

氏名	山本 甲斐
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1155 号
学位授与年月日	令和2年3月23日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	微生物由来抗真菌物質の探索研究
論文審査委員	委員長 連携教授 長田 裕之 委員 教授 小竹 敬久 委員 教授 戸澤 譲 委員 教授 高橋 康弘

論文の内容の要旨

真菌にはヒトや農作物に感染し様々な病気や被害を引き起こすものがある。ヒトにおいては *Aspergillus* 属や *Candida* 属菌が引き起こす深在性真菌症、農業でも *Pyricularia oryzae* が引き起こすイネいもち病や、*Erythricium salmonicolor* による赤衣病といった病害が問題となっている。現在使用されている既存薬の多くは有効性や安全性の点で様々な問題を抱えている。加えて近年では耐性菌の出現が報告されており、新薬の開発が必要とされている。

本論文では微生物代謝産物から新規作用機序や新規骨格を有する抗真菌物質を発見することを目的とした。

第1章では真菌の形態変化データベースの構築について述べる。我々は、真菌が添加された化合物の作用に応じて様々な形態変化を示す点に着目し、新規抗真菌物質の探索を試みた。

イネいもち病菌 (*P. oryzae*) に対して作用既知な標準化合物が誘導する形態変化を顕微鏡で観察し、収集・分類したカタログを構築した。サンプルの誘導した形態変化を標準化合物と比較することで、そのサンプルの薬理作用が推定でき、新規作用を有する抗真菌物質を効率よく探索することができた。更に我々は、*Aspergillus fumigatus* および *Candida albicans* の2種類の真菌についても同様のカタログを構築した。これにより各真菌の形態変化を見比べることで、サンプルのより精細な薬理作用の推定が可能となった。

第2章では第1章で作成したデータベースを用いた微生物スクリーニングについて説明する。富山県で採取した土壌サンプルから微生物の単離を行い、単離した計89種の培養エキスについて生物活性評価を実施した。このうち、*P. oryzae* に対して増殖阻害活性を示す YO15-A001 株が誘導した形態変化を観察したところ、F-ATPase や V-ATPase 阻害剤によって誘導される『Beads+Short』形態と類似の変化が確認された。この『Beads+Short』形態誘導物質について明らかにするため、各種クロマトグラフィーを用いて活性物質の単離精製を行い、1.4 L の微生物培養液から活性本体として YO-001A 物質を 7.1 mg 単離した。NMR による構造解析の結果、YO-001A 物質は新規の 26 員環マクロライド化合物であり、その構造は F-ATPase 阻害作用を持つ Oligomycin 類と類似していた。また、生物活性評価では活性を示した細胞種とその活性強度が

Oligomycin A とほぼ同等であることを確認した。また、YO-001A 物質が ATP 合成阻害活性を有していることを細胞レベル、*in vitro* で明らかにした。

目視による形態変化のカタログとの比較は、その判断基準が観察者や経験則によって異なるため、客観性に欠けるという問題点があった。そこで深層学習による画像判別を用いて形態変化を機械的に分類するモデルを構築した。モデルの構築では代表的な抗真菌物質が誘導する形態変化を形と薬理作用の類似性で分類し、AI に学習させた。このとき特徴を抽出し易くすることを目的として菌体の染色を行ったところ、新たな形態変化の分類を見出すことができ、精度良い判別モデルを構築することができた。

構築したモデルの機能を確認するため、YO-001A 物質を用いて評価を行った。結果、誘導された形態変化は 99% の割合で『Beads』形態に分類され、未登録な化合物についても精度よく判別できた。また YO15-A001 株培養抽出物についても同様に『Beads』に分類され、微生物スクリーニングに利用できるモデルが構築できたことを確認した。

第 3 章ではヒト病原性真菌 *C. albicans* の二形性に着目した抗真菌物質の探索について述べる。*C. albicans* は日和見感染症の中で最も罹患率の高いカンジダ症の主要病原菌である。本真菌は酵母形態と菌糸形態の 2 つの形態に変化する二形性真菌である。このうち菌糸形態は宿主細胞内への侵入に、酵母形態は増殖に関与する。これら 2 つの形態の変化の抑制は *C. albicans* の病原性を低下することが知られているが、その制御物質や遺伝子については未解明な部分が多い。そこで本章では形態変化を指標にして二形性を制御する抗真菌物質の探索を目的とした。

スクリーニングではロボティクスを用いたハイスループットスクリーニングを実施した。微生物培養エキス 3600 種について機械を用いて化合物を添加し、阻止円を指標として抗カンジダ物質を絞り込んだ。活性を示したサンプルについてはマイクロ液体希釈法で活性の再現性確認と形態変化の観察を行い、二形性制御物質を探索した。その結果、*C. albicans* を菌糸形態に変化させる RK13-A276 株を見出した。本菌株の生産する活性物質を CPC や HPLC を用いた各種クロマトグラフィーにより精製し、微生物培養液 7.7 L から活性本体 RK-276A 物質を 12.4 mg 単離した。RK-276A 物質の構造は HR-ESI-MS により推定された分子量と分子式を基に、NMR による構造解析で決定した。RK-276A 物質は既知化合物 SF2768 と同一の平面構造を有しており、ピラノース骨格の 2 位および 6 位にイソシアニド基とアミドを含む側鎖が付加したユニークな構造であった。RK-276A 物質は *C. albicans* に対し高い選択性を示し、濁度から算出した 50% 増殖阻害濃度は 1.7nM と非常に強いものであった。RK-276A 物質の *C. albicans* に対する作用は非常に面白く、二形性メカニズムの一端を解明するバイオプローブとして期待できる。

論文の審査結果の要旨

本学位論文の審査委員会は、当該論文の発表会を令和2年2月17日に理学部3号館にて開催し、詳細な質疑を経て審査した。以下に学位論文の審査結果を要約する。

本論文は、微生物代謝産物より新規の抗真菌物質を探索した結果についてまとめたものである。現在用いられている抗真菌薬は、選択性の問題から安全性の高い薬剤が少なく、また耐性菌の出現が確認されており、新薬開発が強く求められている。本論文は、真菌の形態変化に着目した表現型スクリーニングの構築とスクリーニング結果によって構成されている。

第1章では、序論として真菌病害と治療薬に関する問題点を提起し、新薬開発の重要性について述べた。新薬開発に繋がる新規抗真菌物質の探索では真菌の形態変化を指標とした表現型スクリーニングを行うこととした。真菌は添加された化合物の作用に応じて、様々な形態に変化することが報告されている。そこで、作用既知化合物が誘導する形態変化のパターンを収集し、カタログ化することによって、形態変化から添加した未知化合物の薬理作用が推測できるのではないかと考えた。カタログの構築には、イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* を試験菌とし、約100種類の作用既知化合物から10パターン以上の形態変化を見出した。

第2章では、カタログスクリーニングの結果について述べた。探索源にはこれまでに数多くの新規化合物が発見されてきた微生物代謝産物を用いた。実際のスクリーニングでは、土壌より微生物を単離し、その培養物より抽出したエキスをスクリーニングサンプルとした。スクリーニングでは増殖阻害活性を基に候補サンプルを絞り込み、活性を示したサンプルの形態変化を観察、カタログと比較することで選定を行った。選定したサンプルは各種クロマトグラフィー機器を用いて活性物質を精製し、最終的にNMR解析によって化合物の同定を行った。以下にスクリーニングとその結果の詳細を述べる。

スクリーニングサンプルの作成には富山県で採取された土壌サンプル10種類から単離した放線菌3種、真菌86種を用いた。それぞれの培養抽出エキスの生物活性を評価し、*P. oryzae* に活性を示すYO15-A001株を選定した。本菌株は16S rRNA解析の結果、*Streptomyces* 属と高い相同性を示す放線菌であった。

YO15-A001株の誘導する形態変化をカタログと比較したところ、Beads/Short形態との類似性が認められた。しかし断定はできず、また本形態に登録された化合物はOligomycin Aのみであったことから、カタログの拡張も視野も入れ、活性物質の同定を試みた。

YO15-A001株培養液1.4 Lを高速液体クロマトグラフィーなど各種クロマトグラフィーにより精製し、活性物質YO-001Aを7.1 mg単離した。YO-001A物質はNMRによる構造解析により、その構造を新規26員環マクロライド化合物であると決定した。その構造はMaclafungin類やOligomycin類と似ていたが、側鎖に付加する官能基が異なっていた。

