Aspergillus flavus が産生するエラスターゼとエラスターゼインヒビターに関する研究

二 改 俊 章

Studies on Elastase and Elastase Inhibitor from *Aspergillus flavus*

Toshiaki Nikai

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University;
150 Ygotoyama, Tenpaku-Ku, Nagoya 468-8503, Japan.

(Received August 15, 2020)

The biological properties of elastase and *Aspergillus flavus* elastase inhibitor (AFLEI) from *A. flavus* were examined. Pathogenicity of elastase was investigated in mice immunocompromised with cyclophosphamide, cyclosporine, prednisolone and carrageenan. Compared to cyclophosphamide immunocompromised mice treated with the spores of elastase nonproducing strain, cyclophosphamide immunocompromised mice treated with the spores of elastase producing strain had a significantly shorter survival rate. Molecular mass of AFLEI was determined to be 7525.8 Da. The elastolytic activity of elastases from *A. flavus*, and human leukocytes were inhibited by AFLEI. The primary structure of AFLEI was determined by the Edman sequencing procedure. The search for amino acid homology with other proteins demonstrated that amino acid residues 1 to 68 of AFLEI are 100% identical to residues 20 to 87 of the hypothetical protein AFUA_3G14940 of *A. fumigatus*. When immunocompromised mice administered of cyclophosphamide were infected by inhalation of *A. flavus* then administered amphotericin B (AMPH) alone or in combination with AFLEI, survival rate tended to be higher with combination treatment than with AMPH alone. Moreover, although extensive bleeding was seen in pathology sections taken from rat lung resected 24 h after elastase was administered to the lung *via* the bronchus, this bleeding was inhibited by AFLEI. The X-ray analysis has revealed that the structure of this inhibitor was wedge shaped and composed of a binding loop and a scaffold protein core. As synthetic-inhibitor strongly inhibited cytotoxicity induced by elastase in human-derived cells, it could prove beneficial for the treatment of pulmonary aspergillosis.

Key words—aspergillus; elastase; pathogenicity; elastase inhibitor; primary structure; synthetic *Aspergillus fumigatus* elastase inhibitor (AFUEI)

1. はじめに

筆者はこれまで、1. アスペルギルス属由来の病原因子とその阻害因子、¹⁻⁶⁾ 2. 蛇毒及びトカゲ毒の生物活性因子の構造と機能、⁷⁻¹²⁾ 3. 科学的根拠に基づく感染防御、¹³⁾ 4. 非結核性抗酸菌症の病態とその制御、^{14,15)} 5. サルモネラ症の病原因子の解析と治療^{16,17)} について研究を遂行してきた。本稿では筆者が教授就任後開始したアスペルギルス症における原因菌が産生する病原因子の1つとされるエラスターゼ及び本疾患の治療に役立つ可能性が示唆された新規エラスターゼ阻害因子について *Aspergillus flavus*

を中心に述べる。

肺アスペルギルス症は、宿主の免疫状態に応じて多彩な病態を呈し、侵襲性肺アスペルギルス症、肺アスペルギローマ、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (allergic bronchopulmonary aspergillosis; ABPA) に分類され、ABPA、肺アスペルギローマは全身的な免疫不全がなくとも発症する。肺アスペルギルス症として最も重要なのは侵襲性肺アスペルギルス症である。¹⁸⁾ 菌側の発症因子としては、肺組織の約28%がエラスチンで占められていることから、エラスチン分解酵素であるエラスターゼが肺組織を破壊することで血痰、咯血を引き起こすため、肺アスペルギルス症の病原因子として有力であると考えられてきた。侵襲性肺アスペルギルス症は、重度の基礎疾患を有する免疫抑制又は入院患者で増加している。¹⁹⁾ 侵襲性肺アスペルギルス症は、主に好

名城大学薬学部微生物学研究室 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150)

e-mail: nikai@ccalumni.meijo-u.ac.jp

本総説は、2019年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Table 1. Comparison of Biological Properties of Elastolytic Proteinases from *A. flavus* (AFLE), *A. fumigatus* (AFUE), *A. nidulans* (ANIE) and *A. oryzae* (Asorylase)

Biological properties	AFLE	AFUE	ANIE	Asorylase
Molecular mass (Da)	40000	32000	33800	35000
pI	8.6	9.1	4.2	6.4
Optimum pH	8.5	7.5	7.5	8.5
Optimum temperature (°C)	37	37	45	37
Inhibitor	EDTA DFP leupeptin	NBS DFP leupeptin	APMSF NBS PCMB EGTA	NBS EDTA EGTA
Fibrinogenase activity	A α , B β , γ	A α , B β , γ	A α , B β	A α
Collagenase activity	I, III, IV	I, II, III, IV	I, III, IV	I, III, IV

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, DFP: diisopropylfluorophosphate, NBS: *N*-bromosuccinimide, APMSF: *p*-aminodiphenyl methanesulfonyl fluoride, PCMB: *p*-chloromercuribenzoic acid, EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid.

中球減少症, 血液悪性腫瘍, 同種骨髄移植, 固形臓器移植, 固形がん, human immunodeficiency virus (HIV) 感染などの危険因子のある患者に発生すると考えられている.²⁰⁾ 筆者らは *A. flavus* 及び *A. fumigatus* について, これら 2 種の真菌が病原性に関連するエラスターゼの *A. flavus* elastase (AFLE), *A. fumigatus* elastase (AFUE) を産生し, さらに, エラスターゼ阻害因子も産生していることを発見し, *A. flavus* 及び *A. fumigatus* の培養上清からエラスターゼ阻害因子を単離し, それぞれを *A. flavus* elastase inhibitor (AFLEI),²⁾ *A. fumigatus* elastase inhibitor (AFUEI)⁶⁾ と命名した.

深在性真菌症の真菌側の病原因子としては, マイコトキシン, プロテアーゼなどが報告²¹⁻²⁴⁾ されているが, なかでもエラスターゼが感染成立の要因として重要な役割を果たしていることはエラスターゼ産生株と非産生株を用いた Kothary ら²¹⁾ の免疫不全マウスによる実験モデルの死亡例や肺の病理的变化からも示唆されている. また, Blanco ら²⁴⁾ はエラスターゼが病原性に係わりがあることを報告している.

共同研究者の小川ら^{25,26)} はアスペルギルス症の患者由来の *A. flavus* 及び *A. fumigatus* がエラスターゼを産生していることから, 咯血や血痰を繰り返すアスペルギルス症の患者に対して多価酵素阻害剤であるウリナスタチンの投与により, 抗真菌剤のみの治療より短期間に咯血や血痰の消失を認めたことを報告した. このような知見から, エラスターゼを阻害することによりアスペルギルス症に対する治療効果が期待できるのではないかと考えた.

2. *A. flavus* の産生する病原因子としてのエラスターゼに関する検討⁴⁾

2-1. *A. flavus* よりエラスターゼの精製

Yeast carbon base (YCB)-エラスチン培地 (1% YCB と 1% エラスチンを含む液体培地) に potato dextrose agar (PDA) 斜面培地で継代培養した *A. flavus* の分生子を植菌し, 振とう培養した後, 培養ろ液を Hasegawa ら²⁷⁾ の方法に従ってエラスターゼを精製した (AFLE). また, *A. fumigatus* の産生するエラスターゼ (AFUE) も同様に精製を行った.²⁸⁾ エラスターゼ活性は工藤の方法²⁹⁾ に準拠した. 基質は Suc-Ala-Ala-Ala-pNA (STANA) 又は Glt-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA (GAAPLNA) を用いた.

