

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B1)

(11)特許番号

特許第7279832号

(P7279832)

(45)発行日 令和5年5月23日(2023.5.23)

(24)登録日 令和5年5月15日(2023.5.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 1/04 (2006.01)

C 1 2 P 1/04

A

A 6 1 K 35/74 (2015.01)

A 6 1 K 35/74

E

A 6 1 P 31/10 (2006.01)

A 6 1 P 31/10

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

A

請求項の数 5 (全8頁)

(21)出願番号 特願2022-55718(P2022-55718)

(22)出願日 令和4年3月30日(2022.3.30)

審査請求日 令和4年3月30日(2022.3.30)

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-03614

NPMD NITE BP-03615

NPMD NITE BP-03616

NPMD NITE BP-03617

早期審査対象出願

(73)特許権者 000006231

株式会社村田製作所

京都府長岡京市東神足1丁目10番1号

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 高田 雅親

京都府長岡京市東神足1丁目10番1号

株式会社村田製作所内

(72)発明者 砂原 博文

京都府長岡京市東神足1丁目10番1号

株式会社村田製作所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な抗真菌物質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

アシディピラ属細菌由来の抗真菌物質を含み、酵母を標的とする、抗真菌剤。

【請求項2】

アシディピラ属細菌が *Acidipila* sp. MT3株(受託番号NITE BP-03614)、MT4株(受託番号NITE BP-03615)、MT5株(受託番号NITE BP-03616)、またはMT6株(受託番号NITE BP-03617)である、請求項1記載の抗真菌剤。

【請求項3】

アシディピラ属細菌を培養することを含む、酵母を標的とする抗真菌剤の製造方法。

【請求項4】

アシディピラ属細菌が *Acidipila* sp. MT3株(受託番号NITE BP-03614)、MT4株(受託番号NITE BP-03615)、MT5株(受託番号NITE BP-03616)、またはMT6株(受託番号NITE BP-03617)である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

Acidipila sp. MT3株(受託番号NITE BP-03614)、MT4株(受託番号NITE BP-03615)、MT5株(受託番号NITE BP-03616)、またはMT6株(受託番号NITE BP-03617)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アシディピラ（Acidipila）属細菌由来の抗真菌物質に関する。

【背景技術】

【0002】

1981年から2019年までで全世界で承認されている医薬品の内、天然物を基本骨格とした誘導体化合物や天然物の構造を模倣した合成化合物を含めると、半分以上の医薬品が天然物由来である（非特許文献1）。かなりの数の天然物由来医薬品が、実際には微生物によって生産されている。このことは、微生物由来の天然物の探索が医薬品開発において非常に重要であることを示している。

10

【0003】

なかでも、放線菌は、ストレプトマイシンの発見以来、新薬の探索源として最も注目されている微生物の一群である。放線菌は、二次代謝産物に関連する生合成遺伝子群を多く持ち、化学的に多様性に富んだ二次代謝産物を生産する菌群として知られている。放線菌由来で実用化された抗生物質は数百化合物にのぼり、まさに天然物探索源として最も重要な分類群である。

【0004】

しかし、微生物や真菌の病気に対する医薬品の研究開発を継続する場合、投資に対するリターンが「継続費用」に見合わないことが問題視され、現在では天然物由来のこれらの医薬品を積極的に探索している製薬会社はほとんど存在しない。特に抗真菌剤の開発は深刻な状況にあり、2006年以降、天然物由来の抗真菌剤の新薬はない。その一方で、新しい感染性真菌が患者から発見されており、新規抗真菌剤の開発が望まれている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】J Nat Prod 2020 Mar 27;83(3):770-803, "Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019"

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、多様性に富んだ二次代謝産物を生産する新たな培養可能な微生物群を探索して、新規な抗真菌化合物を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記したように医薬品のための天然物探索源としては放線菌が主流であったが、本発明者らは、新たに二次代謝産物生産能が高いアシドバクテリウム（Acidobacteria）門細菌に着目した。アシドバクテリウム門細菌は、その多くが土壌中に存在するグラム陰性細菌であり、培養が難しいため、ほとんどが未培養微生物である。本発明者らは、鋭意研究の結果、驚くべきことに、アシドバクテリウム門細菌の中でもアシディピラ（Acidipila）属の菌群が抗真菌物質を産出することを見出した。さらに、本発明者らは、新規なアシディピラ属細菌を単離した。かくして、本発明を完成させた。

40

【0008】

本発明は、以下を提供する。

【1】アシディピラ属細菌由来の抗真菌物質。

【2】アシディピラ属細菌が *Acidipila* sp. MT3株（受託番号NITE BP-03614）、MT4株（受託番号NITE BP-03615）、MT5株（受託番号NITE BP-03616）、またはMT6株（受託番号NITE BP-03617）である、【1】記載の抗真菌物質。

