

昆虫由来微生物に注目した有用物質探索

小林 秀昭¹, 竹石 桂一², 安達 勇光³

微生物代謝産物は抗生物質の発見以降重要な創薬資源とみなされ、新規の作用や構造を持つ物質を見つけるため、さまざまな環境で存在している微生物に目が向けられてきた。近年、微生物と昆虫との関わりが注目されている。宿主昆虫と微生物双方の生存戦略に関わる分子やその生理機能が解明されると同時に、それら分子の創薬シーズとしての可能性が見いだされている。昆虫由来微生物には、昆虫共生菌、昆虫寄生菌、付着微生物があり、培養可能な菌から生理活性物質を発見する従来の方法が進む一方で、培養不可能な共生菌の産物の解明はさわめて遅れている。こうした培養不可能な共生菌の遺伝情報と生理活性物質を整備するための基盤技術の確立は、創薬資源の多様性に貢献すると考えられる。

1. 微生物代謝産物のヒトおよび昆虫との関わり

微生物はヒトの食品加工に大きく貢献し、味噌や醤油などの発酵産業に欠かせないものとなっている。さらには、微生物とヒトとの直接的な関わりも密接で、微生物が感染症を引き起こすこと、また腸内細菌がヒトの健康に深く関わっていることはよく知られている。

また微生物はさまざまな種類の代謝産物を生産し、特に抗生物質の発見は二十世紀最大の発見の一つであった。ペニシリンをはじめ多くの抗生物質のおかげで細菌性の感染症は恐ろしい病気ではなくなった。国内ではストレプトマイシン耐性の結核菌に有効なカナマイシンが発見され¹⁾、日本初の国際医薬として評価され、さらには制がん抗生物質ブレオマイシンが発見され臨床使用に至っている²⁾。微

¹ 日本大学薬学部ゲノム創薬学研究室 (〒274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1)

² 静岡県立大学名誉教授 (元農業生物資源研究所・特別研究室) (〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1)

³ 微生物化学研究所・生物活性研究部 (〒141-0021 東京都品川区上大崎 3-14-23)

Exploration of valuable metabolites from insect-derived microbes

Hideaki Kobayashi¹, Keiichi Takeishi² and Hayamitsu Adachi³ (Laboratory of Genome Pharmaceuticals, School of Pharmacy, Nihon University, 7-7-1 Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan; ²University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka, Shizuoka 422-8526, Japan; ³Laboratory of Disease Biology, Institute of Microbial Chemistry, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan)

生物代謝産物中から発見されたこのような抗生物質は人類の健康と福祉に多大な貢献をした。

昆虫においても微生物との関わりは非常に密接である。昆虫に対する微生物の存在様式は、大きく分けて三つある。一つ目は、昆虫体内の組織に共生している微生物 (昆虫共生菌) である。二つ目は、昆虫に寄生する菌で、その中には病原性を示し昆虫を死に至らしめる昆虫病原菌がある。特に昆虫病原糸状菌として、昆虫に感染しキノコ (子実体) を生やす冬虫夏草菌が広く知られている。三つ目は、体表など外界と接する面における付着微生物である。昆虫病原糸状菌が微生物農薬として利用され、冬虫夏草が生薬としてだけでなく、最近では創薬資源として認知されていることを除くと、これら昆虫と関わりのある他の微生物は創薬資源としてはほとんど注目されていない。筆者らは数年前からこれら昆虫と関わる微生物に注目し、その創薬資源としての開発を進めている。本稿ではその中でも特に昆虫共生菌と昆虫病原糸状菌を中心に紹介する。

2. 昆虫共生菌

1) 昆虫共生菌とは

昆虫は4億年前に誕生し³⁾、地球上には数百万種が存在すると考えられている^{4,5)}。昆虫の繁栄は進化の過程で獲得した環境適応能力によるものといわれ、短期間の世代交代や抜群の生殖能力、過酷な生活環境を克服するための休眠や変態、外敵から身を守るための生体防御能などが挙げられる。最近では、昆虫に共生している微生物 (以下、昆虫共生菌または共生菌) が昆虫の環境適応能力を高めている

ことが報告されるようになってきた。

昆虫種の6割がそれぞれの種ごとに共生菌を持つといわれており、その多くのは細菌や真菌である⁶⁾。共生菌は宿主の生存に大きな影響を与え、その内容はさまざまである。宿主に対して栄養を供給したり⁷⁾、宿主の性や生殖を制御したりする⁸⁾。また、宿主が捕食者から逃れられるように体色を変化させたり⁹⁾、宿主の食性を変化させるもの¹⁰⁾、宿主に農薬耐性を付与したりするもの¹¹⁾なども知られるようになってきた。このように共生菌は宿主に有益なものを付与する一方、共生菌自身は宿主の体内に在るため宿主からストレスを受けている。共生菌がそのストレスに耐えるため、菌体内にポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を蓄積することが報告された¹²⁾。PHAは細菌が貧栄養などの環境ストレスに耐えるために蓄積するものとして知られている。

一方、共生菌によってはその生存を宿主の代謝に大きく依存しており、生存に必要な遺伝子すら失っていることがゲノム解読によって明らかにされてきた^{7,13)}。共生菌のゲノムは縮小しており、アブラムシの共生菌ブフネラの0.64 Mb⁷⁾、キジラミの共生菌カルソネラの0.16 Mb¹⁴⁾など、大腸菌ゲノム4.6 Mb^{15,16)}の数分の1から数十分の1の大きさになっている。このことから、共生に必要な遺伝子や、宿主に対して有用な遺伝子は、逆に濃縮され保持されていると考えられる。

