

## 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：25870704

研究課題名(和文) 感染に必須因子である黄色色素の生成阻害剤に関する研究

研究課題名(英文) Inhibitors of yellow pigment production by *Staphylococcus aureus*

## 研究代表者

福田 隆志 (Fukuda, Takashi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30348586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する新しい抗感染薬のターゲットとして黄色色素(staphyloxanthin)の生合成経路に着目し、その阻害活性物質を天然物に求めた。その結果、citridoneAおよび新規化合物 graphiumin 類が色素生成阻害活性を有する事を見いだした。Citridone A に関しては詳しい活性の評価ならびに誘導体合成による構造活性相関研究を行い、活性発現には 4,5,6a-trimethyl-4,6a-dihydro-3aH-cyclopentafuran 環が結合した 3 環性の骨格が重要である事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：It is well known that *S. aureus* produces a yellow pigment called staphyloxanthin. Recently, several research groups reported that staphyloxanthin is one of the important virulent factors of *S. aureus* and the staphyloxanthin biosynthetic pathway of *S. aureus* could be a new potential target to combat MRSA infection. Therefore, we established the screening method and started to find the inhibitors of yellow pigment production. Under this screening, citridone A and graphiumins A to H were found as inhibitors from the culture broth of microorganisms. In the case of citridone A, a common 4,5,6a-trimethyl-4,6a-dihydro-3aH-cyclopentafuran skeleton was necessary to show biological activities.

研究分野：天然物化学

キーワード：MRSA 黄色色素生成阻害剤 活性物質

1. 研究開始当初の背景

抗生物質に対する耐性菌の出現は人類にとって大きな脅威であるが、中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)による院内感染さらに近年確認されている市中感染は、世界規模の問題となっている。加えて MRSA に対して第一選択薬として用いられるバンコマイシンに対しても耐性を示すバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)が報告され早急な対策が望まれている。

2. 研究の目的

最近、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の名前の由来でもある黄色色素(staphyloxanthin)が、菌の感染過程において必須成分であることが報告された。この知見は本色素生成経路が、抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染薬の新しいターゲットとなる事を示していた。そこで申請者は簡易的な黄色色素生成阻害活性を評価する方法を構築し、天然物を中心に様々な化合物を評価した結果、天然物 citridone A が色素生成阻害活性を有する事を初めて見いだした。本研究では citridone A の誘導体合成による構造活性相関を明らかとするとともに、化合物の最適化を行い、新しい作用を有した MRSA 感染予防治療薬への展開を目的としている。さらにはスクリーニングを継続し、新しい活性物質の発見を行う。

3. 研究の方法

1) 構造活性相関の解明

研究協力者(北里大学薬学部 薬品製造学教室の長光了教授)のもとで citridone A の誘導体合成を行う。申請者は研究協力者とともに、すでに citridone A の全合成研究を終了し報告している。その際の間中物質や複数の誘導体の提供を受けている。それらの活性を評価するとともに新たな誘導体合成を行うことで構造活性相関を明らかにした。

2) マウスを使った *in vivo* 評価の開始

最も活性の良好な citridone 誘導体を選択し、それを用いて黄色色素生成を抑えた菌を作製する。この菌を用いてマウスへ皮下投与しその感染の成立を評価した。

3) 新しい活性化合物の探索研究

既に構築済みの黄色色素生成阻害活性評価系(ペーパーディスク法)を用いて微生物培養液を対象にスクリーニングを行った。

4) 天然資源の供給

スクリーニングのサンプルには、微生物培養液(特に海洋由来微生物を中心)申請者が独自に入手したキノコおよび外部研究機関より提供された真菌および放線菌を培養した培養液をスクリーニングに用いた。

5) 活性物質の単離精製

スクリーニングで有効と判断されたサンプルは、三角フラスコを用いた大量培養を行

い、この培養液から抽出操作(溶媒、各種吸着剤)、各種クロマトグラフィー(順相・逆相および HPLC)等の精製手法を組み合わせることによって目的の活性物質を単離した。

6) 活性物質の構造解析

単離した化合物は各種機器分析(質量分析、赤外吸収スペクトル、紫外外部吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル(NMR)等)の測定および解析を行ない、化学構造を明らかにした。

