

微生物代謝産物からの抗感染症薬シード化合物の探索

北里大学 大村智記念研究所

渡邊 善洋

申請者は「微生物代謝産物からの抗感染症薬シード化合物の探索」を主テーマに以下の3つについて研究を行った。

- (1) 微生物代謝産物からの抗マラリア薬シード化合物の探索
- (2) 微生物代謝産物からの抗真菌薬シード化合物の探索
- (3) グラム陰性病原性細菌の3型分泌機構阻害剤 **Aurodox** の作用機序解析

各論について以下に示す。

(1) 微生物代謝産物からの抗マラリア薬シード化合物の探索

<背景>

マラリアはハマダラカが媒介するマラリア原虫の感染によって引き起こされる原虫感染症である。2021年には年間罹患者数2.5億人、死亡者数61.9万人が報告されている¹⁾。既存薬としてアルテミシニン誘導体等が用いられているが、耐性原虫の出現が報告されていることから新たな作用機序を持つ抗マラリア薬の開発が求められている。そこで申請者は赤血球内ステージのマラリア原虫を標的に微生物代謝産物から新たな抗マラリア薬シード化合物を探索した。

<方法・結果>

多剤耐性マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* K1 株に対する抗マラリア原虫活性を指標にスクリーニングを行った結果、糸状菌および放線菌培養物 6,080 サンプルより156 サンプルが通過した。スクリーニングを通過した糸状菌2株の培養物より抗マラリア原虫活性を示す化合物の単離を試みた。まず *Fusarium* sp. FKI-9521 株 (ナナフシモドキの糞より分離) の培養物から FKI-9521 A-E 物質を単離した。NMR および ESI-MS 解析の結果 FKI-9521 A および D 物質はそれぞれ fusarochromanone および 3'-*N*-acetyl fusarochromanone と同定、FKI-9521 E 物質は fusarochromene (もしくはエナンチオマーである banchromene) であると推定した²⁻⁴⁾。FKI-9521 B および C 物質は 1D、2D NMR および ESI-MS 解析により fusarochromanone 新規類縁体と決定し、deacetyl fusarochromene および 4'-*O*-acetyl fusarochromanone と命名した (Fig. 1)。また、それぞれのアセチル化体の NMR および比旋光度の比較により絶対立体配置も決定した。FKI-9521 A-E 物質は *P. falciparum* K1 株に対して *in vitro* 抗マラリア原虫活性 (IC_{50} = 0.08 ~ 6.35 μ M) を示した (Table 1)。一方、30 mg/kg/日 x 4 日間 (i.p.) では残念ながら *in vivo* 抗マラリア原虫活性を示さなかった⁵⁾。