2) 昆虫共生菌の有用性

昆虫に有用な共生菌を我々ヒトにも役立てることはできないだろうか。センチクバエから見つかった抗菌物質5-S-GAD¹⁷⁾は、抗腫瘍活性¹⁸⁾や血管新生阻害¹⁹⁾など多様な生理活性を示し、白内障の点眼剤としての開発が進められている(西川の項を参照)。この物質の生産には共生菌の酵素などが関与しているのではないかと考えられている。また、養菌性キクイムシは坑道内でアンブロシア菌 (ambrosia fungi) と総称される共生菌を培養する習性を持っており、幼虫はこの菌類を摂食して成長する。成虫は共生菌の胞子を貯蔵・運搬するための器官(胞子貯蔵器官)を備えている。トドマツオオキクイムシ (*Xyleborus validus*) の坑道から分離された糸状菌 Xv-3 の培養液から抗菌物質 cerulenin および helvolic acid が単離されている。これらの物質は雑菌の繁殖を防いでいるのではないかと考えられている²⁰⁾。これらの例のように、共生菌は宿主の生体防御に関わっている。その一方で、自らが排除されないように巧妙に宿主の生体防御システムをかいくぐっているとも考えられる。したがって、共生菌が抗菌物質や免疫制御物質をはじめとして人に役立つ物質を作っていることは大いに考えられる。

共生菌は数億年もの間宿主と共生関係にありゲノムサイズは縮小している。そのため共生菌を宿主の昆虫から取り出し培養することは難しい。培養に頼らない方法で有用物質を探索する試みが必要である。たとえば、PCR法を用

いた新規遺伝子の探索が考えられる。アオバアリガタハネカクシ (*Paederus fuscipes*) の全DNAから作製されたコスミドライブラリーからPCR法を用いて、ペデリン系の抗腫瘍ポリケチドを合成すると考えられる新規遺伝子が報告されている²¹⁾。しかし、この方法では既存の遺伝子と相同性のあるものしか得ることができない。

昆虫の中には、体内の特殊な組織(菌細胞塊)に共生菌を有しているものがある。同一種の昆虫を多数集めて菌細胞塊を取り出してすりつぶすと、比較的純度の高いある程度の量の共生菌を確保することができる。そこで筆者らはこのような共生菌を取り出し創薬資源として利用できないか検討することにした。具体的には共生菌の遺伝情報と発現産物に注目した。前者は、共生菌のもつ全遺伝情報を解読することであり、その中から新たな有用遺伝子を見つけることを意図している。後者は、共生菌の遺伝情報を担うDNAの一部を大腸菌に組み込み、大腸菌に昆虫共生菌の代理として物質を生産させ、そこから有用な生理活性物質を見いだすことを意図している。これらの方法を用いて個々の共生菌の遺伝資源を整備し、共生菌を創薬資源として利用できるようにしようと考えた。

3) モデル生物としてのカメムシ共生菌

果樹園の害虫として有名なチャバネアオカメムシ (*Plautia stali*, 半翅目カメムシ科)(図1)は中腸盲のう部に共生菌を純粋培養している²²⁾。共生菌を排除すると幼虫の期間が延長し羽化が遅れる。成虫になったとしても奇形や不妊がみられる。この共生菌は宿主昆虫にビタミンを供給していると考えられている²²⁾ように、宿主にとっての有用性が一部明らかにされている。

カメムシを材料とする利点は二つある。一つ目は、実験

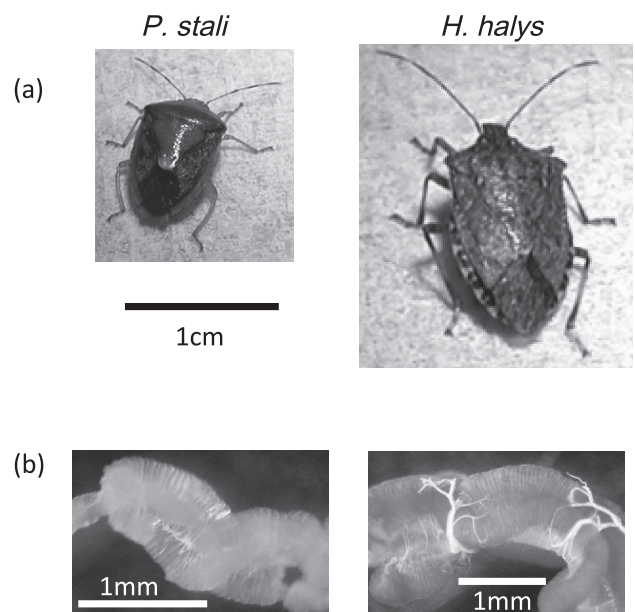


図1 チャバネアオカメムシ (*P. stali*) とクサギカメムシ (*H. halys*) の成虫と共生菌の存在する盲のう部 (a) 成虫, (b) 盲のう部。

室内で容易に飼育できることで、これにより大量の共生菌が得られる。二つ目は、共生菌が盲のう部という特定の組織内に純粋培養の形で存在していることで、これにより純度の高い共生菌が得られる。以上のことから、カメムシ科に属するチャバネアオカメムシならびにクサギカメムシ (*Halyomorpha halys*) (図1) の共生菌をモデルとして選んだ。

4) ゲノム解読

昆虫共生菌のゲノム解読については、PubMedを検索してみると、アブラムシ共生菌**ブフネラ**⁷⁾をはじめとしてこれまでに30件程度報告されている。筆者らも2006年から次世代シーケンサーを利用して共生菌のゲノム解読を開始し、チャバネアオカメムシ共生菌とクサギカメムシ共生菌についてゲノム解読を行った。次世代シーケンサーの開発により、ゲノムDNA断片をベクターに組み込むことなくシーケンスすることができるようになったため、サンガー法に比べてゲノム解析のハードルが大幅に低下した。また、リード長の長いものはアセンブルが容易になるため新規ゲノム解析 (*de novo* シーケンス解析) に向いている。チャバネアオカメムシ共生菌では平均100塩基程度のリード長が得られるRoche社のGS20を使用し、クサギカメムシ共生菌では平均400塩基程度のリード長が得られるRoche社のFLX Titaniumを使用した。最近では平均8.5 kbのリード長が得られるシーケンサー (Pacific Biosciences社, PacBio RS II) も開発されており、微生物のゲノム解析は年々ハードルが下がっている。

筆者らは、次世代シーケンサーでドラフト塩基配列を得たのちギャップクローズを行い、チャバネアオカメムシ共生菌とクサギカメムシ共生菌の全ゲノム塩基配列を決定した (DDBJ登録番号AP012551, AP012554, 投稿準備中)。チャバネアオカメムシ共生菌のゲノムサイズは4.0 Mb (図2) で、クサギカメムシ共生菌のゲノムサイズは1.1 Mb