4. 研究成果

Citridone A の類縁体として 11 化合物の作製を行った。それら及び天然物 4 種の合計 15 化合物を評価した結果、作製した誘導体 3 種に目的の黄色色素生成阻害活性を見いだした。また新しい活性化合物の探索研究では合計 10 種の新規化合物を発見した。

1) Citridone A の誘導体作製

(+)-pulegone を出発物質として 14 step で phenylpiridone 環の構築を行った。その後、種々変換反応ならびに閉環反応を行い、目的の 14 化合物の合成に成功した。

2) Citridone A 誘導体の生物活性

得られた誘導体ならびに天然物 4 種の合計 15 化合物を評価した結果、作製した誘導体 3 種(14, 20, 21)に目的の黄色色素生成阻害活性を見いだした。

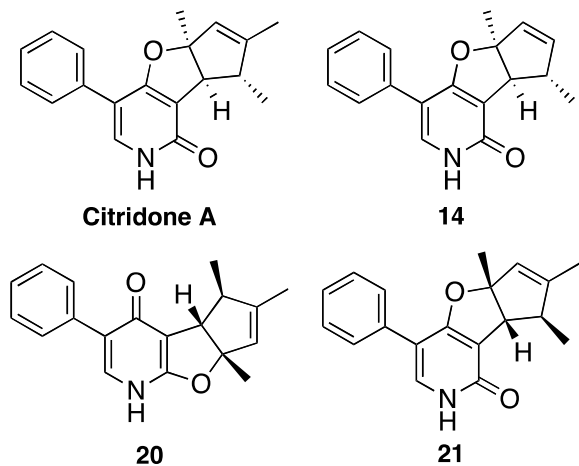


図 1 Citridone A およびその合成誘導体

活性の強さは天然物が最も強く 11.1 ug/ml 濃度で黄色色素生成を 50% 阻害した。残りの 3 化合物は 22~30 ug/ml 濃度で黄色色素生成を 50% 阻害した。

3) 構造活性相関

天然物より活性が強い誘導体作製を目指したが、結果的に天然物を超えるものは合成できなかった。これは天然物研究の醍醐味ではあるが残念な結果であった。数は少ないが以下に考えられる構造活性相関を考察した。

- R1: 置換基を導入すると活性が消失する。
- R2: 置換基がある方が、活性が強くなる。
- R3: 置換基がある方が、活性が強くなる。
- R4: 大きな置換基を入れると活性が消失する。

Hexahydro-2*H*-cyclopenta[ $\beta$ ]furan は活性に必須である。

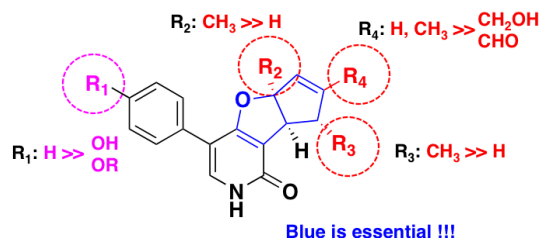


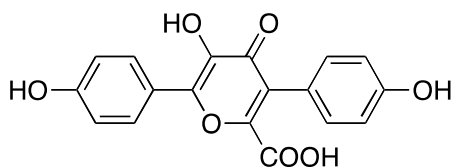
図 2 構造活性相関

#### 4) *In vivo* 試験の開始

HR-1 マウス (n=3) を用いて黄色ブドウ球菌の感染実験を開始した。Citridone A を用いて白色にした菌液および通常の黄色の菌液各 25  $\mu$ l (cfu  $1 \times 10^6$  /ml) をそれぞれマウス皮下に注射し (1 匹につき 2 か所) 8 日目までその感染の有無を評価した。その結果、通常の黄色の菌液では 100% (6/6) 感染が成立したのに対し白色の菌液では 50% (3/6) にその感染率が低下していた。また病変部位の大きさも通常のものに比べ小さくなっていった。プレリミナルなデータではあるが本結果は *in vivo* レベルでも citridone A が有効である可能性を示唆したものと考えている。今後はさらに検討を進める予定である。