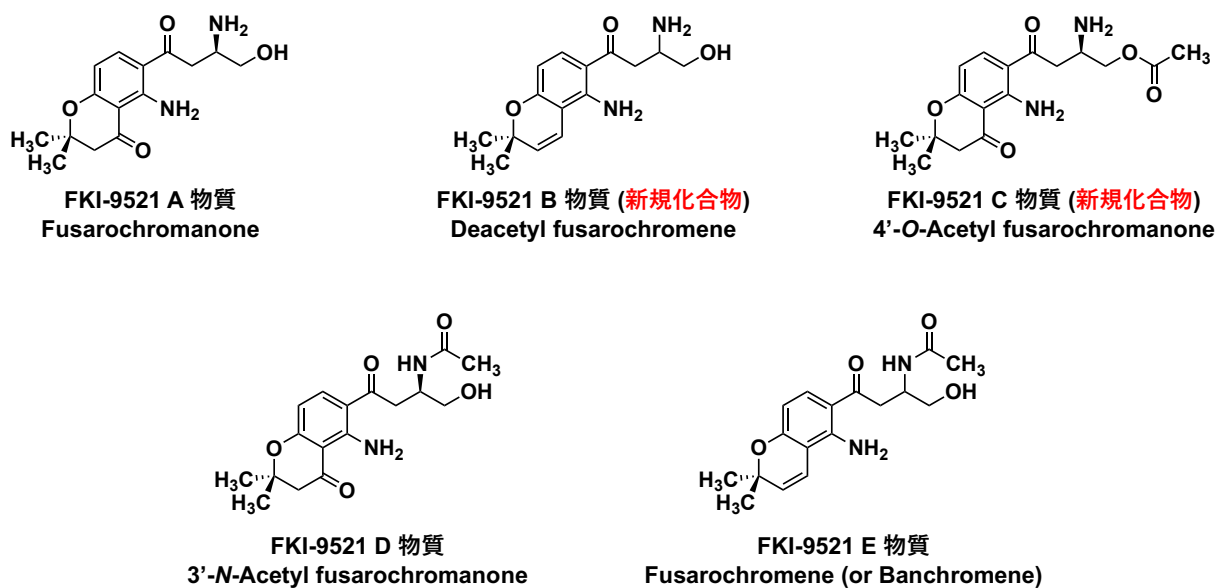


Fig. 1. FK-9521 株由来の新規 2 化合物および既知 3 化合物の構造

Table 1. FK-9521 株由来 5 化合物の *in vitro* 抗マラリア原虫活性および細胞毒性

Compound	IC ₅₀ (μM)				
	Antimalarial activity		Cytotoxicity	Selectivity index (SI)	
	K1 strain*	FCR3 strain**	MRC-5 cells	MRC-5/K1	MRC-5/FCR3
Deacetyl fusarochromene	0.69	0.54	2.25	3.3	4.1
4'-O-Acetyl fusarochromanone	0.17	0.13	24.82	145.4	188.4
Fusarochromanone	0.15	0.08	0.45	2.9	5.6
3'-N-Acetyl fusarochromanone	1.68	0.90	42.49	25.3	47.3
Fusarochromene (or Banchromene)	6.35	Not tested	55.47	6.1	—
Artemisinin***	0.021	0.021	160	7,528	7,528
Artesunate***	0.010	0.003	37	3,556	14,224
Chloroquine***	0.577	0.047	58	101	1,238

*chloroquine-resistant strain

**chloroquine-sensitive strain

***drugs commonly used to treat malaria [ref. 4]

続いて *Pochonia boninensis* FKR-0564 株 (沖縄県伊平屋島の木の根元土壌より分離) の培養物からも同様に抗マalaria原虫活性を指標に精製を行い、FKR-0564 A および B 物質を単離した。NMR、ESI-MS 解析および誘導化により両物質の絶対立体配置を含む構造を決定し、それぞれ koshidacin A および B と命名した (Fig. 2)。

Chlamydocin 新規類縁体である両物質は *P. falciparum* K1 株に対して *in vitro* 抗マalaria原虫活性 (IC_{50} = 12.5 および 0.83 μ M) を示した (Table 2)。更に koshidacin B は *in vivo* においても 41%の抗マalaria原虫増殖阻害活性 (30 mg/kg/日 x 4 日間 (i.p.)) を示した⁶⁾。