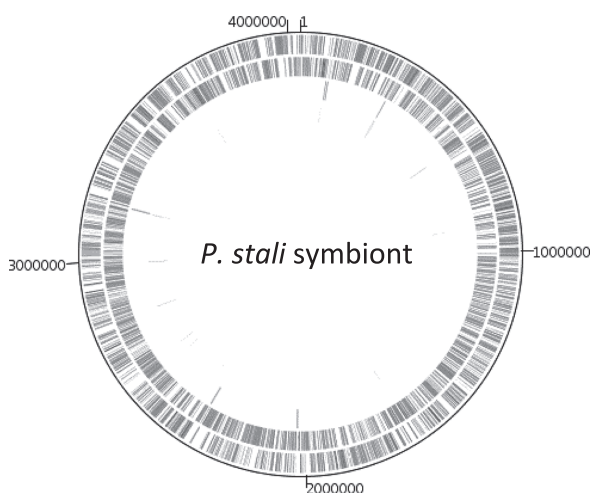


図2 チャバネアオカメムシ共生菌のゲノム地図
外周の円は共生菌ゲノムを示し、数字は塩基配列の相対位置を示す。円内の直線はそれぞれ予想された遺伝子を示す。図はMiGAP²⁸⁾で作成した。

であった。同じカメムシ科に属する昆虫の共生菌でもゲノムサイズが大きく異なることから、これら両者を比較することにより進化的なことも含めて多くのことが明らかになることが期待される (投稿準備中)。チャバネアオカメムシ共生菌はこれまでにカリフォルニアやハワイのものが報告されている²³⁾。これは大腸菌と同じガンマプロテオバクテリア綱に属しパントエア属やエルウィニア属に近いことが16S rDNAの塩基配列を用いた系統樹解析で明らかにされている。今回解読した共生菌もこれらの細菌と近いことが明らかになった。共生菌は宿主の特殊な組織で共存し宿主から排除されないことから、細胞壁を構成するリポ多糖 (LPS) に何か変化があるのではないかと考え、チャバネアオカメムシ共生菌のLPSを調べた。その結果、LPSは糖鎖を持たないラフタイプであることが遺伝子レベルで示唆された²⁴⁾。実際、本共生菌のLPSをSDS-PAGEで確認したところ確かにラフタイプであり、ゲノム解析で予想した結果と一致した²⁴⁾。ラフタイプLPSと宿主免疫系の関連について今後検討が必要である。また、チャバネアオカメムシ共生菌とクサギカメムシ共生菌の脂肪酸代謝系について調べたところ、両者はおおむね脂肪酸合成経路を持つものの、 β 酸化による分解経路に関わる遺伝子群は変異もしくは欠損により働いていないことが示唆された (投稿準備中)。さらに新規遺伝子の探索を進めている。

5) ゲノムライブラリーとその発現産物ライブラリー

大腸菌はさまざまなベクターを用いて外来遺伝子を導入できるので遺伝子発現解析によく利用されている。近年、培養した細菌や土壌中などから回収したDNA断片をベクターに挿入し、大腸菌を形質転換することにより、挿入したDNA断片から遺伝子発現できることが報告された^{25, 26)}。これはそれぞれのDNA断片に含まれるプロモーターを用いての発現と考えられる。この方法が共生菌由来産物の探索に使えるのではないかと考えられた。そこで、共生菌の遺伝子産物やその代謝産物のライブラリー作製やこのライブラリーを使っての有用物質の探索が確かにできるか検証を行った。ベクターとして、短いDNA断片を効率的に組み込むことのできる通常のプラスミドベクターおよびオペロンを含むような長いDNA断片も組み込むことのできるBACベクターを用いて検討した。

プラスミドベクターとしてpKF3を用い、チャバネアオカメムシ共生菌ゲノムDNAからプラスミドライブラリーを作製した²⁷⁾。共生菌ゲノムDNAを制限酵素EcoRI, HindIII, およびSacIで別々に完全消化し、ゲル濾過を2回行うことで平均約2.7 kbのDNA断片を得た。それらを別々にベクターに組み込み、大腸菌TH2株に導入した。その結果、それぞれ4,500~6,000の独立クローンからなるゲノムライブラリーを構築することができた。それぞれのクローンから遺伝子が発現していることを確認するため、ライブラリーから144クローンを単離しSDS-PAGEで解析した。そのうちの6クローンでユニークなバンドを

示すタンパク質の発現が明瞭に認められた。各クローンのプラスミドの挿入DNA配列を決定し、Lasergeneソフトウェア (DNASTAR社) と Database Center for Life Science (DBCLS, Japan) の Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP)²⁸⁾ で ORF を予想したところ、共生菌由来の産物であることが予想された。ユニークなバンドを示したタンパク質を二次元ゲル電気泳動で精製し、プロテインシーケンサーで N 末端のアミノ酸配列を決定したところ、それらは宿主由来の配列とは異なり、共生菌ゲノム DNA 塩基配列から予想された N 末端アミノ酸配列と一致した。これらの結果により、プラスミドベクターで共生菌由来の産物を発現できることがわかった²⁷⁾。また、これらタンパク質を発現した遺伝子のうちの二つ (GTP-binding protein, DnaK) について 5' 上流領域の塩基配列を調べたところ、それら共生菌の遺伝子のプロモーター部位は対応する大腸菌の遺伝子のものであり、-10 配列は同一で、Shine-Dalgarno 配列は完全に両方で保存されていた。このことから、共生菌のプロモーター配列は宿主大腸菌のものであり、共生菌遺伝子が大腸菌内で発現することが支持される。しかし、共生菌の遺伝子の大腸菌内での発現量が宿主大腸菌と同程度であるという保証はなく、また、発現したタンパク質やそれによる代謝産物がスクリーニングに十分な量であるかはさらに検討が必要である。今回ガンマプロテオバクテリア属に属する本共生菌で行った大腸菌での代理発現の試みは、-10 配列や-35 配列が種内でよく保存されていること^{29,30)}、多くの細菌の RNA ポリメラーゼがバクテリオファージ T7 プロモーターを認識する³¹⁾ことを考えあわせると、 α -プロテオバクテリア、 β -プロテオバクテリア、フラボバクテリアといった昆虫共生菌でみられるほかの属の細菌でも同様に適用できると考えられる。他のタイプの細菌での検証が期待される。これまでに、筆者らはクサギカメムシ共生菌についても同様にプラスミドライブラリーを構築している。

