平成２５年度　戦略的基盤技術高度化支援事業

「新たな分離源処理法及び発酵培養法の開発による海洋性微生物・
微細藻類からの効率的な新規創薬シード化合物探索法の開発」

研究開発成果等報告書

平成２６年　３月

委託者　琉球大学
委託先　オーピーバイオファクトリー株式会社

目次

第1章　研究開発の概要
1.　研究開発の背景・研究目的及び目標
2.　研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）
3.　成果概要
4.　当該プロジェクト連絡窓口

第2章　本論
1.　海洋性微生物・微細藻類資源の分離・培養に関する研究
⑴　微生物分離源の採集、微生物の分離・培養に関する研究
⑵　微細藻類分離源の採集、微細藻類の分離・培養に関する研究
2.　新規抗真菌薬の探索に関する研究
⑴　抗真菌薬探索の背景
⑵　新規抗真菌薬探索のための評価系構築
⑶　スクリーニングの実施
３．活性化合物の精製及び構造解析に関する研究
⑴　活性化合物の精製と構造解析
①赤リングを示さない3株（放線菌）SCTA0030, SCTA0002, SCTA0060の精製
②赤リングの発現が弱い株SCTA0162株（放線菌）の精製
③赤リングを示す株 SCTA0287株（放線菌）の精製
④赤リングを示す株 SCTF0037株（カビ）の精製
⑤赤リングを示す株 SCTF００３４４株（カビ）の精製
⑥赤リングを示す株 SCTA００３４３株（放線菌）の精製
⑵　抗真菌データベースの構築
４．新たに得られたＡ８４株の生産する新規化合物
⑴分離源の採集地及び分離方法
⑵生産菌の同定
⑶Ａ８４化合物の培養方法
⑷Ａ８４化合物の精製方法
⑸Ａ８４化合物の構造決定
⑹Ａ８４化合物の生物活性
⑺A84化合物の合成法の研究
⑻Ａ８４化合物の誘導体の合成

⑼ Ａ８４化合物の誘導体の生物活性
⑽ 特許出願

第3章　全体総括

参考文献

第1章　研究開発の概要

1.　研究開発の背景・研究目的及び目標

従来、天然物創薬を目指す製薬企業は多くの場合、陸上の分離源を採集し、微生物等を分離し、利用してきた。しかし、長期に渡る継続的探索の結果、陸域から得られる微生物は殆どが既知菌種となり、新規薬剤のシードとなる二次代謝産物をつくる微生物の分離は極めて困難となった。このため、天然物創薬企業による新規薬剤の開発は急速に縮小した。新規薬剤を選別できるスクリーニング系が考案された場合は従来から使用されていた微生物培養から得られる代謝産物の直接的スクリーニングに変わり、既存の化合物を事前に集めたケミカルライブラリー（天然物及び合成）を用いたスクリーニングが、一時期、世界的な規模で実施された。新規スクリーニング系によるケミカルライブラリーのスクリーニングからは、予想に反し、有望な新規シード化合物が得られなかった。

これらケミカルライブラリーを用いたスクリーニングの結果から、新規構造・活性を天然物資源に求めるスクリーニングが近年再注目され、実施され始めている。日本企業においては、天然物資源を国外に求める動きもあるが、生物多様性条約による資源利用の大幅な制約のため、迅速な研究開発が妨げられている。このため、生物多様性条約の制限のない、使い勝手のよい生物資源の確保が、天然物創薬企業にとっての大きな課題となっている。このような代替資源の一つとして最近注目されているのが、国産の海洋性の微生物資源および微細藻類資源である。これらは、これまでに殆ど利用されておらず、新規二次代謝産物発見の期待が高い。しかし、海洋性微生物・微細藻類資源は、分離源の採集に特殊な技術が必要とされ、またその培養技術も十分に確立されていない。それゆえ、それらの分離・培養技術の確立は、新規創薬シード化合物発見の可能性を高めることが期待できる。

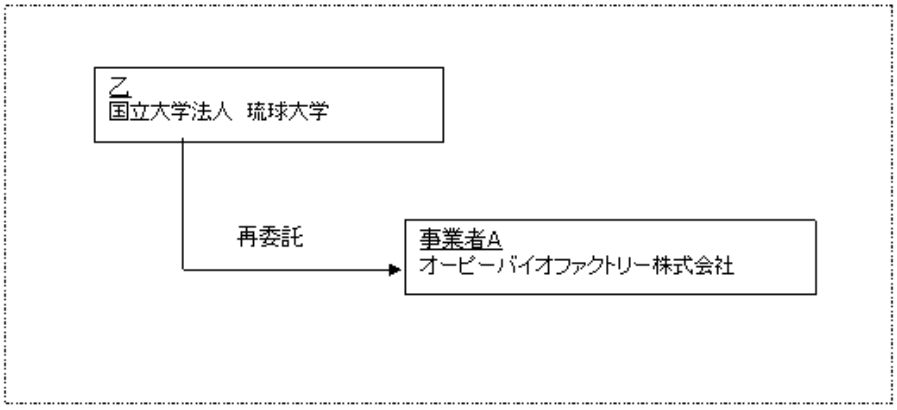
一方、末期がん・免疫不全患者の真菌感染症は、臨床現場で現在大きな問題となっている。このため、薬効が高く、毒性が低い新規抗真菌薬の開発が、多くの患者や臨床医から強く望まれている。しかし、これまでの長期間、多数の陸上微生物の二次代謝産物が評価されたが、期待に応える新規薬剤候補化合物の発見には至っていない。

これらの課題を解決するため、本事業では、（１）未開発天然生物資源である海洋性微生物・微細藻類資源の効率的な分離・培養技術の確立、（２）二次代謝産物を効率的に探索するための、ハイスループット化したスクリーニングシステム構築を目指す。さらに、（２）のシステムを用いて、（３）薬効が高く毒性が

低い、経口投与可能な新規抗真菌薬剤の開発を目指す。

2. 研究体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

（1） 研究組織



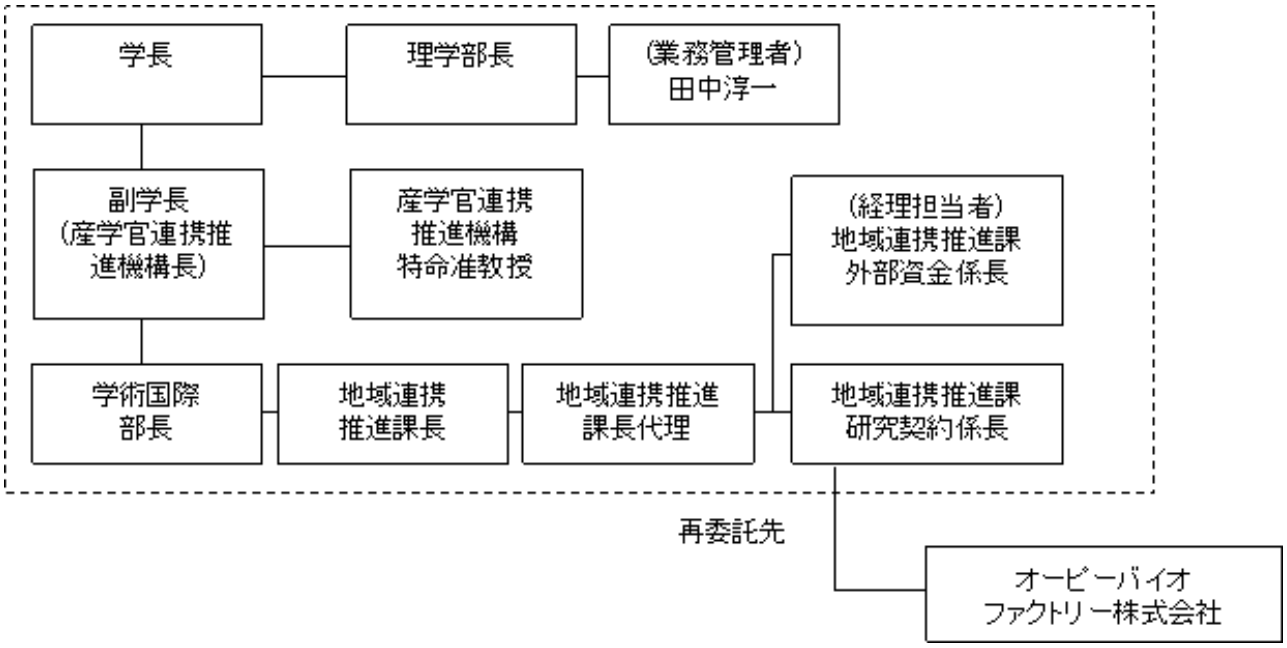
総括研究代表者（ＰＬ）
所属組織名:オービーバイオファクトリー株式会社
所属役職:研究開発本部長
氏名:石見 盛太

副総括研究代表者（ＳＬ）
所属組織名:オービーバイオファクトリー株式会社
所属役職:生物資源部部長
氏名:栗原 祐子

（2） 管理体制

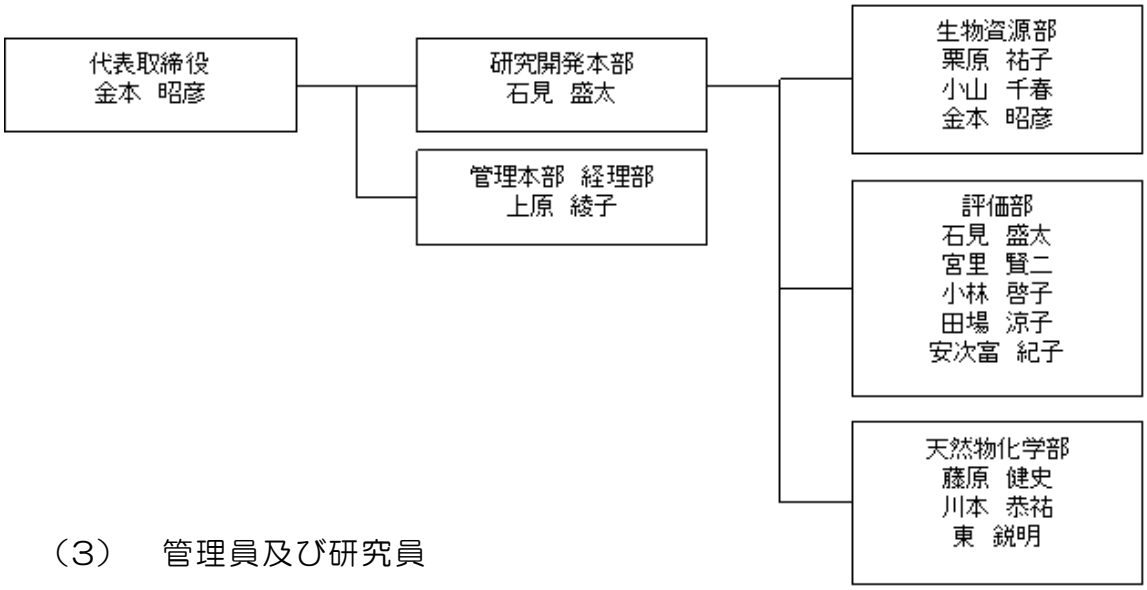
① 事業管理者

［国立大学法人琉球大学］



②　（再委託先）

［オーピーバイオファクトリー株式会社］



（3）　管理員及び研究員

【事業管理者】国立大学法人琉球大学

①　管理員

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
田中　淳一	理学部海洋自然科学科　教授	4
玉城　理	産学官連携推進機構　准教授	4
山内　朱実	学術国際部地域連携推進課　研究契約係長	4
比嘉　康子	学術国際部地域連携推進課　外部資金係長	4

②　研究員

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
田中　淳一	理学部海洋自然科学科　教授	2-3

【再委託先】オーピーバイオファクトリー株式会社

氏　名	所属・役職	実施内容（番号）
石見　盛太	オーピーバイオファクトリー株式会社　研究開発本部長	1-1, 1-4, 2-2, 2-3, 2-4, 3-1, 3-2, 3-3
栗原　祐子	同　生物資源探索部長	1-1, 1-4, 2-2, 3-1
宮里　賢二	研究員	2-3, 2-4, 3-1, 3-2, 3-3
安次富　紀子	研究補助員	2-1, 2-4, 3-1, 3-2, 3-3
藤原　健史	同　天然物化学部長	2-3, 2-4, 3-1
加藤さち	研究補助員	2-3, 2-4, 3-1, 3-2, 3-3

（4）　指導・協力者名及び指導協力事項　（研究開発推進委員会　委員）

氏　名	所属・役職	備考
石見　盛太	オーピーバイオファクトリー株式会社研究開発本部長	PL
栗原　祐子	オーピーバイオファクトリー株式会社生物資源探索部長	SL
金本　昭彦	オーピーバイオファクトリー株式会社代表取締役社長	再委託先
藤原　健史	オーピーバイオファクトリー株式会社天然物化学部長	再委託先
伊藤　義邦	ユイメディック株式会社　科学技術顧問	
市場　俊雄	沖縄県工業技術センター　食品・化学研究班　班長	アドバイザー
藤江　昭彦	独立行政法人　医薬基盤研究所　創薬支援戦略室　東日本統括部　研究コーディネーター	アドバイザー
永井　浩二	アステラスリサーチテクノロジー株式会社　醗酵研究部　部長	アドバイザー

3. 成果概要

本事業では、未開発天然生物資源である海洋性微生物・微細藻類資源から新規抗真菌剤を探索するため、海洋性微生物・微細藻類資源の効率的な分離・培養技術の確立、及び二次代謝産物を効率的に探索するためのハイスループット化したスクリーニングシステム構築について研究開発を実施した。このシステムを用いて、薬効が高く毒性が低い経口投与可能な新規抗真菌剤の探索を実施し、得られた新規化合物生産候補株について活性成分の精製と構造解析を行った。

まず、海洋性微生物資源の採集と微生物の分離・培養について検討を行った。平成２３年度に、海水から微生物を効率的に集積できる新規採集器を開発し、最大で 7000 倍の集積が可能な採集手法を確立した。平成２４年度は、効率を 6 倍向上させた 2 号機を作製し、採集と分離に使用した。また、海砂やマングローブ土壌の効率的な採集に電動ドリルを用いた採集手法を新たに考案･作成し、効率よく良質な分離源を収集することができた。採集技術が確立したことから、地域固有の微生物相が維持・保存されている隔離された場所からの採集を実施し、多種多様な微生物株を分離･培養した。

微細藻類についても、独自に開発した採集法･分離法･識別法･培養法を用いることにより、多様な微細藻類株を収集した。また、培養方法と評価方法を同時に行える培養評価法を確立しハイスループットなスクリーニングの実施を可能にした。

得られた微生物・微細藻類からの新規創薬シード化合物探索を目指し、薬効が高く毒性が低い経口投与可能な新規抗真菌剤の探索を目的としたスクリーニング系の構築を検討した。人に存在せず真菌にのみ特異的に存在する細胞壁を標的にする事から安全性が高い事が予測される細胞壁合成阻害剤をターゲットとした。細胞壁合成阻害剤を選択的にスクリーニングする手法として、平成２３年度に遺伝子組換え手法によるミカファンギン（細胞壁合成阻害剤）耐性酵母の作成、およびミカファンギン添加アッセイ法を検討した。平成２４年度は、より効率よく細胞壁合成阻害剤を判定する新規評価法を確立し、飛躍的にスクリーニング効率を向上させることができた。本手法を用いて、微生物株１００万株および微細藻類エキス 2000 検体を 1 次評価し、細胞壁合成阻害剤生産の候補株約 90 株（菌種の異同による重複を含め約 500 株）を選抜した。２次評価で既知細胞壁合成阻害剤と同じ抗菌スペクトラム（*Sac* ≫ *Cry*）を指標として、候補株 90 株から 25 株を選抜した。

２次評価通過株は、順次生産される化合物の精製を行い、１１株（放線菌８株,

糸状菌３株）から活性成分１１化合物を精製･構造決定した。精製された化合物は、多くが既知化合物であったが目的とする細胞壁合成阻害活性を有する化合物が得られた。この事から、本スクリーニング法が有効な選別法であることが確認された。また、新規化合物を効率よく早期に絞り込む手法として、質量分析装置を活用し既知抗真菌剤のデータベースを作成した。LC/MS（質量分析装置）とデータベースの照合による活性成分同定手法を構築し、本データベースを活用した新規創薬シード化合物探索法を完成させ、スクリーニングに応用した。スクリーニングを継続し行った結果（約１００万株）、新規母核を有し、強い抗真菌活性を示す新規化合物の発見に至った。
新規化合物生産株の活性成分の至適培養条件の検討を行い、また精製法を確立し、活性成分の大量取得を行った。得られた化合物を用いて、患者分離株を用いた抗真菌活性（ＭＩＣ）を測定した。その結果、現在市販されているアゾール系の薬剤やキャンディン系薬剤と比較しても遜色ない活性を示した。本結果はアメリカ ICAAC 学会で発表し、多くの製薬企業から注目を集めている。またＮＭＲ、LC/MS 等の解析から新規母核を有する化合物である事が判明した。その構造のユニークさから新たな抗真菌薬のターゲット発見に繋がる事が期待され、また作用メカニズムの解明に大きな期待が寄せられている。

