

## 【原著・基礎】

Micafungin の *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する  
作用機序の生化学的および形態学的研究山口 英世<sup>1)</sup>・西山 彌生<sup>1)</sup>・内田 勝久<sup>1)</sup>・波多野和男<sup>2)</sup>  
森下 佳彦<sup>2)</sup>・中井 徹<sup>2)</sup>・池田 文昭<sup>2)</sup>・武藤誠太郎<sup>2)</sup><sup>1)</sup>帝京大学医真菌研究センター<sup>2)</sup>藤沢薬品工業株式会社薬理研究所\*

Micafungin (MCFG) の *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* に対する作用機序を生化学的および形態学的手法を用いて検討した。MCFG は *C. albicans* ATCC 90028 および *A. fumigatus* TIMM 0063 由来の 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成系に対して濃度依存的に阻害し、その阻害様式は非競合的であった。一方、*C. albicans* ATCC 90028 の chitin, mannan, 核酸および蛋白生合成を 50% 抑制する MCFG の濃度 (IC<sub>50</sub>) はいずれも 100  $\mu$ g/mL 以上であった。*C. albicans* ATCC 90028 の酵母形、*C. albicans* FP 633 の菌糸形および *A. fumigatus* TIMM 3968 の増殖に対する MCFG の作用を微分干渉顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察し、*C. albicans* の酵母形においては細胞壁の薄層化、隔壁の形成異常、娘細胞の分離阻害および溶菌が、*C. albicans* の菌糸形においては菌糸の伸長抑制、菌糸先端部の膨化や不整化および溶菌が認められた。さらに *A. fumigatus* においては発芽抑制や菌糸の伸長抑制および菌糸先端部の膨化、変形などの細胞壁構造の異常が認められた。以上の結果から、MCFG は *C. albicans* および *A. fumigatus* に対して、その細胞壁を構成する 1,3- $\beta$ -D-glucan の生合成を特異的に阻害することによって抗真菌活性を発揮することが示唆された。

**Key words:** micafungin, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, 作用機序, 形態

近年、移植や抗がん剤投与および HIV 感染者の増加により、深在性真菌症に罹患する患者が増加してきた<sup>1-5)</sup>。これら深在性真菌症に対しては古くから 5-fluorocytosine (5-FC) や amphotericin B (AMPH-B)、さらに近年になって miconazole, fluconazole (FLCZ) および itraconazole のアゾール系抗真菌薬が処方されてきた。しかし、5-FC は副作用が比較的少ないもの的高頻度で耐性菌が出現することが報告されている<sup>6)</sup>。一方、AMPH-B はカンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ症、コクシジオイデス症を含むすべての深在性真菌症に有効性を発揮するが、発熱や悪心、注射局所の血栓性静脈炎、貧血、低カリウム血症、血中尿素値の上昇をはじめ、尿細管変性などの腎の不可逆性病変を呈し、投与に際しては十分な注意が必要とされている<sup>7,8)</sup>。また、アゾール系抗真菌薬、特に FLCZ は安全性が高く汎用されているものの、アスペルギルス症には有効性は認められず、しかも FLCZ に耐性の *Candida* 属菌種が近年増加傾向にあることが報告されている<sup>9-11)</sup>。このように、深在性真菌症、特にカンジダ症およびアスペルギルス症に対して安全性および有効性に優れた抗真菌薬は、それに罹患した患者のみならずマネジメントする臨床医においても希求されてきた。

Iwamoto ら<sup>12,13)</sup>は 1989 年 *Coleophoma empetri* の醗酵産物中に *Candida* 属および *Aspergillus* 属に活性を有する

echinocandin に構造の類似した WF 11899 A, B, C を発見した。この化合物は分子中に硫酸基を有するため水溶性に優れ、すでに同様な構造で抗真菌活性が報告されていた水溶性に乏しい LY-121019 (cilofungin) などと比して臨床開発上大きな特長を有していた。しかし、WF 11899 A は溶血活性が高かったことから、それを回避しかつ活性向上をめざして化学修飾を重ねた結果、FR 179463 (MCFG) を見出した<sup>14)</sup>。MCFG はその構造的類似性から、すでに報告されている echinocandin 系や pneumocandin 系抗真菌薬と同様に、哺乳類には存在しない細胞壁の構成成分である glucan の合成酵素、特に (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase [E.C.2.4.1.34. UDP-glucose: 1,3- $\beta$ -D-glucan 3- $\beta$ -glucosyl transferase] を特異的に阻害する化合物であると推測され、選択毒性に優れた抗真菌薬である可能性が示唆された。

この報告は、MCFG の作用機序を生化学的に解析<sup>15)</sup>するとともに MCFG 作用時の形態変化を微分干渉顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察した結果<sup>16)</sup>から MCFG の作用機序を推測したものである。

## I. 材料と方法

### 1. 使用薬剤および使用菌株

Micafungin (MCFG) は藤沢薬品工業 (株) で合成・品質検定されたものを用いた。*Candida albicans* ATCC 90028 は American Type Culture Collection (VA,

\*大阪府大阪市淀川区加島 2-1-6

USA) より購入した株を用いた。*C. albicans* FP 633 は、国内の患者より分離され藤沢薬品工業(株)で同定・保存された株を用いた。*Aspergillus fumigatus* TIMM 0063 および *A. fumigatus* TIMM 3968 は帝京大学医真菌研究センターで保存された株を用いた。

2. *C. albicans* ATCC 90028 および *A. fumigatus* TIMM 0063 の 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成に対する MCFG の阻害作用

YPD broth-A (0.5% yeast extract, 1% Bacto peptone, 2% glucose) で 35°C, 6 時間振盪培養を行った *C. albicans* ATCC 90028 を 4°C で遠心集菌し, 得られた菌体を冷脱イオン水および buffer-A [50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptethanol, 1 M sucrose] でそれぞれ 1 回洗浄した後, 菌体を破碎するまで -80°C で保存した。また, *A. fumigatus* TIMM 0063 の分生子を YPD broth-A に 1% 接種 (約  $10^6$  cells/mL) し, 35°C, 24 時間振盪培養を行った。培養液を集菌し, 菌体を冷脱イオン水および buffer-A でそれぞれ 1 回洗浄した後, 菌体を破碎するまで -80°C で保存した。

