

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07106

研究課題名(和文) 微生物培養液ライブラリーからのマラリア治療薬シードの探索

研究課題名(英文) Antimalarial screening for microbial culture broth library

研究代表者

岩月 正人 (Iwatsuki, Masato)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：70353464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗マラリア原虫活性を指標に微生物培養液のスクリーニングを行い、選択した糸状菌3株および放線菌1株について検討を行った。糸状菌FKR-0651株由来の新規環状ペプチド2化合物(Koshidacin類と命名)および糸状菌FKI-9521株由来の新規含窒素化合物2種を発見した。また別の糸状菌1株からは活性物質として2種類のピリドン環を有する新規化合物、放線菌1株からは2種類の新規マクロライド系化合物を単離・構造決定した。これら化合物は多剤耐性マラリア原虫の増殖を強力に阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた創薬シード化合物は熱帯病治療薬の開発に特化した非営利団体Medicines for Malaria Ventureの支援によって国際的な開発研究へと展開していくことでマラリア治療薬の開発に繋がることが期待される。開発されたマラリア治療薬は人的被害を軽減することで開発途上国の保健衛生の向上に繋がり、人類の福祉として国際貢献に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We screened microbial cultured broths for antimalarial activity using Plasmodium falciparum strain, and selected three filamentous fungal and one actinomycete strains. Two new cyclic peptides (named Koshidacins) from FKR-0651 and two new nitrogen-containing compounds from FKI-9521 were discovered. We also isolated and determined new antimalarial compounds containing a pyridone ring from another filamentous fungus and two new macrolide compounds from an actinomycete strain. These compounds strongly inhibited the in vitro growth of multidrug-resistant Plasmodium falciparum strain.

研究分野：天然物化学

キーワード：マラリア 微生物培養液 微生物創薬 新規化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアはマラリア原虫の感染によって引き起される原虫症であり全世界で年間42万人以上の死亡者が発生している。特にアフリカでは経口投与可能な治療薬の供給不足によって5歳以下の幼児が熱帯熱マラリア原虫感染により死亡している。現在は主に植物成分由来のアルテミシニン類を中心とした薬物治療が行われているが薬剤耐性原虫の出現が問題視されている。このため「薬剤耐性原虫にも有効」「安全域が広く」「安価で安定な供給可能」かつ「経口投与が可能」な治療薬の開発が望まれている。しかし国内外の製薬会社はこれらの原虫症治療薬開発の経済的見返りが少ないことから積極的な研究開発を進めていない。そのため日本国内でも治療薬の開発研究は限られた研究機関のみで行われているのが現状である。

研究代表者の所属機関は天然物資源および各種化合物ライブラリーをスクリーニングすることで抗マラリア原虫活性物質(1999年よりWHO/TDRの研究協力機関として)および抗トリパノソーマ原虫活性物質(2005年よりDNDiの研究協力機関として)の探索を行ってきた。その過程で申請者らは天然物資源より抗マラリア原虫および抗トリパノソーマ原虫活性を示す新規化合物8群19成分を発見すると共に、抗原虫活性を示す既知化合物を多数見出してきた。

中でも微生物培養液より申請者らが発見した3種のシード化合物は既存の薬剤とは異なるユニークな骨格を有し、かつ強力な抗マラリア原虫活性を示すことが大きな特徴である。

これらシード化合物について有機合成法による最適化研究を共同研究として進行中であり、より高活性で安全域の広い誘導体の創製にも成功しつつある。一方、創薬研究においては「先行シード化合物の最適化」と並行した「バックアップのためのシード化合物の探索」が非常に重要である。そこで本研究では微生物培養液を用いて新たな骨格・より優れた活性プロファイルを有するマラリア治療薬のシード化合物(バックアップ)を探索した。