4.　当該プロジェクト連絡窓口

国立大学法人琉球大学
産学官連携推進機構　准教授　玉城理
〒903-0213 沖縄県西原字千原 1 番地
TEL (098)895-8599　　FAX (098)-895-8957
Email　iicc@to.jimu.u-ryukyu.ac.jp

第2章　研究開発の概要

1.　海洋性微生物・微細藻類資源の分離・培養に関する研究

海洋性微生物・微細藻類資源は、分離源の採集に特殊な技術が必要とされ、またその培養技術も十分に確立されていない。それゆえ、それらの分離・培養技術の確立は、新規創薬シード化合物発見の可能性を高めることが期待できる。

本事業では、海洋性微生物・微細藻類資源の効率的な採集方法を検討し、得られた微生物・微細藻類の分離・培養技術の確立を目指すこととした。微生物と微細藻類についてそれぞれ研究を行った。

(1)　微生物分離源の採集、微生物の分離・培養に関する研究

まず、海洋性微生物資源の効率的な採集方法を検討した。海洋中では陸域に比べて菌数が少ないことが知られている[1)]。そこで、効率的に微生物株を収集できる採集器を開発することとした。

本研究では、プランクトンネットを用いて海水を濾過し、微生物株を集積する方法を用いた。より大量の海水を濾過する為、ポンプを取り付けた採集器を開発した。図1にその概要図を示す。

ポンプは 70～100 L/min の揚水が可能なポンプを採用した。採集器は、ポンプの水量・水圧に耐え得るアクリル素材で特製した。海水中の不要物の除去と濾過効率を向上させるため、複数のプランクトンネットを挟むことができる多段式の構造と　　した。

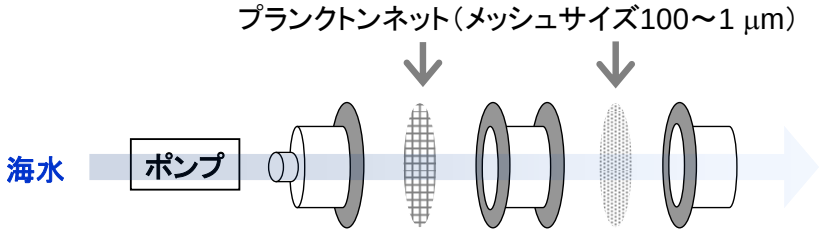
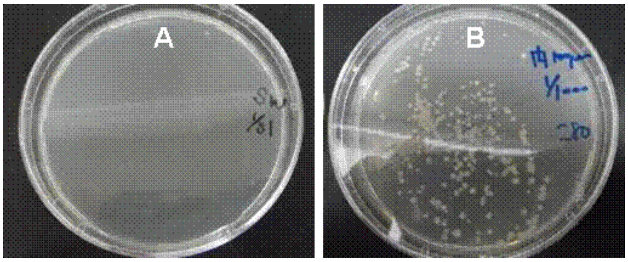


図１　採集機器の概要図

平成２３年度に、試作機を作成して沖縄本島近海で試運転を行い、設計通り稼動することを確認した（図2）。また、プランクトンネットから微生物を分離した。

結果、採集器を用いない場合に比べ、最大7000倍効率よく集積できることを確認した（図3）。

図2　海洋での採集機器の試用試験



（A）採集器による集積を行っていない海水、（B）採集器による集積を行った海水

図3　微生物の分離結果

平成２４年度には、採集器の連結部の改良を行うと共に、集積効率の良いプランクトンネットを採用した2号機を作製した（図4）。これにより集積能が6倍向上し、作業性も向上した。本機を海洋分離源の採集と分離に用いた。

図4　2号機を用いた採集

海砂、マングローブ土壌の効率的な採集法についても検討を行った。従来の手動式は効率が悪く、採集できる深さも限られていた。本年度は、電動ドライバーと採掘用ドリルを用い、効率よく深い砂を採集できる手法を考案した（図5）。

これにより、効率よく良質な分離源を効率よく収集することが可能となった。

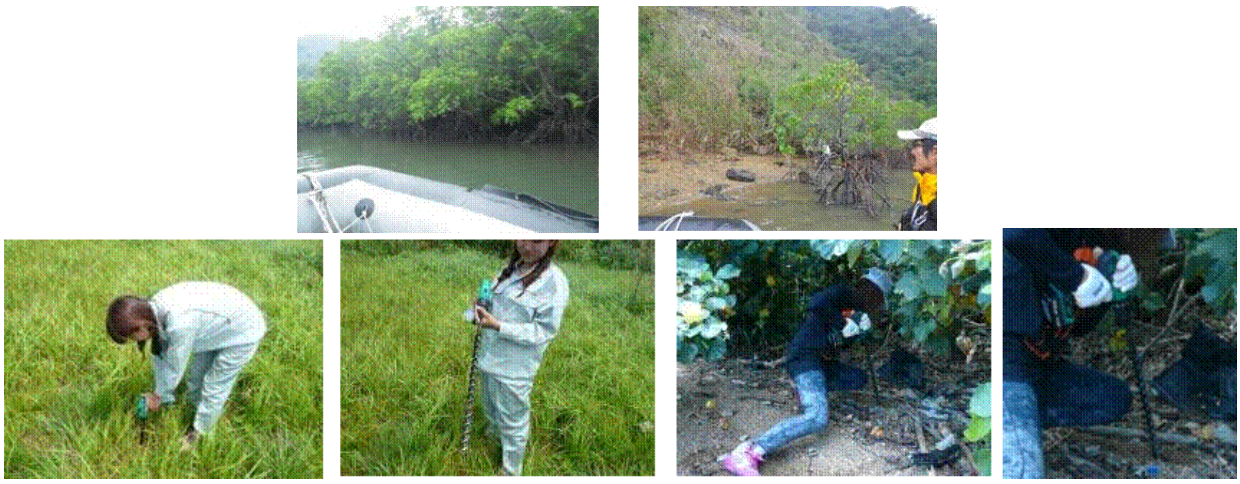


図5　海砂、マングローブ土壌の採集法

効率の良い採集技術が確立したことから、地域固有の微生物相を持つ場所の選定を行った。種々検討を行った結果、固有の微生物相は隔離された場所に存在する可能性が高いと考え、無人島のような隔離された場所からの採集を行った（図6）。

図6　採集場所

微生物分離源の採集および分離・培養の検討の結果をまとめる。

平成２３年度作製した採集器（試作機）を改良・スケールアップし、効率が6倍向上した2号機を作製した。これにより、菌数が少ない海水からの効率的な集積手法を確立した。また、海砂やマングローブ土壌の採集手法を検討し、効率よく深い砂を採集できる手法を新たに考案した。確立した採集技術により1030分

離源を採集し、目標数1000分離源を達成した。また、隔離された採集場所を選定したことにより、良質かつ固有の微生物を収集し、約１００万株の微生物を分離培養した。

⑵　微細藻類分離源の採集、微細藻類の分離・培養に関する研究[2)]

海洋性微細藻類の分離・培養を目的とし、採集法の検討を行った。平成２３年度までにプランクトンネットを利用した濾過濃縮法を検討し、1万倍濃縮可能な技術を確立した。また、波打ち際に集積した泡など、自然界で微細藻が集中した試料を遠心濃縮し更に40倍濃縮する技術も確立した。これらの方法で海水試料を濃縮した結果、従来の方法で分離源を採集していたときに比べ、生息数が少ない希少種を含む多様な株を分離できるようになり、作業効率も大幅に向上した（図7）。平成２４年度は、これらの技術を活用し、海洋性微細藻類分離源の採集を実施した。

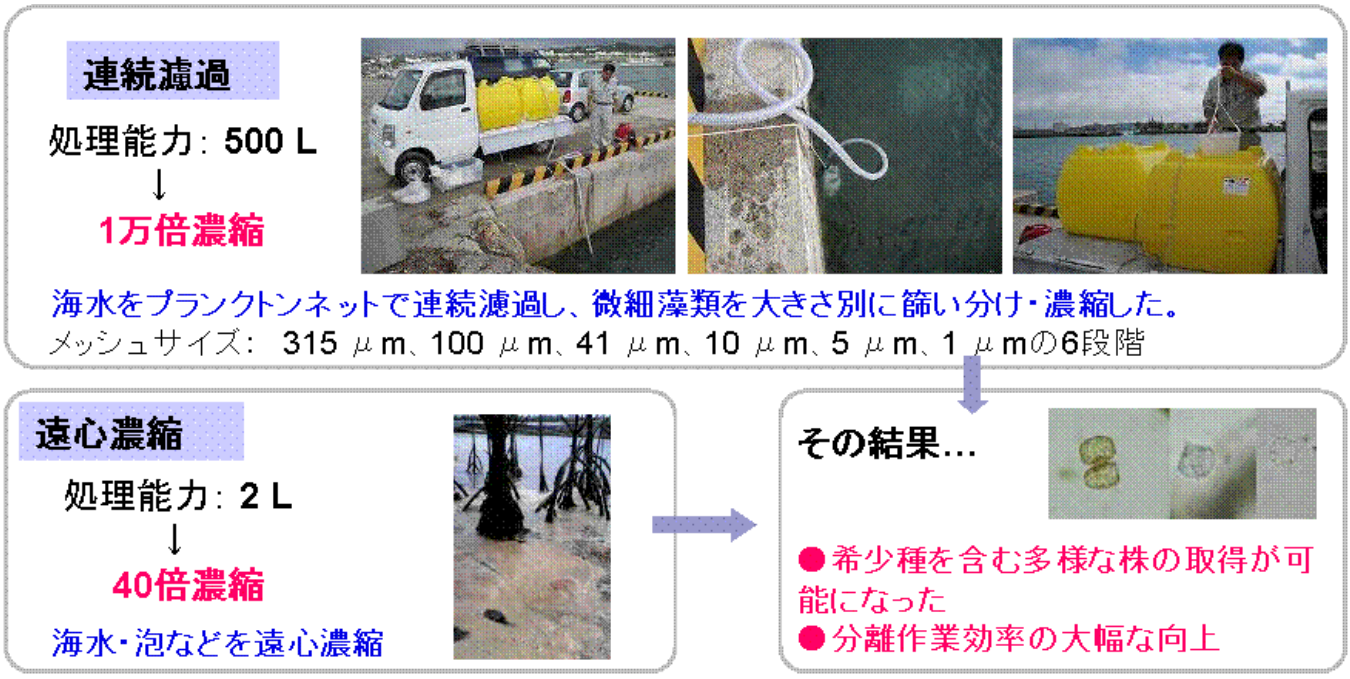


図7　微細藻類の採集法、濃縮技術

得られた分離源から、微細藻の分離･培養を行った。平成２３年度確立した選択的集積培養技術を用いると共に、寒天平板法やマイクロピペット洗浄法などの分離手法を確立し、藍藻（藍色植物門）、渦鞭毛藻（渦鞭毛植物門）、珪藻（不等毛植物門）、ハプト藻（ハプト植物門）、緑藻（緑色植物門）などの微細藻株を分離した（図8）。

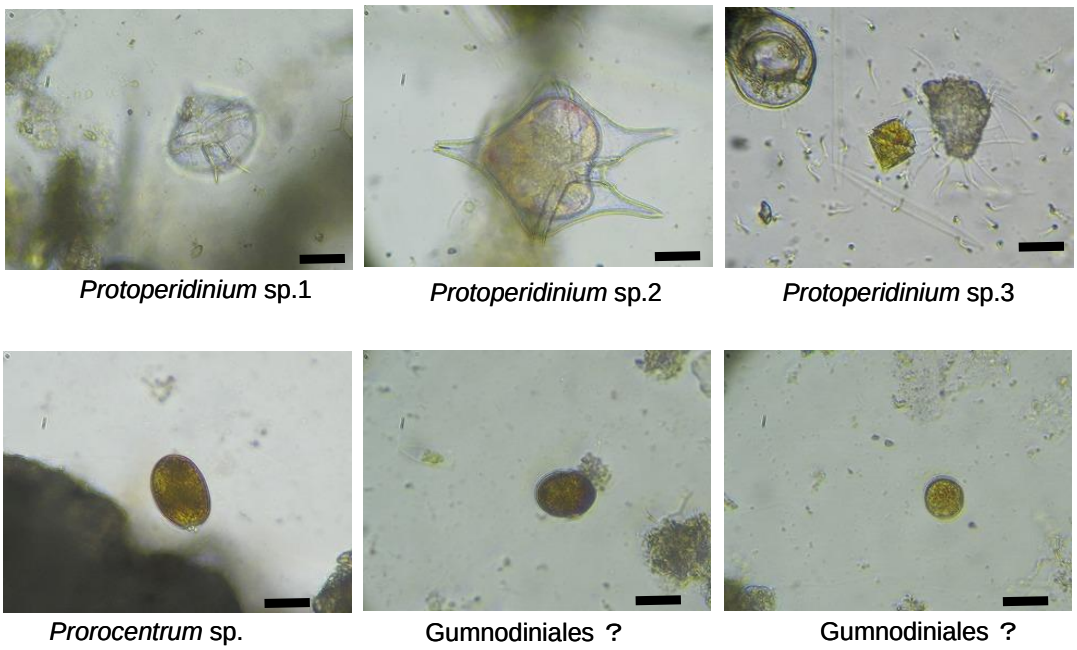


図8　分離した微細藻株の例（属名は仮同定結果、bars = 20 μm）

微細藻株の培養条件の検討を行った。平成２３年度までに、培地組成のほか、温度、照光条件、通気量や振とう条件を検討した。平成２４年度は、平成２３年度得られた知見をもとに2段階培養を行い、微細藻培養物を調製した（図9）。

