チオカルバミン酸系抗真菌剤，ナフチオメート T の作用機作：

スクワレンエポキシダーゼ活性の阻害作用

森 田 達 也 野 沢 義 則

岐阜大学医学部生化学教室

〔受付：9月11日，1985年〕

チオカルバミン酸系抗真菌剤であるナフチオメート T のステロース代謝におよぼす影響を *Candida albicans* の全細胞および無細胞抽出系において検討した。ナフチオメート T 処理により全細胞で認められたスクワレンの代謝阻害は無細胞抽出系においても認められ，この阻害作用はスクワレンからスクワレンエポキシドへの生成経路，すなわち，スクワレンエポキシダーゼ阻害によることが明らかにされた。

Key words: ナフチオメート T (naphthiomate T) スクワレン (squalene), スクワレンエポキシダーゼ (squalene epoxidase)

近年，ミコナゾール(miconazole)，ケトコナゾール(ketoconazole)をはじめとするイミダゾール系抗真菌剤，またナフチフィン(naftifine)や SF 86-327 に代表されるアリルアミン系抗真菌剤の開発が活発になされ，これらの作用機作についても広範な研究が進められている¹⁻⁵⁾。なかでも，エルゴステロール合成阻害作用に関する研究は多く⁵⁻¹¹⁾，イミダゾール系化合物においては Van den Bossche ら^{5,6)}により 14-C 脱メチル化反応阻害が明らかにされており，また，Yoshida ら^{12,13)}はこの 14-C 脱メチル化反応がチトクローム P-450 依存性酵素であることを示している。アリルアミン系化合物においては Ryder ら¹⁴⁻¹⁶⁾によりスクワレンエポキシダーゼ阻害が明らかにされている。一方，ナフチオメート (naphthiomate) T は局所用皮膚真菌治療薬としてすでに広く用いられているチオカルバミン酸系化合物であるが (Fig. 1)，著者らはすでに *Trichophyton mentagrophytes* と *Candida albicans* 細胞においてナフチオメート T はナフチフィンと同様にス

クワレンの異常蓄積をもたらすことを明らかにし，スクワレンエポキシダーゼ阻害作用を有することを示唆した¹⁷⁾。そこで今回は，*C. albicans* を用いてナフチオメート T の脂質代謝と無細胞抽出系におけるスクワレンエポキシダーゼ活性に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

菌体と培養条件 菌体は *Candida albicans* IFO 1060 株を用いた。サブロー寒天培地に 2 週間静置培養した菌体を，サブロー・グルコース培地 (3% グルコース，1% ポリペプトン，1% イーストエキス，pH 6.3) で 1×10^8 細胞個/ml にした。この細胞浮遊液 1.0 ml を 200 ml のサブロー・グルコース培地に接種し，37℃で 20 時間振盪培養して定常期初期の細胞 (約 1.0×10^8 細胞個/ml) を得た。

[¹⁴C] 酢酸の脂質画分への取り込み

定常期初期の細胞 5×10^7 個を 100 ml のサブロー・グルコース培地に接種し，30℃で 6 時間培養し，対数増殖期に達した細胞に 2 μ moles の放射標識酢酸ナトリウム (5.0 μ Ci, sodium [¹⁴C] acetate, New England Nuclear) を添加すると同時に，薬物または溶媒ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide; DMSO) のみを添加し，さらに 4 時間培養を行い細胞をラベルした。培養後，蒸留水にて洗浄し遠心操作によって得られた細胞を Bligh-Dyer の方法¹⁸⁾に従い 3 倍量のクロロホルム-メタノール (1:2, v/v) を加え，

Fig. 1. Chemical structure of naphthiomate T.

別刷請求先：野沢 義則

〒500 岐阜市司町 40

岐阜大学医学部生化学教室

室温下で10時間抽出を行ったのちにクロロホルム層を分離、減圧濃縮したものを総脂質画分とした。

i) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析：中性脂質の分離は 20×20 cm, プレコート・シリカゲル F 254 (Merck) を用い、展開溶媒として *n*-ヘプタン-イソプロピルエーテル-酢酸 (60:40:4, v/v) 系を用いた。各脂質の同定は、それぞれ標準物質の R_f 値をもとに行った。各脂質画分への $[^{14}\text{C}]$ 酢酸の取り込みは、ヨード蒸気により検出した各スポットをヨードを減圧下除去した後、ガラスバイアルビンにかき取り液体シンチレーション溶液 [トルエン/トライトン X-100/水/2, 2'-*p*-フェニレン-*bis*-(5-フェニルオキサゾール) 2, 5-ジフェニルオキサゾール (800 ml:200 ml:50 ml:0.24 g:3.3 g)] を 6.0 ml 加え、Beckman LS-7500 シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

