

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08342

研究課題名(和文)新規エルゴステロール結合両親媒性化合物の探索

研究課題名(英文)Search for new ergosterol binding amphiphilic compounds

研究代表者

中島 琢自(Nakashima, Takuji)

北里大学・北里生命科学研究所・特任准教授

研究者番号：40526216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：真菌の細胞膜に含まれるエルゴステロールを結合させたシリカゲル(ESシリカ)を新規分離材として開発し、新規物質を探索した。ESシリカと相互作用を示す放線菌培養液に含まれる二次代謝産物をスクリーニングした結果、27化合物が新規物質と推定できた。放線菌2株が生産する新規物質を単離・構造決定した結果、ジピリマイシンBとジエトジアミドCが発見できた。ジピリマイシンBはコア骨格にジピリジン構造を有する化合物であった。ESシリカ非結合物質である類縁体ジピリマイシンAは側鎖にカルボン酸、ジピリマイシンBは側鎖にアミド基が結合した構造的違いがあった。ESシリカに結合するためアミド基が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジピリマイシンの結果からESシリカとの相互作用は化合物内にあるアミド基が重要であることがわかった。また、既知物質同定の結果から検出できた化合物のうち8割が窒素を含む化合物であった。ESシリカは既存樹脂であるODSやシリカと異なる特徴を示した。天然物の精製分野でESシリカを新規樹脂として提案することができた。

ESシリカは新規樹脂(分離剤)として開発でき、共同研究先である富士シリシア化学と特許を共同出願することができた。ESシリカは富士シリシア化学から販売されたことは社会的意義として大きい。

研究成果の概要(英文)：Ergosterol is an essential component for fungal growth. we developed silica-binding ergosterol (ES silica) resin and searched for natural products interacting with ergosterol from actinomycete culture broths. And 24 natural products were deduced as new ones. Dipyrimicins and Dietziamide C, new compounds interacted with ES silica, were discovered from actinomycete culture extracts. Dipyrimicin B possesses a 2,2'-dipyridine core skeleton with amide groups. The amide group in dipyrimicin B could be the primary factor involved in the interaction with ES silica. Dietziamide C is a unique structure that possesses a N,N,N-trimethylpropan-1-aminium at the center of tetramic acid dimer. It was suggested that ES silica interacts with microbial alkaloids.

研究分野：天然物化学

キーワード：放線菌 二次代謝産物 生物活性物質 樹脂(分離剤) エルゴステロール ESシリカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真菌症は白癬、いわゆる水虫に代表される表在性真菌症、皮膚の深部、皮下組織に感染する深部真菌症と体の深部に感染する深在性真菌症に分けられる。特に、深在性真菌症は年々増加傾向にあり、臓器に感染し、診断が遅れた場合には重篤になる感染症である。

真菌の膜成分であるエルゴステロールを標的としたポリエン系抗真菌剤アンホテリシン B (Amph-B) は、その優れた有効性から 50 年以上、深在性真菌症治療薬のゴールドスタンダードとして使用されてきた。放線菌 *Streptomyces nodosus* が生産する AMPH-B は、分子内にヘプタエンが存在し、この疎水領域が病原真菌の細胞膜の成分であるエルゴステロールと結合して細胞膜の透過性を高める。その結果、細胞質成分の漏出を生じさせ、抗真菌作用を発揮する。エルゴステロールは真菌細胞膜に普遍的に存在するので、AMPH-B はほぼすべての病原真菌に対して殺菌的に作用する。AMPH-B は真菌の細胞膜に直接作用することで殺菌作用を示すため、耐性菌が生じにくい。一方、コレステロールとの選択性は完全なものではなく、投与時の発熱や悪寒、低カリウム血症や腎機能障害などの重篤な副作用を有する。さらに、Amph-B は水またはエタノールにほとんど溶けず、腸からの吸収が悪く経口投与できない。

2. 研究の目的

Amph-B の標的分子であるエルゴステロールと結合する天然物を放線菌培養液から探索することを目的とした。エルゴステロール修飾シリカゲル (ES シリカ) を開発し、クロマトグラフィーとして用いることで、エルゴステロールに結合する新規な両親媒性化合物を探索した。

3. 研究の方法

探索源は北里生命科学研究所 微生物機能研究室から放線菌培養液抽出物を提供していただいた。ES シリカは富士シリシア化学 (株) と共同でシリカゲルの表面のシラノールにチオール修飾したチオールシリカを出発原料とし、最終的にチオールを介してエルゴステロールを結合させた。放線菌培養液抽出物を ES シリカに供し、水で洗浄後、メタノールで溶出させ、濃縮後少量のメタノールに再溶解させ、解析用サンプルを調整した。LC/UV-MS 解析により、ES シリカに吸着する化合物の物理化学的性状を収集した。得られた物理化学的性状を天然物データベース (Dictionary of Natural Products) で検索し、新規性が高い化合物を精製・単離し、生物活性を評価した。

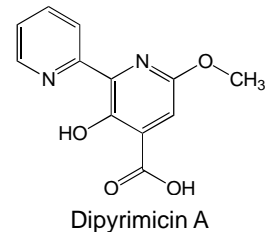
4. 研究成果

放線菌培養液抽出物 859 サンプルを ES シリカで処理し、ES シリカ処理サンプルを LC/UV-MS で解析した。化合物の物理化学的性状のデータをもとにデータベースで検索した結果、104 株から 94 化合物を既知物質と同定した。その結果、ポリエン系化合物は、AMPH-B、ストレベルテン A やフィリピン など 11 化合物が検出された。ES シリカで処理したメタノール溶出液に多くのポリエン系化合物が検出されたことから、ES シリカのエルゴステロール分子を認識していることが示唆された。ポリエン系化合物以外にも様々な構造を有する化合物が同定できた。トリコスタチン類、マレマイシン類、グリセオルテイン酸、サンギバマイシン類やシネファンギンなど窒素を含む複素環式化合物が多く検出され、同定できた既知物質 94 化合物のうち、75 化合物が微生物アルカロイドであった。

