

論文審査報告書

氏名	むはんまど ろこん うる かりむ Md. Rokon Ul Karim
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博生第 32 号
学位授与日	令和 3 年 9 月 24 日
論文題目	Exploitation of a marine bacterial resource for drug lead discovery (医薬探索のための海洋細菌資源の開拓)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 五十嵐 康弘 教授 占部 大介 教授 小山 靖人 講師 奥 直也 東京海洋大学 教授 今田 千秋

内容の要旨

アオカビからのペニシリン、放線菌からのストレプトマイシンの発見を契機として、人類は微生物の生産物を医薬に応用することを学び、以来、抗生物質を中心として、抗癌剤、高脂血症治療薬、免疫抑制剤など多岐にわたる医薬品が微生物により生産され、我々の健康維持に役立てられている。微生物からの医薬探索は、数十年にわたり各国の企業や大学の研究機関において、主として土壌の放線菌と糸状菌を対象に繰り返行われたため、それら微生物からの新規物質発見は次第に困難となり、1990年代以降、微生物からの新薬開発のペースは以前に比べて鈍化している。その後、天然物に替わる探索源としてコンビナトリアル合成化合物からのスクリーニングが主流となり、再生医療や高分子医薬品の実用化も進められてきたが、過去 30 年間に上市された医薬品のほぼ半数は天然物に由来している。これは、創薬で求められる新規リード構造を得るためには、天然物の利用が有効であることを示唆している。それゆえ、遺伝子工学による生合成経路の改変、二次代謝遺伝子の活性化、特異環境からの未利用微生物探索など、新規天然物を得るためにさまざまなアプローチがなされている。本論文では、二次代謝遺伝子に生息環境の違いが反映されているとの仮定に基づき、環境の特異性に着目した微生物探索による新規二次代謝物の取得を目指した。

特異環境として、まず、サンゴやカイメンなどの固着性海洋無脊椎動物に共生する海洋細菌に着目した。それら自ら移動することのできない海洋動物は、捕食者や病原菌の攻撃から逃れるため、共生微生物が生産する忌避物質や抗菌性物質を体内に蓄積し、身を守っていると考えられている。このような生態環境は陸上には見られず、海洋固有の微生物叢が形成されている。加えて、海洋環境に特異的な塩要

求性細菌は、これまでの陸上微生物を対象とした探索研究ではスクリーニングされずに取り残されている。一方で、水深 200 m 以深の海水として定義される海洋深層水は、食品加工や水産養殖などに利用されているが、深層水中の微生物研究はあまりなされておらず、特に微生物二次代謝物に関する知見は少ない。日本の 15 カ所で採水される深層水の中でも、日本海固有水と呼ばれる富山湾深層水は外洋との交換が少なく、独自の生態系が形成されている。それゆえ微生物叢においても固有であり未利用微生物の存在が期待された。以上の背景に基づき、本研究ではサンゴから分離された細菌 2 株と富山湾深層水から分離された放線菌 1 株の生産物解析を行い、それらの医薬探索資源としての新規性および有用性を評価した。本論文は全 5 章から構成されており、各章の主な内容は以下の通りである。

