様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成２９年　６月２６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：２６４６０１２９

研究課題名（和文）赤痢アメーバ原虫特異的なシステイン合成酵素を阻害する微生物代謝産物の探索

研究課題名（英文）Search for natural products which inhibit Entamoeba histolytica cysteine synthase

研究代表者
森　美穂子（Mori, Mihoko）

北里大学・感染制御科学府・助教

研究者番号：２０４２５６４８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：赤痢アメーバ原虫が大腸に寄生して起こる赤痢アメーバ症は、全世界に約4,000万人以上の感染者が存在し、途上国では多数の死者が出ている深刻な感染症である。長年治療に用いられている薬に対する耐性原虫の出現が危惧されているため、新たな治療薬の開発を目的とし、赤痢アメーバに特異的な酵素であるシステイン合成酵素を標的として、選択的な阻害化合物を微生物培養液から探索した。18,000を超える微生物培養液の中から活性を示すものを選択し、システイン合成酵素を阻害することで赤痢アメーバを死滅させると推定される化合物ペンコライドを見出した。

研究成果の概要（英文）：Amebiasis is a common worldwide diarrheal disease, caused by infection with the protozoan parasite, Entamoeba histolytica. Metronidazole has been used against amebiasis for decades despite its side effects. Therefore novel drugs with targets and modes of action different from metronidazole are urgently needed. The cysteine biosynthetic pathway is essential for the proliferation and anti-oxidative defense of E. histolytica. This pathway, consisting of two reactions catalyzed by serine acetyltransferase and cysteine synthase (CS, O-acetylserine sulfhydrylase), does not exist in humans. I selected this pathway for a rational drug target and searched selective inhibitors against this pathway from microbial secondary metabolites. More than 18,000 microbial broths were screened and then one fungal broth was selected as a potential one. Pencolide is isolated as the cysteine biosynthetic pathway inhibitor. This compound showed both inhibitory activity against CS and antiamebic activity.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：赤痢アメーバ　Entamoeba histolytica　システイン生合成経路　cysteine synthase　微生物代謝産物

## １．研究開始当初の背景

### (1) 赤痢アメーバ症の現状

　赤痢アメーバ症は、汚染された水や食物を摂取することでヒト体内に取り込まれた赤痢アメーバ原虫（*Entamoeba histolytica*）が大腸で潰瘍を形成し、下痢、腹痛など赤痢に似た症状を示す寄生虫症である。さらに肝臓や肺、脳へ本原虫が移行して膿瘍を形成すると劇症化する。感染者は開発途上国を中心に全世界で 4,000 万人以上存在し、死亡者数は年間 7〜10 万人と推定されている。日本でも感染の報告が年間 1,000 例を超えてなお増加し続けているため、現在重要視されている感染症の一つである。途上国とは異なり、日本では男性同性愛者間での性交渉による感染例が非常に多いことが特徴である。
赤痢アメーバはヒトの体内ではアメーバ状の「栄養型」で存在し、糞便とともに体外へ排出されるときは硬い外殻を持つ感染型の「嚢子（シスト）」となる。現在、抗菌・抗原虫薬のメトロニダゾールが治療に用いられているが、シストには効かず感染の拡大を抑制できないことに加え、耐性株の出現、高い催奇形性等の問題がある。そのため、メトロニダゾールとは異なる骨格・作用点を持ち、かつ安全な新規治療薬の開発が望まれている。

### (2) 本研究の標的となる赤痢アメーバ特異的なシステイン生合成経路

　新たな作用点を持つ赤痢アメーバ症治療薬のシーズ化合物を見出したいと考え、赤痢アメーバ特異的なシステイン生合成経路（図 1 右）上の 2 種類の酵素、セリン-アセチル転移酵素（serine-acetyltransferase、SAT と略）とシステイン合成酵素（cysteine synthase、CS と略）に着目した。

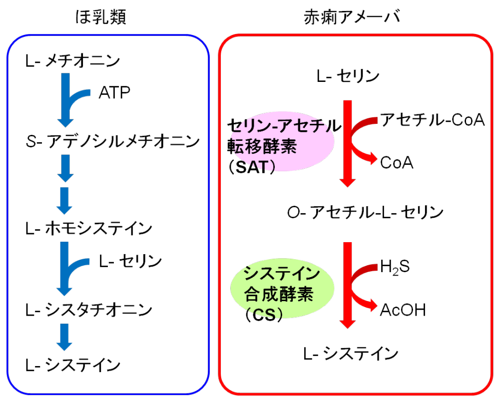


図 1. ほ乳類（左）と赤痢アメーバ原虫（右）のシステイン生合成経路の違い.

