

論文審査報告書

氏名	ちょう ちい 張 智偉
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生医第1号
学位授与日	令和4年3月19日
論文題目	Study on secondary metabolites of marine-derived actinomycetes (海洋由来放線菌の二次代謝物に関する研究)
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 中島 範行 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ならびに放線菌からのストレプトマイシンの発見以来、多岐にわたる医薬品が微生物から発見され、我々の健康維持に役立てられてきた。微生物の中でも特に放線菌が生産する化合物は構造多様性に優れ、抗生物質、抗寄生虫薬、抗癌剤、免疫抑制剤、農業用薬剤など100品目以上が実用化されている。放線菌からの医薬探索は、数十年にわたり各国の企業や大学の研究機関により、土壌から分離された放線菌を対象に繰り返行われてきた。そのため、遺伝的に似通った放線菌が繰り返し分離されることとなり、新規物質を生産する放線菌の取得が次第に困難となった。この問題を解決するため、土壌に代わる分離源として、植物、極限環境、海洋など新たな探索源の開拓が進められてきたが、中でも特に注目を集めているものが海洋環境である。地球表面の70%を占める海洋には、地球上の全生物量の95%が存在すると見積もられており、相当数の未研究微生物が海洋に残されていると期待されている。

捕食者や病原菌などさまざまな選択圧に曝されている海洋無脊椎動物は、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することで、それらのストレスに抵抗していることが示唆されている。そのような海洋固有の生態系には、陸上とは異なる独自の微生物叢が形成されており、新規生理活性物質の有望な探索源になると期待された。一方で、水深200m以深の海水として定義される海洋深層水中の微生物研究は、本研究室における富山湾深層水に関する研究以外はこれまで積極的になされていなかった。日本では、北海道から沖縄まで全国の15カ所で海洋深層水が採水・利用されており、東京海洋大学の今田らは各地の深層水中の環境DNA解析を行い、微生物構成が採水地により異なり、特に相模湾

と沖縄の海洋深層水中に未知微生物の割合が多いことを報告している。以上の背景に基づき、本論文では海洋無脊椎動物としてイシサンゴと軟体動物から分離された放線菌2株、ならびに相模湾と沖縄の海洋深層水から分離された放線菌2株を研究対象として選定し、それらの生産物解析を通じて、海洋由来放線菌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6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、海洋天然物に関する研究の歴史と現状から海洋微生物から発見された生理活性物質とその応用について概説し、本研究の目的と意義を論じている。

第二章では、*Streptomyces* 属放線菌 DC4-5 株が生産する新規36員環マクロライド配糖体の単離、構造決定、生物活性について述べている。生産菌は、三重県で採取された *Dendrophyllia* 属イシサンゴの体内から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Streptomyces* 属放線菌と同定された。但し、同株は最も近縁の既知種への相同性が99.2%と低く、新種 *Streptomyces* と推察された。DC4-5 株を三種類の液体培地で物質生産を比較したところ、A3M 培地で培養したときに特徴的な UV スペクトルをもつ未知化合物の生産が認められた。そこで培養抽出物から分画、精製を行い、3つの新規化合物 (iseolide A, B, C) を得た。Iseolide A の ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは典型的な I 型ポリケチドの特徴を示した。各種二次元 NMR の解析により炭素骨格を解析し、マクロライド部位、ナフトレン部位、糖部位から成る新規構造を有することを明らかにした。その過程で、マクロライド環の一部に6員環ヘミアセタールが形成されていることを重水素シフト実験により証明した。糖部位の立体構造は ROESY スペクトルにより解析し、1個の axenose と2個の rhodinose から成ることを明らかにした。NMR データの比較により、iseolide B では iseolide A の水酸基が一つ少なく、iseolide C では iseolide A のメチル基がエチル基に置換された類縁体であると決定した。さらに3化合物の MS/MS スペクトルにおけるフラグメントパターンの解析により、NMR により得た構造が正しいことを確認した。Iseolide 類に類似の構造をもつ天然物は、いずれも *Streptomyces* の生産物として5例しか報告されておらず、希少性が高い二次代謝物であった。Iseolide 類は、グラム陰性細菌 *Ralstonia solanacearum* (作物の青枯病菌) に弱い抗菌活性を示す一方で、ヒトや植物の病原性糸状菌 *Candida albicans* (カンジダ)、*Trichophyton rubrum* (白癬菌)、*Glomerella cingulata* (炭疽病菌) に MIC 0.19~6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の強い抗菌活性を示した。3化合物の中では iseolide A が最も強い活性を示した。

