

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460128

研究課題名(和文) マラリア感染予防、伝播防止を目的とした微生物培養液からのpfFabI阻害剤の探索

研究課題名(英文) Screening of Plasmodium falciparum enoyl-Acyl carrier protein reductase (PfFabI) inhibitors from microbial metabolites for prophylaxis and blocking transmission of malaria

研究代表者

石山 亜紀 (Aki, Ishiyama)

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号：70300746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Enoyl-acyl carrier protein reductase (pfFabI)はマラリア発症前段階の肝臓細胞内で原虫が分裂増殖する際に必須の脂肪酸合成酵素の一つであり、本酵素阻害によりマラリア予防、伝播阻止が期待される。微生物代謝産物の探索から、pfFabI阻害物質を14化合物見出した。特に放線菌 K12-0828の培養液から得られたcomplestatin類が最も強い阻害活性を示し、加えて肝臓ステージマラリア原虫に対しても同等の効果を示すことが明らかとなった。本研究により見出された化合物のpfFabI阻害活性、肝臓ステージマラリア原虫に対する効果は新たな知見であった。

研究成果の概要(英文)：To create the safer antimalarial drugs for the prophylaxis and transmission blocking, we have focused on the type II fatty acid synthetic system of Plasmodium falciparum. The enoyl-acyl carrier protein reductase (pfFabI) is a key enzyme for the parasite division and proliferation in liver stage parasite before the onset of malaria symptoms such as a fever, anemia and sometime death for its severe. We have carried out the screening to discover pfFabI inhibitors from microbial metabolites, total 14 compounds from microbial metabolites were identified showing pfFabI inhibitory activity with new knowledge. Among them complestatin and chloropectin I isolated from Streptomyces sp. K12-0828 showed the most potent pfFabI inhibitory activity with the IC50 of 4.8 and 5.8 microM, respectively. Additionally, complestatin and chloropectin I showed as effective as pfFabI inhibitory activity against liver stage malaria parasites that was also new knowledge.

研究分野：寄生虫学 生化学

キーワード：pfFabI マラリア原虫 マラリア感染予防 TypeII脂肪酸合成酵素 微生物代謝産物

1. 研究開始当初の背景

世界三大感染症のひとつであるマラリアは紀元前から流行の痕跡があり、今もってなお多くの感染例(>2億/年)、死亡例(49-83.6万/年)が報告されている。治療には現在最も有効とされるアルテミシニン類を中心としその他古くからの既存薬剤を組み合わせる方法が用いられているが、既にアルテミシニン耐性化が懸念されはじめている。このようなことから、特に、今までとは異なる作用点からの新たな薬剤が求められている。現在マラリアの治療に用いている薬剤はほとんどが赤血球内寄生 (Blood stage : BS) マラリア原虫を標的として創薬されてきた (図1)。

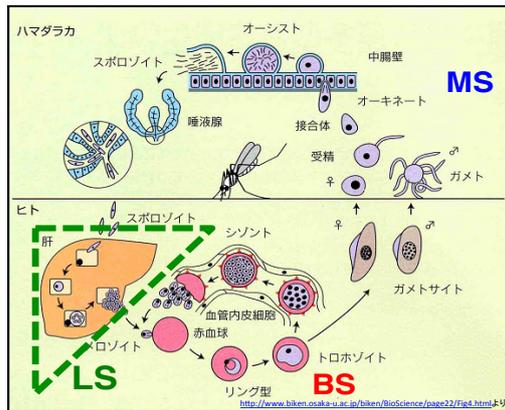


図1 マラリア原虫のライフサイクル

しかしながら最近、肝臓内 (Liver stage : LS) におけるマラリア原虫の生存に必須な脂肪酸合成系が薬剤標的として注目されている。

マラリア原虫の脂肪酸合成酵素系はヒトを含めた哺乳類とは異なるType II であり、複数の酵素群からなる (図2)。なかでも *pfFabI* (enoyl-ACP reductase) はNADH 依存性の還元反応によって脂肪酸鎖伸長の終末を担うキーレギュレーターであり、