2. 研究の目的

本研究では微生物培養液を用いて新たな骨格・より優れた活性プロファイルを有するマラリア治療薬のシード化合物(バックアップ)を探索する。具体的には申請期間内に少なくとも5種の*in vitro*で有効な活性物質の発見を目指す。更に有望な化合物については原虫感染マウスモデルを用いた*in vivo*抗原虫活性評価を行いシード化合物を探索する。目標とするシード化合物は「*in vivo*において30 mg/kg x 4回で治療効果を示す」物質とし、申請期間内に少なくとも2種のシード化合物の発見を目指す。

3. 研究の方法

本研究では抗マラリア原虫活性を指標に微生物培養液のスクリーニングを行い、「薬剤耐性原虫にも有効」「安全域が広く」「安価に供給可能」かつ「経口投与が可能」なマラリア治療薬開発のためのシード化合物(バックアップ)を発見することを目的に、(1) *in vitro*抗原虫活性評価系での微生物培養液のスクリーニング、(2) 活性物質の発酵生産および単離、(3) 活性物質の構造決定、(4) 有望な化合物の大量取得、(5) 原虫感染マウスモデルを用いた*in vivo*抗原虫活性評価を行った。初年度は(1)-(4)を中心に、次年度以降は(1)-(4)を継続しつつ(5)も実施した。

4. 研究成果

4-1. 糸状菌 FKR-0564 株

初年度は開始前のスクリーニングで選択していた *Acremonium* 属糸状菌 FKR-0564 株について抗マラリア原虫活性を指標に発酵・精製を実施した。その結果、培養物 2 kg から新規環状テトラペプチド 2 化合物 (koshidacin A 及び B と命名) を単離した。

Acremonium sp. FKR-0564 株 培養物 (米培地 2.0 kg)

EtOH (1 L)
減圧濾過
減圧下 EtOH 留去

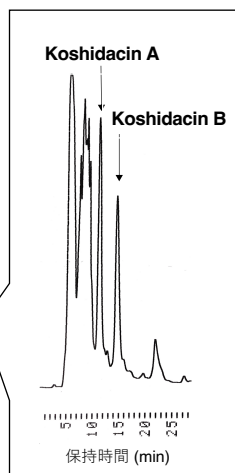
水溶液 (0.5 L)

ODS カラムクロマトグラフィー (50 i.d. x 50 mm)
MeOH/H₂O 系 (各 500 mL)
(Pass, 20%, 30%, 60%, 100%)
減圧下 MeOH 留去

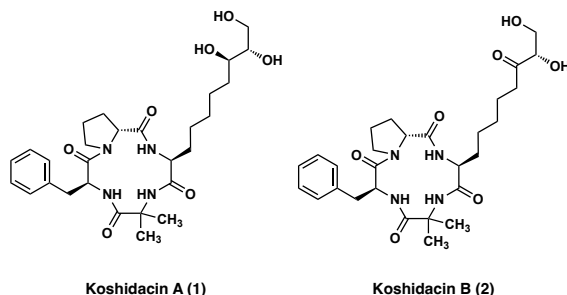
60% MeOH 画分 (539.5/988.8 mg)

HPLC
カラム: Capcell pak (20 i.d. x 250 mm)
移動相: Isocratic 40% CH₃CN/0.1% TFA aq.
流速: 7.0 mL/min
検出: UV 210 nm
減圧下 MeOH 留去後に凍結乾燥

Koshidacin A (1) 29.9 mg
Koshidacin B (2) 17.3 mg



各種機器分析 (NMR、質量分析) および ESI-MS/MS フラグメント解析により平面構造を決定した (下図)。更に完全酸加水分解物の DLA 修飾体を用いた改良 Marfey 法および改良 Mosher 法により絶対立体配置を決定した。



Koshidacin B はサブマイクロオーダーで多剤耐性マラリア原虫の増殖を阻害し、かつヒト正常線維芽細胞に対する細胞毒性は抗マラリア原虫活性と比べて約 16-18 倍低いことが明らかとなった (下表)。

化合物	IC ₅₀ (μM)		
	抗マラリア原虫活性		細胞毒性 (MRC-5細胞)
	K1 株*	FCR3 株**	
Koshidacin A (1)	12.5	17.1	6.8
Koshidacin B (2)	0.8	0.9	14.7
Artemisinin	0.021	0.021	160
Artesunate***	0.010	0.003	37
Chloroquine***	0.577	0.047	58

