

【研究報告】

# 放線菌 TU14386 株が生産する 植物病原菌形態異常誘導物質に関する研究

大塚みゆき<sup>1,2</sup>・畑江拓斗<sup>2</sup>・堀 浩<sup>1,2</sup>

## 要 約

玉川大学農学部の学内農場で栽培されていたダイズの根圏土壌から単離した放線菌 TU14386 株が、植物病原菌の形態異常を誘導する物質を生産することを見出した。この活性物質の単離・精製方法を確立し、機器分析によりこの活性物質がレニン阻害剤として知られているシクロチアゾマイシンであることを明らかにした。本化合物は細菌、酵母には活性を示さず、イネごま葉枯れ病菌およびコマツナ炭疽病菌胞子の発芽管の膨潤を誘導するポリオキシンの活性を示した。単離した化合物を種々の糸状菌に作用させ、ポリオキシンの活性と比較したところ、本化合物は、ポリオキシンのように細菌および酵母に対して活性を示さず、様々な糸状菌胞子に対して形態異常を誘導した。一方、植物病原菌の栄養菌糸に対しては、同濃度のポリオキシンのように、特にイネごま葉枯れ病菌に対して非常に強い生育阻害活性を示した。

キーワード：抗生物質、放線菌、植物病害防除剤、シクロチアゾマイシン

## 緒言

1950年代以降、様々な抗生物質の発見によって人類の平均寿命は著しく伸び、いくつかの感染症は撲滅され、様々な病気の治療が可能になった。それによって人々はこれらの病気が今後も制御可能であり、特に感染症の恐怖から解放されたかと錯覚しているように見えた。しかし、2019年からのCOVID-19パンデミックによって、これは大きな誤解であることが示された。現在、COVID-19に対する有効な治療薬の開発が進められているが、そのための新規化合物の入手は容易ではない。

新薬の開発には膨大な費用と時間がかかる。そのため多くの製薬企業がコストに見合う利益を得にくい感染症治療薬の開発から撤退しているが、薬剤耐性病原菌や新興の感染症に対抗するために、依然として新規活性物質が必要とされている。そのニーズに応えるために、医薬品開発ソースとなりうる新規化合物の探索研究は、継続すべき研究分野である。

伝統的に新規生物活性物質の探索には、活性を指標とした天然有機化合物のスクリーニングが広く行われてき

た。様々なスクリーニングによって、これまでに多様な抗生物質が発見され、実用化されている。糸状菌菌糸の形態変化を指標としたスクリーニングは古くから行われており、このスクリーニングによって一部の真菌にのみ特異的な増殖阻害と形態変化を誘導するレプトマイシンが単離された (Gunji et al., 1983; Hamamoto et al., 1983)。その後レプトマイシンは動物細胞の細胞周期のG1期停止を低濃度で誘導し、抗腫瘍活性を示すことが報告されている (Komiya et al., 1985; Yoshida et al., 1990)。そのほかにも微小管重合阻害剤グリセオフルビン、有糸分裂阻害剤であるベノミルおよびカルベンダジム、アクチンに作用するサイトカラシン類が、糸状菌菌糸の形態変化を誘導することが知られている (Brian, 1949; Betina and Micekova, 1973)。そのため、植物病原糸状菌の形態変化を指標とするスクリーニングは、農業用抗生物質としてだけでなく、医薬品としても利用可能な活性物質の発見につながる可能性がある。

放線菌分離株の代謝産物に対して植物病原糸状菌の形態変化を指標としたスクリーニングを行ったところ、玉川学内農場のダイズの根圏土壌から単離した放線菌

<sup>1</sup> 玉川大学農学部生産農学科 東京都町田市玉川学園6-1-1

<sup>2</sup> 玉川大学大学院農学研究科 東京都町田市玉川学園6-1-1

責任著者：大塚みゆき motsuka@agr.tamagawa.ac.jp

TU14386株を見出した。この株の抽出物はコマツナ炭疽病菌胞子の発芽管の膨潤を誘導した。本研究では放線菌TU14386株が生産する植物病原菌に形態異常を引き起こす活性物質の単離・精製方法を確立し、その構造を明らかにした。また、この活性物質の様々な微生物に対する活性を評価した。

