

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590017

研究課題名(和文) 深在性真菌症の克服を目指した菌類由来の新規抗真菌剤の開発

研究課題名(英文) Development of new antifungal drugs isolated from fungal sources in order to overcome of deep-seated mycosis

研究代表者

河合 賢一 (KAWAI KENICHI)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30061295

研究成果の概要(和文)： 深在性真菌症の患者は近年増加傾向にあり、新しい真菌薬の開発が期待されている。我々は新たに分離された真菌(かび、きのこ)に着目し、これらの米培養エキスについて病原真菌に対する抗真菌活性を検索し、抗菌活性が認められたエキスを各種クロマトグラフィーで分離・精製し、新規化合物およそ20種を単離・構造決定した。今後これらの抗真菌剤としての可能性を検討していく。

研究成果の概要(英文)： The new antifungal drugs will be expected, in consideration of the recent slightly increasing of the deep-seated mycoses. The extracts of newly isolated fungal strains, which had the antifungal activities, were purified by various chromatography and then about 20 new compounds were isolated and determined their structures. The possibility of the antifungal drugs for the above compounds will be tested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,030,000	4,630,000

研究分野：天然物化学・有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学(6801)

キーワード：抗真菌剤、深在性真菌症、新規分離真菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 真菌症、特に深在性真菌症の患者は近年増加傾向にあり、また、コクシジオイデス症等外国由来の重篤な真菌症も、その発生数は少ないが海外滞在者を中心に増加しつつある。近年ミカファンギン等新たな作用機序をもつ新規抗真菌薬が開発されてきているが、今でもなおさらなる新しい抗真菌薬の開発が期待されている。

(2) 真菌類(かび、きのこ)はその種類も多く、植物に比べると成分検索が実施されている菌種は現在でも限られており、新種の真菌を中心とした成分検索への期待がもたれて

いる。

(3) 菌株を医薬品資源の宝庫と考えて、そこから新しい抗真菌薬あるいはそのリード化合物を発見することは新たな抗真菌剤の開発のためにも有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 菌類から、医薬品、特に抗真菌剤として有用な生物活性を有し、かつ、特異な構造を持つ新規化合物を主に医薬品の開発を目的として、成分未知の菌類および新規分離株を中心として各種子囊菌・不完全菌の培養を行い、得られた各エキスについて主に深在性真

菌症の原因菌である病原酵母 *Candida albicans* (カンジダ症等)、*Cryptococcus neoformans* (クリプトコッカス症) および糸状菌 *Aspergillus fumigatus* (フミガツス症等)、*Aspergillus niger* に対する抗真菌活性試験を指標として分離・精製を繰り返し、新規化合物を単離し、その構造を決定することを目指す。

(2) ここで得られた新規化合物を中心にすべての代謝産物について、急性毒性の有無を明らかにした後、さらに、これらの新規化合物の医薬品あるいはそのリード化合物としての可能性を検討し、将来的に抗真菌剤としてのリードを作成することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 新たに土壌等から分離された新種を含む真菌 (主にカビ) の菌株の米培養エキスについて上記4菌の病原真菌を用いて抗真菌活性の有無を検索する。

(2) 上記抗真菌活性試験で、いずれかの真菌に対して抗真菌活性が認められた米培養菌株エキスを大量に培養し、各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製を繰り返し、菌株の成分としての既知化合物および新規化合物を単離する。

(3) 得られた新規化合物については、核磁気共鳴スペクトルをはじめとする種々のスペクトルデータの詳細な解析、化学反応および単結晶X線解析法を併用してそれらの化学構造を明らかにする。

(4) 前述の新規化合物等について細胞毒性の有無を含めて抗真菌活性を検討するとともに、抗菌活性と化学構造との関連性を見極め、医薬品としての有用性あるいは医薬品のリード化合物としての可能性の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 新たに土壌等から分離された真菌367菌株の米培養エキスについて、病原酵母

Candida albicans (カンジダ症等の原因菌)、*Cryptococcus neoformans* (クリプトコッカス症の原因菌) および病原糸状菌

Aspergillus fumigatus (フミガツス症等の原因菌)、*Aspergillus niger* に対する抗真菌活性試験を指標に検索したところ、285菌株 (69%) にいずれかの比較的強い抗真菌活性が認められた。

(2) 前述の抗真菌活性を示したエキスのうち、抗真菌パターンや薄層クロマトグラフィー (TLC)、高速液体クロマトグラフィー

(HPLC) の分析結果を参考にして、合計して、約30菌株の活性エキスを選び出し、米培地等で大量に培養し、有機溶媒により抽出を行い、今後成分検索を行うためのエキスとして供することとした。