2-2. 各種アスペルギルス由来の精製エラスターゼの生物学的性質

アスペルギルス症の主な原因菌種であり, 病原性の強い *A. flavus* 由来のエラスターゼの AFLE, *A. fumigatus* 由来のエラスターゼの AFUE と, 病原性の低い *A. nidulans* 由来のエラスターゼの *A. nidulans* elastase (ANIE)³⁰⁾ 及び日本酒や味噌, 醤油などに多く利用される *A. oryzae* 由来のエラスターゼの *A. oryzae* elastase (AORE)³¹⁾ の生物学的性質について比較・検討を行った (Table 1). 病原性の強い AFLE (777.4 units/mg) や AFUE (569.8 units/mg) は, GAAPLNA を基質としたエラスターゼ活性が強いのにに対し, AORE では, その活性 (76.6 units/mg) はかなり弱かった. また, AFLE や AFUE が塩基性タンパク質であるのに対して, 等電点は ANIE が 4.2, AORE は 6.4 の酸性タンパク質であった. 塩基性タンパク質は細胞に付着し易いため, 細胞に作用し易く, 病原性が

高くなると考えられた。

フィブリノーゲン水解活性を比較すると、AFUEやAFLEが γ 鎖を水解するのに対し、その他のエラスターゼでは γ 鎖を水解するものはなかった。さらに、これら酵素は生体内に含まれるタンパク質であるコラーゲンに対して強い水解作用を示した。特にコラーゲン Type IV は血管や肺胞基底膜を構成する主成分であり、病理的所見における出血はこれら基底膜の傷害によって起こることが考えられ、感染局所において傷害作用を示し、感染の一因子として *A. flavus* が示す組織侵襲や炎症などの病原性となんらかの関連があると考えられた。一方、60°Cで失活する易熱性タンパク質、分子質量や至適 pH、GAAPLNA に対し基質特異性があることなど、共通する性質もあった。AFLE 以外のエラスターゼは *N*-bromosuccinimide (NBS) によって阻害されたことから、その活性発現にはトリプトファン残基が、また AFLE、AFUE 及び ANIE は diisopropylfluorophosphate (DFP) 又は *p*-amidinophenyl methanesulfonyl fluoride (APMSF) で阻害されたことより活性発現に Ser 残基が関与することが考えられた。

3. エラスターゼ産生株及び非産生株の免疫抑制マウスに対する病原性の比較

シクロホスファミド、シクロスポリン、プレドニゾロン、又はカラゲナンにより免疫抑制したマウスに *A. flavus* のエラスターゼ産生株と非産生株の分生子を吸引させ、その病原性の違いを調べた結果、Fig. 1 に示す結果が得られた。⁴⁾ シクロホスファミドによる免疫抑制マウスに対して本酵素産生株は2日目で90%が死亡するという強い病原性を示した。非産生株でも14日目までに40%が死亡した。プレドニゾロン投与群では本酵素産生株では3日目までに40%が死亡した。一方、シクロスポリンとカラゲナン群では本酵素の産生株と非産生株ともに死亡は認められなかった。病理組織像からエラスターゼ産生株の感染により死亡したマウスの肺はコントロールの肺と比較して明らかに充血していると同時に、菌の存在がいたるところに認められた。Kaplan-Meier 法により生存率を求め、Logrank 検定を行ったところ、シクロホスファミドあるいはプレドニゾロンで前処理した場合、エラスターゼ産生株と非産生株における生存率は危険率5%で有意差があることが認められた。

Fig. 1. Survival Curves of Immunocompromised Mice Infected by Inhalation of Spores of Elastase Producing Strain and Nonproducing Strain of *A. flavus*

Animals were observed daily for 15 d or until death and were treated with 0.2 mg/g of cyclophosphamide, prednisolone, carrageenan and 0.02 mg/g of cyclosporine. Ten immunocompromised mice were used in each condition. Reproduced with permission from *Meijo Daigaku Sogo Kenkyusho Sogo Gakujutsu Kenkyu Ronbun Shu* No. 6 Pages 145–152. Copyright 2007 Meijo University.

シクロホスファミド処理された群はカラゲナン、シクロスポリン、プレドニゾロンの各群と比較して生存率が低かったが、シクロホスファミドは主に好中球を減少させ、カラゲナンはマクロファージ機能を抑制し、シクロスポリンと副腎皮質ホルモンは主にリンパ球を抑制することから、本菌の気道感染防御には好中球の関与が考えられた。エラスターゼ産生株に感染したプレドニゾロン処理マウスに死亡を認めたのは、副腎皮質ホルモンが好中球の遊走阻止作用を持つためと思われる。エラスターゼ産生株と非産生株をシクロホスファミドあるいはプレドニゾロンで前処理したマウスに吸入させた場合、本酵素

産生株の生存率が非産生株を吸入させたマウスに比べ有意に低かったことにより、感染症の発症・進展に本酵素の関与する可能性が示唆された。しかし、シクロホスファミドでは非産生株においても生存率が60%であることから、エラスターゼ以外の要因も関与すると考えられた。³²⁻³⁴⁾

4. *Aspergillus* 属のエラスターゼ阻害因子の産生能に関する検討

A. flavus の産生するエラスターゼの病原性への関連性を調べるためにエラスチンを窒素源とした液体培地で培養を行ったところ、培養上清のエラスターゼ活性が急に低下する時期があることに気付いた。エラスターゼ活性が低下する理由として *A. flavus* がエラスターゼ阻害因子を産生しているのではないかと推測したので、この阻害因子の生物学的性質について調べた。

4-1. 各種菌株のエラスターゼ及びエラスターゼ阻害因子の産生能¹⁾ 臨床分離株 19 株 (*A. fumigatus* 13 株, *A. flavus* 3 株, *A. niger* 3 株) を YCB-エラスチン培地で 12 日間培養し、培養上清の STANA 水解活性の変化を調べた。その結果、*A. fumigatus* 9 株, *A. flavus* 3 株に 1 unit/mL 以上のエラスターゼ活性を認めた。同様に臨床分離株 19 株を YCB-カザミノ酸培地 (1% YCB と 1% カザミノ酸を含む液体培地) で 7 日間培養し、培養上清のエラスターゼ阻害活性の変化について STANA を基質として調べた。その結果、*A. fumigatus* 8 株, *A. flavus* 3 株にエラスターゼ阻害活性を認めた。

エラスターゼ活性とエラスターゼ阻害活性の特に強かった *A. flavus* の AFL-1 株を用いて YCB-エラスチン培地で培養し、その培養上清中のエラスターゼ活性とエラスターゼ阻害活性について調べたところ、エラスターゼ活性の低下した 5-7 日目と 12 日目に阻害活性を認めた (Fig. 2).³⁵⁾ エラスターゼ活性の低下した培養時期にエラスターゼ阻害活性を認めたことから、エラスターゼ阻害因子は自己防御としての役割があると推測している。

4-2. 培養上清中のエラスターゼ阻害因子の性質

エラスターゼ阻害因子のスクリーニングの結果、エラスターゼ阻害活性が 2 units/mL 以上ある *A. fumigatus* 6 株と *A. flavus* 2 株の 7 日目の培養上清の耐熱性を調べた。すべての株の培養上清のエラスターゼ阻害活性は熱に安定であった。ブタ膵臓由来

Fig. 2. Elastolytic and Elastase Inhibitory Activities of Culture Filtrates from *A. flavus*

Reproduced with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 47 No. 3 Pages 171-178. Copyright 2006 The Japanese Society for Medical Mycology.

