

機関番号：32607

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780115

研究課題名 (和文) 微生物が生産する NADH-フマル酸還元酵素阻害剤の探索研究

研究課題名 (英文) Search for inhibitors of NADH-fumarate reductase from second metabolites of bacteria, actinomycetes and fungi

研究代表者

森 美穂子 (MORI MIHOKO)

北里大学・大学院感染制御科学府・助教

研究者番号：20425648

研究成果の概要 (和文) : バリエーションに富んだ微生物培養液約 8,200 サンプルの中から NADH-フマル酸還元酵素阻害物質をスクリーニングしたところ、約 2% の培養液が阻害活性を示した。ほとんどの培養液の活性物質は水溶性であり、酵素の基質となるフマル酸、または低分子有機化合物あるいは無機塩が活性を示すことが示唆された。一方、脂溶性の性質を示す活性物質を精製したところ、放線菌 *Streptomyces* sp. 培養液から初めて NADH-フマル酸還元酵素選択的な阻害活性を示す (4E)-5-(2-methylphenyl)-4-pentenoic acid を単離した。糸状菌 *Penicillium* sp. FKI-5329 株培養液からは強力な阻害活性を示すペンタエン化合物 prugosene A1 とその新規類縁体 2 化合物を単離した。

研究成果の概要 (英文) : Screening for inhibitors of NADH-fumarate reductase was conducted using about 8,200 samples of cultured broths of fungi, actinomycetes and bacteria. About 2% of the broths inhibited the enzyme. Active components containing in most of the hit samples were hydrophilic. Fumaric acid or small organic compounds or inorganic salts showed the inhibitory activity was suggested. On the other hand, two hydrophobic active compounds were found in the hit samples. One was (4E)-5-(2-methylphenyl)-4-pentenoic acid from a broth of *Streptomyces* sp. This was the first NADH-fumarate reductase inhibitor produced by actinomycetes. Others were pentaene compounds, prugosene A1 and two new analogs isolated from cultured broth of *Penicillium* sp FKI-5329. They showed strong inhibitory activity against NADH-fumarate reductase.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産科学、生物有機化学

キーワード：生物活性物質、寄生虫、感染症、機器分析、精製、ミトコンドリア電子伝達系

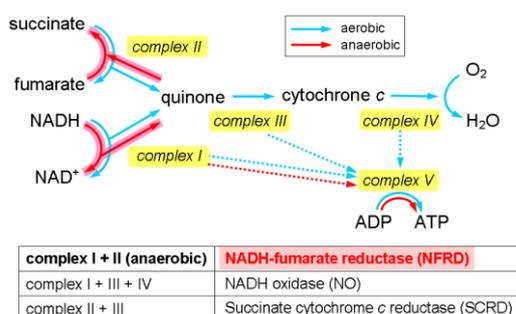
## 1. 研究開始当初の背景

寄生虫症は発展途上国のみならず先進国でも再興感染症として全世界的に深刻な問題となっている。寄生虫症のなかでも特に罹

患者数が多いマラリア、リーシュマニアなどの原虫症に対しては、抗寄生虫化合物の探索やワクチンの開発研究が各国の研究機関で行われている。一方で、多細胞の蠕虫による

寄生虫は年間死者数こそ原虫症に比べて少ないものの、障害により健康が損なわれる期間が長いことが問題であり、原虫症と同じく安全な抗寄生虫薬の開発が求められている。

寄生虫は生活環に基づく生存環境の変化に合わせてエネルギー代謝系を変化させることが知られている。ブタ回虫 (*Ascaris suum*) を用いた研究で、蠕虫は成虫になると嫌気的な宿主内環境に対応し、酸素を用いないエネルギー代謝系を発達させることが明らかにされている (北潔、*実験医学*, 26, 2081-2088, **2008**)。