Bacterial artificial chromosome (BAC) ベクターは 100 kb 以上の DNA を挿入することができるので³²⁾、特定の代謝に関わる遺伝子群を含んだ形でのクローニングが期待できる。一般に BAC ゲノム DNA ライブラリーはゲノムシーケンスに利用されるが、原核生物の遺伝子の代理発現にも利用されるようになってきた²⁶⁾。そして、土壤中のメタゲノム DNA BAC ライブラリーも構築され、多くの酵素が同定されるようになってきた^{25,33)}。BAC ベクターとして pBeloBAC11 を使い、チャバネアオカメムシ共生菌から BAC ライブラリーを構築した³⁴⁾。方法は常法に従い、挿入するゲノム DNA の断片化をできるだけ抑えるために、共生菌をそのまま 1% アガロースゲルに埋め込み、アガロースゲル中でリゾチームとプロテアーゼで消化し、制限酵素 Sau3AI で部分切断してパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で分離し、おおよそ 50~500 kb の大きさの DNA 断片を回収した。pBeloBAC11 ベクターを BamHI で完全消化し、共生菌の DNA 断片を挿入した。大腸菌

DH10B 株を形質転換し、クローンを得た。各クローンから BAC プラスミドを精製し、挿入断片長を PFGE で確認した。チャバネアオカメムシ共生菌では 775 個のクローンを取得した。平均挿入断片長は 40~50 kb で、最長のものは 120 kb に達した。10 kb 以上の挿入断片長を持つクローン 513 個を選択し以降の解析に用いた。これらクローンの平均 DNA 挿入断片長 41 kb は培養されたセレウス菌から作製されたライブラリーの 98 kb²⁶⁾ や土壌メタゲノムライブラリーの 44.5 kb²⁵⁾ と同程度であった。また、これらクローンがカバーするゲノムサイズは、共生菌のゲノムサイズのおおよそ 5 倍に相当した。挿入 DNA 末端のシーケンスを行ったところ、少なくとも片側が共生菌のドラフト塩基配列と一致したものは 485 クローンあり、95% 以上のクローンが共生菌由来のゲノム DNA を含んでいることがわかった。次に、作製した BAC クローンについて、挿入 DNA 断片から遺伝子の発現がみられるか検討を行った。ライブラリー作製に用いた大腸菌 DH10B 株は *leu* オペロンを欠失しているためロイシンを含んでいない最少培地では増殖できない。筆者らの構築した BAC ライブラリーは平均挿入断片長 41 kb を有することから 30 個程度の遺伝子を含んでいると考えられた。このためいくつかのクローンは *leu* オペロンとそのプロモーター領域を含んでいることが期待された。513 クローンをスクリーニングし、最少培地で増殖するクローンを二つ見つけることができた。それぞれの挿入断片長は 47 kb と 39 kb の大きさであった。これら 2 クローンの挿入配列を決定したところ、確かに共生菌の *leuLABCD* 遺伝子と考えられる配列を含んでいた。大腸菌とサルモネラ菌のものと比較して、Leu リーダーペプチドはそれぞれ 55.6% と 51.9% の相同性を示し、LeuA-D タンパク質ではそれぞれ 77.6~86.0% と 80.1~85.8% の相同性を示した。また、RT-PCR 法により、共生菌 *leuA* 遺伝子の発現を大腸菌クローン内で確認することができた。このことは宿主大腸菌の中で、共生菌の遺伝子が働くことを意味し、共生菌のプロモーターや遺伝子が大腸菌の中で機能すると考えられた³⁴⁾。これまでに、筆者らはクサギカメムシ共生菌についても同様に BAC ライブラリーの構築を終了している。

これらの結果から、プラスミドライブラリーや BAC ライブラリーを培養して発現産物ライブラリーを作製し、共生菌由来の産物を探索することは十分可能であると考えられる。各ライブラリーにおける遺伝子の発現量を増やすことや、すべての遺伝子が発現しているかなどについて今後検討していくことが必要だと考えている。また、ライブラリーに取り込まれなかったゲノム領域を精査し、宿主大腸菌に対して毒性を持った遺伝子、たとえば抗生物質生産遺伝子、を含んでいる可能性を調べていくのも大変興味深いと考えられる。

6) 共生菌遺伝子発現株の代謝産物解析

共生菌は宿主の利益になる物質を限定して生産している

と予想されるため、それら限定された代謝産物は HPLC や LC/MS で見つけることができる可能性がある。そして見つけた代謝産物の活性は、その構造をもとに予想し調べようと考えた。チャバネアオカメムシ共生菌とクサギカメムシ共生菌から作製した BAC ライブラリーの各クローンのうち挿入配列としておおよそ 30 kb 以上を有するもの 736 株 (チャバネアオカメムシ由来 416 株, クサギカメムシ由来 320 株) を培養して得た培養液から酢酸エチル抽出を行い、低分子の生理活性物質の探索源として代謝産物ライブラリーを調製した。さまざまな生物活性評価系を用いたスクリーニングと並行して、酢酸エチル抽出物の代謝産物の解析を HPLC や、一部詳細には LC/MS で行った。空ベクターが挿入された株の代謝産物と共生菌遺伝子発現株の代謝産物を比較検討した。共生菌遺伝子発現株特異的に物質が検出される株では、産生量にバラつきはあるものの UV 検出レベルで数個の微量成分が観察され、また UV 吸収がない物質が LC/MS スペクトルにより複数観測され、活性評価に供せられるレベルにあることを確認した。物質の産生 (発現) 量は、培養条件などの検討によりさらに高めることが可能であり、探索ソースとしての質の向上が期待できる。