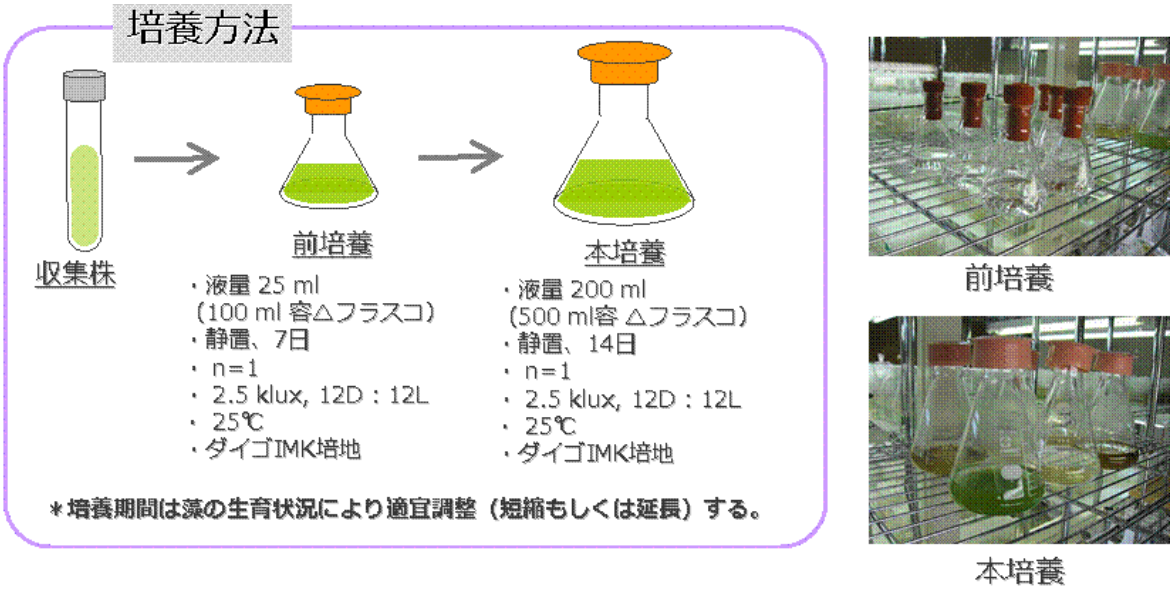


図9　微細藻株の培養

藻培養物は、微生物培養物に比較して二次代謝産物の濃度が低い為、培養抽出物を調製してスクリーニングに供することとした。

微細藻の培養物を遠心分離でろ液と藻体に分け、藻体を乾燥した後に抽出処理

を実施した。藻抽出物はシリカゲルカラムを用いて粗分画し、微細藻培養エキスを調製する手法を確立した（図10）。

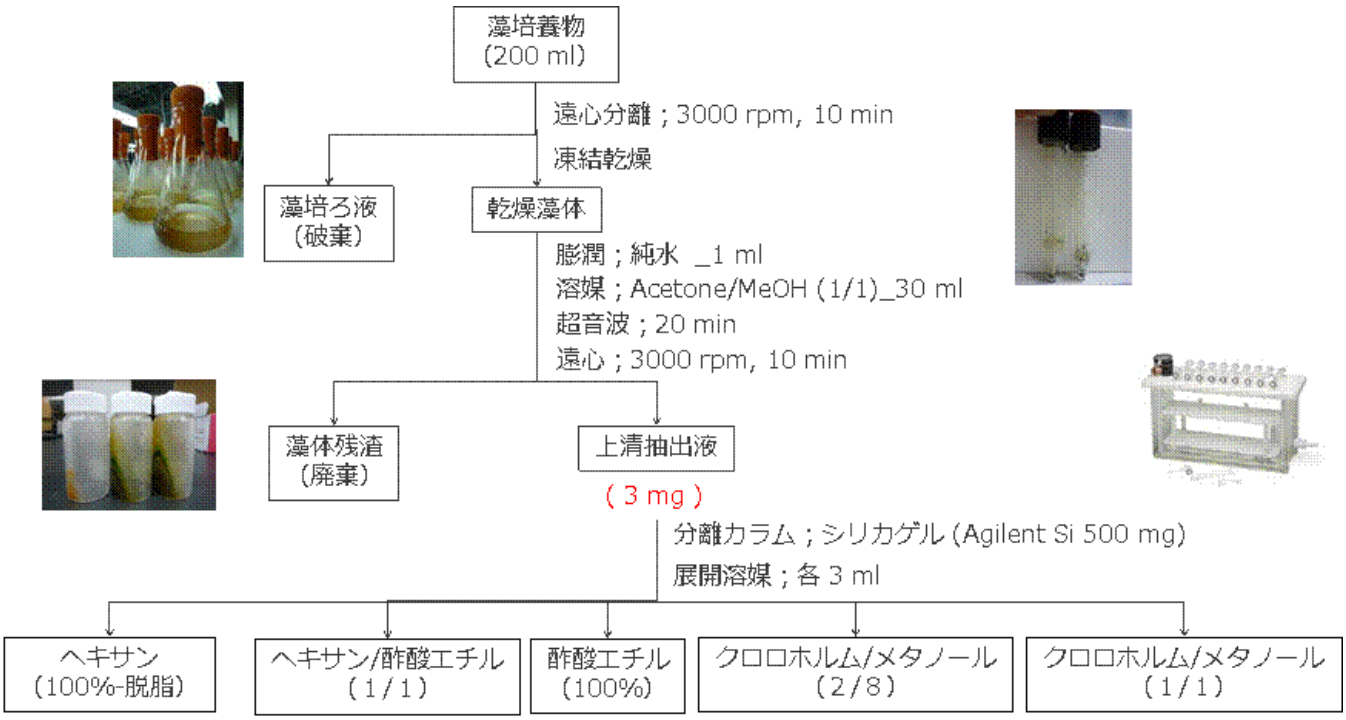


図10　微細藻培養エキスの調製

上述のように、微細藻分離源の採集法・分離法・培養法の検討を実施し、海洋性微細藻株を効率よく分離・培養する技術を確立した。培養物は粗分画して濃縮することにより、従来より感度良くスクリーニングに供することが可能となった。

2. 新規抗真菌薬の探索に関する研究

(1) 抗真菌薬探索の背景

現在、末期がん・免疫不全患者の真菌感染症が臨床現場で大きな問題となっている。中でも、カンジダ症の発症例が最も多く、アスペルギルス症がこれに継ぐ[3)]。表1に既存の抗真菌剤を挙げる。

抗真菌剤は構造と作用機序から、ポリエン系、フロロピリミジン系、アゾール系、キャンディン系の4つに分類される。ポリエン系の抗真菌剤は、広い抗菌スペクトルを有するが、強い副作用がある。フロロピリミジン系は耐性菌が頻発するため、単剤での使用は減少している。アゾール系は1980年代より上市された抗真菌剤で、これまで注射剤が多かった抗真菌剤の中にあって有効な経口剤（フルコナゾール）が実用化されたため汎用されるようになったが、副作用や毒性が課題となっている。キャンディン系は2000年代より上市され、薬効が高く安全性も高いため近年使用例が増加している。しかし、徐々にではあるが耐性菌が報告されていること[3)]、また経口剤が実用化されていないため長期治療への汎用性が低いことが今後の課題となっている。

本研究では、薬効が高く毒性が低い、経口投与可能な新規抗真菌剤の開発を目指して探索を行うこととした。

構造分類	薬剤	作用機序	特徴・課題
ポリエン系	Amphotericin B	細胞膜透過性亢進	広い抗菌スペクトルを有するが、強い副作用があり使いにくい
フロロピリミジン系	Flucytosine	核酸合成阻害	耐性株が頻発
アゾール系	Miconazole Fluconazole Voriconazole Ketoconazole	細胞膜合成阻害 （細胞膜エルゴステロール C14α脱メチル酵素阻害）	注射剤のほか、経口剤が使用可能。アゾール系の標的とするP450依存性酵素は、ヒトにも多数存在し、副作用や薬物相互作用の原因ともなるため高い特異性が必要
キャンディン系	Caspofunin Micafungin Anidulafungin	細胞壁 1,3-β-D-glucan合成阻害	作用機序特異性から安全性は高く、カンジダ症とアスペルギルス症に有効性を示す。経口剤がない。

表1　既存の抗真菌剤

抗真菌剤探索の標的として、細胞壁合成阻害を作用メカニズムとする薬剤に着目した。既存の抗生物質の作用メカニズムには、細胞膜透過性亢進や核酸合成阻害、細胞膜合成阻害、細胞壁合成阻害などが挙げられるが、その中で、細胞壁合成阻害はヒトへの毒性が低いもっとも安全性の高い標的と考えられる。

表2に示すように、ヒトは細胞壁を有さないが、真菌に特異的に存在する。そ

のため、真菌の細胞壁の合成を選択的に阻害する薬剤は、ヒトへの毒性が低いと考えられる。真菌症であるカンジダ症やアスペルギルス症の原因菌（ *Candida* sp. や *Aspergillus* sp. ）の細胞壁は1,3-β-グルカンを主要成分として構成され、その阻害剤は *Candida* sp.や*Aspergillus* sp. にとって致死的となる[4)]。

生物種	細胞壁の主成分
動物	なし
植物	セルロース
真菌	1,3-β-グルカン
細菌	ペプチドグリカン

表2　細胞壁の主要成分

本事業の抗真菌薬探索では、安全性の高さと薬効の観点から、真菌の細胞壁成分1,3-β-グルカン合成を選択的に阻害する薬剤を探索することとした。

細胞壁合成阻害剤を選択的に探索するため、遺伝子組換え手法により、細胞壁合成阻害剤特異的に感受性ないし耐性を示す株を作成し、野生株との感受性差を比較することにより作用メカニズムを判定する手法を確立することとした。また、新規抗真菌剤を探索する為には、多数の微生物・微細藻類のスクリーニングが必要となることから、ハイスループット化した評価手法の確立を目指した。

(2)　新規抗真菌薬探索のための評価系構築

抗真菌薬探索にあたり、カンジダ症の主原因菌 *Candida albicans* (BSL2) と相同性が高く病原性のない出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (BSL1) を用いて評価系の検討を行った。

細胞壁合成阻害剤選択的な耐性酵母の構築

細胞壁合成阻害剤を選択的に探索するため、遺伝子組み変え手法により、細胞壁合成阻害剤特異的に耐性を示す株を作成し、野生株との感受性差を比較することにより作用メカニズムを判定する手法を検討した。

遺伝子組換えのターゲットとして、キャンディン系抗真菌剤（細胞壁合成阻害剤）の標的分子と考えられているFks1pに着目した。*S. cerevisiae* の1,3-β-グルカン合成酵素は、触媒サブユニット（遺伝子：FKS1, FKS2）と調節サブユニット（遺伝子：RHO1）からなる膜結合タンパク質であることが明らかにされている。FKS遺伝子のホモログは、*C. albicans*（FKS1, GSC1, GSL1,

GSL2）のほか、*Aspergillus fumigatus*（アスペルギルス症の主原因菌）でも確認されている。キャンディン系抗真菌剤は、FKS1のタンパクFks1pに結合することにより酵素を阻害し、その結果、菌は正常な形態を保てなくなって死滅すると考えられている[4)]。そこで、Fks1pを過剰発現させた酵母を作成することにより、キャンディン系など細胞壁合成阻害剤に対して選択的に耐性化した株が構築できると考えた。模式図を図11に示す。

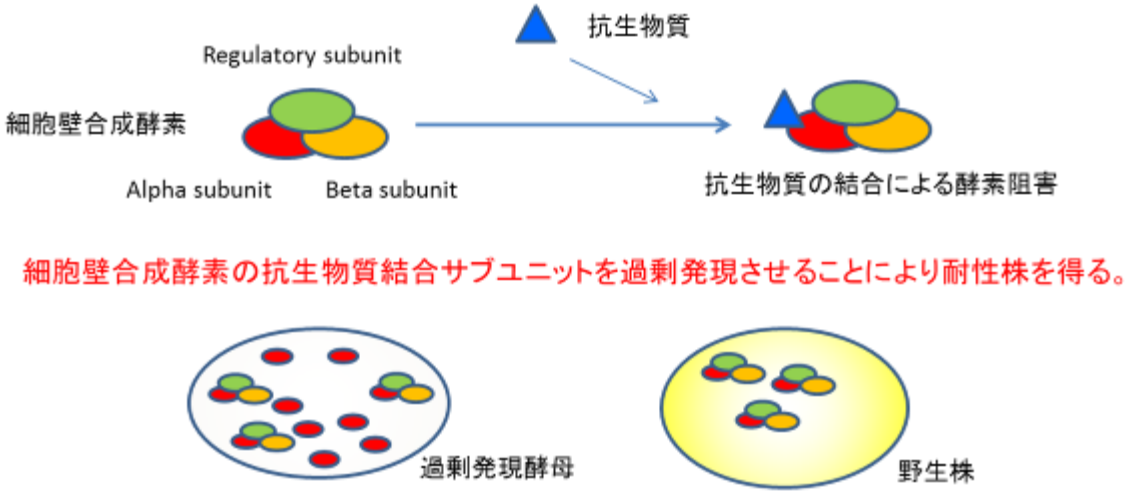


図 11　Fks1p 過剰発現酵母の細胞壁合成阻害剤に対する耐性獲得

Fks1p 過剰発現酵母の作成について検討を行った。宿主酵母としてトリプトファン栄養要求性の Y2H Gold Yeast Strain 株を使用し、宿主酵母に、FKS1遺伝子発現ベクターと、別途用意したトリプトファン（Trp）合成遺伝子を持つプラスミドを共導入することとした。

FKS1遺伝子高発現ベクターは、GAL1プロモーター（PGAL1）の下流に、酵母ゲノムを鋳型としてPCRにより増幅したFKS1遺伝子を挿入することにより作製した。作成したFKS1遺伝子発現ベクターとプラスミドを共導入した酵母を作成し、形質転換を確認した。その結果、多数のTrp+の形質転換体が得られていることが確認できたものの、FKS1の高発現化は確認できず、Fks1p過剰発現株（耐性株）の取得は困難であると判断した。そのため、本手法に代わる新たな評価法が必要となった。

細胞壁合成阻害剤選択的な新規評価法

既知細胞壁合成阻害剤（ミカファンギン）に耐性を示す酵母 *Cryptococcus* sp. に着目し、*S. cerevisiae* との感受性差を利用した新規評価法の検討を行った。

ミカファンギンを初めとするキャンディン系細胞壁合成阻害剤は、*Candida* sp. や *Sac. cerevisiae* に感受性を示すが、担子菌糸酵母の *Cryptococcus* sp. や *Trichosporon* sp. に対しては耐性であることが報告されている[3)]。その理由として、キャンディン系細胞壁合成阻害剤のターゲットであるβ-1,3-グルカンの含有量の違いが示唆されている。*Candida* sp. や *S. cerevisiae* の細胞壁はマンナン、キチン、α-1,3-グルカン、β-1,3-グルカン、β-1,6-グルカンなどで構成され、中でもβ-1,3-グルカンが約80%を占める。一方 *Cryptococcus* sp. ではβ-1,3-グルカンが少なく、代わりにα-1,3-グルカンが多い。この感受性の差は、キャンディン系以外のβ-1,3-グルカン合成阻害剤 Papulacandin, Enfumafungin, lipopeptides などでも報告されている[5)]。

そこで、β-1,3-グルカン合成阻害剤の *S. cerevisiae* 及び *Cryptococcus* sp. に対する感受性を実験的に検証した（図12）。

β-1,3-グルカン合成阻害剤（ミカファンギン）は *S. cerevisiae* に感受性、*Cryptococcus laurentii* に耐性であった。細胞膜障害剤（アムホテリシンB）と細胞膜合成阻害剤（ケトコナゾール）は、いずれにも感受性を示した。すなわち、*Cr. laurentii* はβ-1,3-グルカン合成阻害剤選択的に耐性を示した。このことから、2次評価判定基準を *S. cerevisiae* >> *Cr. laurentii* としてHTS化の検討を行った。

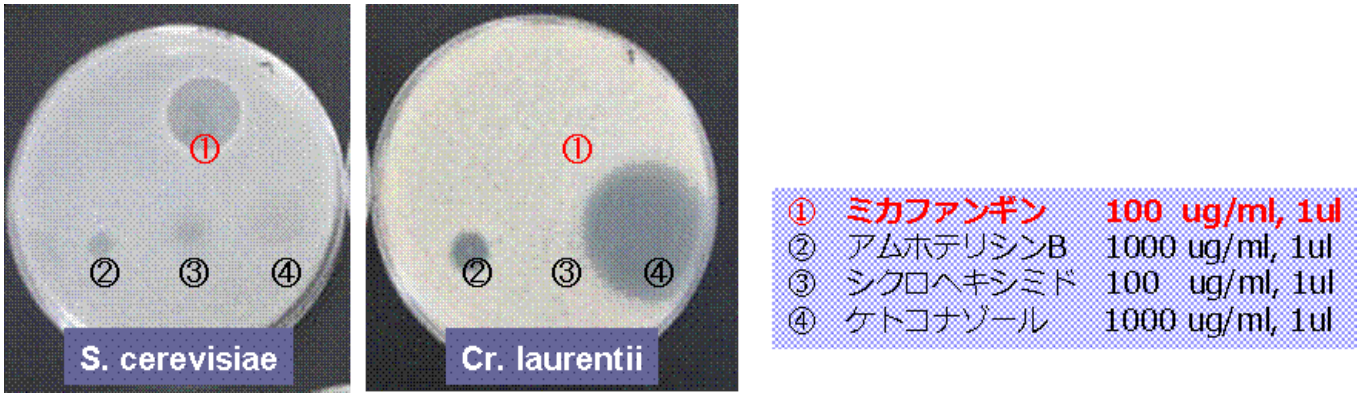


図 12 *S. cerevisiae* 及び *Cr. laurentii* の薬剤感受性

検定菌2種混合法の検討

β-1,3-グルカン合成阻害剤が *S. cerevisiae* >> *Cr. laurentii* のレスポンスを示すことを応用し、より効率化を図るため、2種の検定菌を混合した評価法を検討した。

S. cerevisiae と *Cr. laurentii* の2つの検定をするよりも、2種の検定菌を混

合し一度に評価できれば効率が大幅に上がる。ただし、いずれの検定菌もクリーム色を呈するため、そのまま混合すると判定が容易でない。そこで、*S. cerevisiae* として、標準株と同様の薬剤感受性を示し赤色を呈する変異株を用いた。これにより、赤色の *S. cerevisiae* 変異株とクリーム色の *Cr. laurentii* の感受性差を判定することになり、判定が容易となり大幅に効率が向上した（図13）。

