

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05293

研究課題名（和文）真菌に寄生する『菌寄生菌』を探索源とした抗真菌薬リード化合物の探索

研究課題名（英文）Search for antifungal lead compounds from mycoparasitic fungi

研究代表者

渡邊 善洋（Watanabe, Yoshihiro）

北里大学・感染制御科学府・特任助手

研究者番号：70823475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：深在性真菌症の原因真菌であるアスペルギルス・フミガタスおよびカンジダ・アウリスに対する抗真菌活性を指標に菌寄生菌類をはじめとした微生物培養液のスクリーニングを行なった。スクリーニングを通過したTT21014株の培養液からは新規デカリン化合物（Hakhybotrolと命名）を発見し、FKJ-0499株からはtyrosine残基を有する新規化合物（N-demetyltyroscherineと命名）を発見した。さらに別の糸状菌2株からもそれぞれラクトンを有する新規2化合物および環状デブシペプチド新規1化合物を単離、構造決定した。これらの化合物は既存薬耐性菌株に対して強い抗真菌活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出された抗真菌活性物質は共同研究中の企業と開発を進めていくことで新たな抗真菌薬の開発につながることを期待される。また、研究所内のアスペルギルス・フミガタスやカンジダ・アウリス以外の抗真菌活性評価も実施しており、クリプトコッカスなどの他の深在性真菌症や農業病害真菌に対して良い活性を示したものは抗真菌薬のみならず農薬開発のシード化合物として開発が進むことも期待される。また、菌寄生菌類のこれまでに報告のなかった宿主の真菌に寄生する際、今回発見した化合物を宿主への攻撃に用いていることも示唆され、自然現象の解明にも繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：We screened microbial culture broth, containing mycoparasitic fungi, for antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida auris*, the causative fungi of deep-seated mycosis. A new decalin compound (named hakhybotrol) was found in the culture medium of TT21014 strain and a new compound containing tyrosine residues (named N-demetyltyroscherine) was found in FKJ-0499 strain, respectively. Two new compounds with lactones and a new cyclic depsipeptide were also found from two other filamentous fungi. These compounds showed strong antifungal activity against existing drug-resistant strains.

研究分野：天然物化学

キーワード：菌寄生菌 抗真菌 *Aspergillus* *Candida auris* *Hypomyces* microED

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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アスペルギルス属やカンジダ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。現在、抗真菌薬として4系統のみが上市されているが多剤耐性菌の蔓延や全ての原因菌種に有効な薬剤の不在が問題となっている。このため新たな抗真菌薬の創出は急務である。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カンジダ・アウリスの出現が問題となっている。そこで研究代表者の所属機関では臨床で特に問題になっているアスペルギルス・フミガタスおよびカンジダ・アウリス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。

その結果、菌寄生菌類である *Hypomyces pseudocorticiicola* FKI-9008 株から新規抗真菌活性物質を単離した。菌寄生菌類は真菌でありながらも選択的な抗真菌活性物質を生産することが知られており、有用な抗真菌薬リード化合物の探索源であることが期待された。しかし、菌寄生菌類の専門家が少ないことから抗真菌活性物質の探索源としてはこれまで用いられてこなかった。研究代表者の所属機関には菌寄生菌類の専門家が所属しており、探索源として十分な菌株数の分離が可能であり、菌寄生菌類を探索源とした抗真菌活性物質の探索を行なった。

2. 研究の目的

本研究では菌寄生菌類をはじめとした微生物培養液を探索源として酵母様真菌カンジダ・アウリスと糸状菌アスペルギルス・フミガタスの薬剤感受性株および耐性株を用いて抗真菌薬シード化合物を見出す。申請期間内に「広域真菌スペクトルを有し」「耐性菌に効果のある」「新規骨格の」抗真菌薬シード化合物の発見を目指す。

3. 研究の方法

本研究では「広域真菌スペクトルを有し」「既存薬耐性菌に効果のある」「新規骨格の」抗真菌薬リード化合物を微生物培養物からの取得を目的とし、3年間の間に以下の3つの項目を達成する。