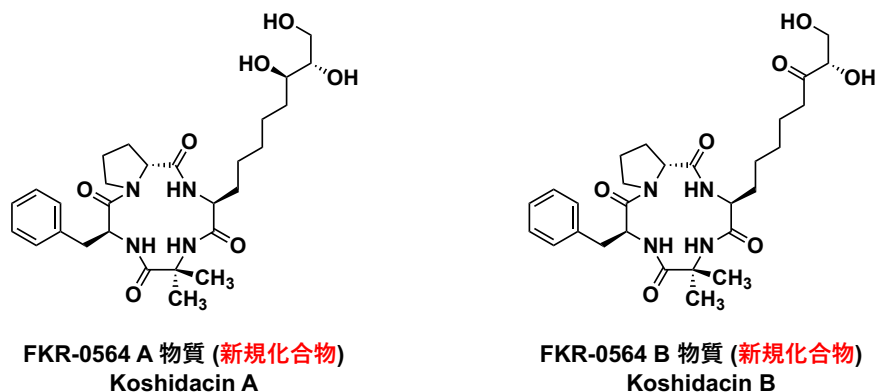


Fig. 2. Koshidacin A および B の構造

Table 2. Koshidacin A および B の *in vitro* 抗マalaria原虫活性および細胞毒性

Compound	IC_{50} (μ M)				
	Antimalarial activity		Cytotoxicity	Selectivity index (SI)	
	K1 strain *	FCR3 strain **	MRC-5 cells	MRC-5/K1	MRC-5/FCR3
Koshidacin A	12.5	17.1	6.8	0.50	0.40
Koshidacin B	0.8	0.9	14.7	18.40	16.30
Artemisinin ***	0.021	0.021	160	7,528	7,528
Chloroquine ***	0.577	0.047	58	101	1,238

*chloroquine-resistant strain

**chloroquine-sensitive strain

***drugs commonly used to treat malaria

(2) 微生物代謝産物からの抗真菌薬シード化合物の探索

<背景>

深在性真菌症は宿主の免疫低下などにより感染する致死率の高い日和見感染症で *Aspergillus* 属や *Candida* 属が主要な原因真菌として知られている。現在用いられている治療薬は 4 系統のみで耐性菌が蔓延しており、原因真菌全てに有効ではない（狭域スペクトルな）ため治療の遅れから重篤化しやすく致死率が高い。近年では、真菌症初の新興感染症に指定され、全ての治療薬に耐性を示す *Candida auris* の出現が問題となっている。そこで本研究では臨床で特に問題になっている *A. fumigatus* および *C. auris* の薬剤耐性菌に対して広域な抗真菌活性スペクトルを示す真菌症治療薬シードの探索を微生物代謝産物から行った。

<方法・結果>

A. fumigatus 薬剤感受性菌、その隠蔽種 (*A. felis*, *A. lentulus* および *A. udagawae*) に対する抗真菌活性を指標にペーパーディスク法で糸状菌培養物をスクリーニングした。見出した *Hypomyces pseudocorticiicola* FKI-9008 株の培養物から抗真菌活性を指標に精製を行い、FKI-9008 A–C 物質を単離した。NMR および ESI-MS 解析の結果、FKI-9008 A および B 物質はそれぞれ F2928-1 および cladobotric acid E と同定した^{7,8)}。FKI-9008 C 物質は NMR および ESI-MS 解析により cladobotric acid 新規類縁体と決定し、hakuhybotric acid と命名した (Fig. 3)。FKI-9008 A–C 物質は *A. fumigatus* およびその隠蔽種に対して MIC = 16–128 µg/mL と中程度の抗真菌活性を示した⁹⁾。

FKI-9008 株が属する *Hypomyces* 属は真菌に寄生する菌寄生菌類として知られている。菌寄生菌類はキノコなどの真菌に対して、細胞壁の合成阻害活性を示す化合物などで宿主を攻撃し寄生すると推定されている。そこで菌寄生菌を探索源として抗真菌薬シード化合物の探索を試みた。

日本各地から採取した菌寄生菌 115 株の培養物を *A. fumigatus* および *C. auris* 薬剤感受性および耐性菌 (全 4 株) に対する抗真菌活性でスクリーニングした結果、全てに活性を示す 5 サンプルを見出した。このうち *Hypomyces* sp. FKA-73 株の培養物から抗真菌活性物質の単離を試みた。その結果 FKA-73 A–G 物質を単離した。NMR および ESI-MS 解析の結果、FKA-73 B–G 物質についてはそれぞれ cladobotric acid F、pyrenulic acid A、F2928-1、cladobotric acid E、cladobotric acid A および cladobotric acid H と同定した^{7,8,10,11)}。FKA-73 A 物質は NMR および ESI-MS 解析により cladobotric acid 新規類縁体であることが明らかとなり hakuhybotrol と命名した¹²⁾ (Fig. 3)。