## 材料と方法

### 放線菌の分離

0.1 g/mLの根圏土懸濁液0.5 mLを、0.05% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウムと6% (w/v) 酵母エキス（日本製薬）を添加した50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）4.5 mLに加え40°Cで20分間保温した。この懸濁液を適宜希釈した後、20 mg/Lシクロヘキシミドと50 mg/Lナリジクス酸を添加した培地（HV寒天培地、ISP No. 5培地、1.5%寒天培地）に塗布し、27°Cで培養した。形成した放線菌コロニーを釣菌し、ISP No. 5培地に植え継いだ。

### 16S rDNAの配列解析

5 mU/ $\mu$ L TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）、1x EX Taq Buffer、200  $\mu$ M dNTP mix、2.5  $\mu$ Mプライマー（9F：GAGTTTGATCCTGGCTCAGおよび1541R：AAGGAGGTGATCCAGCC）、5%ジメチルスルホキシドを混合し、PCR反応液20  $\mu$ Lを調製した。この反応液に少量のTU14386株の菌体を懸濁し、98°Cで2分間熱変性した後、94°Cで30秒間、55°Cで30秒間、72°Cで90秒間のサイクルを30回繰り返し、72°Cで5分間反応させた。PCR産物の精製にはWizard SV Gel and PCR Clean-Up System（プロメガ）を使用した。精製したPCR産物の配列は、Big Dye terminator v3.1 cycle sequence Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて調製した試料を、3500 ジェネティックアナライザ（50 cm キャピラリー、POP 7、サーモフィッシャーサイエンティフィック）で分析し、決定した。配列解析には9F、785F（GGATTAGATACCCTGGTAGTC）、926R（CCGTCAATTCCTTTGAGTTT）、1541Rをプライマーとして用いた。

### TU14386株由来活性物質の精製

TU14386株をPh培地（2%可溶性デンプン、2%ファーマメディア、0.05%硫酸マグネシウム七水和物、0.015%硫酸鉄（II）七水和物、pH7.4）に接種し、27°C、150

rpmで5日間振とう培養した。培養物を吸引ろ過し、菌体と培養液上清に分けた。

菌体にアセトンを加え4時間攪拌し抽出後、溶媒を留去し、菌体抽出物を調製した。

pH3付近に調整した培養液上清を1-ブタノールで抽出した後、溶媒を留去し、培養液上清抽出物を調製した。

調製した菌体抽出物、培養液上清、培養液上清抽出物を各種カラムクロマトグラフィーおよびHPLCで精製し、活性物質を得た。カラムクロマトグラフィーの担体には、ダイヤイオンHP20（三菱化学）、MCI GEL CHP20（三菱化学）、シリカゲル60N（関東化学）、ODS-AM 120-S50（ワイエムシイ）を使用した。HPLCカラムにはODS-H（6×250 mm、センシユー科学）を使用し、0.2%ギ酸を添加した76～95%メタノール水溶液でグラジエント溶出した。

### 機器分析

HPLC分析にはHPLC prominence（島津）を使用した。精製物の分析は、カラムにTSKgel ODS-80Ts（4.6×150 mm、東ソー）を使用し、0.1%酢酸を添加した50～95%メタノール水溶液でグラジエント溶出した。

LC-MS分析にはAcquity UPLC（日本ウォーターズ）に接続したSynapt HDMS（日本ウォーターズ）を使用した。カラムにBEH C18（2.1×50 mm、1.7  $\mu$ m、日本ウォーターズ）を使用し、カラム温度40°C、流速0.20 mL/min、0.1%ギ酸を添加した50～95%メタノール水溶液でグラジエント溶出した。分離した試料をESIでイオン化し、陽イオンモードまたは陰イオンモードでMSスペクトルを測定した。

核磁気共鳴スペクトルはJNM-ECP400（日本電子）を使用し、測定した。

### 活性評価

各精製段階の試料の活性は、コマツナ炭疽病菌 *Colletotrichum destructivum* を被検菌とした孢子発芽試験で評価した。また、ポリオキシシンAL水和剤（有効成分：ポリオキシシン複合体10.0%、ポリオキシシンBとして100000AmBu/mg、科研製薬）の12.8 mg/mL懸濁液を0.45  $\mu$ mフィルター（アドバンテック）で濾過した通過液を1.28 mg/mLポリオキシシン溶液とし、精製した活性物質の各種微生物に対する活性を、このポリオキシシン溶液と比較した。

