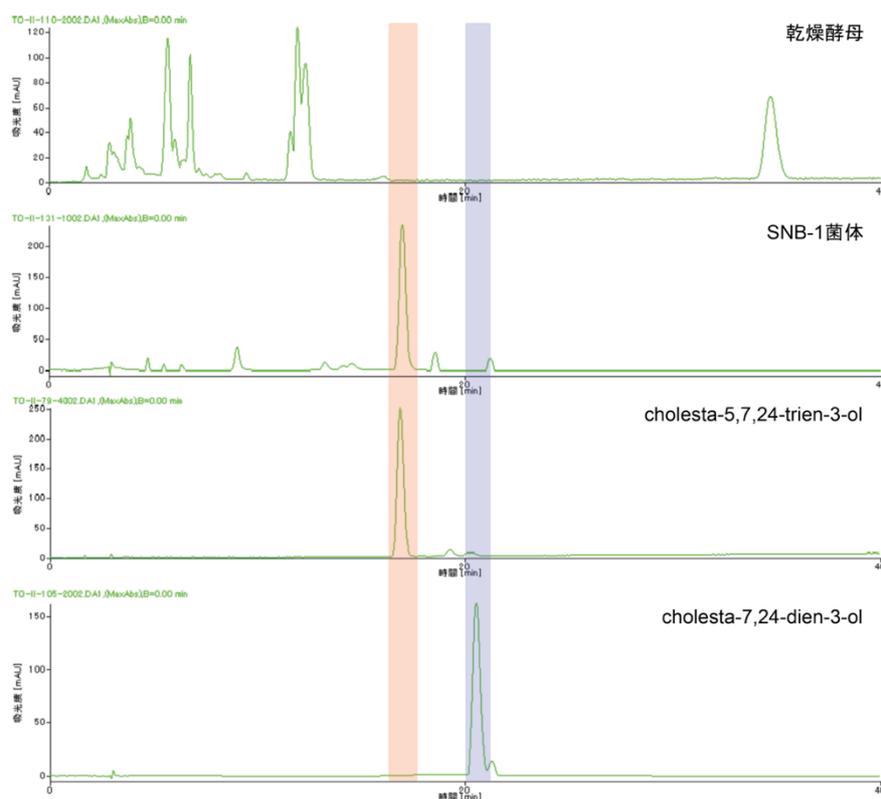


Figure 2-32. 乾燥酵母および SNB-1 菌体抽出物とステロイド化合物の HPLC 分析

2-6. TO-II-79-4 と TO-II-138-2 の細胞毒性

単離したステロイド化合物の細胞毒性を HeLa 細胞および B16 メラノーマ細胞を用いた MTT アッセイで評価した (Figure 2-33)。その結果、分離前 (TO-II-65-10、TO-II-65-11) は細胞毒性が確認されていたものの、両化合物に顕著な細胞毒性は確認できなかった。

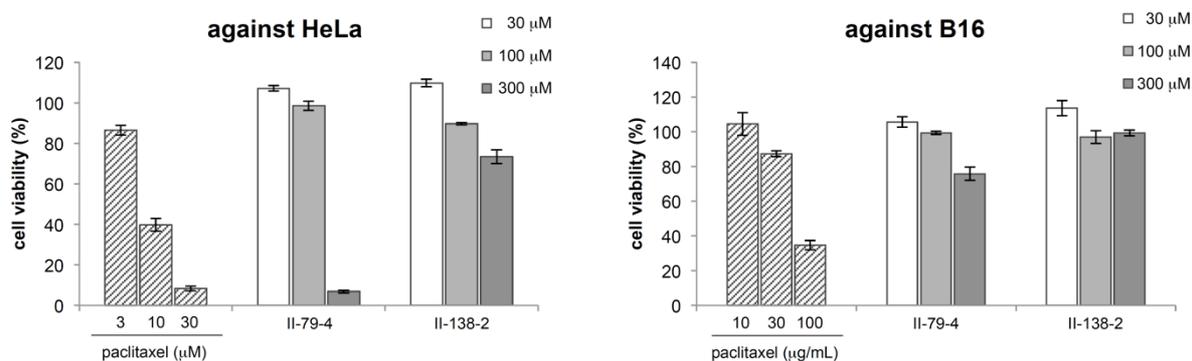
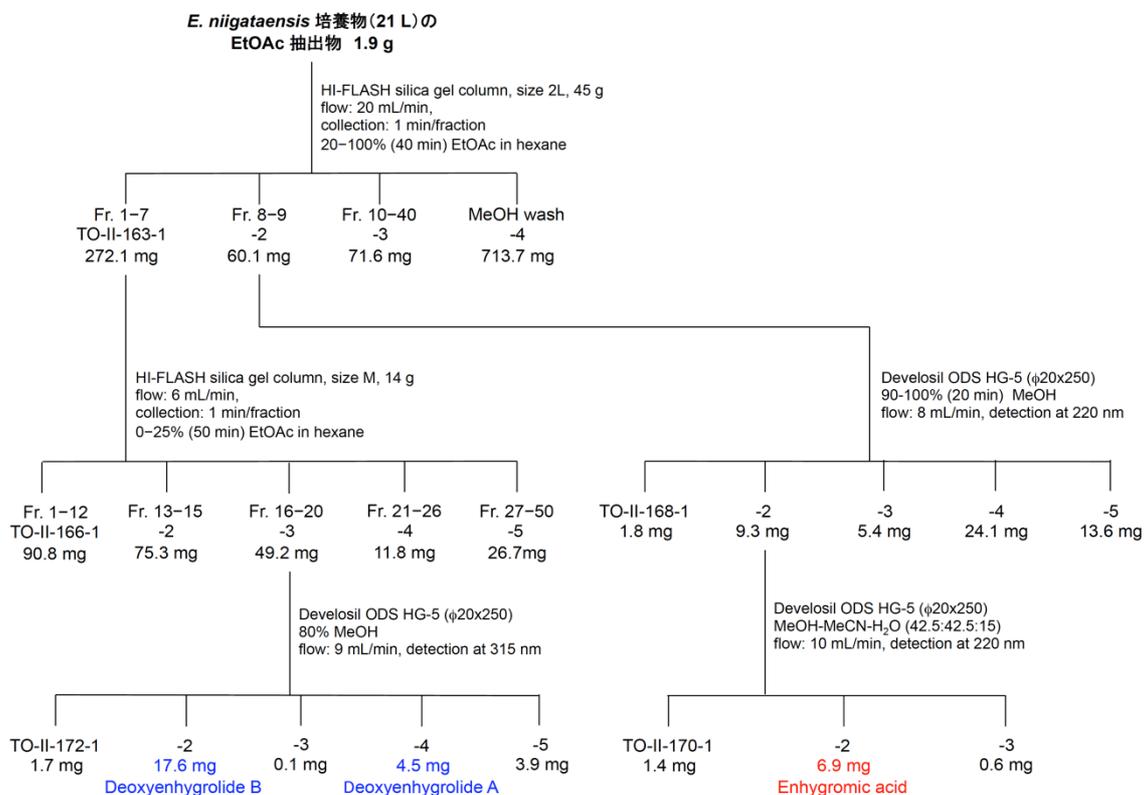


Figure 2-33. TO-II-79-4 および TO-II-138-2 の細胞毒性

2-7. Enhygromic acid の量上げ

上記で分離した enhygromic acid の絶対配置を決定するために、量上げを行った。0.1% (w/v) 酢酸ナトリウムを添加した VY/2-SWS 寒天培地で 2 週間培養した *Enhygromyxa niigataensis* SNB-1 を 2% 塩化ナトリウムおよび 100 mM 酢酸ナトリウムを含む VY/4-SWS 液体培地に植菌し 3 週間振盪培養した。21 L の培養液から脂溶性エキス 1.9 g が得られ、これをシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーで分離することで、TO-II-163 シリーズを得た。分析 HPLC より、TO-II-163-2 に enhygromic acid が含まれていることが確認できたため、これを 2 回の逆相 HPLC で分離し (Figure 2-34、Figure 2-35)、enhygromic acid (TO-II-170-2) が 6.9 mg 得られた (Scheme 2-3)。Enhygromic acid が得られたことは TO-II-85-2 と TO-II-170-2 の ^1H NMR を比較するこ

とで確認した (Figure 2-36)。



Scheme 2-3. Enhygromic acid の量上げ

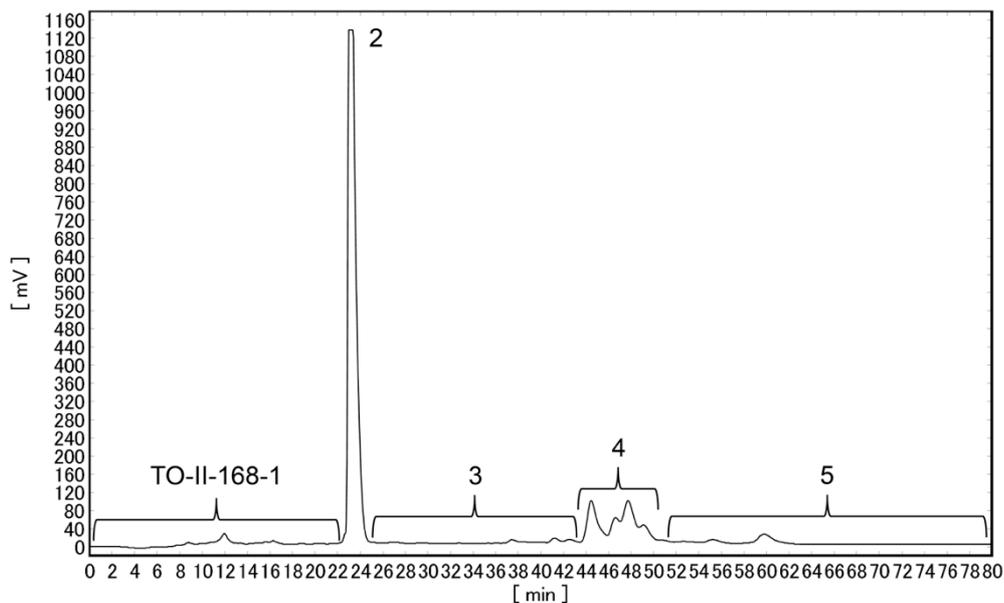


Figure 2-34. TO-II-168 シリーズの HPLC 分取チャート

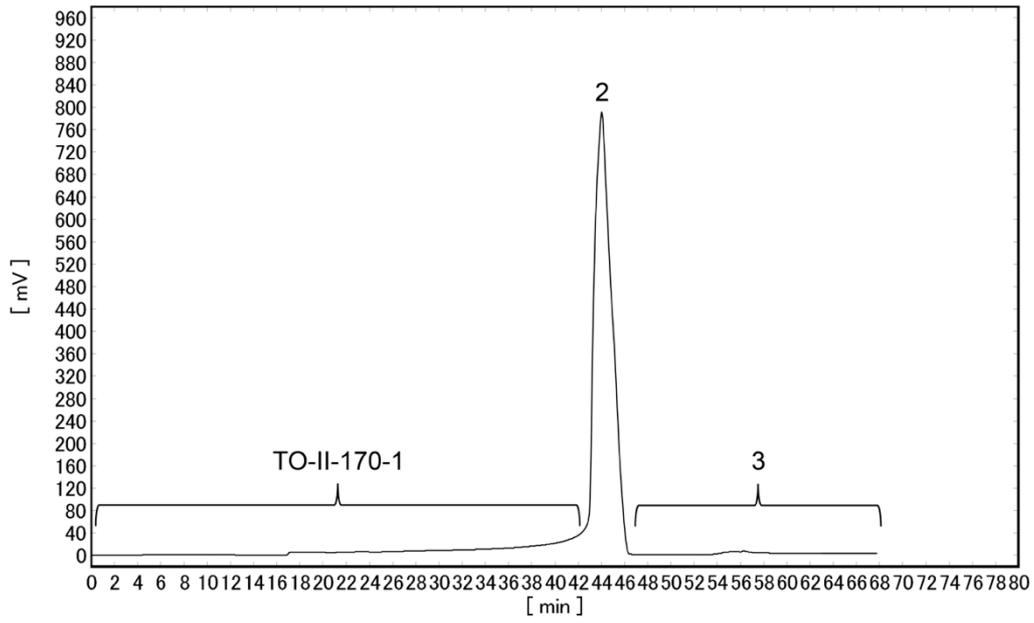


Figure 2-35. TO-II-170 シリーズの HPLC 分取チャート

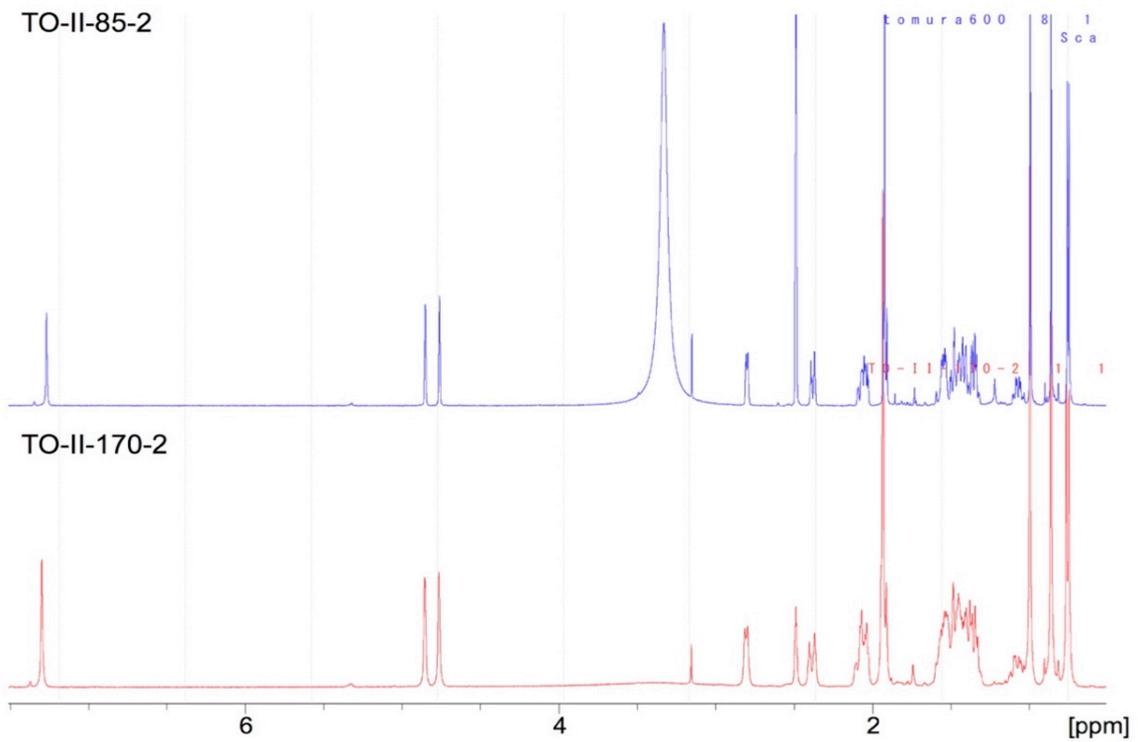


Figure 2-36. TO-II-85-2 (600 MHz、DMSO- d_6) と TO-II-170-2 (400 MHz、DMSO- d_6) の ^1H NMR の比較