また、ラジオオートグラフィーは XO-mat AR フィルム (Kodak) を用い数日間、感光させて行った。

ii) ガスクロマトグラフィー (GLC) による分析：ステロール化合物の分離は、Zurkowski の方法¹⁹⁾に従い *n*-ヘキサン溶液として抽出し、不ケン化物画分を減圧乾固した後、市販のトリメチルシリル化剤である TMS-HT (東京化成) を加え、60°C で10分間加熱し TMS 化を行った。ついで、クロロホルム-水 (1:1, V/V) でステロールエステルを抽出し、 N_2 ガス気流下で減圧乾固後、少量の *n*-ヘキサン溶液に溶かし分析に供した。GLC の分析条件は 3%OV-1 の 2 m ガラスカラムを用い、カラム温度は 250°C とし、 N_2 ガスをキャリアーとして流量は 40 ml/分とした。TMS 化されたステロール化合物の同定は各標準化合物との比較によって行った。

無細胞抽出液の調製

対数増殖期の *C. albicans* 細胞から前報²⁰⁾に従い Zymolyase 処理によるスフェロプラストを得、4°C 冷却下において等量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズすることにより細胞を破壊した。得られたホモジネートから 800×g, 5 分間の遠心分離によって未破壊細胞を除き、さらにこの上清を 10,000×g, 20 分間の遠心分離を行い上清を得た。液面に浮く油脂層をアスピレーターおよび濾紙で可及的にとり除き、これを酵素液として用いた。タンパク量は Lowry の方法²¹⁾に従って測定した。

無細胞抽出系における $[^{14}\text{C}]$ メバロン酸のステロー

ル画分への取り込み

無細胞抽出系におけるステロール合成は、Kato らの方法²²⁾に従って行った。すなわち、上述の酵素液 0.90 ml (40 mg protein/ml) に $1 \mu\text{mol NADP}^+$, $1 \mu\text{mol NAD}^+$, $3 \mu\text{moles}$ グルコース-6-リン酸, $5 \mu\text{moles ATP}$, $3 \mu\text{moles}$ 還元型グルタオチン, $3 \mu\text{moles MgCl}_2$, $2 \mu\text{moles MnCl}_2$ を加え、基質として $1.5 \mu\text{moles}$ の放射標識 D, L-メバロン酸 ($0.25 \mu\text{Ci}$),

Fig. 2. Effect of naphthiomate T (on $[^{14}\text{C}]$ acetate incorporation into lipids in *C. albicans* cells.

Autoradiograph of labeled lipids separated by thin layer chromatography.

A, control; B, 10^{-7}M naphthiomate T; C, 10^{-6}M ; D, 10^{-5}M . 1, squalene and sterol esters; 2, triglycerides; 3, free fatty acids; 4, unknown; 5, trimethylsterols; 6, dimethylsterols; 7, desmethylsterols; 8, diglycerides; 9, monoglycerides; 10, complex lipids.

[2-¹⁴C] mevalonate, New England Nuclear) を加えた反応溶液 1.0 ml を 37℃ で 3 時間インキュベートした後、0.2% ピロガロール、15% KOH を含む 90% エタノール溶液 1.0 ml を加え反応を停止し、80℃ で 30 分間ケン化を行った。ついで、不ケン化物は 2.0 ml の石油エーテルで 2 回抽出し、等量の蒸留水で洗浄後、N₂ ガス気流下において溶媒を除去した。これに少量のクロホルム-メタノール (6 : 1, v/v) を加えた溶液を前述の TLC による分析に供した。薬物の添加は DMSO に溶解して行い、DMSO の最終濃度は 0.05% とした。なお、スクワレンエポキシドの標品は小野輝夫教授 (新潟大学医学部生化学) より供与された。