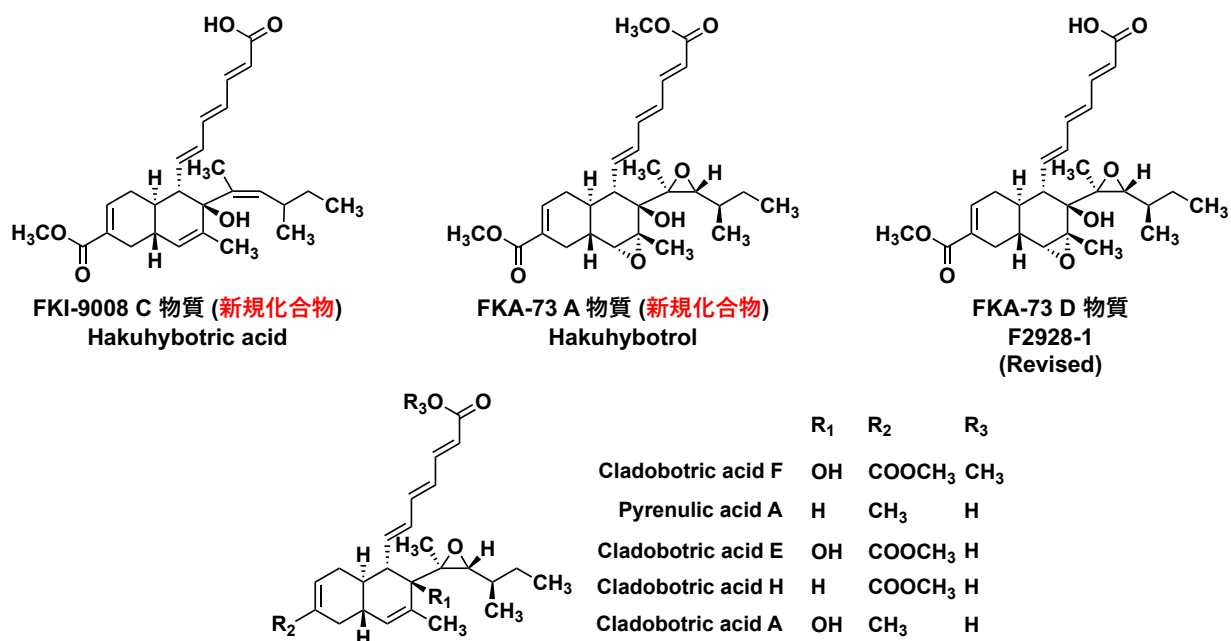


Fig. 3. Hakuhybotric acid、Hakuhybotrol および FKA-73 株由来の既知化合物の構造

Hakuhybotrol の絶対立体配置は PGME 法、X 線結晶構造解析 (SCXRD) および microED を用いて決定した (Fig. 4)。

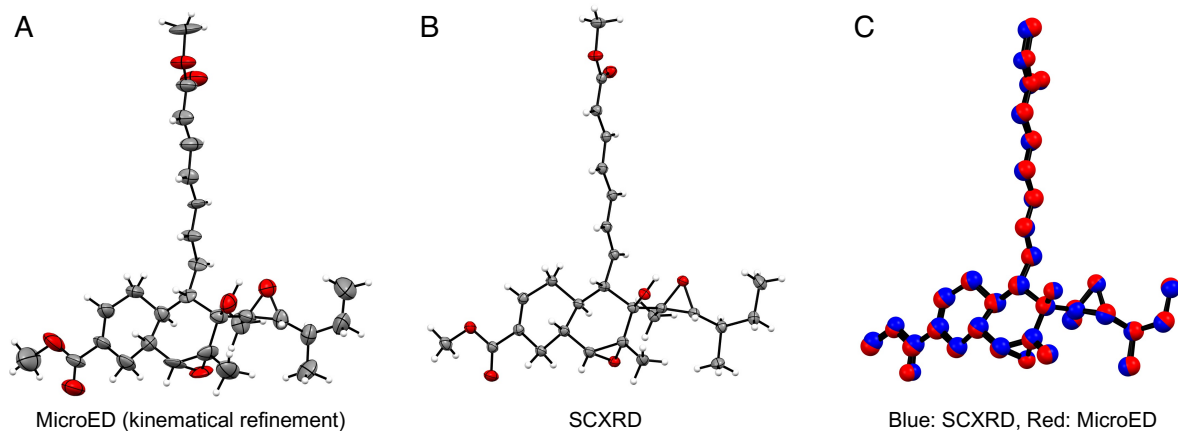


Fig. 4. Hakuhybotrol の ORTEP 図
 A; MicroED B; SCXRD C; Merged A and B

更に誘導化により F2928-1 の立体化学を訂正した (Fig. 3)。また、FKA-73 A-G 物質の *A. fumigatus* および *C. auris* 薬剤感受性および耐性菌を用いた抗真菌活性評価を行った。その結果、cladobotric acid 類の抗真菌活性における構造活性相関を考察し、トリエン末端のカルボキシル基が重要であることが示唆された (Table 3)。

Table 3. Hakuhybotrol および FKA-73 株由来の既知化合物の抗真菌活性

Compound ^d	Minimum Inhibitory Concentration (μg/mL)							
	Test microorganism							
	<i>A. fumigatus</i> IFM 61493 ^a	<i>A. fumigatus</i> IFM 62104 ^b	<i>A. udagawae</i> IFM 62100 ^c	<i>A. felis</i> IFM 62093 ^c	<i>A. lentulus</i> IFM 62073 ^c	<i>C. auris</i> IFM 64524 ^{Ta}	<i>C. auris</i> IFM 65059 ^b	<i>C. auris</i> IFM 65061 ^b
Hakuhybotrol	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Cladobotric acid F	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Pyrenulic acid A	32	32	32	>128	>128	16	16	16
F2928-1	32	32	32	64	64	2	2	2
Cladobotric acid E	8	16	32	64	32	4	2	2
