

機関番号：24402

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580083

研究課題名 (和文) 液胞をターゲットとして真菌を自殺へと導く抗真菌化学療法の開拓

研究課題名 (英文) Development of vacuole-targeting antifungal chemotherapy for suicide induction

研究代表者

田中 俊雄 (TANAKA TOSHIO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：10137185

研究成果の概要 (和文)：アンホテリシン B およびポリミキシン B に見出された真菌液胞膜の断片化作用を新たな抗真菌作用として位置づけ、そのメカニズムの一端を明らかにした。ニンニク由来のアリシンおよびタマネギ由来のツビペランをこれら薬剤の作用を増幅する因子として見出すとともに、アリシンについては化学合成法に替わる酵素的製造法についても提案を行った。さらに、液胞をターゲットとする抗真菌化学療法を実現するためのシステムについての提案を行った。

研究成果の概要 (英文)：The vacuole-disruptive activities of amphotericin B and polymyxin B were evaluated as novel types of fungicidal actions, and their mechanisms have been partly elucidated. This study also found allicin from garlic and zwiebelan from onion as enhancers of vacuole-targeting fungicidal activities of these antifungal agents, and thus proposes enzymatic production of allicin as a substitute for its production by the chemical reaction. A system has been additionally proposed for practically applying the chemotherapy depending on the vacuole-targeting fungicidal activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：amphotericin B, polymyxin B, 選択的抗真菌作用, allicin

1. 研究開始当初の背景

院内日和見感染、臓器移植、免疫疾患などへの対処のために抗真菌性抗生物質のニーズが日に日に増している。しかし、臨床で使用される抗真菌性抗生物質は、いずれも細胞膜エルゴステロールをターゲットとするポリエン系およびアゾール系抗生物質であり、それに細胞壁グルカン合成酵素阻

害剤を加えても数種に限られている。新しい母核構造を有する化合物が得られない状況にくわえて、多種多様なターゲットを有する抗細菌性抗生物質の場合と違いヒトと同じ真核生物である真菌に対する選択的ターゲットを見いだせないことが主な原因である。数少ない既存の抗生物質についても投与量や投与法の改善がもためられており、

新しいアイデアにもとづいた抗真菌性抗生物質の開発に向けての要望はつきない。

申請者らは、臨床で繁用されるアンホテリシンBの抗真菌活性がニンニク薬効成分アリシンの共存下で著しく増幅される現象を見いだしていた。さらに、これら異種因子の協調作用においては、本来の活性である細胞膜障害作用が増幅されることはなく、アンホテリシンBが真菌細胞においていまだ未知のターゲットを有している可能性が示唆された。「既存抗菌剤の潜在活性をひきだす介助分子の探索と介助型抗菌作用の効力の検証」と題する研究が前年度に終了し、その成果をさらに発展させて新たな抗真菌化学療法の開拓に向けての可能性を実証する段階に入ったと言える。

2. 研究の目的

本研究は、真菌の「液胞」を「細胞膜エルゴステロール」および「細胞壁グルカン」につづく第3の抗真菌ターゲットとする新たな化学療法の具体化に向けて、その方法論の拡大を目的とする。すなわち、既存の抗真菌性抗生物質アンホテリシンBに加えて抗細菌性抗生物質ポリミキシンBに見いだした「液胞」の断片化を介する抗真菌作用に注目し、なぜ「液胞」が壊れるのかの謎を解きつつ「液胞」を起点とする自殺死にもとづく化学療法の有効性を様々な角度から明らかにする。とりわけ、「液胞」をターゲットとする抗真菌活性を惹起、あるいは増幅するアリシンのような介助分子のさらなる探索と、これらの併用効果を活用するためのシステムの開発を目指す。