結 果

[¹⁴C] 酢酸の脂質画分への取り込み

Fig. 2 は TLC による中性脂質分離後のラジオオートグラムを、Table 1 は [¹⁴C] 酢酸の脂質画分への取り込みの割合を示したものである。対照では総放射活性の 90% 以上がリン脂質と遊離ステロール画分に取り込まれ、モノグリセリド、ジグリセリド、遊離脂肪酸、トリグリセリド、スクワレンおよびステロールエステル画分にはそれぞれ 1% 程度が取り込まれたにすぎない。一方ナフチオメート T 添加による影響は 10⁻⁶ M 濃度より観察され、スクワレン画分への取り込みの上昇に伴う遊離ステロール画分への取り込みの減少が認められる。この傾向はエルゴステロールに代表されるデスメチルステロール画分において最も顕著であり 10⁻⁵ M 濃度では、スクワレン画分が 1.4 から 7.7% に上昇するのに対して、デスメチルステロール画分では 15.6 から 10.0% に減少した。トリメチルステロール画分 (主にラノステロール) においても若干の減少が認められたが、ジメチルステロール画分では変化は認め

られなかった。トリグリセリド画分における若干の上昇が観察されたが、モノグリセリド画分ではむしろ減少傾向が認められ、ナフチオメート T の脂質代謝に及ぼす作用はステロール代謝に限定しているものと考えられる。ところで Fig. 2 において認められるスポット 4 は、Liebermann-Burchard 反応¹⁹⁾により呈色することからステロール化合物と考えられるが同定されてい

Fig. 3. Gas-liquid chromatograms of sterol components of *C. albicans* cells incubated for 4 hrs with and without 10⁻⁵M naphthiomate. Peak 1: squalene, 2: ergosterol, 3: 4,14-dimethylzymosterol, 4: lanosterol.

Table 1. Effects of Naphthiomate T on the [¹⁴C] acetate incorporation into lipids by *C. albicans* IFO 1060^{a)}

Naphthiomate T		Radioactivity incorporated (%) ^{b)}								
(M)	Complex lipids	MG	DG	Desmethyl-sterols	Dimethyl-sterols	Trimethyl-sterols	FFA	TG	SE	Unknown
0	76.8	0.8	1.8	15.6	0.7	0.6	0.6	0.8	1.4	1.0
10 ⁻⁷	75.3	0.9	1.8	15.6	0.5	0.4	0.4	1.4	1.4	2.2
10 ⁻⁶	75.6	0.6	1.5	12.3	0.6	0.3	0.6	1.3	4.9	2.4
10 ⁻⁵	75.9	0.4	1.4	10.0	0.6	0.2	0.6	1.2	7.7	2.0

a) Naphthiomate T and [¹⁴C] acetate were added to the cultures after 6 hr of growth and cells were collected after 4 hr of incubation.
b) Total radioactivity found in lipid extract was taken as 100%. The results presented are the means from 2 different experiments. MG, monoglyceride; DG, diglyceride; FFA, free fatty acids; TG, triglyceride; SE, sterol ester and squalene.

ない。ナフチオメートTの添加により、 10^{-7} M以上の濃度ではこの画分への取り込みの上昇が認められたが、濃度依存性はみられなかった。Fig. 3は 10^{-5} M濃

度のナフチオメートTを4時間作用させた時のステロールパターンを示す。エルゴステロール(ピーク2)の他に、スクワレン(ピーク1), 4, 14-ジメチルザイモステロール(ピーク3), ラノステロール(ピーク4)が観察されるが、相当量比においても明らかにスクワレンの蓄積が認められる。

無細胞抽出系における $[^{14}\text{C}]$ メバロン酸のステロール画分への取り込み

Fig. 4はTLCによるステロール化合物分離後のラジオオートグラムを、Table 2は $[^{14}\text{C}]$ メバロン酸のステロール画分への取り込みの割合を示したものである。全細胞の場合において認められたナフチオメートTによるスクワレンの異常蓄積は無細胞抽出系においても認められ、対照では放射活性の23.8%がデスメチルステロール画分へ、12.5%がスクワレン画分へ取り込まれたのに対し、 5×10^{-5} MのナフチオメートT添加では、デスメチルステロール画分への取り込みは4.5%と減少する一方、スクワレン画分への取り込みは

Fig. 4. Effect of naphthiomate T on $[^{14}\text{C}]$ -mevalonate incorporation into sterols and its precursors in *C. albicans* cell free system. Autoradiograph of labeled unsaponifiable lipids separated by thin layer chromatography.