(3) 前述のエキスについて、抗真菌活性を指

標にしながら、TLC、HPLCおよびLC-MS等の各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製を繰り返し、既知の化合物とともに新規化合物を単離した。

(4) ここに得られた化合物は、NMRスペクトルをはじめとする各種機器データ及び化学反応を用いてそれらの構造を決定した。構造決定の過程では単結晶X線結晶解析を用いたものもあった。以下に成分検索を行ったそれぞれのカビについての結果を示す。

(5) *Penicillium janthinellum* IFM55557 株から paxilline とともにその類縁体である新規 indoloditerpen 誘導体 penijanthine A が得られ、各種機器データの解析によりその絶対構造を決定した。

(6) *Penicillium* sp. SUM3354 株からは既知 diterpene 誘導体 agathic acid とともに、新規化合物 hexahydro-2-hydroxy-1-phenyl-1*H*-pyrrolizin-3-one を単離・構造決定した。

(7) *Malbranchea filamentosa* IFM41300 株からは既に菌類としては珍しい新規トリテルペン配糖体 malbrancheoside A-D および新規フラノン配糖体 malfilamentoside A, B を単離・構造決定しているが、今回、2種の新規セスキテルペン誘導体 malfilanol A および B を単離し、NMR スペクトルをはじめとする各種機器データの解析からこれらの相対構造を決定した。今回得られた新規トリテルペン配糖体 malbrancheoside A-D は菌類としては比較的珍しい新規骨格を有するトリテルペン配糖体、すなわち、サポニンである。また、その構成糖としては新規フラノン配糖体 malfilamentoside A, B も含めて多くが6位がメチル化されたグルコースであり、あまり例を見ないものである。

(8) *Malbranchea gypsea* IFM41302 株の米培養エキスから新規 isochromanone 誘導体1種および新規 resorcinol 配糖体1種を単離し、各種機器データの会席からそれらの構造を決定した。

(9) *Aspergillus novofumigatus* は最近 *Aspergillus fumigatus* から分かれて新種として登録された種である。同菌 CBS117520 株の成分検索を行った結果、既知化合物 epi-azolenalin A, C とともに、新規 diketopiperazine 誘導体 novoamauromine, ent-cycloechinulin および asnovozine A, B を単離し、これらの絶対構造を各種機器データの解析および化学反応により決定した。近縁種 *Aspergillus fumigatus* からは上記前2化合物のエピマーである amauromine と cycloechinulin が既に単離されていることは分類を考えると興味深いことである。さらに、本菌株からは新規 cyclic peptide 誘導体 novofumigatamide A, B, asnovamide, 新規 benzodiazepine 誘導体 asnovolenin A, B, 新規 quinazolinobenzodiazepine 誘導体

novobenzomalvin A-C および新規 merroterpenoid 誘導体 asnovolin A-G が単離され、それらの構造を各種スペクトルデータの詳細な解析と化学反応から決定した。特に、新規 quinazolinobenzodiazepine 誘導体 novobenzomalvin B の絶対構造について、単結晶 X線解析によって決定できたことは興味深い。

(10) *Aspergillus nishimurae* IFM858441 株の米培養エキスを分離・精製して、新規黄色色素 anishidiol を単離し、その構造を機器データの解析から 6,8-dihydroxy-3,7-dimethyl-1*H*-isocromene-5-carbaldehyde と決定した。

(11) *Aspergillus* 属菌 As15 株から既知 xanthone dimer 誘導体 neosartorin、既知 tripeptide 誘導体 novofumigatamide とともに新規化合物を単離し、現在その構造を検討している。

(12) *Emericella* 属菌 IFM57991 株から既知化合物 dustanin, sorbicilin, aspergillodiol, xylarinol A とともに新規 isobenzofuran 誘導体 6 種 emefuran A, B₁, B₂, C₁, C₂, D および新規 isobenzofuranon 誘導体 3 種 emefuranone A₁, A₂, B を単離し、それらの絶対構造を NMR スペクトルはじめ各種機器データの詳細な解析と一部化学反応を含めて決定した。

(13) *Neosartorya* 属菌の新種 A159 株から既知化合物 cytochalasin B および aszonalenin とともに、新規 diterpene 誘導体 2 種、新規 benzodiazepin 誘導体 1 種および新規 merroterpenoid 誘導体 2 種を単離し、それぞれの構造を各種機器データの詳細な解析から決定した。