3. 研究の方法

真菌液胞膜断片化作用のメカニズムを分子レベルで解明するために、まず、真菌細胞のモデルとしての出芽酵母およびその変異株を用いる実験を実施する。また、病原性酵母 *Candida albicans* や病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* などにおいても同様のメカニズムが成立していることを確認するとともに、液胞をターゲットとする新しい化学療法が既存抗生物質耐性株に対しても有効であることの検証を行う。さらには、アリシンを血漿中に有効濃度で維持するための腸管内徐放システ

ムを開発しつつ、アリシンに優る介助分子のさらなる開拓を行うためのスクリーニングを継続して行う。

S. cerevisiae 標準株より液胞を単離し、アンホテリシンBとポリミキシンBの個々について直接的な液胞膜断片化作用の有無を明らかにする。これら抗生物質については、核膜やミトコンドリア膜への作用が無いことを確認しているが、液胞を含めたこれら小器官を単離したうえで個々の膜系への影響についても明確な情報を得る。

S. cerevisiae 標準株および種々液胞形態形成の変異株を用いて、アンホテリシンB、アリシン、およびアンホテリシンB + アリシン処理による細胞膜から液胞膜へのエルゴステロール輸送系におよぼす影響について解析する。これら薬剤因子については、個々に放射性ラベル、蛍光プローブによる標識を行い、細胞膜から細胞質を介した液胞膜への移行プロセスを可視化してとらえる。液胞の形態形成に関連する種々の変異とアンホテリシンB + アリシンに対する耐性、感受性獲得との関係を総合して、液胞膜断片化作用における作用部位を特定する。ポリミキシンBについては、血清毒素であるリボ多糖の除去を目的としてポリミキシンB固定化カラムが市販されている。細胞破砕液、もしくは液胞破砕液について本カラムによるアフィニティークロマトグラフィーを行ってポリミキシンB結合タンパク質を探索する。得られたタンパク質の部分アミノ酸配列にもとづいて、その同定を行い、液胞の形態形成における役割について検討する。

C. albicans, *Aspergillus fumigatus* など種々病原性酵母および糸状菌の臨床由来株に対するアンホテリシンB + アリシン、ならびにポリミキシンB + アリシンの殺菌効果についてインビトロ抗菌試験を行って系統的データを得る。アンホテリシンB耐性株およびケトコナゾール耐性株についても、アリシンとの併用効果についてインビトロ抗菌試験における系統的データを取得する。

根粒菌類縁菌 *Ensifer adhaerence* と同定されたアライナーゼ生産株について、同酵素の生産のための培養条件ならびに酵素の精製条件を明らかにする。その熱、pH安定性などヒ

ト消化管内での持続した活性発現にかかわる諸性質を明らかにする。以下の実験に供給するために大規模ジャーファーメンター培養をおこなって酵素を取得、精製する。

アリイナーゼと基質アリインを個別にマイクロカプセル封入するなど、これを腸管内で個々に溶融させてアリシンを部位特異的に徐放する腸管内徐放システムを開発する。

4. 研究成果

まず、*S. cerevisiae* 標準株より液胞を単離し、アンホテリシン B およびポリミキシン B が直接この細胞小器官を破壊する作用を有しているかどうかについて検討した。その結果、これら抗生物質には単離液胞膜に対して直接的な破壊作用を発揮していることが明らかになった。アリシンには液胞膜破壊作用はなく、ポリミキシン B に関しては、その細胞内への取り込みを促進することで液胞膜への直接的な作用を助長する事実も見出している。一方、アリシンはアンホテリシン B の液胞膜破壊作用に対しては異なるメカニズムでの増幅効果を示した。すなわち、アリシン処理細胞においては、液胞膜のアンホテリシン B 耐性に必要なエルゴステロールが細胞膜から液胞膜に輸送される経路の障害が確認された。一方、ポリミキシン B に関しては、アリシンの存在下でその細胞内への取り込みが促進されることを見出した。