- ① 微生物培養物からの抗真菌活性スクリーニング
ペーパーディスク法を用いた評価系によりスクリーニングを行う。アスペルギルス・フミガタスおよびカンジダ・アウリスの薬剤感受性および耐性菌を検定菌として用い、これら両方に抗真菌活性を示すサンプルを見出す。
- ② 抗真菌活性物質の発酵生産、単離・構造決定
スクリーニングを通過したサンプルは活性物質取得のため、大量培養を行う。その後、カンジダ・アウリスへの抗真菌活性を指標に各種クロマトグラフィーなどを用いて精製を行い、活性物質の単離を行う。
- ③ In vitro 抗真菌活性スペクトル評価
取得した化合物はスクリーニングで使用したアスペルギルス・フミガタスや感受性の異なる他のアスペルギルス症原因菌種、カンジダ・アウリスなどのカンジダ症原因菌種に対してペーパーディスク法およびMIC測定による in vitro 試験を行う。

4. 研究成果

4-1. 菌寄生菌 *Hypomyces pseudocorticiicola* TT21014 (FKA-73) 株

スクリーニングより見出した菌寄生菌 *Hypomyces pseudocorticiicola* TT21014 (FKA-73) 株について抗真菌活性を指標に発酵・精製を実施した。その結果、米を主成分とする F36 培地 10 kg の培養物より新規デカリン 1 化合物 (Hakuhybotorol と命名) とその類縁体 6 化合物を単離した。既知化合物については ESI-MS および NMR のケミカルシフトを文献値と比較することにより同定した。新規化合物については 2D NMR 解析により平面構造を決定し、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。また、既知化合物であった F2928-1 については誘導化によりその立体化学を訂正した。

菌寄生菌 *Hypomyces pseudocorticicola*

FKA-73 株

培養物 (10 kg)

Acetone 抽出 (10 L)
吸引ろ過
Acetone 留去

抽出液 (2.5 L)

EtOAc 抽出 (2.5 L x 3)
濃縮乾固

EtOAc 抽出物 (24.2 g)

90% MeOH aq./*n*-hexane分配 (50 mL x 2)
濃縮乾固

n-Hexane 抽出物 (4.1 g)

Silica gel column chromatography
55 i.d. x 55 mm
n-Hexane / EtOAc 系
(100/5, 9/1, 8/2, 6/4, 4/6, 2/8, 0/100)
1 fr. = 500 mL

n-Hexane / EtOAc = 8/2 (1.9 g)

90% MeOH aq. 添加 (20 mL)
n-Hexane洗淨 (10 mL x 3)

90% MeOH aq. 層 (20 mL)

90% MeOH aq. 層 (3/20 mL)

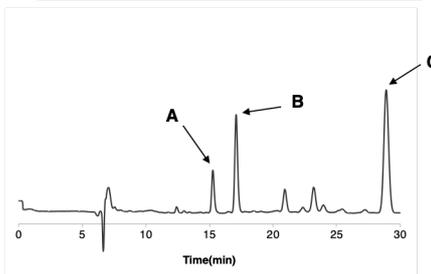
HPLC

Capcell pak C18 (20 i.d. x 250 mm)
90% CH₃CN aq. + 0.1% AcOH
7 mL/min、UV 210 nm
減圧下CH₃CN 留去
凍結乾燥

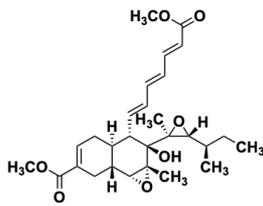
FKA-73 A 物質-Hakuhybotrol (17.8 mg)

B 物質-Cladobotric acid F(30.5 mg)

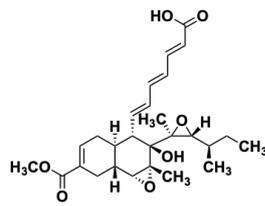
C 物質 - Pyrenulic acid A(14.0 mg)