Table 2. Inhibitory Effect of Culture Supernatant from *Aspergillus* on Porcine Pancreas and Human Leukocytes Elastases

Culture supernatant from <i>Aspergillus</i>	Inhibitory activity (%)	
	Elastase from porcine pancreas	Elastase from human leukocytes
AFU-2	0	52.2
AFU-3	0	36.8
AFU-5	0	0
AFU-6	12.1	23.9
AFU-9	11.1	33.6
AFU-12	6.5	54.6
AFL-1	0	27.4
AFL-2	0	15.0

AFU: *A. fumigatus*, AFL: *A. flavus*. Reproduced in part with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 47 No. 3 Pages 171-178. Copyright 2006 The Japanese Society for Medical Mycology.

エラスターゼとヒト好中球由来のエラスターゼに対しての阻害活性を調べたところ 7 株の培養上清はヒト好中球由来のエラスターゼにも阻害作用を示すことがわかった (Table 2).³⁵⁾ しかしながら、ブタ膵臓由来エラスターゼには阻害作用をほとんど示さなかった。

ヒト好中球エラスターゼとブタ膵臓エラスターゼはともに活性に Ser, Asp, His が関与しているセリンプロテアーゼであるが、相同性は約 40% のため活性中心以外の配列の違いにより阻害活性に差が生じたと推測している。

Fig. 3. Column Chromatographies of Culture Filtrate from *A. flavus*

A: DE-52 cellulose column chromatography. B: Sephadex G-75 column chromatography. Reproduced in part with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 47 No. 3 Pages 219–224. Copyright 2006 The Japanese Society for Medical Mycology.

5. *A. flavus* AFL-1 株よりのエラスターゼ阻害因子の精製とその性質

5-1. エラスターゼ阻害因子 (AFLEI) の精製²⁾

YCB-カザミノ酸培地で7日間培養した培養液を DE-52 cellulose にアプライし、素通り画分を溶出後、塩化ナトリウム濃度を 0.5 M まで直線的に上昇させたところ、エラスターゼ阻害活性は試験管番号 170–190 に認められた [Fig. 3(A)]. この画分を凍結乾燥により濃縮し、Sephadex G-75 にアプライしたところ、エラスターゼ阻害活性は試験管番号 118–130 に認められた [Fig. 3(B)]. この画分はポリアクリルアミドを支持体とした pH 8.3 ゲルのディスク電気泳動と等電点電気泳動により単一なバンドが得られたので、これを最終標品とし、AFLEI と命名した。AFLEI の分子質量は matrix assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry (MALDI/TOF-MS) により、7525.8 Da、等電点 7.4 の糖を含まないタンパク質であった。AFLEI は 80°C、10 分の加熱により阻害

Table 3. Effects of Various Inhibitors on AFLEI

Inhibitor	Final concentration	Residual activity (%)
None	—	100.0
α_2 -macroglobulin	1 mg/mL	41.0
EDTA	10 mM	82.5
SBTI	5 mg/mL	92.6
Chymostatin	0.1 mg/mL	100.0
DTT	5 mM	0
Benamidine	5 mM	99.7

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SBTI: soybean trypsin inhibitor, DTT: dithiothreitol. Reproduced in part with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 47 No. 3 Pages 219–224. Copyright 2006 The Japanese Society for Medical Mycology.

活性が約 50% 残存し、耐熱性であり、pH 3–12 の範囲で安定であった。

5-2. 各種阻害剤による影響²⁾ AFLEI に各種阻害剤を加え、37°C で 15 分間保温した後、常法に従って阻害活性を測定した (Table 3). その結果、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), soy bean trypsin inhibitor (SBTI), キモスタチン, ベンザミジンではほとんど阻害されなかったが、 α_2 -マクログロブリンで約 60% 阻害された。Dithiothreitol (DTT) により阻害されたことより、阻害活性発現にジスルフィド結合が重要であることがわかった。

5-3. 各種プロテイナーゼに対する阻害活性²⁾

AFLEI の各種プロテイナーゼに対する阻害活性を調べた結果を Table 4 に示した。AFLEI は *A. flavus*, *A. fumigatus* 及びヒト好中球由来のエラスターゼに対して強い阻害活性を示した。また、*A. flavus* 由来エラスターゼのフィブリノーゲン水解活性とコラーゲン水解活性を阻害した。しかし、ブタ膵臓エラスターゼへの阻害活性は弱かった。さらに、緑膿菌³⁶⁾と表皮ブドウ球菌のプロテイナーゼを阻害せず、蛇毒の Ac_1 -Proteinase,^{37–39)} トリプシン、キモトリプシン及びトロンビンに対しての阻害活性は弱かった。

5-4. 各種酵素阻害剤との比較³⁾ AFLEI と現在臨床で使用されている酵素阻害剤 4 種類 (ウリナスタチン, メシル酸ナファモスタット, シベレスタットナトリウム, メシル酸ガベキサート) 及び研究用試薬であるエラスターゼ阻害因子の elastatinal と elafin との阻害活性の比較を行った (Table 5). ウリナスタチン, メシル酸ナファモスタット, シベレスタットナトリウム, メシル酸ガベキサートの

Table 4. Inhibitory Activity on Some Elastases and Proteinases of AFLEI

Elastase and Proteinase	Inhibitory activity (%)
Purified elastase from <i>A. flavus</i>	100.0
Purified elastase from <i>A. fumigatus</i>	96.1
Purified elastase from human leukocytes	72.8
Purified elastase from porcine pancreas	5.5
Fibrinogenase activity of elastase from <i>A. flavus</i>	+
Fibrinogenase activity of elastase from <i>A. fumigatus</i>	+
Collagenase activity of elastase from <i>A. flavus</i>	+
Collagenase activity of elastase from <i>A. fumigatus</i>	+
Alkaline proteinase from <i>P. aeruginosa</i>	0
Ac ₁ -Proteinase from <i>Agkistrodon acutus</i>	22.3
Proteinase from <i>S. epidermidis</i>	0
Trypsin	10.2
Chymotrypsin	20.0
Thrombin	—

+: inhibition, —: no inhibition. Reproduced in part with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 47 No. 3 Pages 219–224. Copyright 2006 The Japanese Society for Medical Mycology.

Table 5. Effects of Various Inhibitors on *A. flavus*, Human Leukocytes and Porcine Pancreas Elastases

Inhibitor	Elastase		
	<i>A. flavus</i>	Human leukocytes	Porcine pancreas
	(μg, 50% inhibitory dose)		
AFLEI	0.25	0.29	>0.43
Ulinastatin	>830	96.34	>830
Nafamostat mesilate	>100	>100	>100
Sivelestat sodium hydrate	>500	0.67	63.13
Gabexate mesilate	1707.65	>2500	>2500
Elastatinal	>125	>125	7.14
Elafin	44.06	8.84	14.45

Reproduced with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 48 No. 1 Pages 13–18. Copyright 2007 The Japanese Society for Medical Mycology.