*chloroquine 耐性株 **chloroquine 感受性株 ***既存薬

更に koshidacin B はネズミマラリア感染マウスモデルにおいて 30 mg/kg、i.p.投与でマラリア原虫の増殖を約 50%抑制した。またマウスに対する目立った毒性症状も確認されず安全性もある程度高いと期待された。

4-2. 糸状菌 FKI-5971 株

実施期間中のスクリーニングで選択した *Fusarium* 属糸状菌 FKI-9521 株について抗マラリア原虫活性を指標に発酵・精製を実施した。その結果、培養物 15 kg から新規環状テトラペプチド 2 化合物 (Deacetyl fusarochromene 及び 4'-O-Acetyl fusarochromanone と命名) 及び既知類縁 3 化合物を単離した。

Fusarium sp. FKI-9521 株

培養物 (米培地 15 kg)

アセトン (15 L)
減圧濾過
減圧下アセトン 留去

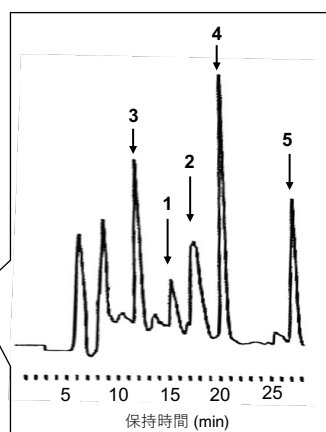
水溶液 (3.5 L)

ODS カラムクロマトグラフィー (50 i.d. x 50 mm)
MeOH/H₂O 系 (各 1 L)
(Pass, 60%, 100%)
減圧下濃縮乾固

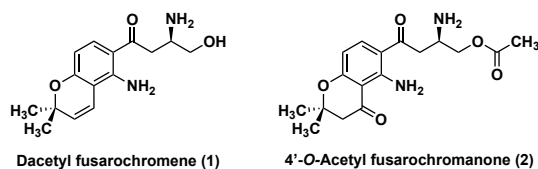
60% MeOH 画分 (240 mg/2.6 g)

HPLC
カラム: Capcell pak (20 i.d. x 250 mm)
移動相: 30% CH₃CN/0.1% TFA aq.
流速: 7.0 mL/min
検出: UV 210 nm
減圧下 CH₃CN 留去後に凍結乾燥

Deacetyl fusarochromene (1)	13.1 mg
4'-O-Acetyl fusarochromanone (2)	17.7 mg
Fusarochromanone (3)	12.5 mg
3'-N-Acetyl fusarochromanone (4)	18.5 mg
Fusarochromene (5)	17.8 mg



各種機器分析 (NMR、質量分析) および ESI-MS/MS フラグメント解析により平面構造を決定した (右図)。更に改良 Marfey 法および改良 Mosher 法により絶対立体配置を決定した。



両化合物はサブマイクロオーダーで多剤耐性マラリア原虫の増殖を阻害し、かつヒト正常線維芽細胞に対する細胞毒性は抗マラリア原虫活性と比べて約 16-18 倍低いことが明らかとなった(下表)。残念ながら、いずれの化合物もネズミマラリア感染マウスモデルにおいて 30 mg/kg、i.p.投与で治療効果は確認されなかった。

化合物	IC ₅₀ (μM)		
	抗マラリア原虫活性		細胞毒性 (MRC-5細胞)
	K1 株*	FCR3 株**	
Deacetyl fusarochromene (1)	0.69	0.54	2.25
4'-O-Acetyl fusarochromanone (2)	0.17	0.13	24.82
Fusarochromanone (3)	0.15	0.08	0.45
3'-N-Acetyl fusarochromanone (4)	1.68	0.90	42.49
Fusarochromene (5)	6.35	Not tested	55.47
Artemisinin***	0.021	0.021	160
Artesunate***	0.010	0.003	37
Chloroquine***	0.577	0.047	58

