

氏名（本籍）	中 楯 奨	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙 第195号	
学位授与年月日	平成24年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	<i>Eupenicillium javanicum</i> の代謝産物の研究	
論文審査委員	主 査	教 授 河 合 賢 一
	副 査	教 授 東 山 公 男
	副 査	教 授 森 田 博 史

論文内容の要旨

生物は、長い進化の過程でそれぞれが様々な化合物の生産能力を獲得してきた。生物の生産する天然有機化合物は、構造上極めて多様である。天然有機化合物は、構造の多様性によりもたらされる多彩な生物活性から医薬品などの供給源として古くから人類に多大な恩恵を与え、その探索源として世界中の様々な生物種が用いられてきた。真菌類を利用した創薬は、1929年に Fleming による *Penicillium notatum* からペニシリンの発見に始まる。今日までに、*P. griseofulvum* から抗真菌抗生物質グリセオフルビン、*Eupenicillium brefeldianum* から免疫抑制剤ミゾリビンがそれぞれ単離され、医薬品として利用されている。また、複数の *Penicillium sp.*より報告された mycophenolic acid、*P. brevicompactum* から発見された compactin は、リード化合物として活用され、前者からミコフェノール酸モフェチル、後者からスタチン類が開発され、世界中で使用される医薬品となっている。

2010年10月、生物多様性条約締結国会議 COP10 が名古屋で開催され、愛知目標と名古屋議定書が採択された。その結果、国外の生物種の利用は一段と厳しい段階となった。日本の国土は小さいが、その気候や変化に富む地形、豊かな自然から、菌類にとって多彩な生育環境を有している。特殊な環境で生活する菌類に注目する例もあるが、今回私は、地球上の広範囲に生息し、頻繁に分離される菌類に注目した。このような菌類は、種内多様性を示し、様々な化合物の生産能力獲得が予想される。そのため、医薬品リード化合物探索における有益な生物資源になりうると考えた。本研究に最適な菌種の一つとして、子

囊菌の中から *Eupenicillium* 属、Series *javanica* に属する *E. javanicum* を選択した。

シード化合物開発に向けた探索源としての有用性を検討するために、化学スクリーニングを行い、各菌株における代謝産物の生産性の特徴を調べることとした。また、深在性真菌症起因菌の1つ *Aspergillus fumigatus* に対する抗真菌活性を指標として生物活性スクリーニングを行い、生理活性物質の生産性について検討することとした。

日本国内土壌から分離された *E. javanicum* の 22 菌株を用いて、代謝産物の化学スクリーニングとして TLC 分析を行った。その結果、菌株により多様な骨格の代謝産物を生産する菌であることが予想された。その際、発色試薬により特徴的な呈色を示す化合物がより多く検出された IFM 54704 株および 59075 株の代謝産物の単離・構造決定を行った。

IFM 54704 株の代謝産物から、新規化合物 eujavanicol A (1)、B (2)、C (3)、および javanicunine A (4)、B (5) を単離した。化合物 1、2 および 3 の構造は、各種機器データの解析から、デカリン誘導体であると決定した。それぞれを tri-*p*-bromobenzoate に誘導し、励起子カイラリティー法を適用することにより、絶対配置を決定することとした。なお、3 は、共役ケトンの影響を除くために得られた誘導体のケトン還元したものを使用した。それらの結果をもとに、1 と 3 を 5*S*,6*R*、2 を 5*S*,6*S* の図に示す絶対構造と決定した。新規デカリン誘導体 1~3 は、化学スクリーニングを行った 22 菌株のエキスのうち、本菌株のみに存在するものであった。また、4 および 5 は、各種機器データの解析から、ジオキソモルフォリン誘導体と決定した。化合物 4 を酸性条件でトリプトファンに導き、キラル TLC を用いて、そのトリプトファンが L 体であることを明らかにし、4 の絶対構造を決定した。化合物 4 と 5 は同一菌株から単離されたことから、生合成を考慮し、5 を 4 と同様の絶対構造と推定した。新規ジオキソモルフォリン誘導体 4 および 5 は、用いた 22 菌株のエキスのうち、2 菌株 (IFM 54704, TM-135) に存在するのみであった。これまでに天然から得られたトリプトファン由来のジオキソモルフォリン誘導体は *E. molle* から分離された mollenine A、B、*A. niveus* から単離された電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性物質 PF1233A、B の 4 例のみと希少な骨格の化合物であった。

IFM 59075 株の代謝産物から、インドールジテルペン 10,23-dihydro-24,25-dehydroflavinine (10)、nominine (11)、さらに 4 種の新規インドールジテル

ペン 17-hydroxyeujindole (12)、17-oxoeujindole (13)、8,21-dehydro-17-hydroxy eujindole (14)、8,21-dehydro-17,21-epoxyeujindole (15)、を単離した。NMRを中心とした各種機器データの解析により、12~15の構造を決定した。天然から多くのインドールジテルペンが報告されているが、eujindole類のようなインドール環の3位、4位とジテルペン部分が環化した構造は、*Petromyces muricatus*から分離された petromindole の1例のみと、特異な構造であった。化合物13のC/D環に着目すると、cis-decalone環となり、Kirkらの方法に従いCDスペクトルにおけるオクタント則を適用して絶対構造を決定した。化合物10~15は、いずれも11から生合成されてくるものと考えられた。そのため、12、14および15、未だ絶対構造の決定されていない10および11は、いずれも本研究で同一菌株から得られたことから、13と同様の絶対構造であると推定した。また、TM-701株から10、12、13および15、TM-135株から10、12および13の存在を確認したが、その他の菌株からは確認されなかった。

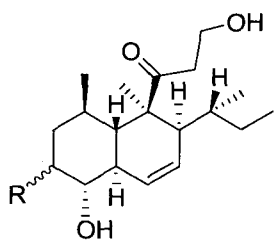
化学スクリーニング時に用いた22菌株のうち4菌株(IFM 54704, 58214, BS-13-4, TM-701)に抗真菌活性が認められた。これまでに *E. javanicum*から単離された抗真菌活性物質に compactin ラクトン開環体が知られている。活性を示した4菌株の代謝産物中に compactin ラクトン開環体は確認されず、新たな生理活性物質の発見が期待された。そこで、IFM 58214株および54704株の抗真菌活性物質の分離を行った。

IFM 58214株の活性本体は、炭酸水素ナトリウム水溶液で水層へ転溶し、塩酸酸性水溶液でエーテルに転溶することからカルボキシル基を有する酸性化合物であると推定された。そこで、活性を示す分画について CH_2N_2 で処理し、カルボン酸を有する化合物をメチル化し、得られたメチルエステルを分離後、加水分解して活性本体を特定することとした。その結果、活性分画中に spiculisporic acid (16) および 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (17) の存在が明らかとなった。活性本体探索の過程で得られた化合物について *A. fumigatus* に対する抗真菌活性試験を行った結果、17を本菌株の活性本体であると決定した。また、17のメチルエステル体19にも弱いながら抗真菌活性が認められ、活性発現に無水マレイン酸の部分構造が関与し、遊離カルボン酸が活性の強度に影響することが考えられた。化合物16はマイコトキシンとして知られ、また誘導体とともに微生物由来の界面活性剤バイオ・サーファクタントとして研究がなされているが、今回17および19の抗真菌活

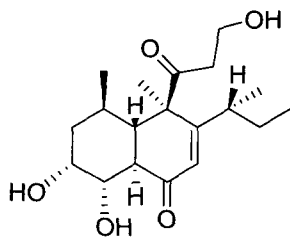
性を初めて明らかにした。

IFM 54704 株から化学スクリーニング時に得られた化合物は、抗真菌活性を示さなかった。そこで、改めて培養を行い、活性本体の eujavanicin A (**24**)を単離した。化合物 **24** は、IR スペクトルおよびその挙動から環状デブシペプチドと推定され、各種機器分析データの解析から、9つのアミノ酸残基と1つの乳酸残基で構成された平面構造を決定した。化合物 **24** の構成アミノ酸の立体化学は、6mol/L 塩酸を用いたアミノ酸分解後、キラルカラムを用いた HPLC 分析により乳酸を D 体と決定し、Marfey 法により各アミノ酸を全て L 体と決定した。*A. fumigatus* に対する抗真菌活性試験を行ったところ、**24** は強い活性を示したが、メチルエステル体 **25** では活性が消失し、活性発現には遊離カルボン酸が必須であると分かった。**24** は、他の病原微生物 (*A. niger*、*Candida albicans*、*Bacillus subtilis* 等) に対する活性を示さず、*A. fumigatus* に対して特異的に抗真菌活性を示す化合物であると明らかになった。また、BS-13-4 株および TM-701 株の代謝産物中においても今回得られた活性物質 **17** および **24** は確認されなかった。

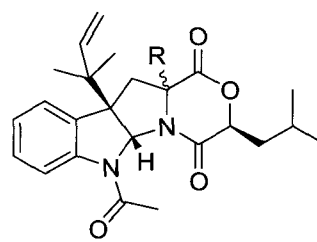
以上のことから、*E. javanicum* は、多彩な代謝産物を生産する能力を獲得した種内多様性を示す真菌であると考えられた。また、国内の潜在的資源を利用した医薬品シード化合物探索において、地球上の広域に生息し、頻繁に分離される真菌類の可能性を示すものと考えられた。



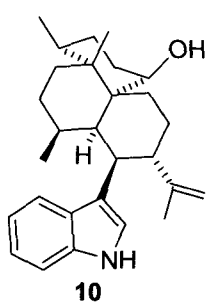
1 : R = α -OH
 2 : R = β -OH



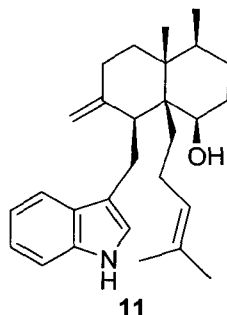
3



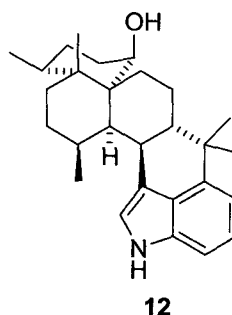
4 : R = α -H
 5 : R = β -OH



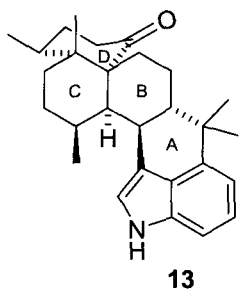
10



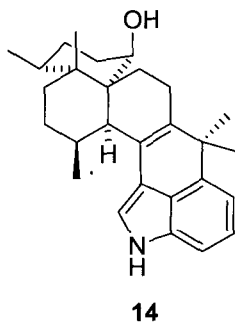
11



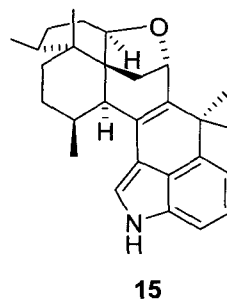
12



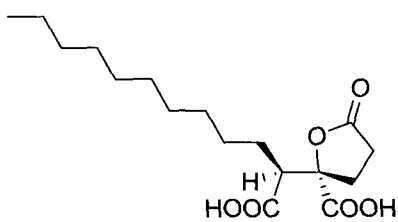
13



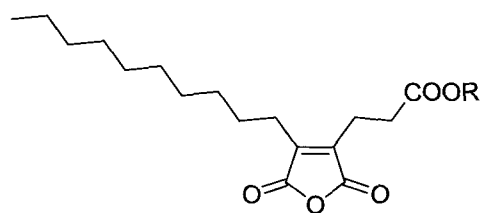
14



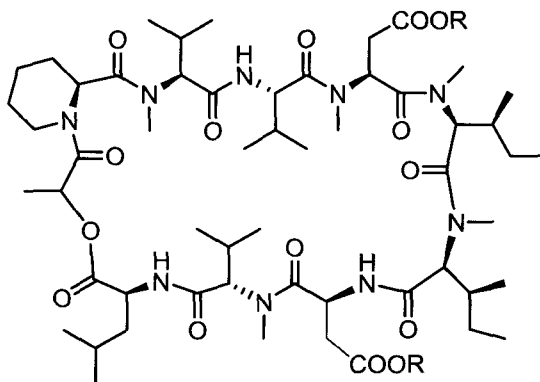
15



16



17 : R = H
 19 : R = Me



24 : R = H
 25 : R = Me

論文審査の結果の要旨

本論文の申請者は、日本の土壌からも頻繁に分離される *Eupenicillium javanicum* に着目し、その 22 菌株について、代謝産物の化学スクリーニング及び抗真菌活性スクリーニングを行った結果、化学スクリーニングから IFM 54704 株及び IFM 59075 株から代謝産物の分離を、また、抗真菌活性スクリーニングから IFM 54704 及び IFM 58214 株から活性本体の単離を行っている。

まず、*E. javanicum* IFM 54704 株の代謝産物として既知化合物 2 種とともに 5 種の新規化合物 eujavanicol A、B、C 及び javanicunine A、B を単離した。Eujavanicol A、B 及び C の構造は、NMR を中心とした各種機器データの詳細な解析からデカリン誘導体である相対構造を決定し、それぞれを tri-*p*-bromobenzoate に誘導し、励起子キラリティー法を適用してそれらの絶対構造の決定に至っている。また、これらの新規デカリン誘導体は上記 22 菌株のうち本菌株のみに存在することを確認した。新規ジオキソモルフォリン誘導体 javanicunine A 及び B は各種機器データの詳細な解析から相対構造を、また、それらの絶対構造はそれぞれを加水分解して l-tryptophan が得られたことから決定した。また、新規ジオキソモルフォリン誘導体は上記 22 菌株のうち 2 菌株のみに存在することを確認した。

E. javanicum IFM 59075 株からは既知アフラビニン型インドロジテルペン 2 種とともに 4 種の新規アフラビニン型インドロジテルペン 17-hydroxyeujindole、8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole、17-oxoeujindole、8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole を単離し、それらの相対構造を NMR を中心とした各種機器データの詳細な解析から決定している。また、アフラビニン型インドロジテルペンは現在まで相対構造が知られているのみであったが、今回、新たに構造を決定した 17-oxoeujindole を用いてオクタント則を適用することによりその絶対構造を決定するとともに、類縁のアフラビニン型インドロジテルペンの絶対構造を推定している。さらに、これらの化合物は上記 22 菌株のうち 2 菌株に存在することを確認した。

E. javanicum IFM 58214 株の抗真菌活性本体は、単離が容易でなく、分離操作の過程で液性の変化や加熱等によりしばしば失活することがあったので、活性を有する分画をメチルエステルとした後、分離・精製を行い、何種類かのメチルエステル体を分離し、最終的に加水分解して活性本体の単離に成功した。本菌の抗真菌活性本体は maleic anhydride 誘導体である [2-(2-carboxyethyl)-3-

decylmaleic anhydride であり、その活性評価を行い、*Aspergillus fumigatus* に対して 3.1mg/disc で阻止円を形成することを確認した。既に成分検索を行った *E. javanicum* IFM 54704 株に関しては、前述の化合物はすべて抗真菌活性を有しなかったため、改めて培養エキスを抗真菌活性を指標に精製を繰り返した結果、活性本体として環状デプシペプチド eujavanicin A を単離した。本化合物の構造は各種機器データの解析、特に 1D-TOCSY でアミノ酸組成を決定し、1H-1H COSY 及び HMBC の相関から各残基の結合様式を決定した。この構造はエステルのみをメタノリシスして得られる鎖状ペプチドの TOF MS の解析からも確認した、本化合物の絶対構造は加水分解で得られる構成アミノ酸のそれぞれの絶対構造から決定した。さらに、本化合物は *Aspergillus niger*、*Candida albicans*、*Batillus subtilis* 等には全く活性を示さず、*Aspergillus fumigatus* にのみ強い抗真菌活性を有することを明らかにした。

以上の研究内容から、本論文は学位論文として充分評価しうるものであり、申請者に博士（薬学）の学位を授与するに値するものであると判断する。