

塩性植物に内生する耐塩性菌類における塩濃度依存性生産物質の探索

塩野 義人, 小関 卓也

山形大学農学部

概要 塩性植物の一つであるマングローブは地球温暖化により引き起こされる海水上昇時において、海水の浸食から沿岸を保護する植物としての利用が期待されている。しかし、近年の環境変化にともない、マングローブを枯死に追い込む枝枯死病などが広がりつつある。一方、日本をはじめ、その他の地域では、大きな病原菌の拡散は見られておらず、健全なマングローブから多種多様な植物内生菌類が既に発見されている。このことは、マングローブは、特殊な微生物との間に密接な共生関係を築くことで、さまざまな環境に適応していると考えられる。しかしながら、これらの塩性植物に内生する耐塩性菌類(低好塩性菌)がどのように共生したのか、菌類の役割や生産している物質などについては、戦略的に進められていることは少なく、天然有機化学領域においても、新しい生理活性物質の探索源にもつながると予測される。そこで、本申請では、マングローブより内生菌類を分離し、塩濃度の培養条件に依存し、生産する二次代謝産物や塩濃度に対して、量的に変動する物質を探索することを目的とした。

マングローブ林より採取した植物の内生菌類より分離した二種の糸状菌 IM-26、IM-33 株に着目して、それらの菌類の生産する代謝産物を調べた。

糸状菌 IM-26 株を食塩無添加の玄米培地と3%の食塩を含む培地で培養し、それら菌類の生産物を TLC で比較することにより、食塩を含む培地でのみ生産されている物質として、化合物 **1** を単離した。化合物 **1** の化学構造解析は、NMR スペクトルデータの解析を中心に行った。その結果、ジベンゾ[a]ピロンを有する既知のアルテヌエンであることが明らかとなった。

糸状菌 IM-33 株は、マングローブ植物より、耐塩性内生菌類(もしくは好塩性)のスクリーニング時に分離された糸状菌類のうち、二次代謝産物の生産性の非常に高い菌類の一種であったため、生産物質の同定を進めた。その結果、三種の化合物、12-O-デアセチルホモキサントン **A (3)** とサイトカラシン **H (4)**、**J (5)** であった。化合物 **3** は、ホモキサントン **A** の新しい類縁物質であった。これらの物質は、生産菌の培養条件(食塩無添加・添加)に依存することなく、顕著に生産された。そもそも、IM-33 株は塩濃度含有培地を用いた内生菌類のスクリーニングで分離された菌類であり、通常のスクリーニング方法では検出されにくい菌類と考えられ、マングローブ植物周辺やその環境に応答し、生産され、利用されていると思われる。

このような塩濃度依存的に誘導される物質を明らかにすることで、マングローブ植物やその環境下で生育する菌類の特徴を物質レベルから観測でき、特徴的な生産物質は、内生菌類のマングローブ植物内に生息する理由や宿主植物との共生関係を考える上で重要であると考えられる。今後は、生育する菌類のプロファイルを知るためにも、IM-26 株や IM-33 株も含め、これら菌類の同定が必要である。

1. 研究目的

塩性植物の一つであるマングローブは地球温暖化により引き起こされる海水上昇時において、海水の浸食から沿

岸を保護する植物としての利用が期待されている。しかし、近年の環境変化にともない、マングローブを枯死に追い込む枝枯死病などが広がりつつある。一方、日本をはじめ、

その他の地域では、大きな病原菌の拡散は見られておらず、健全なマングローブから多種多様な植物内生菌類が既に発見されている。このことは、マングローブは、特殊な微生物との間に密接な共生関係を築くことで、さまざまな環境に適応していると考えられる。しかしながら、これらの塩性植物に内生する耐塩性菌類(低好塩性菌)がどのように共生したのか、菌類の役割や生産している物質などについては、戦略的に進められていることは少なく、天然有機化学領域においても、新しい生理活性物質の探索源にもつながると予測される。そこで、本申請では、マングローブより内生菌類を分離し、塩濃度の培養条件に依存し、生産する二次代謝産物や塩濃度に対して、量的に変動する物質を探索することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 植物内生菌の単離方法

ジャカルタ近郊のマングローブ林より採取した植物を内生菌類のスクリーニング資源とした。採取したマングローブ植物の枝や樹皮を約 1 cm の大きさにカットし、その表面を 70% エタノールと次亜塩素酸ナトリウムで殺菌後、植物サンプルのカット面が寒天培地(3% NaCl 含有)に接するように置き、数日間、25°C で培養した。各植物体の周辺に発生する糸状菌をスラントに釣菌した。このようにして

