

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860082

研究課題名(和文) 微生物培養液からの抗マラリア原虫活性物質の探索

研究課題名(英文) Search for antimalarial agents from microbial sources

研究代表者

岩月 正人 (Masato, Iwatsuki)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：70353464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアはマラリア原虫に引き起こされる原虫感染症であり全世界で年間80万人以上の死亡者が発生している。このため「薬剤耐性原虫にも有効」「安全域が広く」「安価に供給可能」かつ「幼児への経口投与が可能」なマラリア治療薬の開発が望まれている。そこで本研究ではマラリア治療薬シードを発見することを目的に微生物培養液から「抗マラリア原虫活性」および「マラリア解毒酵素PfGL01阻害活性」を指標に活性物質を探索した。その結果、抗マラリア原虫活性物質として既知2化合物を同定し、新規と推定される1化合物を取得した。またPfGL01阻害活性物質として既知1化合物を同定し、新規と推定される1化合物を取得した。

研究成果の概要(英文)：Malaria is the one of most devastating infectious diseases caused by Plasmodium parasite. It is urgently necessary to develop new drugs, which should be effective to drug-resistant strains, be safer, be cheaper, and be used orally. In order to discover seed compounds for new antimalarial drugs, we conducted the screening of active compounds, guided by antimalarial activity as well as inhibitory activity of glyoxalase I (PfGL01). As a result, we identified 2 known compounds and 1 possibly new compounds as antimalarial agents from 3 fungal cultured broths. We identified 1 known compounds and 1 possibly new compounds as PfGL01 inhibitors from 2 fungal cultured broths.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗マラリア原虫活性 抗生物質

1. 研究開始当初の背景

<マラリアの現状>

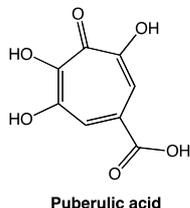
マラリアはマラリア原虫によって引き起される原虫症であり全世界で年間 80 万人以上の死亡者が発生している。主な治療薬として化学合成品であるクロロキンおよび植物成分であるアルテミシニンが用いられているが耐性原虫の出現および副作用が問題視されている。またアフリカでは経口投与可能な治療薬の供給不足のため 5 歳以下の幼児の主な死亡原因が熱帯熱マラリア原虫感染となっている。このため、「薬剤耐性原虫にも有効」で「安全域が広く」「安価に供給可能」かつ「幼児への経口投与が可能」なマラリア治療薬の開発が望まれている。しかし国内外の製薬会社はマラリア治療薬開発の経済的見返りが少ないことから積極的な研究開発を進めていない。そのため国内でもマラリア治療薬の開発研究は限られた研究機関でのみで行っているのが現状である。

<これまでの研究成果>

申請者の所属機関では 1999 年より WHO/TDR の研究協力機関として天然物資源ライブラリおよび各種化合物ライブラリをスクリーニングすることで新規なマラリア治療薬の探索を行ってきた。用いている *in vitro* 抗原虫活性評価系においては下記のような活性物質を選択可能である。

- ・ 薬剤耐性原虫にも効果がある。
- ・ ヒト細胞に対して毒性を示さない。
- ・ 赤血球内の原虫に効果がある。

2012 年までに 75,000 種以上の天然物資源および合成化合物をスクリーニングした結果、申請者は糸状菌 *Penicillium viticola* FKI-4410 株の生産する puberulic acid が強力な抗マラリア活性を示すことを見出した (下図, *J. Antibiot.*, **64**, 183 (2011))。本物質は *in vitro* (IC₅₀ 0.01 μg/mL) だけでなく、*in vivo* においても抗マラリア活性を示した (皮下投与 2 mg/kg x 4 で 69% 増殖阻害)。そのため既に共同研究先で全合成研究が着手されている (2014 年度に全合成を達成。「研究成果」を参照)。また構築された全合成ルートを利用した *in vivo* でより広い安全域 (ED₅₀/LD₅₀) を有する誘導体の創製を目指した合成研究も進行中である。