A: control, B: 5×10^{-5} M naphthiomate T, C: 5×10^{-5} M naftifine, D: 5×10^{-7} M miconazole.

1: squalene, 2: squalene epoxide, 3: trimethylsterols, 4: dimethylsterols, 5: desmethylsterols.

Table 2 Effects of Naphthiomate T on $[^{14}\text{C}]$ mevalonate incorporation into sterols and its precursors in *C. albicans* cell free system

Treatment	Radioactivity incorporated ^{a)}				
	Squalene	Squalene epoxide	Trimethylsterols	Dimethylsterols	Desmethylsterols
Control	12.5	3.1	29.7	30.8	23.8
Naphthiomate T					
5.0×10^{-7} M	14.1	3.5	34.3	29.0	19.0
5.0×10^{-5} M	57.2	3.4	19.7	15.4	4.5
Naftifine					
5.0×10^{-7} M	13.4	3.3	40.0	24.8	18.4
5.0×10^{-5} M	54.6	3.3	21.5	15.3	5.2
Miconazole					
5.0×10^{-7} M	27.9	4.5	28.2	20.2	9.2
5.0×10^{-5} M	16.6	3.8	63.6	10.1	5.9

a) Total radioactivity found in sterols and its precursors was taken as 100%. The results presented are the means from 2 different experiments.

Fig. 5. Biosynthetic pathway of ergosterol and inhibition site of naphthiomate T or miconazole in *C. albicans*¹⁷⁾. Solid lines show the main pathway of ergosterol biosynthesis and broken lines show the alternate pathway.

57.2%と著しい上昇を示した。さらに、スクワレンエポキシドへの放射活性の蓄積が認められないこと、またすでに Ryder ら¹⁴⁻¹⁶⁾によってスクワレンエポキシダーゼ阻害作用が明らかにされているナフチフィンと全く同様の傾向が認められていることから、ナフチオメート T はミコナゾールなどの 14-C 脱メチル化反応阻害を示すイミダゾール系化合物とは異なり、スクワレン→スクワレンエポキシドへの生成経路、すなわちスクワレンエポキシダーゼの阻害作用によってスクワレンの異常蓄積をもたらすものと考えられる。*C. albicans* におけるエルゴステロールの生合成経路を Fig. 5 に一括して示すが、矢印で示したようにミコナゾールをはじめとする一連のイミダゾール系化合物が 14-C 脱メチル化反応を阻害するのに対し、ナフチオメート T はナフチフィンと同様にスクワレンエポキシダーゼ反応を阻害することによりエルゴステロール合成阻害作用を発現するものと考えられる。

考 察

本実験によって、ナフチオメート T の脂質代謝におよぼす主作用はステロール代謝において発現され、全細胞で観察されたスクワレンの異常蓄積は無細胞系の放射標識実験によっても同様に観察され、スクワレンエポキシダーゼ阻害によりステロール合成抑制が起ることが明らかにされた。著者らは、すでに *C. albicans*

と *T. mentagrophytes* の全細胞においてナフチオメート T のステロール代謝におよぼす影響を検討し、*T. mentagrophytes* において、より強く作用することを見出ししている¹⁷⁾。事実、*in vitro* における抗菌試験の結果、さらには臨床使用の経験から、ナフチオメート T が皮膚糸状菌に強い抗菌活性を示すのに対し、*C. albicans* をはじめとする酵母様真菌にはほとんど効果がないことが指摘されている。また、Ryder ら¹⁴⁻¹⁶⁾もアリルアミン系化合物であるナフチフィンや SF 86-327 が、スクワレンエポキシダーゼ阻害作用を有することを明らかにするとともに、これらの抗菌活性は酵母に比べ皮膚糸状菌に対しより強い作用を発揮することを報告している。これらの原因として、薬物の膜透過性、スクワレンエポキシダーゼに対する感受性、また蓄積したスクワレンに対する抵抗性の相異が推測されるが、今後の詳細な検討が必要とされる。

文 献

- 1) Iwata, K. and Yamaguchi, H.: Mode of action of clotrimazole. *Sabouraudia*, 11: 158-166, 1973.
- 2) Yamaguchi, H. and Iwata, K.: Effect of fatty acyl group and sterol composition on sensitivity of lecithin liposomes to imidazole antimycotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 15: 706-711, 1979.