AFLEI に対する阻害作用は AFLEI と比較して非常に弱く、それぞれ AFLEI が阻害する量の 3320 倍以上、400 倍以上、2000 倍以上、6830 倍の量が必要であった。ヒト好中球エラスターゼに対しても同様で、それぞれ AFLEI の 330 倍、340 倍以上、2 倍、8620 倍以上の量が必要であった。これらの結果から、AFLEI は *A. flavus* とヒト好中球のエラスターゼに対して臨床で使用されている酵素阻害剤よりも強い阻害活性を示すことがわかった。

5-5. アミノ酸配列分析³⁾ AFLEI のアミノ酸

配列は、61 残基目まで決定し [Fig. 4(A)], 次に AFLEI を endoproteinase Arg-C で処理して逆相系 HPLC により分離した結果、ピーク R-1 から 1(D)–30(Q) と 46(E)–68(A) 番目のアミノ酸配列が検出された [Fig. 4(B)]. このことから 5 残基目と 67 残基目の C はジスルフィド結合していることがわかった [Fig. 4(C)]. これにより AFLEI の一次構造が決定され、AFUEI についても同様に構造決定を行ったところ、AFLEI と同じアミノ酸配列⁶⁾であった。総アミノ酸残基数が 68 個 (分子量: 7526.2 Da) で、トリプトファンは存在しなかった。新規エラスターゼ阻害因子の AFLEI と AFUEI の一次構造は、Nierman ら⁴⁰⁾が報告した *A. fumigatus* 由来 AFUA_3G14940 (hypothetical protein) の 20–87 残基と同じ配列であることからその一部と考えられ、AFLEI と AFUEI をコードする遺伝子は AFUA_3G14940 と同じであると推定される。

さらに、奥村ら⁴¹⁾は *A. flavus* と *A. fumigatus* 以外の菌種もエラスターゼ阻害因子を産生している可能性を見出し、その中で *A. nidulans* よりエラスターゼ阻害因子の *A. nidulans* elastase inhibitor (Asnidin) を精製し、その性質と部分一次構造について報告した。AFLEI と Asnidin の生物学的性質について比較した (Table 6)。Asnidin の N 末端から 27 残基の部分アミノ酸配列を決定したところ、この配列は、*A. nidulans* FGSC A4⁴²⁾ の細胞壁のシステインに富むタンパク質の残基 140–166 と一致し (GenBank: CBF80768.1)、その分子量は Asnidin の分子量 (4181.63 Da) と一致しているため、Asnidin は *A. nidulans* FGSC A4 の細胞壁のシステインに富むタンパク質の一部であると考えられる。

6. *A. flavus* 感染マウスに対するエラスターゼ阻害因子の有用性の検討⁵⁾

6-1. 実験的吸入感染に対する AFLEI の投与方法の検討

エラスターゼ阻害因子の有用性を調べるため、肺アスペルギルス症病態モデルマウスの作製と AFLEI の投与方法を検討した。肺アスペルギルス症病態モデルマウスはマウスに菌を吸入させる 6 日前から 1 日おきに 3 回、1 回当たりシクロホスファミド 100 mg/kg を腹腔内へ投与し、最後にシクロホスファミドを投与した 2 日後に *A. flavus* の分生子を 1 分間感染させた。その結果、マウスは段

Fig. 4. Primary Structure of AFLEI

A: Amino acid sequence of AFLEI. B: Fractionation by reversed-phase HPLC of the peptides obtained by clostripain cleavage of native AFLEI. Column, Develosil 300 ODS-7 column (0.46 × 25 cm). Solvent A, 0.1% TFA in H₂O; solvent B, 0.1% TFA in acetonitrile. Flow rate, 1.0 mL/min. Elution with a linear gradient from 0 to 100% in solvent B over 20 min. C: Amino acid sequence of R-1. Reproduced in part with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 48 No. 1 Pages 13–18. Copyright 2007 The Japanese Society for Medical Mycology.

階的に死亡したため、この方法を採用した。AFLEI の投与量については、免疫抑制マウスの尾静脈から 0.1 mg/kg と 0.5 mg/kg を単回投与して観察したが、どちらも異常を認めなかったため、0.5 mg/kg を投与することにした。また、感染後 1 日目から死亡していくため、AFLEI とアムホテリシン B (amphotericin B; AMPH) は *A. flavus* の感染時に投与した。

6-2. エラスターゼ阻害因子の効果 シクロホスファミドにより免疫抑制したマウスに *A. flavus* の分生子を吸引させ、AFLEI の効果を調べた。AFLEI と AMPH を投与していないマウスは 1 日目の生存率が 80% で、2 日目で 30% となり 3 日目

にはすべて死亡した。抗真菌剤の AMPH を 0.5 mg/kg 投与しても同様な生存率であった。AMPH の 0.5 mg/kg と AFLEI 0.5 mg/kg を併用すると 1 日目の生存率は 100%、2 日目で 50%、3 日目で 10% となり、4 日目ですべて死亡した。AMPH を単独で 2.0 mg/kg 投与したときは、AMPH の 0.5 mg/kg と AFLEI 0.5 mg/kg を併用した場合と同様な生存率の変化であった。AMPH の 2.0 mg/kg と AFLEI 0.5 mg/kg を併用すると生存率がさらによくなり、2 日目で 80%、3 日目で 30%、4 日目で 10% となり、5 日目ですべて死亡した。この結果から、抗真菌剤の AMPH は投与量に従い生存率が高くなり、さらに AMPH と AFLEI を併用すること

Table 6. Comparison of Biological Properties of Elastase Inhibitor from *A. flavus* (AFLEI) and *A. nidulans* (Asnidin)

Biological properties	AFLEI	Asnidin
Molecular mass (Da)	7525.8	4181.6
Heat stability	50%, 80°C	100%, 100°C
pH stability	3–12	3–12
Inhibitor	DTT	DTT
Inhibitory activity on elastases	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> Human Leukocytes	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> Human Leukocytes Porcine pancreas
Fibrinogenase activity from <i>A. fumigatus</i>	Inhibition	Inhibition
Collagenase activity from <i>A. fumigatus</i>	Inhibition	Inhibition

DTT: dithiothreitol.

により、より生存率が高くなる傾向にあることがわかった。同様の実験を再度行ったが、AFLEIの併用により生存率がよくなるという同様の結果が得られた (Fig. 5)。また、*A. fumigatus* を用いて同様の実験を行ったところ、生存率は100%となった (Fig. 6)。AFLEIとAMPHの併用により生存率が上昇する傾向が認められたのは、AFLEIはAFLEを阻害するため、肺に感染した本菌による組織障害が妨げられ、AMPHにより殺菌されるため、生存率がよくなったのではないかと推測している。AFLEI単独の場合で生存率の上昇につながらなかったのは、AFLEIの投与により一時的に*A. flavus*による組織障害を妨げるが、産生するエラスターゼ量が増加すればAFLEIの効果なくなること、AFLEIが本菌に殺菌的に作用しないためと考える。

6-3. ラット気管支内へのエラスターゼの投与による影響 ラットの肺に気管支内からAFLEの20 μ gを投与し、24時間後にその肺組織を摘出した。摘出した肺組織は出血が認められた。その肺の病理切片を作製して観察したところ、対照と比較して、肉眼的にも組織学的にも肺胞内への巣状出血が多数みられた。このような出血や好中球、好酸球などの浸潤は一部分ではなく、随所に認められた。また、細気管支への出血、血管内へのフィブリン様物質の滲出も認められた。

6-4. エラスターゼ阻害因子の効果 ラットの

Fig. 5. Survival Rate of Immunocompromised Mice Infected by Inhalation of Spores of *A. flavus*

Animals were observed daily until death. Ten immunocompromised mice were used in each experiment. Reproduced with permission from *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 49 No. 2 Pages 87–93. Copyright 2008 The Japanese Society for Medical Mycology.