糸状菌胞子に対する活性評価：孢子発芽試験

ポテトデキストロース寒天（PDA）斜面培地で1～2

週間培養した *Coll. destructivum*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum* に 0.2% 酵母エキス / 0.1% グリセロール溶液を加え懸濁し、G1-ガラスフィルターでろ過後、胞子濃度を適切に調整したものを胞子懸濁液とした。 *Coll. destructivum* 胞子懸濁液には、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるようにトマトクチン水解物 (Osman et al., 1995) を加え使用した。スライドガラスに試料 3  $\mu\text{L}$  を滴下後風乾し、その上に被検菌胞子懸濁液 3  $\mu\text{L}$  を滴下し、27°C で一晩培養した。培養した被検菌胞子を顕微鏡で観察し、活性を評価した。

糸状菌菌糸に対する活性評価

PDA 平板培地に、試料を染み込ませたペーパーディスク ( $\phi$  6 mm) を置き、そこから約 25 mm 離れた位置に 3~7 日間培養した *Coll. destructivum*, *Cochl. miyabeanus*, *A. oryzae* の PDA 培地片 ( $\phi$  6 mm), または *B. cinerea* を 1 週間培養した麦培地を置いた。これを 27°C で約 4~10 日間培養し、ペーパーディスク周辺の菌糸を目視および実体顕微鏡 (SMZ800, Nikon) および生物位相差顕微鏡 (ECLIPSE E600, Nikon) で観察し、菌糸に対する活性を評価した。

細菌および酵母に対する活性評価：ディスク拡散法

*Bacillus subtilis* NBRC13719, *Escherichia coli* NBRC102203, *Micrococcus luteus* NBRC3333, *Pseudomonas aeruginosa* IFO12689, *Staphylococcus aureus* NBRC100910 の培養と検定プレートの調製にはニュートリエント培地 (1.0% 肉エキス, 1.0% ハイポリペプトン, 0.5% 塩化ナトリウム, pH7.2), *Saccharomyces cerevisiae* NBRC10217/IFO309, *Schizosaccharomyces pombe* NBRC1628, *Candida albicans* IFO1061 の培養と検定プレートの調製にはサブロー培地 (4.0% グルコース, 1.0% ハイポリペプトン, pH5.6) を使用した。OD<sub>660</sub> 値が約 0.5 になるように調製した被検菌培養液または *B. subtilis* の芽胞懸濁液を 1% 添加した上層培地 (1.0% 寒天) を下層培地 (1.5% 寒天) に重層し、検定プレートを調製した。その上に試料溶液 (1.28 mg/mL) を染み込ませたペーパーディスクを置き、30°C で一晩培養後、阻止円の形成を観察した。

*C. albicans* の形態変化に対する活性評価 (橋本ほか, 2014)

*C. albicans* を PDB 培地 (Difco) で 30°C で一晩培養した培養液を生理食塩水で希釈し、OD<sub>660</sub> 値を約 0.5 に調整し、この懸濁液を GM-RPMI 培地 (0.2% グルコースおよび 0.165M MOPS を添加した RPMI-1640 培地 (和光)), または PDB 培地に 0.5% 加えた。この培地に試料 (128

$\mu\text{g}/\text{mL}$  活性物質, 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ポリオキシン, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンホテリシン B) を含む GM-RPMI 培地または PDB 培地を等量加え、35°C で静置培養した。一定時間おきに顕微鏡で *C. albicans* の形態を観察し、培養液の OD<sub>660</sub> 値を測定した。

## 結果と考察

### スクリーニング

玉川学園内で採取した様々な環境サンプルから放線菌を分離し、その抽出物を植物病原菌の胞子発芽試験に供試した結果、玉川学内農場で栽培されたダイズの根圏土壌から単離した放線菌 TU14386 株の抽出物が、コマツナ炭疽病菌の胞子および胞子発芽管の先端の球化膨潤を誘導することを見出した。この株の 16S rDNA を増幅し、その配列 (1482 bp) を決定した。この塩基配列を報告されている基準株の配列と比較した結果、*Streptomyces corchorusii* NBRC 13032 (Accession 番号 AB184267) と完全に一致した。

### TU14386 株由来活性物質の精製

TU14386 株の培養物を分析したところ、培養液上清にも菌体抽出物にも同様の活性を確認した。そのため培養液上清と菌体のそれぞれから抽出物を調製し、精製方法を検討した結果、逆相系担体 (CHP20, ODS) を用いたカラムクロマトグラフィーを繰り返すことによって、活性物質の単離に成功した。最終的に 1 L の培養物の菌体から 24 mg の活性物質を得ることができた。