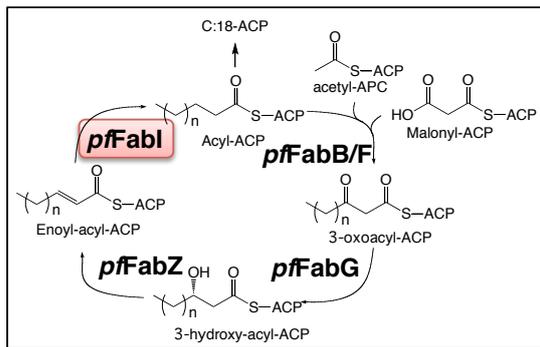


図2 マラリア原虫のType II 脂肪酸合成酵素系

LSマラリア原虫を対象とした抗マラリア剤創薬の良いターゲットとなる。

LS マラリア原虫の脂肪酸合成を阻害することでハマダラカを媒介としたマラリア原虫感染の直後に起こる肝臓細胞内での爆発的な原虫増殖が阻害され、BS への移行がストップし、必然的に媒介蚊 (mosquito stage: MS) へ

の移行も阻止され、『感染予防』、『感染重症化の回避』、『伝播防止』が期待される。

2. 研究の目的

マラリア制圧を目指した薬剤開発において、今までとは異なる作用点をもつ新たな薬剤が必要とされている。そこでマラリア感染初期のLSでの増殖に必須な脂肪酸合成酵素 *pfFabI* に着目し、その阻害剤を微生物培養液からスクリーニングする。 *pfFabI* 阻害活性物質を含む微生物培養液の生産菌を培養し、精製、構造決定を行い、マラリアの『感染予防』、『感染重症化の回避』、『伝播防止』を目的とした薬剤シーズの取得を目指す。

取得した化合物はマラリア原虫媒介蚊を用いた *in vivo* 感染モデルで感染防御活性評価を行うことで真に効果のある薬剤シーズを見出す。

3. 研究の方法

本研究では組み換え酵素 *pfFabI* を使い、酵素阻害活性を指標に微生物培養液のスクリーニングから薬剤シーズを取得し、 *in vivo* で感染防御活性評価を行う。

96 well プレート	μL
微生物培養液などのサンプル	10
2mM NADH	10
2mM t-o-NAC thioester*	10
酵素溶液 <i>pfFabI</i> **	10
20 mM Tris-HCl buffer (pH 8)	60
	100
↓ 25 °C 30分 インキュベーション	
<i>pfFabI</i> の反応の進行に伴って減少する NADHの吸収(A340 nm)を測定	
*trans-2-octenoyl N-acetylcysteamine thioester	
** Vector from Dr. Remo Perozzo, Univ. of Geneva	

図3 *pfFabI*阻害活性評価系

(1) *pfFabI* 阻害物質のスクリーニング

pfFabI 阻害活性評価は図3に示した方法で行った。*pfFabI* 発現ベクターはジュネーブ大のDr. R Perozzo (*J. Biol. Chem.*, 277: 13106-13114(2002))より分与され、組み換え酵素の取得は常法に従って所属機関で行った。

スクリーニングに用いる新属新種の微生物類を含む各種微生物の培養液(糸状菌、放線菌、細菌、キノコなど)は所属機関である北里生命化学研究所(生命研)の微生物機能研究室、および微生物資源センターから供給された。また、生命研は多種生物活性評価系あるいは合成により取得された新規物質等を含む抗生物質ライブラリーを保有しており、このスクリーニングを並行して行った。

スクリーニングの1次選択は培養液原液を用いて阻害活性>80%、2次選択は培養液の10倍希釈で阻害活性>80%とした。ポジティブコントロールとして *pfFabI* 阻害活性が報告されている合成品のトリクロサン(*Nature Med* 7, 167-173 (2001))を用いた。所属機関

で行われている他の酵素評価系と比較することで非特異的な酵素阻害剤を排除した。

(2) 活性物質の発酵生産および単離と構造決定

上記スクリーニングによって選択された培養液は、生産菌からの再培養を行い、活性物質を含む培養液を取得した。培養液は溶媒抽出、各種クロマトグラフィーなどを用いて *pfFabI* 阻害活性を指標に精製を行い活性物質の単離を行った。単離した活性物質は各種機器分析にて構造を決定した。

(3) 活性物質の *pfFabI* 阻害活性

抗生物質ライブラリースクリーニングでピックアップされた化合物、あるいは取得した化合物について、*pfFabI* 阻害活性を精査した。

(4) 培養マラリア原虫、リーシュマニア原虫などを用いた評価

得られた活性物質（あるいは活性成分を含む培養液）はその酵素阻害とは別にBS 培養マラリア原虫に対する抗原虫活性を併せ持つ可能性を考慮し、BS 培養マラリア原虫に対する効果を確認した。また、マラリア原虫と同じ typeII の脂肪酸合成系を持つリーシュマニア原虫に対する効果も検討した。