第三章では、*Streptomyces* 属放線菌 TMKS8 株が生産する新規ナフトキノ誘導体の単離、構造決定、生物活性について述べている。生産菌は、インドネシアで採取されたウミウシの一種 (*Paromoionchis*) の体内から分離され、16S rRNA 遺伝子の相同性から *Streptomyces* 属放線菌と同定された。TMKS8 株を三種類の液体培地で物質生産を比較すると、A3M 培地で培養したときに多環芳香族化合物に特徴的な UV スペクトルをもつ複数の化合物の生産を認められた。次いで、それらの単離、構造解析を行い、5つの既知ナフトキノ系メロテルペノイド化合物に加えて、新規化合物 TMKS8A を得た。既知化合物はいずれもナフトキノ母核にジメチルアリル基、ゲラニル基が置換していることに加えて、塩素原子による修飾を受けていた。TMKS8A の NMR 解析により、キノ構造とベンゼン環を有することが示唆されたが、*o*-キノと *p*-キノの二通りの可能性が考えられ、NMR では区別ができなかった。そこで量子化学計算により、可能な二つの構造式に対して NMR 化学シフトの予測値を求め、実測値と比較した。その結果、*o*-キノの ^{13}C NMR において複数の炭素で予測値と実測値が大きく異なり、*p*-キノ構造が正しいと結論した。TMKS8A ではナフトキノ核に置換したジメチルアリル基が環化し、6員環エーテルを形成していた。その環には塩素原子が置換し、不斉炭素原子が存在することから、絶対配置を決定する

ため、ECD スペクトルを理論計算して求め、実測スペクトルと比較した。その結果、絶対配置を *R* と決定した。TMKS8A は、グラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* と *Kocuria rhizophila* に中程度の抗菌活性を示した。また、マウス白血病細胞の増殖を IC₅₀ 値 9.8 μM で阻害した。

第四章では、*Actinomadura* 属放線菌 AKA43 株が生産する 3 つの新規ポリケチドの単離、構造決定、生物活性について述べている。AKA43 株は、静岡県伊豆赤沢沖合、相模湾の水深 800 m から採水された海洋深層水のろ過フィルターから分離され、16S rRNA 遺伝子解析により *Actinomadura* 属と同定した。*Actinomadura* 属は希少放線菌の一種で、堆肥など比較的高温の環境から分離されやすいが、これまで海洋深層水からの分離報告はなかった。AKA43 株の物質生産能を三種類の液体培地で比較したところ、A16 培地と A11M 培地でそれぞれ異なる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、A16 培地から新規化合物 nomimicin B と C を、A11M 培地から nomimicin D を得た。Nomimicin B の構造は NMR 解析により、当研究室で堆肥由来 *Actinomadura* 属放線菌から発見した抗生物質 nomimicin A のデヒドロデカリン環に水酸基が 2 つ付加され、総計 4 つの水酸基が 1 つの 6 員環上に存在する高度に酸化された構造を有していた。相対配置は ROESY スペクトルとカップリング定数の解析により、また絶対配置は nomimicin A との ECD スペクトルの比較により決定した。同様の構造解析により nomimicin C では nomimicin A に水酸基が 1 つ付加された新規化合物であることを明らかにした。一方、nomimicin D では、nomimicin A と同様のデヒドロデカリン環構造を有していたが、テトロン酸を介する 12 員環構造が形成されておらず、nomimicin A の生合成前駆体と推察された。Nomimicin A のようなスピロテロン酸系化合物では、ポリケチド鎖伸長後に分子内 Diels-Alder 反応により大環状構造が形成される。他のスピロテロン酸系化合物では生合成変異株から、分子内環化前の化合物が得られた例はあるが、天然物として Diels-Alder 反応の基質となる前駆体が得られた報告はない。これらの結果は、海洋由来の *Actinomadura* 属放線菌が陸上由来のそれとは異なる代謝系を有していたことを示唆している。なお、Nomimicin B と C は、グラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* と *Kocuria rhizophila* に中程度の抗菌活性を示した。また、中程度の増殖阻害活性をマウス白血病細胞に対して示した。

第五章では、*Actinomadura* 属放線菌 KD439 株が生産する 7 つの新規芳香族ポリケチドの単離、構造決定、生物活性について述べている。KD439 株は、沖縄県久米島の海洋深層水採水施設で水深 612 m から汲み上げられた深層水約 3,000 L をろ過したフィルターから分離され、16S rRNA 遺伝子解析により *Actinomadura* 属と同定した。KD439 株の物質生産能を三種類の液体培地で比較したところ、A16 培地で複数の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、既知化合物 SF2315B と miasporone E に加えて、新規化合物 kumemicinone A~G を得た。Kumemicinone A の平面構造は NMR 解析により、エポキシ環を有する新規 angucyclinone 系ポリケチドであることを明らかにした。また、その絶対配置は X 線結晶解析により決定した。Kumemicinone B は A と同一の平面構造を有していたが、三級水酸基の立体が反転したジアステレオマーであることを NOESY 解析により明らかにした。また、その絶対配置は kumemicinone A と同じであること ECD スペクトルとの比較により決定した。Kumemicinone C は A のエポキシ環が開環した新規類縁体であることを NMR 解析により明らかにしたが、立体構造の決定には至らなかった。本化合物には不斉炭素原子が 3 個存在し、可能な相対配置は 4 通り考えられた。そこで量子化学計算により 4 通りの構造に対して NMR 化学シフトの予測値を求め、天然物のデータと比較することにより、天然物に最も近い値を示した相対配置が得られ、それを天然物の相対構造として決定した。さらに、ECD スペクトルの実測データと計算データの比較により絶対配置を決定した。Kumemicinone D は A, B, C とは異なり、angucyclinone が骨格転位したスピロ化合物であった。Kumemicinone C と同様

