

氏 名	こ ばやし もと お 央 小 林 幹 央
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2556 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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	Fungal cell wall synthesis inhibitors, FR207944 and FR227244, produced by filamentous fungi (細胞壁合成を阻害する糸状菌由来抗真菌抗生物質 FR207944 および FR227244)
論文調査委員	(主 査) 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 清 水 昌 教 授 宮 川 恒

論 文 内 容 の 要 旨

近年の疾病構造の変化および医療の高度化により、日和見感染を原因とする深在性真菌症の増加と重篤化が問題になっているが、わが国で使用可能な治療薬の種類は極めて限られている。その中で micafungin は、動物細胞にはない細胞壁の構成成分であるグルカンの合成を阻害して抗真菌活性を示し、高い安全性に加えて既存の薬剤耐性菌に対しても優れた活性を有するものの、経口吸収性に乏しいため、新たな分子骨格と作用機序をもつ薬剤がもとめられている。本研究では、micafungin やその原体天然物である FR901379 などの細胞壁合成阻害剤を病原性真菌である *Aspergillus fumigatus* に作用させた場合に誘起される特有の細胞形態変化を指標にしたスクリーニング系を構築し、糸状菌の培養液から抗真菌抗生物質、FR207944 および FR227244 を見出し、それぞれの化学的性質を明らかにするとともに、生理活性の発現機構を検討した。結果は以下のように要約できる。

1) *Chaetomium* sp. No. 217株の培養液中に糸状菌の細胞変形を誘起する物質 FR207944 を見出し、培養条件を検討して生産量を 88.8 mg/l に達せしめた。培養液からアセトン・メタノール抽出および各種カラムクロマトグラフィーを行うことによって粗結晶を得、これをテトラヒドロフランに溶解し、メタノールを滴下して再結晶化して白色結晶を得た。元素分析、質量分析、IR 分析、¹H-NMR 分析、¹³C-NMR 分析などの機器分析により、本物質のテルペン配糖体構造を決定し、さらに X 線結晶解析によってその相対立体配置を決定した。

FR207944 の *in vitro* 抗真菌活性は、*A. fumigatus* に対する最小影響濃度 (MEC) が 0.039 µg/ml であり、細胞壁合成阻害時に特有な形態変化を与えた。*Candida albicans* に対しても MEC が 1.6 µg/ml と強い活性を示した。*A. fumigatus* マウス全身感染モデルにおいて、皮下投与、経口投与とも延命効果を示し、ED₅₀ 値はそれぞれ、5.7 mg/kg、17 mg/kg であった。本物質の延命効果は未だ十分とは言えないが、この物質を骨格として各種の誘導体を合成することにより、溶解性と体内動態を改善することが可能であることを示した。

2) *Myrothecium cinctum* No. 002株の培養液中に糸状菌の細胞変形を誘起する物質 FR227244 を見出した。培養条件を検討して、生産量を 131.8 mg/l とした。培養液よりアセトン抽出、各種カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、濃縮乾固した活性区を少量の酢酸エチルに溶解し、大量のヘキサンを添加して沈殿を生じさせ、濃縮乾固することにより白色粉末を得た。元素分析、質量分析、IR 分析、¹H-NMR 分析、¹³C-NMR 分析などの機器分析によって、本物質を新規テルペン配糖体と判定した。FR227244 の *in vitro* 抗真菌活性は、*A. fumigatus* に対して MBC が 0.031 µg/ml で、細胞壁合成阻害時に特有の形態変化を示した。他の *Aspergillus* 属や *Candida* 属のみならず、表在性真菌症の起因菌である *Trichophyton* 属に対しても強力な抗真菌活性を示した。*A. fumigatus* マウス全身感染モデルにおいて、皮下投与、経口投与とも延命効果を示し、ED₅₀ 値はそれぞれ、1.9、18 mg/kg であった。FR207944 に比べ延命効果は強かったが、さらに合成誘導体や製剤検討を行うことにより、活性を増強せしめる可能性がある。

新たに取得した化合物は細胞壁合成を阻害すると考えられ、細胞壁合成酵素阻害実験および培養細胞を用いた真菌細胞壁前駆体取り込み阻害実験を行ったところ、FR227244 は *A. fumigatus* のグルカン合成酵素のみを IC₅₀=4.04 µg/ml で阻害

し、かつグルカンの前駆体の取り込みのみを強力に阻害した。これらの結果より、FR227244の抗菌活性は、糸状菌のグルカン合成過程に作用して細胞壁合成を阻害することに起因することが明らかになった。一方、細胞透過性の影響を受けることのない *in vitro* でのグルカン合成酵素阻害活性が *in vivo* の抗真菌活性 (MEC) よりも高い値を示したことから、抗菌物質の標的分子はグルカン合成酵素のみではなく、グルカン合成に関わる他の因子にも作用している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、深在性真菌症が増加しその症例も重篤化しているが、治療効果の高い薬剤の種類は極めて限られており、安全で新たな作用機序の薬剤の創出が強く望まれている。本研究は、新規な抗真菌剤探索のために、*Aspergillus fumigatus* に作用させた場合に誘起される特有の細胞形態変化を指標にしたスクリーニング系を構築し、これを用いて糸状菌の培養液から2種の抗真菌抗生物質、FR207944 および FR227244 を見出し、その化学的性質と生理活性の発現機構を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1) *Chaetomium* sp. No. 217株の培養液中から糸状菌の細胞変形を誘起する物質 FR207944 を白色結晶状に単離し、各種機器分析およびX線結晶解析により、相対立体配置を含めたテルペン配糖体構造を決定した。FR207944 は、病原性真菌である *A. fumigatus* および *Candida albicans* に対して *in vitro* での強い抗菌活性を示し、細胞壁合成阻害時に特有の形態変化を与えた。本物質は、*A. fumigatus* を用いたマウス全身感染モデルで、皮下投与、経口投与ともに延命効果を示し、経口投与可能な抗真菌剤原体として有望であることを示している。

2) *Myrothecium cinctum* No. 002株の培養液より抗真菌抗生物質 FR227244 を白色粉末として単離し、各種機器分析によってその新規なテルペン配糖体構造を決定した。FR227244 は、*Aspergillus* 属および *Candida* 属の病原性真菌だけでなく表在性真菌症の起因菌である *Trichophyton* 属の菌株に対しても *in vitro* での抗真菌活性を示した。本物質の薬効を *A. fumigatus* を用いたマウス全身感染モデルで評価し、皮下投与、経口投与ともに強力な延命効果をもつことを認め、経口投与可能な抗真菌剤となり得ることを示している。さらに、細胞壁合成酵素阻害実験および培養細胞を用いた真菌細胞壁前駆体取り込み阻害実験の結果から、本物質が真菌のグルカン合成酵素に作用することによって細胞壁合成を阻害し、抗真菌活性を示すことを明確にした。さらに、グルカン合成酵素阻害活性が *in vitro* の抗真菌活性よりも高い値を示したことから、その標的分子はグルカン合成酵素のみならず、グルカン合成に関わる他の因子にも作用している可能性を示している。

以上のように本論文は、現在不十分である医療ニーズの充足を目的として、新たなスクリーニング系を構築して糸状菌細胞壁の合成を阻害する2つの抗真菌抗生物質を糸状菌培養液に見出し、それぞれの分子構造を決定するとともに、動物モデルでの薬効およびその作用機序を明らかにしたもので、制御発酵学、応用微生物学、天然物有機化学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年1月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。