

放線菌由来二次代謝産物の 物理化学的性状による 新規天然物の探索

指導教授

北里大学北里生命科学研究所 微生物応用化学研究室

塩見 和朗

北里大学大学院感染制御科学府

創薬科学履修コース 細胞機能制御科学

DI-15002 木村 徹

目次

略語

序論 1

本論

第 1 章 土壌分離希少放線菌からの新規物質の探索 7

第 1 節 Sagamilactam に関する研究

1. 新規物質探索に用いた菌株の選定 8

1-1 材料および方法

1-1-1 用いた菌株

1-1-2 生産培地

1-1-3 培養および二次代謝産物の LC/UV-LC/MS 解析

1-2 結果および考察

1-2-1 菌株の選択

1-2-2 LC/UV によるサンプルの選定

1-2-3 LC/MS による代謝産物のプロファイル

2. *Actinomadura* sp. K13-0306 株が生産する二次代謝産物の精製 18

2-1 *Actinomadura* sp. K13-0306 株の生産培養

2-2 Sagamilactam の単離精製

3. Sagamilactam の物理化学的性状および構造解析 20

3-1 分析機器および試薬

3-2 方法および結果

3-3 Sagamilactam の構造解析

4. Sagamilactam の生物活性評価	28
4-1 材料	
4-1-1 Sagamilactam の抗菌活性試験	
4-1-2 Sagamilactam の細胞毒性試験	
4-1-3 Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性評価	
4-2 方法	
4-2-1 Sagamilactam の抗菌活性試験	
4-2-2 Sagamilactam の細胞毒性試験	
4-2-3 Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性評価	
4-3 結果	
4-3-1 Sagamilactam の抗菌活性試験	
4-3-2 Sagamilactam の細胞毒性試験	
4-3-3 Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性評価	
5. Sagamilactam 生産株の分類研究	33
5-1 化学分類学的性状試験	
5-2 培養性状および形態観察	
5-3 生理生化学性状試験	
5-4 遺伝学的解析	
5-5 Sagamilactam 生産株の分類学的位置	
第2節 まとめ	51
第2章 海洋分離希少放線菌からの新規物質の探索	52
第1節 Mumiamicin に関する研究	53
1. 新規物質探索に用いる菌株および培養液サンプルの選定	
1-1 材料および方法	
1-1-1 新規物質探索に用いる菌株の選定	
1-1-2 培地	
1-1-3 培養液サンプルの調製	
1-1-4 LC/UV-MS 解析	
1-1-5 生産菌の菌学	
1-2 結果および考察	
1-2-1 LC/UV-MS による生産物質のプロファイル	
1-2-2 Mumiamicin 生産菌株の分類学的位置	

2.	<i>Mumia</i> sp. YSP-2-79 株が生産する二次代謝産物の精製	59
2-1	<i>Mumia</i> sp. YSP-2-79 株の生産培養	
2-2	Mumiamicin の単離精製	
3.	Mumiamicin の物理化学的性状および構造解析	61
3-1	Mumiamicin の物理化学的性状	
3-2	Mumiamicin の構造解析	
4.	Mumiamicin の生物活性評価	64
4-1	材料	
4-1-1	Mumiamicin の抗菌活性	
4-1-2	Mumiamicin の細胞毒性試験	
4-1-3	Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)に対する抗酸化効果	
4-2	方法	
4-2-1	Mumiamicin の抗菌活性	
4-2-2	Mumiamicin の細胞毒性試験	
4-2-3	Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)に対する抗酸化効果	
4-3	結果	
4-3-1	Mumiamicin の抗菌活性	
4-3-2	Mumiamicin の細胞毒性試験	
4-3-3	Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)に対する抗酸化効果	

第2節	Tatemasporine に関する研究	67
1.	新規物質探索に用いる菌株および培養液サンプルの選定	68
1-1	材料および方法	
1-1-1	新規物質探索に用いる菌株の選定	
1-1-2	培養液サンプルの調製	
1-1-3	LC/UV-MS 解析	
1-2	結果および考察	
1-2-1	<i>Actinomycespora</i> sp. YM25-058 株の培養液抽出物の LC/UV-MS 解析	
2.	<i>Actinomycespora</i> sp. YM25-058 株が生産する二次代謝産物の精製	70
2-1	<i>Actinomycespora</i> sp. YM25-058 株の生産培養	
2-2	Tatemasporine の単離精製	
3.	Tatemasporine の物理化学的性状、構造解析および生物活性	71
3-1	Tatemasporine の物理化学的性状	
3-2	Tatemasporine の構造解析	
3-3	Tatemasporine の生物活性	
4.	Tatemasporine 生産株の分類学的位置	76
4-1	方法	
4-2	結果	
第3節	まとめ	83

第 3 章 北里生命科学研究所保有菌株を用いた新規物質の探索	84
第 1 節 Virantmycin B および C に関する研究	85
1. 新規物質探索に用いる菌および培養液サンプルの選定	
1-1 新規物質に用いる菌株の選定	
1-2 結果および考察	
2. <i>Streptomyces</i> sp. AM-2504 株が生産する二次代謝産物の精製	88
2-1 <i>Streptomyces</i> sp. AM-2504 株の生産培養	
2-2 Virantmycin B および C の単離精製	
3. Virantmycin B および C の物理化学的性状および構造解析	90
3-1 Virantmycin B および C 物理化学的性状	
3-2 Virantmycin B の構造解析	
3-3 Virantmycin C の構造解析	
4. Virantmycin B および C の生物活性評価	97
4-1 方法および結果	
4-1-1 Virantmycin B および C の抗菌活性試験	
4-1-2 Virantmycin B および C の細胞毒性試験	
第 2 節 Pyrizomicin A および B に関する研究	98
1. <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> K10-0216 株を用いた PC screening	99
1-1 スクリーニング方法および結果	
1-2 <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> K10-0216 株の培養および pyrizomicin の精製	
1-2-1 <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> K10-0216 株の培養	
1-2-2 Pyrizomicin の単離精製	
2. Pyrizomicin A および B の物理化学的性状および構造解析	102
2-1 Pyrizomicin A および B の物理化学的性状	
2-2 Pyrizomicin A および B の構造解析	
3. Pyrizomicin A および B の生物活性評価	106
3-1 方法	
3-2 結果	

4. Pyrizomicin の生合成研究	107
4-1 Pyrizomicin 生産菌のゲノム DNA 抽出	
4-2 <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> K10-0216 株のドラフトゲノムシーケンス解析および pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの推定	
4-3 コスミドライブラリーの作製	
4-4 コスミドライブラリーからの pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの探索	
4-5 Pyrizomicin 生合成遺伝子クラスター全領域のクローニング	
4-6 <i>orf9</i> (LuxR ファミリー転写制御因子をコードする遺伝子)の発現ベクターの作製	
4-7 接合伝達による大腸菌から放線菌へのプラスミド導入	
4-8 Pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの異種発現	
第3節 まとめ	116
総括	118
添付資料	122
参考文献	188
謝辞	192

略語

calcd.	calculated
COSY	correlation spectroscopy
DAP	diamino pimelic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
ESI-MS	electron spray ionization mass spectrometry
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethyl alcohol
Fr(s)	fraction(s)
HMBC	¹ H detected multiple bond heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	high resolution mass spectrometry
HSQC	¹ H detected single quantum coherence
IR	infrared
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MBI	Marine biotechnology Institute
MeOH	methyl alcohol
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
PC	physicochemical screening
ROESY	rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
rpm	rotation per minute
R.T.	retention time
TFA	trifluoroacetic acid
TLC	thin-layer chromatography
UV	ultraviolet

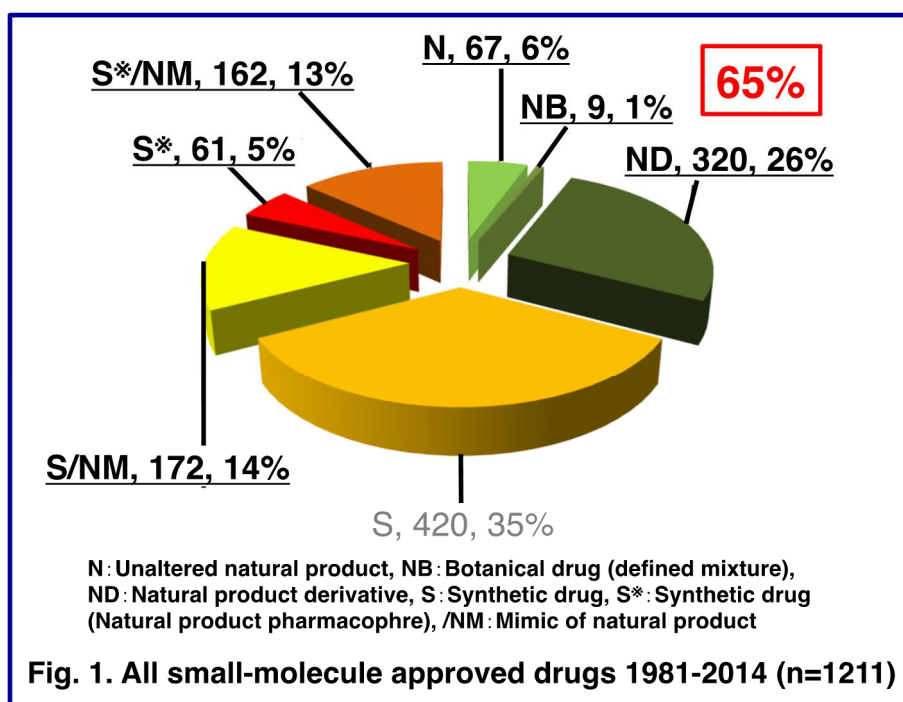
序論

放線菌は 19 世紀半ばに病原菌として発見され、放線菌研究は当初土壌微生物学の分野で行われた。放線菌は *Actinomycetales* 目に属するグラム陽性高 G+C 細菌で¹⁾、栄養菌系の伸長や気菌系の着生、孢子嚢の形成、また運動性孢子を形成する等、細菌でありながら多様な形態と複雑な生活環を示す。