Cladobotric acid A	32	32	64	64	64	16	16	32
Cladobotric acid H	32	32	32	128	64	4	8	8
Itraconazole	0.5	8	2	>8	1	0.06	0.25	0.25
Voriconazole	0.5	8	8	>8	8	0.03	0.5	0.5

^a Azole-sensitive strain. ^b Azole-resistant strain. ^c Cryptic species of *As. fumigatus*. ^d All compounds derived from FKA-73 strain.

(3) グラム陰性病原性細菌の3型分泌機構阻害剤 Aurodox の作用機序解析

<背景>

3 型分泌機構 (以下、T3SS) は *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) や *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter rodentium* などのグラム陰性病原性細菌に高度に保存されている。T3SS は針状の分泌装置でありエフェクタータンパク質などを宿主細胞に打ち込むことで病原性を発揮する。T3SS は菌の生存には必須ではないことが報告されており、T3SS 阻害剤は病原性のみを無力化するため、耐性菌の出現しない抗細菌薬として開発が期待される。前任者らにより行われた EPEC の溶血阻害活性を指標にした T3SS 阻害剤スクリーニングから aurodox が再発見された (Fig.

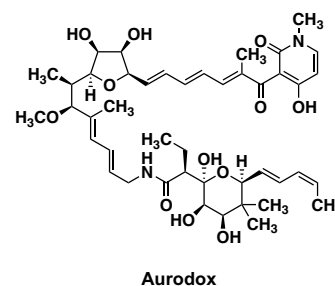


Fig. 5. Aurodox の構造

5)。Aurodox は抗菌活性と溶血阻害活性との選択性が 33 倍あり、動物感染モデルでも有効性があることが明らかとなっているが標的タンパク質は明らかとなっていない¹³⁾。前任者の結合タンパク釣り上げ実験により adenylosuccinate synthase (PurA) が見出された。EPEC において PurA の欠損により T3SS 依存的な溶血活性が著しく失われた¹⁴⁾ (Fig. 6A)。このことから PurA は T3SS の発現に関与していることが示唆された。そこで本研究では PurA が T3SS に与える影響をより詳細に評価することで aurodox の標的分子としての妥当性について検討した。

