

Studies on Antifungal Antibiotics from *Ellisiodothis inquinans* L1588-A8 (*Ellisiodothis inquinans* L1588-A8 が生産する抗真菌抗生物質に関する研究)

学位論文内容の要旨

選択性が高く、副作用の少ない優れた抗真菌剤の発見および開発は難しく、実用化されているものは非常に少ない。現在、真菌感染症の治療で用いられている抗生物質には Amphotericin B と Azole 系のものであるが、その副作用は大きい。一方、抗生物質耐性菌の出現や免疫不全症患者の増加などに伴い、新しい抗真菌剤の探索は、ますます重要かつ切実な問題となってきている。

真菌はその細胞壁にキチンを含んでいることが、動物及び細菌との大きな違いの一つとして挙げられる。キチンは N-アセチルグルコサミンが β -1, 4 結合によって連結したものであり、多くの真菌類細胞壁の主要構成成分となっている (5-60%)。そこでキチンの生合成をターゲットとし、これを阻害することによって、真菌に対して選択的に作用を発揮するような抗生物質の探索を試みた。

1. 抗真菌抗生物質生産菌の探索および生産菌の同定

酵母のキチン生合成については、合成酵素 1, 2, 3 が関与することが知られており、合成酵素 1 は、出芽時における隔壁形成に関与し、合成酵素 2 は、主にその隔壁形成を行い、nikkomycin などの薬剤に阻害されにくい。合成酵素 3 は、細胞壁のほとんどのキチン合成を行っている。合成酵素 2 と 3 の二重欠損は致死を起こすことなどが報告されている。本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* のキチン合成酵素 1 の欠損変異株を用いて、キチン合成阻害物質の探索を行った。キチン合成能力を下げた菌株を使うことで阻害能の低い物質も検出できることが期待される。探索の対象としては、今までに多くの抗生物質が見つかっている *Actinomycetes* と、探索がほとんど行われてきていなかった海洋性真菌の *Leptosphaeria* 属を用いた。

まず、酵母の野生株と欠損株をそれぞれ YEPD (20 g/l glucose, 20 g/l Polypepton, および 10 g/l yeast extract, 初発 pH 7.0) 液体培地を用いて 27°C で一晩振とう培養し、培養液を YEPD 寒天培地に 0.5% (v/v) となるように添加して、アッセイプレートを作成した。生産菌を 27°C で 6 日間培養し、その培養上清約 80 μ l を染み込ませたペーパーディスクをアッセイプレートの上に乗せ、27°C で一晩培養し、生育阻止円の形成を観察した。*Actinomycetes* 146 株と *Leptosphaeria* 属 300 株をスクリーニングしたところ、野生株に比べ明確に大きな生育阻止円を形成したものは、*Actinomycetes* 中には見つからず、*Leptosphaeria* 属中に 2 株見つかった。このうち、

Leptosphaeria 属の L1588 株がより大きな生育阻止円形成の差を示した。L1588 株を形態上の特徴および Luttrell の同定法に基づき分類した結果、本菌は *Ellisiodothis inquinans* と同定された (*Ellisiodothis inquinans* L1588-A8)。本菌による抗生物質の生産は今回の報告が初めてである。

2. 培養条件の検討

抗菌活性物質の生産条件の最適化を行った。その結果、前培養として、30 g/l fructose、5 g/l soybean meal、1 g/l KH_2PO_4 、0.5 g/l MgSO_4 および 0.1 g/l CaCl_2 、初発 pH 6.0 の培地が最適であり、この培地で3日間振とう培養後、本培養培地として、3 g/l glucose、5 g/l glycerol、2 g/l Polypepton、3 g/l yeast extract、2 g/l NaCl および 3 g/l CaCO_3 、初発 pH 6.0 を用いて6日間、27°C で培養した時に、最も高い抗菌活性が得られることがわかった。さらに上記培養条件を用いて5L、10L、30Lのジャーフェーマンターを用い、大量培養を行った。最終的にこの条件を用いて200Lタンクを用いて、本抗真菌抗生物質の大量生産を行った。

3. 抗真菌抗生物質の単離および精製

本菌の培養上清より酢酸エチル抽出、ダイヤイオン HP-20 およびシリカゲル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を用いて、抗真菌活性物質の単離、精製を行った。少なくとも4種の抗真菌活性を持つ物質が確認され、このうちのNCA-1を完全に精製し、構造の解析を行った。本物質はFAB-MSより分子量646、HREI-MSより分子式 $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_9$ と決定された。さらにNMR等の機器分析を行い、NCA-1の構造をglycosylated lanostane-type triterpenoid と決定した。本物質は1997年に米国にて他の真菌から発見されたAscosterosideと同一のものであることが判明したが、作用機構をはじめ、抗真菌剤としての詳細な検討はなされていないため、さらに解析を進めた。

4. NCA-1の抗菌スペクトルおよび作用機構

本物質の抗菌スペクトルを解析したところ、酵母のキチン合成酵素1欠損株に対して明確な生育阻止円を形成し、酵母野生株および *Bacillus* sp. の生育を僅かに阻害し、*Alternaria* sp. および *Salmonella* sp. の生育は阻害しないことがわかった。また、欠損株に対するMICは0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。酵母野生株のスフェロプラストおよびUDP-N-acetyl [U- ^{14}C] glucosamine を用いて、キチン生合成に対するNCA-1の影響を調べたところ、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でUDP-N-acetyl [U- ^{14}C] glucosamine の取り込みが完全に阻害されることが明らかとなった。またDNA合成、RNA合成、蛋白質合成に対するNCA-1の影響を調べるため、[methyl- ^3H] thymidine、[5, 6- ^3H] uracil、およびL-[4, 5- ^3H (N)] leucine の酵母欠損株への取り込みを測定したところ、DNA合成、RNA合成に関しては、生育阻害によると思われる若干の影響がみられたのみであるが、蛋白質合成に関しては、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で完全な停止が観察された。