凍結菌体を急速解凍し, 25  $\mu$ M guanosine 5'-triphosphate (GTP) を含む buffer-A に懸濁し, ガラスビーズ (直径 0.4 mm) を用いて顕微鏡で菌体の破碎状況を確認しながら超音波破碎した。破碎液を 4°C で遠心し, その上清をさらに超高速遠心機で 4°C, 35,000 rpm, 1 時間遠心した。沈渣を buffer-B [50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 25  $\mu$ M GTP] に懸濁し, 4°C, 40,000 rpm で 1 時間遠心し, 得られた沈渣を 33% glycerol を含む buffer-B に懸濁し, 蛋白含量を Bradford 法により測定し, 蛋白質量 4 mg/mL の粗酵素液として使用時まで -80°C で保存した。

あらかじめ粗酵素液 10  $\mu$ L に 5 $\times$ reaction buffer [終濃度 100 mM Tris/HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 4% glycerol, 0.1 mM GTP, 0.25% BSA] 10  $\mu$ L および種々の濃度の MCFG を 10  $\mu$ L 添加し室温で 15 分反応させた後, 0.625, 1.25 または 2.5 mM の UDP-glucose および 0.35  $\mu$ Ci/mL の UDP-[ $^{14}$ C]-glucose を 20  $\mu$ L 添加し, 室温でさらに *C. albicans* の場合 60 分間, *A. fumigatus* の場合 150 分間反応させた。5% trichloroacetic acid (TCA) で反応を停止後, ガラスフィルターで急速吸引濾過し, 生成物に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。得られた放射活性は下に示す式を用いて取込み速度 (V) を算出し, MCFG の濃度を横軸に, 取込み速度の逆数を縦軸に Dixon plot<sup>17)</sup> を行い, 各基質濃度のプロットに対する回帰直線を目測で描いた。

$$V = \text{nano moles of UDP-glucose incorporated/min/} \\ \text{mg of protein}$$

3. *C. albicans* ATCC 90028 の chitin および man-

nan 生合成に対する MCFG の阻害作用

YPD broth-B (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose) で 30°C で一夜振盪培養した *C. albicans* ATCC 90028 を遠心集菌し, 菌体を 1 mM EDTA で洗浄した。菌体に buffer-C [0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL pepstatin A, 2  $\mu$ g/mL aprotinin, 0.5  $\mu$ g/mL leupeptin] を加えて懸濁し, ガラスビーズ (直径 0.4 mm) を用いて顕微鏡で菌体の破碎状況を確認しながら超音波破碎した。破碎液を 4°C で遠心し, その上清をさらに超高速遠心機で 4°C 40,000 rpm, 30 分間遠心した。沈渣を適量の buffer-D [50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 33% glycerol] に懸濁し粗酵素液として使用時まで -80°C で保存した。

Chitin 生合成に対する阻害作用を検討する場合<sup>18)</sup>, 調製した粗酵素液に 1/100 量の trypsin [10 mg/mL in 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7.5)] を加え, 室温で 10 分間反応させた後, 1/50 量の trypsin inhibitor [10 mg/mL in 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7.5)] を加え, 氷上で 5 分間反応させた。2.5  $\mu$ L の MCFG, 酵素処理した粗酵素液 10  $\mu$ L および reaction buffer [100 mM MES (pH 6.5), 20 mM MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O] 12.5  $\mu$ L を 96 well マイクロプレート上で混和し室温で 10 分間静置した。さらに, 基質溶液 (UDP-[U- $^{14}$ C]-N-acetylglucosamine 52.5  $\mu$ L/mL, UDP-N-acetylglucosamine 0.6 mg/mL, N-acetylglucosamine 177 mg/mL) 25  $\mu$ L を加え, 室温で 60 分間反応させた。100  $\mu$ L の 10% 冷 TCA を加えて反応を停止し, 反応生成物をセルハーベスタで回収し放射活性を測定した。陽性対照として MCFG の代わりに nikkomycin X (藤沢薬品工業(株)内製) を用い同様に検討した。

Mannan 生合成に対する阻害作用を検討する場合<sup>19-21)</sup>, 2.5  $\mu$ L の MCFG, 酵素処理した粗酵素液 10  $\mu$ L および reaction buffer [0.1% Chaps, 0.05% Tween 80, 20 mM sodium cacodylate-HCl pH 6.5, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol] 12.5  $\mu$ L を 96 well マイクロプレート上で混和し室温で 15 分間静置した。さらに, 基質溶液 [GDP-[U- $^{14}$ C]-mannose] 25  $\mu$ L を加え, 室温で 60 分間反応させた。100  $\mu$ L の 10% 冷 TCA を加えて反応を停止し, 反応生成物をセルハーベスタで回収し放射活性を測定した。

薬剤非添加での chitin または mannan へのラベル体の取り込み量に対する薬剤添加での chitin または mannan へのラベル体の取り込み量の比から, 阻害率および IC<sub>50</sub> 値を算出した。

4. *C. albicans* ATCC 90028 の核酸生合成および蛋白質生合成に対する MCFG の阻害作用

総核酸 (DNA + RNA) 生合成阻害を検討する場合<sup>22)</sup>, GYS broth (0.4% glucose, 0.2% yeast extract, 0.8 M

sorbitol) で 37°C, 約 3 時間振盪培養した *C. albicans* ATCC 90028 の菌液 (約  $4 \times 10^7$  cells/mL) 460  $\mu$ L に種々の濃度の MCFG を 20  $\mu$ L 加え 37°C で 5 分間培養した。これに [ $^3$ H]-adenine (2.5  $\mu$ Ci/mL) を 20  $\mu$ L 加え 37°C 30 分間振盪培養を行った。反応液に等量の 10% TCA を加え反応を停止した後, ガラスフィルターで急速吸引濾過し放射活性を測定した。一方, DNA 生合成阻害を検討する場合<sup>22)</sup>, 総核酸の生合成阻害反応終了後に等量の 1 mol/L KOH を加え 60°C で 2 時間静置した後, 20% TCA を 900  $\mu$ L 加えて 4°C で一夜静置した。これをガラスフィルターで急速吸引濾過し放射活性を測定した。RNA への取り込み量は総核酸への取り込み量から DNA への取り込み量を差し引いて算出した。DNA および RNA 生合成阻害剤の陽性対照として 5-fluorocytosine (5-FC, 和光純薬) を用いた。薬剤非添加での DNA または RNA へのラベル体の取り込み量に対する薬剤添加での DNA または RNA へのラベル体の取り込み量の比から, 阻害率および IC<sub>50</sub> 値を算出した。