YO-001A物質の生物活性評価では、*P. oryzae* に対しOligomycin Aとほぼ同等の増殖阻害活性を有することを明らかにし、その IC_{50} は $0.012 \mu M$ であった。また、細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア内の酸素消費量の変動やキットを用いた *in vitro* 試験によって、YO-001A物質がF-ATPase阻害作用を有することを確認した。これら結果は形態変化によって未知化合物の作用推定が可能であり、構築したカタログがスクリーニングに利用可能であることを示した。

さらに第2章では人工知能(AI)を用いた *P. oryzae* の形態変化判別モデルの構築を行った。カタログを用いた目視判別では、その判断基準が曖昧で客観性に欠けることや、ある程度の経験を必要とすること、顕

微鏡で 1well ずつ観察するためスループットの低さが問題であった。そこでこの問題を解決するため、AI の深層学習によって形態変化を判別するモデルを構築することにした。

判別モデルの構築では学習のため大量の画像を必要とする。そこで立体標本を自動撮影できる顕微鏡を用いて、ハイスループットに画像の撮影を行うことにした。また、撮影の際には菌体を lactophenol cotton blue によって細胞壁を染色し、特徴抽出し易くすることとした。

モデル構築には NVIDIA のオープンソース WEB アプリケーション DIGITS を利用した。13 種の作用既知化合物から得られた 8 種類の形態変化画像約 11 万枚を学習させ、モデルを構築した。構築したモデルは各形態変化を正確に分類でき、深層学習によって *P. oryzae* の形態変化が判別可能であることを確認した。

構築したモデルが実際の天然物スクリーニングに利用可能か検証するため、第 2 章で報告した YO15-A001 株および YO-001A 物質を用いて試験した。結果、培養前、単離後のサンプル共に 99% の割合で Oligomycin A によって誘導された Beads 形態に分類され、未知サンプルについても薬理作用の通りに分類できていることを確認した。

第 3 章では二形性真菌 *Candida albicans* の形態変化スクリーニングと結果について述べた。*C. albicans* は最も発症例の多い日和見感染症であるカンジダ症の主要病原菌である。本真菌は酵母形態と菌糸形態の 2 つの形態に変化する二形性の真菌で、この形態の変化が病原性に関与することから、二形性制御物質が新薬創出の標的として注目されている。

二形性制御物質のスクリーニングでは、機械を用いて阻止円を指標に増殖阻害活性を示すサンプルを絞り込み、ヒットしたサンプルについて液体培地で再現性と形態変化を観察し候補株を選定した。結果、3600 種の微生物抽出エキスより、*C. albicans* を顕著に菌糸形態へと変化させる放線菌 RK13-A276 株を選定した。

RK13-A276 株からの活性物質の精製では、培養液 7.7 L から活性物質 RK-276A を 12.4 mg 単離した。RK-276A 物質は構造解析によって、既報の SF2768 と同一平面構造を有する化合物であることが明らかとなった。しかし、その絶対立体配置や *C. albicans* の菌糸形態変化についての報告は無かった。

RK-276A 物質の生物活性評価では *C. albicans* に対し高い選択性を確認し、 IC_{50} は 1.7 nM と非常に強いものであった。また形態変化は 3 nM 以上で顕著に確認できた。RK-276A 物質の経時観察を行ったところ、化合物を添加していない control においてもまず菌糸形態で生育することが明らかとなった。その後 8 時間ほどで酵母の出現が確認され、以降は酵母形態での増殖が確認された。一方で RK-276A 物質を添加した際には酵母形態の出現は確認できず、菌糸形態のまま生育していくことがわかった。また菌糸形態を誘導した後、培地から化合物を除去し、経時観察を行ったところ、化合物除去後 10 時間ほどで菌糸の側面より酵母の出現が確認された。これら結果は、RK-276A 物質の作用が酵母形態の分化や分裂抑制である可能性を示している。RK-276A 物質の様な菌糸形態から酵母形態への変化を抑制する化合物の報告はなく、二形性メカニズム解明のバイオプローブとして期待できる。

以上、本学位論文では真菌の形態変化に着目した抗真菌物質探索を行い、新規化合物および新規作用の可能性が高い化合物を発見した。真菌の形態変化スクリーニングについては *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 誌に、YO-001A 物質の構造決定や作用標的については *The Journal of Antibiotics* 誌にて報告されている。本学位論文では、表現型スクリーニングによって興味深い化合物を見出しており、今後 AI を組み合わせることで将来の新薬探索を加速することが期待できる。以上のことから本論文は博士の学位に相当する内容であると判断し、合格とした。