第一章では、天然物創薬の歴史、現状と問題点、将来の展望について、特に微生物由来化合物を中心に概説し、本研究の目的と意義を論じている。

第二章では、*Microbulbifer* 属細菌 DC3-6 株が生産する新規アルカノイルイミダゾール類の単離、構造決定、生物活性について述べている。生産菌は *Tubastraea* 属イシサンゴ体内から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性からガンマプロテオバクテリア綱に属する *Microbulbifer* 属細菌と同定された。*Microbulbifer* は非運動性グラム陰性桿菌の一種で、生育に海水を要求する。これまで海底堆積物や塩田からの分離が報告されているが、生産物に関しては安息香酸エステル誘導体と不飽和脂肪酸の二例しか知られていない。DC3-6 株を三種類の液体培地で物質生産を比較したところ、A11M 海水培地で培養したときに 254 nm に吸収極大をもつ UV スペクトルの未知化合物が生産された。そこで培養抽出物から分画、精製を行い、三種の新規化合物 (bulbimidazole A, B, C と命名) を得た。Bulbimidazole A の ¹H NMR スペクトル中には 2 個の sp²プロトンが観測され、HSQC, HMBC 実験ではそれらから sp²領域の炭素に相関ピークが検出された。しかし ¹³C NMR スペクトル中に sp²炭素が一つも見られなかったことから、何らかの互変異性構造を有すると予想した。そこで測定溶媒の DMSO-d₆ に微量の TFA を添加し、緩和時間を通常より長く設定して測定することにより、カルボニル炭素を含む 4 個の sp²シグナルを検出した。以降、二次元 NMR と MS データに基づき、アルカノイルイミダゾール構造を決定した。Bulbimidazole B と C はいずれもアルキル側鎖末端が異なる類縁体であった。次いで、bulbimidazole A のアンテイソメチル基の絶対配置を大類と赤坂が開発したキラルアントラセン試薬による誘導体化と低温 HPLC により分析し、本化合物が R 体と S 体が 9:91 の混合物であることを明らかにした。Bulbimidazole 類はいずれもヒトや魚類の病原菌であるグラム陽性細菌 *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、グラム陰性細菌 *Tenacibaculum maritimum* (魚類皮膚感染症の原因菌)、真菌類 *Candida albicans* (カンジダ)、*Trichophyton rubrum* (白癬菌) などに MIC 0.78~12.5 μg/mL で広範な抗菌活性スペクトラムを示した。

第三章では、*Kocuria* 属細菌 T35-5 株が生産する二種の新規アルカノイルイミダゾールと三種の既知類縁化合物の単離、構造決定、生物活性について述べている。生産菌は、*Mycedium* 属イシサンゴ体内から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Kocuria* 属細菌と同定された。*Kocuria* は放線菌門に属する球菌で、陸海を問わず幅広い環境に見出される。海洋ではカイメンやサンゴ等の無脊椎動物に共生することが知られているが、通常は塩要求性を示さない。しかし T35-5 株は生育に海水を要求することから、海洋環境に適応した特異種であることが示唆された。T35-5 株を三種類の液体培地で物質生産を比較したところ、A11M 海水培地で培養したときに 296 nm 付近に吸収極大をもつ UV スペクトルの未知化合物が生産された。そこで、それらの単離、構造解析を行い、既知化合物 nocarimidazole A と B, bulbimidazole A に加えて、新規類縁体 nocarimidazole C と D を得た。Nocarimidazole A と B は Fenical らが海洋由来放線菌 *Nocardioopsis* から単離しており、その報文中ではイミダゾール環のアミノ置換が 2 位と 4 位のいず