これをターゲットとすれば宿主に害のない抗蠕虫物質が得られると予想し、我々の研究グループはブタ回虫の嫌気的エネルギー代謝系に特異的な「NADH-フマル酸還元酵素」を阻害する物質を微生物二次代謝産物から探索してきた。その結果、糸状菌代謝産物から nafuredin (Ōmura, S. *et al. PNAS*, 98, 60, **2001**)、paecilaminol (Ui, H. *et al. J. Antibiot.*, 59, 785, **2006**)、verticipyron (Ui, H. *et al. J. Antibiot.*, 59, 591, **2006**) などの新規化合物を見出すことができた。NADH-フマル酸還元酵素は電子伝達系複合体 I および II から成っており、いずれの化合物も回虫の複合体 I を選択的に阻害することがわかった。また nafuredin ではヒツジ捻転胃虫 (*Haemonchus contortus*) を用いた *in vivo* 試験を行い、効果を確認できた。

## 2. 研究の目的

本アッセイ系で抗蠕虫物質を探索し、より強力で有用な物質、特に、好氣的代謝系のものとは逆の反応であるフマル酸からコハク酸の生成反応を触媒する複合体 II を選択的に阻害する物質を発見することを目的とする。

そのために、一般的な土壌由来の糸状菌お

よび放線菌に加え、海洋由来の微生物、植物内生菌、希少放線菌などバラエティー豊かな探索源を用いてスクリーニングを行う。

また、過去に放線菌培養液からは NADH-フマル酸還元酵素選択的な阻害物質が得られていない。放線菌の二次代謝産物からは非常に多くの生理活性物質が単離されていることから、NADH-フマル酸還元酵素阻害物質も発見できると考え、放線菌培養液から活性物質を単離することも目的の一つとした。

## 3. 研究の方法

<スクリーニング>

### 一次スクリーニング

ブタ回虫 (*Ascaris suum*) 体壁筋から調製した粗ミトコンドリア画分を用いて、NADH-フマル酸還元酵素 (NFRD) 活性を測定した。酵素活性は基質 NADH の消費に伴う 340 nm の吸光度の減少を 10 分間経時的に測定し、その減少率より求めた。

放線菌培養液から阻害物質がこれまで見出されなかったのは、放線菌が生産する二次代謝産物量が糸状菌に比べ 1/10 程度と非常に少ないにもかかわらず、一律 10  $\mu$ L/well のサンプル添加量でスクリーニングしていたことが原因だと考えた。そこで、一次スクリーニング時、糸状菌培養液は 10  $\mu$ L/well、放線菌はその倍量の 20  $\mu$ L/well、96 穴プレートにそれぞれ添加して阻害活性を調べた。

ほ乳類の電子伝達系酵素を阻害するものを除外するために、ウシ心筋より調製した粗ミトコンドリア画分を用いて、複合体 I を含む NADH 酸化酵素の阻害活性を測定した。

一次スクリーニング通過基準は、50%以上の NFRD 阻害活性を示し、ウシ心筋の NADH 酸化酵素を阻害しないものとした。

### 二次スクリーニング

3 段階の微生物培養液量 (糸状菌 : 5, 10, 20  $\mu$ L/well、放線菌 : 5, 15, 30  $\mu$ L/well) で阻害活性を調べ、NADH 酸化酵素阻害と比べて NFRD 阻害の IC<sub>50</sub> 値が 3 倍以上強いものを選択した。

<微生物培養液から活性物質の単離>

活性物質が効率よく生産される培地を選んで 0.5~1 L 培養した。培養液を有機溶媒で抽出し各種カラムクロマトグラフィーで精製した。

## 4. 研究成果

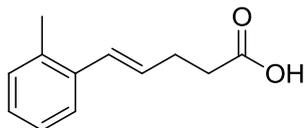
＜スクリーニング結果＞

海洋由来放線菌・糸状菌培養液を約 2,000 サンプル、土壌由来放線菌・糸状菌培養液を約 5,200 サンプル、外部共同研究機関より提供された糸状菌・放線菌培養液約 1,000 サンプルをスクリーニングした。その結果、平均約 2%のサンプルが選択的に NFRD を阻害した。糸状菌は分離源によらず約 2%のヒット率でサンプルを選択できたが、希少放線菌および植物内生菌では二次スクリーニング通過基準を満たすものは見つからなかった。