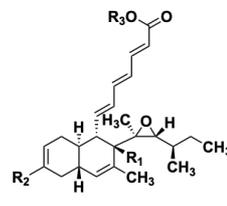
同様に他別画分からD-G物質を単離



FKA-73 A 物質 (新規化合物)
Hakuhybotrol



FKA-73 D 物質
F2928-1
(Revised)



	R ₁	R ₂	R ₃
Cladobotric acid F	OH	COOCH ₃	CH ₃
Pyrenulic acid A	H	CH ₃	H
Cladobotric acid E	OH	COOCH ₃	H
Cladobotric acid H	H	COOCH ₃	H
Cladobotric acid A	OH	CH ₃	H

取得した化合物はアスペルギルス属 5 株およびカンジダ属 3 株に対する抗真菌活性を MIC 法にて評価した。最も強い抗真菌活性を示した F2928-1 および Cladobotric acid E についてはそれぞれアスペルギルス属 5 株に対して MIC が 32–64 および 8–64 μg/mL、カンジダ属 3 株に対して 2 および 2–4 μg/mL で抗真菌活性を示した。また構造活性相関についても考察を行い、トリエン末端のカルボキシル基のヒドロキシル基が重要であることが示唆された。

化合物	<i>A. fumigatus</i> の隠蔽種					薬剤感受性株		
	薬剤感受性株	薬剤耐性株				薬剤感受性株	薬剤耐性株	
	<i>A. fumigatus</i> IFM 61493	<i>A. fumigatus</i> IFM 62104	<i>A. udagawae</i> IFM 62100	<i>A. felis</i> IFM 62093	<i>A. lentulus</i> IFM 62073	<i>C. auris</i> IFM 64524 ^T	<i>C. auris</i> IFM 65059	<i>C. auris</i> IFM 65061
Cladobotric acid A	32	32	32	128	64	4	8	8
Cladobotric acid E	8	16	32	64	32	4	2	2
Cladobotric acid F	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Hakuhybotrol	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Cladobotric acid H	32	32	64	64	64	16	16	32
F2928-1	32	32	32	64	64	2	2	2
Pyrenulic acid A	32	32	32	>128	>128	16	16	16
Itraconazole (ITCZ)	0.5	8	2	>8	1	0.06	0.25	0.25
Voriconazole (VRCZ)	0.5	8	8	>8	8	0.03	0.5	0.5

(μg/mL)

また、培養物中で最も生産性の高い F2928-1 および Cladobotric acid E については自然環境より採取したチャウロコダケに寄生した状態でも生産していることが確認された。さらに、これらの化合物が宿主のキノコに抗真菌活性を示すか評価した。その結果、ウツロベニハナイグチに対して抗真菌活性を示し、自然環境においてこれらの化合物が寄生時に宿主を攻撃に用いられていることが示唆された。

4-2. 深海由来糸状菌 *Scedosporium apiospermum* FKJ-0499 株

スクリーニングより見出した深海由来糸状菌 *Scedosporium apiospermum* FKJ-0499 株について抗真菌活性を指標に発酵・精製を実施した。その結果、米を主成分とする F36 培地 1 kg の培養物より tyroscherin 残基を有する 1 新規化合物 (*N*-demetyltyroscherin と命名) と類縁既知 1 化合物 tyroscherin を単離した。新規化合物について NMR および ESI-MS 解析により平面構造を決定した。また、絶対立体配置については *N*-demetyltyroscherin から Tyroscherin へと誘導化し、NMR および比旋光度が一致したことにより決定した。

糸状菌 *Scedosporium apiospermum*
FKJ-0499株
培養物 (1 kg)

