

氏名	う りんが い 于 林 凱
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博生第 21 号
学位授与日	平成 26 年 6 月 30 日
論文題目	UV-chemical screening for new bioactive compounds from <i>Streptomyces</i> collected in tropical zone (UV ケミカルスクリーニングによる熱帯由来 <i>Streptomyces</i> 属放線菌からの新規生理活性物質探索)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 五十嵐 康 弘 教授 中 島 範 行 教授 加 藤 康 夫 講 師 濱 田 昌 弘 富山大学 教授 紺 野 勝 弘

内容の要旨

アオカビからのペニシリン発見を契機に、有用な抗生物質が相次いで微生物から発見・実用化された結果、細菌感染症による死亡数は激減した。また抗菌剤に加えて、抗がん剤、免疫抑制剤、高脂血症治療薬などの画期的医薬品が微生物代謝産物から生み出されてきた。ところが徹底的な探索研究が進められた結果として、容易に分離・入手可能な放線菌や糸状菌からの新規物質の発見頻度が低下し、20 世紀終盤に入ると微生物からの創薬研究は急激に衰退した。一方で近年のゲノム解析により、*Aspergillus* や *Penicillium* などの糸状菌では一株あたり 50 から 70 種の抗生物質を、*Streptomyces* 属放線菌では一株あたり 20 から 30 種の抗生物質を生合成するための遺伝子を保有することが明らかとなった。この数はこれまでに単離、構造決定された化合物数を上回る値であることから、相当数の未知化合物が未発見のまま残されていると予想される。本研究では、代謝物の構造多様性が期待される熱帯由来 *Streptomyces* 属放線菌を対象に UV スペクトルを指標とした化学的スクリーニングを行い、代謝産物の構造新規性と生理活性を評価することにより、医薬探索源としての *Streptomyces* 属放線菌のポテンシャルを評価することを試みた。

従来の生理活性物質探索は抗菌性や細胞毒性などの生物活性を指標に進められてきたが、その探索方法では既知化合物を検出してしまいう確率が高い。本研究では新規構造の代謝物の検出を優先するために、化合物の UV スペクトルを指標とした化学的 (ケミカル) スクリーニングを用いた。スクリーニングには、UV (紫外吸収)、MS (質量)、NMR (核磁気共鳴) スペクトルが利用可能であるが、新規骨格化合

物を探索する上では UV スペクトルが最適と考えた。UV スペクトルは化合物の共役系（不飽和結合系）構造を反映することから、基本骨格が異なればスペクトル形状も異なる。本研究では、微生物工学研究室で独自に構築した天然有機化合物の UV スペクトルデータベースを参照することにより、新規代謝物のスクリーニングを行った。

抗生物質を産生する微生物にとって、抗生物質は栄養確保の競争相手となる周囲の他生物の活動を抑制する攻撃手段として機能すると一般的に考えられている。そのような生存競争は生物多様性の高い環境でより激しくなることから、冷帯のような生物活性の低い環境に比べて、熱帯のように生物種・個体数ともに高い環境では代謝物生産能も他地域より高いことが期待できる。本研究では熱帯域放線菌を探索の対象として選択し、タイ、メキシコなどの大学研究者の協力を得て *Streptomyces* 株を収集した。それらの培養抽出物を HPLC 分析データの UV ケミカルスクリーニングを通じて新規代謝物の生産株を選別し、研究に用いた。本論文の主な内容は以下の通りである。