　植物や細菌も同様のシステイン生合成経路を持つが、SAT と CS は複合体を形成し機能する。それに対し、赤痢アメーバでは SAT のアミノ酸配列が他生物とは大きく異なるため、CS と複合体を形成せずに機能するという特徴がある。また赤痢アメーバの細胞運動や接着にはシステインが必須であり、赤痢アメーバにおいてシステインは重要な生理作用を持つことが示唆される。以上より、赤痢アメーバの SAT、CS を選択的に阻害する化合物は、宿主であるヒトに無害で、かつ赤痢アメーバが寄生する腸管内の微生物フローラにも影響を与えない、新たな治療薬になると期待できる。
　赤痢アメーバの SAT、CS にはそれぞれ 3 種類の isotype（SAT1~3、CS1~3）が存在する（*Clin. Microbiol. Rev*. 2007, **20**, 164-187）。CS はアミノ酸配列の相同性から、CS1&2 と CS3 の 2 種類に大別できる。一方、SAT の 3 種類の isozyme は C 末端のアミノ酸配列や発現パターンがそれぞれ異なり、互いの相同性が低い。そのため SAT1~3、CS1 と CS3 の 5 種類の酵素を組み換え大腸菌を用いて調製し、各 isozyme を阻害する化合物を探索することとした。

### (3) 微生物代謝産物から見出した赤痢アメーバ特異的システイン生合成経路阻害化合物

　96 穴プレートでのアッセイ系を構築し、はじめに、所属大学で保有する 316 種類の天然化合物中、どのような構造を持つ化合物が各酵素を阻害するのか調べた。その結果、放線菌類が生産するナフトキノン骨格を持つ化合物が CS を阻害することと（最も強いもので $IC_{50}$ = 6 μM）、糸状菌が生産する ascofuranone が唯一選択的に SAT を阻害するという知見を得た。さらに、CS 阻害活性を示したナフトキノン系化合物 naphthacemycin $A_9$ を誘導化し、10 倍以上 CS1 阻害活性が向上した誘導体（$IC_{50}$ = 1.3 μM）を見出した。SAT 阻害活性を示した ascofuranone については類縁化合物を糸状菌培養液から単離し、構造活性相関を調べた結果、ascofuranone の芳香環上の Cl 基が isozyme 選択的な阻害活性発現に重要だとわかった。微生物培養液のスクリーニングも進め、6,700 を超えるサンプルの中から CS1 阻害活性を示した糸状菌培養液 2 種類を選択し、それぞれからナフトキノン系化合物の xanthofulvin、デプシド化合物 exophillic acid を阻害化合物として単離した。

## ２．研究の目的

### (1) SAT、CS の各 isozyme 選択的な阻害化合

物に加え、isozyme 非選択的な阻害化合物も微生物培養液から見出す。

酵素阻害に必要な構造を明らかにしたいため、各 isozyme 選択的な阻害化合物を見出す。さらに非選択的な阻害化合物を得て、両者を比較することにより、酵素阻害に必要な構造を明らかにする。
特に、SAT の各 isozyme はアミノ酸配列が互いに大きく異なるため、各 isozyme 選択的な阻害化合物が得られることが予測される。

(2) 赤痢アメーバ症治療薬創出により速く結び付く化合物を見出す。

酵素アッセイ系に加え、原虫に対する阻害活性とヒト正常細胞を用いた細胞毒性試験を組み合わせた実験系を作成する。

(3) 強力な阻害化合物のデザインに用いたいため、酵素阻害活性を示す化合物に必要な構造を明らかにする。

阻害活性を見出した化合物は酵素との共結晶構造解析を行い、結合部位に違いがあるのか、必要な部分構造はどのようなものかを明らかにする。
In silico で阻害化合物を探した例は報告されているが、実際に天然ソースから酵素を用いて阻害化合物を探索した報告はない。

## ３．研究の方法

(1) 酵素ベーススクリーニング

セリン-アセチル転移酵素（SAT1, 3）と 2 種類のシステイン合成酵素（CS1, 3）を用いて、阻害活性を示す微生物培養液をスクリーニングした。
微生物培養液は所属研究機関保有の放線菌培養液、糸状菌培養液を用いた。

