

## 論文の内容の要旨

論文題目 海洋環境からの医薬活性物質を産生する微生物の探索及び  
それらが生産する抗菌物質に関する研究

氏 名 永井 浩二

微生物の生産する二次代謝物は、ペニシリンやストレプトマイシンの発見以来、各種医薬品探索の資源としての地位を固め、抗生物質以外にも免疫調節剤、高脂血症治療剤、抗原虫剤などの画期的新薬を生み出してきた。その間、多様な微生物資源から膨大な数の医薬活性物質が発見されたが、今後の探索研究においては新たな資源の開発が成功の鍵を握ると考えられる。

このような背景の下に本研究では、未開拓で、有用な活性物質の生産が期待される菌群として「海洋複合環境に生息する細菌類」及び「海洋環境に生息する好アルカリ及び耐アルカリ性真菌類」を取り上げた。前者においては、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いた微生物フロアの検出手法の開発を通じて、種々の海洋生物から細菌類を分離し、複合条件下でのみ生産される代謝物のスクリーニングを実施した。一方後者においては、標的選択性を有する真菌類の分離方法を確立した後、種々の海洋生物や海水などから真菌類を分離し、医薬活性物質スクリーニングを実施した。その結果、新規抗多剤耐性菌抗生物質として YM-266183 及び YM-266184 を、また新規抗真菌抗生物質として YM-202204 を単離・構造決定することができた。さらに、これらの化合物について活性の評価を行い、医薬としての可能性を検討した。その概要は以下の通りである。

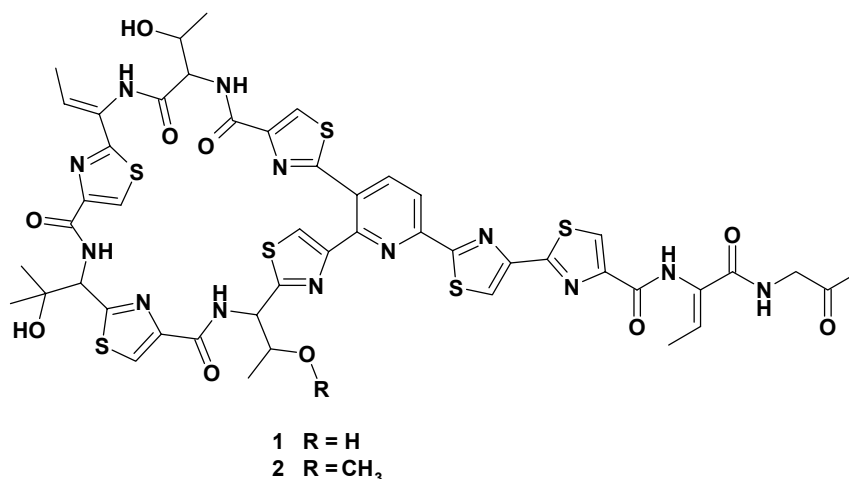
## 1. 海洋複合環境に生息する細菌類からの医薬活性物質の探索

### 1) 海洋複合環境からの細菌類の探索

海綿などの海洋生物の内部組織には非常に多くの微生物が生息していることが知られている。このような複合環境に生息する微生物の有効利用を図るためには、どのような環境にどのような微生物が存在するかを把握することは重要である。そこでまず、海綿などの試料中に優先して存在する細菌類の検出手法について検討した。本研究には、ナノスケールでのイメージングや分子間の結合力測定機能を有する AFM を使用して、新たな微生物検出技術の開発を目指した。その結果、大気中観察においては鞭毛を含め微細な構造の観察、三次元でのイメージングあるいは、おおよそのサイズの測定が簡便にできることがわかった。乾燥に強い試料であれば、無処理（生きたままの状態）で、短時間の内に走査電子顕微鏡相当の分解能で観察できるのは大きなメリットである。また、本法による液中でのモニタリングや抗原抗体反応などの結合力を利用した検出とスクリーニングへの応用の可能性が示唆された。上記手法で微生物の存在が認められた試料については、それらの微生物を有効に利用するための研究、つまり複合環境に存在する微生物の効率的な分離と、分離株を用いた複合条件特異的に生産される医薬活性物質のスクリーニングを実施した。

### 2) 抗多剤耐性菌抗生物質 YM-266183 及び YM-266184

まず、海綿中に共存、共生する細菌類を用いて、海綿の抽出物を添加したときのみ生産される医薬活性物質のスクリーニングを実施した。その過程で、沖縄県西表島沿岸で採取したダイダイイソカイメン *Halichondria japonica* から分離した細菌 *Bacillus cereus* QN03323 株が、海綿抽出液添加培地での培養により黄色ブドウ状球菌 *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性を発現することを認めた。そこで、培養条件の検討を経て大量培養を実施し、活性物質の取得を試みた。菌体及び培養上清のアセトン抽出物をカラムクロマトグラフィー、シリカゲル MPLC などにより順次精製した結果、新規抗生物質 YM-266183 (**1**) 及び YM-266184 (**2**) を単離することができた。両化合物ともに、各種機器分析による構造解析の結果、チアゾール環を含む異常アミノ酸からなる極めて特異な環状ペプチドであることが判明した。**1** と **2** は、メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌 (MRSA)、メチシリン耐性表皮ブドウ状球菌 (MRSE) などの多剤耐性菌を含む staphylococci、streptococci などの病原細菌に対して強力な抗菌活性を示すとともに、マウス *S. aureus* 感染症モデルにおいても有意な治療効果を示すことが確認された。