- 3) Portillo, F. and Gancedo, C.: Mode of action of miconazole on yeast: Inhibition of mitochondrial ATPase. *Eur. J. Biochem.*, **143**: 273—276, 1984.
- 4) Uno, J., Shigematsu, M. and Arai, T.: Primary site of action of ketoconazole on *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**: 912—918, 1982.
- 5) Van den Bossche, H., Willemsens, G., Cools, W., Lauwers, W. and LeJeune, L.: Biochemical effects of miconazole on fungi. II. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Chem. Biol. Interactions*, **71**: 59—78, 1978.
- 6) Van den Bossche, H., Willemsens, G., Marichal, P. and Lauwers, W.: The molecular basis for the antifungal activities of *N*-substituted azole derivatives. Focus on R-51211. Symposium of British Mycological Society, Mode of Action of Agents, 321—341, 1984.
- 7) Van den Bossche, H., Willemsens, G., Colls, W., Cornelissen, F., Lauwers, W. and Van Cutsem, J.M.: *In vitro* and *vivo* effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**: 922—928, 1980.
- 8) Pye, G.W. and Marriot, M.S.: Inhibition of sterol C-14 demethylation by imidazole-containing antifungals. *Sabouraudia*, **20**: 325—329, 1982.
- 9) Van den Bossche, H., Lauwers, W., Willemsens, G., Marichal, P., Cornelissen, F. and Cools, W.: Molecular basis for the antimycotic and antibacterial activity of *N*-substituted imidazoles and triazoles. The inhibition of isoprenoid biosynthesis. *Pestic. Sci.*, **15**: 188—198, 1984.
- 10) Sud, I.D. and Feingold, D.S.: Mechanisms of action of the antimycotic imidazoles. *J. Invest. Dermatol.*, **76**: 438—441, 1981.
- 11) Marriot, M.S.: Inhibition of sterol biosynthesis in *Candida albicans* by imidazole-containing antifungals. *J. Gen. Microbiol.*, **117**: 253—255, 1980.
- 12) Yoshida, Y. and Aoyama, Y.: Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -demethylation. I. Purification and spectral properties. *J. Biol. Chem.*, **259**: 1655—1660, 1984.
- 13) Aoyama, Y. and Yoshida, Y.: Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450_{14DM} and by intact microsomes. *J. Biol. Chem.*, **259**: 1661—1666, 1984.
- 14) Petranyi, G., Ryder, N.S. and Stütz, A.: Allylamine derivatives: New class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. *Science*, **24**: 1239—1241, 1984.
- 15) Ryder, N.S., Seidl, G. and Troke, P.: Effect of the antimycotic drug naftifine on growth of and sterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**: 483—487, 1984.
- 16) Ryder, N.S.: Specific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF 86-327, a allylamine antimycotic agent. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**: 252—256, 1985.
- 17) Morita, T. and Nozawa, Y.: Effects of antifungal agents on ergosterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*: Differential inhibitory site of naphthiomate and miconazole. *J. Invest. Dermatol.*, in press.
- 18) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.*, **37**: 911—916, 1959.
- 19) Zurkowski, P.: A rapid method for cholesterol determination with a single reagent. *Clin. Chem.*, **10**: 451—453, 1964.
- 20) 森田達也, 柳沼英哉, 小瀬木幸司, 関谷 考, 坂野喜子, 野沢義則: *Candida albicans* の形質膜の分離・精製とその生化学的性状. *真菌誌*, **26**: 87—95, 1985.
- 21) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265—275, 1951.
- 22) Kato, T. and Kawase, Y.: Selective inhibition of demethylation at C-14 in ergosterol biosynthesis by the fungicide, Denmart (S-1358). *Agr. Biol. Chem.*, **40**: 2379—2388, 1976.

Mechanism of Action of Naphthiomate T, a Thiocarbamate Antimycotic Drug: Inhibition of Squalene Epoxidase

Tatsuya Morita and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Tsukasamachi-40, Gifu 500, Japan

Effect of naphthiomate T, an antimycotic drug of thiocarbamate derivatives on sterol biosynthesis has been investigated in the whole cell and the cell free systems of *C. albicans*. Naphthiomate T was found to interfere with fungal ergosterol biosynthesis by inhibition of the conversion of squalene into squalene epoxide which is mediated by squalene epoxidase.