Fig. 6. Survival Rate of Immunocompromised Mice Infected by Inhalation of Spores of *A. fumigatus*

Animals were observed daily until death. Ten immunocompromised mice were used in each experiment.

肺にAFLEとAFLEIの混合物を投与し、24時間後にその肺を取り出して観察したところ、肺に出血が認められたが、病理切片を観察したところ、精製エラスターゼ単独投与した肺組織にみられた出血が一部分のみに認められ、その範囲は精製エラスターゼ単独の場合と比較して明らかに小さく、その数も非常に少なかった。

エラスターゼはアスペルギルス症発症の要因として深く関与していると推測されている。⁴³⁾ AFLE のラット肺に対する組織傷害と AFLEI によるその抑制効果を検討したところ、精製エラスターゼ投与ラット肺においては出血、好中球などの炎症細胞浸潤、フィブリン様物質の滲出などの病理学的変化が認められ、AFLEI は精製エラスターゼによって引き起こされるこれらの病理学的変化を抑制する効果があった。今回用いた精製エラスターゼは生体内に含まれるタンパク質であるフィブリノーゲン、コラーゲン (Type I, III, IV) に対して強い水解作用を示した。²⁷⁾ 特にコラーゲン Type IV は血管や肺胞基底膜を構成する主成分であり、病理的所見における出血はこれら基底膜の傷害によって起こることが考えられ、感染局所において傷害作用を示し、感染の一因子として *A. flavus* が示す組織侵襲や炎症などの病原性となんらかの関連があると考えられた。そして、AFLEI は精製エラスターゼのフィブリノーゲン、コラーゲン水解活性を強く阻害した。²⁾

7. エラスターゼ阻害因子 AFUEI の結晶構造解析⁴⁴⁾

本項及び次項では、掲載論文^{44,45)}に従い AFUEI として記述する。AFUEI は MEROPS database における I78 inhibitor family に属しており、この立体構造の知見を得るために、X 線結晶構造解析を試みた。その全体構造はくさびの形をしており、土台となるコア構造からループ(くさびのエッジ部分)が伸びる形をしている (Fig. 7)。⁴⁴⁾ 2つの α ヘリックス ($\alpha 1$, $\alpha 2$) と 4つの β ストランド ($\beta 1$ – $\beta 4$) からなっており、 $\alpha 1$ は Cys-5 と Cys-67 間のジスルフィド結合で $\beta 4$ に固く結合している。この AFUEI の立体構造は、potato inhibitor I family に属する植物や環形動物 (ヒル, ミミズ) 由来のセリンプロテアーゼインヒビターと著しくよく似た構造をしていた。^{46–50)} AFUEI のループ部分は、potato inhibitor I family の結合ループに相当し、AFUEI は potato inhibitor I family に属するインヒビターと同じ阻害機構で、プロテアーゼを阻害することが推測される。しかしながら、ループ部分を除いては両者のアミノ酸配列の相同性が低いにもかかわらず、カビ由来の AFUEI が主に植物由来の potato inhibitor I family のインヒビターによく似ていることは非常に興味深い。

Fig. 7. Overall Structure of AFUEI
A ribbon representation of the crystal structure of AFUEI.⁴⁴⁾

8. 合成エラスターゼ阻害因子 synthetic-AFUEI (S-AFUEI) の性質⁴⁵⁾

近年、高用量のステロイド療法を必要とする好中球減少症でない患者や、免疫抑制療法を必要とする自己免疫疾患のある患者でも、侵襲性肺アスペルギルス症の発生率が増加している。⁵¹⁾ 新しい抗真菌剤の導入にもかかわらず、薬物耐性菌の発生、宿主への毒性、薬物のバイオアベイラビリティなどの要因により、真菌感染症は依然として脅威となっている。⁵²⁾ ポリコナゾールと AMPH は、侵襲性肺アスペルギルス症の第一選択薬であるが、それらの応答率は、それぞれ 52.8% 及び 31.6% であり、⁵³⁾ 新たな治療薬が必要な現状であることから、アスペルギルス症の病原性に関連するエラスターゼを阻害する物質は、新たな治療薬になり得ると考えている。

培養上清から得られる AFUEI の収量は微量であるため、治療薬としての可能性を検討するために native-AFUEI (N-AFUEI) と同じアミノ酸配列かつ 3 次元構造を持つ S-AFUEI を化学的に合成し、その熱安定性、AFUE のエラスターゼ活性、コラーゲン水解活性、ヒトフィブリノーゲン水解活性、正常なヒト小気道上皮細胞 (human small airway epithelial cells; HSAEC)、正常なヒト肺動脈内皮細胞 (human pulmonary artery endothelial cells; HPAEC)、及び正常なヒト肺胞上皮細胞 (human pulmonary alveolar epithelial cells; HPAEpiC) への細胞傷害性に対する阻害活性について検討した。

8-1. S-AFUEI の性質 S-AFUEI を 37℃, 50℃, 60℃, 80℃ で 10 分間保温し, 冷却した後に阻害活性を測定したところ, 37℃ で 100%, 50℃ で 99%, 60℃ で 95%, 80℃ で 54% の残存活性を認め耐熱性であった。これは N-AFUEI と同等の結果であった。

S-AFUEI の AFUE によるコラーゲン (Type IV) 水解への阻害活性を調べた。AFUE はコラーゲンを 30 分後から水解し始め 180 分後にほぼ水解したのに対し, S-AFUEI は AFUE のコラーゲン水解活性を強く阻害し, 180 分後でも水解されなかった。S-AFUEI の AFUE によるヒトフィブリノーゲン水解への阻害活性を調べた。AFUE はヒトフィブリノーゲンを 10 分後から水解を始め 30 分後にほぼ水解したのに対し, S-AFUEI は AFUE のヒトフィブリノーゲン水解を強く阻害し, 30 分後でも水解されなかった。

8-2. 一次構造とエラスターゼ阻害活性 Disulfide bond のある S-AFUEI, Disulfide bond はないが一次構造は同じ Non-disulfide bond S-AFUEI 及び N-AFUEI の阻害活性部位と推定される 39-47 (P-G-D-M-I-T-M-E-Y, 39-51 (P-G-D-M-I-T-M-E-Y-I-A-S-R) について部分合成を行い, 阻害活性を測定した (Table 7)。AFUE と S-AFUEI を 1:1 のモル比で反応させたところ, S-AFUEI は AFUE の GAAPLNA 水解活性を 95% 阻害した。Non-disulfide bond S-AFUEI は 52%, 39-47 の部分合成 S-AFUEI は 2%, 39-51 の部分合成 S-AFUEI は 21% 阻害した。S-AFUEI は N-AFUEI と同等のエラスターゼ阻害活性を示し, S-AFUEI は Non-disulfide bond S-AFUEI や部分合成した S-AFUEI と比較し強い阻害活性を有し, Non-disulfide bond S-AFUEI と比較すると約 2 倍の阻害活性 (95%/52%) を有しており, N 末 5 残基目と C 末 67 残基目の Disulfide bond による立体構造の形成がエラスターゼ阻害活性に重要であることが判明した。

8-3. AFUE のヒト細胞傷害と S-AFUEI の細胞傷害阻害活性 HPAEC, HSAEC 及び HPAEpiC に対する AFUE の細胞傷害性を調べたところ, すべての細胞に対し傷害性を認めた。HPAEC は AFUE 2.5 µg/mL で細胞生存率約 20%, HSAEC は AFUE 2.5 µg/mL で細胞生存率約 40%, HPAEpiC は AFUE 2.5 µg/mL で細胞生存率約

Table 7. Comparison of the Elastase Inhibitory Activity of the Synthetic AFUEI

Synthetic AFUEI	Inhibitory activity (%)
Synthetic AFUEI	95
Synthetic AFUEI without disulfide bond	52
Partial synthetic AFUEI (39-47) ^a	2
Partial synthetic AFUEI (39-51 + TRTF) ^b	21
Partial synthetic AFUEI (39-51 + YRVF) ^c	23

^a P-G-D-M-I-T-M-E-Y, ^b P-G-D-M-I-T-M-E-Y-I-A-S-R-T-R-T-F, ^c P-G-D-M-I-T-M-E-Y-I-A-S-R-V-R-V-F.