分離した約 100 株について、各種培養培地に植菌した。

2.2 単離菌類の培養実験

異なる培養組成による菌類の物質生産性を確認するために、次の三種の異なる培地でそれぞれの菌類を培養した。①ファーマメディア培地:(組成:ファーマメディア:1.0%, グルコース:5%, KH_2PO_4 :0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.1%, 水(NaCl:3%), 培養条件:21日間, 25度で振盪培養)②麦芽エキス培地:(組成:麦芽エキス:4%, グルコース:4%, ペプトン:1.0%, 水(NaCl:3%), 培養条件:21日間, 25度で振盪培養)③玄米固体培地:(組成:玄米, 水(NaCl:3%), 培養条件:30日間, 25度で静置培養)

3. 研究結果

3.1 培養抽出物の TLC 分析結果

2.1で分離された菌類の培養抽出物成分をTLCにより分析した(Fig. 1)。その結果、塩濃度により、物質の生産性が異なった糸状菌 IM-26 株を選別した。すなわち、塩濃度を高めることにより、二次代謝産物の生産が刺激されたことから、IM-26 株の生産する物質を明らかにすることとした。また、TLC 分析において、塩含有培地で優位な生産量で二次代謝産物を生産していることが認められた IM-33 株についても、生産物を単離し、その構造を明らかにすることとした。

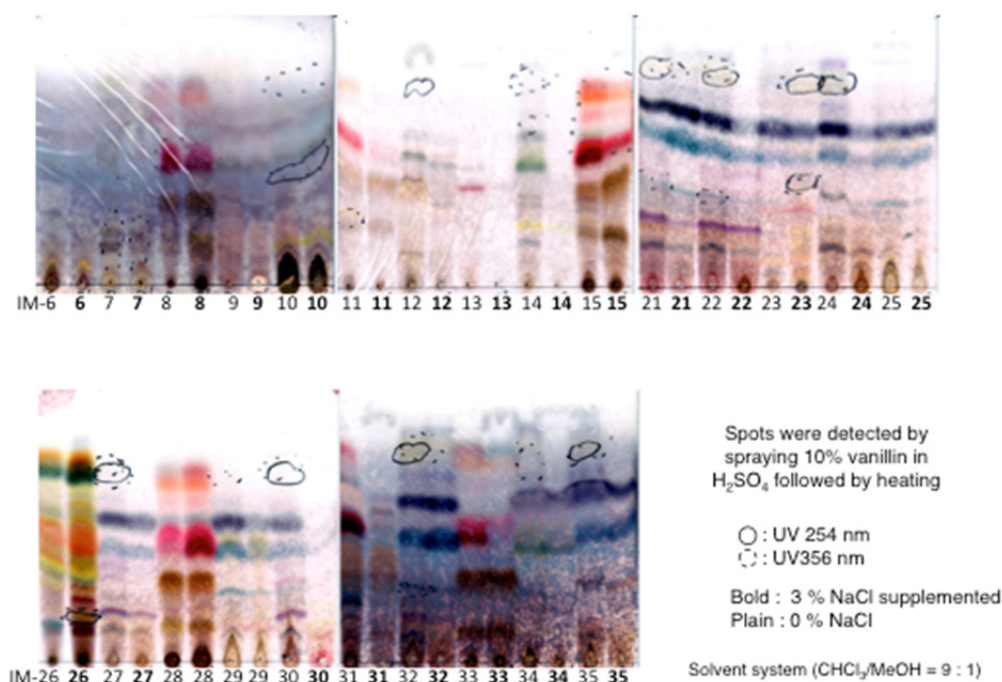


Fig. 1. 単離菌類の培養物の TLC 分析結果

3. 2 糸状菌 IM-26 株の生産する二次代謝産物について

3. 2. 1 培養と物質の単離

糸状菌 IM-26 株を玄米固体培地 (500 g, 10 g/シャーレ x 50 枚) に植菌し、25°C で 3 週間培養した。培養物のメタノール抽出物を TLC 上のスポットの UV 吸収や呈色試験噴霧後の発色を指標に精製した。まず、メタノール抽出物の濃縮後に得られた水溶性残渣を酢酸エチルで抽出し、続いて、酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル) にて精製し、11 のフラクション (Fr. 1-1~1-11) を得た。続いて、Fr. 1-3 はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム/酢酸エチル) により精製し、化合物 **1** (12.5 mg) を単離した。さらに、Fr. 1-6 と Fr. 1-7 についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム/酢酸エチル) と ODS カラムクロマトグラフィー (水/メタノール) により精製し、化合物 **2** (1.5 mg) を単離した。