(14) *Chaetomium* 属菌 IFM57356 株からメラニン色素合成抑制作用を有するウワウルシの成分である albutin に類似したフェノール配糖体数種を単離し、それらの構造を各種機器データの解析から決定した。なお、そのうちの 1 種の絶対構造は単結晶 X線解析によって決定した。

(15) *Beauveria bassiana* IFM59745 株から既知化合物 β -sitosterol β -D-glucoside とともに 3 種のフェノール配糖体を単離し、それらの構造を NMR スペクトル等の解析により決定した。3 種のうちの 2 種はグルコースの 4 位がメチル化された比較的めずらしい構造である。

(16) *Aspergillus* sp. A193 株からは既知 azaphilone 誘導体 monochaetin および 4-hydroxybenzaldehyde, 4-methylbenzyl alcohol とともに、新規 isochromene 誘導体 1 種を単離し、各種機器データの解析からその構造を決定した。

(17) *Aspergillus ochraceus* 1759-1 株からは既知化合物 *p*-hydroxybenzaldehyde ととも

に、新規化合物 1 種を単離し、各種機器データの解析から本化合物を 4-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl)phenylacetic acid と決定した。

(18) *Aspergillus fravipes* No.43 株から既知化合物 6-hydroxymellein, penisimplicissin, vermistatin とともに、新規化合物を単離し、各種機器データの解析からその構造を決定した。

(19) 同じく未同定菌 21KI604 株から既知化合物 mevalonolactone, mullein, *p*-hydroxybenzylalcohol とともに、新規誘導体 3 種を単離し、聞きデータの解析からそれらの化学構造を決定した。

(20) *Aspergillus* sp. A192 株からは現在のところ、既知化合物 3 種 (*R*)-mevalonolactone, pseurotin A および fumitremorgin B を単離し、*Aspergillus* sp. A251 株からは既知化合物 terrein, dihydroterrein とトリテルペン様化合物 helvolic acid を単離している。

Aspergillus fumigatus No.77 株から既知化合物 pseurotin A および fumitremorgin B を単離している。*Aspergillus fumigatus* から既知 xanthone dimer 誘導体 neosartorin を単離している。また、未同定菌 RORA158 株から既知化合物 mevalonolactone と *p*-hydroxybenzaldehyde を単離した。

(21) *Malbranchea filamentosa* IFM41300 株から得られた新規セスキテルペン誘導体 malfilanol A および B はクリプトコッカス症の原因菌である *Cryptococcus neoformans* に対してのみ特異的に抗真菌活性が観測されたことは教務深いことである。さらに、*Aspergillus novofumigatus* CBS117520 株から得られた新規 diketopiperazine 誘導体 novoamauromine および *ent*-cycloechinulin は被検菌 4 種すべてに対して弱い抗真菌活性を示し、*Aspergillus nishimurae* IFM858441 株から得られた新規黄色色素 anishidiol は被検菌 4 種すべてに対して抗真菌活性を示したが、特に anishidiol は *Candida albicans* に対して強い抗真菌活性を示したことは注目に値する。*Emericella* 属菌 IFM57991 株から得られた新規 isobenzofuran 誘導体 emefuran A, B₁, B₂, C₁ には抗真菌活性は認められなかったが、グラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* に対して弱い抗菌活性が見られた。

(21) 今回得られた既知化合物および新規化合物について、今後さらに細胞毒性試験を併用しながら、抗真菌試験を精査し、抗真菌薬あるいはリード化合物としての可能性を追求していくつもりである。また、細胞毒性、メラニン色素合成阻害をはじめとする各種生物活性についても検討していく予定である。

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 5 件)

① Tomoo Hosoe, Nobuaki Mori, Kumi Kamano, Takeshi Itabashi, Kayoko Takizawa, Takashi Yaguchi, Ken-ichi Kawai, A new antifungal yellow pigment from *Aspergillus nishimurae*, *J. Antibiotics*, 査読有、**64** (2), 211-212 (2011)

② Kazuki Ishikawa, Tomoo Hosoe, Takeshi Itabashi, Kayoko Takizawa, Takashi Yaguchi, Ken-ichi Kawai, Novofumigatamide, new cyclic tripeptide from *Aspergillus novofumigatus*, *Heterocycles*, 査読有、**81** (9), 2143-2148 (2010)

③ Kazuki Ishikawa, Tomoo Hosoe, Takeshi Itabashi, Daigo Wakana, Kayoko Takizawa, Takashi Yaguchi, Ken-ichi Kawai, Novoamauromine and *ent*-cycloechinulin: Two new diketopiperazine derivatives from *Aspergillus novofumigatus*, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有、**58** (5), 717-719 (2010)