<方法・結果>

EPEC の PurA 欠損による T3SS 活性に与える影響を評価した。前任者により suicide vector である pABB-CRS2 を用いて EPEC E2348/69 $\Delta cesT \Delta purA$ 株 (PurA 欠損株)、pCA24N を用いて EPEC E2348/69 $\Delta cesT \Delta purA::pCA24N purA$ 株 (PurA 相補株) および EPEC E2348/69 $\Delta cesT \Delta purA::pCA24N$ 株 (空ベクター株) が作製された。それぞれの菌株を用いて T3SS で分泌されるタンパク質 Esp A-D の分泌を検出した結果、PurA 欠損株では検出されず、相補株では検出された (Fig. 6B)。このことから PurA は T3SS の発現に重要であることが強く示唆された。

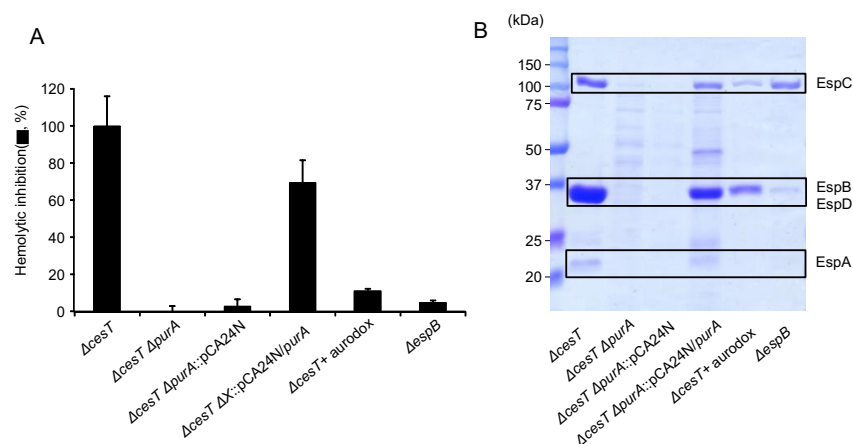


Fig. 6. PurA 欠損における EPEC の T3SS へ与える影響

A; 溶血活性、B; 分泌タンパク質

PurA は GTPase 活性を有することが知られている (Fig. 7)。そこで aurodox が PurA の GTPase 活性に与える影響を評価した。