(2) 細胞ベーススクリーニング

赤痢アメーバをシステイン含有・非含有培地で培養し、そこへ微生物培養液を添加して赤痢アメーバの生死を確認した。赤痢アメーバの生育にはシステインが必須であるため、システイン非含有培地ではシステイン生合成経路を阻害されると赤痢アメーバは生育できないが、システイン含有培地ではシステイン生合成経路を阻害されても培地から取り込むことが可能なため生育できる。これを利用して細胞ベースで赤痢アメーバのシステイン生合成経路を阻害する微生物培養液をスクリーニングした。同様の手法で、化合物ライブラリーもスクリーニングした。

(3) ヒト正常細胞に対する細胞毒性試験

スクリーニングで阻害活性を見出した微生物培養液および化合物は、ヒト正常細胞である繊維芽細胞 MRC-5 に対する毒性を調べた。定法で細胞を培養し、微生物培養液および化合物を添加して細胞毒性を評価した。

(4) 阻害化合物の精製

スクリーニングで見出した微生物培養液は大量に再培養し、活性の再現性を調べた後、溶媒抽出、各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。

## ４．研究成果

(1) 酵素ベーススクリーニング

標的酵素である 3 種類のセリン-アセチル転移酵素（SAT1-3）および 2 種類のシステイン合成酵素（CS1 と CS3）を阻害する微生物培養液を網羅的にスクリーニングした。土壌または植物由来の放線菌、糸状菌の培養液を 1 年目は約 6,000 サンプル、2 年目は約 2,700 サンプル、3 年目は約 9,700 サンプルをスクリーニングした。
酵素阻害活性を示す微生物培養液は、1 年目は約 300 サンプル、2 年目は約 120 サンプル、3 年目は約 200 サンプル見出した。
微生物培養液に加え、所属機関保有の天然化合物ライブラリーに新たに追加された 160 化合物のシステイン合成酵素阻害活性を調べ、新たに 8 化合物に酵素阻害活性を見出した。

(2) 単離した酵素阻害化合物

CS1 と CS3 の両方に対して阻害活性を示した微生物培養液から、PF1057B（またはその位置異性体 PF1057D）、pencolide、xanthomegnin をそれぞれ異なる糸状菌培養液から単離した。PF1057B は CS1 と CS3 の両酵素を $IC_{50}$ 値 15 μM で阻害した。Pencolide は両酵素を $IC_{50}$ 値 200 μg/ml で阻害した。Xanthomegnin の両酵素に対する $IC_{50}$ 値は 400-500 μM であった。
CS1 をより強く阻害する微生物培養液からも阻害化合物を精製した。*Penicillium* 属糸状菌 FKI-6747 株の培養液から、monochlorosulochrin を CS 阻害化合物として単離した。培養液では CS1 に対する阻害活性が強かったが、得られた monochlorosulochrin は CS1 と CS3 の両アイソザイムを共に $IC_{50}$

値 100 μg/ml で阻害した。精製過程で得られた他の画分に CS1 選択的な阻害化合物が含まれていると推定している。また同株の培養液から、monochlorosulochrin と構造類似の asterric acid も単離したが、こちらには阻害活性は認められなかった。

(3) 細胞ベーススクリーニング

保有する天然化合物ライブラリーから抗赤痢アメーバ原虫活性を示す化合物を探索したところ、抗原虫活性が知られている化合物に加え、新たに複数の化合物に抗赤痢アメーバ原虫活性を見出すことができた。そのうち数化合物は培地中のシステインの有無により活性に差が見られた。

微生物培養液を 6,900 サンプルスクリーニングし、システイン生合成経路を阻害することにより抗赤痢アメーバ活性を示すと考えられるものを 11 サンプル見出した。また、システイン生合成とは無関係に抗赤痢アメーバ活性を示す微生物培養液は 31 サンプル選択できた。

(4) 細胞ベーススクリーニングで見出した微生物培養液からの阻害化合物

システイン生合成経路を阻害することにより抗赤痢アメーバ活性を示すと考えられた微生物培養液の多くからは、pencolide が検出された。Pencolide の抗赤痢アメーバ活性はシステイン非含有培地中 $ED_{50}$ 値約 180 μM と、システイン合成酵素阻害活性とほぼ同程度の値であったことから、pencolide はシステイン生合成を阻害することにより抗赤痢アメーバ活性を示すことが示唆された。

システイン生合成とは無関係であるが、強い抗赤痢アメーバ活性を示した糸状菌培養液から化合物を単離したところ、fumagillin と ovalicin を単離した。これらはそれぞれ nM レベルで抗赤痢アメーバ活性を示したことから研究協力者である国立感染症研究所の野崎智義博士のグループで動物実験を行った。その結果 ovalicin に赤痢アメーバ症肝膿瘍の治療効果を見出した。