### TU14386 株由来活性物質の構造解析

本活性物質の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、220 nm ( $\epsilon=5594$ ) に吸収極大、265 nm ( $\epsilon=2576$ ), 300 nm ( $\epsilon=1472$ ), 320 nm ( $\epsilon=1178$ ) にショルダーピークを観察した。

ESI-TOF-MS スペクトルでは、陽イオンモードで  $m/z$  1473.29 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 1495.28 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 1511.26 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ ), および 737.14 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 陰イオンモードで  $m/z$  1471.28 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) のイオンを検出したことから、本活性物質の分子量は 1472 であると推定された。また、 $[\text{M}+\text{H}]^+$  イオンの MS/MS 分析では  $m/z$  1163.2, 784.0, 442.0, 315.0 の特徴的なフラグメントイオンが観測された。

さらに各種 NMR スペクトルから、本活性物質はアラニン、スレオニン、アスパラギン酸またはアスパラギン

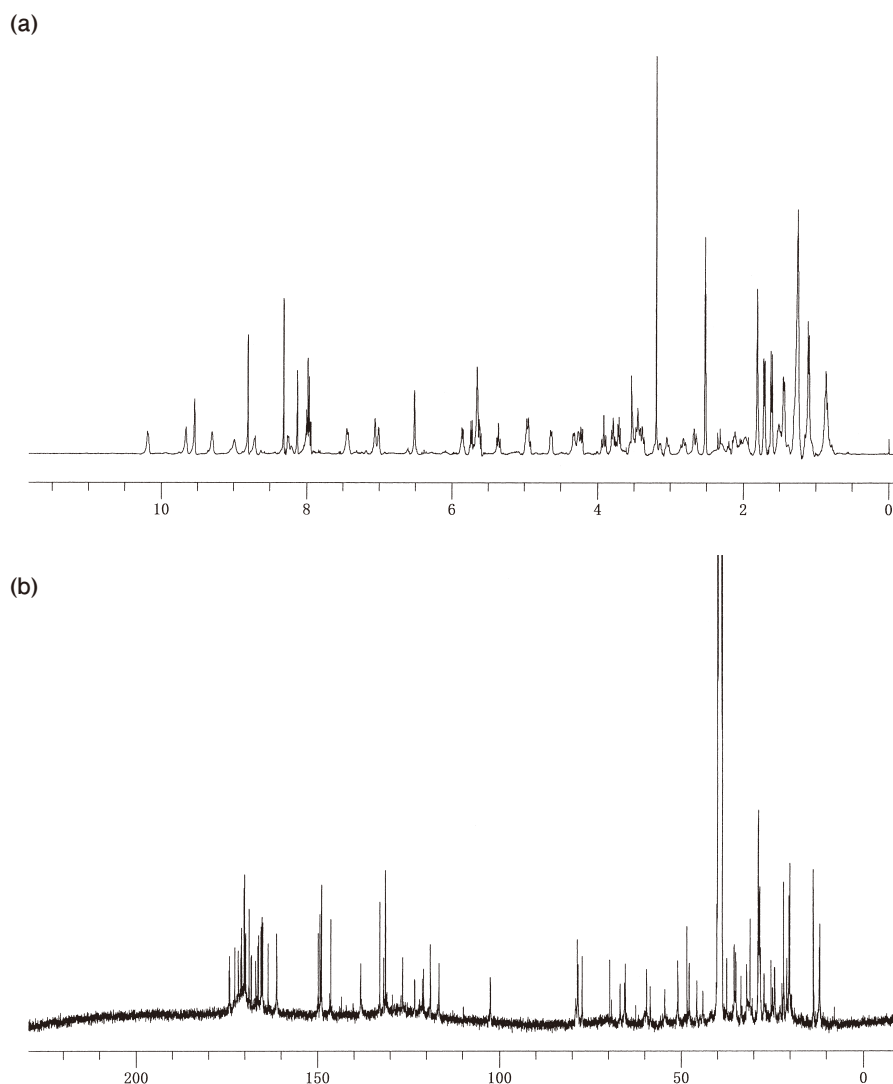


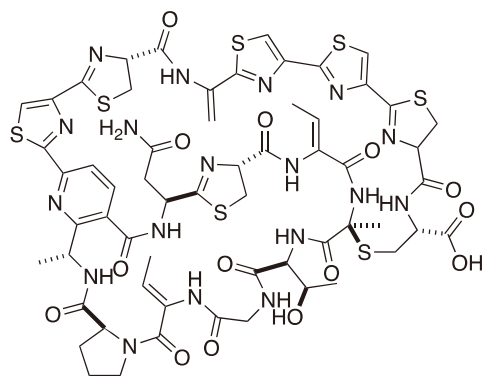
図1 単離した活性物質のNMRスペクトル (DMSO- $d_6$ )  
 (a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), (b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz)

の他に、デヒドロアラニンおよびデヒドロホモアラニン残基を含むペプチドであることが強く示唆された。このような部分構造を持つ同じ分子量の化合物としてシクロチアゾマイシンが報告されている (Aoki et al., 1991)。報告されているシクロチアゾマイシンのスペクトルデータ (Aoki et al., 1991) を比較したところ、よく一致していたため、放線菌 TU14386 株が生産する活性物質はシクロチアゾマイシンであることが示された。