＜活性物質の単離＞

特に強く酵素を阻害するものから順次、ODS カラムで小スケール分画を行い活性物質の極性を調べたところ、微生物の種や分離源を問わず多くのサンプルで高極性（水溶性）画分に活性が見出された。そのうちのいくつかのサンプルで活性物質の精製を進めたところ、あるサンプルからは酵素の基質であるフマル酸が得られた。フマル酸は過去に本アッセイ系で何度か単離されており、無駄な精製を避ける必要があると考えたため、アッセイ時の数値データと TLC の結果から簡便にフマル酸を検出する方法を構築し、スクリーニングの段階でふるい落とすようにした。他のサンプルではアシライザーを用いた脱塩操作により活性が失われたことから低分子有機化合物または無機塩が阻害活性を示していた可能性が示唆された。このようなサンプルは、小スケール分画して得られた水溶性画分をアシライザーで脱塩後、活性を調べることにより初期段階で除くことができると考えている。

上述の検討を行う一方で、低極性活性物質の精製を進めた。放線菌 *Streptomyces* sp. の培養液から (4E)-5-(2-methylphenyl)-4-pentenoic acid (Mukku, V. J. R. V. *et al.*, *Z. Naturforsch.* 57b, 335, 2002) を単離し、NFRD に対しより選択的な阻害活性があることを確認した (NFRD 阻害活性  $IC_{50} = 0.41 \mu\text{M}$ , NADH 酸化酵素阻害活性  $IC_{50} = 4.6 \mu\text{M}$ 、選択性約 11 倍)。

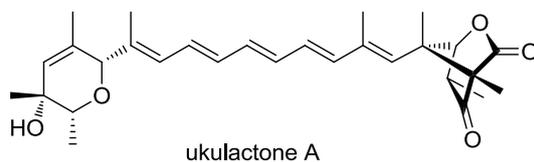


(4E)-5-(2-methylphenyl)-4-pentenoic acid

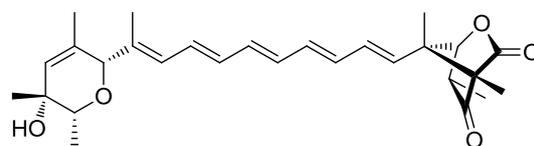
この結果より糸状菌だけでなく、放線菌も

NFRD 選択的な阻害活性物質を生産していることが明らかとなった。

低極性画分に活性が見出された土壌由来糸状菌 *Penicillium* sp. FKI-5329 株の培養液からは各種カラムクロマトグラフィーにより精製を進めた結果、prugosene A1 (Lang, G. *et al.*, *Tetrahedron*, 63, 11844, 2007) とその新規類縁体 2 種を NFRD 選択的な阻害活性物質として見出すことができた。Prugosene A1 は *Penicillium* sp. FKI-3389 株培養液から見出された強力な NFRD 阻害化合物 ukulactone A (Mori, M. *et al.*, *Tetrahedron*, in press) の demethyl 体であった。メチル基の有無にかかわらず、両化合物は同程度の阻害活性 (NFRD 阻害活性  $IC_{50} < 10 \text{ nM}$ ) を示すことがわかった。FKI-5329 株はさらに複数の prugosene 類縁体を生産しており、現在精製を進めている。



ukulactone A



prugosene A1

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, K., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K., Ōmura, S. Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. *Tetrahedron*, (査読有) in press.

〔学会発表〕 (計 3 件)

①大山公成、森美穂子、増間碌郎、高橋洋子、大村智、塩見和朗 微生物が生産する NADH-フマル酸還元酵素阻害物質の探索. 日本農芸化学会 2011 年度大会 (要旨のみ)、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学

②大山公成、森美穂子、増間碌郎、高橋洋子、大村智、塩見和朗 微生物が生産する NADH-フマル酸還元酵素阻害物質の探索. 第 23 回バイオサイエンスフォーラム、2010 年 8 月 5 日、北里大学獣

医学部

③大山公成、森美穂子、増間碌郎、高橋洋子、大村智、塩見和朗 微生物が生産する NADH-フマル酸還元酵素阻害活性物質の探索. 第 4 回蠕虫研究会、2010 年 11 月 27 日、青島サンクマール (宮崎)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

北里生命科学研究所 生物機能研究室 HP

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/labo/BioFuncWeb/Index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 美穂子 (MORI MIHOKO)

北里大学・大学院感染制御科学府・助教

研究者番号: 20425648

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