一方、トロポン骨格を有する複数の化合物は解毒酵素の一種 glyoxalase I を阻害活性およびマラリア原虫の増殖抑制活性を有することが報告されている (*Biochim. Biophys. Acta*, **1208**, 127 (1994))。このことから puberulic acid についても glyoxalase I を作用機序の候補と推定していた。

2. 研究の目的

抗マラリア原虫活性およびマラリア解毒酵素 glyoxalase I (以下 PfGLOI) 阻害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」で「安全域が広く」「安価に供給可能」かつ「幼児への経口投与が可能」なマラリア治療薬開発のためのリード化合物を発見する。並行して強力な抗マラリア活性を有する糸状菌代謝産物 puberulic acid の作用機序を明らかにする。

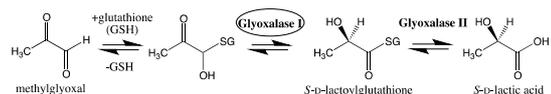
具体的には以下の 3 つの研究を実施した。

in vitro で有効な抗マラリア原虫活性物質の発見

酵素阻害剤の探索と並行して従来から行っているマラリア原虫を用いたスクリーニングも継続する。目標とする抗マラリア原虫活性物質は「薬剤耐性原虫にも有効」かつ「ヒト細胞に毒性を示さない」物質とし、申請期間内に少なくとも 5 種の活性物質の発見を目指す。スクリーニング源に微生物培養液を用い、既に確立済みの *in vitro* 評価系で抗マラリア原虫活性物質のスクリーニングを行い、選択された微生物培養液より活性物質の精製および構造決定を順次行う。

PfGLOI 活性評価系による puberulic acid 誘導体の評価および新たな阻害剤の発見

マラリア原虫の解毒酵素の一種 glyoxalase I は、細胞内で発生する毒性物質 methylglyoxal を glutathione を用いて S-D-lactoylglutathione に変換する酵素である (下図)。



本酵素は原虫ではモノマーであるのに対して哺乳類ではダイマーであり種選択性が期待される。これまでに glyoxalase I 阻害剤である tropolone 系化合物および基質ミミックな化合物がマラリアを始めとした原虫の増殖を抑制することが報告されている (*Biochim Biophys Acta*, **1208**, 127-136 (1994))。しかし既存の阻害剤は活性が不十分であり実用化に至っていない。また本酵素を用いたスクリーニングは報告例の少なく検討の余地が多く残されている。そこで本研究では既知の組み替え大腸菌による発現系 (*FEBS Letters*, **554**, 284-288 (2003)) を参考に構築済みの評価系を用いて puberulic acid およびその合成誘導体について glyoxalase I 阻害活性評価を進めるとともに、微生物資源をスクリーニングすることで新たなマラリア glyoxalase I (PfGLOI) 阻害剤の発見を目指す。発見した阻害剤については抗マラリア原虫活性を評価して有用性を確

認する。

in vivoでも有効な抗マラリア物質の発見

およびで見出した *in vitro* で有効な抗マラリア活性物質について既に確立済みの *in vivo* 評価系で検討を行う。目標とする抗マラリア活性物質は「*in vivo*において 30mg/kg x 4 回で治療効果を示す」物質とし、有望な物質については種々の投与ルートでの検討を行う。前述の puberulic acid 誘導体も含めて申請期間内に少なくとも 1 種の活性物質の発見を目指す。

3. 研究の方法

H25 および 26 年度において以下の流れで研究を実施した。

<平成 25 年度>

(1) PfGLOI 阻害活性での微生物培養液のスクリーニング

既に確立済みの評価系によりスクリーニングを行った。本評価系では組換え大腸菌に発現させたマラリア酵素を用いた。すなわち微生物代謝産物を含む天然物資源をマイクロプレートにまき、次いで酵素液、補酵素および基質を添加し 37°C で適当な時間インキュベートすることで酵素反応を進行させた。この際、酵素反応によって消費される補酵素もしくは基質の吸光度を測定することで添加サンプルの酵素阻害活性を算出した。