放線菌が他の細菌と区別して取り扱われる理由は、複雑な形態分化と、二次代謝産物の多様性という 2 つの大きな特徴による。典型的な放線菌は、孢子の発芽から始まり、栄養菌系を伸長させ分岐する。次いで栄養菌系から分化した気菌系が形成され、菌系の隔壁形成と孢子の熟成へと形態変化する。放線菌は細菌の仲間でありながら、このように複雑な生活環を示す。また、放線菌が生産する二次代謝産物は放線菌自体が生産し、生産菌には直接作用しない各種個有の化合物である²⁾。これまでに発見された微生物由来の生物活性物質の報告は 22,500 を超え³⁾、その約半数が放線菌から発見されている。それらの中には、医薬、農薬、動物薬など実用化された化合物も多い。このように、放線菌は有用な二次代謝産物の生産菌として中心的な位置を占めており、1944 年に Waksman による結核の特効薬 streptomycin の発見を皮切りに新規生物活性物質探索源として利用され、多くの研究者により分離、分類がなされてきた。それらの分離株からは、細菌感染症治療薬として使用されている rifamycin⁴⁾ (*Amycolatopsis mediterranei*)⁵⁾, erythromycin⁶⁾ (*Saccharopolyspora erythraea*)⁷⁾, oleandomycin⁸⁾ (*Streptomyces antibioticus*)⁹⁾、抗がん剤として用いられている bleomycin¹⁰⁾ (*Streptomyces verticillus*)¹¹⁾, daunomycin¹²⁾ (*Streptomyces peuceticus*)¹³⁾、免疫抑制剤 FK506¹⁴⁾ (*Streptomyces tsukubaensis*)¹⁵⁾、イネ馬鹿稲病用農薬 validamycin¹⁶⁾ (*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus*)¹⁶⁾ など現在までに様々な抗生物質が発見され、放線菌は社会に大きく貢献してきた。また、1981 年から 2014 年の 34 年間に米国食品医薬品局 (FDA) で認可された 1,211 の低分子医薬品のうち、天然物あるいはそれを基にして創られた化合物は、65% を占めており (Fig. 1)、本報告では天然物探索の重要性が指摘されている^{17, 18, 19)}。さらに技術の発達により、多くの化合物が有機合成に成功しているにもかかわらず、合成で創られる化合物は、微生物が生み出す天然化合物の独創性には及ばないとの報告もある²⁰⁾。一方、1 年間に発見される抗生物質の中で放線菌由来の物質が 1970 年代までは 60% を超えていたが、2001 年から 2010 年までの 10 年間は放線菌からの発見頻度が約 10,800 種類のうち 3,100 種類 (28.5%) と減少傾向があるが²¹⁾、新規生物活性物質取得のためには未だ重要な微生物資源であるといわれている²²⁾。最近、遺伝子工学の急速な発展により、放線菌のゲノム解析が進み、放線菌が生産する二次代謝産物の潜在能力が分かってきた。Nett らの報告によると²³⁾、*Streptomycetaceae* に属する放線菌は 23~37、*Micromonosporaceae* に属する放線菌は 6~30 もの二次代謝産物生合成遺伝子を保有していることがわかった。すなわち、放線菌が保有する二次代謝産物の生合成に関わる遺伝子の多様性はきわめて膨大であり、その化学構造や生物活性の多様性に繋がる。放線菌が有する二次代謝産物の生産能力や自

然環境に生息する大多数の未分離菌を考えると多くの新規で有用な化合物が存在することが期待される。

放線菌は二次代謝産物生産による。それら放線菌が生産する二次代謝産物は長い進化の過程で、強力な生物活性に加え、多彩な構造をもつようになり自己防御機能を身につけたと考えられる。これまでに報告された放線菌由来の化合物のうち 75% は *Streptomyces* 属由来であり、残りの 25%が希少放線菌 (*Streptomyces* 属以外の放線菌)由来である²⁰⁾。その理由の一つとして、物質探索に用いる放線菌の分離源や分類群が限られていることが考えられる。一般に放線菌の分離源には土壌が用いられている。また、放線菌には現在約 300 属が知られているにも関わらず、分離菌株の多くを *Streptomyces* 属が占める。ゆえに、non-*Streptomyces*、いわゆる希少放線菌は物質探索に用いられた数は比較的少ない。また、二次代謝産物の生産は属、種レベルだけでなく、菌株に特異的であると言われている。このため、海洋²⁴⁾、マングローブ林^{25, 26)}などの様々な試料からの放線菌の分離が試みられている。



近年、海洋放線菌の研究が盛んに行われてきている。海洋は地球表面の約 70%を占め、地球上の全生物の約 8 割が海洋に生息していると言われている。また、海洋生物は過酷な環境条件下で生息していることから、陸棲生物とは異なった進化を遂げ、独自の代謝系を有していると考えられる。このような観点から、海洋微生物からの二次代謝産物に注目し、新規物質の探索研究が行われてきた。過去十数年間に、salinosporamide²⁷⁾、abyssomicin²⁸⁾などの多くの有用な天然物が海洋放線菌から発見された。特に、*Salinispora* 属に属する海洋放線菌によって産生される marizomib としても知られている salinosporamide A は、多発性骨髄腫に対して有望な抗癌活性を有するプロテアソーム阻害剤であり、現在 Phase I / II 臨床試験中である²⁹⁾。ユニークな化学物質を生産する可

性を秘めている未知の海洋放線菌が多数存在し、新規の有用な生物活性化合物の発見にとって貴重な資源となることが期待できる。

北里大学感染制御研究機構海洋バイオテクノロジー釜石研究所 (MBI) は、約 20 年前から海洋微生物を分離・保存し、微生物ライブラリーを構築してきた。MBI で保存されている微生物ライブラリーには土壌由来放線菌と異なる希少放線菌が多く含まれていることから、物質探索源として活用できる。

北里生命科学研究所の創薬研究グループは、微生物由来生物活性物質の探索を行い、約 500 もの新規化合物を発見した³⁰⁾。これら放線菌の二次代謝産物から医薬、動物薬あるいは試薬として使用された物質には以下のような生物活性物質が挙げられる。*Streptomyces avermectinius* MA-4680^{T31)} が生産する抗寄生虫物質 avermectin³²⁾、*S. lactacystinicus* OM-6519^{T33)} が生産するプロテアソーム阻害物質 lactacystin³⁴⁾、*Kitasatospora setae* KM-6054^{T35)} が生産する V-ATPase 阻害物質 setamycin³⁶⁾、*Streptomyces* sp. SK-1894 が生産するアシル CoA 合成酵素阻害物質 triacsin³⁷⁾ などがある。これまで発見された化合物にも発見当初は知り得なかった、新たな生物活性が見つかることが多々あり、後で見つかった活性の方が遙かに実用的な化合物もある。例えば、*Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *staurosporeus* AM-2282^{T38)} (現在は *Lentzea albida*) が生産する staurosporine³⁹⁾ は、ドラージェンドルフ試薬によるアルカロイド検出で発見された後、強力なプロテインキナーゼ阻害活性が発見されている。このことは、評価系を変えることで、より多くの化合物を発見できることを証明している。

特定の評価系を用いて微生物代謝産物から有用物質の探索を行うことは、かなりの偶然性を期待している。生物活性評価による探索研究は、その時々で必要とされている治療薬を見出すことであり最も大事なことであるが、目的物質が見つかるかどうかは評価系の種類や感度に大きく左右される^{18, 19)}。

ここ数年のうちに低分子 (二次代謝産物) を極微量で網羅的に解析する技術が飛躍的に進歩し、多くの化合物を検出できるようになった。この技術を用いることで、微生物の持つ化合物生産能力を最大限に引き出すことができる。我々は、創薬グループで見出された物質生産菌を複数の生産培地で培養し、LC/UV や LC/MS を用いて物質の生産性を確認した。その培養液抽出物に含まれている化合物の吸収スペクトル、分子量、分子組成、極性など物理化学的性質 (physico-chemical properties) を収集し、データベースを構築した。また、本データベースに加え、外部の天然物データベース (Dictionary of Natural Products など) を利用することにより、ある放線菌の代謝産物の中に新規物質が含まれているかどうか予測できるようになった。この方法を +Physicochemical (PC) screening⁴⁰⁾ と称し、放線菌代謝産物から新規物質を探索した。なお、ドラージェンドルフ試薬によるアルカロイドを検出する方法も化合物の物性を指標とするので PC screening に含まれる。化合物の物理化学的性状に着目し、他の研究グループでも行われているが⁴¹⁾、我々が精力的に研究を行ってきたことは微生物化学研究所の澤によって

紹介されている⁴²⁾。これまで、PC screening により創薬グループで見出された化合物、生産菌および生物活性を Table 1 に示す。また、これら物質は化合物が発見された後、生物活性が見出されている。近年、PC screening により、植物より分離された *Polymorphospora rubra* K07-0510 株の培養液より trehangelin 類⁴³⁾および *Actinoallomurus fulvus* MK10-036 株の培養液より actinoallolide 類⁴⁴⁾、マングローブ林の堆積物より分離された *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の培養液より mangromicin 類^{45, 46, 47)}が、発見された。Mangromicin は tetrahydrofuran および 5, 6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone を部分構造に持つ炭素結合のみから成る 15 員環構造の化合物で、これまで報告例がないユニークな骨格を有している。また、北里微生物資源ライブラリーから、新規 nanaomycin 類縁体^{48, 49)}および微生物初のイミニウムイオンを持つ iminimycin A⁵⁰⁾およびピリジニウムイオンを持つ iminimycin B⁵¹⁾を報告している。

以上のことから、筆者は PC screening の対象となっていなかった菌株を用い、化合物の物理化学的性状を用いた PC screening による放線菌由来天然物の発掘を試みた。

第 1 章ではアシタバの根およびその周辺土壌から分離した 403 株の菌株を対象に新規物質を探索した。北里生命科学研究所微生物機能研究室において植物内生放線菌の属レベルでの多様性が示されていたことから⁵²⁾、筆者は 16S rRNA 遺伝子解析により属を推定し、その中の希少放線菌に焦点を当て PC screening を行なった。

第 2 章では MBI で分離された 340 株の菌株を対象に新規物質を探索した。海洋放線菌からは近年多数の有用物質が見出されており、新規化合物の発掘にとって価値のある微生物資源である。よって筆者はその海洋放線菌に焦点を当て PC screening を行なった第 3 章では北里微生物資源ライブラリーに登録されている約 1,000 株のうちの 344 株の放線菌を用いて新規物質を探索した。これらの菌株は長期間保存されており、以前に菌株の生存および化合物の生産試験が実施された。その培養液を用いた検出感度の高い LC/MS を利用した PC スクリーニングにより、新規化合物が発見されている。