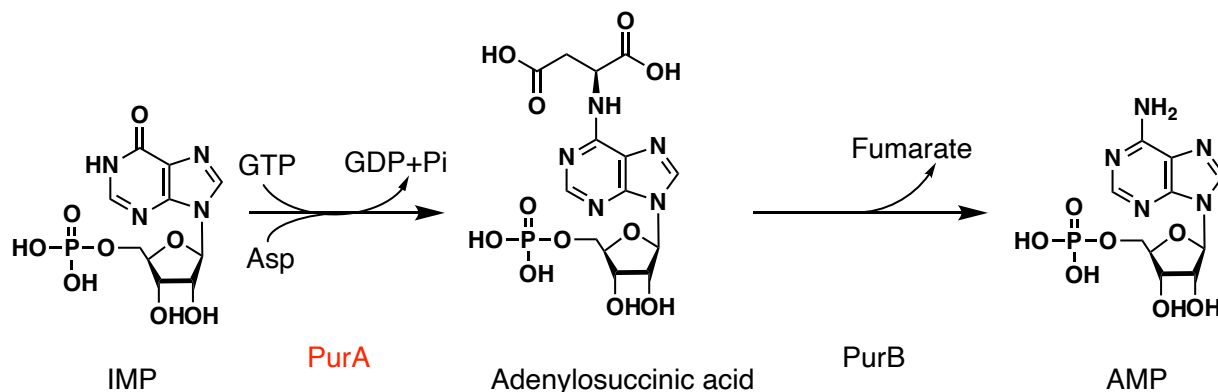


Fig. 7. PurA による adenylosuccinic acid 合成経路

PurA 過剰発現株から PurA を単離し、基質である GTP から遊離するリン酸を定量することで GTPase 活性を定量した。活性評価には aurodox および aurodox と同程度の T3SS 阻害活性を示す誘導体を用いた。その結果 aurodox は PurA の GTPase 活性を阻害したが同程度の T3SS 阻害を示す aurodox 誘導体は GTPase 活性の阻害が減弱しており、T3SS 阻害活性および GTPase 阻害活性の強さに相関は見られなかった。この結果より、aurodox の PurA の GTPase 阻害活性は T3SS 阻害には関与しないことが示唆された。

更に *C. rodentium* を用いたマウスにおける *in vivo* 感染実験において PurA 欠損が与える影響を評価した。*C. rodentium* Δ purA 株を作製し、マウスにおける *in vivo* 感染実験を実施した。その結果 PurA 欠損株は病原性を示さず、相補株では病原性が回復した。更に糞便中の菌数を継時的にカウントした結果、感染 1 日後において PurA 欠損株は野生株より菌数が有意に少なくなっていた。以上の結果より aurodox の T3SS 阻害の標的分子の一つとして PurA を同定した。

<総括>

申請者は抗マラリア薬シード化合物探索のテーマにおいて FKI-9521 株培養物から新規 2 化合物を含む 5 化合物を単離・構造決定し、抗マラリア原虫活性を評価した。FKR-0564 株培養物から新規 2 化合物を単離・構造決定した。このうち FKR-0564 株培養物から取得した koshidacin B は *in vivo* において抗マラリア原虫活性を示した。

抗真菌薬シード化合物探索のテーマにおいて FKI-9008 株培養物から新規 1 化合物を含む 3 化合物を単離・構造決定し、FKA-73 株培養物から新規 1 化合物を含む 7 化合物を単離・構造決定した。また FKA-73 株培養物から取得した hakuhybotrol は PGME 法、X 線結晶構造解析および microED によりその絶対立体配置を決定した。また、誘導化により既知化合物である F2928-1 の立体構造について訂正した。取得した cladobotric

acid 類の *A. fumigatus* および *C. auris* に対する抗真菌活性の構造活性相関を見出した。

Aurodox の作用機序解析のテーマにおいて結合タンパク質釣り上げ実験で見出されていた標的分子候補である PurA を欠損した EPEC では T3SS 関連タンパク質の分泌が抑制されることを見出した。また、aurodox は PurA の GTPase 活性を阻害するが T3SS 阻害活性との相関は見られなかった。更に *C. rodentium* の PurA 欠損株では *in vivo* において病原性が著しく低下することが明らかとなり、aurodox の T3SS 阻害の標的分子の一つとして PurA を同定した。

<参考文献>

- 1) World Health Organization, World Malaria Report 2022.
- 2) *Can. J. Chem.*, 1986, **64**, 1308–1311
- 3) *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 182–187.
- 4) *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 4057–4061.
- 5) *J. Antibiot.*, 2023, in press
- 6) *J. Nat. Prod.*, 2022, **85**, 2641–2649.
- 7) *J. Antibiot.*, 2005, **58**, 507–513.
- 8) *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 492–497.
- 9) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2022, **68**, 200–206.
- 10) *J. Nat. Prod.*, 2022, **85**, 572–580.
- 11) *J. Nat. Prod.*, 2014, **77**, 1404–1407.
- 12) *Org. Biomol. Chem.*, 2023, **20**, 2320–2330.
- 13) *J. Antibiot.*, 2011, **64**, 197–203
- 14) 須賀拓弥 博士論文 (2016)