7) 昆虫共生菌の利用上の問題点

ライブラリー作製のためには、材料とすることができるだけ多くの種類の共生菌を集める必要がある。共生菌の種類は昆虫の種類と同様に膨大で、集めるだけ創薬資源としての価値は高まる。共生菌の収集や収集した共生菌についてゲノム解読や発現産物のライブラリーを作ることについては多大の労力が必要である。

また、今回の例のように多くの共生菌を比較的純度高く十分量確保できればよいが、昆虫体内に拡散している共生菌についてはその調製法を詳細に検討する必要がある。共生菌の培養についてはボルバキア (*Wolbachia*) の例³⁵⁾など数は少ない。また、シロアリの原生生物の共生菌のゲノム解読³⁶⁾で行われたような少量の DNA を増幅させる方法についても、増幅される量や長さが BAC ライブラリー作製に向いているかは慎重に検討する必要がある。

3. 昆虫病原糸状菌

1) 創薬資源としての昆虫病原糸状菌

筆者らは生理活性物質の探索源として、これまで主に土壌から分離した放線菌、カビの代謝産物から種々の生理活性物質を単離してきた^{37, 38)}。比較的分離しやすい菌から得られる代謝産物からは新規物質が得られにくくなってきたため、新たな創薬資源として昆虫病原糸状菌に着目し、昆虫の死骸や冬虫夏草から菌を分離しその代謝産物ライブラリーを構築している。昆虫病原糸状菌は、糸状菌のうち特に昆虫へ感染し増殖する菌群の総称であるが、その成育の過程で毒素、免疫調節物質などのさまざまな生理活性物質

を産生していると考えられている^{39, 40)}。このような特性を利用して、昆虫病原糸状菌の白きょう病菌 (*Beauveria bassiana*)、黒きょう病菌 (*Metarhizium anisopliae*)、赤きょう病菌 (*Paecilomyces fumosoroseus*) などは生物農薬として利用されている⁴¹⁾。また昆虫病原糸状菌のうち、キノコのような子実体を形成する一群は冬虫夏草菌と称されている。冬虫夏草とは、冬は虫の姿をしているが夏には植物に化す形態的特徴から名づけられた。冬虫夏草の菌類は主に生きた昆虫に感染して宿主を殺し、その後子実体を形成し胞子を飛散させて個体数を増やす。日本では実に 300 種以上が記録されており、セミ、カメムシ、クモ、ハチ、トンボ、アリ、甲虫、蛾などいろいろな昆虫の幼虫、蛹、成虫から発生する。さらには例外的にツチダンゴという地中性のキノコに寄生して子実体を生じる種も存在し、複数の科にまたがる大きな分類群である。冬虫夏草は、菌が産生する毒素や免疫抑制物質をはじめとする生理活性物質が薬理作用を示すことが期待され、医薬シーズの探索源としても注目を集めてきた⁴²⁾。冬虫夏草菌の培養エキスには抗腫瘍活性、免疫調節作用、鎮痛、鎮静、消炎、血糖低下作用、抗酸化作用、血小板凝集阻害など多くの薬理作用が知られている。2010 年には、ツクツクボウシタケの菌培養液から免疫抑制物質として得られたミリオン⁴³⁾をもとに創製された FTY720^{44, 45)}が自己免疫疾患の一つである多発性硬化症の薬として承認され、冬虫夏草の薬用資源としての有用性があらためて認識された。しかし、これらの冬虫夏草の薬理活性成分はいまだ特定されていないものも多く、薬理作用が解明されているのはほんの一部にすぎない。また冬虫夏草からは寄生菌 (冬虫夏草菌) だけでなく、二次寄生菌も分離され⁴⁶⁾、昆虫病原糸状菌の分離源としての利用価値が高い。

2) 昆虫病原糸状菌の分離と代謝産物

筆者らは、冬虫夏草タンポタケの子実体から分離したいくつもの糸状菌の中から、ITS-5.8S rDNA および 28S rDNA-D1/D2 の塩基配列解析と菌の形態的特徴より *Pochonia bulbillosa* と推定される昆虫病原糸状菌を分離した。*Pochonia* 属菌はヤマトシロアリを用いた釣り出し法により昆虫病原性寄生菌として土壌から分離されている⁴⁷⁾。また *Pochonia chlamydosporia* は殺線虫活性を示し微生物農薬として使用され、線虫に毒性を示すオーロベルチンタイプの代謝産物を産生することが知られている⁴⁸⁾。

分離した *Pochonia bulbillosa* の代謝産物はハスモンヨトウ脂肪体由来新規細胞 NIAS-SL64⁴⁹⁾ に対して細胞増殖抑制活性を示し、活性物質の探索の過程で Asteltoxin (図 3) と新規 α -ピロン類縁物質 (図 3, 1~3) が単離された (投稿中)。Asteltoxin は Citreoviridin や Aurovertin B などと同様にトリエンが結合した α -ピロン類縁体のグループに属している (図 3)。Asteltoxin は Vleggaar らによって *Aspergillus stellatus* Cruz からカビ毒として単離され⁵⁰⁾、後に大腸菌 BF1-ATPase の阻害活性を示すことが報告されている⁵¹⁾。