2-8. Enhygromic acid の絶対配置の決定

Enhygromic acid の絶対配置を決定するために、まず C3-C4 結合を 15° ずつ回転させねじれ角を変化させることによって生じる全ての配座異性体のエネルギー値を最小化し、配座解析を行った。結果として、エネルギーが最小化された 2 つの配座異性体 **A**、**B** のみが得られ、**A** は **B** よりも約 14 kcal/mol 低いエネルギー値を示した (Figure 2-37)。また **A** は NOESY 相関を強く支持していた (Figure 2-10B)。次にアクリル酸部分と C-6 位のエキソメチレン間の電気遷移モーメントの方向を得るために CD スペクトル解析を行った。その結果、スプリット型の負のコットン効果が 226 nm ($\Delta\epsilon - 9.0$) と 196 nm ($\Delta\epsilon + 8.0$) に観測された (Figure 2-38)。上記で述べた配座解析と CD スペクトル解析の結果を合わせることで、enhygromic acid の絶対配置は 4*S*,5*S*,9*R*,10*R*,13*S* と決定した。興味深いことに、C-2 および C-3 位の ¹³C NMR シグナルは弱くブロードで観測された。これは縮重した三環の中心である C-4 位に結合したメチルアクリル酸部分の自由回転が、生じる立体障害によって制限されているためだと考えられる。この現象は、enhygromic acid のユニークな構造を支持している。

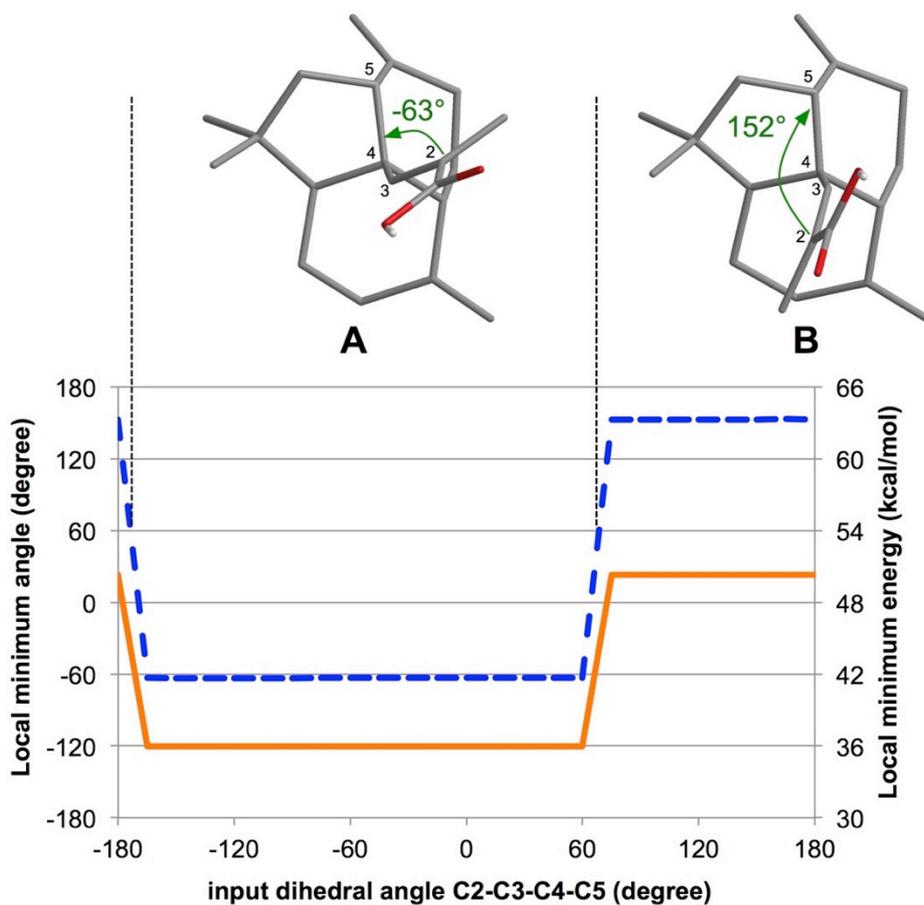


Figure 2-37. Enhygromic acid の配座異性体 **A**、**B** と MM2 最小化エネルギー（オレンジ色）と最小化後の二面角（青色）

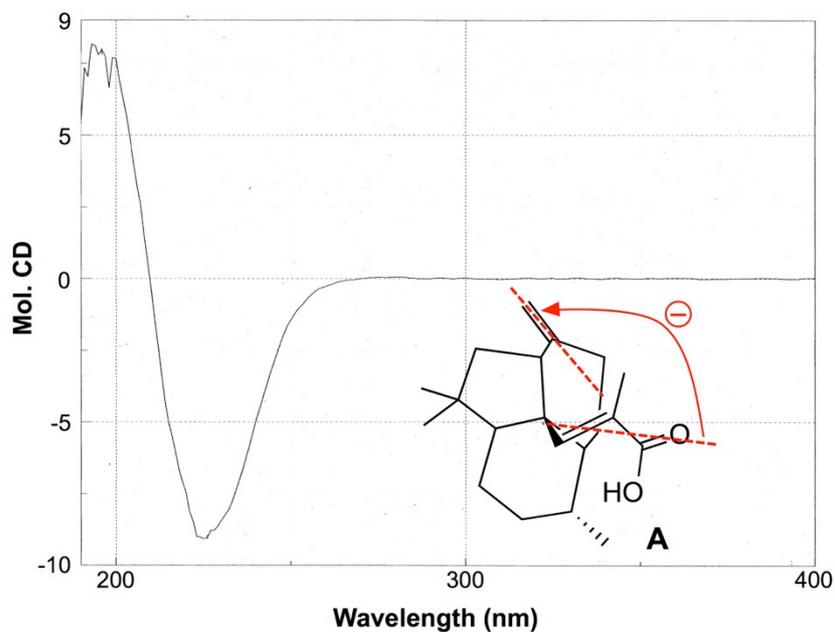
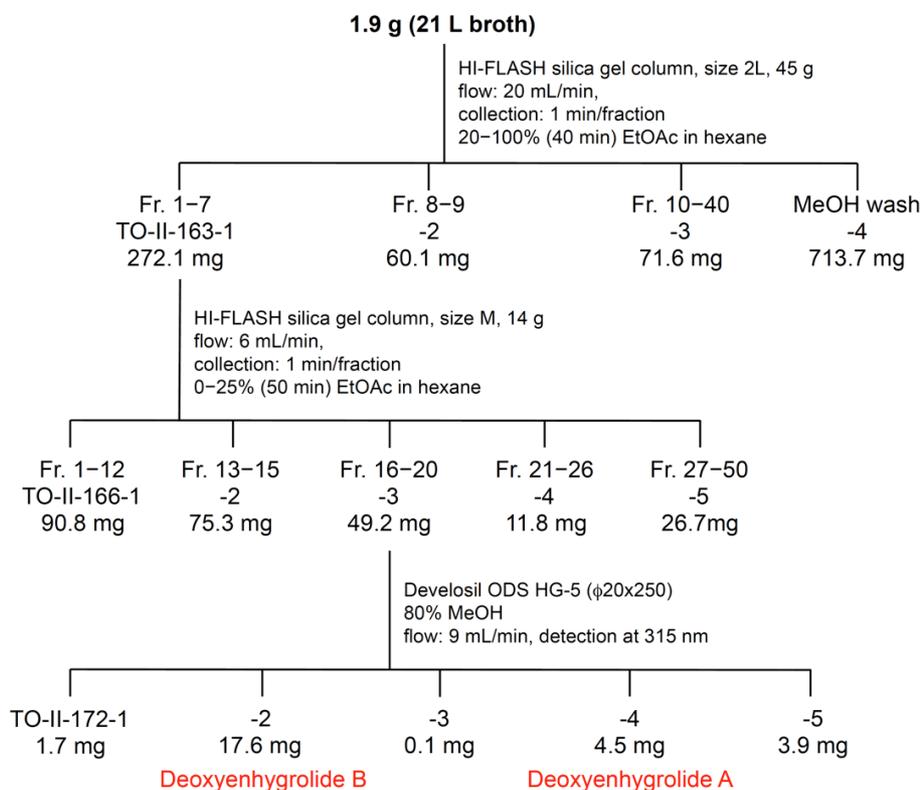


Figure 2-38. Enhygromic acid の CD スペクトル

2-9. Deoxyhygrolide A および B の単離

Enhygromic acid の分離過程で得られた TO-II-163-1 (272.1 mg, Scheme 2-3) を HPLC で分析したところ、興味深い UV 吸収を持つピークが 2 種類 (λ_{\max} 300、331 nm) 確認されたため、分離することにした。TO-II-163-1 をヘキサン-EtOAc 系を用いて再度フラッシュカラムクロマトグラフィーで分離し、5 フラクション (TO-II-166 シリーズ) を得た (Scheme 2-4)。これらのうち、目的の吸収を持つピークが確認された TO-II-166-3 を MeOH-水系を用いた ODS-HPLC で分離し (Figure 2-39)、TO-II-172-2 (17.6 mg) および TO-II-172-4 (4.5 mg) を得た (Scheme 2-4)。各種 NMR および MS 解析より、TO-II-172-2 および TO-II-172-4 は、既知化合物 enhygrolide A および B の新規類縁体であったため、TO-II-172-4 を deoxyhygrolide A、TO-II-172-2 を deoxyhygrolide B と命名した。



Scheme 2-4. Deoxyhygrolide A および B の単離

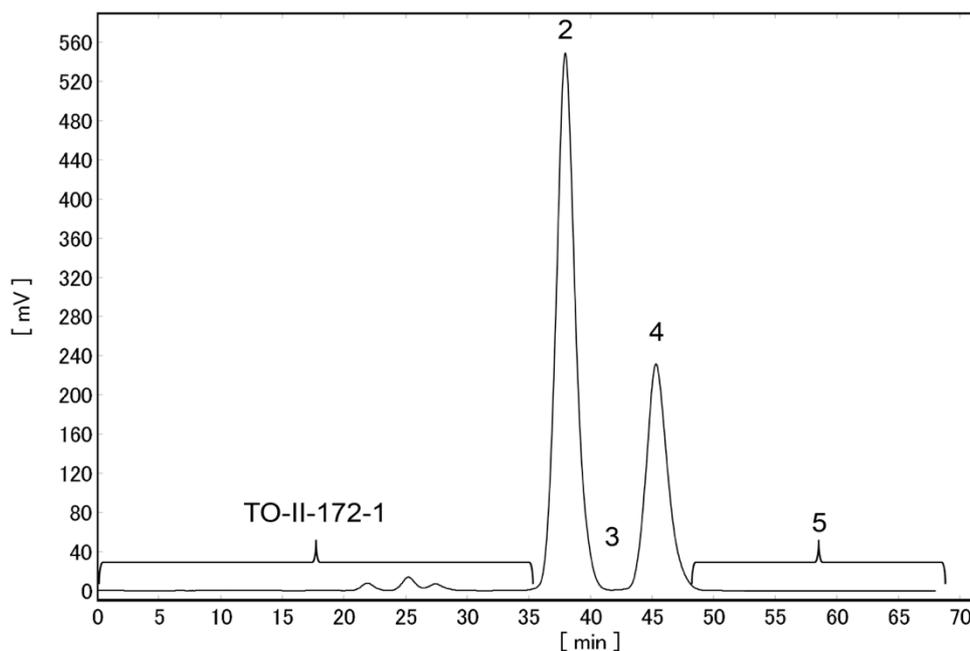


Figure 2-39. TO-II-172 シリーズの分取 HPLC チャート

2-10. Deoxyenygrolide A および B の構造解析

Deoxyenygrolide A と B の構造は各種スペクトル解析により決定した。高分解能 ESI-TOF-MS より、両化合物はともに分子式が $C_{22}H_{22}O_2$ であることがわかった。

Deoxyenygrolide A は IR スペクトルで 1760 cm^{-1} に吸収が観測されたことから、カルボニル基を有することが示唆された。Deoxyenygrolide A の物理化学的性質および NMR データは、以下の Table 2-6 と Table 2-8 にそれぞれ示した。DQF-COSY の相関から、3つの部分構造すなわち2つの C_6H_5- と $-CH_2-CH(CH_3)_2$ を得た。これらの部分構造と5つの4級炭素 (δ_C 127.5、133.8、138.4、149.2、152.0)、カルボニル炭素 (δ_C 169.8)、 sp^3 メチレン (δ_C 30.1)、 sp^2 メチン (δ_C 109.0) を HMBC 相関より結び合わせ、deoxyenygrolide A の平面構造を得た (Figure 2-40)。C-4 位の二重結合の幾何異性は H-5 と H-19 の NOESY 相関が観測されたため Z 配置であると決定した。

Deoxyenygrolide B の構造は deoxyenygrolide A と同様の方法で決定した (Figure

2-40)。deoxyenhygrolide B の物理化学的性質と NMR データは、以下の Table 2-7 と Table 2-8 にそれぞれ示した。Deoxyenhygrolide A と対照的に、deoxyenhygrolide B の C-4 位の二重結合の幾何異性は H-5 と H-19 の NOESY 相関が観測されなかったため *E* 配置であると決定した。Deoxyenhygrolide A および B は、既知化合物 enhygrolide 類のフェノール水酸基が水素に置き換わった新規 enhygrolide 類縁体であった。Enhygrolide A (*Z* 体) は enhygrolide B (*E* 体) よりも安定で、*E* 体から *Z* 体への異性化が起こると報告されている³⁰。しかしながら、本研究では、deoxyenhygrolide B (*E* 体) から deoxyenhygrolide A (*Z* 体) への異性化は確認されず、deoxyenhygrolide B (*E* 体) の収量は deoxyenhygrolide A (*Z* 体) のおよそ 4 倍であった。このことから、この化合物タイプでは、フェノール性水酸基が幾何異性体の安定性に影響を与えている可能性が考えられる。

Table 2-6. Deoxyenhygrolide A の物理化学的性質

Appearance	pale yellow oil
HR ESI-TOF-MS (+)	m/z 341.1512 [M + Na] ⁺ (calcd for C ₂₂ H ₂₂ O ₂ Na 341.1512)
IR (film)	ν_{\max} 3060, 3028, 1763, 1027, 693 cm ⁻¹
UV (MeCN)	λ_{\max} (ϵ) 229 (14,000), 329 (32,000) nm

Table 2-7. Deoxyenhygrolide B の物理化学的性質

Appearance	colorless oil
HR ESI-TOF-MS (+)	m/z 341.1499 [M + Na] ⁺ (calcd for C ₂₂ H ₂₂ O ₂ Na 341.1512)
IR (film)	ν_{\max} 3060, 3028, 1760, 1040, 723, 699 cm ⁻¹
UV (MeCN)	λ_{\max} (ϵ) 299 (27,000) nm