3. 2. 2 化合物 **1**, **2**

化合物 **1** は高分解能マスペクトルより、分子式を $C_{15}H_{16}O_6$ と決定した。また、**1** の 1H -NMR スペクトルデータ (Table 1) を分析した結果、メチル基 [δ_H 1.34 (3H, s, Me-7')], メチレン [δ_H 2.00 (1H, dd, $J = 14.4, 3.7$ Hz, H-3')], 2.40 (1H, dd, $J = 14.4, 9.0$ Hz, H-3')], オキシメチン [δ_H 3.78 (1H, m, H-4'), 4.06 (1H, m, H-5')], メキシ [δ_H 3.88 (3H, s, 5-OCH₃)], 二重結合に帰属されるメチン [δ_H 6.47 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 6.66 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.21 (1H, $J = 2.0$ Hz, H-6')] のシグナルが確認された。一方、DEPT スペクトルと ^{13}C -NMR スペクトルデータ (Table 1) より、 sp^2 領域における 9 本 (カルボニル含む)、 sp^3 領域に 6 本のシグナルが観測されたこと不飽和度 8 から、**1** はピロン環を母核とした三環性物質であると推定した。これらのデータを基に文献検索を行ったところ、ジベンゾ[a]ピロン構造の誘導体である既知のアルテヌエンのスペクトルデータと良い一致を示した (Cole and Cox, 1981)。これらのことから、**1** をアルテヌエンと同定した (Fig. 2)。化合物 **2** については、現在、構造解析中である。

3. 3 糸状菌 IM-33 株の生産する二次代謝産物について

3. 3. 1 培養と物質の単離

糸状菌 IM-33 株を玄米固体培地 (500 g, 10 g/シャー

Table 1. 1H and ^{13}C NMR data of altenuene (**1**)

Altenuene (1)		
No	δ_C	δ_H
1	170.4 (s)	
2	101.8 (s)	
3	165.3 (s)	
4	101.6 (d)	6.47 (1H, d, 2.0)
5	167.9 (s)	
6	103.8 (d)	6.66 (1H, d, 2.0)
7	170.4 (s)	
1'	134.8 (s)	
2'	86.5 (s)	
3'	40.8 (t)	2.00 (1H, dd, 14.4, 3.7) 2.40 (1H, dd, 14.4, 9.0)
4'	70.7 (d)	3.78 (1H, m)
5'	72.3 (d)	4.06 (1H, m)
6'	131.4 (d)	6.21 (1H, 2.0)
7'	28.0 (q)	1.34 (3H, s)
OCH ₃	49.6 (q)	3.88 (3H, s)

Measured in CD₃OD, and values in parentheses are coupling constants in Hz.

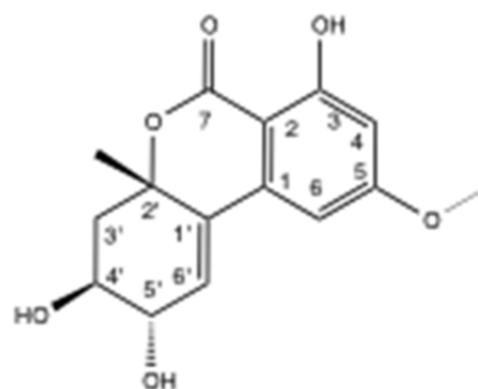


Fig. 2. アルテヌエン (**1**) の構造

レ x 50 枚) に植菌し、25°C で 3 週間培養した。培養物のメタノール抽出物を TLC 上のスポットの UV 吸収や呈色試験噴霧後の発色を指標に精製した。まず、メタノール抽出物の濃縮後に得られた水溶性残渣を酢酸エチルで抽出し、続いて、酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル) にて精製し、11 のフラクション (Fr. 1-1~1-11) を得た。続いて、Fr. 1-4 は

シリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム/酢酸エチル)や ODS カラムクロマトグラフィー(水/メタノール)、さらに、HLPC 分取により、二種の化合物(3 : 2.5 mg と 4 : 20 mg)を単離した。Fr. 1-6 についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒:クロロホルム/酢酸エチル)と ODS カラムクロマトグラフィー(水/メタノール)により精製し、化合物 5 (30 mg)を単離した。