60% と生存率に差異を認めた。HPAEC が AFUE に最も感受性が高かった。次に AFUE 1 mol に対し S-AFUEI を各モル比で反応させ, AFUE の細胞傷害性を阻害するか検討した。HPAEC では AFUE 単独では細胞生存率 41% に対し, S-AFUEI 0.25 mol で 54%, 0.50 mol で 84%, 0.75 mol で 100% と生存率が向上した。HSAEC では AFUE 単独では細胞生存率 22% に対し, S-AFUEI 0.25 mol で 61%, 0.50 mol で 80%, 0.75 mol で 95% と生存率が向上した。HPAEpiC では AFUE 単独では細胞生存率 55% に対し, S-AFUEI 0.25 mol で 67%, 0.50 mol で 82%, 0.75 mol で 95% と生存率が向上した。S-AFUEI は濃度依存的に AFUE のヒト細胞傷害性を阻害し, AFUE 1 mol に対し S-AFUEI 0.75 mol を加えることにより, 細胞傷害性をほぼ 100% 阻害した。

9. 総括

アスペルギルス症の病原因子としては分生子の接着因子, プロテイナーゼ, グリオトキシンなどの毒性分子のように様々な物質について研究されてきたが, 1 つには特定されておらず, 複数の要素が組み合わせられ複合的に病原性を発現していると考えられる。しかしながら, アスペルギルス症の発症は分生子が吸入されて気道粘膜の表面へ定着した後, プロテイナーゼ, 特にエラスターゼが関与して組織を損傷すると考えられており, 実際, *A. fumigatus*⁵⁴⁻⁵⁸⁾ や *A. flavus*^{59,60)} の産生するプロテイナーゼやエラスターゼについて多くの報告がある。そして, Kothary ら²¹⁾ はエラスターゼ産生株と非産生株を免疫抑制マウスに感染させたところ, エラスターゼ産生株の方が非産生株より死亡率が高いこと, また, Kolattukudy ら⁶¹⁾ はエラスターゼ欠損変異株を作製し, 感染実験を行ったところ, エラスターゼ産生株

に比較してマウスの死亡率が減少したと報告している。Blanco ら²⁴⁾は侵襲性肺アスペルギルス症から分離した *A. fumigatus* の臨床分離株が強いエラスターゼ活性を持つことから、エラスターゼと病原性は関係があると報告している。さらに奥村ら⁴⁾の結果からも、エラスターゼのアスペルギルス症における病原性への関与が考えられた。

一方、アスペルギルス属の産生するエラスターゼ阻害因子^{3,6)}は、これまで全く報告されていない新規のものであった。これまでエラスターゼ阻害因子としては、Umezawa ら⁶²⁾が *Actinomycetes* より elastatinal, Ohno ら⁶³⁾は *Streptomyces noborioensis* KM-2753 より elasnin, Sato と Murao⁶⁴⁾は *S. albobogriseolus* S-3253 より S-SI を、Wiedow ら⁶⁵⁾はヒトの皮膚より elafin を、さらに Kawabata ら⁶⁶⁾は ONO-5046 を分離している。ONO-5046 はエラスポールとして臨床で用いられている。

筆者らは、本研究で報告した新規エラスターゼ阻害因子である AFLEI の生物学的性質を初めて明らかにした。アスペルギルス属がなぜエラスターゼとエラスターゼ阻害因子の両方を産生するかは判明していないが、エラスチンを基質とした培養でエラスターゼとエラスターゼ阻害因子の活性を認めたこと、培養上清中に AFLEI と AFLE の結合物がウェスタンブロットにより検出されたことから、⁵⁾ エラスターゼ阻害因子はエラスターゼによる菌自身への傷害を防ぐために産生しているのではないかと考えている。深在性真菌症は年々増加しており、久米ら⁶⁷⁾の報告によれば、1969 年ごろの真菌症検出例総数は全部検例の約 1.6%であったのが、2001 年では約 4.6%と約 3 倍になっており、アスペルギルス症は其中で約 46%を占めている。亀井は 1994 年ごろからカンジダ症に代わりアスペルギルス症が増え第 1 位を占め増加傾向であると述べている。⁶⁸⁾ また、田代⁶⁹⁾も同様の報告をしている。アスペルギルス症は重度の基礎疾患を有する免疫抑制あるいは入院患者に引き起こされる日和見感染症で、このように増加していることから、アスペルギルス症への対応は重要なことである。小川²⁶⁾は臨床において肺アスペルギルス症にエラスターゼを阻害するウリナスタチンを併用した結果、有効であったことを報告している。さらに、前崎ら⁷⁰⁾はアスペルギローマに、杉村ら⁷¹⁾はアスペルギルス肺炎にウリナスタチンを

併用し、同様に有効な結果を報告しており、エラスターゼ阻害因子の使用がアスペルギルス症の治療に有効であると考えられる。このエラスターゼ阻害因子は *A. flavus* や *A. fumigatus* の産生するエラスターゼに対して特異的に作用し、選択性が高いことや耐熱性で幅広い pH で安定であることは、品質の安定性として、さらに、合成ができることは大量に安定的に供給できるため臨床応用上有用なことである。AFUE がヒト血管内皮細胞にも傷害を与えることが確認されたことより、アスペルギルス症による喀血の原因として AFUE が重要な役割を果たしていると考えられた。S-AFUEI が AFUE のヒト細胞傷害性を阻害したことから肺アスペルギルス症における血管侵襲、気管支侵襲を S-AFUEI が軽減する可能性が示唆されたことから、抗真菌薬との併用によりアスペルギルス症の治療効果を高めることが期待できる。さらにヒト好中球エラスターゼに対して阻害作用を示していることから好中球エラスターゼ阻害剤であるエラスポールのように、好中球による全身性炎症反応症候群に伴う急性肺障害のような炎症性疾患、肺線維症などにも有効であると考えられ、アスペルギルス症だけではなく、急性肺障害の治療への効果も期待できる物質である。