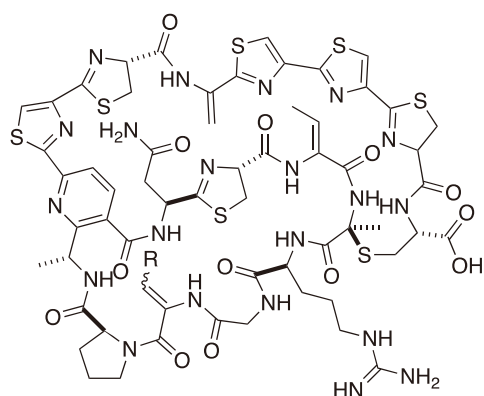
シクロチアゾマイシンはレニン阻害活性物質として *Streptomyces* 属放線菌から Aoki らによって初めて単離された抗生物質である。その後、シクロチアゾマイシンのスレオニン残基がアルギニンに置換されたシクロチアゾマイシン B1 および B2 (Hashimoto et al., 2006)、さらに

スレオニン残基がリジンに、デヒドロホモアラニン残基がデヒドロアラニンに置換されたシクロチアゾマイシン C が報告されている (Cox et al., 2014)。これらの類縁体は一部の細菌および真菌に対して弱い生育阻害活性を示し、さらにシクロチアゾマイシン B1 は RNA ポリメラーゼ阻害活性とともに、イネごま葉枯れ病菌の菌糸先端の膨潤を誘導することが報告されている (Cox et al., 2014; Hashimoto et al., 2006)。このようにシクロチアゾマイシン B1 および C については様々な活性が報告されている。そこで放線菌 TU14386 株から単離したシクロチアゾマイシンについても様々な微生物に対する活性を評価した。

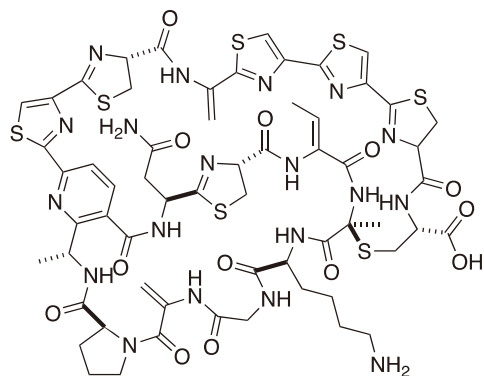




cyclothiazomycin



R = CH<sub>3</sub>, Z-configuration : cyclothiazomycin B1  
 R = CH<sub>3</sub>, E-configuration : cyclothiazomycin B2



cyclothiazomycin C

図2 シクロチアゾマイシンの構造

### TU14386株由来活性物質の活性評価

TU14386株から単離したシクロチアゾマイシンを用いて、細菌および酵母に対する活性をディスク拡散法で評価したところ、グラム陽性細菌 (*B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*), グラム陰性細菌 (*E. coli*, *P.*

*aeruginosa*), 酵母 (*C. albicans*, *Sacch. cerevisiae*, *Shiz. pombe*) に対する活性は確認されなかった。二形性真菌である *C. albicans* に対しては、形態変化に対する影響も評価したが、同様に活性は確認されなかった。