れであるか NMR 解析のみでは区別出来なかったことから、二種類の *N*-メチル誘導体を調製しそれらの HMBC データを解析することで 4 位と結論していた。本論文では、イミダゾールの 2 位と 4 位の ^1H - ^{13}C 直接結合定数(J_{CH})に 15 ppm 以上の差があることを示した報告に着目し、 J_{CH} 値に基づきアミノ基の置換位置を決定した。まずモデル化合物として 4-acetyl-5-aminoimidazole (化合物 **a**) と 4-acetyl-2-aminoimidazole (化合物 **b**) を合成し、それぞれの環上メチンの J_{CH} を coupled HSQC にて測定した。その結果、2 位は 215 Hz (化合物 **a**)、4 位は 201 Hz (化合物 **b**) であり、アシル-アミノ置換イミダゾールにおいても約 15Hz の差があることを確認した。続いて nocarimidazole **C** について同様の測定を行い、 sp^2 メチンの J_{CH} が 221 Hz であったことから、nocarimidazole 類におけるアミノ基の置換位置が Fenical らの結論どおりイミダゾール 4 位であることを確認した。アミノ基を有さない bulbimidazole **A** についても J_{CH} を測定し、2 位では 221 Hz、4 位では 204 Hz であり、イミダゾール環上の置換位置決定に J_{CH} 測定が有効であることを示した。Nocarimidazole **C** と **D**、T35-5 株から得られた bulbimidazole **A** のアンテイソメチル基の絶対配置を大類・赤坂法により解析したところ、nocarimidazole **C** では *S* 配置が 100% であったのに対し、nocarimidazole **D** では *R*:*S*=73:27 と *R* 体が過剰であり、さらに bulbimidazole **A** では生産菌ごとに *R*/*S* 比が異なっていた。アンテイソ分岐脂肪酸は細菌の膜成分に広く分布しており、末端アルキル基は *L*-イソロイシンが生合成前駆体であることから分岐不斉の立体配置は *S* であり、二次代謝物においても同様の *S* 配置と考えられていた。しかし、少なくとも細菌が生産するアルカノイルイミダゾール類においては、*R* 体が混在しており、その割合が一定ではないことを初めて明らかにした。Nocarimidazole 類も bulbimidazole 類と同様に黄色ブドウ球菌、カンジダ、白癬菌などのヒト病原性微生物に広範な抗菌スペクトラムを示したが、活性は MIC 6.25~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と全般的に弱いことから、アミノ基置換の有無がアルカノイルイミダゾール類の活性の強弱に影響することが示唆された。

第四章では、*Streptomyces* 属放線菌 N11-34 株が生産する二種の新規環状ペプチドの単離、構造決定、生物活性について述べている。N11-34 株は、入善富山湾海洋深層水採水施設のろ過フィルターから分離され、16S rRNA 遺伝子解析により *Streptomyces* 属と同定された。*Streptomyces* は放線菌の中でも最も分離頻度が高く、これまでに約 9000 化合物が報告されており、本属からの新規化合物発見は容易でない。しかしながら N11-34 株の培養抽出物解析において未知化合物の生産が認められたため、単離、構造解析へと進め、新規化合物 nyuzenamide **A** と **B** を得た。Nyuzenamide **A** の NMR スペクトルではペプチド化合物に特徴的なシグナルが観測されたため、NMR 解析と並行して、キラル GC-MS による酸加水分解物のアミノ酸組成分析を行い、D-Asn、D-Leu、L-Pro、L-Thr、L-Val、Gly が含まれることを確認した。さらに二次元 NMR 解析により、4 個の異常アミノ酸としてヒドロキシグリシン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、4-ヒドロキシフェニルグリシン、 α -ヒドロキシチロシンの存在を確認した。加えて、ポリケタイド経路に由来する芳香環ユニットの存在も確認された。これら 6 個の正常アミノ酸、4 個の異常アミノ酸、1 個のポリケタイド由来芳香環ユニット間の結合様式の解明は、HMBC、ROESY スペクトル解析、ならびに X 線結晶解析により行い、nyuzenamide **A** の二環性構造と絶対配置が決定された。同様に nyuzenamide **B** の構造解析を行い、ポリケタイド由来芳香環部位の構造が異なることを明らかにした。Nyuzenamide 類は、4 種の希少な異常アミノ酸を含有することに加えて、分子全体から見ても類似化合物が存在しない新規骨格化合物であった。両化合物ともに、ヒト皮膚病の白癬菌、植物病害の炭疽病菌に選択的な抗カビ活性を示すと同時に、マウス白血病細胞の増殖抑制活性を示した。