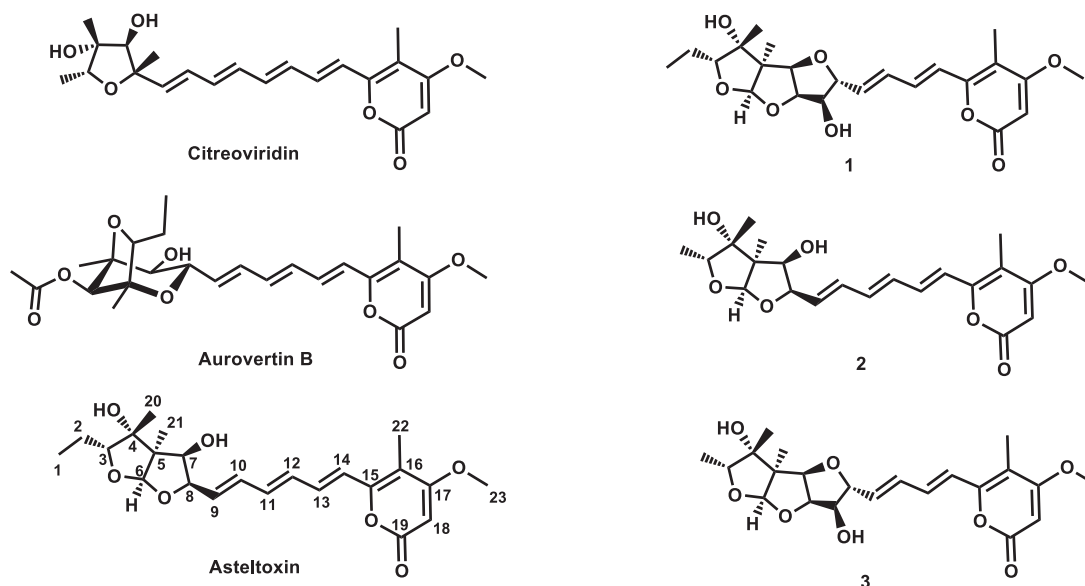


図3 トリエン- α -ピロン化合物と新規 α -ピロン類縁体 (1~3)

Asteltoxin の二つのフラン環が縮合した 2,8-dioxabicyclo [3.3.0]octane 構造は、六つの連続した不斉炭素の中に一つの四級炭素を持ち、高度に官能基化された複雑な構造ゆえに興味を持たれ、全合成研究⁵²⁻⁵⁵⁾や生合成研究⁵⁶⁾が盛んに行われた。2,8-dioxabicyclo[3.3.0]octane 構造の生合成は図 4a の 1~6 のように Vleggaar らによって提唱されている⁵⁶⁾。この反応は線状のポリエン前駆体のポリエポキシ化 (図 4a, 1→2) から始まり、最も興味あるステップはビステトラヒドロフラン環部分を形成する際、エポキシを介して立体が制御されて起こる 1,2-アルキルシフトである (図 4a, 3→4)。2004 年に Cha らは Asteltoxin の全合成において途中段階でこのエポキシを介した 1,2-アルキルシフトを適用しており、Vleggaar らが提唱した 1,2-アルキルシフトに正当性を与え、天然物立体制御合成への適用の可能性を示している⁵⁷⁾。図 3 の化合物 1 の構造は、Asteltoxin の 2,8-dioxabicyclo[3.3.0]octane 骨格にさらにフラン環が縮合した籠状の構造であることが明らかになった。この構造は 2,8-dioxabicyclo[3.3.0]octane 骨格形成 (図 4a) の後、エポキシ体 8 の生成とそれに続くエポキシ環の開環を伴ったフラン環の形成が起こったものと予想された (図 4b)。化合物 1 の分子式を検索した結果、類縁物質として Asteltoxin B が得られた。Asteltoxin B は、Asteltoxin の 3,4 位のジアステレオマーのエポキシ体 (Asteltoxin B) として報告されていたが⁵⁸⁾、旋光度、NMR データが図 3 の化合物 1 と一致したことから、Asteltoxin B の構造は化合物 1 の構造であることが示唆された。エポキシ体は不安定であり、図 4b のように直ちに開環しフラン環を形成すると考えられる。一方、Asteltoxin と 3 位側鎖の構造が異なる化合物 2 とその三環構造を持つ化合物 3 が単離され (図 3)、化合物 1 と同様の環形成機構を経て生成し、生合成の際複数のポリエン前駆体が使われる可能性が示された。化合物 1, 3 は 2 と比較して、前述の活性が著しく減弱する

ことが明らかとなった。このような昆虫病原糸状菌からは興味ある新規構造を持つ物質が多数単離されることから、多様な創薬資源としての利用価値は十分に高い。

4. まとめ

筆者らは、個々の昆虫由来微生物の特性を生かして創薬の探索資源を開発するための技術的な基盤を蓄積してきており、さらに改良を重ねている。昆虫由来微生物は医薬に限らずさまざまな産業における将来の貴重な探索資源になると考えられ、昆虫に関連した新しい産業の展開などの研究基盤となることが期待される。今後はより多くの昆虫由来微生物の遺伝資源を整備し、その利用を促進するために研究を進展させていきたいと考えている。

謝辞

名取俊二博士 (公益財団法人微生物化学研究会評議員、東京大学名誉教授) には昆虫共生菌の医薬探索資源としての開発について多大のご指導をいただきました。野田博明博士 (農業生物資源研究所 (生物研)) には昆虫や共生菌の取り扱いからゲノム解読やライブラリー作製など多くのご指導やご協力をいただきました。また共同研究者の生物研・藤井理香博士に深謝致します。本研究は、農林水産業委託プロジェクト研究「動物ゲノムを活用した新市場創出のための技術開発—昆虫ゲノム情報を活用した新需要創造のための研究—」(2007-2009)、平成 20 年度日本大学学術研究助成金一般研究 (個人) 08-133 (2008)、文部科学省私立大学等経常費補助金特別補助「学術フロンティア推進事業」(2007-2009) 等によりご支援をいただきました。また、第一三共株式会社、日本たばこ産業株式会社、日東紡績株式会社、日本製粉株式会社・中央研究所およびクミアイ化学工業株式会社の各社には「昆虫共生菌ゲノムプロ

