

学位論文審査報告書

報告番号	北里大 乙 第 1062 号	氏 名	渡邊 善洋
論文審査担当者	(主査) 北里大学教授 大城 太一 (副査) 北里大学教授 阿部 章夫 (副査) 北里大学客員教授 味戸 慶一 (副査) 北里大学准教授 白畑 辰弥		
<p>[論文題目]</p> <p>「 微生物代謝産物からの抗感染症薬シード化合物の探索 」</p> <p>[論文審査結果の要旨]</p> <p>渡邊 善洋 氏は、世界的に問題となっている感染症 (マラリアと深在性真菌症) に焦点をあて、微生物資源から創薬シード化合物の探索を行った。その過程で、新規化合物 3 種 6 成分を含む 14 成分の天然有機化合物を発見し、その単離精製、絶対立体を含めた構造決定、活性評価、構造活性相関および動物レベルでの評価を行った。さらに、腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)) などのグラム陰性菌が保有する III 型分泌機構阻害剤 aurodox の作用機序解析と動物レベルでの評価も行った。</p> <p>(1) 微生物代謝産物からの抗マラリア薬シード化合物の探索</p> <p>多剤耐性マラリア原虫 <i>Plasmodium falciparum</i> K1 株に対する抗マラリア原虫活性を指標にスクリーニングを行ない、糸状菌 2 株の培養物より抗マラリア原虫活性を示す天然有機化合物を発見した。<i>Fusarium</i> sp. FKI-9521 株からは、5 成分を単離し、各種機器分析により、新規化合物 deacetyl fusarochromene および 4'-O-acetyl fusarochromanone と既知化合物 fusarochromanone、3'-N-acetyl fusarochromanone および fusarochromene (もしくはエナンチオマーである banchromene) と決定した。新規化合物については、それぞれのアセチル化体の NMR および比旋光度の比較により絶対立体配置も決定した。さらに、<i>P. falciparum</i> K1 株に対して <i>in vitro</i> 抗マラリア原虫活性を評価した結果、IC₅₀ 値 0.08~6.35 μM を示した。つぎに、<i>Pochonia boninensis</i> FKR-0564 株の培養物からも同様に抗マラリア原虫活性を指標に精製を行い、新規化合物 koshidacin A および B を単離し、NMR、ESI-MS 解析および誘導化により両物質の絶対立体配置を含む構造を決定した。この両成分も、多剤耐性マラリア原虫 <i>Plasmodium falciparum</i> K1 株に対し、IC₅₀ 値 12.5 および 0.8 μM で抗マラリア原虫活性を示した。さらに、マラリア感染動物モデルを用いて、koshidacin B を <i>in vivo</i> 評価した結果、毒性を示すことなく、41%の抗マラリア原虫増殖阻害活性 (30 mg/kg/日 x 4 日間 (i.p.)) を示した。</p>			

今回単離した化合物は、臨床で使用されている抗マalaria薬クロロキン耐性のマalaria原虫に活性を示すだけでなく、動物レベルでの効果も示し、新しい創薬シード化合物を提案するものであった。

(2) 微生物代謝産物からの抗真菌薬シード化合物の探索

深在性真菌症の原因真菌である *Aspergillus fumigatus* 薬剤感受性菌、その隠蔽種 (*A. felis*, *A. lentulus* および *A. udagawae*) を用いて、抗真菌活性を指標にペーパーディスク法で糸状菌培養物をスクリーニングし、*Hypomyces pseudocorticicola* FKI-9008 株から新規天然有機化合物を発見した。各種機器分析により、新規化合物 hakuhybotric acid と既知化合物 2 成分を決定した。これらは、*A. fumigatus* およびその隠蔽種に対して MIC 16-128 µg/mL の抗真菌活性を示した。さらに、菌寄生菌 *Hypomyces* sp. FKA-73 株の培養物から、新規化合物 hakuhybotrol と既知化合物 6 成分を発見した。新規化合物 hakuhybotrol については、その立体絶対配置を PGME 法、X 線結晶構造解析 (SCXRD) および microED を用いて決定した。この研究成果は、絶対立体構造を明らかにする手法の 1 つである X 線結晶構造解析に代わって、微小な結晶サンプルで絶対立体構造を決定することができることを提案したものであった。さらに、得られた hakuhybotrol を含む cladobotric acid 類の抗真菌活性から、構造活性相関を明らかにし、トリエン末端の遊離のカルボキシル基が重要であることを明らかにした。

(3) グラム陰性病原性細菌の III 型分泌機構阻害剤 aurodox の作用機序解析

腸管病原性大腸菌 EPEC などのグラム陰性病原性細菌が保有する III 型分泌機構 (T3SS) 阻害剤 aurodox について、作用機序解析と動物レベルでの評価を行った。すなわち、これまでの研究で推定されていた aurodox の候補標的分子の 1 つである adenylosuccinate synthase (PurA) について、T3SS との関係性を検証した。まず、EPEC の PurA 欠損株やその相補株を作製し、T3SS で分泌されるタンパク質 EspA、EspB および EspD を定量した。その結果、PurA 欠損株ではこれら分泌タンパク質は検出されず、相補株では検出された。このことから PurA は、T3SS の発現に重要であることを明らかにした。次に、PurA がもつ GTPase 活性について、酵素評価系を構築し、aurodox とその誘導体を評価した。その結果、aurodox は GTPase 活性を阻害したが、同程度の T3SS 阻害活性を示す誘導体は GTPase 阻害活性が減弱した。この結果より、aurodox の PurA の GTPase 阻害活性は T3SS 阻害には関与しないことが示唆された。さらに、*Citrobacter rodentium* の PurA 欠損株と相補株を作製し、マウスを用いた *in vivo* 感染実験を行った。その結果、PurA 欠損株は病原性を示さず、相補株では病原性が回復し、糞便中の菌数についても、PurA 欠損株は野生株より菌数が有意に低下することを明らかにした。

以上のように、渡邊氏は、微生物資源から感染症に対する創薬シード化合物の探索、作用機序解析、動物実験を行ない、創薬へと期待できる天然有機化合物を発見した。これらは、感染症治療薬のシードとしての可能性だけでなく、新しい標的分子の発見や感染機構の解明ツールとしても提案できるものであった。この一連の研究成果は、天然物創薬研究及びケミカルバイオロジー研究分野に大きく貢献するものであり、博士 (生命科学) の学位に値するものと判断し、学位審査を合格と判定した。