*chloroquine 耐性株 **chloroquine 感受性株 ***既存薬

4-3. 糸状菌 A 株および放線菌 B 株

実施期間中のスクリーニングで選択した糸状菌 1 株 (以下、A 株) についても抗マラリア活性物質の発酵・精製を行った。その結果、活性物質として 2 種類のピリドン環を有する新規化合物を単離・構造決定した。また放線菌 1 株 (以下、B 株) からは活性物質として 2 種類の新規マクロライド系化合物を単離・構造決定した。これら化合物はいずれも *in vitro* で多剤耐性マラリア原虫の増殖を強力に阻害した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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, Arakawa Emi, Kondo Naozumi, Nonaka Kenichi, Ikeda Akari, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki, Hokari Rei, Ishiyama Aki, Iwatsuki Masato	4. 巻 76
2. 論文標題 New antimalarial fusarochromanone analogs produced by the fungal strain <i>Fusarium</i> sp. FKI-9521	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-023-00617-y	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, Hachiya Kodai, Ikeda Akari, Nonaka Kenichi, Higo Mayuka, Muramatsu Reiko, Noguchi Chikako, Honsho Masako, Asami Yukihiko, Inahashi Yuki, Hirose Tomoyasu, Matsui Hidehito, Sunazuka Toshiaki, Hanaki Hideaki, Ishii Takahiro, Teruya Toshiaki, Hokari Rei, Ishiyama Aki, Iwatsuki Masato	4. 巻 85
2. 論文標題 Koshidacins A and B, Antiplasmodial Cyclic Tetrapeptides from the Okinawan Fungus <i>Pochonia boninensis</i> FKR-0564	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2641 ~ 2649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.2c00719	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村奏一朗、渡邊善洋、小池季菜、穂苅玲、石山亜紀、浅見行弘、野中健一、稲橋佑起、木村透、照屋俊明、石井貴広、岩月正人
2. 発表標題 微生物二次代謝産物からの抗マラリア原虫活性物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 渡邊善洋、蜂谷広大、池田朱里、穂苅玲、石山亜紀、野口千夏子、村松玲子、戸澤美帆、肥後菜由佳、野中健一、照屋俊明、石井貴広、廣瀬友靖、砂塚敏明、岩月正人
2. 発表標題 微生物代謝産物からのマラリア原虫増殖阻害活性物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年大会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 木村奏一朗、渡邊善洋、稲橋佑起、野中健一、穂苅玲、石山亜紀、岩月正人
2. 発表標題 微生物二次代謝産物からのマラリア治療薬シードの探索
3. 学会等名 第35回北里バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 木村奏一朗、渡邊善洋、稲橋佑起、野中健一、穂苅玲、石山亜紀、岩月正人
2. 発表標題 微生物二次代謝産物からのマラリア治療薬シードの探索
3. 学会等名 第63回日本熱帯医学会大会・第26回日本渡航医学会学術集会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 木村奏一朗、渡邊善洋、穂苅玲、石山亜紀、野中健一、稲橋佑起、岩月正人
2. 発表標題 微生物培養液からの抗マラリア原虫活性物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 渡邊善洋、荒川絵美、近藤直純、野中健一、池田朱里、廣瀬友靖、砂塚敏明、穂苅玲、石山亜紀、岩月正人
2. 発表標題 微生物代謝産物からの抗マラリア原虫活性物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 木村奏一朗、渡邊善洋、稲橋佑起、野中健一、穂苅玲、石山亜紀、岩月正人
2. 発表標題 微生物培養液からの抗マalaria原虫活性物質の探索
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

〔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
研究協力者	渡邊善洋 (Watanabe Yoshihiro)		
研究協力者	木村奏一朗 (Kimura So-ichiro)		
研究協力者	石山亜紀 (Ihisyama Aki)		
研究協力者	穂苅玲 (Hokari Rei)		
研究協力者	稲橋佑起 (Inahashi Yuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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	野中健一 (Nonaka Kenichi)		
研究協力者	廣瀬友靖 (Hirose Tomoyasu)		

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