蛋白生合成阻害を検討する場合<sup>22)</sup>, 前述の菌液 460  $\mu$ L に種々の濃度の MCFG を 20  $\mu$ L 加え 37°C で 5 分間培養した。これに [ $^3$ H]-leucine (25  $\mu$ Ci/mL) を 20  $\mu$ L 加え 37°C で 30 分間振盪培養を行った。60°C に加温した 10% TCA を反応液に等量加え, 90°C で 15 分間加熱した後氷冷した。ガラスフィルターで急速吸引濾過し放射活性を測定した。蛋白質生合成阻害の陽性対照として blasticidin S (科研製薬) を用いた。薬剤非添加での蛋白質へのラベル体の取り込み量に対する薬剤添加での蛋白質へのラベル体の取り込み量の比から, 阻害率および IC<sub>50</sub> 値を算出した。

5. *C. albicans* および *A. fumigatus* の形態におよぼす MCFG の影響

*C. albicans* の酵母形に対する MCFG の作用を検討す

るために, YPD broth-A で 35°C で 2 時間振盪培養した *C. albicans* ATCC 90028 に MCFG を添加し, 35°C で振盪培養した。3 および 24 時間後に培養液をスライドグラス (0.2% poly-L-lysine コート, Matsunami) に採取し 0.02% メチレンブルー液<sup>23)</sup> と等量混合して染色した後封入し, 微分干渉顕微鏡 (Leica DMR, Germany) で観察した。*C. albicans* の菌糸形発育に対する MCFG の作用を観察するために, 0.8 M sorbitol 添加 YPD broth-C (1% yeast extract, 1% Bacto peptone, 2% glucose) で 35°C で 2 時間培養した *C. albicans* FP 633 に MCFG を添加し, 35°C で振盪培養した。3 および 24 時間後に同様に微分干渉顕微鏡で観察した。*A. fumigatus* の発育に対する MCFG の作用を観察するために, *A. fumigatus* TIMM 3968 の分生子を RPMI 1640 に接種し, 30°C で 7.5 時間穏やかに振盪培養した。これに MCFG を添加し 30°C で振盪培養し, 同様に微分干渉顕微鏡で観察した。一方, 透過型電子顕微鏡による超微細形態観察では YPD broth-A で 35°C で 2 時間培養した *C. albicans* ATCC 90028 に MCFG を添加し 35°C で 3.5 時間振盪培養した。遠心集菌した菌体を glutaraldehyde および KMnO<sub>4</sub> で二重固定を行い, 常法にしたがって超薄切片を作製し, 透過型電子顕微鏡 (日立 H-7000) で観察した。

## II. 結 果

1. *C. albicans* ATCC 90028 および *A. fumigatus* TIMM 0063 の 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成に対する MCFG の阻害作用

*C. albicans* ATCC 90028 および *A. fumigatus* TIMM 0063 の粗酵素における UDP-glucose の取り込み速度と MCFG の濃度との関係を Dixon plot したものを Fig. 1 に示した。いずれの基質濃度においても, MCFG の濃度の上昇に伴って基質取り込み速度は低下し,

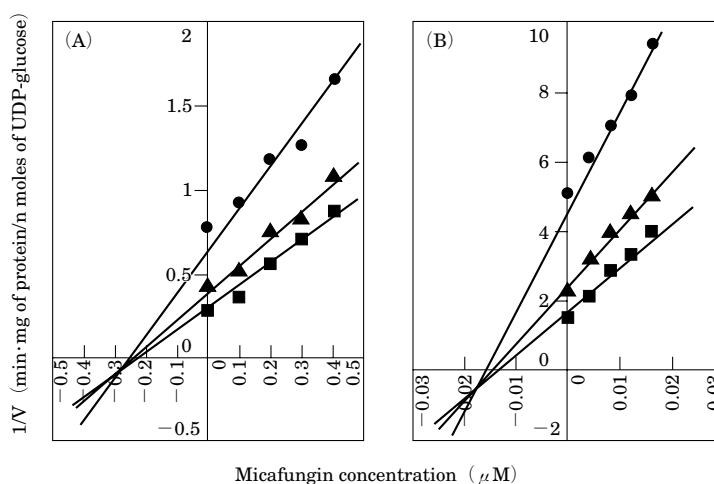


Fig. 1. Kinetics of micafungin inhibition against 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase in crude lysate of *Candida albicans* ATCC 90028 (A) and *Aspergillus fumigatus* TIMM 0063 (B). Glucan syntheses were run with different concentrations of UDP-glucose (●; 0.25 mM, ▲; 0.5 mM, and ■; 1 mM).