一方、シクロチアゾマイシンを糸状菌胞子 (*Coll. destructivum*, *Cochl. miyabeanus*, *A. oryzae*, *P. citrinum*) に作用させたところ、いずれの胞子に対しても発芽管の膨潤を誘導するポリオキシン様の活性を示した。シクロチアゾマイシンの胞子発芽に対する最小影響濃度を調べた結果、シクロチアゾマイシンは特にコマツナ炭疽病菌に低濃度で作用することがわかった。

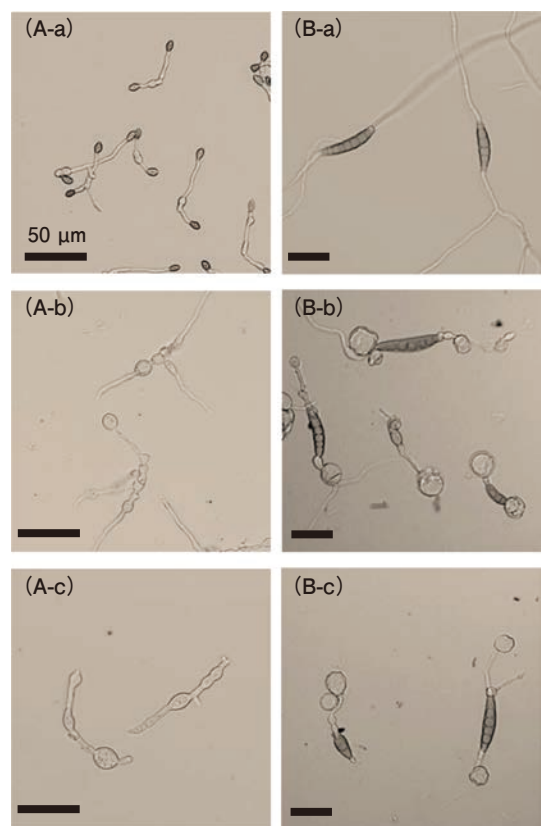


図3 (A) *Colletotrichum destructivum* および (B) *Cochliobolus miyabeanus* 胞子の発芽

a : コントロール, b : シクロチアゾマイシン (0.64 mg/mL), c : ポリオキシン (0.64 mg/mL) を作用させて培養した胞子

ポリオキシン類は *Streptomyces cacaoi* が生産する核酸系抗生物質で、これまでに、14種類の類縁体が報告されている (Isono et al., 1965; Isono et al., 1967; Isono et al., 1968; Uramoto et al., 1981)。ポリオキシンの構造は糸状菌細胞壁の主要成分であるキチン合成酵素の基質と類似しているため、キチン合成酵素を特異的に阻害し、糸状菌の細胞壁合成を阻害する。シクロチアゾマイシン

表1 シクロチアゾマイシンの糸状菌胞子に対する最小影響濃度

	cyclothiazomycin ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Colletotrichum destructivum</i>	0.06
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	0.25
<i>Aspergillus oryzae</i>	0.50
<i>Penicillium citrinum</i>	1.00

も植物病原菌にポリオキシンと同様の形態異常を引き起こすことから細胞壁生合成系に作用すると考えられるが、ポリオキシンとは構造が大きく異なることから、作用メカニズムも異なる可能性が高い。

シクロチアゾマイシンまたはポリオキシンをしみこませたペーパーディスクに対峙させて糸状菌を培養したところ、どちらの化合物も *Coll. destructivum*, *Cochl. miyabeanus* に対して生育阻害活性を示したが、特にシクロチアゾマイシンは *Cochl. miyabeanus* に対して強い活性を示した。一方、*A. oryzae* には顕著な影響は見られなかったが、菌糸先端の様子を顕微鏡で観察したところ、シクロチアゾマイシンを作用させた菌糸の先端には褐色の凝集体のようなものが観察された。キチン合成酵素は、クラスIからVIIに分類され、酵母および糸状菌は複数のクラスの異なるキチン合成酵素を持っている (Liu et al., 2017)。出芽酵母 *Sacch. cerevisiae* はクラスI・II・IIIのキチン合成酵素を持っているが、糸状菌 *Aspergillus nidulans* はクラスI~IIIに加えてクラスIV~VIも持つことが報告されており、後者のキチン合成酵素は菌糸形成などの糸状菌の形態形成に重要と考えられている。このうちクラスVIキチン合成酵素遺伝子を破壊した *A. nidulans* で褐色の凝集体の形成が報告されており (Takeshita et al., 2006)、本研究でシクロチアゾマイシンを作用させた *A. oryzae* の菌糸先端に見られた褐色の凝集体もこれと同様のものである可能性がある。ポリオキシンを作用させた *A. oryzae* にはこのような凝集体は観察されなかったことから、この凝集体の形成がシクロチアゾマイシンとポリオキシンの作用点の違いを示していると考えられる。