3. 3. 2 化合物 3

化合物 3 は、高分解能 HRLCTOFMS 測定により分子式を $C_{36}H_{36}O_{15}$ と決定した。IR スペクトルよりアセチル基の存在がみられた。DEPT スペクトルと ^{13}C -NMR スペクトルデータ (Table 2) より、 sp^2 領域における 26 本、 sp^3 領域に 13 本のシグナルが観測された。 1H -NMR スペクトルデータ (Table 2) より、メチル基 [δ^H 0.88 (6H, s, Me-11), 2.09 (6H, s, 5,12-Acetyl)], メチレン [δ^H 2.39-2.47 (H-7'), 3.55 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 4.11 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 4.15 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 4.50 (1H, d, $J = 13.0$ Hz)], ベンゼン環に帰属されるメチン [δ^H 6.46 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.51 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.38 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.40 (1H, d, $J = 8.5$ Hz)] が観測された。カルボニル基とキレートした水酸基のシグナル [δ^H 11.8 (1H, s), 11.9 (1H, s), 14.0 (1H, s), 14.1 (1H, s)] が見られた。また、NMR スペクトルデータ (Table 2) より見られたカルボニル基とメチル基に帰属されるシグナルより三種のアセチル基が存在していることが明らかになった。それらは、IR データにより支持された。また、得られた HMBC スペクトルからの相関により (Fig. 3)、テトラヒドロキサントン骨格を有していることが判明した。また、マススペ

クトルより得られた分子式と NMR スペクトルデータにおけるペアーに観測されたシグナルの特徴により、3 は二種の類似のテトラヒドロキサントン骨格を部分構造に有するダイマー様物質であると推測された。分子内に同一の二分子のテトラヒドロキサントン骨格を有するホマキサントン A と 3 の NMR データをホマキサントン A と比較しながら、検討したところ、ホマキサントン A の 5 位のアセチル基に帰属されるシグナルのうち一つが確認できなかった (Isaka, *et al.*, 2001)。また、3 のマススペクトルより得られた質量数がホマキサントン A より、 C_2H_3O (アセチル基) 少ないことから支持された。これらのことから、3 はホマキサントン A の一つのアセチル基が脱離した新しい類縁物であると推定した。さらに、HMBC 実験より得られたデータ (Fig. 3) より、3 の構造を 5-O-デアセチルホマキサントン A と決定した (Fig. 4)。相対立体配置については、 1H や ^{13}C -NMR スペクトルにおけるシフト値やカップリング定数が、ホマキサントン A とよく似ていることから、ホマキサントン A と同一であると決定した。なお、3 は、ホマキサントン類の新しい類縁物質であった。

3. 3. 3 化合物 4, 5

高分解能マススペクトルより、分子式 $C_{30}H_{39}O_5N$ を決定した。IR スペクトルより、エステルやアミド、ベンゼン環に帰属される吸収が認められた。 1H -NMR スペクトルデータ (Table 3) より、アミドグループ [δ_H 5.57 (1H, br. s, NH-2)], 一置換ベンゼン [δ_H 7.30 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-2', 6'), 7.16 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3', 5'), 7.31 (1H, m, H-4)], 二級アルコール [δ_H 3.81 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 5.43 (1H, d, $J =$