また、すでに上記で述べた mangromicin 生産菌、*L. aerocolonigenes* K10-0216 株の培養液中に PC screening により新規と予測されるピークを新たに見出したため、物質の取得および生合成研究を行った。

Table 1. Physicochemical screening により見出された化合物とその生物活性

検出	化合物	発見年	生産菌	生物活性(年)
Doragendorff's reaction	1,3-Diphenethylurea	1978	<i>Streptomyces</i> sp. AM-2498	抗うつ活性 ¹⁾ (1978)、脂肪細胞分化促進 ²⁾ (2011)
	Dityromycin	1977	<i>Streptomyces</i> sp. AM-2504	抗菌活性 ³⁾ (1977)、翻訳伸長因子(EF-G)阻害 ⁴⁾ (2014)
	Herquiline	1979	<i>Penicillium herquei</i> Fg-372	血小板凝集抑制(Herquiline B) ⁵⁾ (1996)
	NA-337A	1974	<i>Streptomyces</i> sp. NA-377	fat clearing activity ⁶⁾ (1974)
	Pyrimidin	1973	<i>Streptomyces griseoflavus</i> NA-15 ^T	抗菌活性 ⁷⁾ (1973)
	Quinoline-2-methanol	1976	<i>Kitasatoa grisiophaeus</i> PO-1227 ^T	血糖低下活性 ⁸⁾ (1976)
	Reductionomycin	1981	<i>Streptomyces xanthochromogenus</i> AM-6201	抗腫瘍・抗菌・抗真菌・抗ウイルス活性 ⁹⁾ (1981)
	Sespendole	2004	<i>Pseudobotrytis terrestris</i> FKA-25	CE・TG合成阻害、抗菌活性 ¹⁰⁾ (2006)
	Staurosporine	1977	<i>Saccarothrix aerocolonigenes</i> AM-2282	抗真菌・抗腫瘍活性 ¹¹⁾ (1977)、プロテインキナーゼ阻害 ¹²⁾ (1986)
	TM-64	1975	<i>Thermoactinomyces antibiotics</i> TM-64	角膜反射刺激 ¹³⁾ (1975)
	Spoxazomicin	2011	<i>Streptosporangium oxazolanicum</i> K07-0460 ^T	抗トリパノソーマ ¹⁴⁾ (2011)
LC/UV-MS	Actinoalolide	2011	<i>Actinoallomurus</i> sp. MK10-036	抗トリパノソーマ ¹⁵⁾ (2011)
	Trehangelin	2012	<i>Polymorphospora rubra</i> K07-0510	細胞保護作用 ¹⁶⁾ (2012)、コラーゲン生産促進活性(2014)
	Mangromicin	2011	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> K10-0216	抗トリパノソーマ ¹⁷⁾ (2011)、抗酸化活性 ¹⁸⁾ (2013)
	Nanaomycin F, G, H	2015	<i>Streptomyces rosa</i> subsp. <i>notoensis</i> OS-3966 ^T	上皮間葉転換誘導細胞傷害 ^{19, 20)} (2016)
	Iminimycin A, B	2014	<i>Streptomyces griseus</i> OS-3601	抗菌活性、細胞毒性 ^{21, 22)} (2016)

1) Iwai Y., et al., *J. Antibiot.*, **31**, 375-376 (1978), 2) Choi SS., et al., *J. Antibiot.*, **64**, 277-80 (2011), 3) Omura S., et al., *Agricult. Biol. Chem.*, **41**, 1827-1828 (1977), 4) Bulkley D., et al., *Cell Rep.*, **6**, 357-365 (2014), 5) Enomoto Y., et al., *J. Antibiot.*, **49**, 50-53 (1996), 6) Onda M., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2916-2920 (1974), 7) Onda M., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2048-2050 (1973), 8) Omura S., et al., *J. Antibiot.*, **29**, 797-803 (1976), 9) Konda Y., et al., *J. Antibiot.*, **34**, 1222-1223 (1981), 10) Uchida R., et al., *J. Antibiot.*, **59**, 93-97 (2006), 11) Omura S., et al., *J. Antibiot.*, **30**, 275-282 (1977), 12) Tamaoki T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397-402 (1986), 13) Omura S., et al., *J. Antibiot.*, **28**, 609-610 (1975), 14) Inanashi Y., et al., *J. Antibiot.*, **64**, 303-307 (2011), 15) Inanashi Y., et al., *Org. Lett.*, **17**, 864-867 (2015), 16) Nakashima T., et al., *J. Antibiot.*, **66**, 311-317 (2013), 17) Nakashima T., et al., *J. Antibiot.*, **67**, 253-260 (2014), 18) Nakashima T., et al., *J. Antibiot.*, **67**, 533-539 (2014), 19) Nakashima T., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 596-600 (2015), 20) Nakashima T., et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 765-770 (2017) 21) Nakashima T., et al., *J. Antibiot.*, **69**, 611-615 (2016), 22) Nakashima T., et al., *Tetrahedron Lett.*, **57**, 3284-3286 (2016)

第 1 章

土壌分離希少放線菌からの新規物質の探索

第 1 節 Sagamilactam⁵³⁾に関する研究

放線菌は有用な産業微生物であり、その代謝産物から多くの生物活性物質が発見されてきた。その多くは生物活性を指標に見いだされ、医薬品や農薬に活用されている。しかし、その培養液の中には多くの二次代謝産物が含まれており、生物活性を指標としたスクリーニングでは見いだされなかった有用物質が未発見のまま取り残されてきていると考えられる。北里生命科学研究所、微生物機能研究室で植物の根から分離された菌株は希少放線菌が多く分離され、その分離株から actinoallolide 類、spoxzomicin 類、trehangelin 類などの新規化合物が発見されている。本章では植物の根やその周辺土壌から分離した希少放線菌を用いた PC screening により発見した *Actinomadura* sp. K13-0306 株の生産する新規物質 sagamilactam について記述する。

1 新規物質探索に用いた菌株の選定

1-1 材料及び方法

1-1-1 用いた菌株

北里大学相模原キャンパス薬用植物園より採取したアシタバの根及びその周辺土壌から water proline agar (WPA) および CMC asparagine agar (CMC) を用いて分離した菌株を用いた (Table 1-1 および Table 1-2)。それら分離株は 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列 (約 500 bp) の解析より属を推定した。

Table 1-1. アシタバの根から分離した菌株一覧

推定種	WPA*	CMC**	株数	選択株
<i>Actinomadura madurae</i> DSM 4367 ^T	31	21	52	7
<i>Actinomadura maheshkhaliensis</i> 13-12-50 ^T	13	1	14	4
<i>Actinomadura formosensis</i> JCM 7474 ^T	1	1	2	2
<i>Actinomadura rudentiformis</i> HMC1 ^T	1		1	1
<i>Actinomadura verrucosospora</i> NBRC 14100 ^T		4	4	4
<i>Asanoa iriomotensis</i> TT 97-02 ^T	3		3	3
<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886 ^T		2	2	2
<i>Gordonia westfalica</i> Kb2 ^T	1		1	1
<i>Micromonospora tulbaghiae</i> TVU1 ^T	1		1	1
<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	2		2	2
<i>Micromonospora echinospora</i> ACTT 15837 ^T		1	1	1
<i>Micromonospora hainanensis</i> 211020 ^T		1	1	1
<i>Microbispora amethystogenes</i> JCM 3021 ^T	1		1	1
<i>Oerskovia enterophila</i> DSM 43852 ^T	5	118	123	4
<i>Oerskovia paurometabola</i> DSM 14281 ^T	3		3	3
<i>Plantactinospora mayteni</i> YIM 61359 ^T	5		5	5
<i>Rhodococcus baikonurensis</i> GTC 1041 ^T	1		1	1
<i>Verrucosisspora maris</i> AB-18-032 ^T	1		1	1
N.D.	16	5	21	21
計	85	154	239	65

Table 1-2. 周辺土壌から分離した菌株一覧

推定種	WPA*	CMC**	株数	選択株
<i>Actinomadura bangladeshensis</i> 3-46-b(3) ^T	2		2	1
<i>Actinomadura formosensis</i> C-36820 ^T	2		2	1
<i>Actinomadura oligospora</i> A80190.1 ^T	1		1	1
<i>Actinomadura verrucosospora</i> ATCC 27299 ^T	1		1	1
<i>kibdelosporangium phytohabitans</i> KLBMP 1111 ^T	4		4	1
<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T	1		1	1
<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> ATCC 51475 ^T		1	1	1
<i>Nocardia pseudovaccinii</i> AR 368,38366-20 ^T	1		1	1
<i>Nonomuraea endophytica</i> YIM 65601 ^T	10		10	1
<i>Streptosporangium canum</i> HBUM 170018 ^T	1		1	1
<i>Streptomyces fildesensis</i> GW25-5 ^T	1		1	
<i>Streptomyces amakusaensis</i> AS 4.1462 ^T	1		1	
<i>Streptomyces sioyaensis</i> ATCC 13989 ^T	2	1	3	
<i>Streptomyces bungoensis</i> AS 4.1653 ^T	6	1	7	
<i>Streptomyces bobili</i> AS 4.1624 ^T	13	6	19	
<i>Streptomyces cacaoi subsp. asaoensis</i> AS 4.1602 ^T	5		5	
<i>Streptomyces mirabilis</i> ATCC 27447 ^T	2	12	14	
<i>Streptomyces mayteni</i> YIM 60475 ^T	1		1	
<i>Streptomyces violascens</i> ATCC 23968 ^T	1		1	
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> ATCC 25479 ^T	3	3	6	
<i>Streptomyces ciscaucasicus</i> AS 4.1603 ^T	4	10	14	
<i>Streptomyces yanii</i> 80-133 ^T	1	2	3	
<i>Streptomyces canus</i> AS 4.1468 ^T	1		1	
<i>Streptomyces aureus</i> B7319 ^T	9	7	16	
<i>Streptomyces indigoferus</i> ATCC 23924 ^T	1		1	
<i>Streptomyces kaempferi</i> I37 ^T	2		2	
<i>Streptomyces phaeoluteigriseus</i> DSM 41896 ^T	1	1	2	
<i>Streptomyces atratus</i> AS 4.1632 ^T	2		2	
<i>Streptomyces galilaeus</i> AS 4.1320 ^T	1	1	2	
<i>Streptomyces shaanxiensis</i> 172115 ^T		1	1	
<i>Streptomyces exfoliatus</i> AS 4.1407 ^T		1	1	
<i>Streptomyces cinereorectus</i> AS 4.1622 ^T		1	1	
<i>Streptomyces graminearus</i> DSM 41474 ^T		1	1	
<i>Streptomyces resistomycificus</i> ATCC 19804 ^T		2	2	
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> AS 4.1430 ^T		1	1	
<i>Streptomyces brevispora</i> BK160 ^T		1	1	
N.D.	23	8	31	1
計	103	61	164	11