第五章では、前章までの内容を総括し、結論を述べている。

審査の結果の要旨

感染症をはじめとする様々な疾病の治療薬が微生物から発見、実用化されてきたが、薬剤耐性菌や生活習慣病の増加に対応した新薬の継続的開発が求められている。しかし、医薬探索の中心とされてきた陸生の糸状菌や放線菌から新規物質を得ることが困難となり、新薬探索のための新たな天然資源の開拓が求められている。微生物二次代謝物は自らの生存を有利にするために生産され、例えば環境中での生存競争における他微生物の生育抑制、植物や動物の防御機能の攪乱による感染確立などに利用されている。海洋には陸上に見られない生物間相互作用が存在することから、海洋微生物は固有の二次代謝系を進化させてきたことが推察される。以上の背景に基づき、本研究では海洋由来細菌と放線菌の生産物解析を通じて、それらの医薬探索資源としての新規性ならびに有用性を評価した。主な内容は以下の通りである。

第一章では、天然物創薬の歴史、現状と問題点、将来の展望について、微生物由来化合物を中心に概説し、本研究の目的と意義を論じている。

第二章では、*Tubastraea* 属イシサンゴから分離したガンマプロテオバクテリア綱 *Microbulbifer* 属細菌 DC3-6 株から、イミダゾール 3 位がアシル化された三種の新規アルカノイルイミダゾールを単離し、スペクトル解析により構造を決定した。天然由来アルカノイルイミダゾールは一例しか報告がなく、希少構造の化合物の発見であることに加えて、*Microbulbifer* 属からはこれまで安息香酸エステル誘導体と不飽和脂肪酸の二例しか生理活性物質の報告がなく、本研究を通じて同属細菌の有用物質生産能を示す新たな知見を得ることができた。また、得られた新規化合物はいずれもヒトや魚類、植物の病原性細菌および糸状菌に幅広い抗菌性を示すことを明らかにした。

第三章では、*Mycedium* 属イシサンゴから分離したアクチノバクテリア綱 *Kocuria* 属細菌 T35-5 株から二種の新規アルカノイルイミダゾールを単離した。その構造決定にあたり、イミダゾール環上のアミノ基置換位置決定に水素-炭素直接結合定数の測定が有効であることを示した。また、天然有機化合物中の立体中心は *R* または *S* 配置のいずれか一方のみであるのが通例だが、アルカノイルイミダゾールのアンテイソメチル基が両絶対配置の混合物であることを明らかにした。得られた新規化合物はいずれも、上述のアルカノイルイミダゾールと同様にヒトや植物の病原菌に幅広く抗菌作用を示すことを明らかにした。

第四章では、富山湾海洋深層水から分離した *Streptomyces* 属放線菌 N11-34 株から二種の新規環状ペプチドを単離、構造決定した。スペクトル解析、X 線結晶解析により、いずれも 6 個の正常アミノ酸と 4 個の異常アミノ酸を含む二環性構造の新規骨格化合物であることを明らかにした。放線菌からは多様な環状ペプチドが報告されているが、本研究で見出された化合物に類似するものは知られていない。また、いずれの新規化合物もヒトと植物の病原性糸状菌に対する選択的抗菌作用、ならびにマウス白血病細胞の増殖抑制作用を示すことを明らかにした。

以上、第二章から第四章に詳述されているように、海洋無脊椎動物ならびに海洋深層水から分離された細菌類の二次代謝物解析を通じて、ガンマプロテオバクテリア綱 *Microbulbifer* 属、ならびに放線菌門 *Kocuria* 属と *Streptomyces* 属から新規抗生物質を見出すことに成功した。得られた化合物はいずれも既知化合物とは異なる構造上の特長を有し、幅広い抗菌活性スペクトルあるいは選択性の高い抗菌活性を示すなど創薬リード化合物として有望な特性を有していた。医薬探索における重要な要素である構造多様性と新規性に優れた化合物を得る上で、新たな探索源となり得る微生物群を見出した点において、今後

の有用微生物探索に与える影響は大きく，生物工学的価値が認められる。

研究成果は，申請者が筆頭著者の3件の査読付き，国際学術誌に掲載されている。2021年3月24日に予備検討委員会を開催，2021年7月28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。