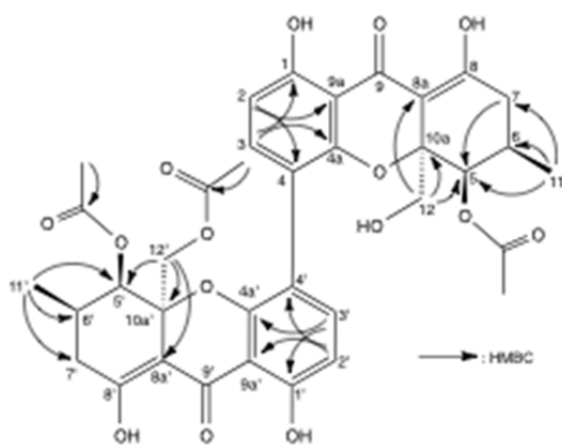


Fig. 3. 化合物 3 の HMBC 相関

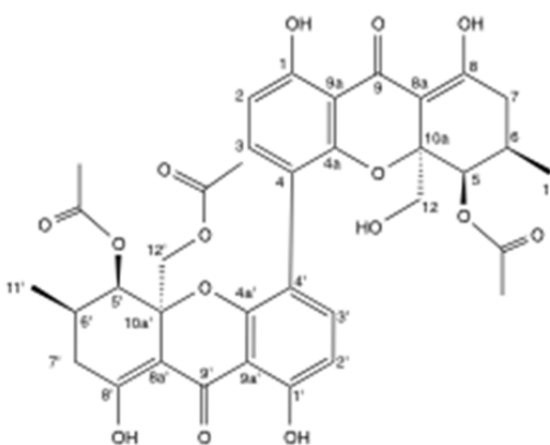


Fig. 4. 化合物 3 の構造

Table 2. ¹H- and ¹³C-NMR data of phomaxantone A and compound 3

No	Phomaxanthone A		Compound 3	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1, 1'	161.5 (s)		159.3, 159.5	
2, 2'	109.5 (d)	6.58 (1H, d, 8.8)	107.9, 108.2	6.46 (1H, d, 8.5) 6.51 (1H, d, 8.5)
3, 3'	141.1 (d)	7.38 (1H, d, 8.8)	140.2	7.38 (1H, d, 8.5) 7.40 (1H, d, 8.5)
4, 4'	115.3 (s)		117.7, 118.0	
4a, 4a'	153.8 (s)		157.0, 157.4	
5, 5'	70.3 (d)	5.40 (1H, s)	70.2, 70.4	5.56 (1H, s) 5.75 (1H, s)
6, 6'	27.6 (d)	2.37 (1H, m)	27.6, 27.7	2.39-2.47*
7, 7'	33.2 (t)	2.46 (1H, m), 2.33 (1H, m)	33.3, 33.4	2.39-2.47*
8, 8'	177.5 (s)		178.0, 177.8	
8a, 8a'	100.0 (s)		100.4, 100.8	
9, 9'	187.7 (s)		187.8	
9a, 9a'	106.4 (s)		106.3, 106.4	
10a, 10a'	80.3 (s)		80.5, 82.5	
11, 11'	17.5 (q)	1.01 (1H, d, 5.8)		0.88 (6H, s)
12, 12'	64.5 (t)	4.28 (1H, d, 12.8) 4.17 (1H, d, 12.8)	65.2, 65.5	3.55 (1H, d, 13.0) 4.11 (1H, d, 13.0) 4.15 (1H, d, 13.0) 4.50 (1H, d, 13.0)
5-OCOCH ₃	20.4 (q)	2.07 (3H, s)	20.7, 20.8, 20.9	2.09 (6H, s)
5'-OCOCH ₃				
12-OCOCH ₃	20.6 (q)	1.89 (3H, s)		2.09 (3H, s)
12'-OCOCH ₃				
5-O \underline{C} OCH ₃	170.0 (s)		170.4, 170.5, 170.6	
5'-O \underline{C} OCH ₃				
12-O \underline{C} OCH ₃	169.6 (s)			
12'-O \underline{C} OCH ₃				
1,1'-OH		11.5 (1H, s)		11.8 (1H, s) 11.9 (1H, s)
8, 8'-OH		14.1 (1H, s)		14.0 (1H, s) 14.1 (1H, s)

Measured in CDCl₃, and values in parentheses are coupling constants in Hz.

2.0 Hz, H-21)、二種のトランス型オレフィン[δ_H 5.42 (1H, m, H-20), 5.87 (1H, dd, J = 15.0, 2.0 Hz, H-19), 5.75 (1H, dd, J = 15.0, 10.0 Hz, H-13), 5.39 (1H, m, H-14)], エキソメチレン、二種の二級メチル[δ_H 0.90 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me-11), 1.00 (3H, d, J = 7.0 Hz, Me-22)], 三級メチル[δ_H 1.35 (3H, s, Me-23)]に帰属されるプロトンシグナルが観測

された。¹³C-NMR スペクトルデータ (Table 3) から、二種のカルボニル炭素 [δ_C 170.5 (C-24), 174.2 (C-1)], 六種のアロマティック炭素 [δ_C 137.4 (C-1'), 128.8 (C-2', 6'), 129.2 (C-3', 5'), 131.0 (C-4')], 六種のオレフィン炭素 [δ_C 127.1 (C-13), 138.7 (C-14), 126.0 (C-19), 138.1 (C-20), 147.9 (C-6), 114.2 (C-12)] などが観測された。これらの情