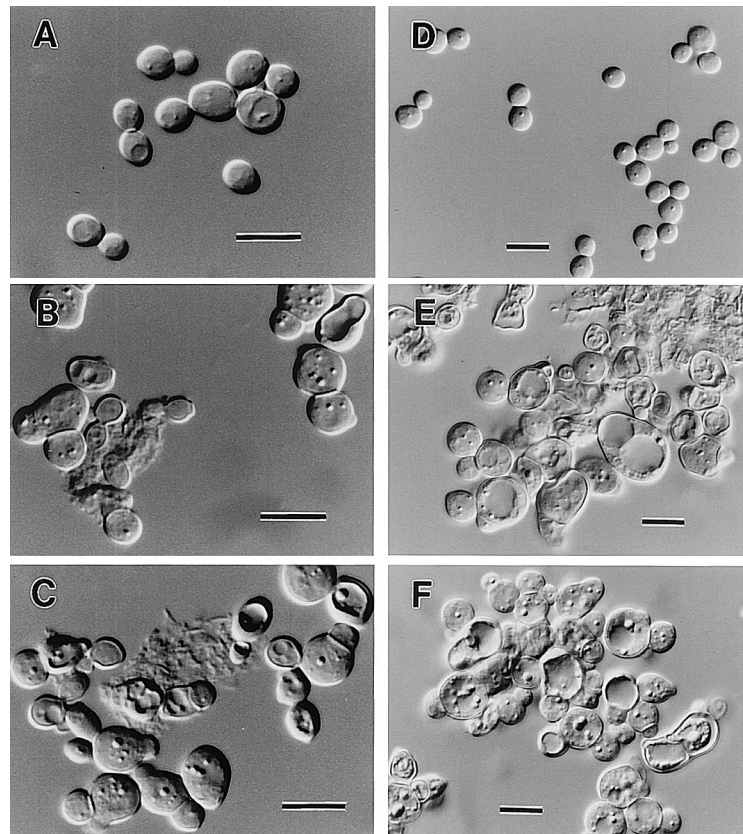


Fig. 2. Differential-interference contrast micrographs of drug-induced morphological changes in *Candida albicans* ATCC 90028 yeast form. Panels: A, saline control after 3 hours, B, 0.1 µg/mL micafungin (MCFG) after 3 hours challenge; C, 1 µg/mL MCFG after 3 hours challenge; D, saline control after 24 hours; E, 0.1 µg/mL MCFG after 24 hours challenge; F, 1 µg/mL MCFG after 24 hours challenge. Bars indicate 10 µm.

MCFGの濃度が0である時に各反応基質濃度の回帰直線は1点で交差しなかった。

2. *C. albicans* ATCC 90028 の chitin, mannan, 核酸および蛋白生成に対する MCFG の阻害作用

*C. albicans* ATCC 90028 の chitin 生合成阻害反応に対して、陽性対照とした nikkomycin X は 0.1 µg/mL 以下の 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) で阻害したが、MCFG の IC<sub>50</sub> 値は 100 µg/mL 以上であった。一方、MCFG の mannan 生合成阻害の IC<sub>50</sub> 値は 100 µg/mL 以上であった。DNA および RNA の生合成阻害剤として知られる 5-FC の *C. albicans* ATCC 90028 の生菌における DNA および RNA 生合成に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.44 および 0.7 µg/mL であったが、MCFG の DNA および RNA 生合成に対する IC<sub>50</sub> 値はともに 100 µg/mL 以上であった。同様に蛋白生成に対する MCFG の IC<sub>50</sub> は、陽性対照とした blasticidin S の IC<sub>50</sub> 値は 0.02 µg/mL であったのに対し MCFG の IC<sub>50</sub> 値は 100 µg/mL 以上であった。

3. *C. albicans* ATCC 90028 の酵母形発育形態におよぼす MCFG の作用

*C. albicans* ATCC 90028 に MCFG を作用させたと

きの典型的な微分干渉顕微鏡観察像を Fig. 2 に示した。本菌株は MCFG 無添加では、培養 3 および 24 時間後に酵母細胞および出芽による増殖像が観察された (Fig. 2-A および D)。一方、MCFG を 0.1 µg/mL (Fig. 2-B および E) または 1 µg/mL (Fig. 2-C および F) 作用させた場合、3 時間後で異常な隔壁を有する大型細胞が認められ (Fig. 2-B および C)、24 時間後では細胞の大型化がさらに顕著になり、メチレンブルーで染色される死細胞が多く観察された。これらを透過型電子顕微鏡観察した結果を Fig. 3 に示した。MCFG を作用させていない酵母細胞では、細胞壁の厚さが 50~150 nm で、電子密度の高い繊維状構造からなる最外層、低電子密度の中間層および高電子密度の薄い内層の 3 層構造が認められ、細胞壁に密着した細胞膜、核膜で境界された核の他、ミトコンドリア、小胞体、液胞などのオルガネラが観察された (Fig. 3-A)。一方、5 µg/mL の MCFG を 3.5 時間作用させた場合、細胞の大型化および変形、細胞壁の薄層化や隔壁の異常形成が認められ、娘細胞の分離阻害とそれによる細胞集塊形成が観察された (Fig. 3-B)。

4. *C. albicans* FP 633 の菌糸形発育形態におよぼす

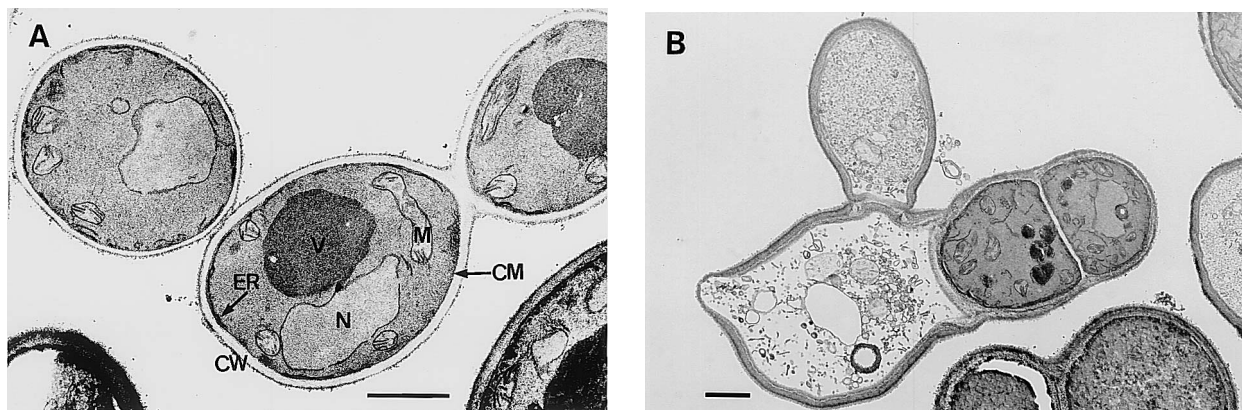


Fig. 3. Transmission electron micrographs of drug-induced morphological change in *Candida albicans* ATCC 90028 yeast form. Panels: A, saline control after 3.5 hours, CW: cell wall, CM: cytoplasmic membrane, M: mitochondria, N: nucleus, V: vacuole, and ER: endoplasmic reticulum; B, 5 µg/mL of micafungin after 3.5 hours challenge. Bars indicate 1 µm.,