④ Daigo Wakana, Tomoo Hosoe, Hiroshi Wachi, Takeshi Itabashi, Kazutaka Fukushima, Takashi Yaguchi, and Ken-ichi Kawai, The cytotoxic and antifungal activity of two new sesquiterpenes, malfilanol A and B, derived from *Malbranchea filamentosa*, *J. Antibiotics*, 査読有、**62** (4), 217-219 (2009)

⑤ Takeshi Itabashi, Tomoo Hosoe, Daigo Wakana, Kazutaka Fukushima, Kayoko Takizawa, Takashi Yaguchi, Kaoru Okada, Galba Maria de Campos Takaki, Ken-ichi Kawai, A new indoloditerpene derivative, penijanthe A, from *Penicillium janthinellum*, *J. Natural Med.*, 査読有、**63** (1), 96-99 (2009)

[学会発表] (計 13 件)

① 石川和樹、板橋武史、細江智夫、滝澤香代子、矢口貴志、福島和貴、河合賢一、*Aspergillus novofumigatus* CBS117520 から単離された新規環状テトラペプチドおよびメロテルペノイド 日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡

② 板橋武史、細江智夫、滝澤香代子、矢口貴志、河合賢一、*Neosartorya* sp. A159株の産生する新規meroterpeneおよびbenzodiazepine誘導体、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡

③ 齊藤哲也、板橋武史、細江智夫、滝澤香代子、矢口貴志、福島和貴、河合賢一、

Emericella sp. IFM57991より得られた新規farnesylisobenzofuran誘導体、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡

④ 森本重輝、齊藤哲也、石川和樹、板橋武史、細江智夫、滝澤香代子、矢口貴志、河合賢一、*Beauveria bassiana* IFM59745株の成分検索、日本薬学会第131年会、2011年3月31日、静岡

⑤ 齊藤哲也、板橋武史、細江智夫、河合賢一、滝澤香代子、矢口貴志、福島和貴、*Emericella* sp. IFM57991より得られた新規isobenzofuranおよびisobenzofuranone誘導体 第2号、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山

⑥ 石川和樹、細江智夫、板橋武史、河合賢一、滝澤香代子、矢口貴志、福島和貴、*Aspergillus novofumigatus*から単離された新規メロテルペノイド、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山

⑦ 石川和樹、板橋武史、細江智夫、河合賢一、滝澤香代子、矢口貴志、福島和貴、若菜大悟、合田幸広、*Aspergillus novofumigatus*より得られる新規環状ペプチド及びベンゾジアゼピン誘導体の構造、日本生薬学会第56回年会、2009年10月3日、京都

⑧ 齊藤哲也、板橋武史、細江智夫、河合賢一、滝澤香代子、矢口貴志、福島和貴、*Emericella* sp. IFM57991 より得られた新規 isobenzofuran および isobenzofuranone 誘導体日本生薬学会第56回年会、2009年10月3日、京都

⑧ 石川和樹、若菜大悟、板橋武史、細江智夫、滝澤香代子、矢口貴志、河合賢一、*Aspergillus novofumigatus*の産生する新規diketopiperazineおよびditerpene誘導体日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都

⑨ 板橋武史、細江智夫、滝澤香代子、矢口貴志、河合賢一、*Neosartorya* sp. A159株の産生するジケトピペラジン化合物の立体化学、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都

⑩ 二宮早也夏、細江智夫、板橋武史、河合賢一、野中里紗、輪千浩史、瀬山義幸、矢口貴志、滝澤香代子、福島和貴、Zebrafishに対する色素形成抑制作用を指標とした真菌由来“美白効果”物質の探索、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、京都

⑪ 笠原宏之、細江智夫、板橋武史、河合賢一、滝澤香代子、福島和貴、*Malbranchea gypsea* の成分検索日本生薬学会第55回年会、2008年9月20日、長崎

⑫ 板橋武史、細江智夫、河合賢一、矢口貴志、*Neosartorya* 属菌の“新種”とプロフェイルされたA159菌株の成分研究、日本生薬学会第55回年会、2008年9月19日、長崎

⑬ 若菜大悟、細江智夫、板橋武史、矢口貴志、滝澤香代子、福島和貴、河合賢一、

Malbranchea filamentosa から得られる新規セスキテルペンの構造、日本生薬学会第55回年会、2008年9月19日、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 賢一 (KAWAI KENICHI)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30061295

(2) 研究分担者

細江 智夫 (HOSOE TOMOO)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10287849

板橋 武史 (ITABASHI TAESHI)

星薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20350225

(3) 連携研究者

なし