Table 3. ^1H - and ^{13}C NMR data of Compounds **4** and **5**

No	Cytocharasin H (4)		Cytocharasin J (5)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	174.2		175.8	
2-NH		5.57 (1H, br. s)		5.75 (1H, br. s)
3	53.7	3.35 (1H, m)	53.9	3.30 (1H, m)
4	50.5	2.13 (1H, dd, 5.0, 4.0)	50.1	2.00 (1H, dd, 5.0, 4.0)
5	32.3	2.79 (1H, m)	33.0	2.93*
6	147.9		148.5	
7	69.7	3.81 (1H, d, 10.0)	69.9	3.81 (1H, d, 10.0)
8	47.2	3.10 (1H, dd, 10.0, 10.0)	45.8	2.93*
9	51.8		52.9	
10	45.7	2.61 (1H, dd, 14.0, 10.0) 2.87 (1H, dd, 14.0, 5.0)	45.5	2.60 (1H, dd, 14.0, 10.0) 2.93*
11	14.1	0.90 (3H, d, 7.0)	14.0	1.10 (3H, d, 7.0)
12	114.2	5.12 (1H, br. s) 5.35 (1H, br. s)	113.7	5.11 (1H, br. s) 5.30 (1H, br. s)
13	127.1	5.75 (1H, dd, 15.0, 10.0)	127.0	5.70 (1H, dd, 15.0, 10.0)
14	138.7	5.39 (1H, m)	137.8	5.30 (1H, m)
15	42.8	1.79-1.91 * 2.04 (1H, m)	42.7	1.80 ** 2.04 (1H, m)
16	28.4	1.79-1.91 *	28.4	1.80 **
17	53.8	1.56 (1H, m) 1.79-1.91 *	53.7	1.57 (1H, dd, 14.0, 3.0) 1.87 (1H, dd, 14.0, 3.0)
18	74.4		74.6	
19	126.0	5.87 (1H, dd, 15.0, 2.0)	127.8	5.77 (1H, dd, 14.0, 2.3)
20	138.1	5.42 (1H, m)	137.0	6.00 (1H, dd, 15.3, 2.0)
21	77.3	5.43 (1H, d, 2.0)	76.7	4.00 (1H, br. s)
22	26.5	1.00 (3H, d, 7.0)	26.5	1.02 (3H, d, 7.0)
23	31.2	1.35 (3H, s)	31.0	1.32 (3H, s)
1'	137.4		137.5	
2', 6'	128.8	7.30 (2H, d, 7.0)	128.8	7.24 (2H, d, 7.0)
3', 5'	129.2	7.16 (2H, d, 7.0)	129.2	7.10 (2H, d, 7.0)
4'	131.0	7.31 (1H, m)	131.0	7.30 (1H, d, 7.0)
CH_3CO	20.9	2.25 (3H, s)		
CH_3CO	170.5			

* ** : Overlapped signals

報より得られた部分構造を HMBC 実験により得られた相関をもとに結合させた (Fig. 5)、その結果、**4** は既知物質のサイトカラシン H と同定された (Fig. 6) (Cole *et al.*, 2003)。

化合物 **5** は、**4** と非常によく似た NMR シグナルが観測されたため、**4** と NMR データを比較しながら、構造を解析

した。その結果、**4** の 21 位のアセチル基が脱離したサイトカラシン J と予想された。また、質量分析データより得られた質量数や分子式 ($\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}$) から支持された。そこで、**4** とサイトカラシン J の ^1H , ^{13}C -NMR データを比較したところ、良い一致を示したので、**4** をサイトカラシン J と同定した (Fig. 6) (Cole *et al.*, 2003)。

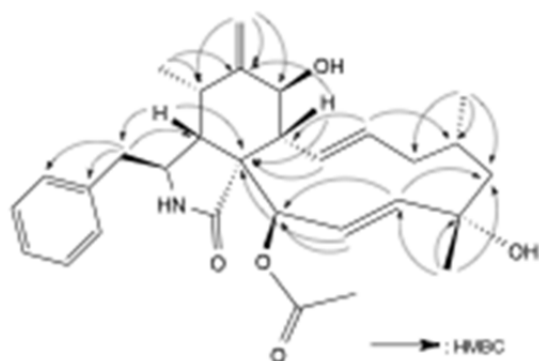


Fig. 5. サイトカラシン H (4) の HMBC 相関

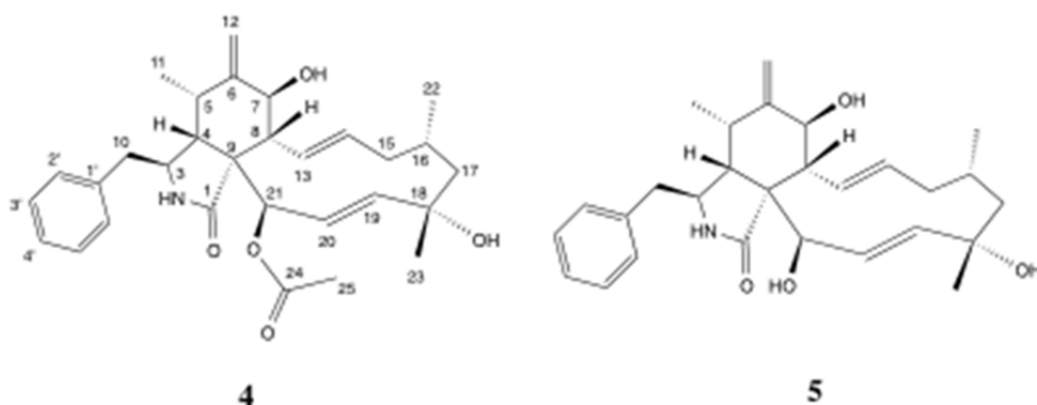


Fig. 6. サイトカラシン H (4)、J (5) の構造

4. 考察

マングローブ林より採取した植物の内生菌類より分離した二種の糸状菌 IM-26、IM-33 株に着目してそれらの菌類の生産する代謝産物を調べた。

糸状菌 IM-26 株を NaCl 無添加の玄米培地と塩を含む培地 (3% NaCl) で培養し、それら菌類の生産物を TLC で比較することにより、塩を含む培地で生産されている物質としてアルテヌエン(1) を単離した。アルテヌエン(1) は、1970 年代に *Alternaria* 属より単離されたマイコキシンのアルテナリオールやアルテナリオール 9-メチルエーテルの類縁物質として、報告されている (Cole and Cox, 1981)。近年、水カビの一種からも、新しい類縁体としてジヒドロアルテヌエンやデヒドロアルテヌエンが抗菌物質として発見されている (Jiao *et al.*, 2006)。アルテヌエン類は、ベンゾ [a]ピロン環を中心母核とし、数種の不斉中心も有するため、分子量が小さいにもかかわらず、化学構造が複雑であり、構造研究への興味も持たれ、化学合成研究も行われている (Altemöller *et al.*, 2009)。一方で、アルテヌエンは、動物細胞に対する毒性や抗菌作用など知られている

(Harvan and Pero, 1976)。しかし、アルテヌエン類と生産菌への塩濃度を関連付ける研究報告はない。一般に、微生物により生産される物質のパターンは、菌類の生育している環境に大きく依存している (Bode *et al.*, 2002)。今回、単離されたアルテヌエンは、抗菌活性が知られていることから、マングローブ植物やその環境下で、耐病原菌類やその他の菌類への生理活性物質として、作用していると予想される。

糸状菌 IM-33 株から分離された 5-O-ホマキサントン(3) とサイトカラシン H (4)、J (5) は、塩濃度の増減作用により誘導された物質でなく、耐塩性内生菌類 (あるいは好塩性) のスクリーニング時に分離された糸状菌類において、二次代謝産物の生産性の非常に高い菌類の一種であったため、生産物質の同定を進めた。サイトカラシン類は、これまでに既に多くの類縁物質が植物病原菌類から報告されており、抗菌活性やがん細胞に対する毒性活性を示すものが多く、そのうち、サイトカラシン A、B、D、E はアクチンフィラメント機能阻害剤の試薬として、市販されている (Ikewaki *et al.*, 2003)。また、分子内に 14 員環構造を

有することなどから、化学構造のユニークさと強い生物活性により、今なお、多くの類縁物質が探索され、発見され続けている(Kim *et al.*, 2012)。一方、化合物 **3** は、ホマキサントン A の新しい類縁物質であるモノデアセチル体であった。そもそも、ホマキサントン A は、2001 年にチークの葉より分離された *Phomopsis* sp. の生産する抗マラリヤや細胞毒性作用物質として発見され、その位置異性体の類縁物質ホマキサントン B も同菌より報告されている(Isaka *et al.*, 2001)。また、オトギリソウ科の植物から分離された *Phomopsis* sp. PSU-D15 からは、抗結核作用物質として、ホマキサントン B の新しい類縁物質の報告がなされている(Rukachaisirikul *et al.*, 2008)。しかし、いずれの場合も、植物より分離された菌類の生産物質でありながら、植物との共生やそれに関連した生理作用は明らかになっていない。

これらの物質は、生産菌の培養条件(NaCl 無添加培地や塩を含む培地)に依存することなく、顕著に生産された。そもそも、IM-33 株は塩濃度含有培地を用いた内生菌類のスクリーニングで分離された菌類であり、通常のスクリーニング方法では検出されにくい菌類と考えられ、マングローブ植物周辺やその環境に応答し、生産され、利用されていると思われる。