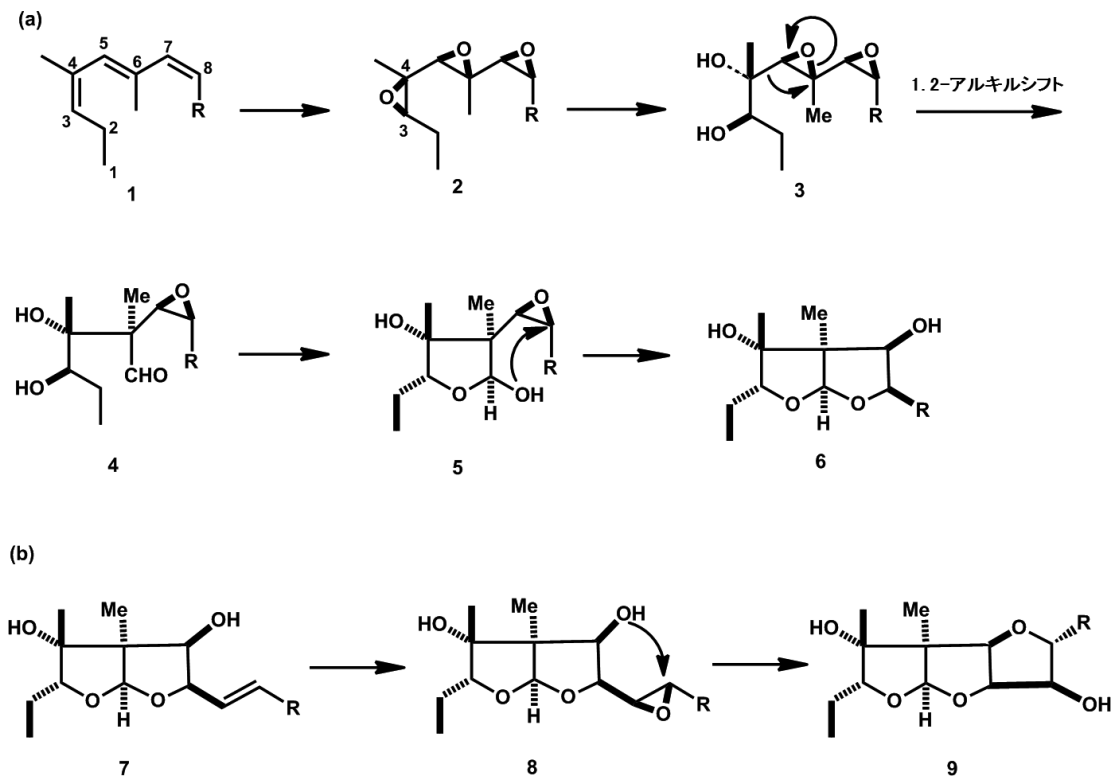


図4 Asteltoxin と類縁化合物 1 の縮環構造の形成
(a) 提唱されている Asteltoxin の生合成機構, (b) 1 の三環構造の形成。

ジェクト」に協賛をいただきました。ここに感謝申し上げます。本稿の執筆にあたり、温かいご支援をいただいた微生物化学研究所長野本明男博士に謝意を表します。共同研究者の徹化研・土井宏育博士、細川信夫博士、澤 竜一博士、中島馨、笠原優一各氏に感謝の意を表します。

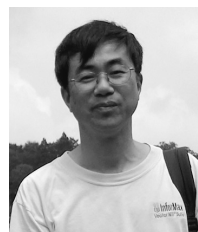
文 献

- Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K., & Takeuchi, T. (1957) *J. Antibiot. (Tokyo)*, **10**, 181-188.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., & Okami, Y. (1966) *J. Antibiot. (Tokyo)*, **19**, 200-209.
- Engel, M.S. & Grimaldi, D.A. (2004) *Nature*, **427**, 627-630.
- Gaston, K.J. (1991) *Conserv. Biol.*, **5**, 283-296.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G., & Worm, B. (2011) *PLoS Biol.*, **9**, e1001127.
- Buchner, P. (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Micro-organisms*, Wiley, New York.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000) *Nature*, **407**, 81-86.
- O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., & Werren, J.H. (1997) *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*, Oxford University Press, New York.
- Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., Simon, J.C., & Fukatsu, T. (2010) *Science*, **330**, 1102-1104.
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Shimada, M., & Fukatsu, T. (2007) *Proc. Biol. Sci.*, **274**, 1979-1984.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8618-8622.
- Kim, J.K., Won, Y.J., Nikoh, N., Nakayama, H., Han, S.H., Kikuchi, Y., Rhee, Y.H., Park, H.Y., Kwon, J.Y., Kurokawa, K., Dohmae, N., Fukatsu, T., & Lee, B.L. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E2381-E2389.
- Moran, N.A. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 512-518.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H.E., Moran, N.A., & Hattori, M. (2006) *Science*, **314**, 267.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., & Shao, Y. (1997) *Science*, **277**, 1453-1462.
- Yamamoto, Y., Aiba, H., Baba, T., Hayashi, K., Inada, T., Isono, K., Itoh, T., Kimura, S., Kitagawa, M., Makino, K., Miki, T., Mitsuhashi, N., Mizobuchi, K., Mori, H., Nakade, S., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Oshima, T., Oyama, S., Saito, N., Sampei, G., Satoh, Y., Sivasundaram, S., Tagami, H., Takahashi, H., Takeda, J., Takemoto, K., Uehara, K., Wada, C., Yamagata, S. & Horiuchi, T. (1997) *DNA Res.*, **4**, 91-113.
- Leem, J.Y., Nishimura, C., Kurata, S., Shimada, I., Kobayashi, A., & Natori, S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 13573-13577.
- Akiyama, N., Hijikata, M., Kobayashi, A., Yamori, T., Tsuruo, T., & Natori, S. (2000) *Anticancer Res.*, **20**, 357-362.
- Nishikawa, T., Akiyama, N., Kunimasa, K., Oikawa, T., Ishizuka, M., Tsujimoto, M., & Natori, S. (2006) *Eur. J. Pharmacol.*, **539**, 151-157.
- Nakashima, T., Iizuka, T., Ogura, K., Maeda, M., & Tanaka, T. (1982) *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **61**, 60-72.
- Piel, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14002-14007.
- Abe, Y., Mishihiro, K., & Takanashi, M. (1995) *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, **39**, 109-115.
- Prado, S.S. & Almeida, R.P. (2009) *Curr. Microbiol.*, **58**, 64-69.
- Kobayashi, H., Kawasaki, K., Takeishi, K., & Noda, H. (2011) *Microbiol. Res.*, **167**, 48-54.