現在、化学合成法にのみ供給されているアリシンを酵素法で生産するシステムについて検討した。高価で熱安定性を欠く市販の化学合成アリシンを使用する方法に替えて、アリインからアリイナーゼの作用によって二次的にアリシンを生成させる方法に注目した結果、土壌よりアリイナーゼ生産菌の単離に成功した。種々菌学的性質ならびに 16s リボソーム DNA の塩基配列にもとづいて行った同定実験の結果から、本菌を *Ensifer adhaerens* と同定することができた。次いで、本菌のアリイナーゼが種々クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一のレベルにまで精製することができた。精製標品を用いる実験において、本細菌アリイナーゼがニンニクアリイナーゼに比べて熱安定性に優れていること、ニンニクを始めとする植物由来酵素が作

用しにくい (-)-アリインにより選択的に作用する基質特異性を有していることなどの事実を明らかにしている。まず、アリイナーゼ生産菌 *E. adhaerens* G-2 株の大量培養によって菌体を確保、さらに菌体を破砕して細胞内より同酵素を分離・部分精製するための方法を確立した。一方、基質であるアリインの生産についても検討した。ニンニクより直接的に単離する方法、ニンニク加工食品より単離する方法、さらに前駆体であるアリルシステインの化学的酸化によって生成させる方法である。目下のところ、ニンニク由来食品中のアリインからアリシンを生成する反応条件を種々改良している。

病原性真菌である *C. albicans* に対するアンホテリシン B の液胞膜破壊作用を検証した結果、*S. cerevisiae* に対する作用と同様に、*C. albicans* に対しても液胞膜破壊を伴う致死作用が認められた。さらにその作用は、ニンニク由来の硫黄化合物アリシンの存在下において増幅することが明らかとなった。アンホテリシン B 処理を施した *C. albicans* では、本薬剤の多くが細胞膜画分に検出されたが、その一部が細胞質画分から検出されたことから、アンホテリシン B は細胞質において直接的に液胞へ作用している事実を確認することができた。一方、アリシンは、本株においても液胞の保護プロセスとも言える細胞膜エルゴステロールの細胞内への輸送系を阻害することによって、アンホテリシン B の液胞膜障害作用を増幅していることを明らかにした。

出芽酵母をモデルとしてポリミキシン B の殺真菌活性を増幅する成分を種々食品中に検索するスクリーニング実験において、タマネギ鱗茎の破砕液中にアリシンと同様の効果を有する活性成分の存在が認められた。同成分の単離、精製、および構造解析の結果、精製標品は無色油状で、60°Cでの加熱や減圧濃縮に際しても活性が維持される点でアリシンと異なる物性を示すなど、いくつかの有利な性質を有することが見いだされた。質量分析、1、2次元 NMR、IR 分析、ならびにシミュレーション解析をおこなった結果、本標品を zwibelane (*cis*-2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1] hexane 5-oxide) と同定す

るに至った。精製標品には何らの生育阻害活性も無いが、ポリミキシン B の殺真菌活性を著しく増幅することを明らかにした。

さらに、アンホテリシン B の液胞膜断片化作用を増幅する因子として、ポリオールマクロライド抗生物質ニフィマイシンのアルキル側鎖のアナログである *N*-methyl-*N'*-dodecylguanidine の効果を *C. albicans* を対象とする実験によって検証した。さらに、アンホテリシン B の作用に耐性となるエルゴステロール合成欠損株 *S. cerevisiae* Δ *erg6* が依然としてポリミキシン B に感受性であること、また、エルゴステロール前駆体の構造に応じてアンホテリシン B の液胞膜断片化作用の強度に変化が生じるなどの事実を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Yutani, M., Bordihan, B., Ogita, A., Fujita, K. and Tanaka, T. Enhancement effect of *N*-methyl-*N'*-dodecylguanidine on the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the pathogenic fungus *Candida albicans*. J. Antibiot. 査読有, 2011, in press
- ② Yutani, M., Taniguchi, H., Borjihan, H., Ogita, A., Fujita, K. and Tanaka, T. 2011. Alliinase from *Ensifer adhaerence* and its use for generation of fungicidal activity. AMB Express, 査読有, Vol. 1, 2011, pp. 1-8
- ③ Ogita, A., Yutani, M., Fujita, K. and Tanaka, T. Dependence on vacuole disruption and independence of potassium ion efflux in fungicidal activity induced by combination of amphotericin B and allicin against *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antibiot. 査読有, Vol. 63, 2010, pp. 689-992
- ④ Borjihan, B., Ogita A., Fujita, K., Doe, M. and Tanaka, T. The cyclic organosulfur compound zwiebelane A from onion (*Allium cepa*) functions as an enhancer of polymyxin B in fungal vacuole disruption. Planta Med.. 査読有, Vol. 76, 2010, pp.1-3,