【3】【1】または【2】記載の抗真菌物質を含む抗真菌剤。

【4】アシディピラ属細菌を培養することを含む、抗真菌物質の製造方法。

50

〔5〕アシディピラ属細菌が *A A c i d i p i l a* sp. MT3株（受託番号NITE BP-03614）、MT4株（受託番号NITE BP-03615）、MT5株（受託番号NITE BP-03616）、またはMT6株（受託番号NITE BP-03617）である、〔4〕記載の方法。

〔6〕*A c i d i p i l a* sp. MT3株（受託番号NITE BP-03614）、MT4株（受託番号NITE BP-03615）、MT5株（受託番号NITE BP-03616）、またはMT6株（受託番号NITE BP-03617）。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、アシディピラ属細菌由来の新規な抗真菌物質が提供される。該抗真菌物質は、真菌が引き起こす疾患を治療するための医薬品の有効成分として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本願の抗真菌物質を用いた抗真菌活性試験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本願の抗真菌物質は、アシディピラ属細菌が二次代謝物として産生する物質である。抗真菌物質とは、抗真菌活性を有する物質である。本願明細書において「抗真菌活性」とは、真菌の増殖を抑制または阻害する能力をいう。抗真菌活性は、当該分野で既知の方法で確認することができる。既知の方法には、例えば、Spot-on-lawn法、Direct法、ペーパーディスク法、MIC（minimum inhibitory concentration）法等がある。

【0012】

本願の抗真菌物質の標的となる真菌は特に限定されない。本願の抗真菌物質は、各種の酵母および糸状菌をはじめとする種々の真菌に対して抗真菌活性を有する。例えば、限定するものではないが、カンジダ（*Candida*）属、トリコフィトン（*Trichophyton*、白癬菌）属、コウジカビ（*Aspergillus*）属、アオカビ（*Penicillium*）属、ケタマカビ属（*Chaetomium*）属、クラドスポリウム（*Cladosporium*）属、アウレオバシジウム（*Aureobasidium*）属、グリオクラディウム（*Gliocladium*）属、ペシロマイセス（*Paecilomyces*）属等の微生物が挙げられ、さらに、*Candida albicans*、*Trichophyton mentagrophytes*、*Aspergillus niger*、*Penicillium funiculosum*、*Chaetomium globosum*、*Cladosporium cladosporioides*、*Aureobasidium pullulans*、*Gliocladium virens*、*Paecilomyces variotii*等が挙げられる。

【0013】

本願において、アシディピラ属細菌は、アシディピラ属に属するいずれの菌種および菌株であってもよい。例えば、限定するものではないが、アシディピラ・ディンゲンシス（*Acidipila dinghuensis*）、アシディピラ・ロゼア（*Acidipila rosea*）等の既知の菌種を用いてもよい。また、新たに単離したアシディピラ属細菌を用いてもよい。アシディピラ属細菌は、例えば、土壌から単離することができ、単離方法および選抜方法は、既知の方法にしたがって行ってもよく、または当業者が適宜決定することができる。例えば、限定するものではないが、DSMZ（German Collection of Microorganisms and Cell Cultures）GmbHが公開しているMedium 1426（「SSE/HD1:10」培地）等の既知の固体培地を用いて、例えば、25℃～35℃で24時間～30日間、好ましくは28℃～30℃で7～14日間培養してもよい。培養条件は、菌体の出現状況及び成育状況等に応じて、当業者が適宜決定すればよい。本願においては、アシディピラ属細菌が抗真菌物質を産生することを初めて見出した。したがって、本願において使用されるアシディピラ属細菌は、抗真菌物質産生能を有する。

【0014】

本願においてはさらに、アシディピラ属細菌の新規な4つの菌株が単離され、新種であ

10

20

30

40

50

ると同定された。これらをそれぞれ、*Acidipila* sp. MT3株、MT4株、MT5株、およびMT6株と名付け、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に2022年3月1日付で寄託した（それぞれ、受託番号NITE BP-03614、受託番号NITE BP-03615、受託番号NITE BP-03616、および受託番号NITE BP-03617）。したがって、本願の一実施態様では、*Acidipila* sp. MT3株、MT4株、MT5株、またはMT6株が用いられる。

【0015】

本願の抗真菌物質は、アシディピラ属細菌を培養することによって産生される二次代謝物である。アシディピラ細菌の培養方法は、特に限定されず、液体培養または固体培養のいずれであってもよいが、好ましくは、液体培養が用いられる。培養に用いられる培地は、細菌培養に使用される一般的な培地を用いればよく、例えば、限定するものではないが、DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) GmbHが公開しているMedium 1426（「SSE/HD1:10」培地）等が挙げられる。培養温度および培養時間は、当業者が適宜決定すればよく、特に限定されないが、例えば、25℃～35℃で24時間～30日間、好ましくは28℃～30℃で7～14日間培養してもよい。

【0016】

本願の抗真菌物質は、アシディピラ属細菌の培養物または培養上清から得ることができ、また、アシディピラ属細菌の培養物または培養上清そのものであってもよい。培養上清は、常法により得ることができる。例えば、遠心分離等によって菌体培養物から菌体を除去することによって得てもよい。培養上清は、さらに、濃縮、抽出、および／または精製工程に付してもよい。濃縮、抽出および精製工程は、常法によって行うことができ、例えば、真空濃縮、フィルターろ過、限外ろ過等の各種ろ過、メタノール等の有機溶媒による抽出、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー法、クロロホルムや酢酸エチルを用いた液液抽出等を用いても良い。精製は蒸留、逆抽出、カラムクロマトグラフィー、再結晶等を用いてもよい。

【0017】

本願はさらに、有効成分として本願の抗真菌物質を含む抗真菌剤を提供する。抗真菌剤は、組成物の形態であり、例えば、医薬組成物、化粧品組成物（例えば、シャンプー、コンディショナー、入浴剤等）、洗浄組成物（例えば、住居用洗浄剤、洗濯用洗剤、石鹸等）、食品添加用組成物、消毒薬組成物（たとえば食品、調理器具、病院等の建物の壁や床、及び机等の家具にも適用される）等が挙げられる。抗真菌剤は、本願の抗真菌物質の他に、医薬上許容される担体、賦形剤、溶剤、安定化剤、可溶化剤等の付加成分を含有していてもよい。抗真菌剤はさらに、本願の抗真菌物質に加えて、他の抗真菌物質を含有していてもよい。抗真菌剤は、いずれの剤形であってもよく、例えば、限定するものではないが、ローション、クリーム、パップ剤、軟膏、錠剤、散剤、カプセル剤、顆粒剤、シロップ剤、注入剤、注射剤、粒剤、粉末、溶液、懸濁液、ペースト、噴霧剤、ブロック等が挙げられる。抗真菌剤が医薬組成物である場合は、真菌症の治療薬として使用可能である。真菌症としては、例えば、限定するものではないが、白癬、カンジダ症、クリプトコックス症、アスペルギルス症等が挙げられる。

【0018】

以下、実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0019】

実施例1：新規なアシディピラ属細菌の同定

土壌から単離した4株のアシディピラ属細菌のゲノム配列を常法により決定し、16S rDNA解析、全ゲノム解析、およびANI (Average Nucleotide Identity) 解析を行った。16S rDNA解析では相同率98.7%以下、ANI解析ではANI値95%以

10

20

30

40

50

下が新種であるとみなされる。土壌からの菌体の単離は、DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) GmbHが公開しているMedium 1426「SSE/HD1:10」培地の1.5wt%寒天培地上で、30℃で2週間培養することによって行った。

【0020】

<16SrDNA解析>

菌体をアクロモペプチダーゼ（富士フィルム和光純薬製）で溶菌し、常法によりDNAを抽出し、PrimeSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ製）を用いてPCR増幅し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems製）を用いてサイクルシーケンスを行い、ChromasPro1.7（Technelysium製）で塩基配列を決定した。16SrDNAのV1～V4領域の約600塩基に関して、NCBI国際塩基配列データベースと照合して相溶性解析を実施し、簡易分子系統樹を作製し、種の同定を行った。その結果、単離した4株はいずれも、アシディピラ属の既知の種のうち、アシディピラ・ディングエンシスと最も高い配列相同性を示し、その16SrDNA相同率は、これらの4株がアシディピラ属の新種であることを示した（表1）。これら新種4株をそれぞれ、MT3、MT4、MT5、およびMT6と名付けた。

【0021】

<全ゲノム解析>

MT3、MT4、およびMT5株について、全ゲノム解析を実施し、この塩基配列を用いてANI解析を実施した。DNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen）を用いて各菌株からDNAを抽出し、Illumina DNA Prep（M）Tagmentationキットを使用してライブラリーを調製した。インデックスキットは、Nextera DNA CD Indexesキットを使用した。次世代シーケンサー（MiSeq, Illumina）を用いてシーケンスを実施した（301bpのペアエンド解析）。Platanus Bを用いてゲノムアセンブリを実施し、塩基配列を決定した。QUASTおよびcheckMを用いて、アセンブリ結果の評価を実施した。

【0022】

<ANI解析>

次に、EZbiocloud（<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>）を用いてANI値を算出し、菌株間の相溶性解析を実施した。NCBI国際塩基配列データベースに登録されているAcidipila dinghuensis DHOF10とAcidipila dinghuensis CGMCC 1.13007を基準株としてANI解析を実施したところ、いずれもANI値が95%未満であり、新種であることが確認できた（表1）。また、MT3、MT4、MT5株で相同性が異なることから、これらが別々の遺伝子情報を持つ菌株であることが推測された。

【0023】

【表1】

株名	16SrDNA解析		全ゲノム解析	
	相同率が高かった種名	相同率	比較株	ANI値
MT3	<i>Acidipila dinghuensis</i>	96.5%	<i>Acidipila dinghuensis</i> DHOF10	71.5%
			<i>Acidipila dinghuensis</i> CGMCC 1.13007	71.3%
MT4	<i>Acidipila dinghuensis</i>	97.2%	<i>Acidipila dinghuensis</i> DHOF10	71.4%
			<i>Acidipila dinghuensis</i> CGMCC 1.13007	71.5%
MT5	<i>Acidipila dinghuensis</i>	97.2%	<i>Acidipila dinghuensis</i> DHOF10	71.2%
			<i>Acidipila dinghuensis</i> CGMCC 1.13007	71.1%
MT6	<i>Acidipila dinghuensis</i>	97.2%		

【実施例 2】

【0024】

実施例 2：生産用培地におけるアシディピラ属細菌の培養と培養濃縮液の作製

抗真菌物質生産用培地を準備し、500mL 三角フラスコに各100mL ずつ分注し、オートクレーブにて121℃/20min 滅菌処理した。オートクレーブ処理後に、あらかじめ液体培養した各菌株液を1mL 添加した。この作業は安全キャビネット内の無菌状態で行った。シェーカーにて27℃、210rpm、6日間攪拌培養して二次代謝産物を産生させた。その後、培養液に等量(100mL) メタノールを添加し、210rpm、30分間攪拌した。攪拌後に遠心分離処理3000rpm、10分間を行い、菌体を除去し、上澄み液を1L ナスフラスコに移した。湯浴40℃のエバポレーターにて濃縮作業を行った。徐々に真空度を高めて、80hPa まで引いて、メタノールを取り除くことで、培養濃縮液サンプルを得た。

10

【0025】

なお、菌株として、*Acidipila* sp. MT3株、MT4株、MT5株、およびMT6株を用いた。菌株の液体培養(前培養)には、YD培地(1%グルコース、1%酵母エキス)を用い、30℃で6日間培養してOD600が1~1.5まで増殖させた。抗真菌物質生産用培養としては、前記Medium 1426培地を用い、28℃で14日間培養した。

【実施例 3】

【0026】

実施例 3：抗真菌活性試験 (Spot-on-lawn アッセイ)

検定菌としてサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (NBRC 10505) を用いた。MRS (Becton, Dickinson and Company製) 液体培地に接種し、30℃、150rpm、1日間攪拌培養を行い、検定菌液を作製した。MRS 軟寒天培地(寒天0.5%)を試験管に7mL 分注し、オートクレーブ滅菌(105℃/10分間)を行ない、55~60℃まで冷却した。上記液体培地で培養した検定菌液70μL を各軟寒天培地に加えて、攪拌機を用いて攪拌した。予め作製したMRS 寒天培地プレート(寒天1.5%)上に、上記軟寒天培地を流し込み、抗真菌活性試験用培地を作製した。プレート上のアドレスを決定して、実施例2で得られた培養濃縮液サンプルを10μL スポットした。30℃で24時間培養し、目視で観察した。この実験では、抗真菌活性があった場合には阻止円が確認できる。

30

【0027】

その結果、4種の菌株のいずれの培養濃縮液においても阻止円が確認された(図1)。したがって、アシディピラ属細菌の培養濃縮液が抗真菌活性を示すことが分かった。

40

50

【要約】

【課題】本発明は、新規な抗真菌物質を提供することを目的とする。

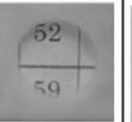
【解決手段】アシディピラ属細菌由来の抗真菌物質、およびその製造方法が提供される。

【選択図】なし

【図面】

【図 1】

図1

MT3株	MT4株	MT5株	MT6株
			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 FEMS Microbiol. Lett., 2011年, Vol. 317, pp. 138-142

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2016年, Vol. 66, pp. 76-83

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12P 1/00-41/00

C12N 1/00-1/38

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

PubMed