#### シクロチアゾマイシンの構造活性相関に関する考察

シクロチアゾマイシン精製の過程で、シクロチアゾマイシンが酸性条件下で徐々に別の化合物に変換されることを見出した。新しく生成した化合物はシクロチアゾマイシンと同様のUVスペクトルを示し、MSスペクトルで

はシクロチアゾマイシンで観測されたイオンよりも  $m/z$  が18大きいイオン ( $m/z$  1491.3, 1181.2) とともに、シクロチアゾマイシンに共通するフラグメントイオン ( $m/z$  784.0, 442.0, 315.0) も観測されたことから、この化合物はシクロチアゾマイシンに水が付加した類縁体であると考えられた。MSスペクトルでシクロチアゾマイシンから生じるフラグメントイオンはWangらによって図4のように予測されている (Wang et al., 2010)。そのため酸性条件下で生じるシクロチアゾマイシン類縁体は、Thr-Gly-Dhha-Pro-Ala部分に水が付加、あるいは加水分解によって開環した化合物である可能性が高い。

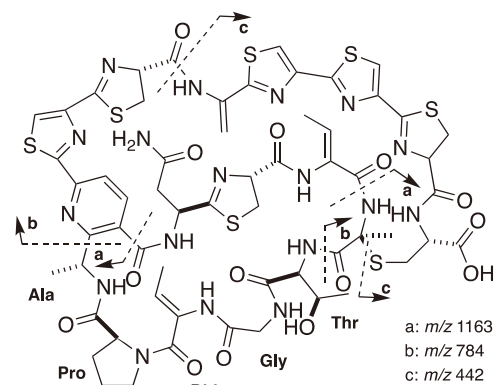


図4 予測されるシクロチアゾマイシンのフラグメンテーション

この類縁体をHPLCで分取して植物病原菌胞子に作用させたところ形態異常が認められなかったため、この部分構造の維持が活性に必須である可能性が高い。一方で、この部分のスレオニン残基がアルギニンに置換されたシクロチアゾマイシンB1 (0.3  $\mu\text{M}$ ) は、シクロチアゾマイシンと同様にイネごま葉枯れ病菌の菌糸先端の膨潤を誘導する。そのため、アミノ酸側鎖の構造よりも、環の立体構造の維持が活性発現に重要であると考えられる。

本研究では、植物病原糸状菌の形態変化を指標としたスクリーニングで見出した放線菌TU14386株が生産する活性物質を単離し、構造を決定した。その結果、すでにレニン阻害活性物質として知られているシクロチアゾマイシンを、植物病原菌に形態異常を誘導する物質として再発見した。