*WPA (water proline agar): 1.0% proline, 1.0% agar, 水道水, pH 無調整

**CMC (CMC asparagine agar): 1.0% carboxymethylcellulose, 0.1% L-Asparagine, 0.1% K₂HPO₄, 0.0001% FeSO₄·7H₂O, 0.0001% MnCl₂·4H₂O, 0.0001% ZnSO₄·7H₂O, 1.5% agar, D.W, pH7.0-7.4

1-1-2 生産培地

前培養培地は 301 seed 培地または YD 培地を用いた。生産培地は 4 種類（301 seed, 51, 54, Y19-2）を用いた。各培地組成を秤量し、水を加え加温後、固まりがなくなるまで攪拌し、1 N HCl および 1 N NaOH で pH を調整した。大試験管（20 x 210 mm）に 10 mL または 500 mL 容三角フラスコに 100 mL 分注し、スポンジ栓をして、ステンレス管をかぶせて 121℃、15 分間オートクレーブ滅菌した。特記しない限り水道水で作製した。

YD 培地

Yeast extract	1.0%	オリエンタル酵母工業株式会社
Dextrose	1.0%	和光純薬工業株式会社
pH 7.0		

301 seed 培地

Starch	2.4%	朝日食品株式会社
Glucose	0.1%	和光純薬工業株式会社
Peptone	0.3%	極東製薬工業株式会社
Meat extract	0.3%	極東製薬工業株式会社
Yeast extract	0.5%	オリエンタル酵母工業株式会社
CaCO ₃	0.4%	関東化学株式会社
pH 7.0		

51 培地

Glucose	0.5%	和光純薬工業株式会社
Corn Steep Powder	0.5%	イワキ株式会社
Oatmeal	1.0%	日本食品製造合資会社
Pharmamedia	1.0%	イワキ株式会社
K ₂ HPO ₄	0.5%	関東化学株式会社
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4%	和光純薬工業株式会社
Trace metals solution	1 mL/L	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1%	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1%	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1%	
pH 7.0		

54 培地

Soluble starch	2.0%	和光純薬工業株式会社
Glycerol	0.5%	関東化学株式会社
Defatted wheat germ	1.0%	日清ファルマ株式会社
Meat extract	0.3%	極東製薬工業株式会社
Dry yeast	0.3%	JT フーズ株式会社
CaCO ₃	0.3%	関東化学株式会社
pH 無調整		

Y19-2 培地

Meat extract	1.2%	極東製薬工業株式会社
Peptone	2.0%	極東製薬工業株式会社
Soybean meal	3.3%	東京保存食糧株式会社
Glycerol	2.2%	関東化学株式会社
Soluble starch	2.2%	和光純薬工業株式会社
CaCO ₃	2.2%	関東化学株式会社
pH 7.0		

1-1-3 培養および二次代謝産物の LC/UV-LC/MS 解析

生産培養および二次代謝産物解析方法を Fig. 1-1 に示した。YD 培地 10 mL（大試験管）にあらかじめ凍結保存しておいた培養液（凍結保存 YD 培地）を 2% 植菌し、300 rpm、27℃ で十分な生育が確認できるまで振とう培養し、種培養液とした。生産培養として、301 seed、51、54、Y19-2 培地 各 10 mL（大試験管）に種培養液を 2% となるように植菌し、300 rpm、27℃ で 8 日間振とう培養した。生産培養後、培養液に等量のエタノールを加えて、300 rpm で 30 分間振とうした。3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。エバポレーターでエタノール留去後、10 mL の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出物をエバポレーターで乾固後、MeOH を 1 mL 加え、遠心後 LC/UV-MS 解析試料とした。解析条件を Fig. 1-1 に記載した。LC/UV 解析は 0 分から 30 分にかけて 5% から 100% メタノール（0.1% ギ酸含）となるようにグラジエント分析した。MeOH および H₂O は HLC-SOL 規格（関東化学株式会社）、ギ酸は LC/MS 用（和光純薬工業株式会社）を用いた。LC/MS 解析条件は 0 分から 5 分間 5% メタノール（2 mM 酢酸アンモニウム含）で溶出させた後、5 分から 30 分間、5% から 100% メタノール（2 mM 酢酸アンモニウム含）となるようにグラジエント溶出させた。酢酸アンモニウムは LC/MS 用（和光純薬工業株式会社）を用いた。MS のイオン化は ESI-positive モードで行った。LC に Agilent 1200 Infinity（アジレント・テクノロジー）、MS 検出は Q-STAR（AB サイエックス）を用い、100 から 2,000 の範囲で m/z 値を測定した。

種培養液 (YD 培地, 大試験管, 10 mL)

2% 植菌 (凍結保存 YD 培地), 300 rpm, 27 °C

生産培地 (301 seed, 51, 54, Y19-2, 大試験管, 10 mL)

2% 植菌 (種培養液), 300 rpm, 27 °C, 8 日間

培養液

EtOH 等量添加, 攪拌 (30 分)

遠心 (3,000 rpm, 5 min)

上清 (50% EtOH broth)

EtOH 留去

酢酸エチル (10 mL) 抽出

酢酸エチル抽出物

酢酸エチル留去

MeOH (1 mL) に溶解

LC/UV-MS 解析用培養液抽出物

<LC/UV 条件>

カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm

移動相 : 5-100% MeOH / 0.1% HCOOH (0-30 min)

流速 : 0.5 mL / min

カラム温度 : 40 °C

検出 : UV 254 nm

inject 量 : 5 µL

<LC/MS 条件>

カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm

移動相 : 5% MeOH / 2 mM ammonium acetate (0-5 min)

5-100% MeOH / 2 mM ammonium acetate (5-35 min)

流速 : 0.5 mL / min

カラム温度 : 40 °C

イオン化 : ESI-positive

検出 m/z : 100-2000

inject 量 : 5 µL

Fig. 1-1. 培養液抽出物の調製および LC/UV-MS による二次代謝産物の解析

1-2 結果及び考察

1-2-1 菌株の選択

アシタバの根から 239 株 (Table 1-1) および周辺土壌から 164 株 (Table 1-2) 計 403 株の放線菌の中から希少放線菌をそれぞれ 65 株と 11 株を選択した。その放線菌の中から 301 seed 培地及び YD 培地に 2% 植菌し、8 日間培養し、生育良好株を 23 株選択した (Table 1-3)。

Table 1-3. LC/UV 解析を行った 23 株

菌株番号	推定種	bp	相同性 (%)	分離源
K13-0221	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	521	99.6	根
K13-0222	<i>Micromonospora peucetia</i>	700	99.1	根
K13-0224	<i>Verrucospora maris</i>	698	98.3	根
K13-0231	<i>Plantactinospora mayteni</i>	653	98.8	根
K13-0234	<i>Actinomadura madurae</i>	702	99.1	根
K13-0236	<i>Microbispora amethystogenes</i>	698	99.6	根
K13-0237	<i>Micromonospora tulbaghia</i>	782	100	根
K13-0238	<i>Asanoa iriomotensis</i>	702	99.6	根
K13-0239	<i>Agromyces allii</i>	511	99.0	根
K13-0240	<i>Gordonia westfalica</i>	718	98.2	根
K13-0243	<i>Plantactinospora mayteni</i>	772	99.0	根
K13-0247	<i>Plantactinospora mayteni</i>	679	99.0	根
K13-0249	<i>Micromonospora chalybophumensis</i>	593	98.3	根
K13-0250	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	580	99.0	根
K13-0251	<i>Micromonospora echinospora</i>	731	99.6	根
K13-0252	<i>Actinomadura formosensis</i>	629	99.2	根
K13-0263	<i>Actinomadura maheshkhaliensis</i>	674	99.4	根
K13-0276	<i>Actinomadura madurae</i>	768	99.2	根
K13-0284	<i>Actinomadura verrucosospora</i>	680	99.1	根
K13-0306	<i>Actinomadura formosensis</i>	652	98.2	周辺土壌
K13-0308	<i>Actinomadura oligospora</i>	615	99.4	周辺土壌
K13-0310	<i>Kibdelosporangium phytohabitans</i>	630	96.8	周辺土壌
K13-0372	<i>Actinomadura verrucosospora</i>	581	99.1	周辺土壌

1-2-2 LC/UV によるサンプルの選定

候補株 23 株を 301 seed、51、54、Y19-2 培地で生産培養し、その酢酸エチル抽出物を LC/UV 解析した。

92 サンプル (23 株×4 種の生産培地) から 1) 4 種の生産培地の中で 1 種の生産培地でのみ生産している化合物、2) 特徴的な UV スペクトルを示す化合物を含む、9 株由来、27 サンプルを選択し、LC/MS 解析を行った。(Table 1-4)

Table 1-4. LC/MS 解析を行った 9 株由来 27 サンプル

菌株番号	推定種	培地
K13-0222	<i>Micromonospora peucetia</i>	51, 54, Y19-2
K13-0224	<i>Verrucosispora maris</i>	51, 54, Y19-2, 301
K13-0231	<i>Plantactinospora mayteni</i>	51
K13-0237	<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	Y19-2
K13-0239	<i>Agromyces allii</i>	54, Y19-2
K13-0276	<i>Actinomadura madurae</i>	51, 54, Y19-2, 301
K13-0306	<i>Actinomadura formosensis</i>	51, 54, Y19-2, 301
K13-0308	<i>Actinomadura oligospora</i>	51, 54, Y19-2, 301
K13-0310	<i>Kibdelosporangium phytohabitans</i>	51, 54, Y19-2, 301
		計27 サンプル

