

[背景・目的]

現在、日本における蠕虫症罹患率は 1%以下であり日常生活で蠕虫を目にすることは稀となった。しかし、世界では回虫のみに限定しても約 14 億人の感染者が試算されており、日本でも蔓延地域からの輸入寄生虫症や近年の健康志向による有機農業野菜の重用等を原因に新規罹患者が増加傾向にある。一方、蠕虫症の治療薬である駆虫薬に目を向けると、その種類は抗菌薬に比べ驚くほど少ない。そしていくつかの薬剤にはすでに耐性蠕虫が報告され、畜産業において問題が表在化しつつある。したがって、新規抗寄生虫薬の開発は急務である。そこで本研究では微生物代謝産物から新規駆虫薬開発を目指して宿主体内に寄生する多くの蠕虫にとって必須な嫌気呼吸の鍵酵素である NADH-フマル酸還元酵素 (NADH-fumarate reductase: NFRD) の阻害化合物を探索した。またこれまでのスクリーニングにおいて *Talaromyces* 属から高頻度で単離された NFRD 阻害化合物 ukulactone 類に着目し、その属内分類と ukulactone 類の生産性の関係を明らかにするとともに、新規類縁化合物を単離した。さらに NFRD 阻害化合物として見出された呼吸鎖複合体 II 選択的阻害剤 atpenin 類のより詳細な構造活性相関を明らかにするため、生産菌 FO-125 株から新規 atpenin 類縁化合物の取得を行った。

[方法・結果]

1. 微生物培養液からの NADH-フマル酸還元酵素 (NFRD) 阻害化合物の探索

1-1. NFRD 阻害活性を示す微生物培養液のスクリーニング

糸状菌培養液 7,825 サンプル、放線菌培養液 7,792 サンプルから NFRD 阻害活性を示すサンプルをスクリーニングした。NFRD の阻害活性測定はブタ回虫 (*Ascaris suum*) の体壁筋から調製した粗ミトコンドリア画分を用いて測定した。さらにウシ心筋から調製した同画分を用いて NADH-oxidase (NO) 阻害活性を測定することで嫌気的呼吸鎖酵素に対する選択性を調べた。その結果、糸状菌培養液 52 サンプル、放線菌培養液 3 サンプルに NFRD 選択的な阻害活性を見出した。

1-2. *Neosartorya fischeri* FO-5897 が生産する NFRD 阻害化合物の構造と活性

1-1 で培養抽出物に NFRD 選択的な阻害活性が認められた *Neosartorya fischeri*

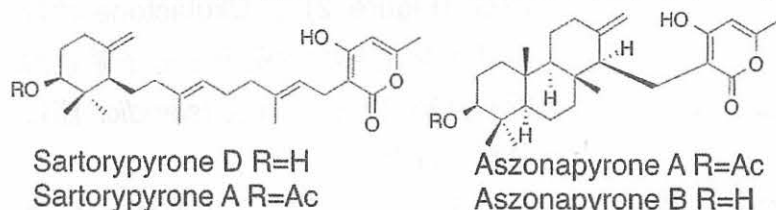


Figure 1. FO-5897 株が生産する NFRD 阻害化合物の構造

FO-5897 株をコメ培地で静置培養し、メタノール、酢酸エチルで抽出した。抽出物を各種カラムクロマトグラ

フィーで精製し、NFRD 阻害化合物として sartorypyrone A とその脱アセチル体である新規化合物 sartorypyrone D, sartorypyrone の環化体である aszonapyrone A および B の 4 成分を単離した (Figure 1)。Sartorypyrone A および D の NFRD に対する IC₅₀ はそれぞれ 0.6 μM および 1.7 μM であったが哺乳類の NO に対しても IC₅₀ 値 1.3 μM および 3.9 μM で阻害した (Table 1)。一方、azonapyrone A および B は sartorypyrones に比べ NFRD 阻害活性は弱かったが、哺乳類の NO 阻害活性との間に選択性が若干みられた。そして aszonapyrones、sartorypyrones とともにアセチル体でやや阻害活性が強い傾向が見られた。Sartorypyrones と aszonapyrones は NFRD 阻害活性を有する新たな骨格であり、構造的に安定で培養細胞に対し低毒性 (Panc-1 に対し CC₅₀>50 μM) であるため新しい抗蠕虫薬のリード化合物として有望である。

Table 1. Sartorypyrone 類、azonapyrone 類の NFRD および NO 阻害活性

化合物名	IC ₅₀ (μM)		
	NFRD	NO	SI*
Sartorypyrone A	0.6	1.3	2.1
Sartorypyrone D	1.7	3.0	1.8
Aszonapyrone A	8.7	87	10.0
Aszonapyrone B	72.5	241	3.3