(5) *pfFabI* 阻害活性物質の肝臓ステージマラリア原虫に対する作用

公益社団法人グローバルヘルス技術振興基金 (GHIT) のコラボレーションセンターの協力を得て、*in vitro* 肝臓ステージマラリア原虫に対する阻害活を確認した。

4. 研究成果

(1) *pfFabI* 阻害物質のスクリーニング

5991 サンプルの微生物培養液のスクリーニングから、*pfFabI* 阻害活性を示す培養液を7種見出した。微生物培養液を用いた *pfFabI* のスクリーニングは未開拓であり、新たな創薬リード化合物が得られる可能性が示唆されるためスクリーニングは継続している。

抗生物質ライブラリーのスクリーニングを進めた結果、pyridomycin、madurahydroxylactone、xanthofulvin、anhydrofulvic acid、integracide A、cinatrin D、E に *pfFabI* 阻害活性が見出された。

(2) 活性物質の発酵生産および単離と構造決定

微生物培養液から *pfFabI* 阻害活性を指標として活性物質が取得された例は今まで報告されていなかったが、本研究ではこれを遂行し、スクリーニングで選択された培養液のうち、4株の生産菌から、発酵生産、単離、構造決定により *pfFabI* 阻害活性が新知見となる7化合物 (complestatin、chloropectin I、panosialin A、D、vinaxanthone、

secospiculisporic acid B、ilicicolinic acid) を見出すことが出来た。

放線菌 K12-0828 株 (WK-3419) の培養液より complestatin 及びその位置異性体である chloropectin I を単離した。放線菌 KAC-25 株 (OH-5186 株) の培養液から panosialin A、D を単離した。

糸状菌 FKI-5504 株の培養液から vinaxanthone を単離した。本物質は抗生物質ライブラリーから見出された xanthofulvin、anhydrofulvic acid 関連物質であった。糸状菌 FKI-5375 株の培養液からは secospiculisporic acid B および *pfFabI* 阻害活性を持たない関連化合物 2 種 (secospiculisporic acid、spiculisporic acid) を同時に単離した。FKI-7533 株の培養液からは ilicicolinic acid を単離した。

放線菌培養液よりヒットした 1 ブロス (K16-0580 株) について活性ピークを同定済みである。UV 吸収、LC-MS からこれまで取得してきた化合物群とは異なる新規物質であることが示唆されているため、精製を継続中である。

(3) 化合物の *pfFabI* 阻害活性

化合物の *pfFabI* 阻害活性は全て新知見であった。

抗生物質ライブラリーより見出された pyridomycin、madurahydroxylactone、xanthofulvin、anhydrofulvic acid、integracide A、cinatrin D、E の *pfFabI* 阻害活性は IC_{50} 値でそれぞれ 14.5、29.5、7.9、87.0、29.1、101.5、118.8 μM であった。

培養液より単離された 7 化合物 (complestatin、chloropectin I、panosialin A、D、vinaxanthone、secospiculisporic acid B、ilicicolinic acid) の *pfFabI* 阻害活性は IC_{50} 値でそれぞれ 4.8、5.8、18.1、10.8、10.0、66.4、25.7 μM を示した。これらの中で complestatin 及びその位置異性体である chloropectin I は最も強い阻害活性 (それぞれ IC_{50} 値で 4.8、5.8 μM) を示した。

vinaxanthone、xanthofulvin、anhydrofulvic acid は chromon 骨格を有する化合物であり、*pfFabI* 阻害活性には構造中の 1,4-benzopyrone 骨格と xanthone 骨格が必要であることが示唆された。

secospiculisporic acid B および secospiculisporic acid、spiculisporic acid と cinatrin D、E は脂肪酸鎖と carboxyl 基を共通骨格に持つ化合物であり、構造活性相関からは、2つの carboxyl 基の存在が活性に必要であることが示唆された。

Illicicolinic acid は新規類縁体も同時に単離されていたが、*pfFabI* 阻害活性は見られなかった。

(4) 培養マラリア原虫、リーシュマニア原虫などを用いた評価

*In vitro*培養マラリア原虫に対してはいずれも12.5 µg/mlで阻害活性を示すものは無く、酵素特異的であることが示唆された。
リーシュマニア原虫に対してはcomplestatin及びchloroepetin I、pyridomycin について評価したが、いずれも12.5 µM or µg/mlで阻害活性を示さなかった。