## 2. 海洋環境に生息する好アルカリ及び耐アルカリ性真菌類からの医薬活性物質の探索

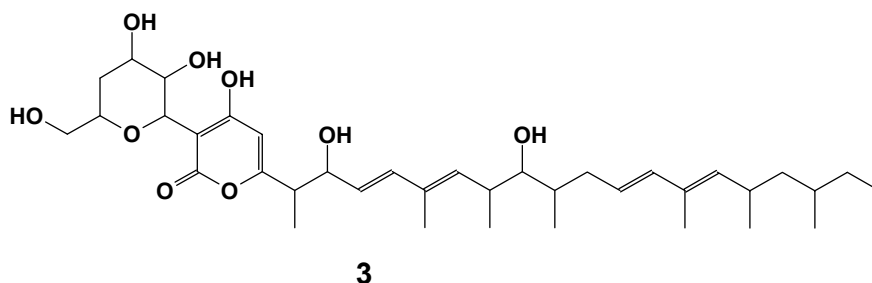
### 1) 好アルカリ及び耐アルカリ性真菌類の探索

海洋環境は pH 8 程度の弱アルカリ性であることから、そこに生息する微生物はアルカリ環境に適応した性質を持っていると予想される。しかし、一般に真菌類は弱酸性条件を好むと考えられていることから、まず各種土壌試料を用いて、好アルカリ及び耐アルカリ性を有する真菌類の分離方法の検討を行い、土壌菌類フロラ及び分離株の性状を検討した。その結果、アルカリ性コーンミール寒天培地 (ACMA) の適用により、試料中の標的真菌を効率良く分離できることを見出し、*Acremonium* 属菌を初めとする好アルカリ性真菌を得ることができた。本手法を海綿などの海洋生物からの真菌類の分離に適用したところ、*Scolecobasidium* 属菌、*Stachybotrys* 属菌、*Acremonium* 属菌、*Phoma* 属菌などのアルカリ嗜好性の菌類を効率的に得ることができた。さらに、分離株を主にアルカリ条件下で培養し、種々の医薬活性物質スクリーニングを実施した。

### 2) 抗真菌抗生物質 YM-202204

前述のダイダイイソカイメンからアルカリ培地で分離した真菌 *Phoma* sp. Q60596 株が、海綿の抽出物を添加した弱アルカリ性の培地において抗 *Candida* 活性物質を生産することを認めた。その後の検討で、そば粉とセルロースからなる固形培地が生産に有効であることが認められ、大量培養を実施した。固形培養菌体のアセトン抽出物を、カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC により順次精製し、活性物質として新規抗真菌抗生物質 YM-202204 (3) を得ることができた。本物質は、スペクトルデータから分子式は C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>O<sub>9</sub> と決定され、二次元 NMR の詳細な解析により、 $\alpha$ -ピロン骨格にポリアルコール環と 2 つのジエン部分を含む長い側鎖が結合した平面構造をもつことが明らかとなった。また、側鎖の 4 つの二重結合の幾何異性は全てトランスと決定されたが、テトラヒド

ロピラン環及び側鎖部分の立体構造は未定のままである。**3**は、*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* などの病原酵母、真菌に対して強力な抗菌活性を示した。なお、その抗真菌作用は GPI アンカータンパク質を阻害することによると示唆された。



以上本研究では、海洋の複合環境及びアルカリ環境を標的として新しい手法を用いて医薬活性物質を生産する微生物を検索した。その結果、多くの有望菌株を分離できたとともに、西表島産ダイダイイソカイメンから分離したバクテリア及び真菌から3種の新規抗菌物質を得ることができた。これらのうち、YM-266183 (**1**) 及び YM-266184 (**2**) は現在临床上問題となっている MRSA や MRSE を初めとする多剤耐性菌に対して特異性に優れた抗菌活性を示し、新しい抗菌剤として有望である。一方、YM-202204 (**3**) は病原酵母や糸状菌に対して強力な抗菌活性を示すとともに、既存の薬剤にない作用機序を有することが示唆され、新しいタイプの抗真菌剤となることが期待される。これらの知見は、本研究で取り上げた海洋微生物が新たな創薬資源としての可能性を有することを証明するものであり、それらを利用した医薬活性物質探索のアプローチと併せて、学術上ならびに産業上有用な知見を提供できたものと考えている。