*Selectivity Index (NO/NFRD)

2. Talaromyces 属に着目した ukulactone 類縁ポリエン化合物の探索

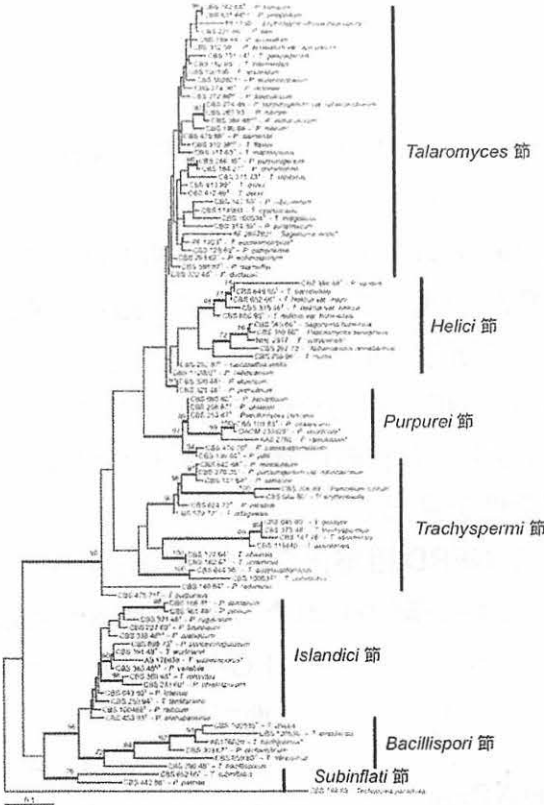


Figure 2. Talaromyces 属の属内分類群

NFRD 阻害化合物 ukulactone A, prugosene A1, wortmannilactone F はいずれもポリエン鎖でピロン環とオキサビシクロ環が繋がれた特異な構造を持ち、なかでもペンタエン鎖を持つ ukulactone 類が強力な NFRD 阻害活性を示した (IC₅₀=2.4 nM)。これら ukulactone 類縁ポリエン化合物の生産菌は全て Talaromyces 属糸状菌であった。Talaromyces 属糸状菌は形態的特徴および分子系統解析などにより現在 7 節に分類されている (Figure 2)。Ukulactone 類縁ポリエン化合物生産菌を分子系統解析した結果、いずれも Islandici 節に分類された。

以上の結果より Talaromyces 属

の中でも *Islandici* 節あるいはその類縁の節に分類される菌株から探索研究を行えば、NFRD 阻害活性を持つ ukulactone 類縁化合物を効率よく見出すことが出来るのではないかと考え、*Talaromyces* 属内の分類群と ukulactone 類ポリエン化合物との関連について調べた。

保有している *Talaromyces* 属菌から 24 株を選び、塩基配列に基づく系統解析を行い既報の分類群へ分類したところ 5 節に分類された。それぞれをコメ培地で 14 日間静置培養し、培養物のメタノールで抽出物を、LC-UV で分析することにより、ukulactone 類縁ポリエン化合物の生産を調べた。

その結果、24 株中 7 株が ukulactone 類縁ポリエン化合物を生産していた。7 株のうち 3 株は上述の生産株と同じく *Islandici* 節に属し、残り 4 株は *Bacillispori* 節に属する菌株であった。本結果から *Islandici* 節と *Bacillispori* 節に属する菌株は ukulactone 類縁ポリエン化合物生産能を有することが明らかになった。さらに、*Bacillispori* 節に属する FKI-6713 株の培養物から ukulactone A のオキサビシクロ環の 3 位のケトン基が還元された新規類縁体 ukulactone C を見出すことができた(Figure 3)。Ukulactone C の NFRD 阻害活性は $IC_{50}=62$ nM と ukulactone A には及ばないものの強力に NFRD を阻害した (Figure 2)。生産菌の属内分類に着目することでこれまで報告例の少なかった ukulactone 類縁ポリエン化合物の探索研究が容易になり、新規類縁体を見出すこともできた。