第一章では、微生物創薬の歴史と成功例、現状と問題点について概説し、本研究の目的と必要性を論じている。

第二章では、土壌から分離された *Streptomyces* 属放線菌 CHI93 株からの新規ポリケタイド化合物の単離、構造決定、生物活性について述べている。生産菌はメキシコ Campeche 州で採取した岩石から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Streptomyces* と同定した。三種類の液体培地で本菌株の物質生産能を比較した結果、A16 培地中で培養したときのみ 280 nm 付近に吸収極大を示す未知化合物を生産した。そこで培養抽出物を順相および逆相シリカゲルカラムで分画、精製した後、ゲル濾過カラム精製により二種類の化合物 campechic acid A と B を得た。精密質量分析により、それぞれの分子量を $C_{40}H_{70}O_8$ と $C_{39}H_{68}O_8$ と決定し、 ^{13}C NMR スペクトルにおいてもそれを支持する結果を得た。Campechic acid A については、COSY、HSQC、HMBC 等の二次元 NMR スペクトルを解析することにより平面構造を決定した。本化合物はポリケタイド骨格の末端にカルボキシル基を、またエノール化した 1,3-ジケトン構造と二つのテトラヒドロフラン環をポリケタイド鎖中に含み、複数のメチル分岐を有する新規化合物であった。Campechic acid B についても同様に二次元 NMR データを解析し、campechic acid A とのデータ比較により campechic acid A のエチル基がメチル基に置換した類縁物質であることを明らかにした。Campechic acid 類に近縁な化合物として、放線菌の生産する ionomycin が知られているが、他に類似した化合物は知られていない。次に両化合物の立体構造の決定を行った。二級水酸基と末端二級カルボキシル基をそれぞれ MTPA エステル、PGME アミドに誘導し、キラルアニソトロピー法により絶対配置を決定した。二級メチル基とエチル基の絶対配置は、campechic acid を酸化分解して得られるカルボン酸の PGME 誘導体化を適用し、Schmidt らにより報告されている 1,3,n-メチル置換系の相対立体配置決定法を応用することにより決定した。テトラヒドロフラン環周辺の立体化学を決定するには至っていない。Campechic acid A と B はグラム陽性細菌 *Micrococcus luteus* に抗菌活性を示したが、グラム陰性細菌や酵母に対しては活性を示さなかった。一方で、両化合物共にマウス大腸癌由来 colon 26L-5 細胞に対する毒性を IC_{50} 値が数 μM 程度の濃度域で示したが、毒性の見られない低濃度域では同細胞のマトリジェルへの浸潤を campechic acid A が IC_{50} 値 5.5 nM で、B が IC_{50} 値 300 nM で阻害した。Campechic acid A は著者らの研究室で得られた浸潤阻害剤の中で最強の活性を示した。また campechic acid 類は、ionomycin 等のポリエーテル系ポリケタイド化合物に属するが、これまでにこの系統の化合物の浸潤阻害活性に関する報告はない。

第三章では、*Streptomyces* 属放線菌 CHI39 株の生産する新規多環性化合物 abyssomicin I の単離、構造決

定、生物活性について述べている。生産菌は、第一章で用いた分離源と同じくメキシコ Campeche 州で採取した岩石から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Streptomyces* と同定された。本菌株を三種類の液体培地で物質生産能を比較した結果、A3M 培地中で 220 と 260 nm 付近に吸収極大を示す化合物を生産し、UV データベース中には該当する既知化合物が存在しなかったため、単離、構造解析へと進めた。培養液のブタノール抽出物を順相および逆相シリカゲルカラムで分画、精製することにより、abyssomicin I が得られた。精密質量分析と ^1H 及び ^{13}C NMR スペクトルデータに基づき、本化合物の分子量を $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ と決定した。さらに各種二次元 NMR データの解析により、本化合物は abyssomicin の新規類縁化合物であることを解明し、abyssomicin I と命名した。本化合物の立体構造決定に際しては、まず二つの二級水酸基を MTPA エステルへ誘導し、改良 Mosher 法による決定を試みたが、11 員環の配座予測が困難であり、決定的なデータを得ることができなかった。そこで 11 員環に含まれる二重結合を Grubbs 触媒、エチレンによるオレフィンメタセシスにより開環し、鎖状構造とした誘導体に改良 Mosher 法を適用し、二級水酸基の一つについては絶対配置を確定した。次いでアリル位二級水酸基の二酸化マンガニンによる選択的酸化で得た酸化誘導体に、改良 Mosher 法を用いることでもう一方の二級水酸基の絶対配置を決定した。Abyssomicin I は細菌、酵母に対して顕著な抗菌性を示さなかったが、その酸化誘導体にはグラム陽性細菌に対する弱い抗菌活性が認められた。また abyssomicin I とその酸化誘導体は、マウス大腸癌由来 colon 26L-5 細胞のマトリジェルへの浸潤をそれぞれ IC_{50} 値 11 μM 、0.21 μM で阻害した。Abyssomicin は六員環にテトロン酸がスピロ縮環し、さらに 11 員環構造が縮合した多環性ポリケタイドであり、これまでに約 10 化合物が報告されている。Abyssomicin I もこれらと共通の基本骨格を有するが、メチル基の置換様式が二か所異なり、既知の abyssomicin 類とは生合成基質の取り込み様式を異にする新規化合物であった。