謝辞 この研究は当研究室の研究員の奥村欣由博士のたゆまぬ努力の成果であり、共同研究者の小川賢二、杉原久義、長谷川洋一、打矢恵一、佐久間麻由子、本間道夫、福井保太、小森由美子、本間学の各先生方にお礼申し上げるとともに、微生物学研究室で熱心に研究を推進してくれた大学院生の山下玲子、和出(吉川)幸江、鈴川 誠、松井 健の諸氏、また柴田由紀子、山田義明、幸王智美、吉田茜、青木さやか、黒坂有貴の諸氏を始め大勢の学部卒論学生の皆様に感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Okumura Y., Ogawa K., Nikai T., *J. Med. Microbiol.*, **53**, 351–354 (2004).
- 2) Okumura Y., Ogawa K., Uchiya K., Nikai T., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **47**, 219–224 (2006).
- 3) Okumura Y., Ogawa K., Uchiya K., Nikai T.,

- Jpn. J. Med. Mycol.*, **48**, 13–18 (2007).
- 4) Okumura Y., Ogawa K., Nikai T., *Meijo Daigaku Sogo Kenkyusho Sogo Gakujutsu Kensyu Ronbun Shu*, **6**, 145–152 (2007).
 - 5) Okumura Y., Ogawa K., Uchiya K., Komori Y., Nonogaki T., Nikai T., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **49**, 87–93 (2008).
 - 6) Okumura Y., Matsui T., Ogawa K., Uchiya K., Nikai T., *J. Med. Microbiol.*, **57**, 803–808 (2008).
 - 7) Tu A. T., Nikai T., Baker J. O., *Biochemistry*, **20**, 7004–7009 (1981).
 - 8) Nikai T., Ishizaki H., Tu A. T., Sugihara H., *Comp. Biochem. Physiol.*, **72**, 103–106 (1982).
 - 9) Nikai T., Imai K., Sugihara H., Tu A. T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **264**, 270–280 (1988).
 - 10) Nikai T., Ohara A., Komori Y., Fox J. W., Sugihara H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 89–96 (1995).
 - 11) Nikai T., Taniguchi K., Komori Y., Masuda K., Fox J. W., Sugihara H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **378**, 6–15 (2000).
 - 12) Komori Y., Murakami E., Uchiya K., Nonogaki T., Nikai T., *Toxins*, **6**, 2594–2604 (2014).
 - 13) Komori Y., Hoshino Y., Takeda E., Nikai T., *Meijo Daigaku Sogo Kenkyusho Sogo Gakujutsu Kensyu Ronbun Shu*, **8**, 37–45 (2009).
 - 14) Uchiya K., Tomida S., Nakagawa T., Asahi S., Nikai T., Ogawa K., *Sci. Rep.*, **7**, 39750 (2017).
 - 15) Uchiya K., Asahi S., Futamura K., Hamaura H., Nakagawa T., Nikai T., Ogawa K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e02035-17 (2018).
 - 16) Uchiya K., Sugita A., Nikai T., *BMC Microbiol.*, **9**, 179–189 (2009).
 - 17) Uchiya K., Kamimura Y., Jusakon A., Nikai T., *Infect. Immun.*, **87**, e00881-18 (2019).
 - 18) Miyaji M. “Byogenseishinkin Handbook,” Iyaku Journal Sha, Osaka, 2007, p. 113.
 - 19) Garcia-Vidal C., Peghin M., Cervera C., Gudiol C., Ruiz-Camps I., Moreno A., Royo-Cebrecos C., Roselló E., de la Bellacasa J. P., Ayats J., Carratalà J., *PLoS One*, **10**, e0120370 (2015).
 - 20) Patterson T. F., Thompson G. R. III, Denning D. W., Fishman J. A., Hadley S., Herbrecht R., Kontoyiannis D. P., Marr K. A., Morrison V. A., Nguyen M. H., Segal B. H., Steinbach W. J., Stevens D. A., Walsh T. J., Wingard J. R., Young J.-A. H., Bennett J. E., *Clin. Infect. Dis.*, **63**, e1–e60 (2016).
 - 21) Kothary M. H., Chase T. Jr., Macmillan J. D., *Infect. Immun.*, **43**, 320–325 (1984).
 - 22) Watanabe A., Hashimoto Y., Higurashi H., Ochiai E., Toyotome T., Nagayoshi M., Kamei K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **49**, 263–267 (2008).
 - 23) Rhodes J. C., Bode R. B., McCuan-Kirsch C. M., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**, 165–170 (1988).
 - 24) Blanco J. L., Hontecillas R., Bouza E., Blanco I., Pelaez T., Muñoz P., Molina J. P., Garcia M. E., *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1811–1813 (2002).
 - 25) Ogawa K., Taki F., Takagi K., Furui H., Tsuda M., Honda K., Sasaki T., Sasamoto M., Miwa T., *Kokyu*, **11**, 880–886 (1992).
 - 26) Ogawa K., *Bull. Jpn. Soc. Tuberc.*, **72**, 59–64 (1997).
 - 27) Hasegawa Y., Nikai T., Okumura Y., Ogawa K., Sugihara H., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **38**, 53–59 (1997).
 - 28) Hasegawa Y., Nikai T., Yamashita R., Yoshikawa Y., Sugihara H., Ogawa K., Mizuno M., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **36**, 235–243 (1995).
 - 29) Kudou Y., *Kagaku no Ryouiki*, **5**, 26–34 (1989).
 - 30) Komori Y., Okumura Y., Kamiya K., Ogawa K., Nikai T., *Int. J. Biochem. Res. Rev.*, **12**, 1–8 (2016).
 - 31) Kurosaka Y., Komori Y., Okumura Y., Nikai T., Abstracts of papers, the 139th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Chiba, March 2019, p. 144.
 - 32) Sakaguchi T., Yokota K., *Nippon Saikingaku Zasshi*, **27**, 649–655 (1972).
 - 33) Kumagai T., Nagata T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **40**, 217–222 (1999).
 - 34) Kamei K., Watanabe A., Nishimura K., Miyaji M., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **43**, 37–41 (2002).
 - 35) Ogawa K., Okumura Y., Nikai T., Tarumi O., Nakagawa T., Saitou Y., *Jpn. J. Med.*