- 25) Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., & Goodman, R.M. (2000) *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2541-2547.
- 26) Rondon, M.R., Raffel, S.J., Goodman, R.M., & Handelsman, J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6451-6455.
- 27) Fujii-Muramatsu, R., Kobayashi, H., Noda, H., & Takeishi, K. (2013) *J. Biochem.*, **154**, 149-158.
- 28) Sugawara, H., Ohyama, A., Mori, H., & Kurokawa, K. (2009) *The 20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009) (Yokohama, Japan)*, Poster and Software Demonstrations, S001-001-002.
- 29) Hawley, D.K. & McClure, W.R. (1983) *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2237-2255.
- 30) Helmann, J.D. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2351-2360.
- 31) Wiggs, J.L., Bush, J.W., & Chamberlin, M.J. (1979) *Cell*, **16**, 97-109.
- 32) Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., & Simon, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8794-8797.
- 33) Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W.R. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 955-962.
- 34) Kobayashi, H., Fujii-Muramatsu, R., Noda, H., & Takeishi, K. (2014) *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 528-533.
- 35) Noda, H., Miyoshi, T., & Koizumi, Y. (2002) *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **38**, 423-427.
- 36) Hongoh, Y., Sharma, V.K., Prakash, T., Noda, S., Taylor, T.D., Kudo, T., Sakaki, Y., Toyoda, A., Hattori, M., & Ohkuma, M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5555-5560.
- 37) Nosaka, C., Adachi, H., Sawa, R., Nakae, K., Atsumi, S., Kinoshita, N., Kubota, Y., Igarashi, M., Sei, Y., Yamaguchi, K., Shibuya, M., Nishimura, Y., & Akamatsu, Y. (2013) *J. Nat. Prod.*, **76**, 715-719.
- 38) Sawa, R., Takahashi, Y., Hashizume, H., Sasaki, K., Ishizaki, Y., Umekita, M., Hatano, M., Abe, H., Watanabe, T., Kinoshita, N., Homma, Y., Hayashi, C., Inoue, K., Ohba, S., Masuda, T., Arakawa, M., Kobayashi, Y., Hamada, M., Igarashi, M., Adachi, H., Nishimura, Y., & Akamatsu, Y. (2012) *Chem.-Eur. J.*, **18**, 15772-15781.
- 39) Zimmermann, G. (2007) *Biocontrol Sci. Technol.*, **17**, 553-596.
- 40) Glare, T.R. & Milner, R.J. (1991) In *Handbook of Applied Mycology, Vol. 2: Humans, Animals, and Insects* (Arora, D. K., Ajello, L. and Mukerji, K.G. eds.), pp. 547-612, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 41) Copping, L.G. (2001) *The Biopesticide Manual, Second Edition, British Crop Protection Council, United Kingdom.*
- 42) Isaka, M. (2007) *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **65**, 700-708.
- 43) Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., Chiba, K., Hoshino, Y., & Okumoto, T. (1994) *J. Antibiot. (Tokyo)*, **47**, 208-215.
- 44) Adachi, K. & Chiba, K. (2008) *Perspect. Med. Chem.*, **1**, 11-23.
- 45) Adachi, K., Kohara, T., Nakao, N., Arita, M., Chiba, K., Mishina, T., Sasaki, S., & Fujita, T. (1995) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 853-856.
- 46) Kobayashi, Y. (1949) *J. Jpn. Bot.*, **24**, 176-180.
- 47) Nishi, O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., & Shimizu, S. (2011) *Entomotech*, **35**, 21-26.
- 48) Niu, X.M., Wang, Y.L., Chu, Y.S., Xue, H.X., Li, N., Wei, L.X., Mo, M.H., & Zhang, K.Q. (2010) *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 828-834.
- 49) Tateishi, K., Kasahara, Y., Watanabe, K., Hosokawa, N., Doi, H., Nakajima, K., Adachi, H., Nomoto, A. (2014) *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, in press, DOI: 10.1007/s11626-014-9808-4.
- 50) Kruger, G.J., Steyn, P.S., Vlegaar, R., & Rabie, C.J. (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 441-442.
- 51) Satre, M. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 267-274.
- 52) Schreiber, S.L. & Satake, K. (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6723-6724.
- 53) Schreiber, S.L. & Satake, K. (1984) *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4186-4188.
- 54) Schreiber, S.L. & Satake, K. (1986) *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2575-2578.
- 55) Tadano, K., Yamada, H., Idogaki, Y., Ogawa, S., & Suami, T. (1990) *Tetrahedron*, **46**, 2353-2366.
- 56) Vlegaar, R. (1986) *Pure Appl. Chem.*, **58**, 239-256.
- 57) Eom, K.D., Raman, J.V., Kim, H., & Cha, J.K. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 5415-5421.
- 58) Bao, J., Zhang, X.Y., Xu, X.Y., He, F., Nong, X.H., & Qi, S. H. (2013) *Tetrahedron*, **69**, 2113-2117.

著者寸描

●小林秀昭 (こばやし ひであき)



日本大学薬学部准教授。博士(薬学)。

■略歴 1965年広島県に生る。88年東京大学薬学部卒業。93年同大学院薬学系研究科博士課程修了。日本学術振興会特別研究員、明治製菓(株)薬品総合研究所、カリフォルニア大学サンディエゴ校(UCSD)研究員、東京都精神医学総合研究所研究員、東北大学大学院医学系研究科研究員、2006年日本大学薬学部専任講師。12年4月より現職。

師。12年4月より現職。

■研究テーマと抱負 昆虫共生菌の新規生物資源としての開発とその生命現象の分子基盤の解明。地球上に広く繁栄する昆虫には我々の学ぶべき多くの知恵が詰まっています。その一端を少しでも明らかにして医療の進歩に貢献したいと考えています。

■ウェブサイト <http://www.pha.nihon-u.ac.jp/genome.html/>

■趣味 旅行, 温泉。

●竹石桂一 (たけいし けいいち)

静岡県立大学名誉教授。

●安達勇光 (あだち はやみつ)

(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所(微化研)生物活性研究部主席研究員。博士(理学)。

■略歴 1987年島根大学理学部卒業, 89年岡山大学大学院理学研究科修士課程修了, 92年大阪大学大学院理学研究科博士課程修了, 92年微生物化学研究所(微化研)薬化学部研究員, 2003~09年微化研・探索研究推進ユニット長(05~06年米国National Institutes of Health (NIH)研究員), 10年より現職。

■研究テーマと抱負 生理活性物質の探索と創製を通して医療, 農業, 環境の分野に貢献する。昆虫-微生物間の相互作用に介在する物質基盤の解明と創薬への応用。

■ウェブサイト <http://www.bikaken.or.jp>

■趣味 キノコ採集, 山歩き, 乱読書。