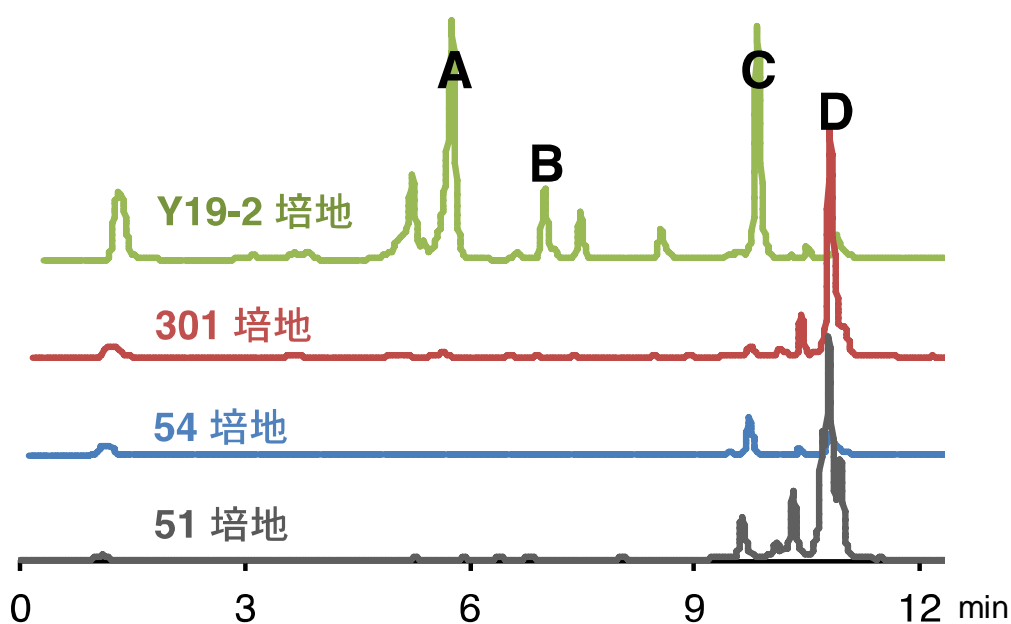
1-2-3 LC/MS 解析による代謝産物のプロファイル

選択した 27 サンプルの LC/MS 解析を行った結果、*Verrucosispora* sp. K13-0224 株は 51 培地でのみ生産したピーク ($[M+H]^+$ 169.2583) が観察された。しかし、Dictionary of Natural Products (CRC Press) で検索した結果、2,4-decadienoic acid⁵⁴⁾と推定された。また、*Agromyces* sp. K12-0239 株も Y19-2 培地で同様の物質を生産していた。

27 サンプルのなかで K13-0306 株の Y19-2 培養液抽出物に注目した(Fig. 1-2)。Y19-2 培地の培養液抽出物は他の 3 つの生産培地では生産していない大きなピークが複数観察された。しかし、これらのピーク(A および B)は多くの菌株で Y19-2 培地の培養液抽出物に共通していたピークだった。これらのピークは Y19-2 培地に含まれている大豆由来の成分が放線菌によってダイゼインなどのフラボノイド類に変換された物質と UV 極大吸収の波形より考えられる (Fig. 1-2)。

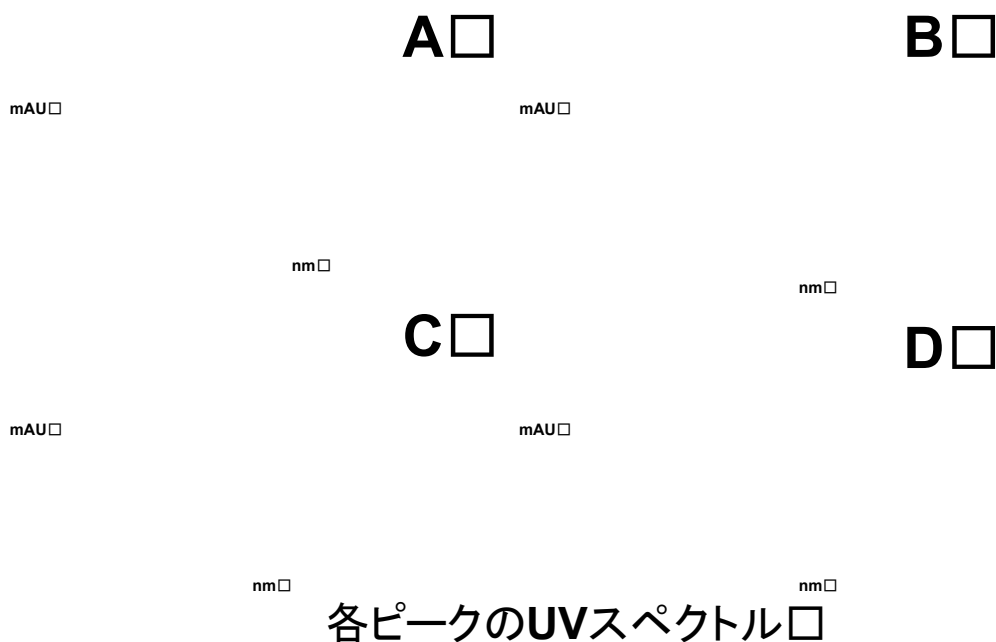
Fig. 1-3 に示すように K13-0306 株の Y19-2 培地で生産する溶出時間約 35 分、37 分および 33 分にフラボノイド類と異なるピークが観察された。溶出時間 35 分の化合物は $[M+H]^+$ m/z 902.3173、270nm に極大吸収を示し、溶出時間 37 分の化合物は $[M+H]^+$ m/z 868.3508、270nm に極大吸収を示した (LC/UV 解析では溶出時間 11 分、Fig. 1-2 のピーク D)。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索した結果、両物質は Decatromicin 類⁵⁵⁾と推定された。

一方、溶出時間 33 分の化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 570.3577、極大吸収 270, 279 及び 331 nm を示した (LC/UV 解析では溶出時間 10 分、Fig. 1-2 のピーク C)。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索結果、該当する化合物がないことから新規物質と推定した(Fig. 1-3)。

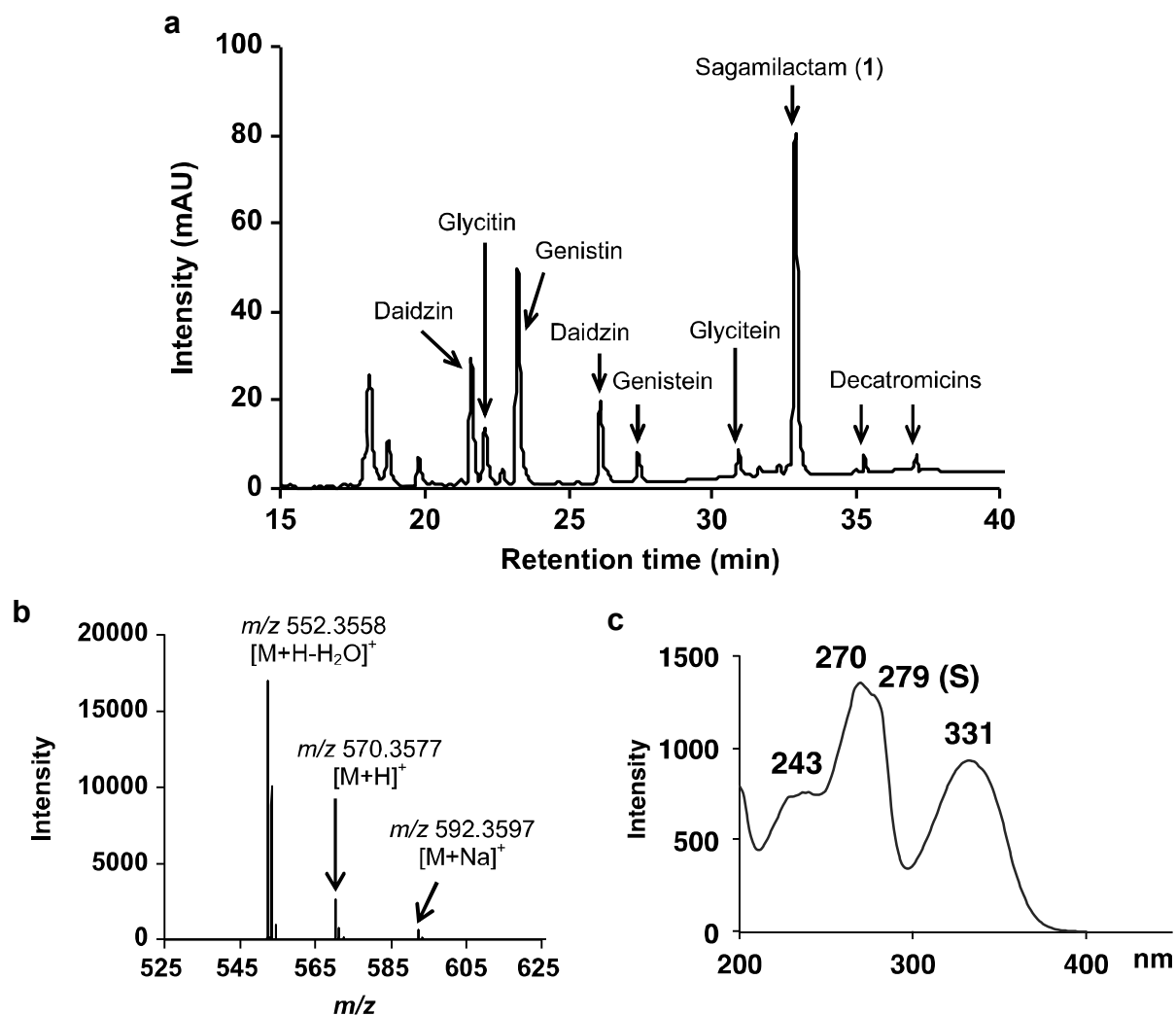


K13-0306株の4種類の培養液抽出物(LC/UV)

カラム : MonoBis 3.2× 100 mm、移動相 : 5-100% MeOH / 0.1% HCOOH (0-10 min)、
 流速 : 0.8 mL / min、カラム温度 : 40 °C



**Fig. 1-2. K13-0306 株を 4 種の培地で培養した時の LC/UV チャートと
 各ピークの UV スペクトル**



カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相 : 5% MeOH / 2 mM ammonium acetate (0-5 min)、5-100% MeOH / 2 mM ammonium acetate (5-35 min)、流速 : 0.5 mL / min、カラム温度 : 40 °C、イオン化 : ESI-positive、検出 m/z : 100-2000