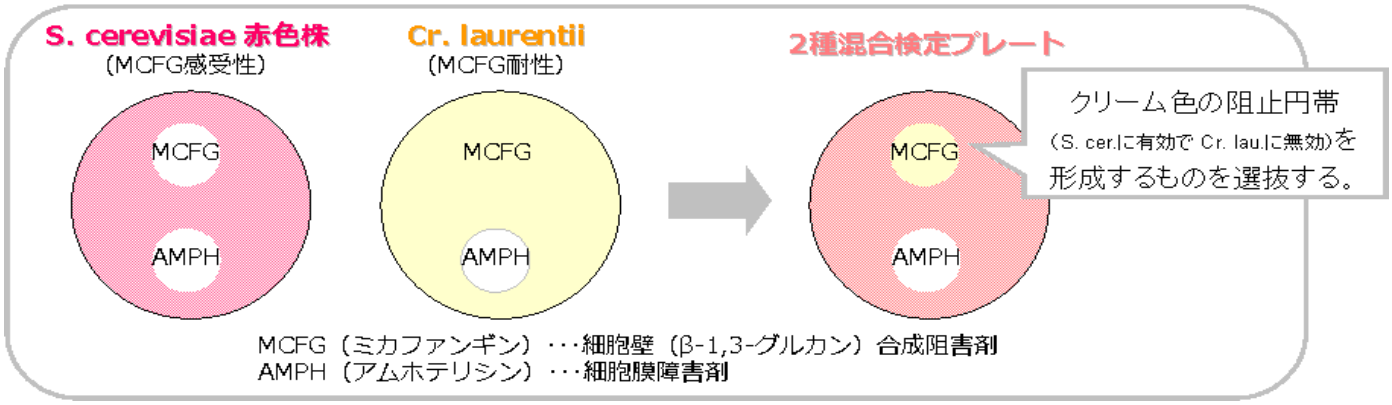


図13　検定菌2種混合評価法

赤リング評価法の検討

1次スクリーニングの更なるHTS化を目指し、細胞壁合成阻害剤選択性の高い新規評価法を検討した。

検定プレートの作成条件を種々検討した結果、細胞壁合成阻害剤が作用した場合にのみ、抗菌阻止円の淵が赤いリングになる検定法を見出した。図14に赤リング検定法での各種抗真菌剤のレスポンスを示す。細胞膜障害剤（アムホテリシンB）、タンパク合成阻害剤（シクロヘキシミド）、細胞膜合成阻害剤（ケトコナゾール）は、阻止円を形成するものの赤いリングは認められない。一方、細胞壁合成阻害剤であるミカファンギン、キャスポファンギン、Aculeacin A は、いずれも阻止円の淵に赤いリングが確認され、赤リング法が細胞壁合成阻害剤のみに陽性となる新規評価法であることが判明した。

赤リング法の発見により、非常に容易に細胞壁合成阻害剤の選別を行うことが可能となり、飛躍的にスクリーニング効率を向上させることができた。

※ 図14、図１５に関し、委託業務の成果として、産業財産権等の対象となる技術情報（未出願又は未公開の産業財産権等又は未公開論文）、ノウハウ等の秘匿情報が含まれるため、それらは非公開とする。

(3)　スクリーニングの実施

スクリーニングの実施状況を図16に示す。平成２４年度採集した1030分離源から、海洋性微生物・微細藻類株を分離・培養し、微生物１００万株及び微細藻類2000検体を抗真菌スクリーニングに供した。新たに開発した赤リング法を用いて1次スクリーニングを実施し、赤リングを示す、約500株を選別した。菌種の異同による重複を判別し、90株に絞り込んだ。次に抗菌スペクトルによる絞込み（*S. cerevisiae* >> *Cr. laurentii*）を行い、25株（糸状菌3株、放線菌17株、細菌5株）を選抜した。

図16　抗真菌剤のスクリーニング実施状況

候補株25株及びミカファンギン（MCFG）の抗菌スペクトラムを表3に示す。検定菌は表4に示す12種の真菌を用いた。

阻止円Φ(mm)

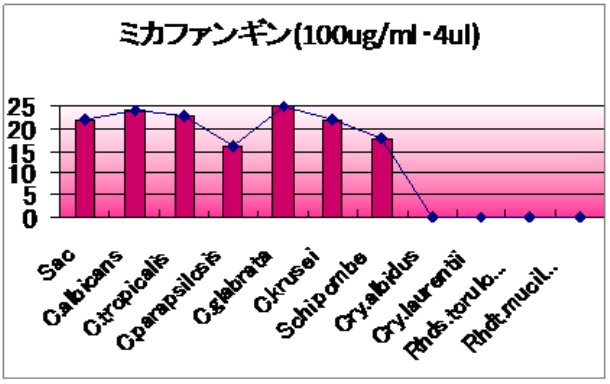
	Sac	Cry.albidus	Cry.laurenti	Rhd.toruloides	Rhd.mucilaginosa	C.albicans	C.tropicalis	C.parapsilosis	C.glabrata	C.krusei	Schi.pombe	A.fumigatus	赤リング
A30	26	30	(+)	0	30	0	(+)	(+)	0	20.5	7	(+)	×
A162	15	10	±	0	0	15	9	0	7.5	0	30	11	△
A84	20	16	±	13	14	14	±	12	16	14	34	8	○
F37	16	0	0	0	(+)	13	14	10	0	14	0	(+)	○
A160	(+)	(+)	0	11	10	(+)	(+)	0	7.5	0	16	7	△
A240	9	(+)	0	11.5	9	0	0	0	0	7	18	(+)	○
F265	9	(+)	0	0	0	+	0	8	0	9		(+)	○
F344	8	0	0	0	0	6	13	8	0	0	0	(+)	○
MCFG	21	0	0	0	0	21	21	12	25	20	13	(20)	○
B14	29	40	0	0	8	17	8	13.5	0	0	24	−	○
A238	20.5	18	0	10	13	19	8	18	19	14	32	(+)	○
A241	12	8	0	13	12	6	0	0	9	10	22	(+)	○
A287	10	8	0	11.5	10	5.5	8	8	11.5	10.5	20	(+)	○
A341	10	8	0	12	8	6	8	0	8	0	14.5	(+)	○
A343	30	30	0	15	23	18	8	19	15	8	42	(+)	○
A1	11	8	8	10	8	8	0	8	0	11	20	−	○
B38	11	9	8	8	12	8	8.5	9	7	8.5	14	13	○
B42	10	8	8	9.5	10	6	8	0	7	8	11	17	△
A60	15	16.5	12	12	23	8	10	11.5	16	15	30	22	○
A239	9	10	8	10	12	7	8	8	20	8	28	7	○
A288	14	9	10	14	13	6	9	9	10	12	24	(+)	○
B2	35	44	12	9	22	28	14	21	12	12	34	7	○
B5	29	38	12.5	0	14	22	8	16.5	0	0	34	−	○
A132	18.5	17	11	18	18	12	13	9.5	14	13	24	7	△
A161	15.5	13	8	16	14	9	11	0	13	10	17	7	△
A342	32	27	14	20	25	26	15	29	26	19	43	17	○
A289	14	8.5	11	14	13	6	10	8	11	12	30	(+)	○

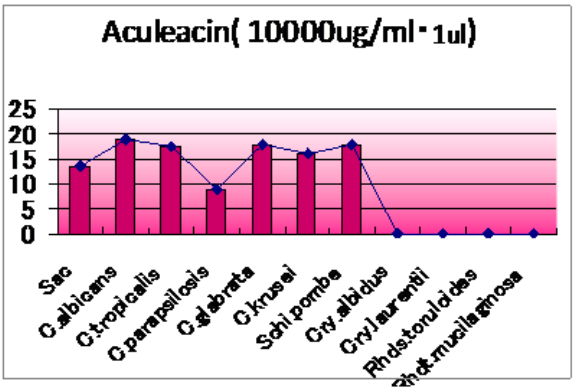
表3　候補株25株とミカファンギン（MCFG）の抗菌スペクトラム

子嚢菌	*Saccharomyces cerevisiae*	NBRC 100929	
子嚢菌	*Schizosaccharomyces pombe*	NBRC 1628	
子嚢菌	*Candida albicans*	NBRC 1594	カンジダ症原因菌
子嚢菌	*Candida tropicalis*	NBRC 1400	カンジダ症原因菌
子嚢菌	*Candida parapsilosis*	NBRC 1396	カンジダ症原因菌
子嚢菌	*Candida glabrata*	NBRC 0622	カンジダ症原因菌
子嚢菌	*Candida krusei*	NBRC 1395	カンジダ症原因菌
子嚢菌	*Aspergillus fumigatus*	NBRC 33022	アスペルギルス症原因菌
担子菌	*Cryptococcus albidus*	NBRC 0378	クリプトコックス症原因菌
担子菌	*Cryptococcus laurentii*	NBRC 0609	クリプトコックス症原因菌
担子菌	*Rhodotorula mucilaginosa*	NBRC 0909	
担子菌	*Rhodosporidium toruloides*	NBRC 8766	

表4　抗菌スペクトラムで用いた検定菌12種

既知抗真菌剤の抗菌スペクトラム（図17～24；縦軸は阻止円Φmm）と候補株の抗菌スペクトラム（図25；縦軸は阻止円Φmm）を比較することにより、細胞壁合成阻害作用が高く新規性が期待できる候補株から精製を進めることとした。





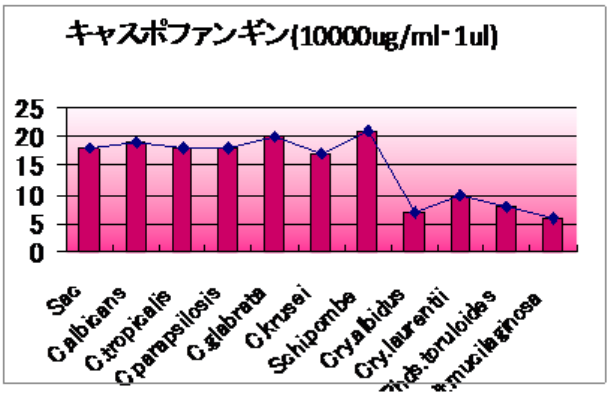


図17　細胞壁（β-1,3-グルカン）合成阻害剤の抗菌スペクトラム

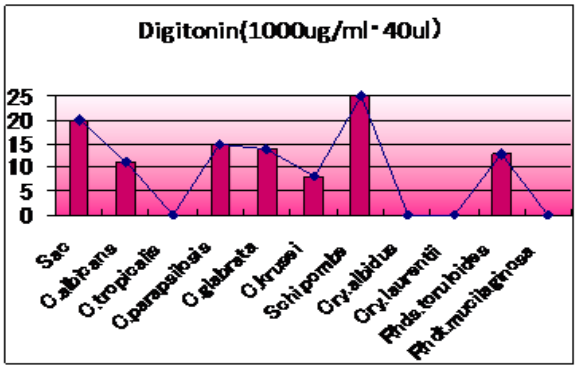


図18　細胞壁（グルカン、キチン、マンナン）合成阻害剤の抗菌スペクトラム

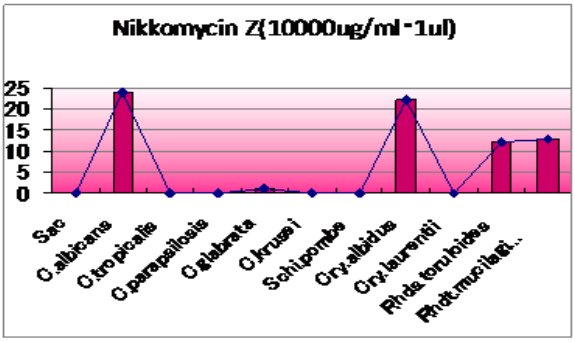


図19　細胞壁（キチン）合成阻害剤の抗菌スペクトラム

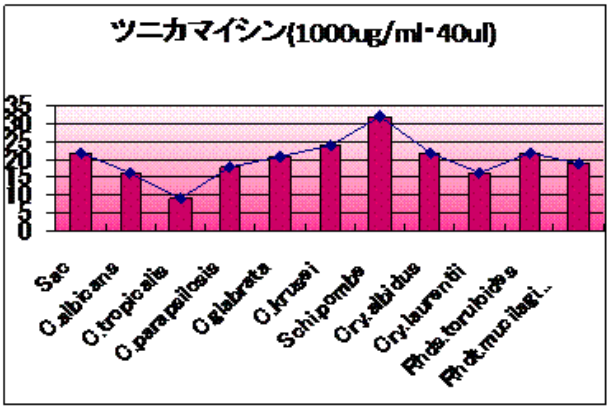
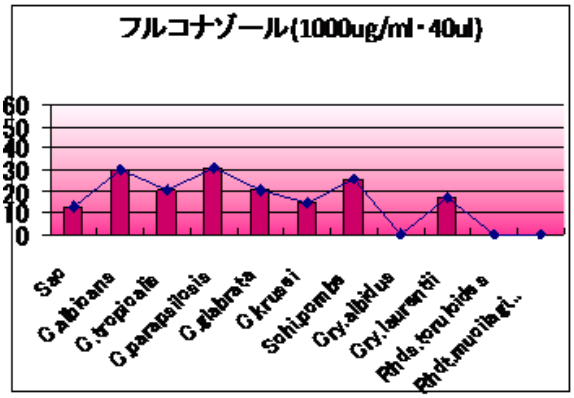


