

## 鳥石四郎

医学部 中村 昭四郎

医薬品の素材としては、合成品および天然物に大別されるが、天然物のほとんどすべてが、植物、動物または微生物に由来している。

微生物は場所によってかなりの差は認められるが、通常1gの土壌中には約1億個の細菌、約1千万個の放線菌および約100万個の真菌が生存していると言われている。

通常、植物や動物の生育には季または年の単位が用いられているが、微生物のそれには日または時間の単位が一般的である。また、植物や動物に比べて、微生物は化学構造の面からはるかに多様性に富んだ代謝産物を生産することもよく知られた事実で、珍奇としかいいようのない化合物との出会いは、珍しくも奇しくもない。これら微生物代謝産物の生物活性についても、多様性や意外性に富んでいることはいうまでもない。

微生物は主として土壌等から容易に分離され、短い日時のうちにしばしば優れた生物活性を示す物質を生産することから、新しい医薬品探索の面からも目を追ってその重要性が認識されている。

私は、大学卒業後まもなく当時は薬学教育とはあまりというよりほとんど縁のなかつた抗生物質の分野に入る機会を得たが、以来37有余年、週日はのんびりと菌釣りを、週末は早朝から忙しく魚釣りを楽しんできたのが、魚釣り仲間からは水畜産関係者とからかわれたり、漁師からは本当に定年後は漁師になれと勧められたりするゆえんでもある。菌釣りでは釣り方、換言すれば探索法さえ適切であれば大物が釣れるといった期待感はいつの日か確信に変わっていったが、このことは前述の微生物2次代謝産物の化学構造・生物活性

の多様性に起因している。

広島大学医学部に薬学科が設立された1969年当時、細菌感染症に対する化学療法剤については一応充足されている状態であった。一方、*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*等による深在性真菌症に対しては、polyene antifungal antibiotics (PAA) に属す amphotericin B 以外に有効な薬剤がなかったことや、また amphotericin B は、強度の腎障害をおこすことから、副作用の少ない有効な化学療法剤の出現が強く望まれていた。設立当初の3年間ほどは、なにかと学科の設営に時間をとられ、またこれといった設備等もない状態であった。そこで考えついたのが PAA の1種である trichomycin と cholesterol との拮抗現象を利用しての“簡易多目的スクリーニング法”である。

Fig. 1 に示すように trichomycin と cholesterol との混液に浸した濾紙片 (TC) と微生物培養液に浸した濾紙片 (BF) を *Candida yu1200* を被検菌とする寒天平板上で交差させ、37℃で17時間培養すると阻止帯が現れ、その形状から、A): PAA, B): non-PAA, C): PAA の potentiators, D): cholesterol の antagonists 計4種の生物活性物質が迅速かつ容易に識別できるわけである。

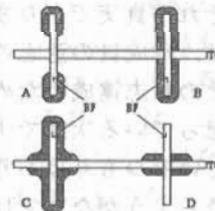


Fig. 1 簡易多目的スクリーニング法

被検菌: *Candida yu 1200*

阻止帯: (陰影)

A: polyene antibiotics

B: non-polyene antibiotics

C: polyene antibiotics の potentiators

D: cholesterol の antagonists

TC: trichomycin と cholesterol との混液に浸した濾紙片

BF: 微生物培養液に浸した濾紙片

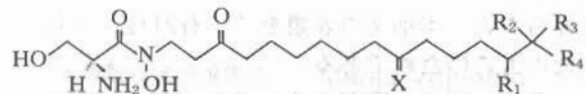
1972年4月には第1期生が卒業実習のため教室配属となり、そのうちの1人川上幸子さんが福田頼穂助手（現在東京水産大学助教授）と協力して cholesterol と antagonist の抽出精製を行い、夏休み前には世界ではじめて *Streptomyces* 由来の cholesterol oxidase (C.O.) を分離し (H. Fukuda, Y. Kawakami, S. Nakamura: Chem. Pharm. Bull., 21, 2057-2060, 1973), その年の10月鳥取で行われた日本薬学会中四国支部で発表した。我々とは別に Uwajima 等 (1973, 1974) は, *Brevibacterium* 由来の C.O. を, また Smith 等 (1976) は *Nocardia* 由来の C.O. を独自に分離し, 血中 cholesterol 定量の臨床検査試薬として開発したが, 安定性や定量性の面で我々の *Streptomyces* 由来の C.O. が最も優れていることから, 国の内外を問わず広く用いられているようである。

A) の PAA は抗真菌抗生物質スクリーニングに際して常連のおじゃま虫であるが, 本簡易多目的スクリーニング法により容易に排除することができた。

B) の non-PAA について有効成分の抽出精製を行った結果 platenocidin, antibiotic H537-SY2, ileumycin, histidinomycin, carbazomycins, piperazinomycin 等の新抗真菌抗生物質を効率よく発見し, それ等の化学的および生物学的諸性状を明らかにすることができた。

さらに C) の PAA の potentiators として enactins (ENs) および neoenactins (NEs) の新規抗真菌抗生物質群を発見分離した。ENs および NEs はともに数種ないしは10数種の同族体から構成されており, いずれの同族体も L-serine を含有し, その carboxyl 基は炭素数15ないし17の normal, iso または ante-iso 型の 3, 10-dioxo-alkyl amine と結合して, 極めて特異的な hydroxamic acid 構造を形成していることから "Hydroxamic Acid Antimycotic Antibiotics (HAAA)" のグループ名を提唱した (Fig. 2)。

Fig. 2 enactins および neo-enactins 同族体の化学構造式



Compound	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
EN-Ia	=O	H	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
EN-Ib <sub>1</sub>	=O	CH <sub>3</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>
EN-Ib <sub>2</sub>	=O	CH <sub>3</sub>	OH	H	CH <sub>3</sub>
EN-IVa (=NE-M <sub>1</sub> )	=O	CH <sub>3</sub>	H	H	H
EN-IVb (=NE-A)	=O	H	H	H	CH <sub>3</sub>
EN-Va	<OH H	CH <sub>3</sub>	H	H	H
EN-Vb (=NE-M <sub>2</sub> )	<OH H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
EN-VIa (=NE-B <sub>1</sub> )	=O	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
EN-VIb (=NE-B <sub>2</sub> )	=O	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
NE-NLCH <sub>1</sub>	=O	H	H	H	H
NE-NLCH <sub>2</sub>	=O	H	H	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

HAAA は, それ自体でも抗真菌作用を示すとともに, 血清や cholesterol の存在下でも amphotericin B や trichomycin のような PAA の抗真菌活性を相乗的に強くすることから, 抗生物質研究者の注目するところとなった。

前述の簡易多目的スクリーニング法は, ただ私共の研究室のみでなく, 生物活性を有する微生物 2 次代謝産物の探索を行っている世界の研究者の間でも広く利用されている。私共の研究室で修士課程 (1982-1984) の間 NEs の研究を行った西尾真樹博士は, 社会に出てから多くの抗真菌抗生物質を発見し, そのうちの1つ pradimicin は, 深在性真菌症に *in vivo* で有効であることが実証され, 目下開発研究が進められているようである。現在は amphotericin B に加えて合成品である 5-FC や azole antimycotics の一部も深在性真菌症に対し臨床的に使用されているとはいえ, 治療上満足すべき状態ではない。また, 本スクリーニング法を応用して, カビの培養液について cholesterol 生合成の inhibitors を追求したグループは, cholesterol 生合成に関与する酵素の inhibitors を発見し, 临床上重要な治療薬の開発に成功したという話も伝え聞いている。

以上述べたように、簡単な1つのスクリーニング法で4種類もの異なる生物活性を示す物質を分別する探索法は寡聞にして他に例を知らない。本拙文の表題を“一石四鳥”としたのもこのためである。

魚釣りでは、隣が大釣りで自分がポーズの時ほどおもしろくないことはない。逆の言い方をすれば海の中へ投げ込まれてしまうのが、手作りの6本針のメバル仕掛けで釣ると一荷六尾もまれではなく、そのたびごとに仲間から非魚道的と非難されるが、私としては一石四鳥の菌釣りよりはるかに効率的であると思っている。

1972年度の会計検査の折、*Streptomyces* C.O.の特許出願について問い合わせをしてはみたものの、何の音沙汰もなく結局出願せずに終わってしまった。その結果、本文依頼内容の“開かれた学問”にはうってつけの見本となってしまったのは何とも締まらない話ではある。しかし、本研究は微生物由来の酵素の臨床検査試薬としての応用分野での嚆矢的な研究の1つとなったのは事実である。

共同研究者の1人である亀井敏夫博士(現万有製薬中央研究所室長)により研究された結晶 cholesterol 上での affinity chromatography による *Streptomyces* C.O. の精製法(培養液よりの回収率79%、純度99%以上)は、C.O. の精製法としては世界中で最も単純かつ最良の方法であると自負している。

数年前、全く偶然の機会に本学工学部室岡教授からお聞きした、*Streptomyces* C.O. を cloning することに成功されたとの話は、私共にとってもうれしいニュースであった。また菌学部奥田教授が cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase の精製に成功された折、*Streptomyces* C.O. を使用されたとの話を伺い肩身の広い思いをした次第である。

この *Streptomyces* C.O. の研究が契機となって私共の研究室では微生物酵素に対する関心が高まり、亀井博士が中心となり *Streptomyces* 由来の cholesterol esterase を発見し、さきの *Streptomyces* C.O. と共に血中の total cholesterol の定量に使用したところ良好な結果を得た。また、*Streptomyces* 由来の新規酵素を分離して L-glutamate oxidase と命名し、血中 GOT 測定の臨床検査試薬として優れた定量性を示すことを実証した。亀井敏夫氏は以上の研究結果を纏めて本学最初の論文による薬学博士(放線菌の生産する 3 $\beta$ -hydroxy steroid oxidase, cholesterol esterase および L-glutamate oxidase と臨床検査試薬としての利用に関する研究)の称号が与えられた。

また附属病院坪倉教授の御助言もあって、当教室の井上義雄助教授および浅野健治研究員(現小林製薬東京支店)等は、微生物由来の creatinine amidohydase, creatine amidohydase および sarcosine oxidase 等のスクリーニングを行い、数種の新酵素を分離し、尿中 creatinine および creatine の臨床検査試薬の開発に成功した。

以上述べたように、簡単な1つのスクリーニング法で4種類もの異なる生物活性を示す物質を分別する探索法は寡聞にして他に例を知らない。本拙文の表題を“一石四鳥”としたのもこのためである。