

58. 天然記念物テングノムギメシに関する生物有機化学的研究

中央大学理工学部応用化学科 准教授 岩崎 有紘

概要

微生物集合体“テングノムギメシ”の構成微生物の解明と、その生産する化学物質の調査を目的として、研究を実施した。その結果、以下の成果を挙げた。

- ・テングノムギメシの抽出物より、多数にチグロイル化された四糖構造をもつ化合物を単離し、その構造を推定した。
- ・テングノムギメシより、二種の菌を単離し、それぞれ *Sphingomonas* 属と *Mesorhizobium* 属のグラム陰性細菌であることを明らかにした。
- ・テングノムギメシ構成菌を培養した結果、R2A 液体培地をもちいることで2種の代謝産物の生産を確認した。¹H NMR の解析を通じて、このうちのひとつが少なくともアミノ酸5残基からなるペプチド性化合物であることを明らかにした。

上記に加え、テングノムギメシからいくつかの菌や化合物を単離し、それらの同定および構造決定を進めている。本研究を発展させることを通じて、テングノムギメシの構成微生物およびそれらの生物の代謝産物の解明を進めていく。

助成者は2023年4月に中央大学に異動して研究室を立ちあげた。本助成金は、本研究を遂行する上で必要な消耗品や備品の導入に使用した。心より感謝申し上げます。

背景および目的

アオカビが生産するペニシリンに代表されるように、ある種の生物（とくに微生物）は病気の治療に有用な効果をもつ物質を生産している。実際、現在使われている医薬品のおよそ半分は、生物由来の物質（＝天然物）をヒントに開発されてきた。このような背景のもと、助成者は新しい天然物を発見し、その有用な作用を明らかにする研究を進めてきた。その過程で、探索源とする生物が未開拓であるほど、新奇な化合物が発見できる傾向を見出してきた。そこで助成者は、“テングノムギメシ”を題材に物質探索を進めることを着想した。

“テングノムギメシ”とは長野県小諸地方に言い伝えられている“食べられる土”である。実際にはゼリー状の微細な微生物集合体であり、地中に埋没している。江戸時代には、飢饉の際の救荒食物や修験者の食物として利用されてきたことが記録されている。明治以降、近代化が進む中で大半の産地が失われており、大正10年には東小諸にあるテングノムギメシ産地が天然記念物に指定されている。しかしその後、詳細な科学的調査は行われておらず、絶滅が危惧されていた。2022年末、助成者は文化庁の許可を得て、東小諸にある天然記念物“テングノムギメシ産地”の採掘を行い、およそ40年ぶりにその発見に成功した（Fig. 1）。また数か所の試掘を通じて、地表30 cm～80 cmにかけての幅広い層にテングノムギメシが存在することを見出した。



Fig. 1. 採集したテングノムギメシ.

石の上に付着したテングノムギメシ（左）および実体顕微鏡写真（右）。いずれも黄土色の塊がテングノムギメシ。

以上の背景のもと、本研究では以下の達成を目指す。

- ①テングノムギメシをソースとして新規天然物を発見する。
- ②天然記念物テングノムギメシの構成微生物を明らかにする。

方法

①テングノムギメシからの新規天然物の発見

採集したテングノムギメシをエタノール 2 L で抽出した。ろ過後、残渣を再度メタノール 2 L で抽出し、ろ液をあわせて濃縮した。濃縮物は酢酸エチル／水で分配し、脂溶性画分については 90% メタノール／ヘキサンで再度分配した。この段階でヒト子宮がん細胞に対する増殖阻害活性試験を行った。顕著な活性を示した 90% メタノール画分を逆相オープンカラムクロマトグラフィーで粗分画し、得られた各画分については高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製を行った。

②天然記念物テングノムギメシの構成微生物の解明

テングノムギメシひとつまみを滅菌水で懸濁し、R2A 寒天培地上に塗布した。30℃ で培養を行い、形成したコロニーについては白金耳で釣菌し、新たな寒天培地に植え継いだ。単菌化できた菌については、16S rRNA をコードする遺伝子を増幅して同定を行うとともに、複数の液体培地で培養し、代謝産物の有無を調べた。