(5)Complestatinおよびchloroepetin Iの肝臓ステージマラリア原虫に対する作用

最も強いpfFabI阻害活性を示した complestatin及びchloroepetin Iについて、GHITのコラボレーションセンターの協力を得て、*in vitro*肝臓ステージマラリア原虫に対する阻害活を確認したところ、それぞれIC₅₀で4.1および4.5 µMの阻害活性が認められた。酵素阻害活性のみならず、肝臓ステージに対する抗原虫阻害活性も認められたことは新たな知見となった。

表-1 Complestatin および chloroepetin Iの活性プロファイル

	PfFabI	IC ₅₀ (µM)	
		<i>P. falciparum</i> K1 strain	<i>P. berghei</i> in liver stage*
Complestatin	4.8 ± 0.4	> 12.5	4.1
Chloroepetin I	5.8 ± 0.3	> 12.5	4.5
Triclosan	0.17	1.9	6.8

*GHIT collaboration center

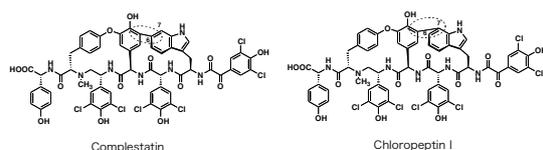


図4 Complestatin および chloroepetin Iの構造

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 9 件)

- ①A. Ishiyama, M. Iwatsuki, T. Yamamoto, H. Miura, S. Omura, K. Otaguro. Antimalarial tropones and their *Plasmodium falciparum* Glyoxalase I (pfGLOI) inhibitory activity. *J. Antibiot.*, 67: 545-547 (2014) 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① ○石山亜紀、岩月正人、穂苅玲、野中健一、松本厚子、高橋洋子、乙黒和彦、大村智 「微生物代謝産物からのマラリア原虫脂肪酸合成酵素 (pfFabI) 阻害活性物質の探索研究」
第 57 会日本熱帯医学会大会日本熱帯医学 2016/11/5-11/6 一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)
- ② ○浮山颯、岩月正人、野中健一、松本厚子、石山亜紀、穂苅玲、乙黒和彦、大村智、塩見和郎 「微生物代謝産物からのマラリア脂肪酸合成酵素 pfFabI 阻害物質の探索」

日本農芸化学会 2015 年度大会
2015/3/26-3/29 ホテルグランヴィア岡山、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

- ③ ○石山亜紀、岩月正人、山本剛、三浦広美、乙黒一彦、大村智

「抗マラリア活性を示すトロポ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」
第 55 会日本熱帯医学会大会、第 29 回日本国際保健医療学会学術大会
2014/11/1-11/3 東京女子医大 弥生記念講堂、独立行政法人 国立国際医療センター(東京都新宿区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)
名称: 抗マラリア活性を有する新規ヘテロアリール誘導体
発明者: 澤匡明、朝光優子、大村智、乙黒一彦、岩月正人、石山亜紀、穂苅玲
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2015-91436
出願年月日: 平成 27 年 4 月 28 日
国内外の別: PCT 出願 PCT/JP2016/063294

○取得状況 (計 1 件)
名称: 抗マラリア活性を有する新規ヘテロアリール誘導体
発明者: 澤匡明、朝光優子、大村智、乙黒一彦、岩月正人、石山亜紀、穂苅玲
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2015-91436
出願年月日: 平成 27 年 4 月 28 日
国内外の別: 日本

[その他]
なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
石山 亜紀 (ISHIYAMA AKI)
北里大学・北里生命化学研究所感染制御科学府・特任助教
研究者番号: 70300746
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
岩月 正人 (IWATSUKI MASATO)
北里大学・北里生命化学研究所感染制御科学府・准教授
研究者番号: 70353464

松本 厚子 (MATSUMOTO ATSUKO)
北里大学・北里生命化学研究所感染制御科
学府・准教授
研究者番号：20300759

野中 健一 (NONAKA KENICHI)
北里大学・北里生命化学研究所感染制御科
学府・助教
研究者番号：60421369

廣瀬 友靖 (HIROSE TOMOYASU)
北里大学・北里生命化学研究所感染制御科
学府・准教授
研究者番号：00370156

筏井 宏実 (IKADAI HIROMI)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号：80327460