- Mycol.*, **47**, 171–178 (2006).
- 36) Komori Y., Nonogaki T., Nikai T., *Toxicon*, **39**, 1327–1332 (2001).
- 37) Nikai T., Sugihara H., Tanaka T., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 507–514 (1977).
- 38) Homma M., Kubota F., Nikai T., Sugihara H., *Kitakanto Med. J.*, **30**, 485–494 (1980).
- 39) Nikai T., Kato C., Komori Y., Nodani H., Homma M., Sugihara H., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 631–633 (1995).
- 40) Nierman W. C., Pain A., Anderson M. J., Wortman J. R., Kim H. S., Arroyo J., Berri-man M., Abe K., Archer D. B., Bermejo C., Bennett J., Bowyer P., Chen D., Collins M., Coulsen R., Davies R., Dyer P. S., Farman M., Fedorova N., Fedorova N., Feldblyum T. V., Fischer R., Fosker N., Fraser A., García J. L., García M. J., Goble A., Goldman G. H., Gomi K., Griffith-Jones S., Gwilliam R., Haas B., Haas H., Harris D., Horiuchi H., Huang J., Humphray S., Jiménez J., Keller N., Khouri H., Kitamoto K., Kobayashi T., Kon-zack S., Kulkarni R., Kumagai T., Lafon A., Latgé J. P., Li W., Lord A., Lu C., Majoros W. H., May G. S., Miller B. L., Mohamoud Y., Molina M., Monod M., Mouyna I., Mulligan S., Murphy L., O’Neil S., Paulsen I., Peñalva M. A., Perteu M., Price C., Pritchard B. L., Quail M. A., Rabinowitsch E., Rawlins N., Rajandream M. A., Reichard U., Renauld H., Robson G. D., Rodriguez de Córdoba S., Rodriguez-Peña J. M., Ronning C. M., Rutter S., Salzberg S. L., Sanchez M., Sánchez-Ferrero J. C., Saunders D., Seeger K., Squares R., Squares S., Takeuchi M., Tekaia F., Turner G., Vazquez de Aldana C. R., Weidman J., White O., Woodward J., Yu J. H., Fraser C., Galagan J. E., Asai K., Machida M., Hall N., Barrell B., Denning D. W., *Nature*, **438**, 1151–1156 (2005).
- 41) Okumura Y., Suzukawa M., Uchiya K., Oga-wa K., Komori Y., Yamashita N., Nikai T., *J. Med. Mycol.*, **54**, 279–284 (2013).
- 42) Wortman J. R., Gilsenan J. M., Joardar V., Deegan J., Clutterbuck J., Andersen M. R., Archer D., Bencina M., Braus G., Coutinho P., von Döhren H., Doonan J., Driessen A. J., Durek P., Espeso E., Fekete E., Flipphi M., Estrada C. G., Geysens S. G., Goldman G., de Goot P. W., Hansen K., Harris S. D., Heinekamp T., Helmstaedt K., Henrissat B., Hofmann G., Homan T., Horio T., Horiuchi H., James S., Jones M., Karaffa L., Karányi Z., Kato M., Keller N., Kelly D. E., Kiel J. A., Kim J. M., van der Klei I. J., Klis F. M., Kovalchuk A., Kraševac N., Kubicek C. P., Liu B., Maccabe A., Meyer V., Mirabito P., Miskei M., Mos M., Mullins J., Nelson D. R., Nielsen J., Oakley B. R., Osmani S. A., Pak-ula T., Pasazewski A., Paulsen I., Pilsyk S., Pócsi I., Punt P. J., Ram A. F., Ren Q., Robellet X., Robson G., Seiboth B., van Solingen P., Specht T., Sun J., Taheri-Talesh N., Takeshita N., Ussery D., van Kuyk P. A., Visser H., van de Vondervoort P. J., de Vries R. P., Walton J., Xiang X., Xiong Y., Zeng A. P., Brandt B. W., Cornell M. J., van den Hondel C. A., Visser J., Oliver S. G., Turner G., *Fungal Genet. Biol.*, **46** (Suppl. 1), S2–S13 (2009).
- 43) Jonsson A. G., Martin S. M., *Arg. Biol. Chem.*, **28**, 734–739 (1964).
- 44) Sakuma M., Imada K., Okumura Y., Uchiya K., Yamashita N., Ogawa K., Hijikata A., Shirai T., Homma M., Nikai T., *J. Biol. Chem.*, **288**, 17451–17459 (2013).
- 45) Fukui Y., Okumura Y., Uchiya K., Komori Y., Ogawa K., Nikai T., Hasegawa Y., *J. Mycol. Med.*, **29**, 345–351 (2019).
- 46) Betzel C., Dauter Z., Genov N., Lamzin V., Navaza J., Schnebli H. P., Vasanji M., Wilson K. S., *FEBS Lett.*, **317**, 185–188 (1993).
- 47) Frigerio F., Coda A., Pugliese L., Lionetti C., Menegatti E., Amiconi G., Schnebli H. P., Ascenzi P., Bolognesi M., *J. Mol. Biol.*, **225**, 107–123 (1992).
- 48) McPhalen C. A., James M. N., *Biochemistry*, **26**, 261–269 (1987).
- 49) McPhalen C. A., James M. N., *Biochemistry*, **27**, 6582–6598 (1988).
- 50) Wojtaszek J., Kolaczowska A., Kowalska J., Nowak K., Wilusz T., *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **143**, 465–472 (2006).
- 51) Meersseman W., Lagrou K., Maertens J., Wijngaerden E. V., *Clin. Infect. Dis.*, **45**, 205–216 (2007).
- 52) Barker K. S., Rogers P. D., *Curr. Infect. Dis.*

- Rep.*, **8**, 449–456 (2006).
- 53) Herbrecht R., Denning D. W., Patterson T. F., Bennett J. E., Greene R. E., Oestmann J. W., Kern W. V., Marr K. A., Ribaud P., Lortholary O., Sylvester R., Rubin R. H., Wingard J. R., Stark P., Durand C., Caillot D., Thiel E., Chandrasekar P. H., Hodges M. R., Schlamm H. T., Troke P. F., de Pauw B., *N. Engl. J. Med.*, **347**, 408–415 (2002).
- 54) Reichard U., Büttner S., Eiffert H., Staib F., Rüchel R., *J. Med. Microbiol.*, **33**, 243–251 (1990).
- 55) Monod M., Togni G., Rahalison L., Frenk E., *J. Med. Microbiol.*, **35**, 23–28 (1991).
- 56) Frosco M. B., Chase T. Jr., Macmillan J. D., *Infect. Immun.*, **60**, 728–734 (1992).
- 57) Larcher G., Bouchara J. P., Annaix V., Symoens F., Chabasse D., Tronchin G., *FEBS Lett.*, **308**, 65–69 (1992).
- 58) Monod M., Paris S., Sangland D., Jatton-Ogay K., Bille J., Latgé J. P., *Infect. Immun.*, **61**, 4099–4104 (1993).
- 59) Rhodes J. C., Amlung T. W., Miller M. S., *Infect Immun.*, **58**, 2529–2534 (1990).
- 60) Zhu W. S., Wojdyla K., Donlon K., Thomas P. A., Eberle H. I., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **13**, 491–497 (1990).
- 61) Kolattukudy P. E., Lee J. D., Rogers L. M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B., Copelan E. A., *Infect. Immun.*, **61**, 2357–2368 (1993).
- 62) Umezawa H., Aoyagi T., Okura A., Morishima H., Takeuchi T., Okami Y., *J. Antibiot.*, **24**, 787–789 (1973).
- 63) Ohno H., Yoshida M., Takahashi Y., Omura S., *J. Antibiot.*, **33**, 474–479 (1980).
- 64) Sato S., Murao S., *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1067–1074 (1973).
- 65) Wiedow O., Schröder J. M., Gregory H., Young J. A., Christophers E., *J. Biol. Chem.*, **265**, 14791–14795 (1990).
- 66) Kawabata K., Suzuki M., Sugitani M., Imaki K., Toda M., Miyamoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 814–820 (1991).
- 67) Kume H., Yamasaki T., Abe M., Tanuma H., Okudaira M., Okayasu I., *Jpn. J. Med. Mycol.*, **47**, 15–24 (2006).
- 68) Kamei K., *Healthist*, **260**, 18–21 (2020).
- 69) Tashiro T., *Jpn. J. Soc. Clin. Microbiol.*, **19**, 67–75 (2009).
- 70) Maesaki S., Kohno S., Tanaka K., Miyazaki H., Mitsutake K., Miyazaki T., Tomono K., Kaku M., Koga H., Hara K., *Jpn. J. Thorac. Dis.*, **31**, 1327–1331 (1993).
- 71) Sugimura S., Yoshida K., Oba H., Hashiguchi K., Nakajima M., Moriya O., Okimoto N., Niki Y., Soejima R., *Jpn. J. Thorac. Dis.*, **32**, 1032–1037 (1994).