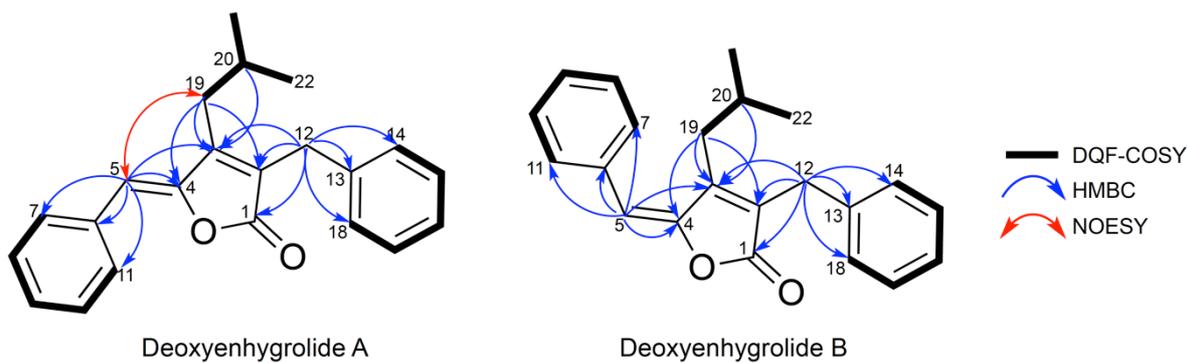


Figure 2-40. Deoxyenhygrolide A および B の二次元 NMR 相関

太線: DQF-COSY; 矢印: HMBC 相関; 両矢印: NOESY 相関

Table 2-8. Deoxyenhygrolide A および B の ^1H および ^{13}C NMR データ (C_6D_6)

position	Deoxyenhygrolide A		Deoxyenhygrolide B	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H mult.}} (J \text{ in Hz})^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H mult.}} (J \text{ in Hz})^{\text{b}}$
1	169.8		169.3	
2	127.5		132.5	
3	152		149.6	
4	149.2		150.2	
5	109	5.70 s	113.8	6.58 s
6	133.8		133.7	
7, 11	130.7	7.74 d (7.5)	129.5	6.82 m
8, 10	129	7.12 t (7.5)	128.3	6.96 m
9	128.7	7.01 t (7.5)	128	6.96 m
12	30.1	3.51 s	30.2	3.56 s
13	138.4		138.4	
14, 18	128.9	7.18 d (7.5)	128.9	7.25 d (7.5)
15, 17	128.9	7.10 t (7.5)	128.9	7.12 t (7.2)
16	126.8	7.02 t (7.5)	126.9	7.02 t (7.4)
19	33.6	1.92 d (7.4)	34.8	2.00 d (7.1)
20	29.1	1.55 non (6.6)	28.3	1.07 non (6.8)
21, 22	22.6	0.62 d (6.6)	22	0.33 d (6.6)

^aMesured at 100 MHz; ^bat 400 MHz.

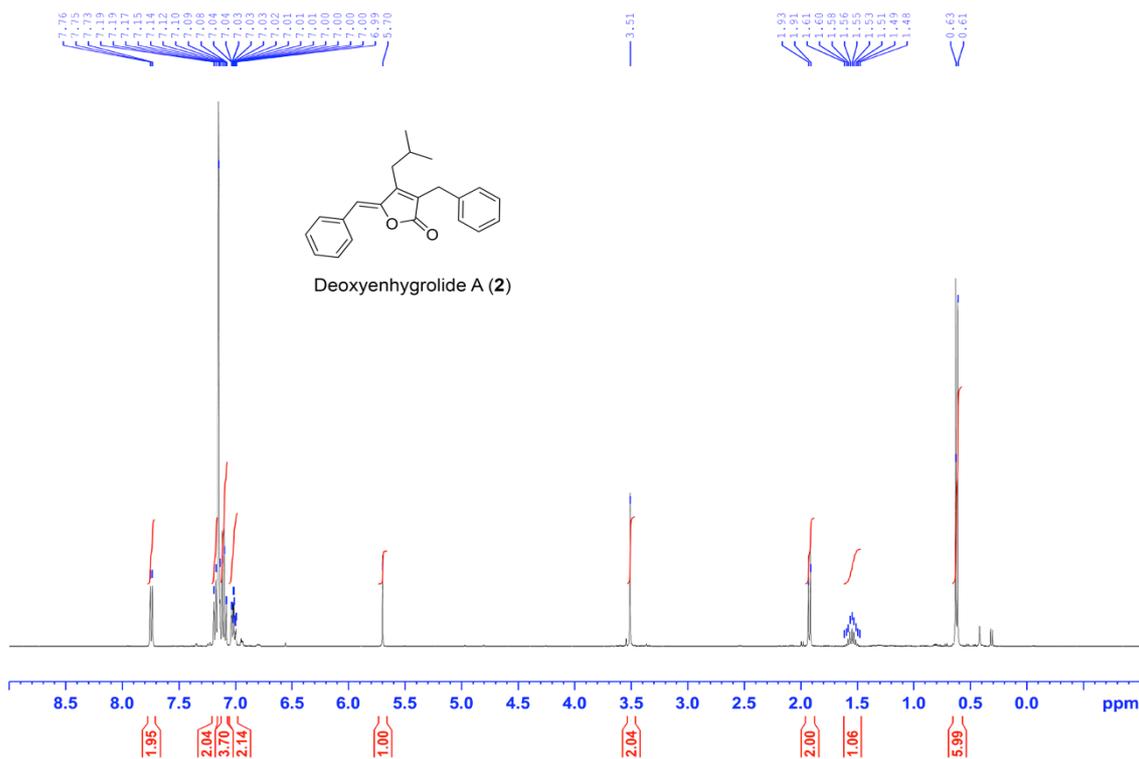


Figure 2-41. Deoxyenyngrolide A の ¹H NMR スペクトル (400 MHz, C₆D₆)

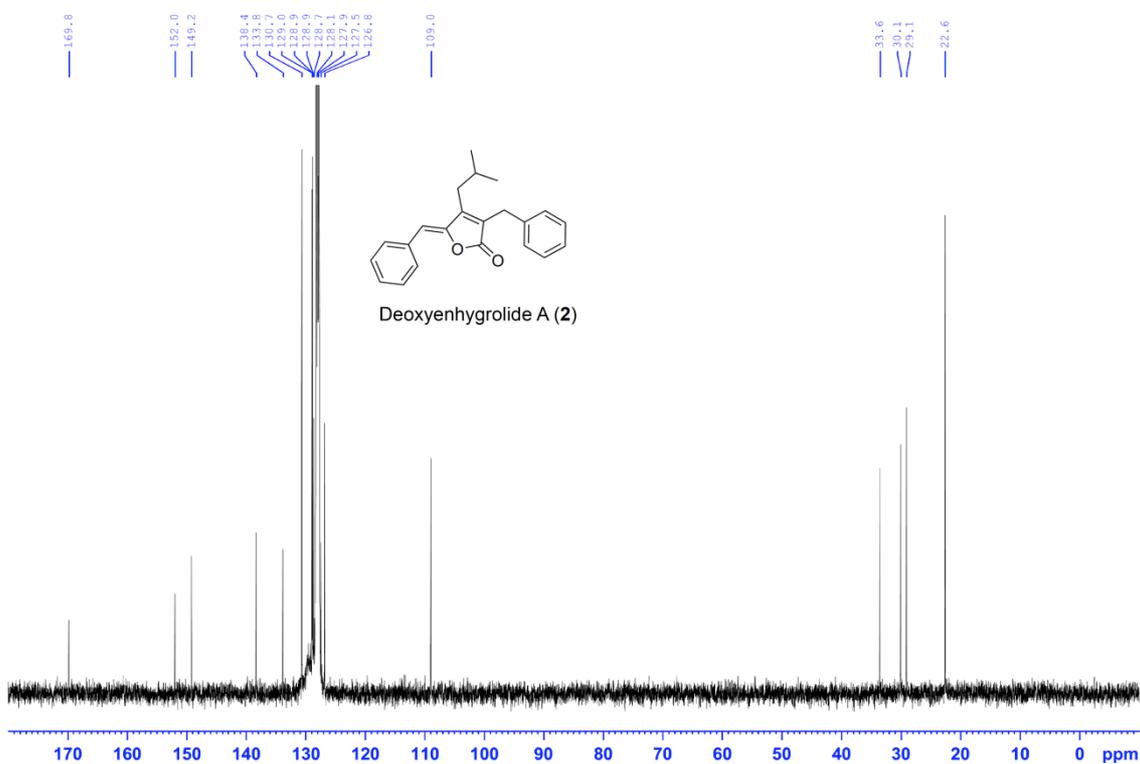


Figure 2-42. Deoxyenyngrolide A の ¹³C NMR スペクトル (100 MHz, C₆D₆)

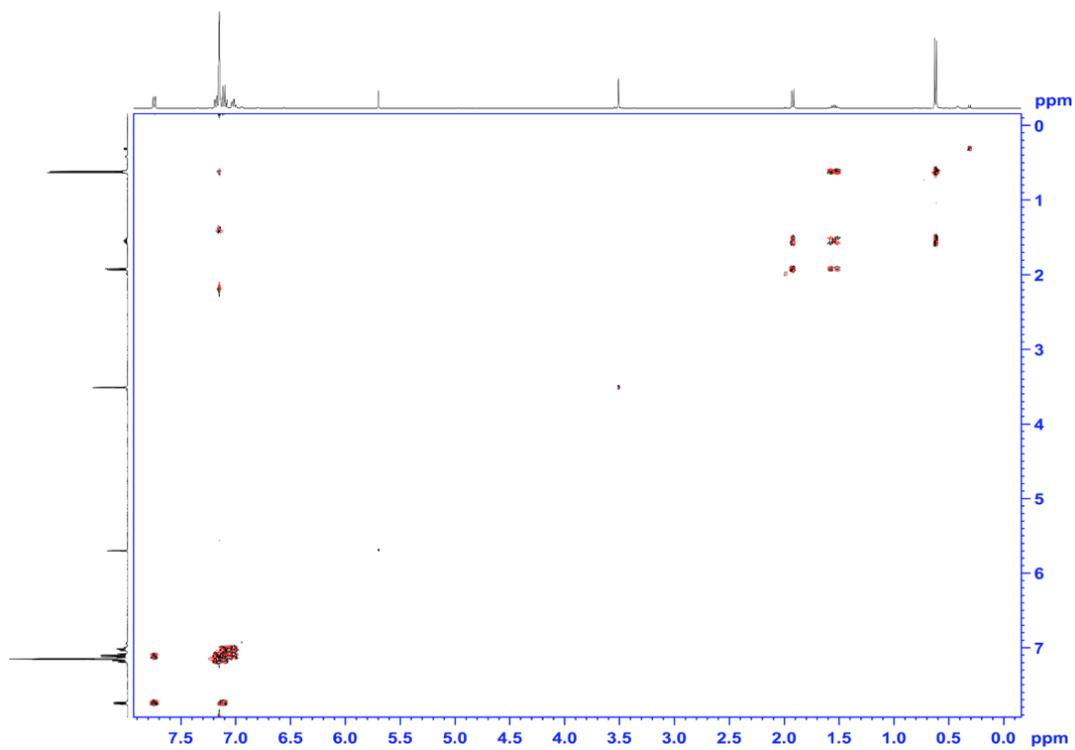


Figure 2-43. Deoxyenhygrolide A の DQF-COSY (400 MHz, C₆D₆)

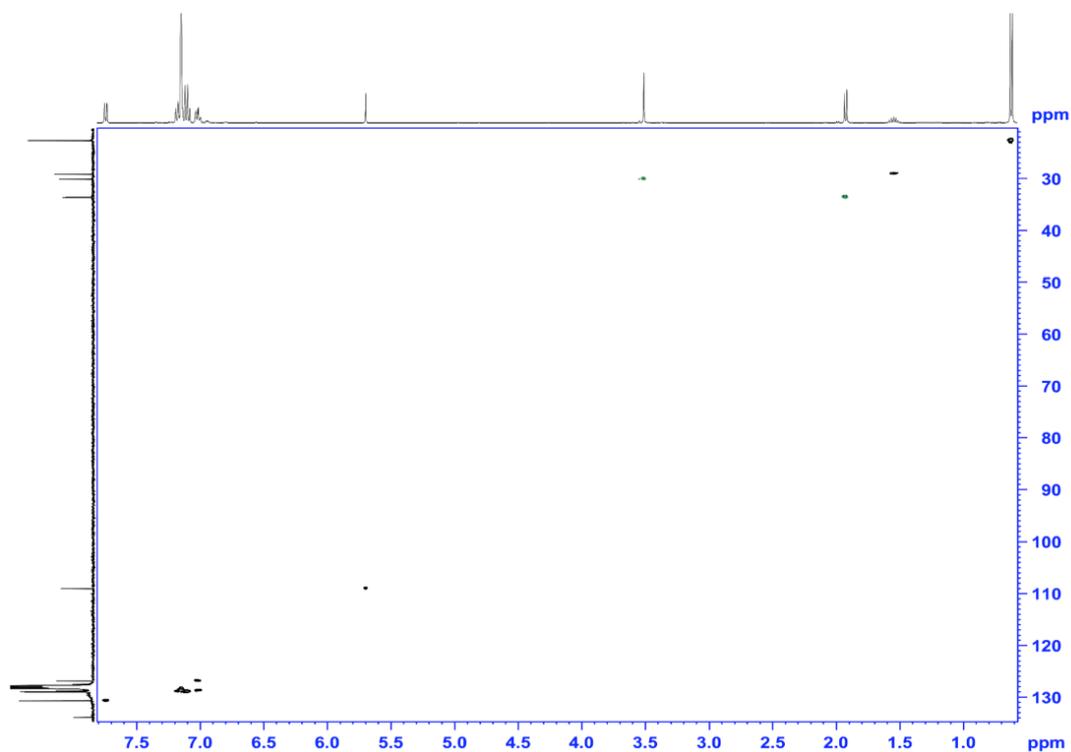


Figure 2-44. Deoxyenhygrolide A の HSQC スペクトル (400 MHz, C₆D₆)