図20　細胞壁（マンナン）合成阻害剤の抗菌スペクトラム



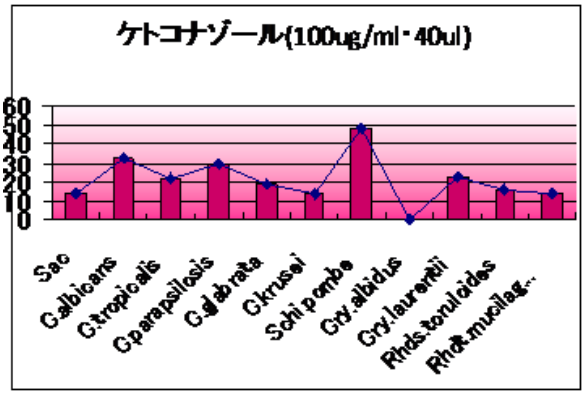


図21　細胞膜合成阻害剤の抗菌スペクトラム

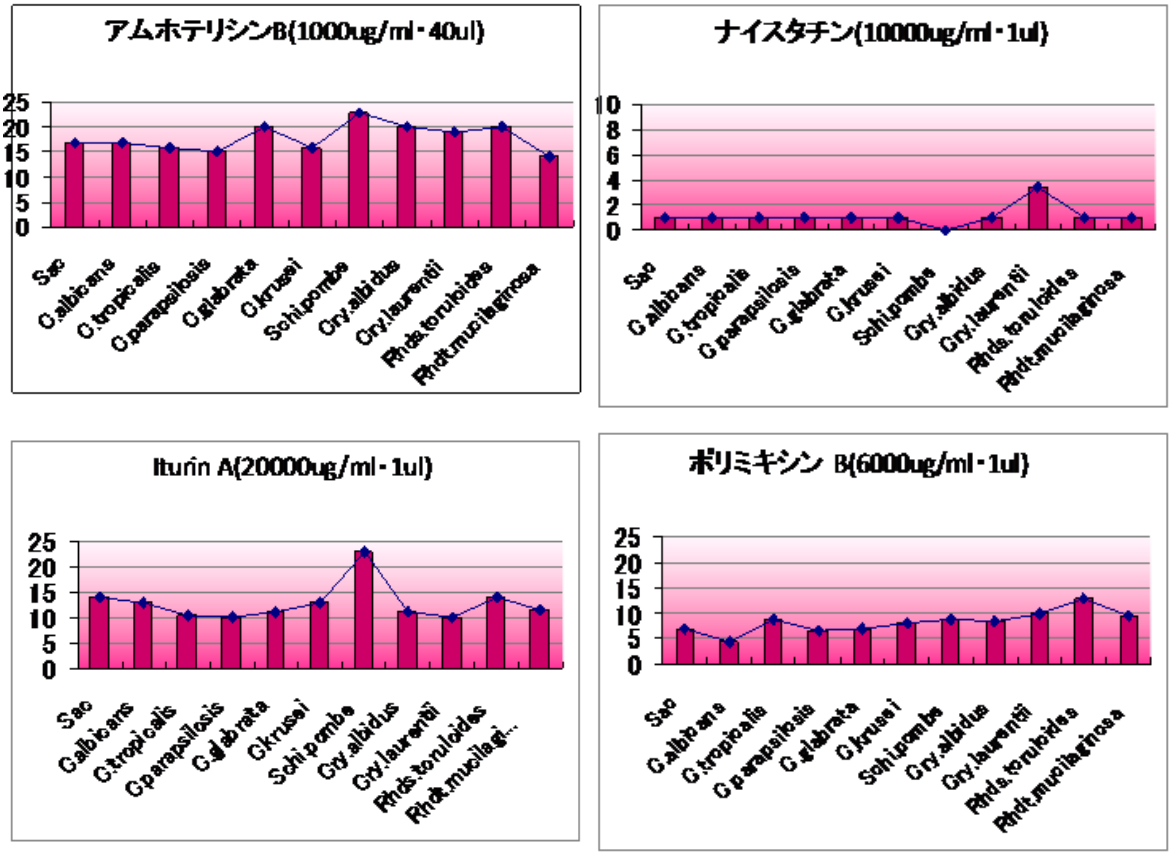


図22　細胞膜障害剤の抗菌スペクトラム

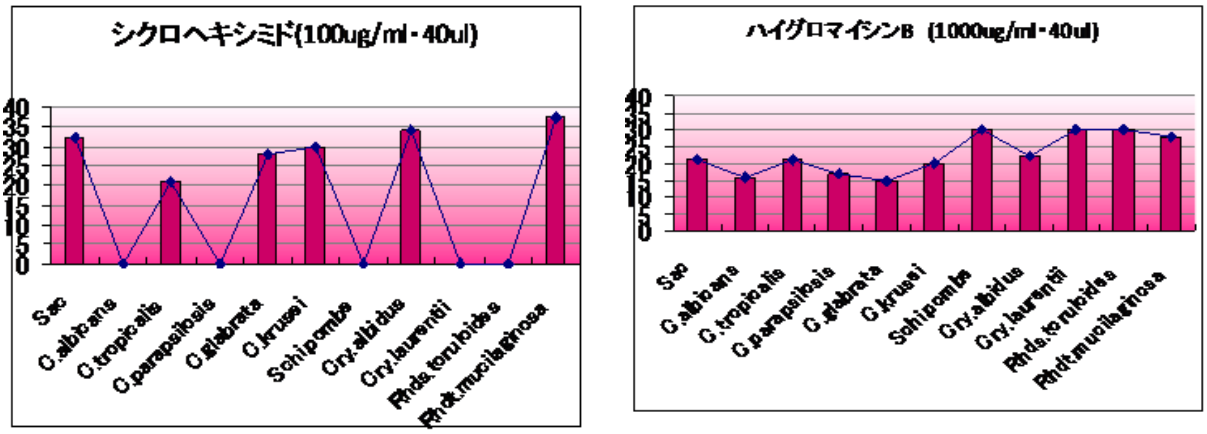


図23　タンパク合成阻害剤の抗菌スペクトラム

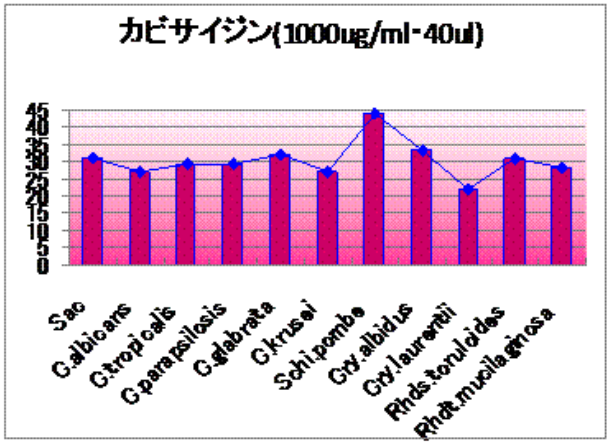


図24　その他の抗真菌剤の抗菌スペクトラム

選別された候補株の各種真菌に対するスペクトラム

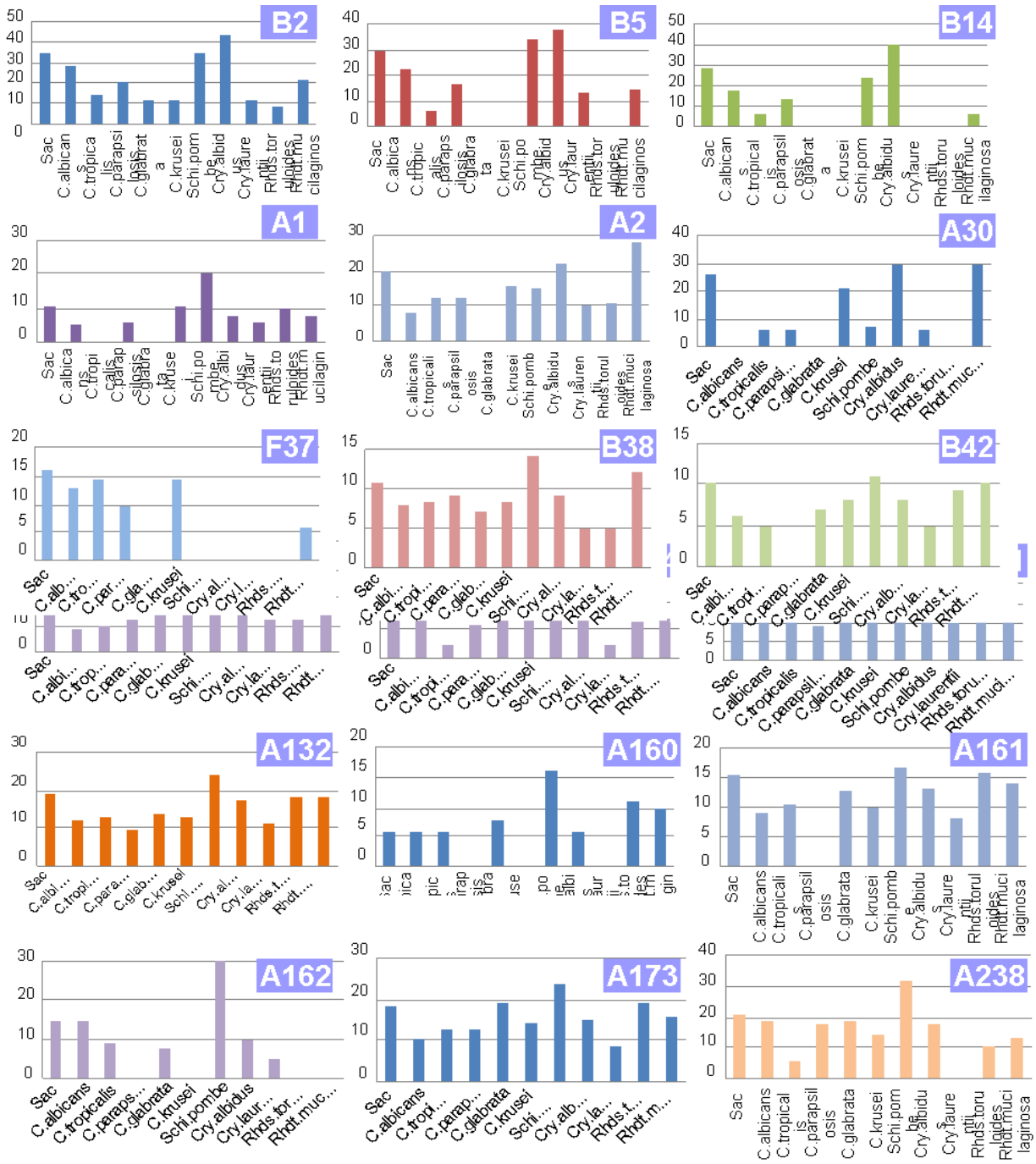


図25（1）　候補株の抗真菌剤の抗菌スペクトラム

図25（2）　候補株の抗真菌剤の抗菌スペクトラム

3.　活性化合物の精製及び構造解析に関する研究

（1）　活性化合物の精製と構造解析

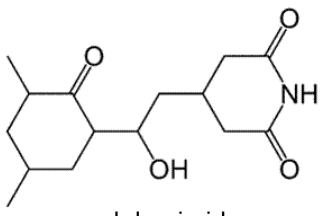
スクリーニングで得られた候補株は、琉球大学田中教授と連携し順次精製を実施した。

①赤リングを示さない3株SCTA0030, SCTA0002, SCTA0060の精製

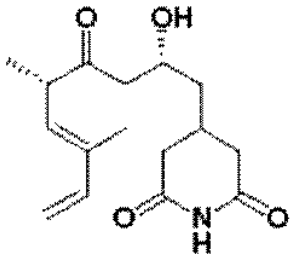
赤リングを示さないが抗菌スペクトルが細胞壁合成阻害剤に近いレスポンス（*Sac* ≫ *Cry*）を示す3株（SCTA0030, SCTA0002, SCTA0060；いずれも放線菌）の精製を行った。

まず、SCTA0030株の液体培養を行い、培養上清を分画･精製して活性成分を単離した。MS 及び NMRスペクトルにより構造解析を行い、cycloheximide類[6)]と同定した。また、SCTA0002株から cycloheximide、SCTA0060株から streptimidone[7)] を単離した（図26）。これら glutarimide 系抗真菌剤は、*Streptomyces griseus*, *St. noursei*, *St. rimosus* など複数の放線菌から単離されている。抗真菌作用のメカニズムは、タンパク合成阻害作用によることが知られている。

精製した化合物および cycloheximide の標品は、いずれも*Sac* ≫ *Cry*のレスポンスを示すものの赤リングを示さなかった。このことから、細胞壁合成阻害剤探索において赤リング発現が必須であることが確認できた。



cycloheximide



streptimidone

図26　glutarimide 系抗真菌剤（cycloheximide, streptimidone）

②赤リングの発現が弱い株SCTA0162株（放線菌）の精製

赤リングを示すが弱い株 SCTA0162株（放線菌）の精製を行った。

SCTA0162の液体培養を行い、液液分配とカラムクロマトグラフィーにより分画･精製し、活性成分2成分を単離した。MS 及び NMRスペクトルにより構造解析を行い、それぞれ wortmannin[8)], 11-deacetoxywortmannin[9)] と同定した（図27）。Wortmannin 類は、1968年に糸状菌 *Penicillium* sp. から単離

された既知化合物で、PI3 kinase 阻害作用を有し、抗がん剤として開発が進められている。

PI3 kinase 阻害作用を有することは、すなわちシグナル伝達阻害により細胞壁合成を阻害している可能性を示していた。このことから、赤リングが弱い場合は、既存の細胞壁合成阻害剤とは異なるメカニズムで細胞壁に作用する可能性が示唆された。

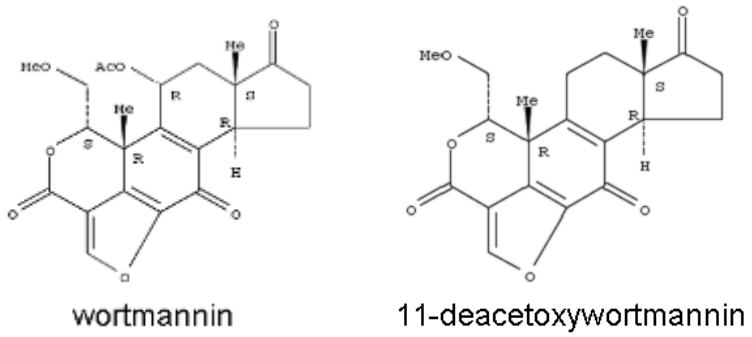


図27　wortmannin 類

③赤リングを示す株 SCTA0287株の精製

これまでの精製より、細胞壁合成阻害剤探索において赤リングが必須であることが判明したため、赤リングを示す株 SCTA0287株（放線菌）の精製を行った。

SCTA0287株は抗真菌化合物生産量が少なく、そのままでは精製が困難であったため、液体培養の条件検討を行った。種々検討した結果、SYMA培地を用いることにより力価を大幅に向上させることができた（図28）。

液体培養上清の抗真菌活性

培地	阻止円Φ
GA	0 mm
SYMA	18 mm

培養条件
培養温度：28℃
培養日数：3日
振とう条件：各培地 10 ml / 大試験管, 250rpm

GA	
glucose	10 g
yeast extract	1 g
malt extract	1 g
L-asparagine	1 g
Tap water	1 L
pH 7.2	

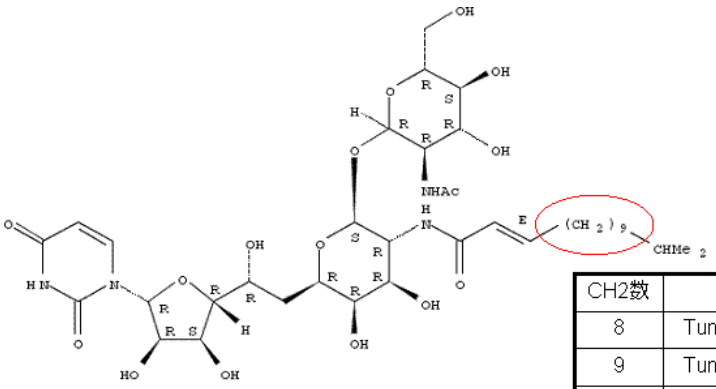
SYMA	
solble starch	40 g
yeast extract	10 g
malt extract	1 g
L-asparagine	1 g
NaH_2PO_4	2 g
Tap water	1 L
pH 7.2	

図28　SCTA0287株の培養検討

SYMA培地で液体培養を行い、培養上清を分画・精製した結果、活性成分3成分を単離した。MS 及び NMRスペクトルにより構造解析を行い、それぞれ

Tunicamycin A, B, C[10] と同定した（図29）。また、SCTA0287と近縁の放線菌 SCTA0288, SCTA0289 の培養物について、Tunicamycins 標品と比較した結果、HPLCの溶出時間およびUVスペクトルが一致したことから、これらの候補株の活性成分も Tunicamycins と同定した。Tunicamycins は、*Streptomyces lysosuperificus*, *St. griseoflavus*, *Bacillus* sp. から単離されている化合物で、抗菌および抗真菌作用が知られている。抗真菌作用のメカニズムは、UDP-GlcNAc から polyisoprenyl lipid carrier への GlcNAc の取り込み阻害のほか、細胞壁成分のマンナンを阻害することが報告されている。

このことから、赤リングを示す化合物は、細胞壁に作用することが確認された。



CH2数		CAS	分子量
8	Tunicamycin C	66081-37-6	816.89
9	Tunicamycin A	66054-36-2	830.92
10	Tunicamycin B	66081-36-5	844.94

図29　Tunicmycin A, B, C

④赤リングを示す株 SCTF0037株の精製

赤リングを示す SCTF0037株（糸状菌）の精製を行った。

培養検討の結果、SCTF0037株は培養上清よりも菌体に活性成分を保持しており、液体培養よりも固体培養の方が高い抗真菌活性を示したことから、固体培養物から精製を行った。固体培養物を50%アセトンで抽出し、液液分配とカラムクロマトグラフィーにより分画･精製を行い、活性成分を単離した。MS 及び NMRスペクトルにより構造解析を行い、Ascosteroside A[11] と同定した（図30）。Ascosteroside A は、アメリカの製薬会社 Bristol-Myers Squibb Company が1996年にケニアの土壌から分離した糸状菌 Ascotricha amphitricha から単離した化合物で、Enfumafungin などと共に Acidic terpenoids に分類される。高い抗真菌活性を有し、その作用メカニズムはβ-1,3-グルカン合成阻害によることが報告されている。Enfumafungin は経口吸収能が高く、抗真菌活性も高いことから医薬品への開発が進められている。

