

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 Thin Wut Soe

論文題目

Chemical studies on antifungal cyclic
depsipeptides from an aquatic hyphomycete

(水生不完全菌由来の抗真菌性環状デプシペプ
チドに関する化学的研究)

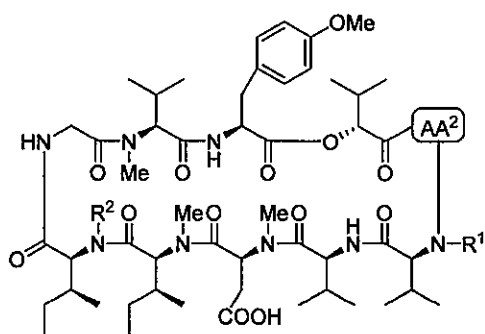
論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小鹿	一
委員	名古屋大学教授	北	将樹
委員	名古屋大学准教授	中川	優
委員	名古屋大学講師	近藤	竜彦

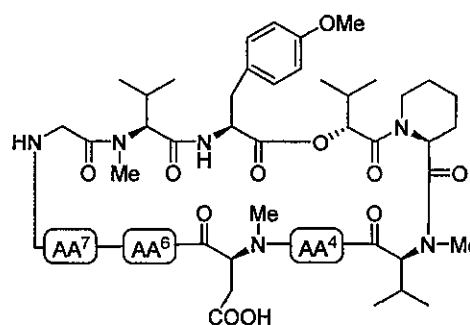
論文審査の結果の要旨

水生不完全菌は主に溪流などの淡水で生息する真菌で、陸上真菌と大きく異なり、シグモイド型や放射状型などの特徴的な形状を持つ分生子（無性孢子）を多数形成する。生育が遅く純化培養が容易ではないため、二次代謝産物の研究は多くはない。申請者の研究室では2001年、水性不完全菌の一種 *Clavariopsis aquatica* から高い抗真菌性を示す環状デブシペプチド clavariopsin A (1) および B (2) を発見したが、他にも多数の類縁化合物を生産していることが示唆されていた。本研究では、共同研究から入手した本菌の大量培養物の化学成分を精査し、新規 clavariopsin 類縁体を精製・構造決定するとともに、詳細な生物学的評価を行った。さらに、clavariopsin A (1) の誘導体を合成しその生物学的評価についても行った。

水性不完全菌 *C. aquatica* 培養物(合計 15 L、フラスコ 100 個相当)をアセトンで抽出し、抽出物を EtOAc と H₂O 分配した。EtOAc 画分をシリカゲルカラムで分離し、clavariopsin 類を含む画分を繰り返し HPLC により精製した。その結果、7つの新しい環状デブシペプチド、clavariopsin C-I (3-9) の発見に成功した。単離化合物の平面構造は分光学的手法(NMR、MS など)によって決定し、これら類縁体が既知の clavariopsin A の 10 残基あるアミノ酸・ヒドロキシ酸の一つが別のアミノ酸に置換した構造であることが分かった。各残基の立体化学は次のように決定した。化合物を酸加水分解した後、アミノ酸残基については改良 Marfey 法（アミノ酸のキラル誘導化、LC/MS 分析）により、ヒドロキシ酸は精製後キラルカラムを用いた HPLC により決定した。



- 1: AA² = Pip, R¹ = Me, R² = Me
- 2: AA² = Pip, R¹ = H, R² = Me
- 3: AA² = Pip, R¹ = Me, R² = H
- 8: AA² = L-Pro, R¹ = Me, R² = Me

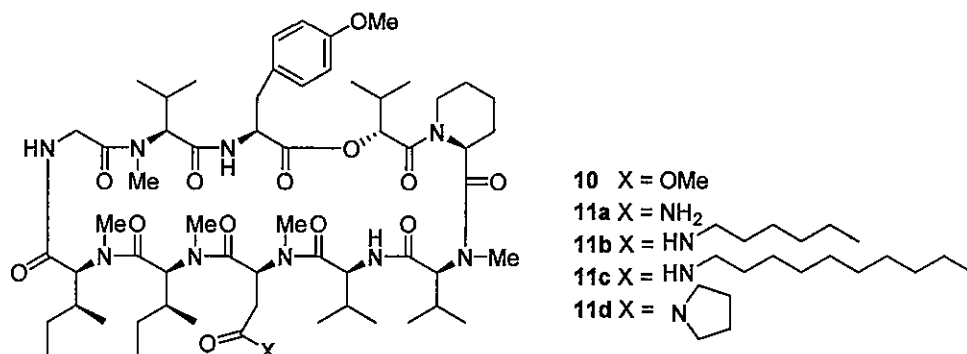


- 4: AA⁷ = L-Melle, AA⁶ = L-MeVal, AA⁴ = L-Val
- 5: AA⁷ = L-MeVal, AA⁶ = L-Melle, AA⁴ = L-Val
- 6: AA⁷ = L-Melle, AA⁶ = L-MeLeu, AA⁴ = L-Val
- 7: AA⁷ = L-MeLeu, AA⁶ = L-Melle, AA⁴ = L-Val
- 9: AA⁷ = L-Melle, AA⁶ = L-Melle, AA⁴ = L-Leu

次いで、得られた clavariopsin 類の生物活性を評価した。抗真菌性については、6種の重要な植物病原性真菌(灰色カビ病菌 *Botrytis cinerea*、稲いもち病菌 *Magnaporthe oryzae*、炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、トマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum*、イチゴ黒斑病菌 *Alternaria alternata*、黒麹菌 *Aspergillus niger*) に対して、ペーパーディスク拡散法によって評価した。多くの化合物は、これ

ら真菌に対して強力な抗真菌活性(最小阻害用量= 0.01-10 $\mu\text{g}/\text{disk}$)を示すとともに、*A. niger*に対して菌糸の膨潤を誘導した(最小有効用量= 0.3-3 $\mu\text{g}/\text{disk}$)。*A. niger*に対する膨潤誘発は、clavariopsin 類が真菌の細胞壁(1,3-グルカンなど)の生合成を阻害することで抗真菌性を発揮する可能性を示唆している。Clavariopsin 類は癌細胞株(HeLa-S3)に対して低い細胞傷害性しか示さなかったので($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$)、これらの化合物は抗真菌剤として有望な化合物といえる。

次に、より有効な抗真菌性を賦与するため、細胞透過性を変化させることを試みた。最も豊富に入手できた clavariopsin A (1)を原料に用いて、N-メチルアスパラギン酸(MeAsp5)残基のカルボキシ基を修飾することにより、メチルエステル 10 および4種のアミド誘導体 11a-11d (第一アミド、ヘキシルアミド、デシルアミド、ピロリジニルアミド)を合成した。これらの誘導体は原料より低い抗真菌活性(最小阻害用量 0.1 ~ >10 $\mu\text{g}/\text{disk}$)を示し、MeAsp5 のカルボキシ基が抗真菌性に極めて重要であることを示した。一方、HeLa-S3 細胞に対する細胞毒性を評価したところ、興味深いことに第一アミドは、天然 clavariopsin A (1, $\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$)よりも高い細胞毒性($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$)を示した。その他の誘導体は、低い細胞傷害性または不活性($\text{IC}_{50} = 19$ または $>50 \mu\text{M}$)を示し、これは分子の親油性に対して負の相関であった。



以上の Thin Wut Soe の成果は、今後、clavariopsin 類を基盤にしてさらに抗真菌性が高く毒性が低い抗真菌薬のリードを開発する上で重要な示唆を与えるものとして、当該分野における学術研究に大きく貢献するものであり、博士(農学)に相応しい内容であると判断した。