Fig. 1-3. K13-0306 株を Y19-2 培地で培養した時の LC/UV-MS チャート (a) と sagamilactam の TOF-MS スペクトル(b) および UV スペクトル (c)

2. *Actinomadura* sp. K13-0306 株が生産する二次代謝産物の精製

2-1 *Actinomadura* sp. K13-0306 株の生産培養

Actinomadura sp. K13-0306 株は YD 培地で培養し、凍結培養液として保存し、本菌株の培養に使用した。前培養は、凍結培養液を 500 mL 三角フラスコに 100 mL 入れた YD 培地に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 5 日間培養した。生産培養は Y19-2 培地より改変した sagamilactam 生産培地 (3.3% soybean meal) 100 mL を分注した 500 mL 容三角フラスコ、100 本に前培養で得られた種培養液を 2% 植菌し、210 rpm、27°C で 7 日間振盪培養した。

2-2 Sagamilactam の単離精製

Sagamilactam の精製方法を Fig. 2-1 に示した。精製は LC/UV-MS 分析を指標に行った。培養液 (10 L) を遠心分離し、上清と菌体に分けた。上清は Diaion HP20 (三菱化学) に供し、水で洗浄後、メタノールで溶出させ、エバポレーターでメタノールを留去させた。2 L の酢酸エチルを加え、抽出を 3 回行い、酢酸エチル層を回収し、エバポレーターにより乾固した。また、菌体はメタノール抽出を 3 回行い、メタノール留去後、酢酸エチルで抽出を行った。この上清と菌体由来の酢酸エチル抽出物 (5.51 g) をシリカゲル (MERCK) オープンカラムクロマトグラフィー (130 g, カラム径 60 mm) にて、クロロホルム - メタノール溶媒を用い、ステップワイズで溶出 (各溶媒 350 mL, 100:0, 100:1, 100:2, 10:1, 1:1, 0:100) させ、sagamilactam を含む 10 : 1 画分 (Fr. 3) を 307.4 mg 得た。

この 10 : 1 画分を ODS (富士シリシア化学) オープンカラムクロマトグラフィー (130 g, カラム径 60 mm) にて、メタノール - 水溶媒系を用い、ステップワイズで溶出 (各溶媒 350 mL, 0:100, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 100:0) させた。目的物質である sagamilactam は 80:20 画分 (37.8 mg) に得られたので最終的に HPLC (カラム : PEGASIL ODS SP100 10 x 250 mm, カラム温度 : 40 °C, 移動相 : 68% メタノール, 流速 : 4.7 mL/min, 検出 : UV 254 nm) により溶出時間 25 分付近のピークを分取することで sagamilactam を 8.4 mg 得た。分取した sagamilactam を LC/UV で解析し、不純物がないことを確認した (Fig. 2-2)。

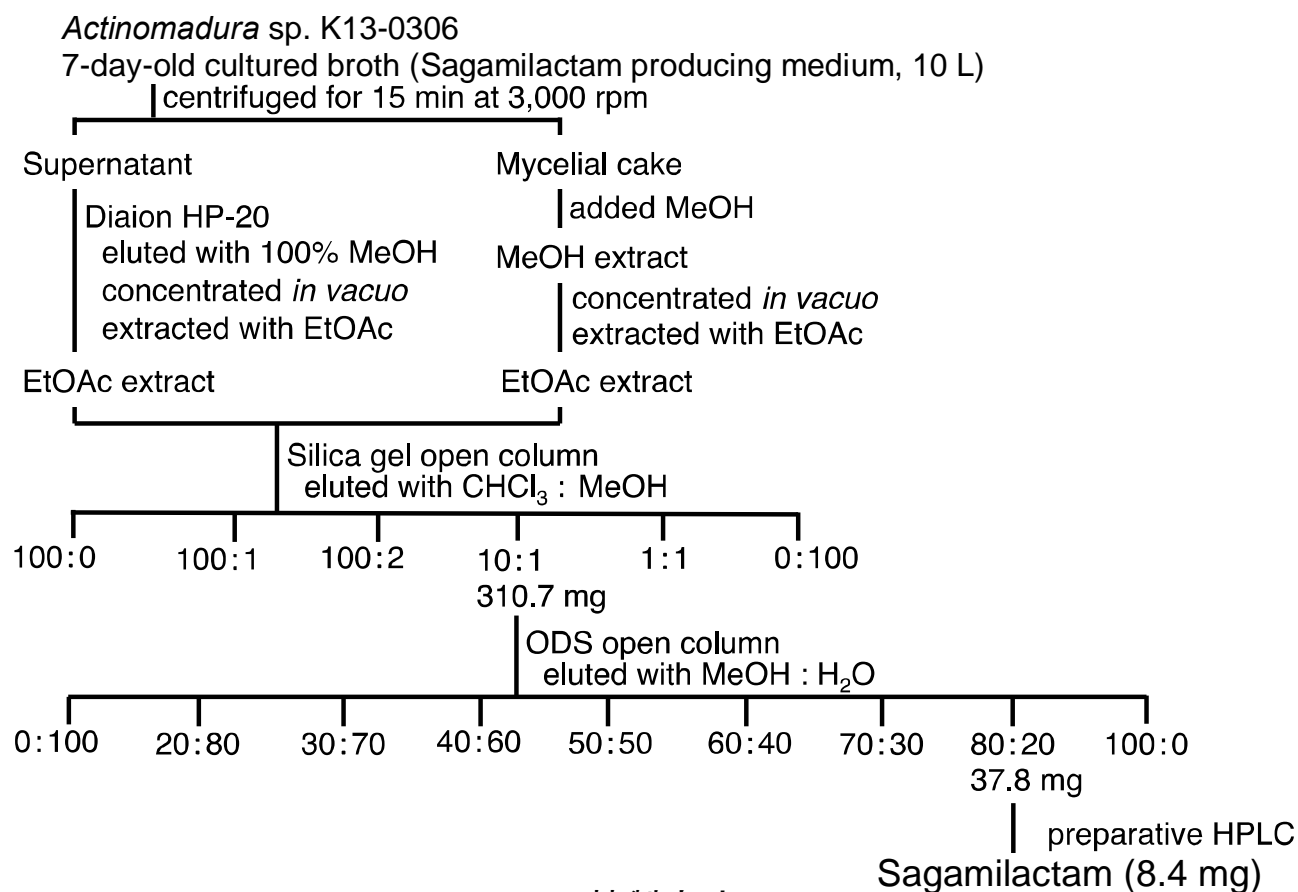
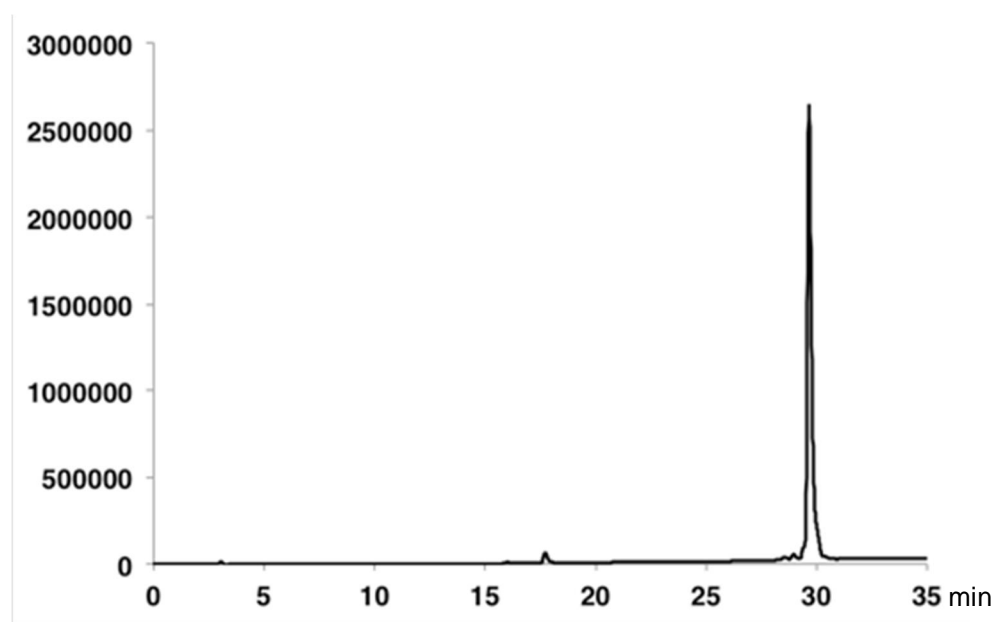


Fig. 2-1. Sagamilactam の精製方法



カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相 : 5-100% MeOH / 0.1% HCOOH (0-30 min)、
 流速 : 0.5 mL / min、カラム温度 : 40 °C

Fig. 2-2. HPLC 精製後の sagamilactam の LC/UV チャート

3. Sagamilactam の物理化学的性状および構造解析

3-1 分析機器および試薬

LC/UV-MS (HR-ESI-MS)

LC : Agilent 1200 Infinity (アジレント・テクノロジー株式会社)

カラム : Inertsil ODS-4 3.0 × 250 mm (ジーエルサイエンス株式会社)

溶媒条件

移動相 A : H₂O / 2 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B : MeOH / 2 mM 酢酸アンモニウム

gradient : 5% B (5 分)、5-100% B (5-35 分)、100% B (35-40 分)

流速 : 0.5 mL/min

カラム温度 : 40 °C

検出 : total wavelength および TOF-MS (*m/z* 100~2,000)

FAB-MS : JMS-AX 505HA (日本分光社)

NMR

400 MHz : Varian NMR system-400 (アジレント・テクノロジー株式会社)

600 MHz : INOVA -600 (アジレント・テクノロジー株式会社)

旋光度

旋光度計 : DIP-1000 (ジャスコエンジニアリング株式会社)

UV 極大吸収

吸光度測定 : HITACHI U-2810

赤外吸収スペクトル

IR 測定器 : FT-710 (株式会社 堀場製作所)

KBr 板 (3×3×0.5 mm) (ジャスコエンジニアリング株式会社)

Clear Disk CD-05 (ジャスコエンジニアリング株式会社)

Di-05 成型器 (ジャスコエンジニアリング株式会社)

ハンドプレス (MP-1) (ジャスコエンジニアリング株式会社)