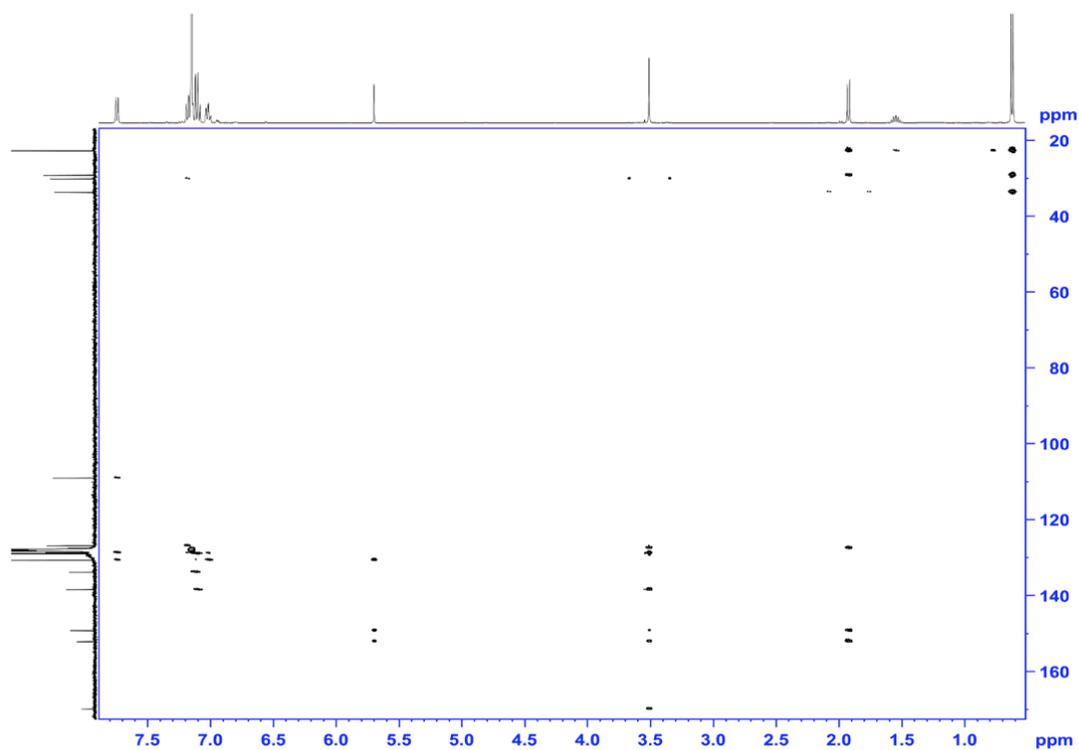


Figure 2-45. Deoxyenyngrolide A の HMBC スペクトル (400 MHz, C₆D₆)

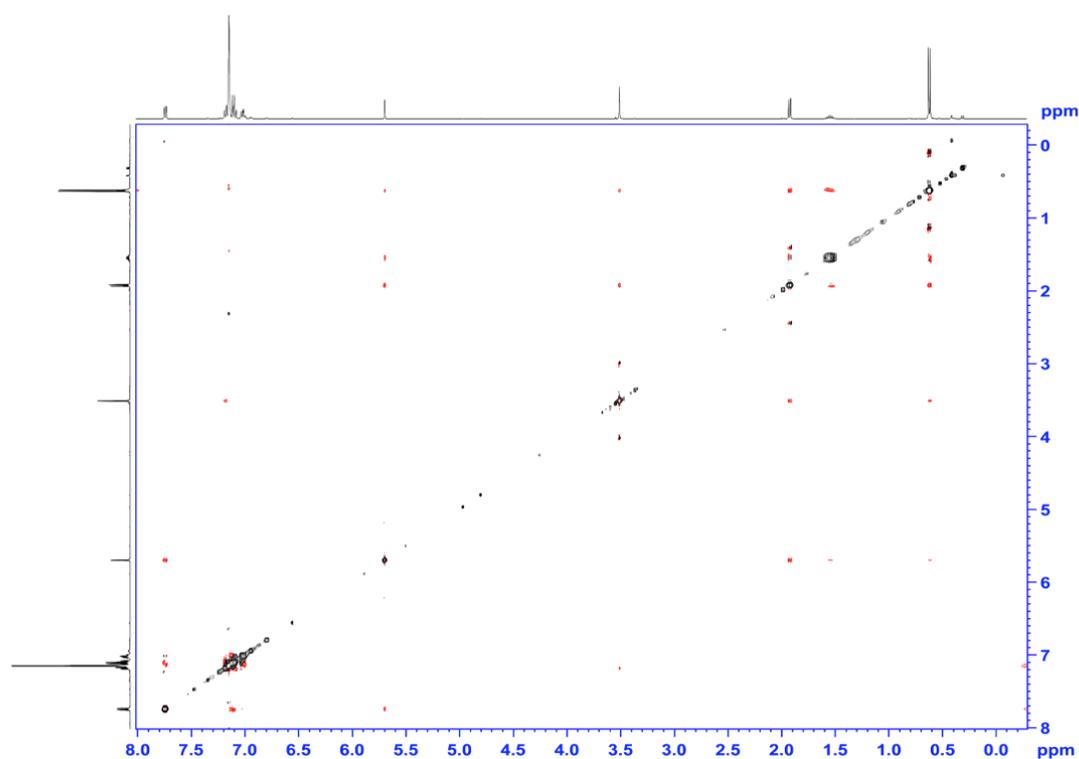


Figure 2-46. Deoxyenyngrolide A の NOESY (400 MHz, C₆D₆)

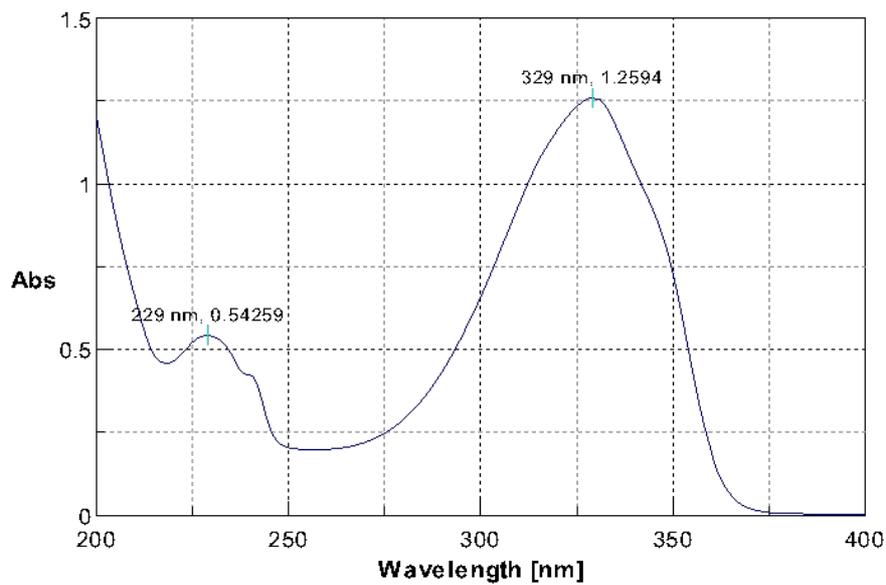


Figure 2-47. Deoxyhygrolide A の UV スペクトル (MeCN, $c = 78 \mu\text{M}$)

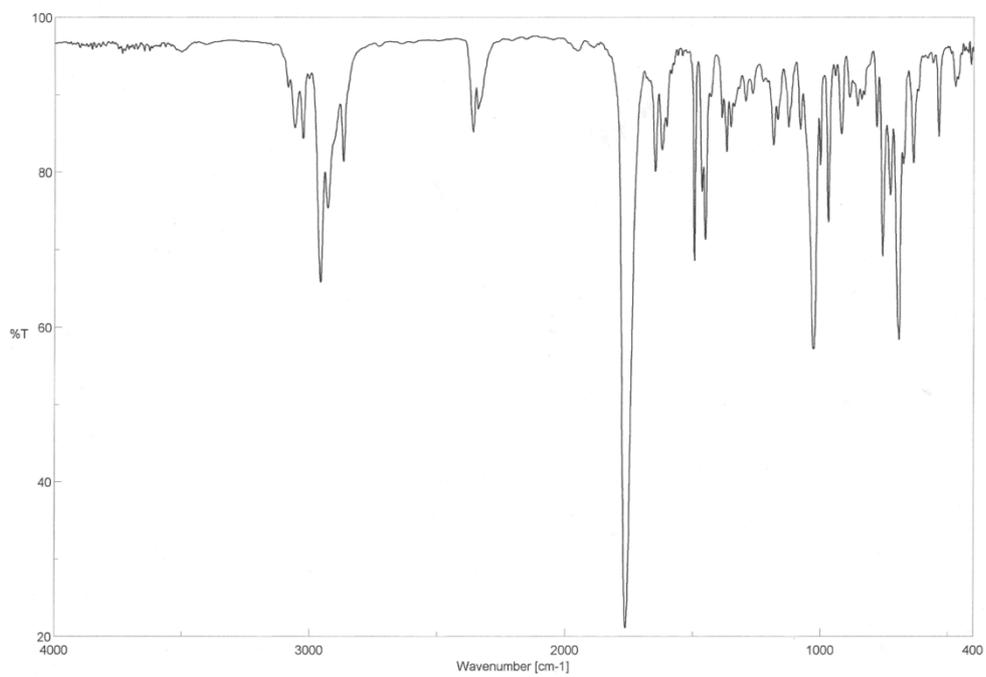


Figure 2-48. Deoxyhygrolide A の IR スペクトル (film)

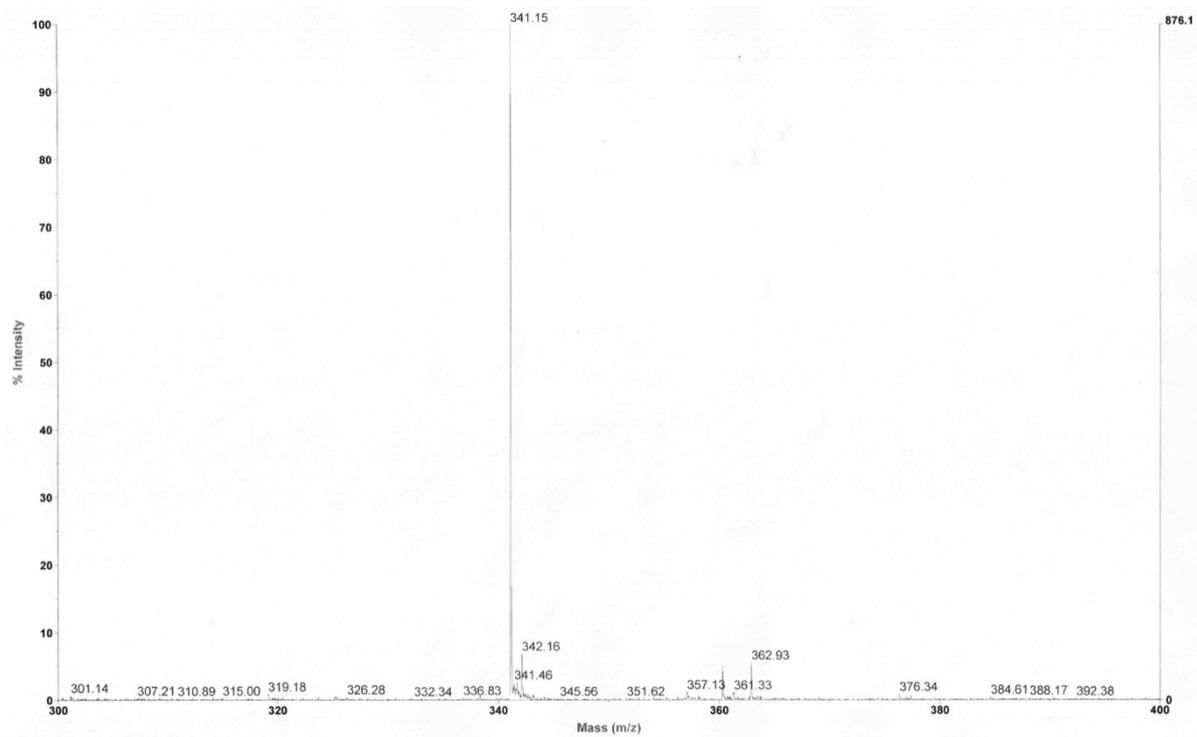


Figure 2-49. Deoxyenhygrolide A の ESI-TOF-MS (+) スペクトル

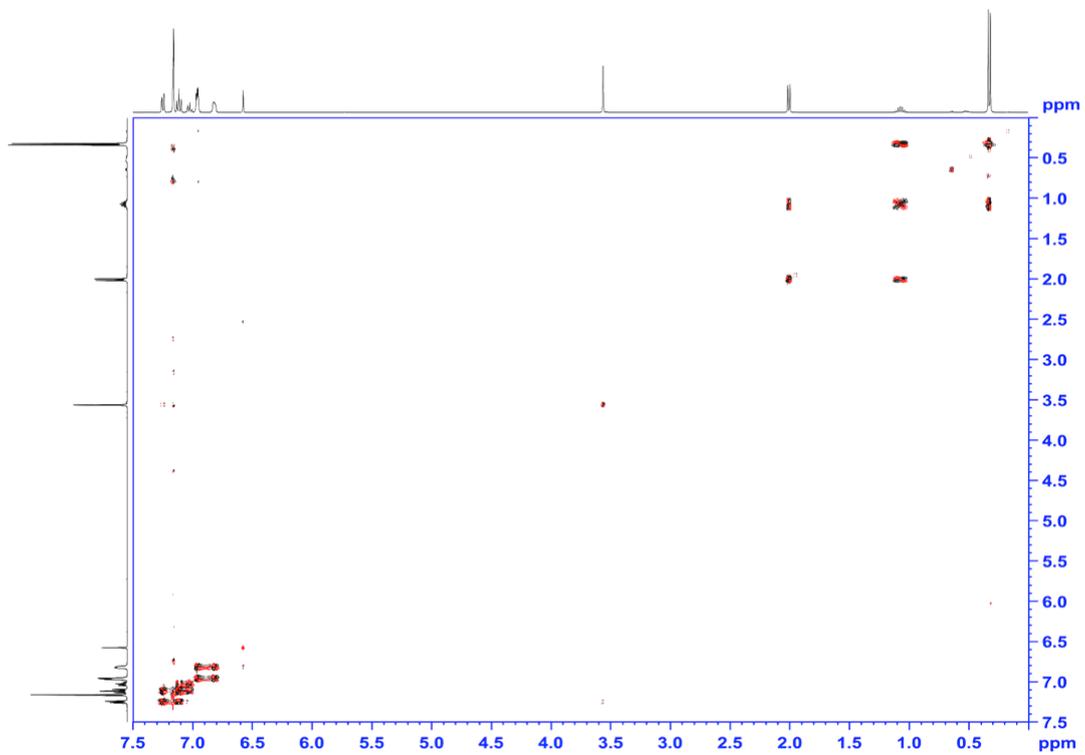


Figure 2-52. Deoxyenhygrolide B の DQF-COSY (400 MHz, C₆D₆)

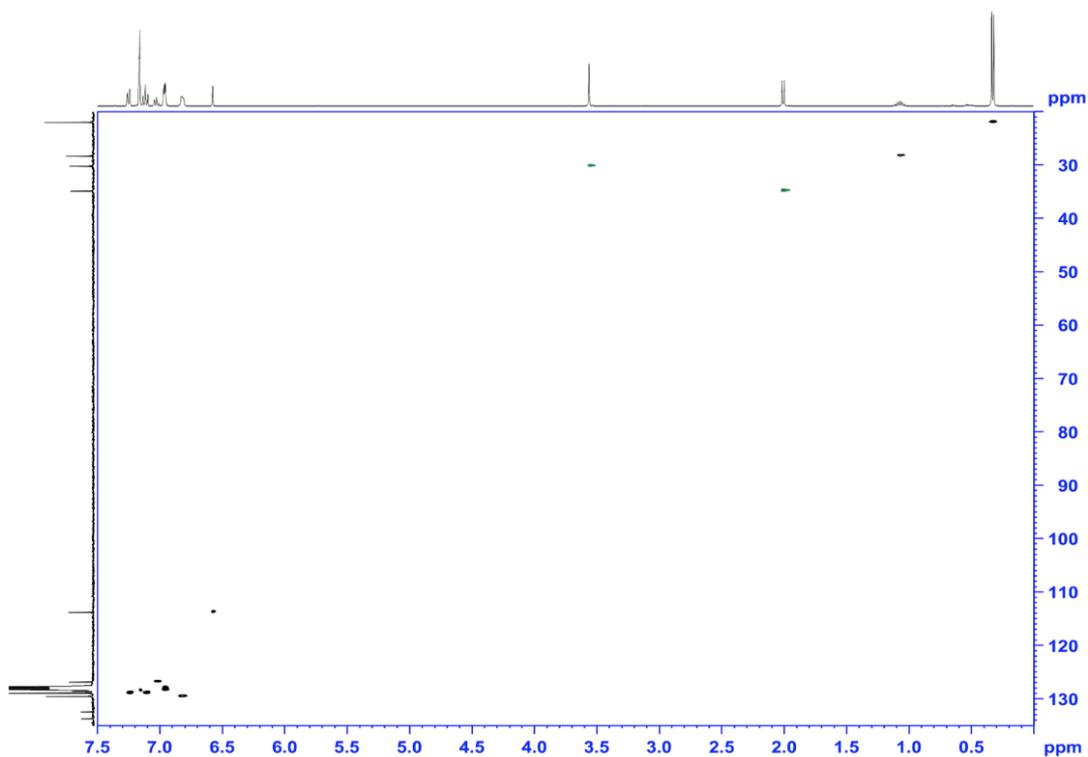


Figure 2-53. Deoxyenhygrolide B の HSQC スペクトル (400 MHz, C₆D₆)

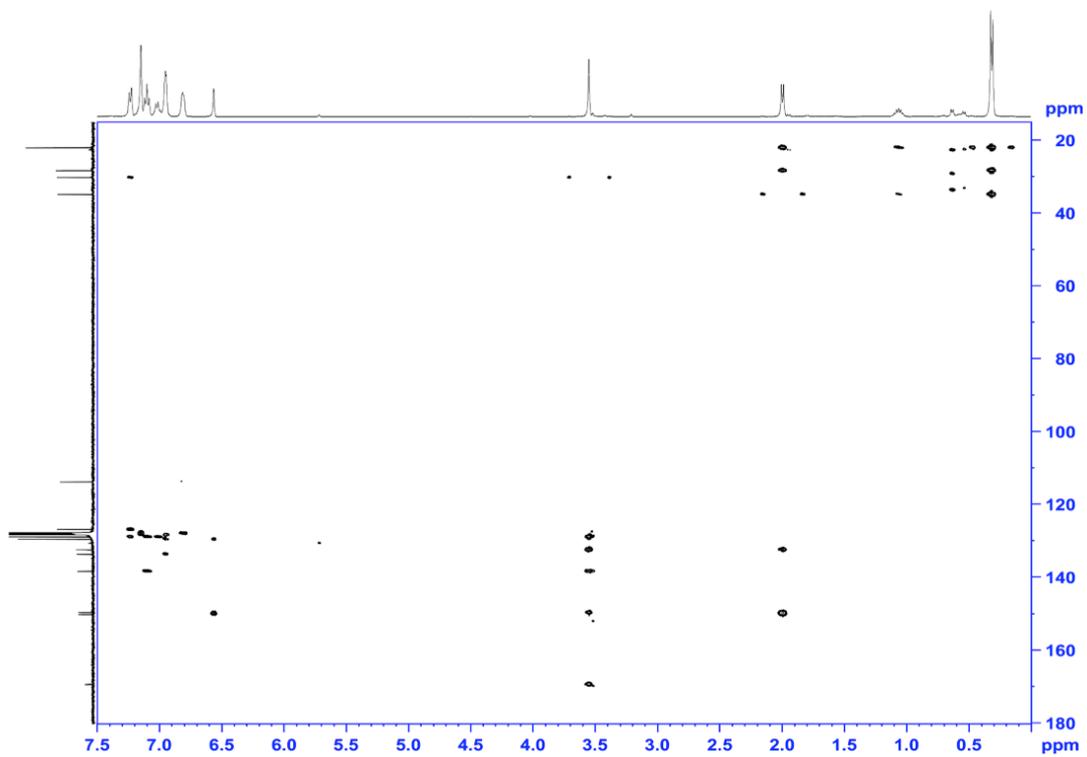


Figure 2-54. Deoxyenhygrolide B の HMBC スペクトル (400 MHz, C₆D₆)

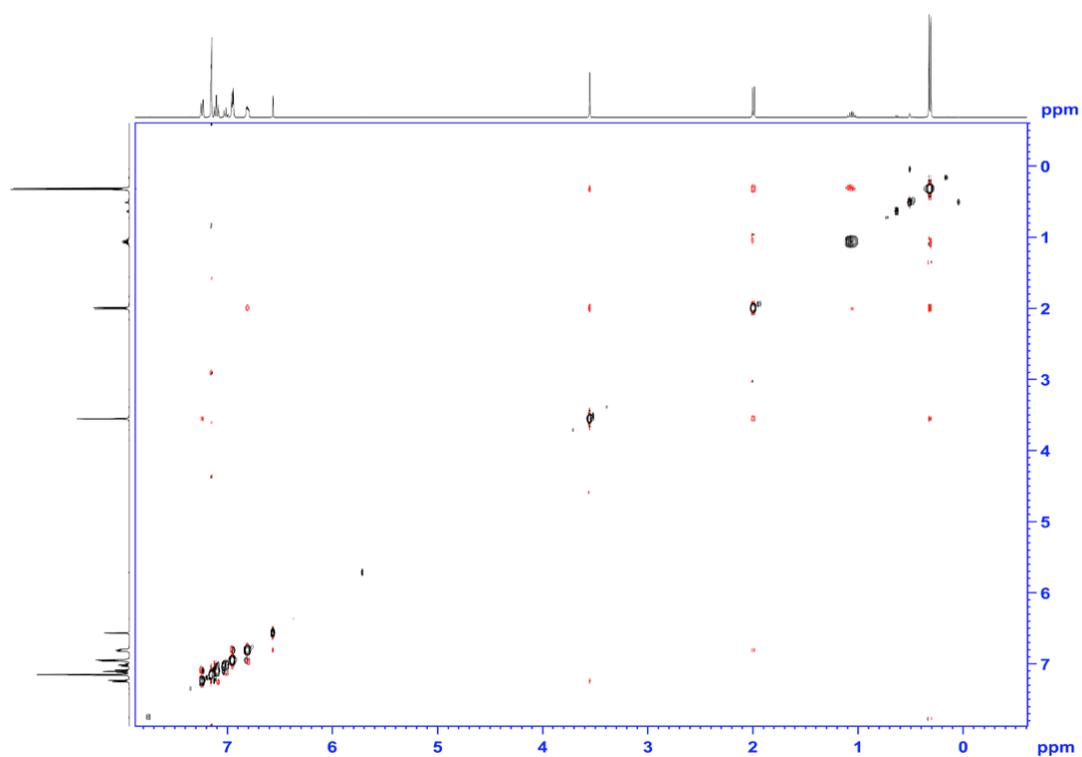


Figure 2-55. Deoxyenhygrolide B の NOESY (400 MHz, C₆D₆)

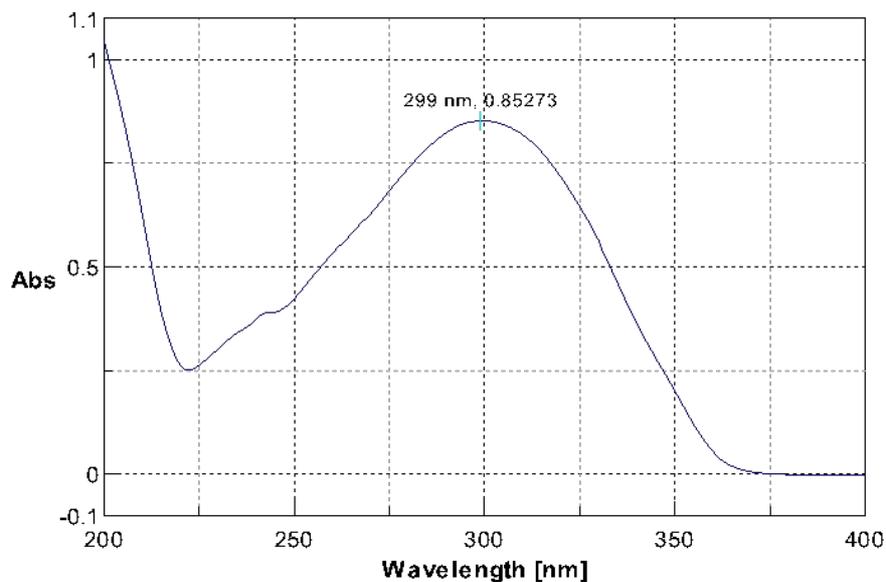


Figure 2-56. Deoxyenhygrolide B の UV スペクトル (MeCN, $c = 63 \mu\text{M}$)

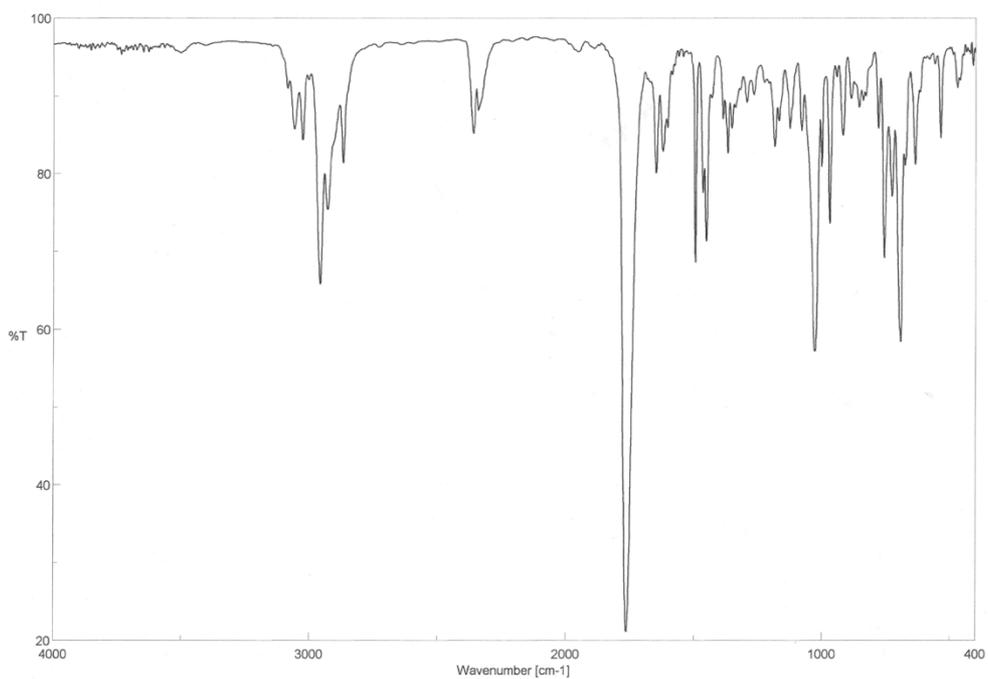


Figure 2-57. Deoxyenhygrolide B の IR スペクトル (film)

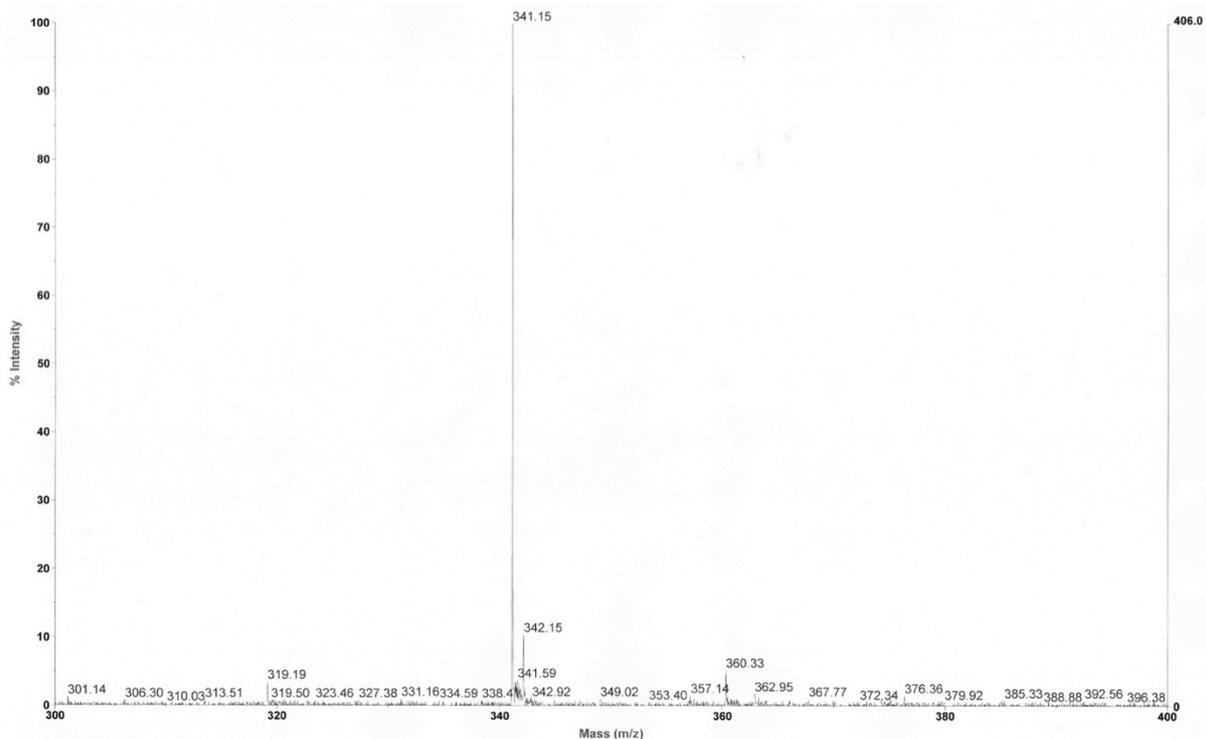


Figure 2-58. Deoxyenhygrolide B の ESI-TOF-MS (+) スペクトル

2-11. 生物活性

単離した enhygromic acid、deoxyenhygrolide A および deoxyenhygrolide B の細胞毒性、NGF 増強活性、抗菌活性、抗真菌活性および抗疫病菌活性を評価した。