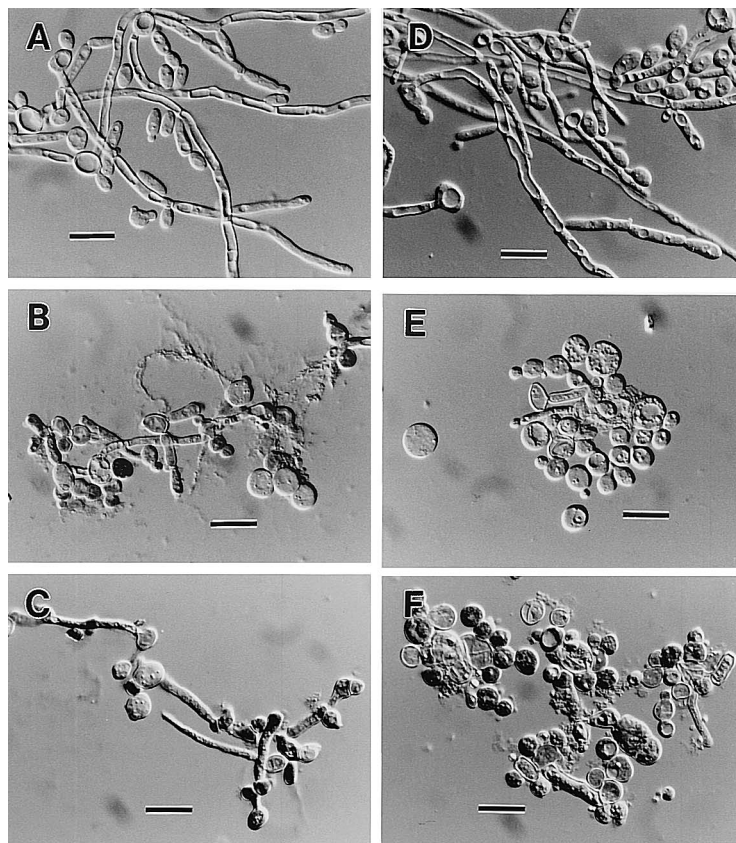


Fig. 4. Differential-interference contrast micrographs of drug-induced morphological changes in pseudo and true hypha of *Candida albicans* FP 633. Panels: A, saline control after 3 hours; B, 0.1 µg/mL micafungin (MCFG) after 3 hours challenge; C, 1 µg/mL MCFG after 3 hours challenge; D, saline control after 24 hours; E, 0.1 µg/mL MCFG after 24 hours challenge; F, 1 µg/mL MCFG after 24 hours challenge. Bars indicate 10 µm.

#### MCFG の作用

*C. albicans* FP 633 に MCFG を作用させたときの微分干渉顕微鏡観察像を Fig. 4 に示した。本菌株は、MCFG 無添加では酵母細胞から germ tube が形成され菌糸が伸長する像が観察され (Fig. 4-A), 24 時間後では大多数は菌糸形であったが、酵母形発育も一部観察さ

れた (Fig. 4-D)。一方、MCFG を 0.1 µg/mL (Fig. 4-B および E) または 1 µg/mL (Fig. 4-C および F) 作用させた場合、3 時間後に菌糸伸長の抑制、菌糸先端細胞の膨化や不整形化、菌糸基部の酵母形細胞の膨化と変形、メチレンブルー染色に陽性を示す菌糸細胞の増加や溶菌像、および大型の球状細胞が観察された (Fig. 4-

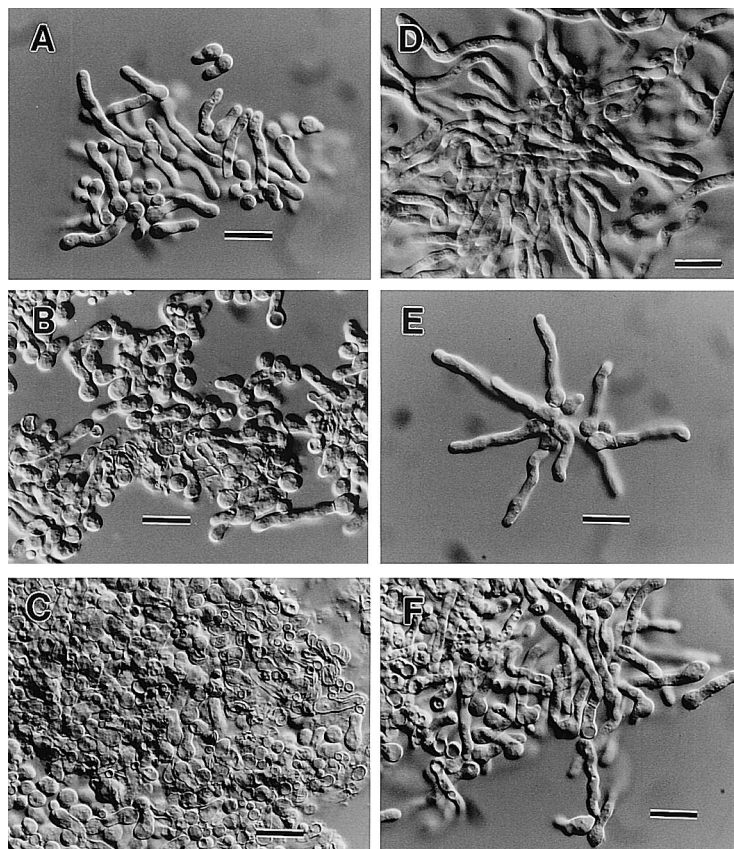


Fig. 5. Differential-interference contrast micrographs of drug-induced morphological changes in mycelia of *Aspergillus fumigatus* TIMM 3968. Panels: A, saline control after 5 hours; B, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of micafungin (MCFG) after 5 hours challenge; C, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MCFG after 5 hours challenge; D, saline control after 7 hours; E, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MCFG after 7 hours challenge; F, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MCFG after 7 hours challenge. Bars indicate 10  $\mu\text{m}$ .