本研究よって、酵母のキチン合成酵素1欠損株と野生株を用いたスクリーニング系の有用性が明らかとなり、キチン合成阻害物質生産菌の探索による、新しい有望な抗真菌剤発見の可能性が大きく開かれた。また、海洋微生物である *E. inquinans* からの抗生物質の生産は、今回の報告が始めてである。NCA-1については、すでに他菌株由来の同じ物質の報告はされていたが、そのキチン合成阻害作用については本研究で初めて明らかにされたものであり、新しいキチン合成酵素阻害剤の一つとして、その有用性が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 吉 原 照 彦
副 査 助 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Studies on Antifungal Antibiotics from *Ellisiodothis inquinans* L1588-A8 (*Ellisiodothis inquinans* L1588-A8 が生産する抗真菌抗生物質に関する研究)

本論文は、英文138頁、図53、表23、引用文献106、5章からなり、他に参考論文3編が付されている。

選択性が高く、副作用の少ない優れた抗真菌剤の発見および開発は難しく、実用化されているものは非常に少ない。現在、真菌感染症の治療で用いられている抗生物質の副作用はまだまだ大きい。一方、抗生物質耐性微生物の出現や免疫不全症患者の増加などに伴い、新しい抗真菌剤の探索は、ますます重要かつ切実な問題となってきた。

真菌はその細胞壁にキチンを含んでいることが、動物及び細菌との大きな違いの一つとして挙げられる。そこでキチンの生合成をターゲットとし、これを阻害する抗生物質の取得を試みた。

1. 抗真菌抗生物質生産菌の探索および生産菌の同定

本研究では、*Saccharomyces cerevisiae*のキチン合成酵素1の欠損変異株を用いて、キチン合成阻害物質の探索を行った。キチン合成能力を下げた菌株を使うことで阻害能の低い物質や極微量の物質も検出できることが期待される。探索の対象としては、今までに多くの抗生物質が見つかった *Actinomycetes* と、探索がほとんど行われてきていなかった海洋微生物の *Leptosphaeria* 属を用いた。

酵母の欠損株と野生株を用い、ペーパーディスク法で生育阻止円の形成を観察することによって *Actinomycetes* 146 株と *Leptosphaeria* 属300 株をスクリーニングしたところ、野生株に比べ明確に大きな生育阻止円を形成したものは、*Actinomycetes*

中には見つからず、*Leptosphaeria* 属中に2株見つかった。このうち、*Leptosphaeria* 属L1588 株がより大きな生育阻止円形成の差を示したため、形態上の特徴および Luttrell の同定法に基づき分類した結果、本菌は*Ellisiodothis inquinans*と同定された (*E. inquinans* L1588-A8)。本菌による抗生物質の生産は今回の報告が初めてである。

2. 培養条件の検討

培養条件の検討を行った結果、3 g/l glucose、5 g/l glycerol、2 g/l Polypepton、3 g/l yeast extract、2 g/l NaClおよび3 g/l CaCO₃、初発 pH 6.0 で6日間振とう培養を行った時に、最も高い抗菌活性が得られることがわかった。最終的に200 Lタンクを用いて、抗真菌抗生物質の大量生産を行った。

3. 抗真菌抗生物質の単離および精製

本菌の培養上清より抗真菌活性物質の単離、精製を行った。少なくとも4種の抗真菌活性を持つ物質が確認され、このうちのひとつ、NCA-1 を完全に精製し、構造の解析を行った。FAB-MSより分子量646、HREI-MSより分子式 C₃₇H₅₈O₉と推定された。さらにNMR等の機器分析を行い、NCA-1の構造を glycosylated lanostane-type triterpenoid と決定した。本物質は1997年に米国にて他の真菌から発見された Ascosterosideと同一のものであることが判明したが、作用機構をはじめ、抗真菌剤としての詳細な検討はなされていないため、さらに解析を進めてゆくことにした。

4. NCA-1 の抗菌スペクトルおよび作用機構

本物質は、酵母キチン合成酵素1欠損株に対して明確な生育阻止円を形成し、酵母野生株および*Bacillus subtilis*の生育を僅かに阻害し、*Alternaria* sp. および *Salmonella* sp. の生育は阻害しなかった。欠損株に対する MIC は 0.1 μg/mlであった。キチン生合成に対するNCA-1の影響を調べたところ、10 μg/mlの濃度にて完全に阻害されることが明らかとなった。またDNA合成、RNA合成に関しては、生育阻害によると思われる若干の影響がみられ、蛋白質合成に関しては、10 μg/mlの濃度にて完全な停止が観察された。

本研究によって、酵母のキチン合成酵素1欠損株と野生株を用いたスクリーニング系の有用性が明らかとなり、キチン合成阻害物質生産菌の探索による、新しい有望な抗真菌剤発見の可能性が大きく開かれた。また、海洋微生物である*E. inquinans*からの抗生物質の生産は、今回の報告が初めてである。NCA-1については、すでに他菌株由来の同じ物質の報告はされていたが、そのキチン合成阻害作用については本研究で初めて明らかにされたものであり、新しいキチン合成酵素阻害剤の一つとして、その有用性が期待される。

よって審査員一同は、チープタム・ナオワラットが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。