⑤ Ogita, A., Fujita, K., Usuki, Y., and Tanaka, T. Targeted yeast vacuole disruption by polyene antibiotics with a macrocyclic lactone ring. Int. J. Antimicrobiol. 査読有, Vol. 35, 2010, pp. 85-92

⑥ Borjihan, H., Ogita, A., Fujita, K., Hirasawa, E., and Tanaka, T. The Vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the pathogenic fungus *Candida albicans* and its enhancement by allicin. J. Antibiot. 査読有, Vol. 62, 2010, pp. 691-697

⑦ Ogita, A., Fujita, K., and Tanaka, T. Salinomycin and citric acid in combination demonstrate bactericidal activity against Gram-negative bacteria. Annals Microbiol. 査読有, Vol. 53, 2009, pp. 611-614

⑧ Ogita, A., Konishi, Y., Borjihan, B., Fujita, K., and Tanaka, T. Synergistic fungicidal activities of polymyxin B and ionophores, and their dependence on direct disruptive action of polymyxin B on fungal vacuole. J. Antibiotics, 査読有, Vol. 62, 2009, pp. 81-87

⑨ Ogita, A., Fujita, K., and Tanaka, T. Enhancement of the fungicidal activity of amphotericin B by allicin: Effects on intracellular ergosterol trafficking. Planta Medica, 査読有, Vol. 75, 2009, pp. 222-226

[学会発表] (計 7 件)

- ① バヤラン、キョウ琴琴、荻田亮、藤田憲一、田中俊雄、ポリミキシン B の真菌液胞膜断片化作用に関与する細胞内因子、日本農芸化学会平成 22 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学
- ② 荻田亮、藤田憲一、田中俊雄、アンホテリシン B の抗真菌活性発現機構 -液胞膜の断片化に液強を与える因子-、日本生物工学会平成 22 年度大会、2010 年 10 月 28 日、宮崎ワールドコンベンションセンター
- ③ バヤラン、荻田亮、藤田憲一、土江松美、田中俊雄、ポリミキシン B の抗真菌活性を増幅するタマネギ由来成分、日本農芸化学会平成 21 年度大会、2010 年 3 月 29 日、東京大学
- ④ 荻田亮、抗真菌化学療法の新ターゲットの開拓-出芽酵母をモデルとして-、関西応用微生物シンポジウム、2009 年 12 月 4 日、大阪市立大学
- ⑤ ハスバガン、荻田亮、藤田憲一、平澤栄次、田中俊雄、病原性酵母 *Candida albicans* に対する amphotericin B の液胞膜障害作用とアリシンによるその増幅、日本農芸化学会平成 20 年度大会、2009 年 3 月 28 日、メッセマ

リン福岡

⑥ Ogita, A., Fujita, K., Tanaka, T. A lemon-derived compound enhances and antibacterial activity of salinomycin against Gram-negative bacteria、国際バイオテクノロジーシンポジウム、2008年10月14日、大連ワールドエキスポセンター

⑦ 荻田亮、藤田憲一、田中俊雄、レモン果汁とサリノマイシンの組み合わせ、日本生物工学会平成20年度大会、2008年8月28日、東北学院大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/mchem/teacher.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 俊雄 (TANAKA TOSHIO)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：10137185

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし