

コルジセピンの誘導体化による 分解耐性が高い核酸代謝拮抗剤の開発

研究代表者： 櫻井 明彦（工学系部門・教授）
共同研究者： 山内 高弘（医学系部門・教授）

概 要
冬虫夏草 <i>Cordyceps militaris</i> が生産するコルジセピンは高い生理活性を示すが、生体内ではアデノシンデアミナーゼにより酸化され生理活性が著しく低下する。そこでコルジセピンを基本骨格とする核酸代謝拮抗剤の開発を目指し、生体内での分解耐性を有するコルジセピン誘導体の合成を検討した。また、合成した誘導体の増殖抑制効果および耐分解性を評価した。コルジセピン誘導体は、ピリジン中でカルボン酸無水物とコルジセピンとを反応させることにより簡便に合成が可能であり、合成物は塩酸/クロロホルムで抽出することにより高収率で回収可能であった。得られたコルジセピン誘導体の中でアセチルコルジセピンとプロピオニルコルジセピンは、日和見感染菌に対して強い増殖抑制効果を示した。
関連キーワード
冬虫夏草、抗腫瘍物質、コルジセピン、増殖抑制、分解耐性

研究の背景および目的

【研究の背景】冬虫夏草サナギタケが生産する固有成分であるコルジセピン (3'-デオキシアデノシン、図1) は、生体内でアデノシンのアナログとして働き、核酸の伸長を阻害することにより抗腫瘍作用を発揮する。*in vitro* 実験では多くのガン細胞に対して抗腫瘍性を示すことが報告されているが、天然のサナギタケの資源量が少ないこと、さらに子実体中のコルジセピン含有量が非常に低いことから工業的な生産には至っていない。また、コルジセピンは *in vivo* 実験では生体内でアデノシンデアミナーゼにより分解されるため、その効果が *in vitro* に比べて低下することが知られている。このため、コルジセピンの大量生産技術、および生体内でのコルジセピンの効果を持続させる方法の開発が期待されている。

コルジセピンの生産技術については、当研究室でイオンビーム照射によりコルジセピン高生産変異株の作出に成功し、培養条件の最適化により実用レベルのコルジセピン生産性を得ることに成功している。

生体内でのコルジセピンの効果を持続させる方法としては、1) コルジセピンとともにアデノシンデアミナーゼの阻害剤を投与する、2) コルジセピンをマイクロカプセルなどに包括して分解速度を低下させる、3) コルジセピンを化学的に修飾することによって分解性を低下させる、等の方法がある。

【目的】本研究では、生体内での耐分解性が高い新たな核酸代謝拮抗剤の開発を目指し、生体への影響が小さく最も簡便な方法としてコルジセピンの誘導体化 (図2 参照) を検討した。

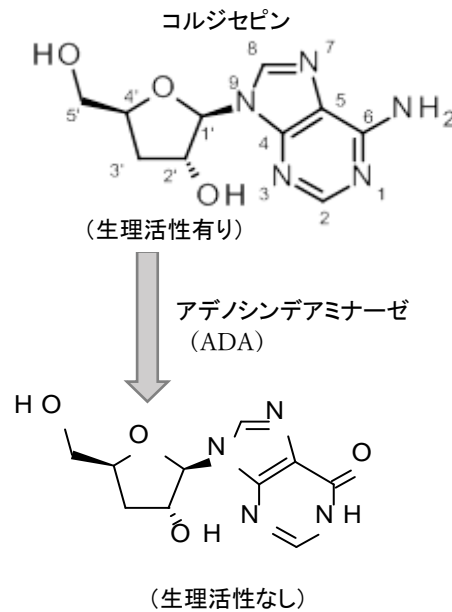


図1 コルジセピンの構造と生体内での不活性化

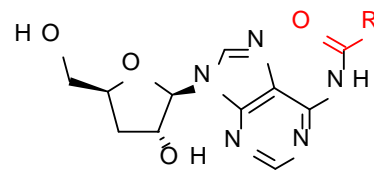


図2 コルジセピン誘導体の一例

研究の内容および成果

【コルジセピンの誘導体化】コルジセピンの6位アミノ基をカルボン酸無水物によって誘導体化（アシル化）する反応条件について検討した。カルボン酸無水物としては、無水酢酸、無水プロピオン酸、無水フタル酸を用い、溶媒としてはピリジンを用いた。

無水酢酸とコルジセピンとを反応させると、アミノ基だけではなくヒドロキシ基も反応し、1置換体、2置換体、3置換体のアセチルコルジセピンの混合物が生成することが分かった。無水フタル酸の場合も同様であったが、無水プロピオン酸の場合には1置換体のみが生成した。次に反応温度を25~70℃の範囲で検討したところ、40℃以上では60分間でほぼ反応が完結しているが若干の分解が確認された。一方、25℃では反応速度が低く反応の終了までに120分以上が必要であったが、原料や生成物の分解が見られなかったことから、25℃で180分間の反応を基本条件とした。

合成で得られたコルジセピン誘導体の回収について、カラムクロマトグラフィーや抽出などの方法を検討したところ、塩酸/クロロホルムで抽出することにより、高収率で回収できることが明らかとなった。

【コルジセピン誘導体の抗菌性及び分解耐性】

得られたコルジセピン誘導体の抗菌性を6種類の日和見感染菌 (*Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus epidermidis*) を用いて評価した。コルジセピンフタレートは *E. aerogenes* に強い増殖抑制効果を示したが、サルモネラ菌 *S. enterica* や表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis*、緑膿菌 *P. aeruginosa* への抑制効果は低く、セレウス菌 *B. cereus* に対しては全く効果を示さなかった。一方、プロピオニルコルジセピンとアセチルコルジセピンは、すべての菌に対して強い増殖抑制効果を示した。代表例として緑膿菌 *P. aeruginosa* に対する各種コルジセピン誘導体の増殖抑制効果を図3に示す。

次に緑膿菌の培養液中のコルジセピン誘導体濃度をHPLCで追跡した結果を図4に示す。コルジセピンは培養36時間で80%程度分解されていたが、抗菌性を示したプロピオニルコルジセピンはほと

んど分解されていなかった。同様に抗菌性を示すアセチルコルジセピンもほとんど分解されなかった。一方、コルジセピンフタレートは、分解されなかったが抗菌性も示さなかった。これは、大きな置換基が導入されたために、アデノシンのアナログとして認識されず、生理活性を示さなかったためと考えられる。

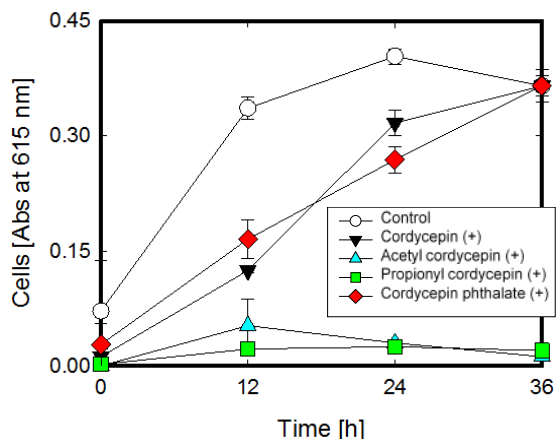


図3 *P. aeruginosa* に対するコルジセピン及びその誘導体の抗菌作用

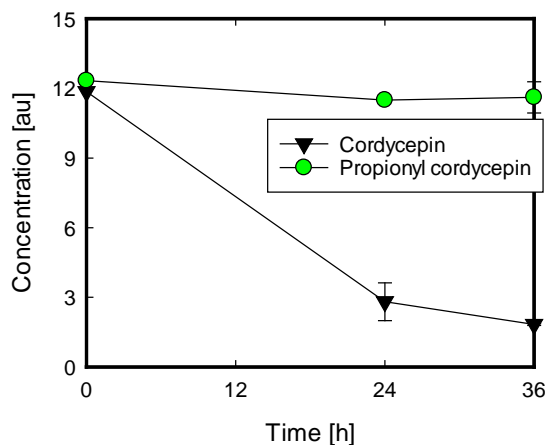


図4 *P. aeruginosa* 培養液中のコルジセピン及びその誘導体の濃度変化

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- 櫻井明彦：冬虫夏草サナギタケを使った生理活性物質の生産、第8回化粧品開発展 CosmeTech2018、幕張メッセ
- 小楠夏海、増田美奈、櫻井明彦：冬虫夏草を用いた液体表面培養によるコルジセピン生産のスケールアップ、化学工学会第49回秋季大会

「特記事項」

コルジセピン誘導体に関する特許を申請予定

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 若狭湾エネルギー研究センター・公募型共研・2017.8-2018.2・冬虫夏草変異株を用いた新規抗腫瘍物質の生産・代表・採択・190万円