既知化合物ではあったものの、目的とする細胞壁合成阻害剤が本スクリーニン

グで得られることを確認した。

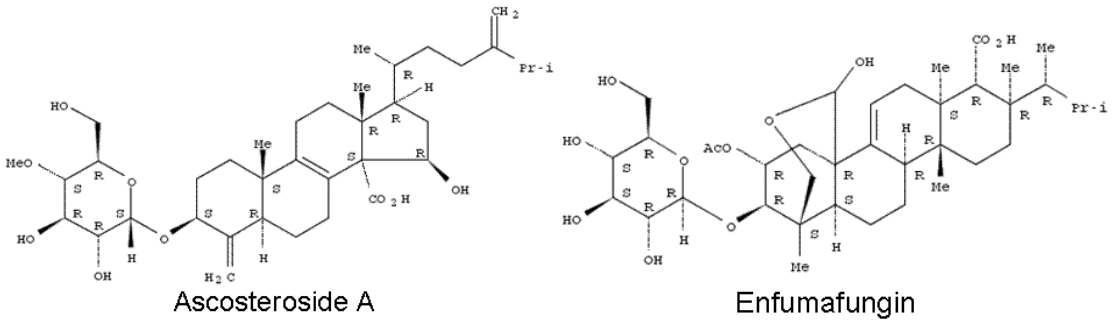


図30　Ascosteroside A 及び Enfumafungin

⑤赤リングを示す株 SCTF00３４４株の精製

赤リングを示す SCTF0034４株（糸状菌）の精製を行った。

培養検討の結果、SCTF0034４株をポテト・デキストロース液体培地で２８℃、１０日間培養し、培養上清及び菌体（９０％アセトン抽出液）を酢酸エチルにて液液分配を行った。酢酸エチル溶液を減圧濃縮し乾固した後、９０％メタノール溶液で溶解後、ヘキサンを用いて液液分配を行った。９０％メタノール画分を濃縮乾固し、クロロホルムに溶解後オープンシリカゲルカラムを行った。クロロホルム対メタノールの比率を変化させ溶出を行った。その結果。活性画分はクロロホルム対メタノール１０：１，５：１、１：１の画分に存在した。
活性の有った３画分を集め濃縮乾固させ水に溶解した。溶解した水をさらに逆相系ＯＤＳオープンカラムにて分画を行った。メタノール濃度を０％から１００％まで１０％のステップアップ分画を行った。その結果、９０％メタノール画分に活性が存在した。活性画分を濃縮乾固し、分取型ＨＰＬＣ（ＯＤＳカラム、８５％メタノール移動相）を用いて活性成分の精製を行った。その結果、２か所に活性を示す画分が有り、それぞれ２ｍｇの純度９５％での分画を得た。各分画をＬＣ／ＭＳ及びＮＭＲ分析にかけ、それぞれエルゴキニンＡ，及びＢ（図３１）と決定した。Ergokonin A、Ｂは１９９１年に糸状菌 *Trichoderma koningii*から単離されEnfumafungin などと共に Acidic terpenoids に分類される。高い抗真菌活性を有し、その作用メカニズムはβ-1,3-グルカン合成阻害によることが報告されている。

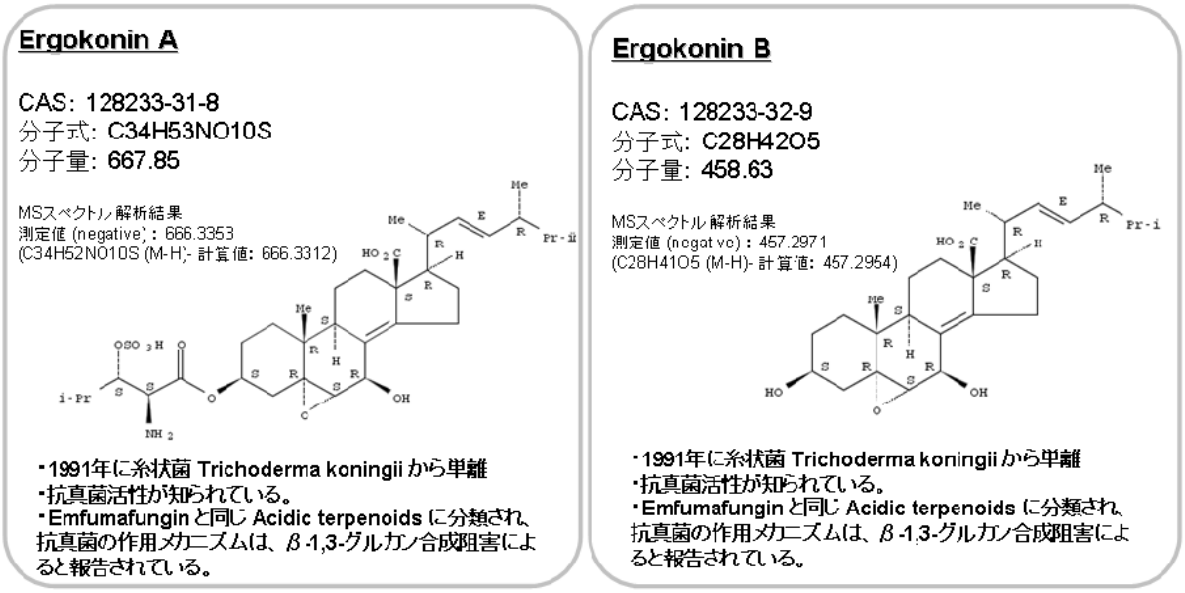


図３１　Ergokonin A&B

⑥赤リングを示す株 SCTA００３４３株の精製

赤リングを示す SCTA00343株（放線菌）の精製を行った。

培養検討の結果、SCTA00343株をＹＭＧ液体培地（図３２）で２８℃、４日間培養（図３３）し、培養上清及び菌体（９０％アセトン抽出液）を活性炭に吸着させ９０％アセトンで溶出を行った。９０％アセトン溶出画分を濃縮乾固させクロロホルム・メタノール（１０％）溶液に溶解後シリカゲルカラムを行った。

＊Yeast extract　0.3%
＊Peptone　0.5%
＊Malt extract　0.3%
＊Glucose　1%
＊Sea Water　3.84%
ｐＨ　７．０

図３２　ＹＭＧ培地組成

・100ml medium in 300ml vol triangle flask
・4days for 28℃
・Rotary shaker 200rpm

図３３　培養条件

クロロホルム対メタノールの比率を変化させ溶出を行った。その結果。活性画分はクロロホルム対メタノール１：１，１：２、０：１の画分に存在した。

活性の有ったクロロホルム対メタノール１：２の画分を集め濃縮乾固させメタノールに溶解した。溶解したメタノールをさらにHPLC（HILICカラム、図３４）にてアセトニトリル８０％濃度で分画を行った。溶出画分の生物活性を測定し、活性画分を用いて、さらにＬＣ／MS（図３５）及びＮＭＲ分析を行い、クラバマイシンD（図３６）と同定した。_

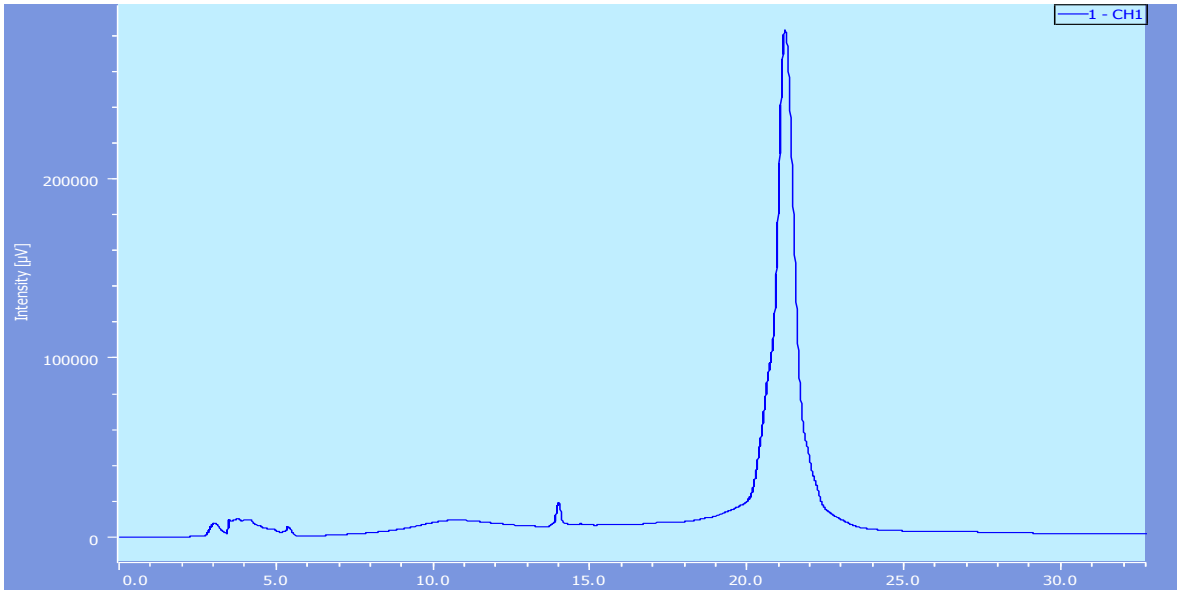


図３４　HPLC condition: HILIC column
80% Acetonitrile (isocratic)

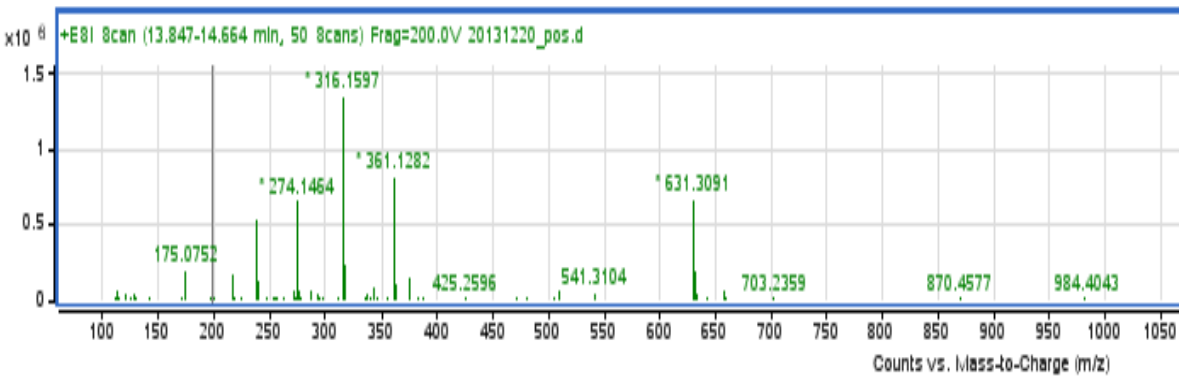
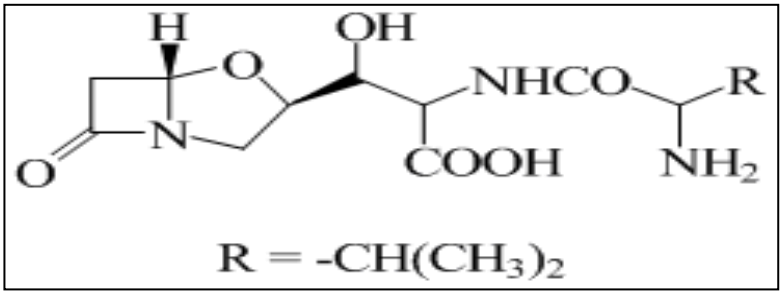


図３５　LC/MS condition: HILIC column 80%Acetonitrile溶出



C13H21N3O6

315.143037

図３６　βラクタム抗真菌剤クラバマイシンＤの構造

⑵　抗真菌データベースの構築

スクリーニングを通過した株には、既知抗真菌化合物が多く含まれていると予想される。そのため、既知抗真菌化合物か否かを早期に判定し、化合物の新規性を効率よく判定する手法が必要となる。そこで、候補株の培養抽出物のLC/MS解析結果と、既知抗真菌化合物の分子量とを照合して効率よく判定することとした。

其の為、まず既知抗真菌化合物の分子量データベースを構築した。天然由来の既知抗真菌剤をリスト化し、分子量、分子式、化学構造、生理活性及び起源生物の情報を含むデータベースを構築した。これにより活性成分の同定が容易となり、HTS化した新規化合物選別法が確立できた。

4.　新たに得られたA84株の生産する新規化合物

(1)　分離源の採集地及び分離方法

地域固有の微生物相を有する、隔離された場所からの採集を実施し、新規化合物を生産するA84株を発見する事に成功した。A84株は、鹿児島県奄美大島加計呂麻島の海砂を分離源とし、得られた新規化合物をKakeromycinと名づけた。

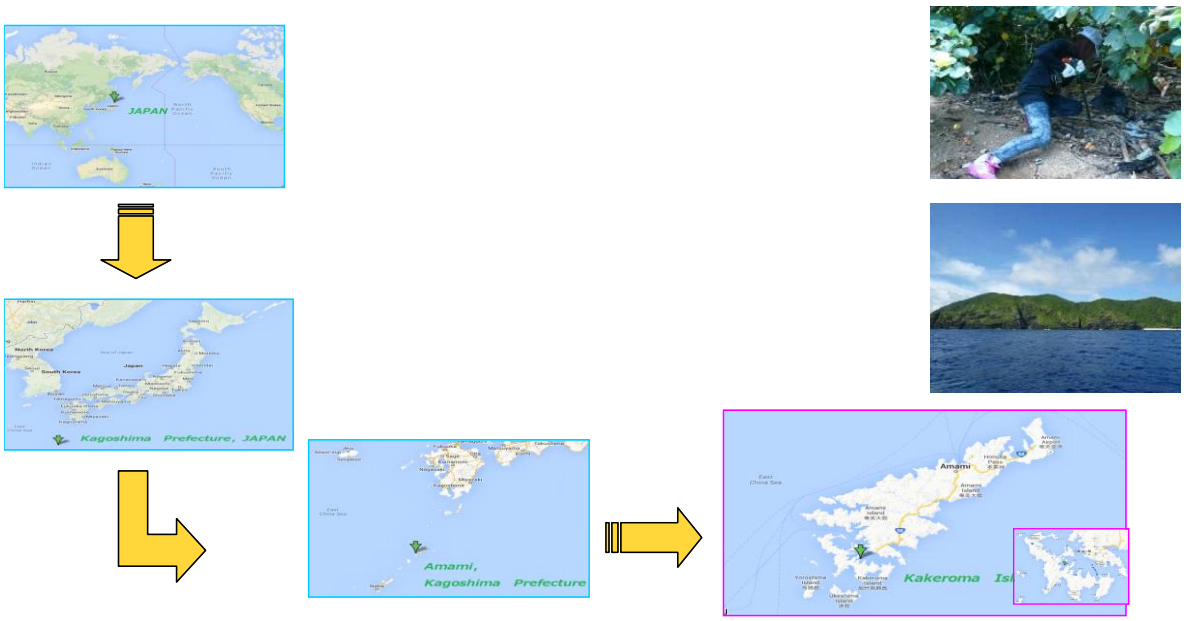


図37　鹿児島県奄美大島加計呂麻島

(2)　生産菌の同定

新規抗真菌活性物質を生産するA84株において、16S r RNAの塩基配列の相同性解析を行った結果、最も高い相同性（９０％）を示した種は*Streptomyces nodosus*であった。しかし、相同性が90%である事からA84株が新種である可能性が高く、更なる解析を行い、最尤法、最小進化法、最節約法においても同様の結果が得られている（図37～４１）。