結果および考察

①テングノムギメシからの新規天然物の発見

細胞増殖阻害活性を示した画分を対象に、代謝産物の解析を進めたところ、主要成分のひとつとして紫外光吸収の強い化合物 0.2 mg を単離した。得られた量が微量であったこと、および ^1H NMR のシグナルの重なりが激しかったことから、構造解析は非常に困難であった。また観測された NMR シグナルから予想される分子構造に対して、質量スペクトルから予想される分子式に隔たりがあったことから、二量体様の構造であることが予想された。詳細なスペクトル解析の結果、本化合物がヘキソース 4 つからなる四糖構造を母骨格とし、6 つの水酸基がチグロイル化された化合物であることを見出した。推定構造を Fig. 2 に示す。類似の化合物としては、放線菌から発見された tigloside¹⁾ が知られており、今後は本研究で見出した化合物の絶対立体配置を含む詳細な構造を明らかにする。

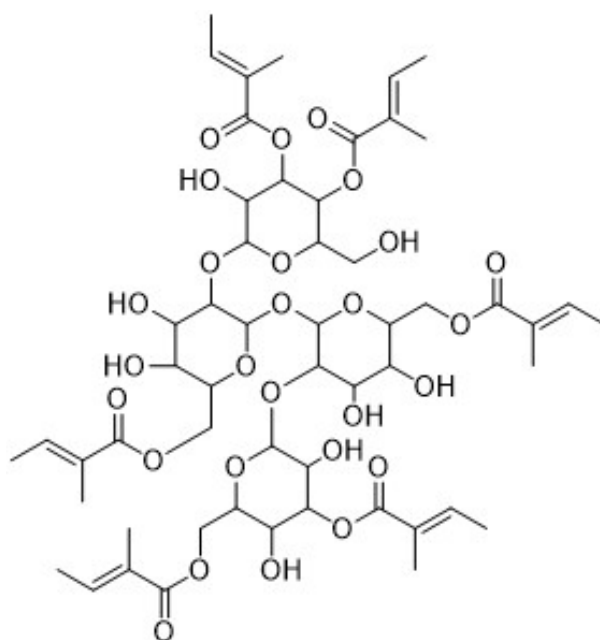


Fig. 2. テングノムギメシから単離した化合物の推定構造.

②天然記念物テングノムギメシの構成微生物の解明

テングノムギメシ懸濁液を塗布した R2A 培地を 30℃ でインキュベーションしたところ、2 週間後にクリーム色とオレンジ色のコロニーの出現が認められた。白金耳で釣菌し、それぞれの菌を新たな寒天培地に植え継いだ。両コロニーについては、16S rRNA をコードする遺伝子を PCR で増幅し、シーケンシングを行った。得られた配列を既知の配列と比較した結果、オレンジ色のコロニーを形成した微生物が *Sphingomonas* 属のグラム陰性細菌であること、クリーム色のコロニーを形成した微生物が *Mesorhizobium* 属のグラム陰性細菌であることが分かった。

次に *Mesorhizobium* 属のグラム陰性細菌が生産する代謝産物について解析を行った。前項と同様の手法によって菌体の抽出物を作成し、HPLC で含有成分を評価した。その結果、NBRC 液体培地をもちいた培養条件では目立った代謝産物の生産が確認されなかった一方、R2A 液体培地を用いた条件においては、少なくとも 2 種類の新たな代謝産物の生産が確認された。これらを HPLC で分取した結果、いずれも 0.1 mg 程度の化合物 (A および B) を単離した。化合物 A については、¹H NMR 解析よりペプチド性の化合物であること、また構成アミノ酸としてフェニルアラニン、バリン、ロイシン、および 2 個のプロリンの存在を推定した。化合物 B については非常に微量であったために解析に適した ¹H NMR を測定することが出来なかった。今後、大量培養を通じて構造を明らかにしていく予定である。一方、*Sphingomonas* 属細菌が生産する代謝産物については、現在精製を進めている。

本研究を通じて、以下のことを明らかにした。

- ・テングノムギメシの抽出物より、多数にチグロイル化された四糖構造をもつ化合物を単離し、その構造を推定した。
- ・テングノムギメシより、二種の菌を単離し、それぞれ *Sphingomonas* 属と *Mesorhizobium* 属のグラム陰性細菌であることを明らかにした。
- ・テングノムギメシ構成菌を培養した結果、R2A 液体培地をもちいることで 2 種の代謝産物の生産を確認した。¹H NMR の解析を通じて、このうちのひとつが少なくともアミノ酸 5 残基からなるペプチド性化合物であることを明らかにした。

本報告書で述べた以外にも、テングノムギメシからいくつかの菌や化合物を単離し、それらの同定および構造決定を進めている。本研究を発展させることを通じて、テングノムギメシの構成微生物およびそれらの生物の代謝産物の解明を進めていく。

(完)

引用文献

- 1) R.W. Rickards, J. M. Rothschild, E. Lacey *J. Antibiot.* **1998**, *12*, 1093.