#### 謝辞

本研究で使用した放線菌TU14386株の分離源を提供していただいた玉川大学農学部農産研究センター玉川学

内農場の先生方、並びにTU14386株の分離に尽力していただいた鈴木麻未氏に深謝致します。

#### 引用文献

- Aoki, M., Ohtsuka, T., Yamada, M., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Yasuno, H., Sano, T., Watanabe, J., Yokose, K. and Seto H. 1991. Cyclothiazomycin, a novel polythiazole-containing peptide with renin inhibitory activity. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical characterization. *The Journal of Antibiotics* 44(6): 582–588.
- Aoki, M., Ohtsuka, T., Itezono, Y., Yokose, K., Furihata, K. and Seto, H. 1991. Structure of cyclothiazomycin, a unique polythiazole-containing peptide with renin inhibitory activity. Part 2. Total structure. *Tetrahedron Letters* 32(2): 221–224.
- Betina, V. and Micekova, D. 1973. Morphogenetic activity of cytochalasins, cyanein, and monorden in *Botrytis cinerea*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 13(4): 287–298.
- Brian, P. W. 1949. Studies on the biological activity of griseofulvin. *Annals of Botany* 13(49): 59–77.
- Cox, C. L., Tietz, J. I., Sokolowski, K., Melby, J. O., Doroghazi, J. R. and Mitchell, D. A. 2014. Nucleophilic 1,4-additions for natural product discovery. *ACS Chemical Biology* 9(9): 2014–2022.
- Gunji, S., Arima, K. and Beppu, T. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry* 47(9): 2061–2069.
- Hamamoto, T., Seto, H. and Beppu, T. 1983. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation. *The Journal of Antibiotics* 36(6): 646–650.
- Hashimoto, M., Murakami, T., Funahashi, K., Tokunaga, T., Nihei, K., Okuno, T., Kimura, T., Naoki, H. and Himeno, H. 2006. An RNA polymerase inhibitor, cyclothiazomycin B1, and its isomer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(24): 8259–8270.
- Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y. and Suzuki, S. 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agricultural and Biological Chemistry* 29(9): 848–854.
- Isono, K., Nagatsu, J., Kobinata, K., Sasaki, K. and Suzuki, S. 1967. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics Part V. Isolation and characterization of polyoxins C, D, E, F, G, H and I. *Agricultural and Biological Chemistry* 31(2): 190–199.
- Isono, K., Kobinata, K. and Suzuki, S. 1968. Isolation and characterization of polyoxins J, K and L, new components of polyoxin complex. *Agricultural and Biological Chemistry* 32(6): 792–793.
- Komiyama, K., Okada, K., Tomisaka, S., Umezawa, I., Hamamoto, T. and Beppu, T. 1985. Antitumor activity of leptomycin B. *The Journal of Antibiotics* 38(3): 427–429.
- Liu, R., Xu, C., Zhang, Q., Wang, S. and Fang, W. 2017. Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaption to ecological niches. *Scientific Reports* 7: 44527.
- Osman, S. F., Gerard, H. C., Fett, W. F., Moreau, R. A. and Dudley, R. L. 1995. Method for the production and characterization of tomato cutin oligomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(8): 2134–2137.
- Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H. 2006. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Molecular Microbiology* 59(5): 1380–1394.
- Uramoto, M., Matsumoto, M., Liehr, J. G., McCloskey, A. and Isono, K. 1981. Polyoxin N, a new member of the polyoxin family. *Agricultural and Biological Chemistry* 45(8): 1901–1902.
- Wang, J., Yu, Y., Tang, K., Liu, W., He, X., Huang, X. and Deng, Z. 2010. Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster encoding the thiopeptide antibiotic cyclothiazomycin in *Streptomyces hygroscopicus* 10–22. *Applied and Environmental Microbiology* 76(7): 2335–2344.
- Yoshida, M., Nishikawa, M., Nishi, K., Abe, K., Horinouchi, S. and Beppu, T. 1990. Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Experimental Cell Research* 187(1): 150–156.
- 橋本佳祐, 眞野容子, 古谷信彦. 2014. *Candida albicans*の形態変化に対する抗真菌薬効果の検討—各種抗真菌薬における sub-MIC 効果—. *医学検査* 63 : 545–549.

# Studies on the Compound Inducing Abnormal Morphological Changes on Some Phytopathogenic Fungi Produced by Actinomycete TU14386

Miyuki Otsuka<sup>1,2</sup>, Takuto Hatae<sup>2</sup>, Hiroshi Hori<sup>1,2</sup>

## Abstract

We found actinomycete strain TU14386 by screening program for microorganisms producing bioactive compounds on phytopathogenic fungi. The strain TU14386 produced a compound which induced abnormal morphological changes on the spore and hyphae of *Colletotrichum destructivum*. This strain was identified as *Streptomyces corchorusii* based on 16S rDNA sequence.

Chromatographic purification gave a pure active compound, and spectroscopic analysis revealed the active compound was cyclothiazomycin, a macrocyclic bicyclic peptide known as a renin inhibitor.

The active compound showed polyoxin-like activities such as swelling of growing hyphae of some phytopathogenic fungi, but mycelial growth of *Cochliobolus miyabeanus* on agar plate was more strongly inhibited by this compound than polyoxin.

**Keywords:** antibiotics, actinomycetes, anti-phytopathogenic agent, cyclothiazomycin

---

<sup>1</sup> Department of Agri-Production Sciences, College of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawagakuen, Machida, Tokyo, 194-8610, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawagakuen, Machida, Tokyo, 194-8610, Japan