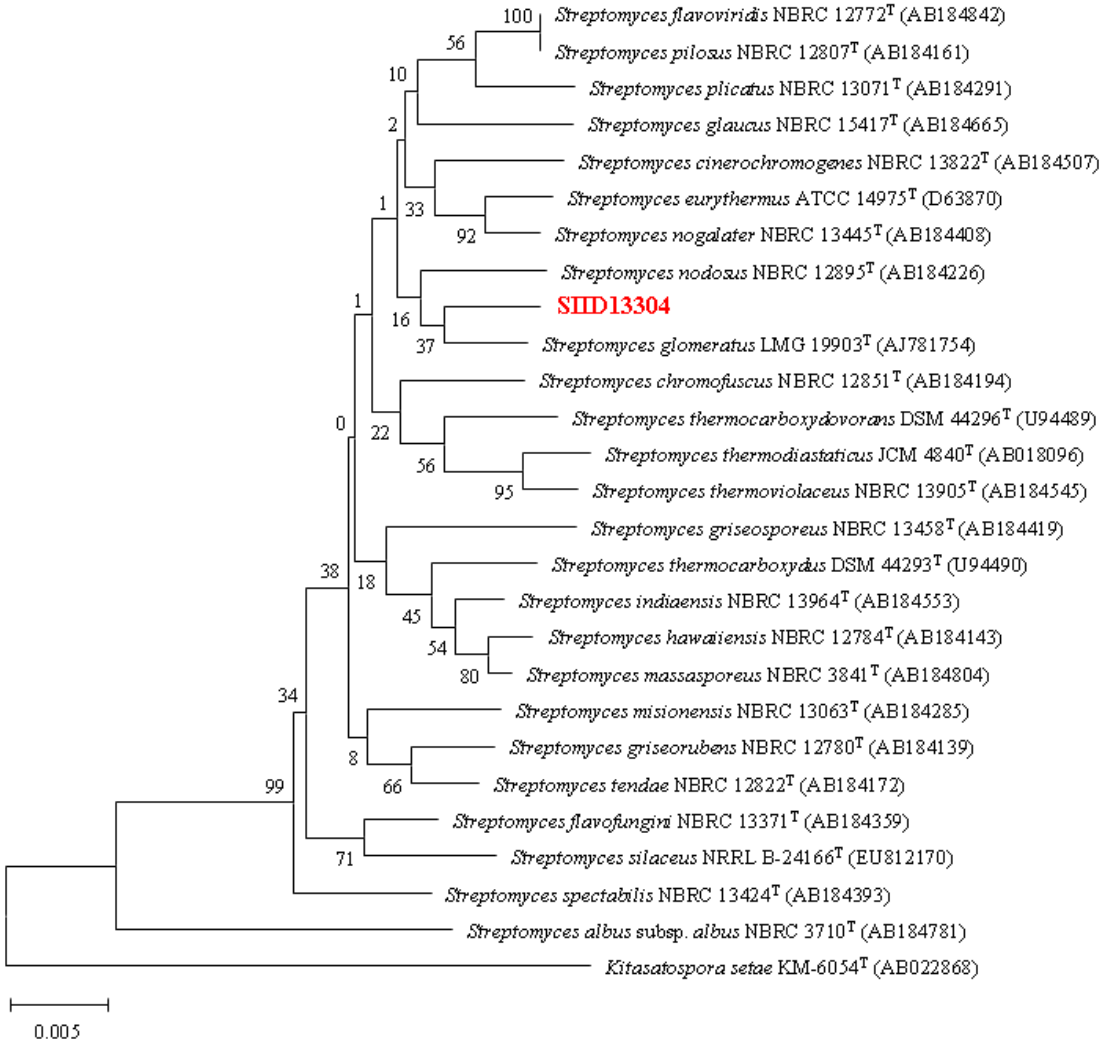

Streptomyces flavoviridis NBRC 12772T (AB184842)
Streptomyces pilosus NBRC 12807T (AB184161)
Streptomyces plicatus NBRC 13071T (AB184291)
Streptomyces glaucus NBRC 15417T (AB184665)
Streptomyces cinerochromogenes NBRC 13822T (AB184507)
Streptomyces eurythermus ATCC 14975T (D63870)
Streptomyces nogalater NBRC 13445T (AB184408)
Streptomyces nodosus NBRC 12895T (AB184226)
SIID13304
Streptomyces glomeratus LMG 19903T (AJ781754)
Streptomyces chromofuscus NBRC 12851T (AB184194)
Streptomyces thermocarboxydovorans DSM 44296T (U94489)
Streptomyces thermodiastaticus JCM 4840T (AB018096)
Streptomyces thermoviolaceus NBRC 13905T (AB184545)
Streptomyces griseosporeus NBRC 13458T (AB184419)
Streptomyces thermocarboxydus DSM 44293T (U94490)
Streptomyces indiaensis NBRC 13964T (AB184553)
Streptomyces hawaiiensis NBRC 12784T (AB184143)
Streptomyces massasporeus NBRC 3841T (AB184804)
Streptomyces misionensis NBRC 13063T (AB184285)
Streptomyces griseorubens NBRC 12780T (AB184139)
Streptomyces tendae NBRC 12822T (AB184172)
Streptomyces flavofungini NBRC 13371T (AB184359)
Streptomyces silaceus NRRL B-24166T (EU812170)
Streptomyces spectabilis NBRC 13424T (AB184393)
Streptomyces albus subsp. albus NBRC 3710T (AB184781)
Kitasatospora setae KM-6054T (AB022868)
0.005

図38　近隣結合法

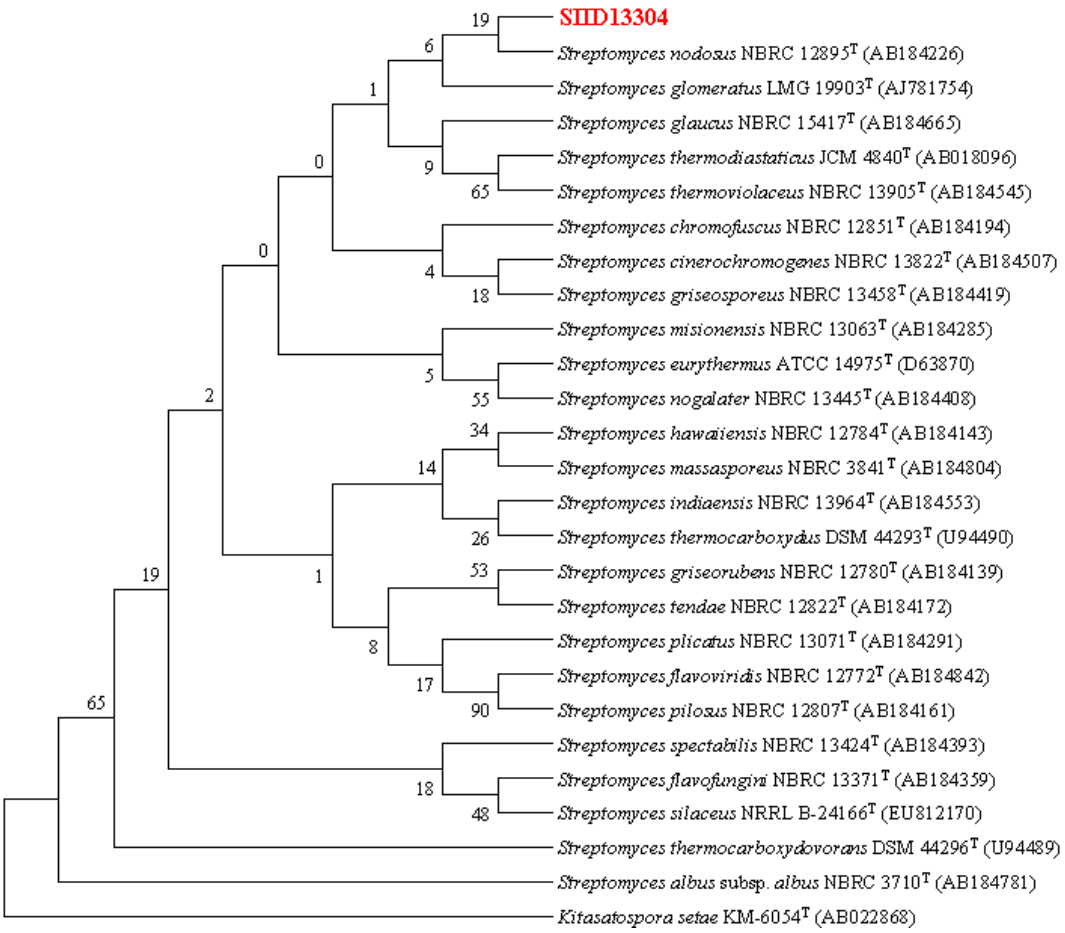

SIID13304
Streptomyces nodosus NBRC 12895T (AB184226)
Streptomyces glomeratus LMG 19903T (AJ781754)
Streptomyces glaucus NBRC 15417T (AB184665)
Streptomyces thermodiastaticus JCM 4840T (AB018096)
Streptomyces thermoviolaceus NBRC 13905T (AB184545)
Streptomyces chromofuscus NBRC 12851T (AB184194)
Streptomyces cinerochromogenes NBRC 13822T (AB184507)
Streptomyces griseosporeus NBRC 13458T (AB184419)
Streptomyces misionensis NBRC 13063T (AB184285)
Streptomyces eurythermus ATCC 14975T (D63870)
Streptomyces nogalater NBRC 13445T (AB184408)
Streptomyces hawaiiensis NBRC 12784T (AB184143)
Streptomyces massasporeus NBRC 3841T (AB184804)
Streptomyces indiaensis NBRC 13964T (AB184553)
Streptomyces thermocarboxydus DSM 44293T (U94490)
Streptomyces griseorubens NBRC 12780T (AB184139)
Streptomyces tendae NBRC 12822T (AB184172)
Streptomyces plicatus NBRC 13071T (AB184291)
Streptomyces flavoviridis NBRC 12772T (AB184842)
Streptomyces pilosus NBRC 12807T (AB184161)
Streptomyces spectabilis NBRC 13424T (AB184393)
Streptomyces flavofungini NBRC 13371T (AB184359)
Streptomyces silaceus NRRL B-24166T (EU812170)
Streptomyces thermocarboxydovorans DSM 44296T (U94489)
Streptomyces albus subsp. albus NBRC 3710T (AB184781)
Kitasatospora setae KM-6054T (AB022868)
19
6
1
0
9
65
0
4
18
5
55
2
34
14
26
1
53
19
8
17
90
65
18
48

図３９　最尤法（ＭＬ法）

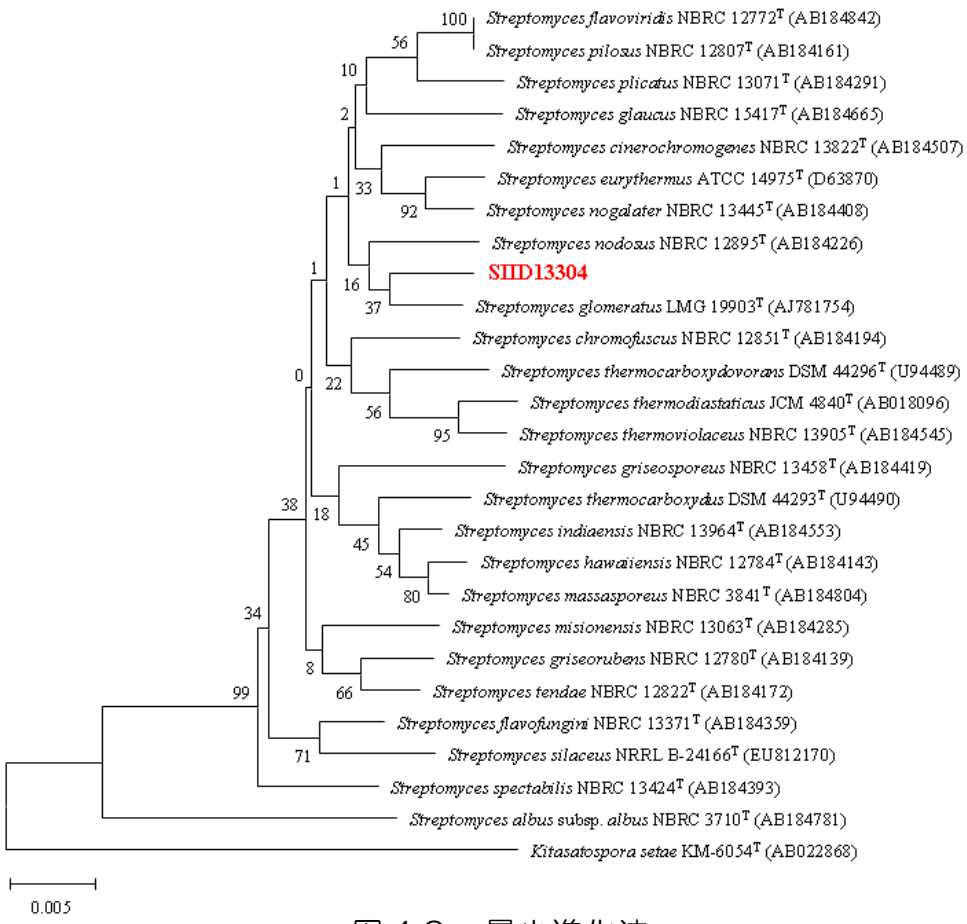


図４０　最小進化法

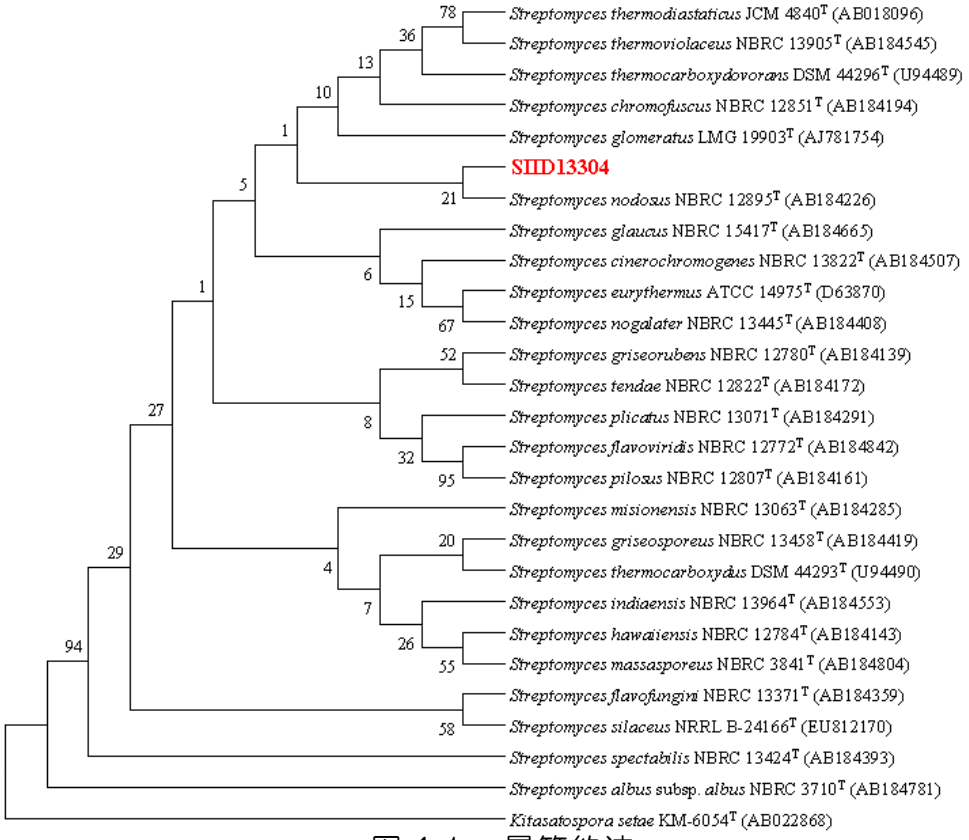


図４１　最節約法

(3)　A84株の培養方法

培地組成

A84株の生産培地として、SC培地を使用した（図４２）。

＊Solble Starch	1%
＊Casein	0.1%
＊Na2HPO4	0.1%
＊Sea Water	3.84%

図４２　SC培地

培養条件

300ml溶の△フラスコに100mlの液体培地を入れ、Rotary shaker 200rpm、28℃で3日間前培養を行い、本培養に5%シードした。本培養においても、全培養と同条件で培養を行った。

(4)　A84化合物の精製方法

A84のBroth10Lに対し、5Lの酢酸エチルで液液分配を行い、オープンODSカラムを用いてMeOHによるステップアップ溶出を行った（図４３）。

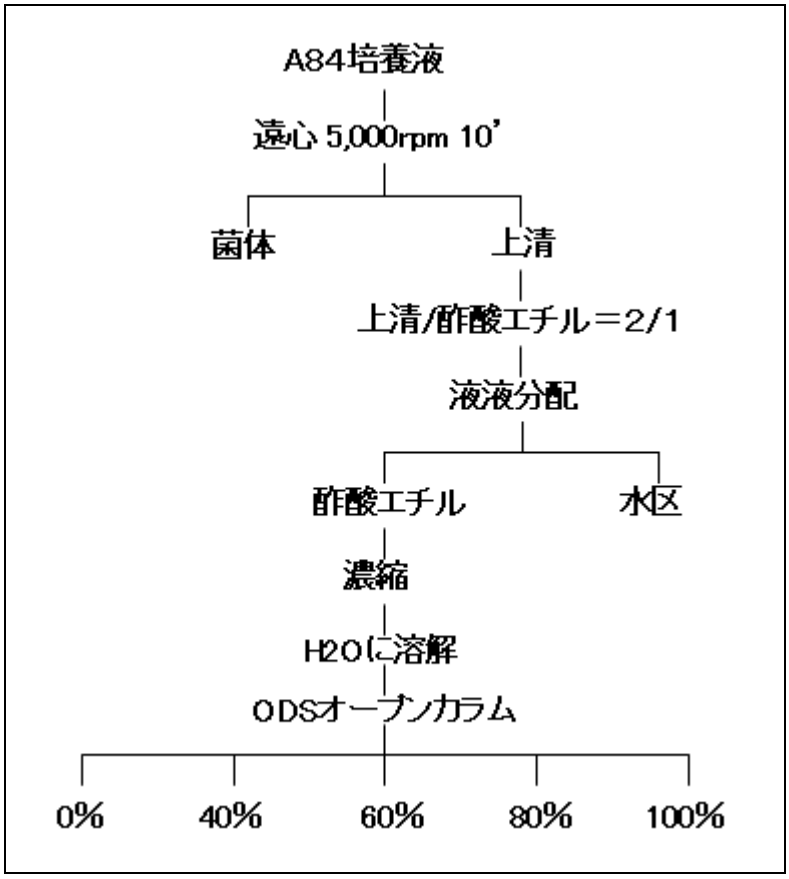


図４３

６０％メタノール溶出画分（３vol.）に活性が存在していたため、６０％メタノール画分を濃縮し分取型ＨＰＬＣ（ＯＤＳカラム、６５％メタノール移動相）にて分画を行った（図４４，４５）。その結果、高純度のＡ８４化合物の単離に成功した。