細胞毒性は B16 メラノーマ細胞と HeLa-S3 細胞に対して MTT アッセイで評価した。Enhygromic acid は B16 メラノーマ細胞に対して弱いながら細胞毒性を示し ($IC_{50} = 46 \mu M$)、ポジティブコントロールである paclitaxel ($IC_{50} = 57 \mu M$) よりも強い細胞毒性であった (Figure 2-59)。しかしながら、Enhygromic acid は HeLa-S3 細胞に対しては細胞毒性を示さなかった ($IC_{50} > 30 \mu M$)。一方、deoxyenhygrolide A および deoxyenhygrolide B はどちらの細胞に対しても細胞毒性を示さなかった ($IC_{50} > 30 \mu M$)。

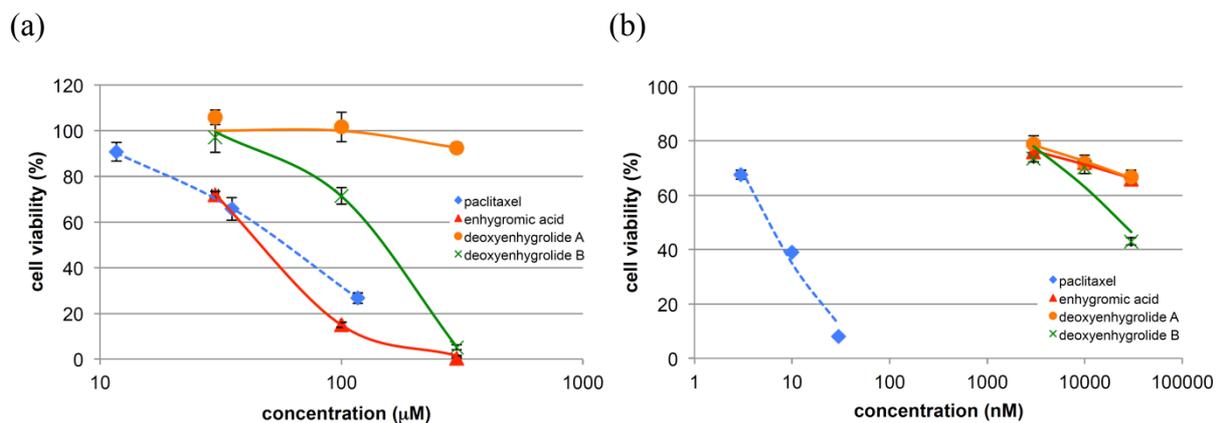


Figure 2-59. Enhygromic acid、deoxyenhygrolide A および B の細胞毒性

(a) B16 メラノーマ細胞、 (b) HeLa-S3 細胞

また enhygromic acid は、PC12 細胞の NGF による神経様突起伸長を促進した。ごく微量の NGF (0.5 ng/mL) 存在下での神経様突起伸長率は 22%であったが、enhygromic acid の投与濃度依存的に 67%まで増強した (Figure 2-60)。Deoxyenhygrolide A および deoxyenhygrolide B を投与した場合には、3 μM で毒性が確認された。

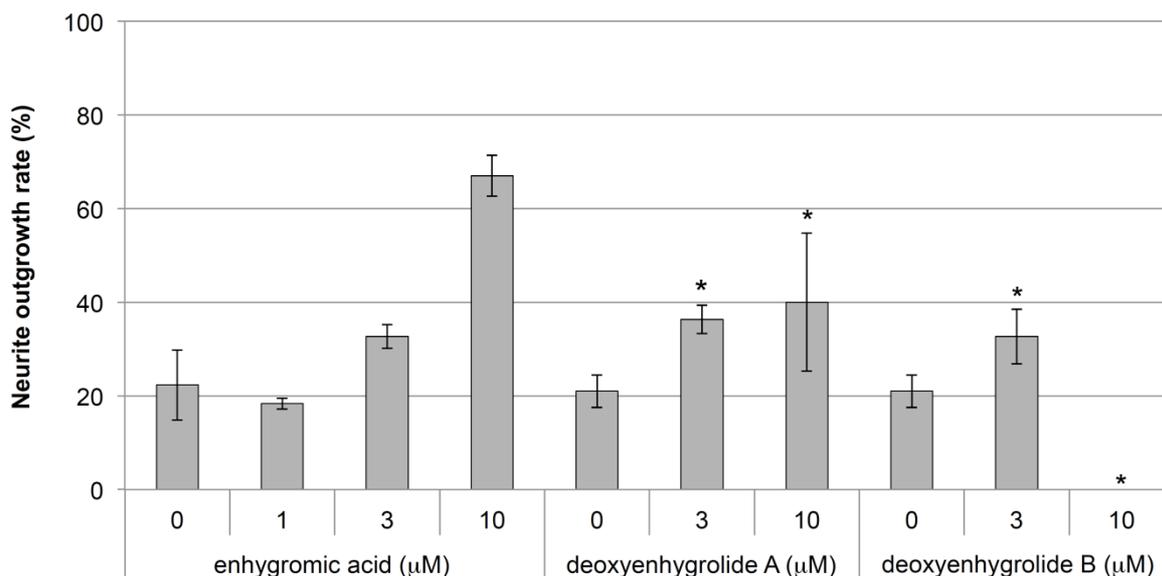


Figure 2-60. Enhygromic acid、deoxyenhygrolide A および B の NGF 増強活性

*は毒性を示す。

さらに enhygromic acid は、グラム陽性菌である *Bacillus subtilis* に対して抗菌活性を示した (MIC = 8 µg/mL) が、グラム陰性菌 (*Escherichia coli*)、真菌 (*Candida rugosa*、*Aspergillus niger*、*Rhizopus oryzae*、*Trichophyton mentagrophytes*)、植物疫病菌 (*Phytophthora capsici*) には活性を示さなかった。一方、deoxyenhygrolide A および deoxyenhygrolide B は、上記の菌全てに対して活性を示さなかった。

2-12. 新規化合物の生合成経路

Enhygromic acid は、縮重した三環性の decahydroacenaphthylene 骨格に α -メチルアクリル酸が結合した非常にユニークな構造を有している。Enhygromic acid の炭素骨格は、C-1-C-2(C-20)-C-3-C-4、C-18-C-14(C-19)-C-13-C-12、C-11-C-10(C-17)-C-9-C-8 および C-7-C-6(C-16)-C-5-C-15 の 4 つのイソプレン単位に分けることができ、ジテルペンであると考えられる。しかしながら、 α -メチルアクリル酸部分の C-4 と縮環系炭素 (C-5、C-9、C-13) の結合はテルペンの結合様式である head-to-tail 則に従っていない。したがって、enhygromic acid の生合成経路について (a) ファルネシル二リン酸 (FPP) から α -humulene が形成された後に、プレニル化される、あるいは (b) ゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) の環化に次いでイソプレン単位が転移される、という 2 つの経路を提唱した (Figure 2-61)。合成された中間体 I は、1,3-ヒドリドシフトと環化を繰り返し、末端メチル基 (C-1) の酸化を受け、enhygromic acid へと生合成される。近縁種である *E. salina* DSM 15201 株のゲノム情報³¹を antiSMASH ver. 4.0.0 (<http://antismash.secondarymetabolites.org>) で *in silico* 解析したところ、ゲノム上には 7 つのテルペン生合成遺伝子クラスターが存在し、そのうちの 3 つには pentalenene 合成遺伝子と相同性を示す遺伝子が含まれていた。Pentalenene は FPP から α -humulene を介して生合成されることが知られている。そのため 3 つの pentalenene 合成遺伝子

のうちの1つが **enhygromic acid** の生合成に関わっている可能性があり、提唱した2つの生合成経路のうち経路 (a) が経路 (b) よりも妥当であると考えられる。しかし、FPP (または GGPP) 合成酵素遺伝子、プレニルトランスフェラーゼ遺伝子 (経路 a) およびオキシダーゼ遺伝子などの関連遺伝子は、これらの **pentalenene** 合成遺伝子を含むクラスター内および周辺には見出されなかったため、生合成経路を完全に推定する事は出来なかった。したがって、**enhygromic acid** のユニークな炭素骨格を構築する興味深い生合成機構は、候補となるテルペン合成酵素遺伝子をクローニングすることによって解明されるはずである。一方、**deoxyenhygrolide A** および **deoxyenhygrolide B** は既知化合物 **enhygrolide A** および **B** の新規類縁体であったが、**enhygrolide A** および **B** については生合成遺伝子クラスターは解明されていないが、生合成経路はすでに推定されており³⁰、**deoxyenhygrolide A** および **deoxyenhygrolide B** も同様の経路で生合成されると考えられる。

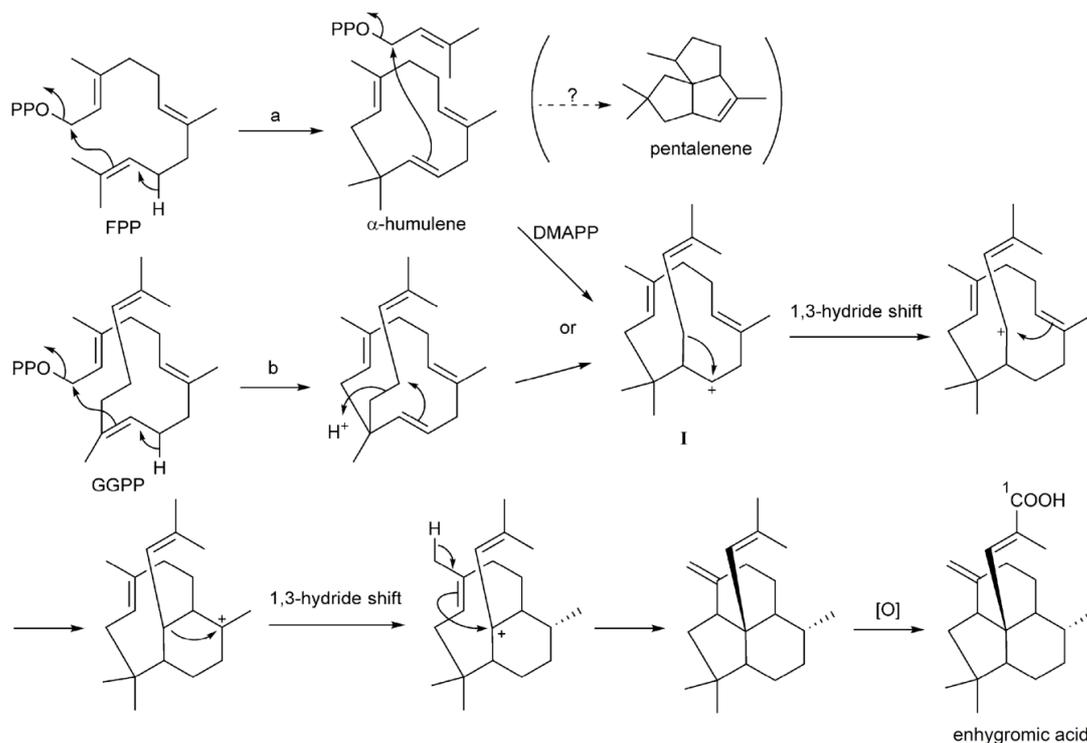


Figure 2-61. **Enhygromic acid** の推定生合成経路

2-13. 結論

粘液細菌は、生産する二次代謝産物がユニークな構造や活性を有し新規性が高いことから、新規医薬品リード化合物の探索源として近年注目されている。中でも海洋性粘液細菌は単離・培養が難しく、種記載、生産する生理活性物質の報告も陸生のものに比べると少ない。それにもかかわらず二次代謝に関与する遺伝子の配列に高い新規性が見られることから、海洋性粘液細菌は新規生理活性物質を生産する潜在能力が高いと期待できる。そこで本研究では、海洋性粘液細菌 *E. niigataensis* SNB-1 由来新規二次代謝産物を探索し、生物活性を評価した。B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性を指標に培養液抽出物から活性成分の探索を行ったところ、天然では非常に稀な decahydroacenaphthylene 骨格を有する新規化合物 enhygromic acid を発見した。さらに近縁種から単離が報告されていた enhygrolide 類の新規類縁体 deoxyenhygrolide A および deoxyenhygrolide B を得た (Figure 2-62)。

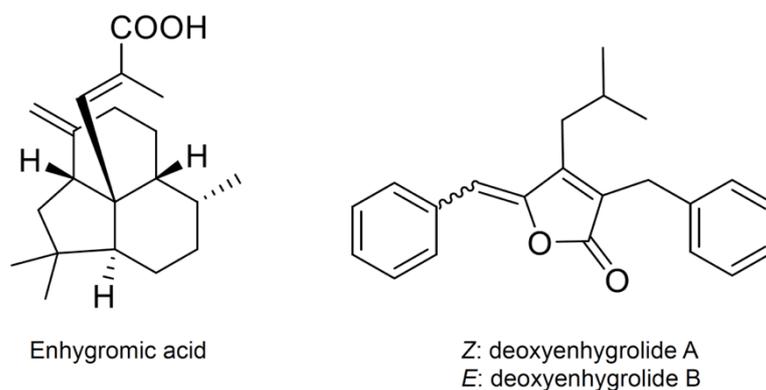


Figure 2-62. 本研究で発見した *E. niigataensis* SNB-1 由来の新規化合物

Enhygromic acid は B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性 (46 μM)、PC12 細胞に対する NGF 神経様突起伸長促進活性 (10 μM で 67%)、さらにはグラム陽性菌 *Bacillus subtilis* の生育阻害活性 (MIC = 8 $\mu\text{g/mL}$) が見られた。Deoxyenhygrolide A および

deoxyenhygrolide B は、今回実施した活性試験では活性を見出すことはできなかった。Enhygromic acid の生合成経路は、*E. salina* のゲノム情報を antiSMASH 解析することにより推定した。Enhygromic acid はジテルペンであるが、ゲノム中にジテルペン生合成遺伝子は存在せず、セスキテルペンである pentalenene 合成遺伝子が 3 つ存在した。Pentalenene は α -humulene から生合成されることがわかっているため、enhygromic acid も α -humulene を経由して生合成されると推定した。一方、deoxyenhygrolide A および B は、既知化合物 enhygrolide A および B の新規類縁体であったが、enhygrolide A および B の生合成経路はすでに推定されており、deoxyenhygrolide A および B も同様の経路で生合成されると考えられる。

また新規化合物の分離の際に 2 種の既知ステロイド化合物、cholesta-7-24-dien-3-ol および cholesta-5,7,24-trien-3-ol を単離した。一般的に真菌はその細胞膜成分として ergosterol を含んでいるが、細菌の細胞膜はリン脂質で形成されておりステロイド化合物は含まれない。しかし本研究では、単離したステロイド化合物は *E. niigataensis* SNB-1 が生産していることを見出し、海洋性粘液細菌がステロイド化合物を生産することを初めて示した。

今回発見した化合物のうち、enhygromic acid は生物活性はさほど強くはないものの、今までに報告されたことがない非常に珍しい炭素骨格をもつテルペノイドであり、今後の有機合成や生合成研究に期待がかかる。

第3章 実験の部

3-1. 基本操作

融点は Micro melting point apparatus MP-J3 (Yanaco, Kyoto, Japan) を用いて測定した。IR スペクトルは、FT/IR-4100 spectrometer (JASCO, Tokyo, Japan) を用い、フィルム法で測定した。UV スペクトルは、V-530 spectrometer (JASCO) を用いて測定した。CD スペクトルは、J-720WN spectrometer (JASCO) を用いて測定した。比旋光度は、DIP-370 spectrometer (JASCO) を用いて測定した。ESI-TOF-MS は、Mariner Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, CA, USA) を用いてポジティブモードで測定した。注入溶媒は enhygromic acid では 80% MeOH-0.1% ギ酸を用いて、deoxyenhygrolide A および deoxyenhygrolide B には 80% MeOH-1 mM ギ酸ナトリウムを使用した。LC-ESI-IT-MS は、Agilent 1200 HPLC system (Hewlett Packard) をつないだ HCTplus mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA) を用いてポジティブモードで測定した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は Cadenza CD-C18 カラム (2.0 i.d. × 75 mm, Imtakt, Kyoto, Japan) を用いて、移動相に 50 % MeCN in MeOH、流速 0.2 mL/min、注入量 100 ng/5 μ L で行った。

各種 NMR スペクトルは、Avance 400 (400 MHz) あるいは Avance III HD 600 Cryo-Probe (600 MHz) (Bruker BioSpin, Yokohama, Japan) で測定した。

フラッシュカラムクロマトグラフィーは、C-605 ポンプモジュールと C-615 ポンプマネージャー (BÜCHI, Flawil, Switzerland) から成る中圧グラジエントシステムを用いた。

分析 HPLC は PU-980 型送液ポンプ、DG-980-50 型気体除去装置、HG-980-31 型溶媒混合装置および MD-915 型多波長検出器 (JASCO) から成る高圧グラジエントシス

テムを用いた。分取 HPLC は PU-2087 型送液ポンプ、DG-2080-53 型気体除去装置、MX-2080-32 型溶媒混合装置および UV-2075 検出器 (JASCO) からなる高圧グラジェントシステムを用いた。

3-2. 菌株の寒天培養

海洋性粘液細菌 *E. niigataensis* SNB-1 は共同研究者である味の素株式会社の飯塚俊博士および不藤亮介博士に提供していただいた。*E. niigataensis* SNB-1 を 0.1% (w/v) 酢酸ナトリウムを添加した VY/2-SWS 寒天培地 [Baker's yeast cake 5 g、塩化ナトリウム 20 g、シアノコバラミン 0.5 g、15 g 寒天 (1 L Sea Water Salt solution (SWS) 中)] 上で 30 °C で 2-3 週間培養した。

3-3. 菌株の保存

寒天培地上で 8 割程度生育した菌体の成長末端を 5 mm 角にスパチュラで切り出した。切り出した小片を 1.5 mL マイクロチューブに入れ、1 mL の 20% (w/v) グリセロール溶液を加えた後、-80 °C で保存した。

3-4. Enhygromic acid の単離

寒天培地上で生育したコロニーを約 1 cm 角に切り出し、細菌の生育を促進させるために 100 mM の酢酸ナトリウムとゲルキューブ (5 mm 角 100 個/L) を添加した VY/4-SWS 液体培地 [Baker's yeast cake 2.5 g、塩化ナトリウム 20 g、シアノコバラミン 0.5 g (SWS 1 L 中)] 100 mL (500 mL 三角フラスコ中) に加え、30 °C、180 rpm で 10 日間振とう培養した。1.8 L (100 mL×18) の培養液を菌体ごと 7.2 L のアセトンで 1 回、3.6 L のアセトンで 2 回抽出した。これら抽出液をまとめて濾過し、減圧

濃縮したのちに EtOAc (2.7 L) で抽出し、脂溶性エキス TO-II-40-1 (134.5 mg) を得た。これをシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー [HI-FLASHTM silica gel column (size M, 14 g, Yamazen Co., Osaka, Japan)、20–100% (40 min) EtOAc in hexane、流速 6 mL/min] で分離し、8 フラクシオンを得た (TO-II-43 シリーズ)。B16 メラノーマ細胞に対する細胞毒性が見られた TO-II-43-3 (12.9 mg、 t_R = 6–14 min) を 400 μ L の MeOH に溶かしフィルター濾過した後、得られたろ液を逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (10 i.d. \times 250 mm, Nomura Chemical Ltd., Seto, Japan)、50–100% MeOH (50 min)、流速 3 mL/min] で分離し、細胞毒性を示す TO-II-65-5 (0.8 mg、 t_R = 21–22 min) を得た。活性成分の量が少なかったため、上記培養方法と同様に再度 3.6 L を培養し、ここから 241.9 mg の脂溶性エキス (TO-II-56-1、TO-II-70-1、TO-II-74-1) を得た。得られたエキスをシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー [HI-FLASHTM silica gel column (size M, 14 g)、20–100% (40 min) EtOAc in hexane、流速 6 mL/min] で分離し、4 フラクシオンを得た (TO-II-77 シリーズ)。7–13 分に溶出した TO-II-77-2 (16.8 mg) を逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (20 i.d. \times 250 mm)、90–100% (20 min) MeOH、流速 8 mL/min、検出 220 nm] で分離し、6 フラクシオンを得た (TO-II-79 シリーズ)。22–24 分に溶出したフラクシオンである TO-II-79-2 (2.2 mg) と TO-II-65-5 を合わせて、再度逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (10 i.d. \times 250 mm)、80–100% (90 min) 50% MeCN in MeOH、流速 3 mL/min、検出 220 nm] で精製し、enhygromic acid (TO-II-85-2、2.0 mg、 t_R = 33–35 min) を得た。

3-5. ステロイド化合物の単離

2-8-2. で得られた TO-II-65-11 と TO-II-79-5 を合わせて逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (10 i.d. \times 250 mm)、50% MeCN in MeOH、流速 3 mL/min、検出 210 nm]

で分離し、TO-II-105-2 (3.4 mg、 $t_R = 32-35$ min) を得た。TO-II-105-2 は不純物を含んでいたため再度リサイクル逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (20 i.d. × 250 mm)、95% MeOH、流速 10 mL/min、検出 206 nm] で精製し、TO-II-138-2 (1.6 mg) を得た。一方、2-8-2 で得られた TO-II-79-4 (1.4 mg、 $t_R = 45-47$ min) は、 $^1\text{H NMR}$ より十分な精製度であると判断し、このまま構造解析した。

3-6. ステロイド化合物の由来

培地に用いる乾燥酵母 280 mg (112 mL broth 相当) を 10 mL の酢酸エチルで 3 回抽出し、脂溶性エキス TO-II-110-1 を 0.9 mg 得た。次に 0.1% の酢酸ナトリウムを含む VY/2-SWS 寒天培地で 2 週間培養した SNB-1 菌体をスパチュラの柄を用いて回収 (9 枚分、10.8 mg)、EtOAc 抽出し、脂溶性エキス TO-II-131-1 を 0.3 mg 得た。これら 2 つのエキスと上記で分離した TO-II-79-4 (cholesta-5,7,24-trien-3-ol) および TO-II-105-2 (cholesta-7,24-dien-3-ol) を逆相 HPLC [Develosil ODS-UG-5 (4.6 i.d. × 250 mm, Nomura Chemical Ltd.)、50% MeCN in MeOH、流速 1 mL/min] で分析し、データを比較した。

3-7. Enhygromic acid の量上げ

E. niigataensis SNB-1 を VY/4-SWS 液体培地 750 mL (2 L 三角フラスコ中) 中で 3 週間振盪培養した。得られた 21 L の培養物を菌体ごと 63 L のアセトンで 1 回抽出し、さらに 10.5 L で 2 回抽出した。これら抽出液は、まとめて濾過したのち減圧濃縮したのち EtOAc (14 L) で抽出し脂溶性エキスを 1.9 g 得た。このエキスをシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー [HI-FLASHTM silica gel column (size 2L, 45 g, Yamazen Co.)、20-100% (40 min) EtOAc in hexane、流速 20 mL/min] で分離し、34-38% EtOAc

in ヘキサンで溶出したフラクションを逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (20 i.d.×250 mm)、90–100% MeOH (20 min)、流速 8 mL/min、検出 220 nm] で分離した。22–25 分で溶出したフラクション (TO-II-168-2、9.3 mg) をさらに逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (20 i.d.×250 mm)、MeOH–MeCN–H₂O (42.5 : 42.5 : 5)、流速 10 mL/min、検出 220 nm] で精製し、enhygromic acid (TO-II-170-2、6.9 mg、 t_R = 42–46 min) を得た。

3-8. Enhygromic acid の配座解析

配座解析は ChemOffice 15.1 に含まれる Chem3D Ultra (PerkinElmer Co., Waltham, MA, USA) を用いて行った。Enhygromic acid の二面角 C2–C3–C4–C5 を–180°から 180°まで 15° ずつ回転させ、その都度 MM2 エネルギー最小化を行い、最小化後のエネルギー値 (kcal/mol) と二面角を入力した二面角に対しプロットした。

3-9. Deoxyenhygrolide A および B の単離

2-8-5 において、フラッシュクロマトグラフィーで 20–34% EtOAc in ヘキサンで溶出したフラクションをまとめ (TO-II-163-1、272.1 mg)、再度フラッシュクロマトグラフィー [HI-FLASHTM silica gel column (size M, 14 g)、0–25% (50 min) EtOAc in hexane、流速 6 mL/min] で分離した。7.5–10% EtOAc in ヘキサンで溶出したフラクション (TO-II-166-3、49.2 mg) を逆相 HPLC [Develosil ODS-HG-5 (20 i.d.×250 mm)、80% MeOH、流速 9 mL/min、検出 315 nm] で精製し、deoxyenhygrolide A (TO-II-172-4、4.5 mg、 t_R = 43–49 min) および deoxyenhygrolide B (TO-II-172-2、17.6 mg、 t_R = 36–41 min) を得た。

3-10. 細胞毒性試験

理化学研究所CELL BANKより購入したHeLa-S3(SC)細胞を10% ウシ血清(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) と抗生物質 [100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin(Thermo Fisher Scientific Inc.)]を添加した Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて前培養した。培養後の細胞を Trypsin-EDTA 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で処理した後、遠心分離で回収しノイバウエル血球計算盤を用いて FSX100 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) 下で細胞数を計測した。細胞懸濁液は細胞数 10,000 個/99 µL となるように EMEM 培地で調製した。この細胞懸濁液を 96-well プレート (Biolite 96 Well Multidish, Thermo Fisher Scientific Inc.) の各 well に 99 µL ずつ加え、5% CO₂ 存在下、37 °C で 24 時間培養した後、サンプルを DMSO に溶解し、1 µL ずつ well に添加した。5% CO₂ 存在下、37 °C で 48 時間培養した後、5 mg/mL MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を各 well に 10 µL ずつ加え、37 °C で 3 時間インキュベートした。細胞を剥がさないように培地を抜き、各 well に DMSO を 100 µL ずつ加え、595 nm の吸光度を Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定した。サンプルは 3、10、30 µM で行い、ポジティブコントロールは 3、10、30 nM の paclitaxel を用いた。検定は 4 連で行った。

B16 メラノーマ細胞 (中部大学芋川玄爾客員教授から譲与) は EMEM の代わりに Dulbecco's modification of eagle's medium (DMEM) (MP Biomedicals, CA, USA) で培養し、細胞数 5,000 で各 well に播種した。他の操作は上記 HeLa 細胞を用いる場合と同様に行った。サンプルは 30、100、300 µM で行い、ポジティブコントロールは 10、30、100 µM の paclitaxel を用いた。検定は 4 連で行った。

3-11. PC12 細胞に対する NGF 増強活性試験

NGF 増強活性試験は過去の報告³⁷を一部変更して行った。理化学研究所 CELL BANK より購入した PC12 細胞を 10% ウシ胎児血清 (Biosera, MO, US)、5% ウマ血清 (Thermo Fisher Scientific Inc.) と抗生物質 (100 µg/mL streptomycin and 100 units/mL penicillin) を添加した DMEM 培地で、細胞数が 15,000 個/mL の懸濁液を作り、24 well Microplate Collagen Type I-Coated (IWAKI, Tokyo, Japan) に 1 mL/well ずつ播種した。5% CO₂ 存在下、37 °C、インキュベーター中で 24 時間培養した後、0.5% DMSO と 0.5 ng/mL NGF (PEPROTECH, NJ, USA)、5 µL の DMSO に溶かしたサンプル (終濃度の 200 倍濃度) を含む無血清培地と交換した。4 日後に PC12 細胞の形態を位相差顕微鏡 FSX100 (OLYMPUS) で観察した。活性の評価は、ランダムに選んだ約 100 個の細胞のうち、細胞の長径より長く神経突起を伸ばした細胞の比率を計測した。計測は 3 連で行った。

3-12. 抗疫病菌活性試験

検定菌は、*Phytophthora capsici* NBRC 30696 (独立行政法人製品評価技術基盤機構生物資源部門 (NBRC) より購入) を用いた。新鮮ポテトスクロース (FPS) 寒天培地 (スクロース 2 g、寒天 1.5 g (新鮮ポテトエキス 100 mL 中)) で 5 日間 25 °C、湿度 65%、暗黒下で前培養した。菌体の成長先端部分をスパチュラで 5 mm 角に切り取り、5% V8 ジュース寒天培地 (1.5% (w/v) 寒天) の中央にのせ、25 °C、湿度 65% 暗黒下で 48 時間培養した。DMSO に溶解したサンプル 10 µL を抗生物質検定用ペーパーディスク (薄手、6 mm) (Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan) に染み込ませ、成長先端から、10 mm のところに置き、25 °C、湿度 65%、暗黒下で 24-26 時間インキュベートした。ネガティブコントロールである DMSO における菌体の成長先端と

濾紙までの距離を 0 mm とし、サンプルの阻害距離を測定することによって疫病菌成長阻害活性を評価した。ポジティブコントロールには metalaxyl を 3、10、30、100 µg/disc で用い、サンプルは 3、10、30、100 µg/disc で投与した。検定は 1 連で行った。

3-13. 抗菌活性試験

抗菌活性試験は、Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition (M07-A9, CLSI) に従った。検定菌である *Escherichia coli* AJ 3837 (NBRC 14237) および *Bacillus subtilis* AJ 12865 (ATCC 6051) は、味の素 (株) の飯塚俊氏に提供して頂いた。検定菌は、寒天培地 (*E. coli*: LB agar、*B. subtilis*: Nutrition agar) で 35 °C で 2 日間前培養した。1 mm 程度に生育したコロニー 1 つを白金針でとり、5 mL の生理食塩水で懸濁した。懸濁液を 0.5 McFarland 濁度に生理食塩水を用いて調製した (1×10^8 cfu/mL)。DMSO に溶解したサンプルをミューラーヒントン液体培地 (肉エキス 2 g、カゼイン加水分解物 17.5 g、可溶性デンプン 1.5 g、Ca²⁺ 20 mg、Mg²⁺ 10 mg (水 1 L 中)) で 100 倍に希釈し、96 well プレートに 100 µL ずつ播種した。濁度を調製した菌液をミューラーヒントン液体培地で 20 倍希釈し、10 µL をそれぞれの well に加えた (5×10^5 cfu/mL)。蓋の周囲をサージカルテープでシーリングし、35 °C で 20 時間インキュベートした。最小発育阻止濃度 (MIC: µg/mL) は、プレートの底から覗き目視で確認した。ポジティブコントロールには ampicilin を使用した [MIC: 4 µg/mL (*E. coli*)、0.04 µg/mL (*B. subtilis*)]。サンプルは 1、2、4、8、16、32、64 µg/mL で、3 連で行った。

3-14. 抗真菌活性試験

検定菌 *Candida rugosa* AJ 14513 (NBRC 0750)、*Aspergillus niger* AJ 117065 (ATTC

10864)、*Rhizopus oryzae* AJ 117321 (JCM 5582) および *Trichophyton mentagrophytes* AJ 11716 (NBRC 7522) は、細菌と同様に味の素 (株) より提供していただいた。

C. rugosa に対する抗真菌活性

活性試験は、Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition (M27-A2, NCCLS) に従った。*C. rugosa* を PDA 寒天培地で 30 °C で 24 時間前培養したのち、1 mm 以下のコロニー1つを白金針で採取し、1 mL の生理食塩水で懸濁することで菌液を得た。この菌液を RPMI1640 液体培地 (Wako) で 50 倍希釈し、さらに 20 倍希釈した。DMSO に溶解したサンプルを RPMI1640 液体培地で 100 倍希釈し、96 well プレートに 100 μ L ずつ加え、そこに調製した菌液を 100 μ L ずつ加えた。35 °C で 48 時間インキュベートした後、濁度を目視で確認した。ポジティブコントロールには、amphotericin B を使用した (MIC: 0.125 μ g/mL)。サンプルは 0.5、1、2、4、8、16、32 μ g/mL で投与し、3 連で行った。

A. niger および *R. oryzae* に対する抗真菌活性

活性試験は、Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds (EUCAST) に従った。検定菌は PDA 寒天培地で 35 °C で 2 日間前培養した。シャーレに 5 mL の 0.1% Tween 20 を加え、綿棒でコロニーをこすり取り、回収した菌糸懸濁液を 15 秒間ボルテックスした。菌糸を除去し胞子のみを得るために、Grade 40 濾紙 (ϕ 47 mm、Whatman) を PP-47 プラスチックホルダー (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) に装着し、菌液をろ過した。ろ液を回収し、ヘモサイトメーターを用いて胞子数を計測し、RPMI1640 液体培地で 2×10^5 conidia/mL に調製した。DMSO に溶解したサンプルを RPMI1640 液体培地で

100 倍希釈し、96 well プレートに 100 μ L ずつ加え、そこに調製した菌液を 100 μ L ずつ加えた (1×10^4 conidia/mL)。35 $^{\circ}$ C、48 時間のインキュベーション後、濁度を目視で確認した。ポジティブコントロールには、amphotericin B を使用した [MIC: 0.25 μ g/mL (*A. niger*)、2 μ g/mL (*R. oryzae*)]。サンプルは 0.5、1、2、4、8、16、32 μ g/mL で投与し、3 連で行った。

T. mentagrophytes に対する抗真菌活性

検定菌は、PDA 寒天培地で 35 $^{\circ}$ C で 5 日間前培養した。活性試験は上記 *A. niger* および *R. oryzae* の場合と同様に行ったが、サンプル添加後のインキュベーションを 28 $^{\circ}$ C で 1 週間に変更した。ポジティブコントロールには、griseofluvin (MIC: 2 μ g/mL) を使用し、サンプルは 0.5、1、2、4、8、16、32 μ g/mL で、3 連で行った。

参考文献

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
2. Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kon, Y.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Omura, S., Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 361–367.
3. 上村大輔、天然物の化学－魅力と展望－、東京化学同人（2016）。
4. Tsuji, Y.; Matsuo, H.; Okubo, K.; Hatano, K.; Sadoh, S.; Ikari, H.; Kamimura, H.; Yamane, K.; Arakawa, Y., Case of Refractory Retroperitoneal Abscess in which Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* was Isolated from Stool and Ascitic Fluid, *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.* **2007**, *33*, 125–131.
5. Wang, J. *et al.*, Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties, *Nature* **2006**, *441*, 358–361.
6. Reichenbach, H., *Myxobacteria II*, Dworkin, M., Kaiser, D. Eds., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1993, pp. 13–62.
7. Dawid, W., Biology and global distributeon of myxobacteria in soil, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2000**, *24*, 403–427.
8. Iizuka, T.; Tokura, M.; Jojima, Y.; Hiraishi, A.; Yamanaka, S.; Fudou, R., Enrichment and Phylogenetic Analysis of Moderately Thermophilic Myxobacteria from Hot Springs in Japan, *Microbes Environ.* **2006**, *21*, 189–199.

9. Stanford, R. A.; Cole, J. R.; Tiedje, J. M., Characterization and Description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an Aryl-Halorespiring Facultative Anaerobic Myxobacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 893–900.
10. Reichenbach, H., The ecology of the myxobacteria, *Environ. Microbiol.*, **1999**, *1*, 15–21.
11. 宮道慎二、奥田徹、井上勲、後藤俊幸、微生物の世界、筑波出版会（2006）。
12. 不藤亮介、粘液細菌；この可憐で賢き狩人たち、生物工学会誌、**2013**、*9*、532–535.
13. Ringel, S. M.; Greenough, R. C.; Roemer, S.; Connor, D.; Gutt, A. L.; Blair, B.; Kanter, G.; Strandmann, M., Ambruticin* (W7783), A New Antifungal Antibiotic, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 371–375.
14. Reichenbach, H., Myxobacteria, producers of novel bioactive substances, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 149–156.
15. Gerth, K.; Pradella, S.; Parlova, O.; Bayer, S.; Müller, R.; Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
16. Weissman, K. J.; Müller, R., Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1276–1295.
17. Höfle, G. H.; Bedorf, N.; Steinmetz, H.; Schomburg, D.; Gerth, K., Reichenbach, H., Epothilone A and B - Novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: Isolation, crystal structure, and conformation in solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1567–1569.
18. Bollag, D. M.; McQueney, P. A.; Zhu, J.; Hensens, O.; Koupal, L.; Liesch, J.; Goetz, M.;

- Lazarides, E.; Woods, C. M., Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325–2333.
19. Ojika M.; Suzuki Y.; Tsukamoto A.; Sakagami Y. Cystothiazoles A and B, new bithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1998**, *51*, 275–281.
20. Fudou, R.; Jojima, Y.; Iizuka, T.; Yamanaka, S., *Haliangium ochraceum* gen. nov. sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2002**, *48*, 109–115.
21. Iizuka, T.; Jojima, Y.; Fudou, R.; Tokura, M.; Hiraishi, A.; Yamanaka, S., *Enhygromyxa salina* gen. nov., sp. nov., a Slightly Halophilic Myxobacterium Isolated from the Coastal Areas of Japan, *System. Appl. Microbiol.* **2003**, *26*, 189–196.
22. Iizuka, T.; Jojima, Y.; Fudou, R.; Hiraishi, A.; Ahn, J. W.; Yamanaka, S., *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dehydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 189–195.
23. Iizuka, T.; Fudou, R.; Jojima, Y.; Ogawa, S.; Yamanaka, S.; Inukai, Y.; Ojika, M., Miuraenamides A and B, Novel Antimicrobial Cyclic Depsipeptides from a New Slightly Halophilic Myxobacterium: Taxonomy, Production, and Biological Properties, *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 385–391.
24. Iizuka, T.; Jojima, Y.; Hayakawa, A.; Fujii, T.; Yamanaka, S.; Fudou, R., *Pseudoenhygromyxa salsginis* gen. nov., sp. nov., a myxobacterium isolated from an estuarine marsh, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 1360–1369.
25. Fudou, R.; Iizuka, T.; Yamanaka, S., Haliangicin, a novel Antifungal Metabolite

- Produced by a Marine Myxobacterium, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 153–156.
26. Kundim, B. A.; Itou, Y.; Sakagami, Y.; Fudou, R.; Iizuka, T.; Yamanaka, S.; Ojika, M., New Haliangicin Isomers, Potent Antifungal Metabolites Produced by a Marine Myxobacterium, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 630–638.
27. Sun, Y.; Tomura, T.; Sato, J.; Iizuka, T.; Fudou, R.; Ojika, M., Isolation and biosynthetic analysis of haliamide, a new PKS-NRPS hybrid metabolite from the marine myxobacterium *Haliangium ochraceum*, *Molecules*, **2016**, *21*, 59.
28. Ojika, M.; Inukai, Y.; Kito, Y.; Hirata, M.; Iizuka, T.; Fudou, R., Miuraenamides: Antimicrobial Cyclic Depsipeptides Isolated from a Rare and Slightly Halophilic Myxobacterium, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 126–133.
29. Felder, S.; Dreisigacker, S.; Kehraus, S.; Neu, E.; Bierbaum, G.; Wright, P. R.; Menche, D.; Schäberle, T. F.; König, G. M., Salimabromide: Unexpected Chemistry from the Obligate Marine Myxobacterium *Enhygromyxa salina*, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9319–9324.
30. Felder, S.; Kehraus, S.; Neu, E., Bierbaum, G.; Schäberle, T. F.; König, G. M., Salimyxins and Enhygrolides: Antibiotic, Sponge-Related Metabolites from the Obligate Marine Myxobacterium *Enhygromyxa salina*, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1363–1371.
31. Dávila-Céspedes, A.; Hufendiek, P.; Crüsemann, M.; Schäberle, T. F.; König, G. M., Marine-derived myxobacteria of the suborder Nannocystineae: An underexplored source of structurally intriguing and biologically active metabolites, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 969–984.
32. Wilson, W. K.; Sumpter, R. M.; Warren, J. J.; Rogers, P. S.; Ruan, B.; Schroepfer, Jr. G. J. Analysis of unsaturated C₂₇ sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J.*

- Lipid Res.* **1996**, *37*, 1529–1555.
33. Kohl, W.; Gloe, A.; Reichenbach, H., Steroids from the Myxobacterium *Nannocystis exedens*, *J. Gen. Microbiol.* **1983**, *129*, 1629–1635.
 34. Bode, H. B.; Zeggel, B.; Silakowski, B.; Wenzel, S. C.; Reichenbach, H.; Müller, R. Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 471–481.
 35. Gawas, D.; Garcia, R.; Huch, V.; Müller, R. A Highly Conjugated Dihydroxylated C₂₈ Steroid from a Myxobacterium. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1281–1283.
 36. Garcia, R.; Gemperlein, K.; Müller, R. *Minicystis rosea* gen. nov., sp. nov., a polyunsaturated fatty acid-rich and steroid-producing soil myxobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 3733–3742.
 37. Qi, J.; Ojika, M.; Sakagami, Y., Linkosides A and B, Two New Neuritogenic Steroid Glycosides from the Okinawan Starfish *Linckia laevigata*, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1961–1966.

謝辞

本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科生理活性物質化学研究分野において行ったものであり、本テーマを与えてくださり終始丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました小鹿一教授に深く感謝申し上げます。

研究生生活において多岐にわたってお世話になり、また様々な助言をいただきました中川優准教授、近藤竜彦講師に深く感謝申し上げます。

研究生生活を送るにあたり、母親のような温かい助言、励ましを頂きました岡田真弓事務補佐員に深く感謝申し上げます。

本研究を始めるにあたり植物疫病菌の管理および培養方法の有用な助言を頂きました浅野友世技術補佐員に深く感謝申し上げます。

$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の合成を行って頂きました東京農業大学 矢島新准教授に深く感謝申し上げます。

粘液細菌を提供して頂きました味の素株式会社イノベーション研究所 飯塚俊博士並びに同株式会社研究開発企画部 不藤亮介博士に深く感謝申し上げます。

MS スペクトルの測定にあたりご指導頂きました全学技術センター 北村繁幸技術員、NMR スペクトルの測定でご協力頂きました古賀和司技術員ならびに CD スペクトルの測定でご協力いただきました尾山公一技術職員に深く感謝申し上げます。

研究生生活を送る上でいつも温かい励ましや助言、ご指導を頂きました生理活性物質化学研究分野関係者に深く感謝いたします。

最後に、博士号取得までの長い道のりを精神的、経済的に支えてくれ、温かく見守り応援してくれた家族に深く感謝いたします。

報文目録

1. Tomura, T.; Molli, S. D.; Murata, R.; Ojika, M. Universality of the *Phytophthora* mating hormones and diversity of their production profile, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5007.
2. Tomura, T.; Nagashima, S.; Yamazaki, S.; Iizuka, T.; Fudou, R.; Ojika, M. An Unusual diterpene—enhygromic acid and deoxyenhygrolides from a marine myxobacterium, *Enhygromyxa* sp., *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 109.

参考論文目録

1. Ojima, D.; Yasui, A.; Tohyama, K.; Tokuzumi, K.; Torihara, E.; Ito, K.; Iwasaki, A.; Tomura, T.; Ojika, M.; Suenaga, K. Total synthesis of miuraenamides A and D, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9886–9894.
2. Sun, Y.; Tomura, T.; Sato, J.; Iizuka, T.; Fudou, R.; Ojika, M. Isolation and biosynthetic analysis of haliamide, a new PKS-NRPS hybrid metabolite from the marine myxobacterium *Haliangium ochraceum*, *Molecules* **2016**, *21*, 59.
3. Sun, Y.; Feng, Z.; Tomura, T.; Suzuki, A.; Miyano, S.; Tsuge, T.; Mori, H.; Suh, J.; Iizuka, T.; Fudou, R.; Ojika, M. Heterologous production of the marine myxobacterial antibiotic haliangicin and its unnatural analogues generated by engineering of the biochemical pathway, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22091.
4. Han, C.; Furukawa, H.; Tomura, T.; Fudou, R.; Kaida, K.; Choi, B.; Imokawa, G.; Ojika, M. Bioactive maleic anhydrides and related diacids from the aquatic Hyphomycete *Tricladium castaneicola*, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 639–644.
5. Aratake, S.; Tomura, T.; Saitoh, S.; Yokokura, R.; Kawanishi, Y.; Shinjo, R.; Reimer, J. D.; Tanaka, J.; Maekawa, H. Soft coral *Sarcophyton* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) species diversity and chemotypes, *PLoS ONE*, **2012**, *7*, e30410.