5. 今後の課題

本研究のスクリーニングでは、100 株以上の菌類を分離し、物質生産性に着目して、菌類を選別した。そのため、物質生産性の乏しい菌類は手つかずのままである。今後は、生育する菌類のプロファイルを知るためにも、IM-26 株や IM-33 株も含め、これら菌類の同定が必要である。また、糸状菌 IM-26 株は、培地の塩濃度の増加につれて、アルテヌエン以外にも、NaCl 無添加培養時には見られない物質(化合物 **2**)が生産されている。このような塩濃度依存的に誘導される物質を明らかにすることで、マングローブ植物やその環境下で生育する菌類の特徴を物質レベルから観測できると考えられる。また、糸状菌 IM-33 株が示したように、マングローブ林より分離され、塩を含有培地において顕著に生産される物質は、内生菌類のマングローブ植物内に生息する理由や宿主植物との共生関係を考える上で重要な知見になると考えられる。

文献

- Altemöller, M., Podlech, J. Total synthesis of dehydroaltenuene A. Revision of the structure and total synthesis of dihydroaltenuene B. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1288-1290.
- Cole, R.J., Cox, R.H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York, 1981, 614-645.
- Cole, R.J., Jarvis, B.B., Schweikert, M. A. *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*, 2003.
- Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem.* 2002, 3, 619-627.
- Harvan, D.J., Pero, R.W. *Mycotoxins and other Fungal Related Food Problems*, 1976, 149, 344-355.
- Ikewaki, N., Yamada, A., Inoko, H. Depolymerization of actin filament by cytochalasin E induces interleukin-8 production and up-regulates CD54 in the HeLa epithelial cell line. *Microbiol. Immunol.* 2003, 47, 775-783.
- Isaka, M., Jaturapat, A., Rukseree, K., Danwisetkanjana, K., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 1015-1018.
- Jiao, P., Gloer, J.B., Campbell, J., Shearer, C.A. Altenuene derivatives from an unidentified freshwater fungus in the family *Tubeufiaceae*. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 612-615.
- Kim, E.L., Li, J.L., Dang, H.T., Hong, J., Lee, C.O., Kim, D.K., Yoon, W.D., Kim, E., Liu, Y., Jung J.H. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22, 3126-3129.
- Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J., Kirtikara, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry.* 2008, 69, 783-787.

謝辞

マングローブ植物採取に協力頂いた、パジャジャラン大学理学部教授 ウナン スプラットマン博士(バンドン, インドネシア)に感謝いたします。

Studies of Salt Concentration Dependent Compounds Produced by Endophytes of Salt-Tolerant Plants

Yoshihito Shiono, Takuya Koseki

Department of Food, Life, and Environmental Science, Faculty of Agriculture, Yamagata University

Summary

Mangrove forests area are distributed in most tropical and subtropical coast regions of the world. Some of the potency of mangrove plants may be due to mutualistic endophytes fungal associated with host plants. In fact, some chemical materials are isolated from the fermentation broth of endophytes from mangrove plants. These fungi such as producing chemical materials are adapted to sodium chloride (NaCl). It could be shown that NaCl has a profound influence on the regulation of secondary metabolites biosynthesis in fungal species. In this project, we started a research program to discover the endophytic fungi from mangrove plants that show the growth increase of secondary metabolites under the NaCl including fermentation condition. Over 100 fungal strains were collected from the twigs and petiols of mangrove plants at Muara angke, Jakarta, Indonesia, on NaCl supplemented agar plate. The AcOEt extracts obtained from these cultures have been done by TLC analysis. Then, two fungal strains, IM-26 and IM-33 were selected because of large productivity or characteristic of secondary materials profile in the NaCl including fermentation condition (exposed salt stress). TLC-guided fractionation of the extract resulted in the isolations of altenuene (**1**) and compound **2** from IM-26 strain and 12-*O*-monodeacetylphomaxanthone A (**3**), cytocharasins H (**4**), and J (**5**) from IM-33 strain, respectively. These structures were elucidated by spectroscopic methods (1D, 2D NMR and MS) except for compound **2**.

Although altenuene (**1**) and compound **2** do not contain a chloride atom, altenuene (**1**) and compound **2** biosynthesis increased under the 3% NaCl concentration in fermentation condition. The biosynthetic pathways of them could be activated by NaCl in this species. These endophytic fungi live within plant tissues without causing visible damage to the host plant may protect plants directly or indirectly through a using these compounds produced by fungi activated by NaCl.