スクリーニングには北里大学北里生命科学研究所微生物機能研究室および微生物資源センターより供給される微生物培養液(糸状菌、放線菌、細菌、キノコなど)を主に用いた他、共同研究機関より不定期に供給される微生物培養液も利用した。

(2) *In vitro* 抗マラリア原虫活性での微生物培養液のスクリーニング

既に確立済みの評価系により(1)と同様のソースを用いてスクリーニングを行った。抗マラリア原虫活性評価系では薬剤耐性マラリア原虫の lactate dehydrogenase 活性を測定する比色法で行った。抗マラリア原虫活性を示したサンプルについてはヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞 MRC-5 を用いた細胞毒性を MTT 法で評価し、マラリア原虫と MRC-5 細胞間の毒性比から選択毒性の高いサンプル(毒性比>25)を選択した。また選択毒性の低いサンプル(5<毒性比<25)についても逆相系固担体で部分精製後、抗マラリア活性および細胞毒性を測定することで両活性の分離を試みた。

(3) 活性物質の発酵生産および単離

スクリーニングで選択された試料については、再培養後、溶媒抽出、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った。

(4) 活性物質の構造決定

単離した活性物質は各種機器分析により構造を決定した。

(6) Puberulic acid およびその合成誘導体に対する PfGLOI 阻害活性評価

計画書においては上述(2)の評価系を用いて生命研・生物有機化学研究室より供給される puberulic acid およびその合成誘導体について PfGLOI 阻害活性を随時評価した。

<平成 26 年度>

平成 25 年度研究計画 研究 (1)-(4) および(6)を継続して行った。得られた酵素阻害剤については抗マラリア原虫活性を評価する。また、得られた抗マラリア原虫活性物質については以下の研究 (5) を行った。

(5) 動物レベルでの検討

得られた活性物質について既に確立済みの方法(ネズミマラリア原虫をマウスに感染させる系)を用いて動物レベルでの抗マラリア活性を検討した。

4. 研究成果

H25 および 26 年度を通して以下の成果が得られた。

in vitro で有効な抗マラリア原虫活性物質の発見

北里大学北里生命科学研究所微生物機能研究室および微生物資源センターより供給された微生物培養液 3,004 サンプルについてスクリーニングを実施した。その結果、抗マラリア原虫活性と MRC-5 細胞に対する細胞毒性の選択毒性比が 20 倍以上の 9 サンプルを選択した。

選択したサンプルについての LC-UV-MS 分析の結果、糸状菌培養液 4 サンプルより本系で頻繁に選択されるペプチド系化合物 leucinostation 類が検出された。さらに放線菌培養液 2 サンプルについても検討を進めた結果、活性物質をポリエーテル系化合物 dianemycin と同定した。本物質の抗マラリア原虫活性は既知である (*J. Antibiot.*, **54**, 658-663 (2001), *J. Antibiot.*, **56**, 322-324 (2003))。

LC-UV-MS 分析において既知の抗マラリア原虫活性物質が検出されなかった *Microdiplodia* 属糸状菌 FKI-7042 株について再培養液を用いた精製を行った。再培養液 3 L を等量の EtOH 抽出した後、EtOH 留去して得られた水溶液を ODS、シリカゲル樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーにて順次分画した。最終的に逆相系カラムを用いた HPLC 分取を行うことで FKI-7042 物質(収量 約 1 mg、分子量 1,030 のペプチド系化合物と推定)を得た。現在、各種機器分析を用いて構造決定を行うと共に、量上げを実施している。

PfGLOI 活性評価系による puberulic acid 誘導体の評価および新たな阻害剤の発見

所属センターで糸状菌培養液より発見した抗マラリア原虫活性を示すトロポロン系化合物 puberulic acid およびその合成誘導体（北里生命科学研究所生物有機化学研究室で調製）について PfGLOI 阻害活性の評価を行った。尚、酵素は組み替え大腸菌で発現した。数種のトロポロン系化合物（hinokitiol など）が glyoxalase I 阻害活性を示すことが報告されていたことから本化合物の作用標的を PfGLOI と推定したが、実際に評価を行った結果、これらの化合物の PfGLOI 阻害活性はいずれも抗マラリア原虫活性を大きく下回った。従ってこれら化合物の作用標的は PfGLOI ではないと結論づけた（本結果は本助成による成果として *J. Antibiot.*, **67**, 545-547 (2014)）として掲載済み）。