に、量子化学計算により得られた NMR 化学シフトと ECD スペクトルの予測データを天然物の実測データと比較することにより、可能な相対配置 4 通りから天然物の構造を絞り込むことに成功した。Kumemicinone E は SF2315B 二分子がカップリングした二量体であることを NMR 解析により明らかにし、絶対配置は X 線結晶解析により決定した。一方で、kumemicinone F は SF2315B と kumemicinone A がカップリングした二量体構造を有していた。さらに、kumemicinone G では angucyclinone 構造の環の一つが芳香族化した単量体が、エポキシ環の開環を伴い、硫黄原子を介して二量体化していた。これら新規化合物のうち、kumemicinone D のスピロ骨格は報告例がない新規構造であり、kumemicinone E, F, G のような angucyclinone 二量体もまた前例のない構造であったことから、海洋深層水が未知構造の探索資源として有望であることが示唆された。Kumemicinone 類は一般細菌、酵母、糸状菌に対する抗菌性を示さなかったが、P388 マウス白血病細胞の増殖を IC₅₀ 値 1.8 から 53 μM の範囲で阻害し、kumemicinone A が最も強い活性を示した。

第六章では、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

放線菌は有用物質生産微生物として抗生物質や抗癌剤等の医薬品の生産に利用されている。しかし、長年にわたり土壌放線菌から探索がなされた結果、近年では新規化合物を得ることが困難となり、土壌に代わる新たな放線菌分離源の開拓が必要とされている。海洋微生物研究の歴史は比較的浅く、相当数の未研究微生物が今後発見、利用されていくと期待されており、実際に特に海洋無脊椎動物からは陸生生物とは異なる化学構造や顕著な生理活性を有する化合物が多数発見されている。本研究では、海洋由来放線菌 4 株から計 14 個の新規化合物を発見し、それらがヒトや植物の病原菌に対する抗菌活性やマウス白血病細胞の増殖阻害活性を有することを明らかにし、海洋由来放線菌が陸生放線菌に代わる新規生理活性物質探索源として有望であるとの結論に至った。主な内容は以下の通りである。

第一章では、海洋天然物に関する研究の歴史と現状から海洋微生物から発見された生理活性物質とその応用について概説し、本研究の目的と意義を論じている。

第二章では、*Dendrophyllia* 属イシサンゴから分離した *Streptomyces* 属放線菌 DC4-5 株から、3 種の新規 36 員環マクロライド配糖体を見出した。類縁構造が 5 例しか報告のない希少性が高い二次代謝物であった。また、生産菌 DC4-5 株は最も近縁の既知種に 99.2% の低い 16S rRNA 遺伝子相同性を示し、新種の *Streptomyces* と推察された。得られた新規化合物はいずれもヒトや植物の病原性糸状菌に強い抗菌性を示した。

第三章では、ウミウシの一種 (*Paromoionchis*) から分離した *Streptomyces* 属放線菌 TMKS8 株から塩素原子を含む新規ナフトキノンを発見した。量子化学計算により得た NMR 化学シフト値と ECD スペクトルの実測データとの比較により平面構造および絶対立体配置を決定した。得られた新規化合物は、グラム陽性細菌に対する抗菌性、マウス白血病細胞の増殖抑制作用を示した。

第四章では、相模湾海洋深層水から分離した *Actinomadura* 属放線菌 AKA43 株から、2 種の新規スピロテロン酸系化合物を発見した。同系統の化合物中、最小の 12 員環構造を有する点と、高度に酸化されている点が特徴であり、いずれもグラム陽性細菌に抗菌性を示した。また、それらの生合成前駆体となる非環化テロン酸を天然物として初めて単離した。

第五章では、沖縄久米島の海洋深層水から分離した *Actinomadura* 属放線菌 KD439 株が、7 種の新規芳香族ポリケタイドを生産することを見出した。その中には、新規骨格をもつもの、前例のない二量体構造を有するものが含まれていた。また、スペクトル解析では決定困難な立体構造を、量子化学計算による NMR 化学シフト値予測に基づき明らかにした。得られた新規化合物の多くはマウス白血病細胞に対し優れた増殖抑制活性を示した。

第六章では、前章までの内容を総括し、結論を述べている。

以上、第二章から第五章に詳述されているように、海洋無脊椎動物と海洋深層水から分離された放線菌の二次代謝物解析を通じて、*Streptomyces* 属放線菌 2 株と *Actinomadura* 属放線菌 2 株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抗菌活性や癌細胞の増殖抑制活性を示すなど創薬リード化合物として有望な作用を有していた。また、土壌放線菌由来の既知化合物とは異なる構造上の長を有し、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、新たな探索源となる天然資源を見出した点において、今後の医薬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論文が査読付き国際学術誌に 3 件が掲載済みで、1 件の掲載が予定さ

れている。2021年11月16日に予備検討委員会を開催，2022年2月10日に博士論文の審査および最終試験を行った結果，申請者は学术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。