BおよびC)。24時間後では菌糸形細胞はほぼ完全に消失し、溶菌した菌体の残骸と推察される繊維状あるいは顆粒状構造物と球状細胞のみが観察された (Fig. 4-EおよびF)。

5. *A. fumigatus* IMM 3968 の発育形態におよぼす MCFG の作用

*A. fumigatus* TIMM 3968 に MCFG を作用させたときの微分干渉顕微鏡観察像を Fig. 5 に示した。本菌株の分生子を 7.5 時間培養すると膨化した分生子が観察された (結果は示さない)。これよりさらに培養 5 時間後の MCFG 無添加像は分生子からの菌糸の発芽および菌糸の伸長が認められ (Fig. 5-A), 7 時間後では多くの菌糸が伸長した像が観察された (Fig. 5-D)。一方, MCFG を 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 5-B および E) または 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 5-C および F) 作用させた場合, 5 時間後では発芽の開始が遅れ, 一部に分生子の発芽が認められるものの未発芽の分生子が多く, 扁平化した菌糸が観察された (Fig. 5-B および C)。7 時間後では菌糸の伸長はほとんどみられず, 菌糸先端部の膨化, 変形像が観察された (Fig. 5-E および F)。

### III. 考 察

*C. albicans* の細胞壁は plasma membrane 上に mannoprotein,  $\beta$ -glucan + chitin,  $\beta$ -glucan, mannoprotein, fibrillar layer の層が積み重なることによって構成されており, glucan の polymer である  $\beta$ -glucan は 1,3- $\beta$ -D-glucan と 1,6- $\beta$ -D-glucan が層構造をなしている<sup>24)</sup>。このように 1,3- $\beta$ -D-glucan は細胞壁の構成上重要な成分で, chitin core に glucan が  $\beta$ -1,3 結合してできた polymer が 3 次元螺旋状に絡んだ糸状構造をなし, 細胞の剛性や形態維持に重要な役割を果している。1,3- $\beta$ -D-glucan polymer の生合成が阻害されると, 細胞壁が脆弱化し外界との浸透圧差に抗し切れず細胞膜が破裂し細胞死に至る。哺乳動物細胞には 1,3- $\beta$ -D-glucan の生合成経路は存在しないため, このメカニズムは抗真菌薬のターゲットとしてきわめて有望であると考えられている<sup>24)</sup>。

一般に抗真菌薬の作用機序として大きく, ① polyene に代表される一次的細胞膜障害作用, ② FLCZ などのアゾール系薬に代表される細胞膜の構成成分代謝の阻害による二次的細胞膜障害作用, ③ 5-FC に代表される核酸生合成阻害作用, ④ sordarin 誘導体などの蛋白質生合

成阻害作用, ⑤echinocandinに代表される glucan 生合成, nikkomyacinに代表される chitin 生合成, benanomycin Aに代表される mannan 生合成などの細胞壁成分生合成阻害作用などがある<sup>25)</sup>。今回の検討において, *C. albicans* に対する MCFG の増殖阻止および殺菌作用は核酸合成阻害や蛋白質合成阻害に由来するものではないことが確認された。さらに, 細胞壁成分である chitin や mannan の生合成も MCFG では阻害されなかった。一方, 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成反応に対しては MCFG はその濃度依存的に UDP-glucose の glucan への組み込みを阻害した。また, その glucan への組み込みに対する酵素反応速度論的解析をするために, UDP-glucose 濃度を 0.25 mM, 0.5 mM および 1.0 mM にした時の反応速度の逆数と MCFG の濃度とを Dixon plot すると, 非競合的な阻害様式を示した。Beaulieu ら<sup>26)</sup>は *A. fumigatus* の 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成に対する cilofungin の作用についてわれわれと同様の Dixon plot でその阻害様式を解析し, 今回の結果と同様の報告をしている。また, 解析手法が異なるものの, pneumocandin や echinocandin の 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成に対する阻害の様式が非競合的であることが報告されている<sup>27-32)</sup>。一方, MCFG が 1,6- $\beta$ -D-glucan の生合成を阻害するか否かは検討していないが, 1,3- $\beta$ -D-glucan の生合成が阻害された結果として  $\beta$ -1,6 結合による高次構造の形成が進行しない可能性は考えられる。

MCFG 作用時の形態変化は細胞壁生合成の異常を反映したものと考えられる。MCFG の作用により *C. albicans* において認められた細胞壁の薄層化は細胞壁生合成阻害作用をもっとも端的に反映したものと考えられる。さらに, 正常な形態より明らかに大型で球状を呈した細胞は, MCFG により蛋白質や核酸などの細胞質成分の生合成が抑制されないにもかかわらず細胞壁生合成が阻害され細胞壁が脆弱化したために細胞自体が膨化したものと考えられる。Shiota ら<sup>33)</sup>や中島<sup>34)</sup>は細胞壁の endo-1,6- $\beta$ -D-glucanase に対する感受性が低下した変異株は野性株に対して球状の形態を呈すると報告していることから, MCFG の作用により 1,3- $\beta$ -D-glucan の生合成が阻害され, その結果, 細胞の形態形成を決定する  $\beta$ -1,6 結合が行えなくなった可能性も考えられる。一方, 隔壁の異常形成や娘細胞の分離阻害は, 出芽による娘細胞形成は開始されるものの細胞壁自己融解<sup>35)</sup>が働かず, 正常な細胞の分離が行われなかった結果と推察される。MCFG が直接, 細胞壁自己融解酵素の活性を阻害したのかあるいは正常な細胞周期が進行しないために細胞壁自己融解酵素の誘導や転写がされないのかは不明であるが, 細胞の分裂分離割断において細胞壁自己融解酵素が作用しないために分離が行われなかった可能性は考えられる<sup>34,36)</sup>。ただし, 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成を阻害する papulacandin においては 1,3- $\beta$ -glucanase は

阻害しない<sup>37)</sup>ことが報告されていることから, MCFG が細胞壁自己融解酵素を直接的に阻害している可能性は低いと考えられる。Hiura ら<sup>38,39)</sup>が *Neurospora crassa* の増殖過程における glucan 組成および glucanase 産生を詳細に検討し, 細胞の成長初期には  $\beta$ -1,3 結合の割合が高く, 成長後期になるとその割合が減少することを報告しており, *A. fumigatus* の分生子からの発芽が MCFG によって抑制されたのも, 発芽初期の急速な 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成を MCFG が効率よく阻害したためと推察される。

MCFG が 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成系の酵素複合体に対してどのように作用することで  $\beta$ -1,3 結合の形成を阻害するのにはまだ不明である。1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成系の酵素複合体は, 触媒サブユニットである Fks 1 p / Fks 2 p (遺伝子: *FKS 1/FKS 2*)<sup>40-43)</sup>と調節サブユニットである Rho 1 p GTPase (遺伝子: *RHO 1*)<sup>44-49)</sup>であることが報告されている。Kurtz ら<sup>50)</sup>は, 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成の触媒サブユニットをコードしている *FKS 1*<sup>31,51,52)</sup>あるいは *FKS 2*<sup>53)</sup>に点変異を加えた変異株に対する pneumocandin 誘導体である L-733,560 の活性が低下することから, L-733,560 の作用機序は Fks 1 p / Fks 2 p に対する直接作用であると報告している。他方, Radding ら<sup>54)</sup>は echinocandin 誘導体 LY 303366 の標的蛋白質を特定するために photo-affinity labeling を行い, 40 Kda の蛋白質を echinocandin binding protein (EBP) として特定した。この蛋白質のフラグメント解析から, この EBP はヒトの GTPase-activating protein (GAP) である NF-1 に相同性があることが示され, echinocandin の作用機序が, Rho 1 p を介した 1,3- $\beta$ -D-glucan 生合成<sup>55)</sup>の阻害である可能性を報告している。しかし, いずれの作用機序検討においてもその機序を特定する決定的な実験事実はなく推測の域はでない。今後, 分子レベルでの MCFG の作用機序の解明が必要と考えられる。

#### 文 献

- 1) 河野 茂: Compromised host における深在性真菌症。Jpn. J. Med. Mycol. 41: 71-76, 2000
- 2) Ampel N M: Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. Emerg. Infect. Dis. 2: 109-116, 1996
- 3) Andriole V T: Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. J. Antimicrob. Chemother. 44: 151-162, 1999
- 4) Wade J C: Treatment of fungal and other opportunistic infections in immunocompromised patients. Leukemia. 11 Suppl 4: S 38-39, 1997
- 5) Chimelli L, Mahler-Araújo M B: Fungal infections. Brain. Pathol. 7: 613-627, 1997
- 6) Vermes A, Guchelaar H J, Dankert J: Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J. Antimicrob. Chemother. 46: 171-179, 2000

- 7) Robinson R F, Nahata M C: A comparative review of conventional and lipid formulations of amphotericin B. *J. Clin. Pharm. Ther.* 24: 249~257, 1999
- 8) Gates C, Pinney R J: Amphotericin B and its delivery by liposomal and lipid formulations. *J. Clin. Pharm. Ther.* 18: 147~153, 1993
- 9) Hofmann H: Fungal infections of the skin and mucous membranes: new therapies and the development of azole resistant yeasts. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 10: 96~100, 1997
- 10) Sangeorzan J A, Bradley S F, He X, et al.: Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am. J. Med.* 97: 339~346, 1994
- 11) Redding S, Smith J, Farinacci G, et al.: Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by in vitro susceptibility testing and DNA subtype analysis. *Clin. Infect. Dis.* 18: 240~242, 1994
- 12) Iwamoto T, Fujie A, Sakamoto K, et al.: WF 11899 A, B and C, novel antifungal lipopeptides. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiotics.* 47: 1084~1091, 1994
- 13) Iwamoto T, Fujie A, Nitta K, et al.: WF 11899 A, B and C, novel antifungal lipopeptides. II. Biological properties. *J. Antibiotics.* 47: 1092~1097, 1994
- 14) Tomishima M, Ohki H, Yamada A, et al.: FK 463, a novel water-soluble echinocandin lipopeptide: synthesis and antifungal activity. *J. Antibiotics.* 52: 674~676, 1999
- 15) Hatano K, Morishita Y, Nakai T, et al.: Antifungal mechanism of FK 463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiotics.* 55: 219~222, 2002
- 16) Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H: Morphological changes of *Candida albicans* induced by micafungin (FK 463), a water-soluble echinocandin-like lipopeptide. *J. Electron Microsc. in press.*
- 17) Dixon M: The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55: 170~171, 1953
- 18) Sburlati A, Cabib E: Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 261: 15147~15152, 1986
- 19) 日本農芸化学会編: 細胞壁合成阻害物質のスクリーニング。抗生物質—新しい領域への展開—, p. 201~204, 朝倉書店, 東京, 1985
- 20) Behrens N H, Cabib E: The biosynthesis of mannan in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* 243: 502~509, 1968
- 21) Kossaczka Z, Drgoňová J, Podobová B, et al.: Accumulation of golgi-specific mannosyltransferases in *Candida albicans* cells grown in the presence of brefeldin A. *Can. J. Microbiol.* 41: 971~977, 1995
- 22) Yamaguchi H, Hiratani T, Iwata K, et al.: Studies on the mechanism of antifungal action of aculeacin A. *J. Antibiotics.* 35: 210~219, 1982
- 23) Lehrer R I, Cline M J: Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. *J. Bacteriol.* 98: 996~1004, 1969
- 24) Debono M, Gordee R S: Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 471~497, 1994
- 25) Chiou C C, Groll A H, Walsh T J: New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. *Oncolog.* 5: 120~135, 2000
- 26) Beaulieu D, Tang J, Yan S B, et al.: Characterization and cilofungin inhibition of solubilized *Aspergillus fumigatus* (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38: 937~944, 1994
- 27) Sawistowska-Schröder E T, Kerridge D, Perry H: Echinocandin inhibition of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase from *Candida albicans*. *FEBS Letters.* 173: 134~138, 1984
- 28) Taft C S, Stark T, Selitrennikoff C P: Cilofungin (LY 121019) inhibits *Candida albicans* (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase activity. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 32: 1901~1903, 1988
- 29) Taft C S, Selitrennikoff C P: LY 121019 inhibits *Neurospora crassa* growth and (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase. *J. Antibiotics.* 41: 697~701, 1988
- 30) Tang J, Parr Jr. T R: W-1 solubilization and kinetics of inhibition by cilofungin of *Candida albicans* (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35: 99~103, 1991
- 31) Douglas C M, Marrinan J A, Li W, et al.: A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *J. Bacteriol.* 176: 5686~5696, 1994
- 32) Kurtz M B, Heath I B, Marrinan J, et al.: Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38: 1480~1489, 1994
- 33) Shiota M, Nakajima T, Satoh A, et al.: Comparison of  $\beta$ -glucan structures in a cell wall mutant of *Saccharomyces cerevisiae* and the wild type. *J. Biochem.* 98: 1301~1307, 1985
- 34) 中島 佑: 真菌の形態形成に伴う細胞壁 $\beta$ -グルカンの構造変化。 *Jpn. J. Med. Mycol.* 33: 259~265, 1992
- 35) Inouhe M, Sugo E, Tohoyama H, et al.: Cell wall metabolism and autolytic activities of the yeast *Saccharomyces exiguus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 21: 11~14, 1997
- 36) Gorman J, Taruo P, LaBerge M, et al.: Timing of enzyme synthesis during synchronous division in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15: 43~49, 1964
- 37) Varona R, Pérez P, Durán A: Effect of papulacandin B on  $\beta$ -glucan synthesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS. Microb. Lett.* 20: 243~247, 1983
- 38) Hiura N, Nakajima T, Matsuda K: Two cell wall  $\beta$ -D-glucans from *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem.* 47: 1317~1322, 1983
- 39) Hiura N, Honjyo I, Nakajima T, et al.: Change of the structure of cell wall  $\beta$ -1,3- $\beta$ -D-glucan with the growth of *Neurospora crassa* cells. *Agric. Biol.*