第四章では、熱帯土壌由来 *Streptomyces* 属放線菌 BB47 株の生産する新規ペプチド系化合物の単離、構造決定、生物活性について述べている。BB47 株はタイ王国バンコク市の土壌から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Streptomyces* と同定した。本菌株は当初、果樹炭そ病の原因となる糸状菌に対して拮抗作用を示す生物防除剤として選抜された。培養物を HPLC により精査すると、ポリエン系化合物や呼吸鎖阻害剤 piericidin が糸状菌拮抗作用の原因物質として特定されたが、それらに加えて 280 nm 付近に吸収を示す未知化合物の生産が認められた。この化合物には抗カビ活性は見られなかったが、UV スペクトルの特徴から構造新規性が期待された。本菌株を A3M 液体培地で培養後、ブタノール抽出により得た抽出物を順相および逆相シリカゲルカラムで分画し、逆相系 HPLC カラムによる精製を行うことで、三種類の化合物 jomthonic acid A、B と C を得た。Jomthonic acid A の分子量は精密質量分析により $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ と予想された。NMR スペクトルもこの予想を支持するデータを示し、二次元 NMR スペクトルの解析により平面構造を決定した。本化合物は β -メチルフェニルアラニンのアミノ基に 4-メチル-2,4-ヘキサジエン酸が縮合し、カルボキシル基には 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸がエステル結合したアミノ酸誘導体であった。 β -メチルフェニルアラニンはこれまでに微生物二次代謝物の数例に見られる希少な異常アミノ酸であり、4-メチル-2,4-ヘキサジエン酸についても同じく数例の微生物代謝物に見出されているに過ぎない。このように jomthonic acid は希少な成分から構成されており、全体構造に類似した化合物は全く知られていない。 β -メチルフェニルアラニンのキラル標品は市販されていないため、ラセミ混合物の HPLC 分離により調製した標品と、jomthonic acid の塩酸加水分解により得た試料を逆相系 HPLC により比較することで相対立体配置を決定した。さらにキラル試薬による誘導体化反応を経て、Marfey 法により絶対配置を 2S, 3R と決定した。既知の β -メチルフェニルアラニンはすべて 2S, 3S-体であり、2S, 3R-

体の報告は今回が初めてであった。また、ヒドロキシ酸部位は UV 吸収を持たないために HPLC 等での検出が困難であったことから、カルボキシル基に蛍光アミンを縮合させることにより標識した。これを温和に加水分解し、得られた二級水酸基に改良 Mosher 法を適用することにより 3-ヒドロキシ-2-メチル酪酸は 2*R*, 3*R*-体であることを明らかにした。Jomthonic acid B と C の構造は A の NMR データと比較することにより、B では不飽和脂肪酸部分のメチル基が水素に置換した 2,4-ヘキサジエン酸となる類縁化合物であること、C ではヒドロキシ酸部分のメチル基が失われた 3-ヒドロキシ酪酸を有する類縁化合物であることを明らかにした。単離された物質量が少ないため、jomthonic acid B と C の立体構造の決定には至らなかった。様々な生物評価系で試験した結果、jomthonic acid 類が前駆脂肪細胞の分化誘導を活性化することを見出した。マウス由来 ST-13 前駆脂肪細胞に jomthonic acid を作用させると、成熟脂肪細胞へと分化し、細胞内に脂肪滴が蓄積された。成熟脂肪細胞はアディポネクチンを分泌し、糖や脂質の代謝を活性化することから、脂肪細胞分化誘導物質は糖尿病などの慢性疾患に有効な薬剤として期待されている。Jomthonic acid A と B は 25 から 50 μM で活性を示したが、C は同濃度でほとんど活性を示さなかった。このことから jomthonic acid の構造中でヒドロキシ酪酸部分が活性発現に関与していることが明らかとなった。

