

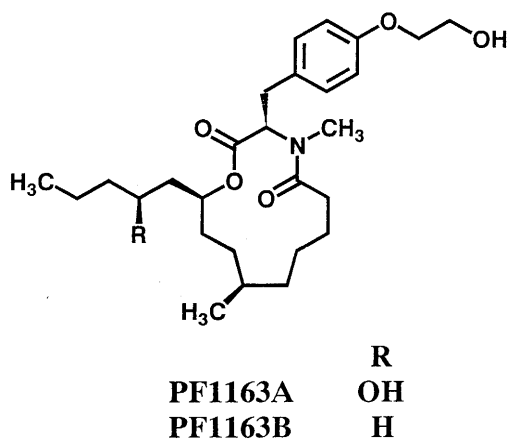
氏名	の 能 せ ひろし 博 勢 博
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 687 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	新 規 抗 真 菌 化 合 物 PF1163A と B の 探 索 と エ ル ガ ス テ ロ ー ル 阻 害 メ カ ニ ズ ム の 解 明

論文調査委員 (主 査)
教 授 富 岡 清 教 授 河 合 明 彦 教 授 竹 本 佳 司

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、真菌類に特異的に存在するエルゴステロール生合成系を阻害する新規な構造を有する抗真菌化合物の発見を目指し、微生物2次代謝産物を中心にその探索を行った。

抗 *C. albicans* 活性およびエルゴステロール阻害活性を指標にしてスクリーニングした結果、*Penicillium* 属に属する PF1163 株の培養液より新規抗真菌化合物である PF1163A と PF1163B を見出した。構造解析により、両化合物ともに *N*-メチルチロシン残基と脂肪酸よりなる13員環構造を有するユニークな化合物であることが判明した。



新規でユニークな構造を有する PF1163A, B 化合物の作用メカニズムを詳細に解析するために、PF1163A 処理後のステロール成分の解析を行った。PF1163A 物質で *S. cerevisiae* を処理したところ、ラノステロールと異なるステロールの蓄積が認められた。MS 解析の結果から、そのステロール成分は 4,4-dimethylzymosterol であることが分かった。したがって、PF1163A は C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していることが推定された。

ステロールの分析結果より、PF1163A が C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していると推定されたが、それを証明するための実験として C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) の温度感受性株 mERG25 を作製した。この mERG25 株を許容温度 (28°C) で培養した場合、ステロール成分解析結果は野生株 ssERG25 と同じであった。しかし、非許容温度下 (37°C) で培養しステロール成分を分析すると野生株と異なるステロール成分が観察された。MS 解析の結果、このステロールは 4,4-dimethylzymosterol であることが判明した。この温度感受性株のステロール解析結果は、PF1163A 処理後のステロール解析結果と一致した。この実験結果は、PF1163A が C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していることを示唆するものであった。

ステロール成分の分析および温度感受性株の解析結果より、PF1163 物質が C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していることが推定された。さらにそのことを証明するために遺伝子過剰発現株を作製し、各種薬剤に対する感受性試験

を行った。感受性試験の結果、*ERG11* 遺伝子を過剰発現する *ERG11* 株は fluconazole に対して耐性を示し、*ERG25* 遺伝子を過剰発現する *ERG25* 株は PF1163A に対して耐性を示した。

以上の結果より、*Penicillium* 属に属する PF1163 株の培養液中より見出された新規抗真菌化合物 PF1163A は、C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害して、エルゴステロール生合成を阻害し、その結果、抗真菌活性を示すことが証明された。これまでに C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) の阻害剤報告はなく、筆者が見出した PF1163A, B は世界初の C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) の阻害剤である。