3-2 方法および結果

Sagamilactam の物理化学的性状は Table 3-1 に示した。

1) 比旋光度

ナトリウムランプを安定化させるために、測定の前1時間前に旋光度計の電源を入れた。1時間後、ブランク測定を行うためセル（3.5 × 50 mm）を測定溶媒であるメタノールで満たし、ホルダーにセットした。セットし終わったらゼロクリアを行い測定値の偏りを補正した。Sagamilactam のメタノール溶液（1 mg/mL）をセルに移した。次に旋光度計のホルダーにセットし測定を開始した。10回の測定結果の平均値-13.0を比旋光度として用いた。

2) 赤外吸収スペクトル（IR）

KBr プレート法にて Sagamilactam の赤外分光スペクトルの測定を行った。Fig. 3-1 に模式図を示した。

ベースプレートにガイドリング、ClearDisk (CD-05) をセットし KBr 板 (3×3×0.5 mm) 1枚を ClearDisk に置いた。KBr 板を載せ、ハンドプレスを用いて圧縮しプレートを作製した。押さえプレート、ガイドリングを外し、サンプルをホールドした ClearDisk を IR 測定器にセットし、赤外分光スペクトルを測定した。

3400 および 1635 cm^{-1} に吸収が観察されたことから、水酸基およびカルボキシル基の存在が示唆された。

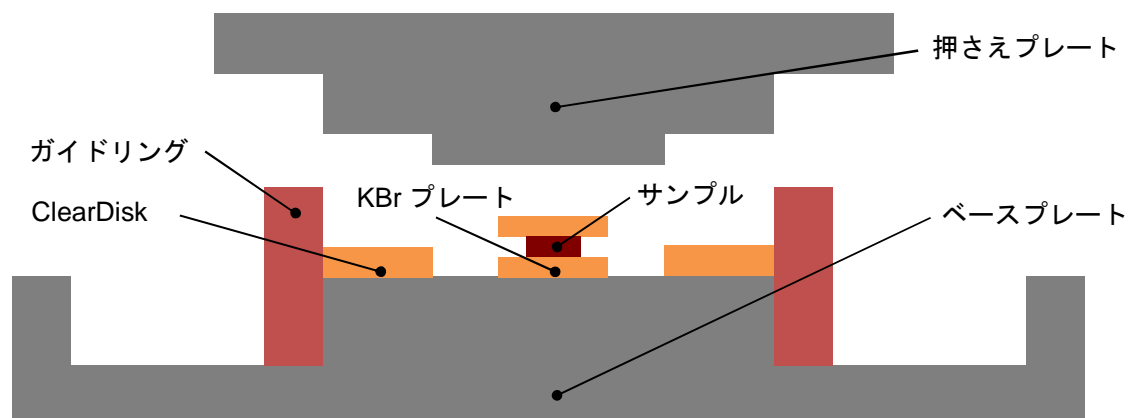


Fig. 3-1. KBr プレート成型の模式図

3) UV/VIS 吸収スペクトル

Sagamilactam のメタノール溶液（1 mg/mL）を調製し、サンプル溶液とした。測定用 1.5 mL セルに正確に 900 μ L のメタノールを分注した。その 900 μ L のメタノールから 9 μ L を抜き取り、9 μ L のサンプル溶液を添加し、ピペッティングにより攪拌した。メタノールでのブランク測定後にサンプル溶液を測定した。モル吸光係数（ ϵ ）は下記の式 1 より求めた。結果は Table 3-1 に示した。

$$\epsilon = A / (c \cdot l) \quad (\text{式 1})$$

A : 吸光度

c : モル濃度 (mol/L)

l : 光路長 (cm)

5) 溶解性

Sagamilactam を 1 mg 秤量し、各溶媒を 1 mL を加え、HPLC で溶解性を確認した。HPLC 解析は Fig. 1-1 に示した条件で実施した。各種溶媒に対する溶解性の結果を Table 3-1 に示した。

Table 3-1. Sagamilactam の物理化学的性状

		Sagamilactam
Appearance		white powder
Molecular formula		C ₃₇ H ₄₇ O ₄ N
Molecular weight		569
ESI-MS (<i>m/z</i>)	calcd.	570.3577 (for C ₃₇ H ₄₈ O ₄ N)
	found	570.3529 [M+H] ⁺
[α] _D ^{24.7} (c = 0.1, MeOH)		13.0
UV _{max} ^{MeOH} nm ()		270 (4091), 279 (3783), 331 (1997)
IR (KBr) cm ⁻¹		3400 (broad), 1635, 1527, 1303
Soluble		methanol, ethanol, pyridine
Insoluble		water, chloroform

3-3 Sagamilactam の構造解析

Sagamilactam は白色粉末として得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータより $C_{37}H_{47}O_4N$ と決定された ($[M+H]^+$ ion at m/z 570.3529 (calculated value of 570.3577 for $C_{37}H_{48}O_4N$)). 1D および 2D NMR スペクトルは CD_3OD を用いて測定した。

Sagamilactam の 1H NMR および ^{13}C NMR スペクトルデータは Table 3-2 に示した。 1H NMR および HSQC より 3 つの oxygenated methines および 1 つの nitrogenated methine を含む 8 つの sp^3 methine, 21 の olefinic protons, 4 つの methylenes, 1 つの primary methyl および 1 つの secondary methyl の存在が示唆された。The ^{13}C NMR および HSQC より 37 の carbons が観測され、それぞれ 22 の olefinic carbons, 173.7 ppm を示す 1 つの carbonyl carbon, 3 つの oxygenated sp^3 methine carbons, 4 つの sp^3 methine carbons, 1 つの nitrogenated sp^3 methine carbon, 4 つの sp^3 methylene carbons および 2 つの methyl carbons の存在が示唆された。

1H - 1H COSY および TOCSY より (a) C-3/C-10; (b) C-13/C-29; (c) C-30/C-32 および (d) C-34/C-36 の 4 つの部分構造が示された (Fig. 3-2)。HMBC 解析の結果、 H_3 -2-Me から C-1, C-2, および C-3; H-3 から C-1, C-2-Me, C-4, および C-5; H-4 から C-3 および C-5; H-6 から C-8; H-7 から C-6 および C-8; H-8 から C-6 および C-10; H-9 から C-7 および C-8; H-10 から C-9 に相関が観測されたことから **a** を含むテトラエンの部分構造が確認された。**b** を含むジエンの部分構造は、H-19 から C-20; H-20 から C-22; H-21 から C-19 および C-23; H-22 から C-24; H-23 から C-21 および C-24 に HMBC の相関が観測されたことより確認された。**b** および **c** を含むトリエンの部分構造は H-26 から C-28; H-27 から C-25, C-26, および C-29; H-28 から C-26; H-30 から C-28 および C-31; H-31 から C-30 に HMBC の相関が観測されたことより確認された。**b** を含むデカリンの部分構造は H-10 から C-11, C-12 および C-19; H-11 から C-13; H-12 から C-10 および C-18; H₂-14 から C-18; H-15 から C-17; H₂-16 から C-14, C-15 および C-17; H-18 から C-12; H-19 から C-10, C-11, C-13, および C-18 に HMBC の相関が観測されたことより確認された。**d** を含む 1-propene の部分構造は H-33 から C-34 および C-35; H-34 から C-33 および C-36-Me; H-35 から C-33 および C-36-Me; H₃-36-Me から C-34 および C-35 に HMBC の相関が観測されたことより確認された (Figure 3-2)。

HMBC 相関が H-8 から C-10, H-10 から C-9, H-11 から C-9, H-19 から C-9, C-10, C-20 および C-21, H-20 から C-10 および C-19, H-21 から C-19 に観測されたことより C-9/C-10 および C-19/C-20 でデカリン環が側鎖と連結し、H-22 から C-24, H-23 から C-24 および C-25, H-24 から C-25, H-26 から C-24, H-27 から C-25 および C-26 に相関が観測されたことから methylene (C-24) および hydroxyl carbon (C-25) を介して diene moiety と triene moiety が結合し、H₂-32 から C-34; H-33 から

C-34 および C-35; H-35 から C-33 に相関が観測されたことから、1-propene moiety が C-33 位に結合することが確認された。最終的に、 ^1H - ^{13}C および ^1H - ^{15}N HMBC 相関が H-33 から C-1、H₂-32 および H-34 から NH-33 に観測されたことより、sagamilactam の平面構造は Fig. 3-2 に示した構造と決定した。

また、デカリン環における ROESY 相関が、H-9/H-18, H-10/H-20, H-13/H-17 および H-20, H-19/H-21 に観測された。これらの結果は、デカリン環において H-10, H-13, および H-17 が同じ向きに配置し、H-19 および H-18 が同じ向きに配置していることを示している。さらに、H-17 が大きな coupling constant (10.8, 10.8 Hz)を示すことから trans-デカリンであると確認された。二重結合の trans/cis 型の幾何異性は Double Quantum Filtered-COSY (DQF-COSY)、ROESY および ^1H - ^1H coupling constants をもとに決定された。ROESY 相関が H-21/H-23 (15.0 Hz) および H-28/H-30 (15.0 Hz) に観測され、20*E*, 22*E*, および 28*E* と決定し、H-26/H-27 (10.5 Hz) および H-30/H-31 (10.3 Hz) に観測されたことから 26*Z* および 30*Z*と決定した。Trans-coupling constant (15.0 Hz)が H-4/H-5, および H-6/H-7 に見られることから 4*E* および 6*E* と決定し、cis-coupling constant (10.3 Hz) で coupling constant が H-8/H-9 に見られたことから 8*Z* と決定した。また、H₃-2-Me/H-4 に ROESY 相関が観測されたことから 2*E* と決定した。最後の二重結合は H-34/H-35 (18.0 Hz)より 34*E* と決定できた(Fig. 3-3)。以上のことより、sagamilactam は diene, triene, および tetraene を含み、trans-デカリン環を持つ新規 34-員環 macrocyclic lactam であることがわかった(Fig. 3-4)。

生産菌の分離源が北里大学相模原キャンパスの薬用植物園であるので、土地名を由来とし、本物質を sagamilactam と命名した。

Sagamilactam の生合成は、I 型 PKS により長鎖脂肪酸が作られた後、環化酵素により環化し、デカリン骨格はディールズアルダー反応により作製され、最終的に種々の修飾酵素により sagamilactam が生合成されると考えられる。