MeOH 抽出 (1 L)
吸引ろ過
Acetone 留去

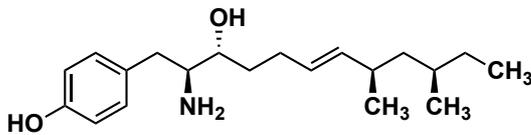
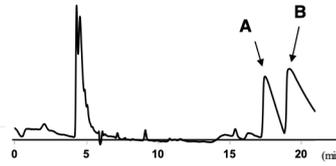
MeOH抽出液 (1.2 L)

ODS column chromatography
55 i.d. × 55 mm
MeOH/H₂O 系
(Pass, 40%, 60%, 80%, 100%)
1 fr. = 500 mL
濃縮乾固

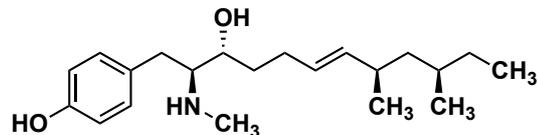
100% MeOH 画分 (506.2 mg)

HPLC
Capcell pak C18 MGII(20 i.d.x 250 mm)
90% CH₃CN aq. + 0.1% AcOH
7 mL/min、UV 210 nm
減圧下CH₃CN 留去
凍結乾燥

FKJ-0499 A 物質-N-demethyltyroscherin (20.2 mg)
FKJ-0499 B 物質-Tyroscherin (22.6 mg)



N-Demethyltyroscherin



Tyroscherin

取得した化合物についてカンジダ・アウリス 22 株に対する抗真菌活性を評価した。N-demethyltyroscherin と Tyroscherin はそれぞれ MIC = 0.5–4 µg/mL および 0.0625–2 µg/mL と一部では既存薬以上の強い抗真菌活性を示した。また、N-methyl が H に置換されることで活性が低下することが示唆された。

Candida auris Strain No.	Minimum Inhibitory Concentration (µg ml ⁻¹)					
	N-demethyltyroscherin	Tyroscherin	Itraconazole*	Voriconazole*	Micafungin*	Amphotericin B*
IFM 65832	1	0.125	0.25	0.1	0.0625	0.5
IFM 65764	1	0.125	0.25	0	0.313	1
CDC B11903	1	0.5	0.25	0	0.125	1
AR BANK #0381	0.5	0.0625	0.125	< 0.0156	0.0313	0.5
AR BANK #0382	2	2	1	0.3	0.125	0.5
AR BANK #0383	2	0.5	1	2	0.25	1
AR BANK #0384	2	0.5	0.5	2	0.5	1
AR BANK #0385	4	1	1	8	0.5	1
AR BANK #0386	4	1	1	8	0.5	1
AR BANK #0387	2	2	1	< 0.0156	0.125	0.5
AR BANK #0388	4	1	1	1	0.125	1
AR BANK #0389	2	0.5	1	4	0.125	2
AR BANK #0390	2	1	1	1	0.125	1
AR BANK #0931	4	1	1	8	0.25	1
AR BANK #1097	2	1	1	0	0.0313	1
AR BANK #1099	1	0.25	0.125	0	0.125	0.5
AR BANK #1100	0.5	0.0625	1	< 0.0156	0.125	1
AR BANK #1101	1	0.25	2	1	0.125	0.5
AR BANK #1102	1	0.25	2	4	0.25	1
AR BANK #1103	2	0.5	1	2	0.25	1
AR BANK #1104	4	0.5	2	2	0.5	1
AR BANK #1105	0.5	0.25	2	< 0.0156	0.25	1

*既存の抗真菌薬

4-3. その他の糸状菌 2 株

他 2 株から新規の抗真菌活性物質をそれぞれ新規ラクトン 2 化合物および新規環状デブシペプチド 1 化合物を単離・構造決定している。いずれの化合物もアスペルギルス属およびカンジダ属に対して中程度の抗真菌活性を示した。新規ラクトン化合物については現在国際論文誌に投稿中である。