PF1163A の各種誘導体を PF1163A から化学合成して阻害活性を評価したが、天然物に勝るものは見つからなかった。

以上本研究は、臨床上有用で新規な抗真菌薬の開発基盤を構築したものである。

論文審査の結果の要旨

抗真菌薬は数多く開発されているものの、決め手に欠けるのが現状である。幾つかの薬剤ターゲットの一つとして、真菌類のエルゴステロール生合成系を阻害する薬剤が知られているが、まだまだ開発の必要が有る分野である。本研究では薬剤ターゲットとして真菌類のエルゴステロール生合成系に焦点を当て、その阻害物質をカビから見だし、特に、新規な標的酵素を阻害する新規化合物の探索に力を注いだ。その結果、1. カビの2次代謝産物より新規な構造を有する PF1163 A および B を見出した。さらにその作用メカニズムを詳細に検討し、2. 化合物 PF1163 がステロールの4位の脱メチル化に関与する酵素 C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害することを証明した。これまでに本酵素を標的とする阻害剤の報告はなく、本論文により C-4 sterol methyl oxidase が新たな抗真菌薬のターゲットとなり得ることが初めて示唆された。

抗 *C. albicans* 活性およびエルゴステロール阻害活性を指標にしたスクリーニングの結果、*Penicillium* 属に属する PF1163 株の培養液より新規抗真菌化合物である PF1163A と PF1163B を見出した。その構造解析は、本体そのものでは複数のコンホメーション平衡が存在するために、NMR での分解能が低かった。そのため、ラク톤をアルカリ加水分解した開環体カルボン酸で NMR 構造解析を行った。更に、結晶化にも成功したので、その構造を、相対配置を含めて X 線結晶構造解析によって決定することができた。その結果、両化合物ともに *N*-メチルチロシン残基と脂肪酸よりなり、フェノール性水酸基がヒドロキシエチル化されたチロシンの *N*-メチルアミノ酸官能基が共に環に組み込まれたラクトンとラクタム構造を特徴とする13員環を有するユニークな新規環状化合物であることがわかった。二種の化合物の差は、側鎖アルキル基上の水酸基の有無に基づくもので、環構造は同じであった。

新規でユニークな構造を有する PF1163A, B 両化合物の阻害作用発現メカニズムを詳細に解析するために、PF1163A 処理後のステロール成分の解析を行った。PF1163A 化合物で *S. cerevisiae* を処理すると、ラノステロールと異なるステロールの蓄積が認められた。MS 解析の結果から、そのステロール成分が 4,4-dimethylzymosterol であることが分かった。したがって、化合物 PF1163A は C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していることが推定された。

その阻害を証明する実験を行うために、C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) の温度感受性株 m*ERG25* を作製した。m*ERG25* 株を許容温度 (28°C) で培養すると、ステロール成分解析結果は野性株 ss*ERG25* と同じであるが、非許容温度下 (37°C) で培養すると、野性株とは異なるステロール成分が観察された。MS 解析の結果、このステロールは予想通り 4,4-dimethylzymosterol であった。以上の温度感受性株のステロール解析結果は、PF1163A 処理後のステロール解析結果と一致し、PF1163A が C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していることを強力に示唆するものであった。

ステロール成分の分析および温度感受性株の解析結果より、PF1163 物質が C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害していることが推定された。さらにそのことを証明するために遺伝子過剰発現株を作製し、各種薬剤に対する感受性試験を行った。感受性試験の結果、*ERG11* 遺伝子を過剰発現する *ERG11* 株は、fluconazole に対して耐性を示し、*ERG25* 遺伝子を過剰発現する *ERG25* 株は PF1163A に対して耐性を示した。

以上の結果より、*Penicillium* 属に属する PF1163 株の培養液中より見出された新規抗真菌化合物 PF1163A は、C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) を阻害して、エルゴステロール生合成を阻害し、その結果、抗真菌活性を示すことが証明された。PF1163A, B は世界初の C-4 sterol methyl oxidase (*ERG25*) の阻害剤である。

PF1163A の置換基変換および開環させた各種誘導体を PF1163A から化学合成して阻害活性を評価したが、天然物が最

も高い活性を示した。

以上本研究は、抗真菌活性を示すカビ由来の新規環状構造の発見と構造決定から出発し、活性発現に必須の基本構造の位置付け、新たな阻害作用機序の提出を行ったものであり、創薬科学、医薬品化学、薬品合成化学に重要で新規な知見を提供するものであり、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。