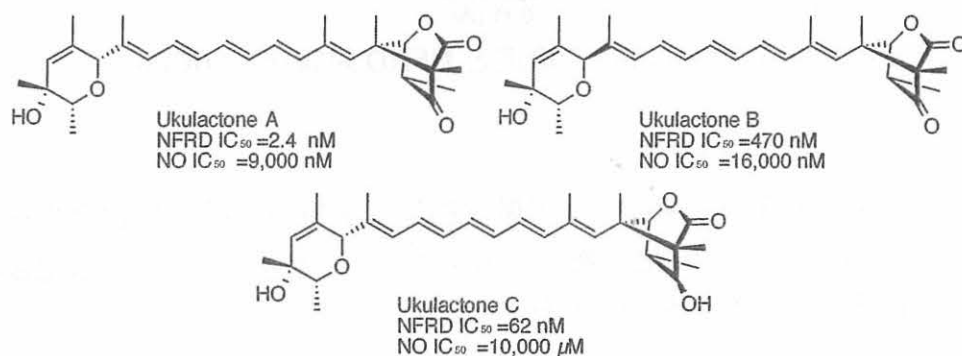


Figure 3. Ukulactone 類の構造と NFRD および NO 阻害活性

3. 構造未決定であった atpenin 類の構造決定

呼吸鎖複合体 II の選択的阻害剤である atpenin 類のうち A1-A3 の 3 成分は構造未決定であった。そこで生産菌 *Penicillium oxalicum* FO-125 株をジャー培養し、目的の 3 成分を単離した。各種機器分析の結果、atpenin A1 は側鎖末端にオレフィンを持つ既報の NBRI 23477 B と同定した (Figure 4)。Atpenin A2 は NMR 測定の結果、平面構造が A1 と同一であり、A1 と A2 の比旋光度の符号はどちらも負であったことから、A1 のエピマーであると考えられる。また、atpenin A3 は A1 および A2 の末端オレフィンの位置が一つ移動した平面構造を持つ新規化合物であるとわかった。各構造は Figure 4 に示した。

三成分に加え側鎖ケトンの α 位にヒドロキシ基とメチル基が結合した新規 atpenin 類縁体 atpenin C を得た (Figure 4)。得られた 4 種類の atpenin 類縁体の NFRD 阻害活性を評価したところ、atpenin A3 が最も強力に NFRD を阻害した。また、A1 と A2 は同一平面構造を有するにもかかわらず、その NFRD 阻害活性には 16 倍の差が見られた。この結果は atpenin 類の NFRD 阻害活性は側鎖の立体配置に大きく影響を受けることを示唆した。

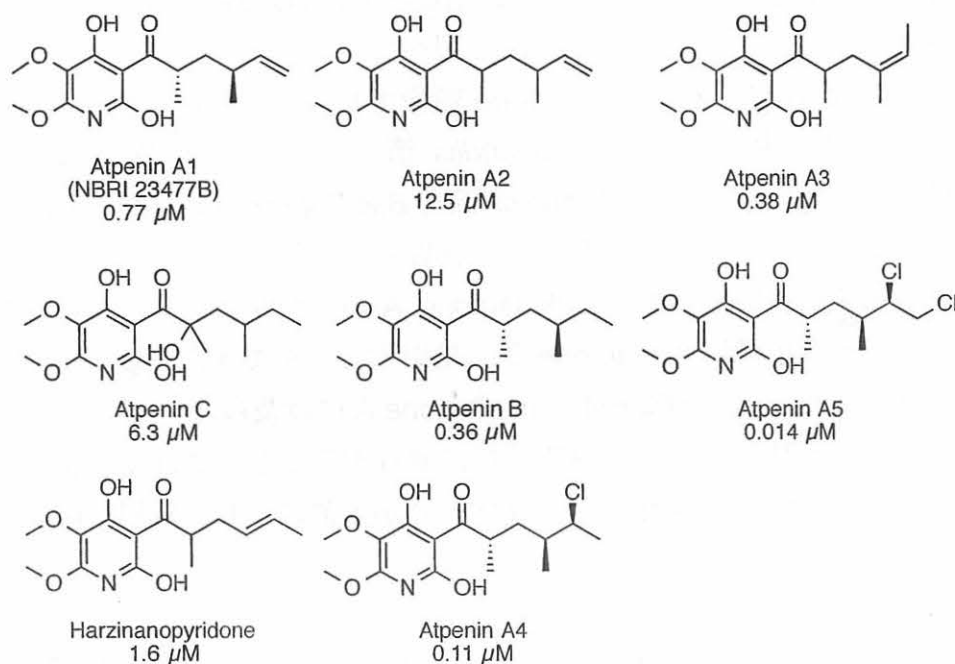


Figure 4. Atpenin 類の構造と NFRD 阻害活性 (IC_{50})

以上、本研究では 1, 2, 3 の方策によって微生物代謝産物から新規 5 化合物を含む新たな NFRD 阻害化合物として 9 化合物を見出すことができた。今後これら化合物をリードとした新規抗蠕虫薬の開発が期待される。