(5) 共結晶構造解析のための共同研究

これまでに見出した酵素阻害化合物をインドのジャワハルラールネルー大学の Gourinath 博士に提供し、共同研究として、cysteine synthase と阻害化合物との共結晶構造解析を開始した。

## 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　3 件）

①Krautwald, S., Nilewski, C., Mori, M., Shiomi, K., Ōmura, S., Carreira, E. M. Bioisosteric exchange of Csp3-Chloro and methyl substituents: synthesis and initial biological studies of atpenin A5 analogues. ***Angew. Chem. Int. Ed.*** 55(12):4049-4053, 2016. 査読あり
DOI 10.1002/anie.201511672

②Mori, M., Jeelani, G., Masuda, Y., Sakai, K., Tsukui, K., Waluyo, D., Tarwadi, Watanabe, Y., Nonaka, K., Matsumoto, A., Ōmura, S., Nozaki, T., Shiomi, K. Identification of natural inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase from microbial secondary metabolites. ***Frontiers Microbiol.*** 6:article 962, 2015. 査読あり
DOI 10.3389/fmicb.2015.00962

③Kaifuchi, S., Mori, M., Nonaka, K., Masuma, R., Ōmura, S., Shiomi, K. Ukulactone C, a new NADH-fumarate reductase inhibitor produced by *Talaromyces* sp. FKI-6713. ***J. Gen. Appl. Microbiol.*** 61(2):57-62, 2015. 査読あり
DOI 10.2323/jgam.61.57

〔学会発表〕（計　9 件）

①森美穂子, 中野由美子, 栢植聡志, 大村 智, 塩見和朗, 野崎智義. 糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 2017 年 3 月 19 日, 京都女子大学（京都府京都市）.
②森美穂子. Screening and isolation of antiparasitic compounds from secondary metabolites of microorganisms. 赤痢アメーバ症会議. 2016 年 11 月 1 日, New Delhi（India）.
③森美穂子. 微生物代謝産物からの赤痢アメーバ症治療薬シーズの探索. 第 27 回新薬創製談話会. 2016 年 8 月 31 日, 江戸屋（茨城県つくば市）.
④深澤航、栢植聡志、森美穂子、野中健一、松本厚子、野崎智義、大村智、塩見和朗. 微生物培養液からの赤痢アメーバ特異的システイン生合成経路阻害物質の探索. 日本薬学会第 136 年会. 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）.
⑤森美穂子、深澤航、伯耆原愛、栢植聡志、野中健一、松本厚子、野崎智義、大村智、塩見和朗. 微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ特異的システイン合成酵素阻害化合物の探索. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 3 月 28 日-30 日, 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）.
⑥栢植聡志、深澤航、森美穂子、野中健一、

松本厚子、野崎智義、大村智、塩見和朗.微生物代謝産物からの抗赤痢アメーバ物質の探索.日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年 3 月 28 日-30 日, 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）.
⑦酒井一成、森美穂子、柘植聡志、野中健一、増間碌郎、野崎智義、塩見和朗、大村智. 糸状菌が生産する赤痢アメーバ特異的システイン生合成経路阻害物質. 日本菌学会第 59 回大会. 2015 年 5 月 16 日-17 日, 那覇市ぶんかテンブス館（沖縄県那覇市）.
⑧柘植聡志、森美穂子、野中健一、松本厚子、野崎智義、大村智、塩見和朗. 微生物代謝産物からの抗赤痢アメーバ物質の探索. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学津島キャンパス（岡山県岡山市）.
⑨酒井一成、森美穂子、野中健一、松本厚子、野崎智義、大村智、塩見和朗. 微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ特異的含硫アミノ酸代謝経路阻害物質の探索. 日本農芸化学会 2015 年度大会. 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学津島キャンパス（岡山県岡山市）.

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

○取得状況（計　0 件）

〔その他〕
ホームページ等
北里生命科学研究所微生物応用化学研究室
http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/labo/BioFuncWeb/Index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
森　美穂子（MORI Mihoko）
北里大学大学院感染制御科学府　助教
研究者番号：20425648

(2)研究分担者
なし.

(3)連携研究者
なし.

(4)研究協力者
野崎　智義（NOZAKI Tomoyoshi）
国立感染症研究所　部長
筑波大学　教授（兼任）