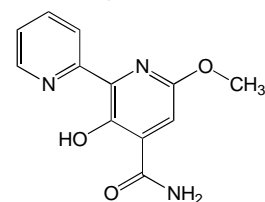
ES シリカを用いたスクリーニングの結果、29 化合物が新規物質と推定された。そのうち、新規性や生産性の再現などを考慮し、放線菌 *Amycolatopsis* sp. K16-0194 および *Streptomyces* sp. K16-0477 が生産する推定新規化合物について精製・構造解析を行った。

K16-0194 株の培養液抽出物にメインな 2 本ピークが観察されたが、ES シリカで処理すると 1 つの化合物のみ ES シリカに結合することがわかった。2 つの化合物は共に UV 極大吸収 240 nm および 320 nm を示し、類縁物質と推定された。各種クロマトグラフィーで精製し、類縁体ジピリマイシン A および目的物質ジピリマイシン B を得た。ジピリマイシン A および B は、水、メタノールおよびエタノールに可溶で両親媒性の性質を示した。ジピリマイシン A および B の NMR 解析の結果、コア構造にピリジンが 2 つ結合したジピリジン骨格を有する新規物質であった。側鎖に違いがあり、ジピリマイシン A はカルボン酸、ジピリマイシン B はアミドを有していた。ジピリマイシン A は抗菌・抗真菌活性を示し、動物細胞株に対して 10 μ M 以下で IC₅₀ 値を示した。一方、ジピリマイシン B は、*Escherichia coli* NIHJ に対して弱い抗菌活性を示し、動物細胞株に対する増殖抑制効果はジピリマイシン A より低下していた。ただし、H1299 細胞に対して同等以上の細胞増殖抑制活性を示した。

Streptomyces sp. K16-0477 の培養液抽出物に含まれていた UV 極大吸収 270 nm および HRESI-MS より m/z 334.1751 を示し、分子組成 C₁₇H₂₃N₃O₄ と推定した化合物が ES シリカに結合した。本物質を精製し、構造解析の結果、テトラミン酸の 2 量体でプロパ-1-エンが結合し、*N,N,N*-トリメチルエチルアミニウムがテトラミン酸 2 量体の中心に結合した構造を有した新規物質であ



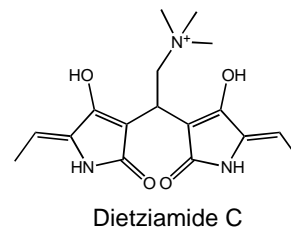
Dipyrimicin A



Dipyrimicin B

った。テトラミン酸のダイマー化合物は、希少放線菌 *Dietzia timorensis* MZ-3 株から発見されたジエトジアミド A および B の報告があり、本物質をジエトジアミド C と命名した。ジエトジアミド C は両親媒性の性質を示した。ジエトジアミド C は抗菌活性および細胞増殖抑制活性は示さなかった。

今後、得られた新規物質はコレステロールとの結合力を測定し、エルゴステロールにより強力に結合する化合物を選択し、合成的手法により抗真菌活性を示す化合物を創薬する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Izuta Shoko, Kosaka Shohei, Kawai Makoto, Miyano Rei, Matsuo Hirotaka, Matsumoto Atsuko, Nonaka Kenichi, Takahashi Y?ko, ?mura Satoshi, Nakashima Takuji	4. 巻 71
2. 論文標題 Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from Amycolatopsis sp. K16-0194	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 535 ~ 537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-018-0028-0	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8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊豆田祥子、高坂尚平、河合真、宮野怜、松尾洋孝、松本厚子、三浦宏美、野中健一、高橋洋子、大村智、中島琢自
2. 発表標題 エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索
3. 学会等名 2018年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島琢自
2. 発表標題 微生物が作り出す宝物の探し方
3. 学会等名 富士シリシア化学株式会社 社内講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島琢自
2. 発表標題 Physicochemical screening による微生物新規物質の探索
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会ランチョンセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島琢自
2. 発表標題 微生物の底力 Potential Power of Microorganisms
3. 学会等名 天野エンザイム株式会社 社内講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島琢自
2. 発表標題 Physicochemical screeningによる新規二次代謝産物の探索
3. 学会等名 第 62 回日本放線菌学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島琢自
2. 発表標題 Search for new microbial metabolites by physicochemical screening using new resin, ES-silica
3. 学会等名 Kitasato Univ. - Mahidol Univ. Joint Symposium, Microbial Natural Products: Discovery of Novel Bioactive Compounds and Biosynthetic Pathways (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊豆田祥子, 宮野怜, 松本厚子, 三浦宏美, 野中健一, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自.
2. 発表標題 エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索
3. 学会等名 日本放線菌学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊豆田祥子、高坂尚平、河合真、宮野怜、松尾洋孝、松本厚子、三浦宏美、野中健一、高橋洋子、大村智、中島琢自
2. 発表標題 エルゴステロール樹脂を用いた新規物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 分 担 者	松本 厚子 (Matsumoto Atsuko) (20300759)	北里大学・感染制御科学府・准教授 (32607)	