微生物培養液から選択される化合物の傾向を掴むことを目的に、既に確立の評価系により所属センターの保有する化合物ライブラリをスクリーニングした。しかし強い阻害活性を示す物質は現在のところ見出せなかった。

続いて北里大学北里生命科学研究所微生物機能研究室および微生物資源センターより供給された微生物培養液 2,080 サンプルについてスクリーニングを実施した。その結果、1 次通過として培養液 5 μ L で 70%以上 PfGLOI 阻害活性を示す 25 サンプル、二次通過として培養液 1 μ L で 50%以上 PfGLOI 阻害活性を示す 3 サンプルを選択した。糸状菌培養液 3 サンプルを選択した。

このうち *Beauveria* 属糸状菌 FKI-7514 株について再培養および精製を行った結果、PfGLOI 阻害活性物質として Oosporein を同定した (*Science*, **8**, 152 (1965))。本物質は強い PfGLOI 阻害活性 ($IC_{50} = 6.6 \mu\text{g/mL}$) を示し、ヒト GloI ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) と 15 倍以上もの選択性を示した。

また同じく *Beauveria* 属糸状菌 FKI-7429 株について再培養および精製を行い取得した活性物質について構造決定を行っている。

in vivo でも有効な抗マラリア物質の発見

およびで見出した *in vitro* で有効な抗マラリア活性物質について既に確立済みの *in vivo* 評価系で検討を行う予定であったが適切な候補が得られていない、もしくは構造決定中であるため未実施である。代わりに共同研究などで得られた有望化合物について検討を実施した。

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：全て査読有り)

(1) A. Tsutsui, T. Hirose, A. Ishiyama, M. Iwatsuki, A. Yokota, H. Maruyama, H. Matsui, K. Otoguro, H. Hanaki, S. Ōmura, T. Sunazuka. Antimalarial C-9 oxime derivatives from desmycosin, produced by click chemistry., *J. Antibiot.*, **66**, 191-194 (2013)

(2) T. Hirose, Y. Noguchi, Y. Furuya, A. Ishiyama, M. Iwatsuki, K. Otoguro, S. Ōmura, T. Sunazuka. Structure Determination and Total Synthesis of (+)-16-Hydroxy-16,22-dihydroapparcine., *Chemistry.*, **19**, 10741-10750 (2013)

(3) A. Ishiyama, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, H. Miura, S. Ōmura, K. Otoguro. Antimalarial tropones and their *Plasmodium falciparum* glyoxalase I (pfGLOI) inhibitory activity., *J. Antibiot.*, **67**, 545-547 (2014)

(4) G. Sennari, T. Hirose, M. Iwatsuki, S. Ōmura, T. Sunazuka. A concise total synthesis of puberulic acid, a potent antimalarial agent., *Chem. Commun.*, **50**, 8715-8718 (2014)

(5) A. Ishiyama, M. Iwatsuki, R. Hokari, M. Sawa, S. Ōmura, K. Otoguro. Antimalarial activity of kinase, *in vitro* and *in vivo*., *J. Antibiot.* (2015) in press

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 国内学会（ポスター発表）日本熱帯医学会 第 55 回年会 東京都新宿区東京女子医大 弥生記念講堂 2014/11/1-3：「抗マラリア活性を示すトロポロン化合物のマラリア原虫グリオキサラーゼ I (pfGLOI) 阻害活性」 石山 亜紀、岩月正人、山本剛、三浦広美、乙黒一彦、大村智

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩月 正人 (MASATO IWATSUKI)

北里大学感染制御科学府・講師

研究者番号：70353464