- Chem. 48: 1041~1047, 1984
- 40) Inoue S B, Takewaki N, Takasuka T, et al.: Characterization and gene cloning of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 231: 845~854, 1995
- 41) Douglas C M, D'ippolito J A, Shei G J, et al.: Identification of the *FKS 1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase inhibitors. Antimicrob. Agents. Chemother. 41: 2471~2479, 1997
- 42) Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, et al.: Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSC 1/FKS 1* and its involvement in  $\beta$ -1,3-glucan synthesis. J. Bacteriol. 179: 4096~4105, 1997
- 43) Douglas C M, Foor F, Marrinan J A, et al.: The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS 1 (ETG 1)* gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12907~12911, 1994
- 44) Kondoh O, Tachibana Y, Ohya Y, et al.: Cloning of the *RHO 1* gene from *Candida albicans* and its regulation of  $\beta$ -1,3-glucan synthesis. J. Bacteriol. 179: 7734~7741, 1997
- 45) Mazur P, Baginsky W: In vitro activity of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho 1. J. Biol. Chem. 271: 14604~14609, 1996
- 46) Arellano M, Durán A, Pérez P: Rho 1 GTPase activates the (1-3)- $\beta$ -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. EMBO. J. 15: 4584~4591, 1996
- 47) Drgonová J, Drgon T, Tanaka K, et al.: Rho 1 p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. Science. 272: 277~279, 1996
- 48) Qadota H, Python C P, Inoue S B, et al.: Identification of yeast Rho 1 p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- $\beta$ -glucan synthase. Science. 272: 279~281, 1996
- 49) Kelly R, Register E, Hsu M J, et al.: Isolation of a gene involved in 1,3- $\beta$ -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. J. Bacteriol. 178: 4381~4391, 1996
- 50) Kurtz M B, Douglas C M: Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. J. Medic. Vet. Mycol. 35: 79~86, 1997
- 51) El-Sherbeini M, Clemas J A: Cloning and characterization of *GNS 1*: a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in synthesis of 1,3- $\beta$ -glucan in vitro. J. Bacteriol. 177: 3227~3234, 1995
- 52) El-Sherbeini M, Clemas J A: Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicro. Agents. Chemother. 39: 200~207, 1995
- 53) Mazur P, Morin N, Baginsky W, et al.: Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. Mol. Cell. Biol. 15: 5671~5681, 1995
- 54) Radding J A, Heidler S A, Turner W W: Photoaffinity analog of the semisynthetic echinocandin LY 303366: identification of echinocandin targets in *Candida albicans*. Antimicrob. Agents. Chemother. 42: 1187~1194, 1998
- 55) Cabib E, Drgonová J, Drgon T: Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. 67: 307~333, 1998

Anti-fungal mechanisms of micafungin: Enzymological and morphological studies of micafungin action against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*

Hideyo Yamaguchi<sup>1)</sup>, Yayoi Nishiyama<sup>1)</sup>, Katsuhisa Uchida<sup>1)</sup>,  
Kazuo Hatano<sup>2)</sup>, Yoshihiko Morishita<sup>2)</sup>, Toru Nakai<sup>2)</sup>,  
Fumiaki Ikeda<sup>2)</sup> and Seitaro Mutoh<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Institute of Medical Mycology, Teikyo University

<sup>2)</sup>Medicinal Biology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.,  
2-1-6, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan

This report describes the anti-fungal mechanism of action of micafungin (MCFG) against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* using enzymological and morphological techniques. MCFG inhibits 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis derived from *C. albicans* ATCC 90028 and *A. fumigatus* TIMM 0063 in a concentration dependent manner. Inhibition kinetics between substrate and inhibitor were non-competitive. MCFG is not active against chitin or mannan synthesis derived from *C. albicans* ATCC 90028 with both having a 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) over 100  $\mu$ g/mL. MCFG is also not active against deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid or protein synthesis in *C. albicans* ATCC 90028 ( $IC_{50}$ s were both over 100  $\mu$ g/mL). On differential-interference contrast micrographs and transmission electron micrographs of drug-challenged cells, abnormal cell wall structures were observed. These abnormalities included: thin cell walls, abnormal septum formation, split inhibition of daughter cells and lysis of the *C. albicans* ATCC 90028 yeast cells; inhibition of pseudohyphae extensions, swelling and abnormal extension at the tips of pseudohyphae in *C. albicans* FP 633; and inhibition of germination and hyphae extension, swelling and abnormal extension at the tip cells of hyphae in *A. fumigatus* TIMM 0063. These results suggest that the anti-fungal mechanism of action against *C. albicans* and *A. fumigatus* is inhibition of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthesis.