



Title	Entomopathogenic fungi (EPF) as a potential bioresource of novel bioactive compounds
Author(s)	Sastia, Prama Putri
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58394
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【43】

氏 名	サスティア プラ マ フトリ Sastia Prama Putri
博士の専攻分野の名称	博 士（工 学）
学 位 記 番 号	第 2 4 2 6 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 12 月 31 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	Entomopathogenic fungi (EPF) as a potential bioresource of novel bioactive compounds (新規な生理活性物質の探索資源としての昆虫病原性糸状菌)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 仁 平 卓 也 (副査) 教 授 原 島 俊 教 授 渡 邊 肇 教 授 大 竹 久 夫 教 授 福 崎 英 一 郎 教 授 福 井 希 一 教 授 紀 ノ 岡 正 博 教 授 村 中 俊 哉 教 授 藤 山 和 仁

論 文 内 容 の 要 旨

The emergence of drug resistant microorganisms, new variety of diseases and existing diseases without cure, all emphasize the need for a continued search for novel antibiotics. One of the most promising microbial resources is the entomopathogenic fungi, because they are known to produce biologically active substances during the pathogenic stage of their life cycle. Since only a relatively small number of compounds have been chemically investigated until now, it is highly possible that novel compounds can be found from these fungi cultivated under suitable conditions. The aim of this work is to assess the potential of EPF as a source of novel bioactive compounds by adopting different strategies that enable efficient screening for the isolation of novel compounds from EPF. The result is expected to lead to the utilization of EPF as an alternative source of novel compounds with diverse structures and biological activities and discovery of useful information on the secondary metabolites produced by EPF which would be valuable for the improvement of their current use as biological control agents against insect pests.

Chapter 2. Bioassay-guided screening of novel antioomycete compounds from EPF that is active against *Aphanomyces cochlioides* and *Phytophthora sojae*

Several EPF species have been utilized as sources of antibacterial, antiinsectan, antimalarial, antituberculous, anticancer, and neuritogenic compounds, in addition to their agricultural use as biological control agents against insect pests. However, EPF have never been studied on the antioomycete activity and the production of antioomycete metabolites. In a program aimed at identifying natural agents as alternatives to conventional synthetic agrochemicals, 414 strains of EPF were isolated from various sites in Japan and were screened against two economically important plant pathogenic oomycetes, *A. cochlioides* and *P. sojae*. The result showed that majority of EPF (61.7%) has the ability to produce compounds active against plant pathogenic *P.*

sojae and/or *A. cochilides*. Detailed analysis on 15 highly active fungal extracts resulted in the isolation of a new antioomycete compound, farinomalein, and the identification of 7 other bioactive compounds (beauvericin, aurovertin D, fungerin, aranorosinol A, paecilosetin, *N*-(methyl-3-oxodec-6-enoyl)-2 pyrroline and *N*-(methyl-3-oxodecanoyl)-2 pyrroline) that were not known previously to exhibit antioomycete activities. The results of this work raised the prospect of using insect fungal pathogens as a highly potential source of compounds for the control of soil borne plant pathogens.

Chapter 3. Isolation, structure elucidation, and biological activity of farinomalein, a novel antioomycete compound from *Isaria farinosa* HF599

One of the most important diseases of soybean (*Glycine max*) is Phytophthora rot disease caused by *P. sojae*, a plant pathogenic oomycete that causes enormous economic loss worldwide. Current treatment of this disease is mainly done by using metalaxyl, an acylalanine fungicide commonly used against *Phytophthora* and *Pythium* strains. However, the emergence of metalaxyl-resistant isolates worldwide has prompted the need for new, safer and more effective control agents such as microbe-derived pesticides. During screening for compounds active against plant pathogenic oomycetes, a novel compound, farinomalein was isolated from the entomopathogenic fungus *Isaria farinosa* HF599. The structure was determined on the basis of spectroscopic analyses and chemical conversion. Farinomalein contains a maleimide ring which is rare in nature and is the first antioomycete compound to be isolated from *Isaria* species. Farinomalein showed potent and selective inhibition (at 0.15-5 µg/disk) against eight isolates of plant pathogenic *P. sojae*. These results indicate that farinomalein might be useful as a candidate pesticide for the treatment of Phytophthora stem rot in soybean.