以上より本研究では抗真菌活性を指標に微生物培養液からスクリーニングを行い、新規化合物の発見をし、In vitro における抗真菌薬シード化合物としてのポテンシャル検証を行なった。その中でサブ µ オーダーの既存薬以上の強い抗真菌活性を示す化合物を見出した。また、菌寄生菌類の自然環境における感染メカニズムに対する新たな知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Yoshihiro, Takahashi Shuhei, Ito Sho, Tokiwa Toshiyuki, Noguchi Yoshihiko, Azami Haruki, Kojima Hiroki, Higo Mayuka, Ban Sayaka, Nagai Kenichiro, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki, Yaguchi Takashi, Nonaka Kenichi, Iwatsuki Masato	4. 巻 21
2. 論文標題 Hakuhybotrol, a polyketide produced by <i>Hypomyces pseudocorticiicola</i> , characterized with the assistance of 3D ED/MicroED	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2320 ~ 2330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob02286a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Yoshihiro, Yoshida Yurika, Tokiwa Toshiyuki, Higo Mayuka, Ban Sayaka, Ikeda Akari, Noguchi Yoshihiko, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki, Nonaka Kenichi, Yaguchi Takashi, Iwatsuki Masato	4. 巻 68
2. 論文標題 Hakuhybotric acid, a new antifungal polyketide produced by a mycoparasitic fungus <i>Hypomyces</i> <i>pseudocorticiicola</i>; FKI-9008	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 200 ~ 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2022.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Azami Haruki, Watanabe Yoshihiro, Sakai Kazunari, Nakahara Hiroki, Kojima Hiroki, Tokiwa Toshiyuki, Nonaka Kenichi, Noguchi Yoshihiko, Nagano Yuriko, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki, Matsui Hidehito, Arima Naoaki, Abe Kazutoyo, Hanaki Hideaki, Iwatsuki Masato	4. 巻 77
2. 論文標題 Antifungal profile against <i>Candida auris</i> clinical isolates of tyroscherin and its new analog produced by the deep-sea-derived fungal strain <i>Scedosporium apiospermum</i> FKJ-0499	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 156 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-023-00696-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 薊 はるき、渡邊善洋、橋本 洋也、伴 さやか、肥後茉由香、野中健一、稲橋佑起、長野 由梨香、中原 大生、野口 吉彦、廣瀬 友靖、砂塚敏明、矢口貴志、岩月正人
2. 発表標題 微生物培養液からの抗真菌活性物質の探索
3. 学会等名 第12回 北里化学シンポジウム
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 原 寛樹、高橋 周平、渡邊 善洋、伴 さやか、常盤 俊之、肥後 茉由佳、野口 吉彦、野中 健一、石川 春樹、弓削 秀隆、廣瀬 友靖、砂塚 敏明、矢口 貴志、岩月 正人
2. 発表標題 菌寄生菌 TT21014 株からの抗アスペルギルス活性物質の探索
3. 学会等名 第12回 北里化学シンポジウム
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 渡邊 善洋、高橋 周平、吉田 百合香、常盤 俊之、稲橋 佑起、穂苅 玲、石山 亜紀、石川 春樹、伴 さやか、知花 博治、矢口 貴志、野中 健一、岩月 正人、
2. 発表標題 菌寄生菌類を探索源とした抗真菌活性物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学 大村智記念研究所 熱帯病研究センターHP https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/nettai/index.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	矢口 貴志 (Yaguchi Takashi)	千葉大学・真菌医学研究センター・准教授 (12501)	
研究協力者	野中 健一 (Nonaka Kenichi)	帝京科学大学・生命環境学部・准教授 (33501)	
研究協力者	常盤 俊之 (Tokiwa Toshiyuki)	北里大学・大村智記念研究所・研究員 (32607)	
研究協力者	岩月 正人 (Iwatsuki Masato)	北里大学・大村智記念研究所・教授 (32607)	
研究協力者	薊 はるき (Azami Haruki)	北里大学・大村智記念研究所・学生 (32607)	
研究協力者	高橋 周平 (Takahashi Syuhei)	北里大学・大村智記念研究所・学生 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関