#### 5) 新規活性化合物 tylopilusin C の取得

天然のキノコ抽出物より新規化合物 tylopilusin A, B および C を単離構造決定した。活性は citridone A より弱かった。

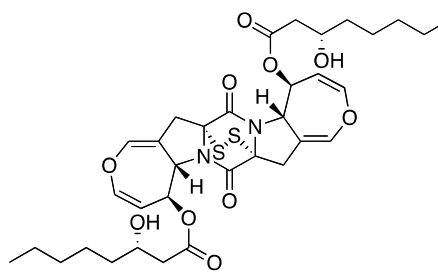


Tylopilusin C

図 3 Tylopilusin C の構造

#### 6) 新規活性化合物 graphiumin 類の取得

海洋由来真菌 *Graphium* sp. OPMF00224 の培養液中より新規化合物 graphiumin 類を単離構造決定した。活性は citridone A より弱かった。

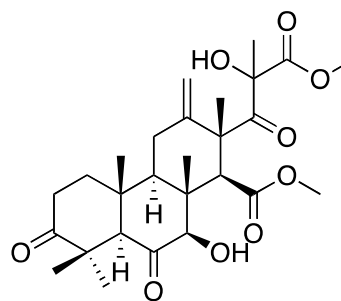


Graphiumin A

図 4 Graphiumin A の構造

#### 7) 新規化合物 terretonin G の取得

海洋由来真菌 *Aspergillus* sp. OPMF00272 の培養液中より新規化合物 terretonin G を単離構造決定した。黄色色素生成阻害活性は確認されなかった。



Terretonin G

図 5 Terretonin G の構造

#### 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 4 件)
- 1) Fukuda T, Shinkai M, Sasaki E, Nagai K, Kurihara Y, Kanamoto A, Tomoda H. Graphiumins, new thiodiketopiperazines with a (3*S*)-3-Hydroxy-octanoate chain from the marine-derived fungus *Graphium* sp. OPMF00224. *J. Antibiot.* doi: 10.1038/ja.2015.41. (査読あり)
  - 2) Fukuda T, Shimoyama K, Nagamitsu T, Tomoda H. Synthesis and biological activity of citridone A and its derivatives. *J. Antibiot.* 67: 445-450 (2014) (査読あり)
  - 3) Fukuda T, Kurihara Y, Kanamoto A, Tomoda H. Terretonin G, a new sesterterpenoid antibiotic from marine-derived *Aspergillus* sp. OPMF00272. *J. Antibiot.* 67:593-595 (2014) (査読あり)
  - 4) Fukuda T, Tomoda H. Tylopilusin C, a new diphenolic compound from the fruiting bodies of *Tylopilus eximimus*. *J. Antibiot.* 66: 355-357 (2013) (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 福田隆志、佐々木恵里、内田龍児、供田洋  
黄色ブドウ球菌が生産する黄色色素の生成阻害活性物質  
日本薬学会第135年会(兵庫県デザインクリエイティブセンター神戸 1F KIITO ホール)(3.27.2015)
- 2) Fukuda T, Shimoyama K, Nagamitsu T, Tomoda H.  
Biological Activity of Citridone A  
SIMB 2015 (San Diego, CA, US) (1.13.2015)
- 3) 佐々木恵里、福田隆志、新開みのり、栗原祐子、金本昭彦、供田洋  
海洋由来真菌 OPMF00224 株が生産する新規化合物 graphiumin 類に関する研究  
日本薬学会第134年会(熊本県熊本総合体育館 1F ホワイエ)(3.28.2014)
- 4) 福田隆志、佐々木望、栗原祐子、金本昭彦、供田洋  
海洋由来真菌 OPMF00272 株が生産する新規化合物 terretonin G に関する研究  
日本薬学会第134年会(熊本県熊本総合体育館 1F ホワイエ)(3.28.2014)
- 5) Fukuda T, Kanamoto A, Tomoda H.  
Graphiumins, New Thiodiketopiperazines from Marine-derived Fungus *Graphium* sp. OPMF00224  
Gordon Research Conferences (Ventura, CA, US) (3.5.2014)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microchem/wei\\_sheng\\_wu\\_yao\\_pin\\_zhi\\_zao\\_xue/Welcme.html](http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microchem/wei_sheng_wu_yao_pin_zhi_zao_xue/Welcme.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 隆志 (Fukuda Takashi)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30348586