Chapter 4. Structure-based screening of novel compounds from EPF

Screening for secondary metabolites based on their chemical characters (structure-based screening) has led to the detection and isolation of compounds independent from their biological activity. Consequently, structure-based screening can increase the possibility of isolating novel compounds with a wider array of biological activities. Structure-based screening of 38 representative isolates of EPF led to the isolation of the potent antibiotic equisetin and its new analog ophiosetin from a rare entomopathogenic fungus *Elaphocordyceps ophioglossoides* HF272. Equisetin is known to be a potent HIV-integrase inhibitor and antibacterial compound but does not exhibit any antifungal nor antioomycete activity. This highlights the importance of adopting structure-based screening as one alternative strategy to isolate compounds with wider range of bioactivities if the availability of test procedures for bioassay is limited.

Chapter 5. General Conclusion

The search for novel bioactive compounds from EPF resulted in the isolation of two novel compounds with different structures and biological activities, farinomalein and ophiosetin. The use of two distinct approaches (bioassay-guided screening and structure-based screening) to search for novel bioactive compounds was proven to be a rapid and efficient strategy to fully explore the potential of EPF as a source of novel compounds. Since each screening method has its own benefits and drawbacks, the combined utilization of both screening methods could further expand the possibilities of finding novel bioactive compounds from EPF.

論文審査の結果の要旨

本論文は昆虫病原性糸状菌における生理活性物質生産性の評価を行っており、その有望性を明らかにしている。

昆虫病原性糸状菌は昆虫に寄生する糸状菌であり、昆虫への感染、増殖の過程で様々な生理活性を持った二次代謝産物を生産することが知られている。しかしながらこれまでの研究は昆虫病原性糸状菌の特定の菌に特化しており、包括的な評価はなされていなかった。そこで、本研究では我々が保持している400菌株以上の昆虫病原性糸状菌が生産する二次代謝物質について網羅的な検討を行い、その生物資源としての有用性を評価し、新規化合物を単離、同定することを目的としている。研究の成果により、得られた化合物は新たな医薬品、農薬として利用されること、またより高い病原性を持った昆虫病原性糸状菌を育種し安全な生物農薬としての効果を高めることが期待される。

本論文を要約すると以下のとおりである。

1. 昆虫病原性糸状菌が生産している二次代謝物質について、抗菌活性を指標とする解析、およびダイオードアレイ検出器を用いたHPLCによる解析を行った。得られたHPLCプロファイルを基に各菌株が有する抗卵菌活性に寄与するピークを同定し、更にそのUVスペクトルを我々が保持する既知化合物データベースのものと比較した。その結果、これまでは活性が報告されていない既知化合物が、抗卵菌活性を有していることが明らかとなった。

2. 続いて高い抗卵菌活性を示した *Paecilomyces farinosus* より未知抗菌物質を単離し、NMR、MS、UVスペクトル、IRスペクトル等のデータを基に化学構造を同定した。その結果、抗菌物質を与える化合物はマレイミド骨格を持つ新規化合物であることが明らかとなった。新規化合物 farinomalin は被検菌とした *Phytophthora sojae* P6497 に対して 5µg/disk という高い抗菌活性を示した。今後 farinomalein を基に誘導体を作成し、さらなる活性を高めることが可能となれば特異性の高い農薬として使用が期待できる。

3. さらにUVスペクトルを指標に *Elaphocordyceps ophioglossoides* から新規構造を持つと予測された化合物を単離し、NMR、MS、UVスペクトル、IRスペクトル等のデータを基に化学構造を同定した。その結果、得られた化合物は Equisetin の新規アナログであることが明らかとなった。新規化合物 ophiosetin は equisetin には存在しない水酸基を保持しており、異なった化学性質を示すと考えられる。今後、更に活性の検討を行うことによって応用的な利用が可能になると考えられる。

以上のように、本論文は昆虫病原性糸状菌においてこれまで不明な点の多かった二次代謝物質生産に関して網羅的な解析を行ったものであり、本論文により昆虫病原性糸状菌の生理活性物質資源としての重要性が明確に示された。今後、探索を続けることにより新規化合物のさらなる発見が期待される。また見出された新規化合物生産菌の物質生産能を育種により高めた菌株を作成し、有用な生物農薬として用いられることも期待でき、安全性の高い食糧供給に寄与すると考えられる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。