以上、第二章から第四章に詳述されているように、UV スペクトルを指標にしたケミカルスクリーニングにより、熱帯域で採取された *Streptomyces* 属放線菌から新規生理活性物質を探索し、三種の放線菌株から構造的に異なる三系統の新規化合物を得ることに成功した。得られた化合物はいずれも類縁構造が報告されていない高い新規性を有するか、単離報告の例数が少ない希少な構造的特徴を有するものであった。またいずれの化合物も癌細胞基底膜浸潤阻害、前駆脂肪細胞分化誘導など創薬リード化合物として有望な生物学的性質を示した。本研究を通じて、*Streptomyces* 属放線菌には未だ解明されていない二次代謝能が残されていることから、今後も医薬探索源として重要な生物資源として位置付けるべきであること、また新規構造の代謝物を得るためには UV ケミカルスクリーニングが有効的に機能することを結論づけている。

審査の結果の要旨

微生物二次代謝物は抗菌剤、抗癌剤、殺虫剤など様々な用途で利用されているが、近年の新規物質発見効率の低下に伴い、微生物からの新薬開発研究は減退している。一方で近年のゲノム解析により、*Streptomyces* 属放線菌のゲノムにはこれまで単離された化合物数を大きく上回る数の生合成遺伝子クラスターが存在しており、相当数の新規物質が未発見のまま残されていると予想されている。本論文では、代謝物の構造多様性が期待される熱帯由来 *Streptomyces* 属放線菌を対象に UV スペクトルを指標としたスクリーニングを行い、得られた化合物の構造新規性と生理活性の評価を通じて、*Streptomyces* 属放線菌が医薬探索源として重要な生物資源であり、UV ケミカルスクリーニングにより多様な新規構造の取得が可能であると結論づけている。主な内容は以下の通りである。

第一章では、微生物創薬の歴史と成功例、現状と問題点について説明し、本研究の目的と必要性を述べている。

第二章では、メキシコ土壌から分離した *Streptomyces* 属放線菌 CHI93 株から 2 種類のポリエーテル系新規化合物 *campechic acid A* と *B* を単離、構造決定した。これらはポリケタイド骨格が環状エーテルや多数のメチル分岐で修飾された特異な構造を有する。両化合物ともにマウス大腸癌由来 *colon 26-L5* 細胞の基底膜浸潤を IC_{50} 値が $10^{-7}M$ から $10^{-9}M$ の低濃度で阻害すること、特に *campechic acid A* がこれまで我々の研究室で見出された阻害剤の中で最強の活性を有し、抗癌剤リードとして有望な化合物であることを明らかにした。

第三章では、同じくメキシコ土壌から分離した *Streptomyces* 属放線菌 CHI39 株から新規多環性化合物 *abyssomicin I* を単離し、誘導體化、スペクトル解析を通じて、絶対配置を決定した。本化合物は天然物の中でも稀な多環骨格を有することに加えて、既知 *abyssomicin* 類には見られないメチル基置換様式を有しており、同属放線菌の生合成多様性を示す新たな例となった。また本化合物の酸化誘導體に優れた基底膜浸潤阻害活性を見出した。

第四章では、タイ土壌由来放線菌 *Streptomyces* sp. BB47 株からペプチド系新規化合物 *jomthonic acid A, B, C* を単離、構造決定した。これらは異常アミノ酸、 β -メチルフェニルアラニンに二つの修飾脂肪酸が結合した低分子であり、類似構造が存在しない、新規性の高い化合物群であった。このうち *jomthonic acid A* と *B* は前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞へと分化誘導し、インスリン抵抗性改善に有効な活性を示すことを見出した。

以上のように第二章から第四章まで、UV スペクトルを指標にしたケミカルスクリーニングにより *Streptomyces* 属放線菌から新規生理活性物質を探索し、得られた化合物の構造の面から同属放線菌二次代謝産物の多様性について論じている。得られた化合物にはいずれも構造新規性と多様性が認められ、生物活性の面でも創薬リードとして有望な性質が見られた。化合物の構造多様性は医薬探索において最も重要な要素の一つであることから、本研究で得られた知見が微生物創薬に関連する分野に与える影響は大きい。

平成 26 年 5 月 23 日に博士論文の審査および最終試験を行った結果、申請者は学術研究にふさわしい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と独立して研究を遂行する能力を有するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。