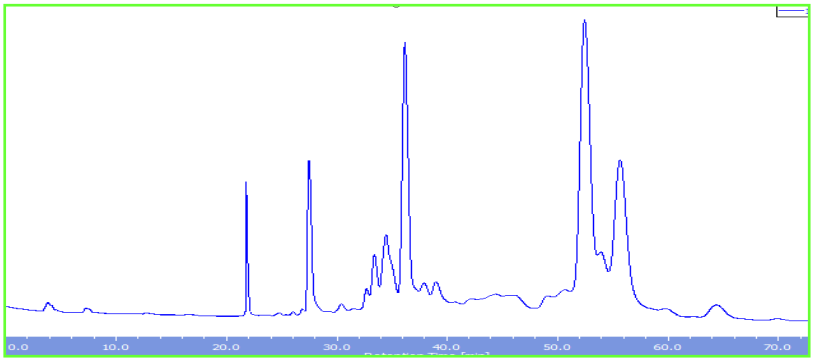


図４４　HPLC condition: ODS column, 65 % MeOH (isocratic)

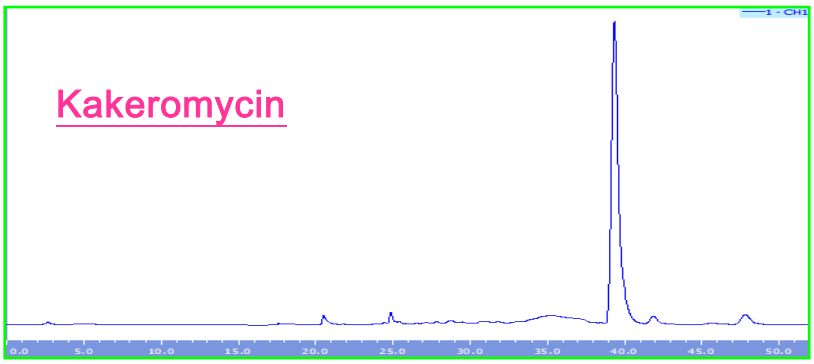


図４５　HPLC condition: ODS column, 40 % Acetonitrile　(isocratic)

(5)　A84化合物の構造決定

A84化合物を95 %純度に精製し、LC-MS と NMR スペクトラム解析を実施した。その結果Ａ８４化合物が新規母核を持つ抗真菌剤である事が判明した。

(6)　A84化合物の生物活性

抗真菌活性（ＭＩＣ）は患者分離酵母を用いてＢＭＬ社にて定法（microbroth dilution method according to approved standard M27-A3 defined by CLSI.）に従い実施した。

Abbreviations: KKRM (Kakeromycin), MCFG (Micafungin), AMPH-B (Amphotericin B), 5-FU (Fulcytosin), FLCZ (Fluconazole), ITCZ (Itraconazole), VRCZ (Voriconazole), MCZ (Miconazole)（図46）

	MIC: μ g/ mL							
	KKRM	MCFG	AMPH-B	5-FU	FLCZ	ITCZ	VRCZ	MCZ
Candida albicans ATCC24433	0.5	≦0.015	1	0.25	0.25	≦0.015	≦0.015	≦0.03
ATCC90028	0.125	≦0.015	0.25	≦0.125	≦0.125	≦0.015	≦0.015	≦0.03
ATCC90029	0.125	≦0.015	0.125	>64	0.25	≦0.015	≦0.015	≦0.03
clinical isolate 1	0.125	≦0.015	0.25	≦0.125	≦0.125	≦0.015	≦0.015	≦0.03
clinical isolate 2	0.125	≦0.015	0.25	≦0.125	≦0.125	≦0.015	≦0.015	≦0.03
clinical isolate 3	0.06	≦0.015	0.125	≦0.125	0.25	0.03	≦0.015	≦0.03
Candida parapsilosis CC22019	0.015	0.5	0.25	≦0.125	0.25	≦0.015	≦0.015	0.06
ATCC90018	0.5	≦0.015	0.125	≦0.125	0.5	≦0.015	≦0.015	≦0.03
clinical isolate 1	0.008	0.5	0.125	≦0.125	2	0.03	≦0.015	≦0.03
clinical isolate 2	0.125	0.25	0.25	≦0.125	2	0.03	0.06	0.25
clinical isolate 3	0.015	0.25	0.125	≦0.125	0.5	≦0.015	≦0.015	0.06
Candida tropicalis ATCC750	>8	≦0.015	0.25	≦0.125	1	0.06	0.03	0.5
clinical isolate 1	>8	≦0.015	0.125	≦0.125	1	0.06	0.03	0.25
clinical isolate 2	>8	≦0.015	0.125	≦0.125	2	0.25	0.06	1
clinical isolate 3	4	≦0.015	0.5	≦0.125	4	0.125	0.125	1
Candida krusei ATCC6258	0.125	0.06	0.5	4	32	1	0.25	1
Candida glabrata ATCC90030	1	0.03	0.5	≦0.125	8	1	0.25	0.125
clinical isolate 1	0.125	≦0.015	1	≦0.125	4	0.5	0.125	0.125
clinical isolate 2	8	≦0.015	0.25	≦0.125	4	0.5	0.125	0.125
clinical isolate 3	0.5	≦0.015	0.5	≦0.125	4	0.25	0.125	0.125
Candida quilliermondii clinical isolate 1	0.5	1	0.25	1	4	0.25	0.06	0.25
Candida lusitaniae clinical isolate 1	0.5	0.125	1	0.25	0.25	0.06	≦0.015	0.06
Aspergillus fumigatus clinical isolate 1	2	≦0.015	1	64	>64	0.125	0.25	0.5
Aspergillus flavus clinical isolate 1	4	≦0.015	1	4	32	0.125	0.25	2
Aspergillus niger clinical isolate 1	8	≦0.015	0.5	0.5	>64	0.25	0.125	1
Aspergillus terreus clinical isolate 1	0.25	≦0.015	0.5	0.25	16	≦0.015	0.03	0.06

図46　抗真菌薬剤感受性

カケロマイシンを作用させた後、出現する*C. albicans*を用いて再度感受性の試験を行った結果、カケロマイシンに対する*C. albicans*の耐性株は出現しなかった。（図４７）

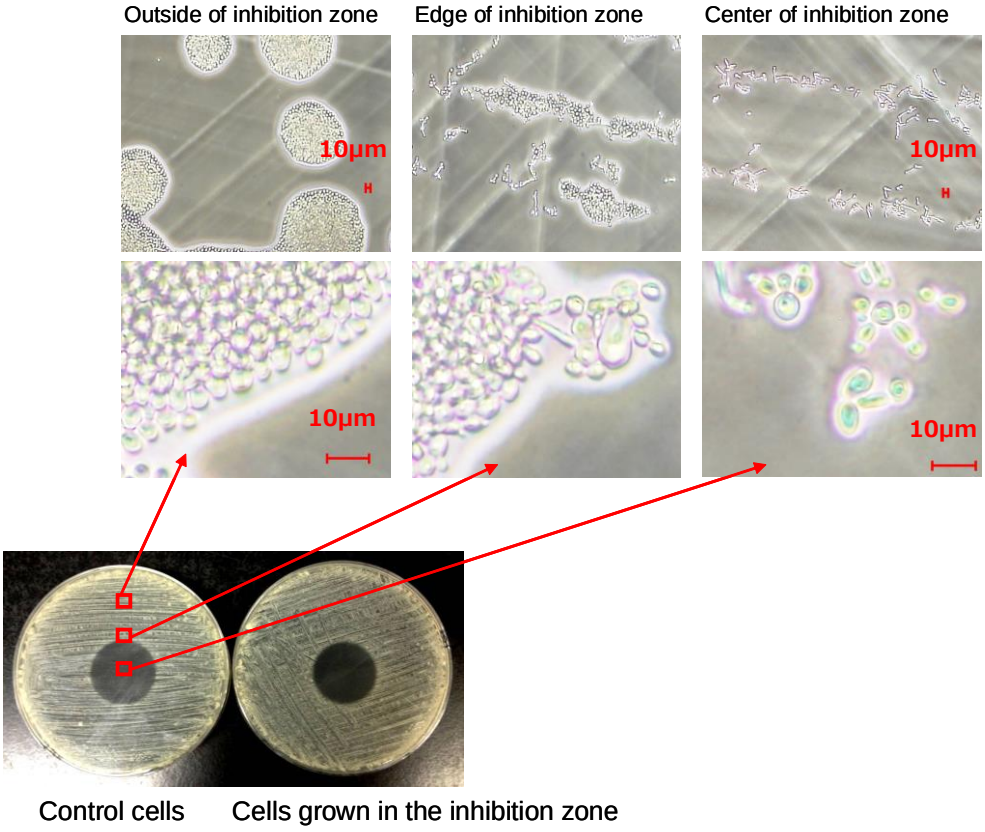


図４７　形態変化　寒天上での*C.albicans*に対する形態変化

⑺　A84化合物の合成法の研究

Ａ８４化合物の全合成を試みた。現在まで中間体の合成を完了し最終産物の１ステップ前まで新規合成法を考案し合成ルートを完成させる事が出来た。

しかし、予想に反し最終段階の閉環工程がうまく反応せず、閉環工程の条件検討を実施している。様々な条件での閉環反応を今後行って行くと同時に新たな合成ルート案を考案し、検討して行く。

⑻　A84化合物の誘導体の合成

全合成の過程において各合成ステップで作成された新規化合物の活性を評価する。

また、全合成が完成した後は、誘導体の合成を行い、より良質な元体を上回る誘導体の合成を試みる。

⑼　A84化合物の誘導体の生物活性

誘導体合成で作成された化合物に関し、その生物活性を測定し薬剤としてより優れたリード化合物の創出を行う。

⑽　特許出願

特許性が認められる、生産方法、化合物合成法、化合物、化合物誘導体に関し特許の出願を行う。

第3章　全体総括

本研究開発では、未開発天然生物資源である海洋性微生物・微細藻類資源から新規抗真菌剤を探索するため、海洋性微生物・微細藻類資源の効率的な分離・培養技術の確立、及び二次代謝産物を効率的に探索するためのハイスループット化したスクリーニングシステム構築について研究開発を実施した。このシステムを用いて、薬効が高く毒性が低い経口投与可能な新規抗真菌剤の探索を実施した。

まず、海洋性微生物資源の採集と微生物の分離・培養について検討を行った。平成２３年度までに、海水から微生物を効率的に集積できる新規採集器を開発し、最大で 7000 倍の集積が可能な採集手法を確立した。平成２４年度は、効率を６倍向上させた２号機を作製し、採集と分離に使用した。また、海砂やマングローブ土壌の効率的な採集手法（電動ドリル法）を新たに考案･作成し、効率よく良質な分離源を収集することができた。採集技術が確立したことから、地域固有の微生物相を有する隔離された場所からの採集を実施し、多種多様な微生物株を分離･培養した。

微細藻類についても、平成２３年度確立した採集法･分離法･識別法･培養法を用いることにより、多様な微細藻類株を収集した。また、効率的な培養抽出物の調製法について検討を行い、高濃度の培養抽出物を生理活性評価に供することが可能となった。

得られた微生物・微細藻類からの新規創薬シード化合物探索を目指し、薬効が高く毒性が低い経口投与可能な新規抗真菌剤の探索を目的としたスクリーニング系の構築を検討した。人に存在せず真菌にのみ特異的に存在する細胞壁を標的にする事から安全性が高い事が予測される細胞壁合成阻害剤をターゲットとした。細胞壁合成阻害剤を選択的にスクリーニングする手法として、遺伝子組換え手法

によるミカファンギン（細胞壁合成阻害剤）耐性酵母の作成、およびミカファンギン添加アッセイ法を検討したが、遺伝子改変株の取得に至らなかった。そのため効率よく細胞壁合成阻害剤を判定する新規評価法の確立を目指し様々なアイデアを出し検討を行った。その結果測定装置を使わないヒトの目で容易に判定できる飛躍的にスクリーニング効率が向上したスクリーニング方法を開発した。本手法を用いて、微生物株１００万株および微細藻類エキス 2000 検体を 1 次評価し、細胞壁合成阻害剤の候補株約 90 株（菌種の異同による重複を含め約 500 株）を選抜した。2 次評価で細胞壁合成阻害剤と同じ抗菌スペクトラム（*Sac* >> *Cry*）を示す株を絞り込み、90 株から 25 株を選抜した。

2 次評価通過株は順次精製を行い、１１株（放線菌８株，糸状菌３株）から活性成分１１成分を精製･構造決定した。既知化合物ではあるものの目的とする細胞壁合成阻害活性を有する化合物が得られていることから、本スクリーニング系が有効な評価法であることが確認された。また、新規化合物を効率よく早期に絞り込む手法として、既知抗真菌剤のデータベースを作成し、LC/MS とデータベースの照合による活性成分同定手法を確立し、本データベースを活用した新規創薬シード化合物探索法を構築し、スクリーニングに応用した。スクリーニングを継続し行った結果、新規母核を有し、強い抗真菌活性を示す新規化合物の発見に至った。

活性成分の高生産培養条件検討と精製により活性成分の大量取得を行い患者分離株を用いた抗真菌活性を測定した。その結果、現在市販されているアゾール系の薬剤やキャンディン系薬剤と比較しても遜色ない活性を示した。本結果はアメリカ ICAAC 学会で発表し、多くの製薬企業から注目を集めている。またＮＭＲ、LC/MS 等の解析から新規母核を有する化合物である事が判明した。その構造のユニークさから新たな抗真菌薬ターゲット発見に繋がる事が期待される。また、その作用メカニズムの解明に大きな期待が寄せられている。今後は前臨床試験を目指し化合物の大量取得を行った後、マウス急性毒性、in vivo 感染実験（有効性の実験）、体内動態等の実験を行い開発に向けたデータの取得を行う。

参考文献

1) CMC出版, 海洋生物資源の有効利用, (2002).

2) 有賀祐勝・井上勲・田中次郎・横濱康繼・吉田忠生編（2000）「藻類学実験・実習」. pp 104-105. 講談社サイエンティフィク. 東京

3) Yamaguchi, H. 病原真菌と真菌症, (2007).

4) Niimi, K. and Niimi, M. The mechanisms of resistance to echinocandin class of antifungal drugs. *Jpn. J. Med. Mycol.*, **50**, 57-66, (2009).

5) Hori, Y. Current Status of β-1,3-glucan synthase inhibitors from microbial products as systemic antifungal agents. *化学と生物*, **39**, 154-164, (2001).

6) Whiffen, A. J. *et al.* The Production of an Antifungal Antibiotic by *Streptomyces griseus*. *J. Bact.,* **52**, 610-611, (1946).

7) Kohberger, D. L. *et al.* Biological studies of streptimidone, a new antibiotic. *Antibiot. Chemoth.,* **10**, 9-16, (1960).

8) Brian, P. W. *et al.* Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni*. *Transactions of the Britixh Mycological Society,* **40**, 365-368, (1957).

9) Haefliger, W. and Hauser, D. Isolation and structure elucidation of 11-deacetoxywortmannin. *Helvetica Chimica Acta,* **56**, 2901-2904, (1973).

10) Takatsuki, A. *et al.* Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J. Antibiotics,* **24**, 215-223, (1971).

11) Leet, J. E. *et al.* Ascosteroside, a new antifungal agent from Ascotricha amphitricha II. Isolation and structure elucidation. *J. Antibiotics,* **49**, 553-559, (1995).

※ この報告書には、委託業務の成果として、産業財産権等の対象となる技術情報（未出願又は未公開の産業財産権等又は未公開論文）、ノウハウ等の秘匿情報が含まれているので、通例の取扱いにおいて非公開とする。