Table 3-2. Sagamilactam の化学シフト値

Position	¹³ C	mult.	¹ H (int., mult., J in Hz)	HMBC
1	173.7			
2	134.2			
3	132.6	CH	6.35, d, 15.0	C-1, C-4, C-5, C-2-Me
4	128.8	CH	6.53, dd, 10.3, 15.0	C-3, C-5
5	138.4	CH	6.29, dd, 10.3, 15.0	
6	134.2	CH	6.38, dd, 10.3, 15.0	C-8
7	131.4	CH	6.54, dd, 10.3, 15.0	C-6, C-8
8	129.5	CH	6.06, dd, 10.3, 15.0	C-6, C-10
9	138.1	CH	5.53, dd, 10.3, 10.3	C-7, C-8,
10	41.6	CH	3.18, m	C-9, C-11, C-12, C-19
11	129.0	CH	5.56, m	C-9, C-13
12	132.5	CH	5.55, m	C-10, C-18
13	30.2	CH	2.34, m	
14a	40.0	CH ₂	1.26, m	C-18
14b			1.82, ddd, 2.4, 6.0, 12.6	C-18
15	67.9	CH	4.15, m	C-17
16a	43.3	CH ₂	1.42, ddd, 2.4, 10.8, 13.2	C-15, C-17
16b			2.10, m	C-15
17	67.0	CH	3.66, ddd, 4.8, 10.8, 10.8	
18	48.2	CH	1.29, m	
19	44.3	CH	2.75, m	C-10, C-11, C-13, C-18, C-20
20	133.4	CH	5.70, dd, 9.6, 15.0	C-19, C-22
21	132.9	CH	6.18, dd, 9.6, 15.0	C-19, C-23
22	134.3	CH	6.06, dd, 9.6, 15.0	C-24
23	128.5	CH	5.43, m	C-21, C-24, C-25
24a	42.7	CH ₂	2.20, ddd, 10.5, 10.5, 13.5	C-22, C-23, C-25
24b			2.61, m	C-22, C-23, C-25
25	67.6	CH	4.63, ddd, 10.5, 10.5, 4.0	
26	134.2	CH	5.28, dd, 10.5, 10.5	C-24, C-28
27	132.3	CH	6.19, dd, 10.5, 10.5	C-25, C-26, C-29
28	127.7	CH	6.59, dd, 10.5, 15.0	C-26
29	135.4	CH	6.34, dd, 10.3, 15.0	
30	134.4	CH	6.28, dd, 10.3, 10.3	C-28, C-31
31	133.0	CH	5.65, dd, 4.0, 10.3, 15.0	C-30
32a	39.7	CH ₂	2.32, m	C-34
32b			2.52, ddd, 3.5, 5.0, 15.0	C-34
33	52.1	CH	4.38, m	C-1, C-34, C-35
34	132.85	CH	5.43, dd, 10.3, 18.0	C-33, C-35-Me
35	126.3	CH	5.59, m	C-33, C-35-Me
36	17.6	CH ₃	1.68, dd, 1.2, 6.0	C-34, C-35
2-Me	13.7	CH ₃	1.93, d, 1.6	C-1, C-2, C-3

Fig. 3-2. Sagamilactam の COSY および HMBC 相関

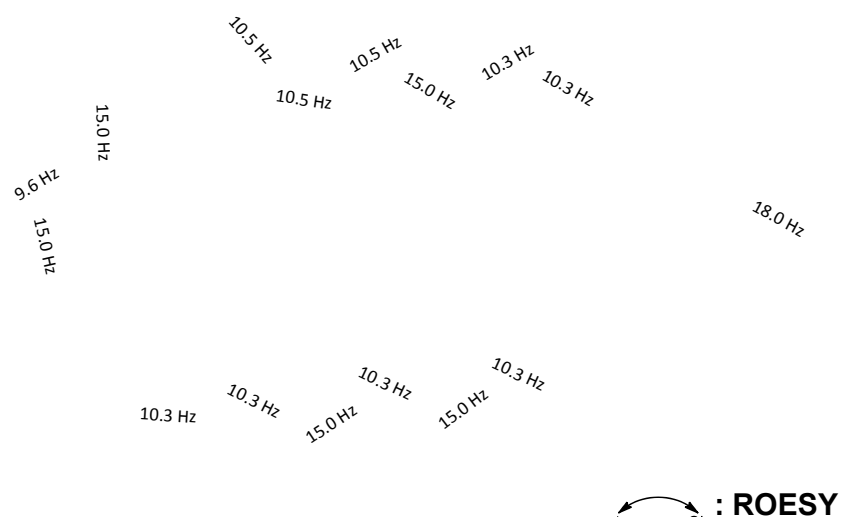


Fig. 3-3. Sagamilactam の ROESY 相関

Fig. 3-4. Sagamilactam の構造

4. Sagamilactam の生物活性評価

4-1 材料

4-1-1 Sagamilactam の抗菌活性試験

検定菌 () は略

グラム陽性細菌

Staphylococcus aureus ATCC 6538P (a)

Bacillus subtilis ATCC 6633 (S)

Kocuria rhizophila ATCC 9341 (I)

Mycobacterium smegmatis ATCC 607 (M)

Bacillus cereus IFO 3001 (Bc)

グラム陰性細菌

Escherichia coli NIHJ (c)

Klebsiella pneumonia ATCC 10031 (Kp)

Pseudomonas aeruginosa NBRC 12582 (Ps)

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* KB88 (X)

Bacteroides fragilis ATCC23745 (Ba)

Clostridium perfringens ATCC 3624 (Cp)

マイコプラズマ

Acoleplasma laidlawii PG8 (Ala)

酵母

Candida albicans ATCC 64548 (Ca)

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 (Sa)

糸状菌

Aspergillus niger ATCC 6275 (Ni)

Mucor racemosus IFO4581 (Mu)

4-1-2 Sagamilactam の細胞毒性試験

D-MEM (和光純薬工業株式会社)

RPMI 1640 (ナカライテスク株式会社)

heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (フナコシ株式会社)

PenStrep (和光純薬工業株式会社)

Sodium pyruvate (和光純薬工業株式会社)

トリパンプルー (和光純薬工業株式会社)

トリプシン (和光純薬工業株式会社)

CO₂ インキュベーター

HeLa S3 細胞

Jurkat 細胞

セルカウンター (Logos Biosystems)

4-1-3 Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性評価

Iscove's modified Dulbecco's 培地

heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)

Trypanosoma brucei brucei strain GUTat 3.1

FLx800 fluorescence microplate reader (BioTek Instruments)

the fluorescent plate reader software (KC-4; BioTek Instruments)

アラマーブルー

4-2 方法

4-2-1 Sagamilactam の抗菌活性試験

乾熱滅菌したペーパーディスク (paper disk thin 6mm, Advantec) に濃度調整した sagamilactam のメタノール溶液 (10 mg/mL, 3 mg/mL, 1 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.1 mg/mL) を 10 μ L 滴下し (final 100 μ g/disk, 30 μ g/disk, 10 μ g/disk, 3 μ g/disk, 1 μ g/disk)、乾燥させ、各種被検菌液が混釈されている寒天培地に置いた。a, S, I, M, Bc, Kp, Ps, Ala は 37℃ で、X, Ca, Sa, Ni, Mu は 27℃ で、好氣的条件にて一晩培養した。Ba, Cp は 37℃ で、嫌氣的条件にて一晩培養した。培養後、阻止円の出現の有無を観察した。活性のクリアー度は A-D の 4 段階で評価し、その阻止円の直径 (mm) を測定した。A は明瞭な阻止円、B は A に劣るが明瞭な阻止円、C は阻止円の中に検定菌が生え、濁る状態、D は阻止円がごくわずかに見える状態と判定した。

4-2-2 Sagamilactam の細胞毒性試験

1) 前培養

HeLa S3 細胞には 10% FBS、抗生物質（1% PenStrep）を添加した D-MEM 培地を用いた。Jurkat 細胞は 10% FBS、抗生物質（1% PenStrep）および 1% sodium pyruvate を添加した RPMI 1640 培地を用いた。

-80℃の冷凍庫から細胞の入ったチューブを出し、素早く手で暖めて溶かした。チューブを 800 rpm, 3 min 遠心後、上清をパスツールピペットで取り除き、1 mL の培地で細胞を懸濁した。あらかじめ 9 mL の培地を分注したシャーレに懸濁させた細胞を入れ、緩やかに混和後、CO₂ インキュベーターで 37℃、2 日間前培養した。

2) 継代培養

HeLa S3: 前培養を行ったシャーレから培地を取り除き、5 mL のトリプシンを入れ、5 min インキュベーションした後、培地を 5 mL 入れピペティングで細胞をはがした。全量を 50 mL のファルコンチューブに移し、800 rpm, 3-5 min で遠心する。その後、上清を除き、1 mL の培地で細胞を懸濁し、あらかじめ 9 mL の培地を分注したシャーレに懸濁させた細胞を入れ、緩やかに混和後、CO₂ インキュベーターで培養した。

Jurkat : Jurkat 細胞は浮遊細胞であるので前培養を行ったシャーレから全量を 50 mL のファルコンチューブに移し、800 rpm, 3-5 min で遠心した。その後、上清を除き、1 mL の培地で細胞を懸濁し、あらかじめ 9 mL の培地を分注したシャーレに懸濁させた細胞を入れ、緩やかに混和後、CO₂ インキュベーターで 37℃、2 日間培養した。

3) 細胞数の計測

培養液 50 μ L を 1.5 mL エッペンチューブとり、死細胞と区別するため、等量のトリパンプルを加え、軽くタッピングした。セルカウンタープレートにガラスカバーを装着し、計測部分（A と B の 2 カ所）に細胞懸濁液 10 μ L をピペットで挿入後、セルカウンタープレートを Cell カウンターに差し込み細胞の数をカウントした。細胞数は A と B の平均数を用いた。

4) 活性評価

Cell カウンターで計測した細胞数から培地を用いて、HeLa S3 細胞は 5×10^4 cell/mL、Jurkat 細胞は 3.0×10^6 cell/mL に調製し、96 穴プレートに 100 μ L 分注した。2 日間培養を行った。メタノールで溶解した sagamilactam を 10 mM から 100 μ M まで 3 倍希釈で調整し、各ウェルに 1 μ L 添加した（終濃度 1 μ M~100 μ M）。2 日間培養後、WST-8 試薬（Cell Counting Kit-8, 同仁化学）を各 well に 10 μ L ずつ入れ、30 分間培養後、吸光度 460 nm で測定した。

4-2-3 Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性評価および正常細胞 MRC-5 に対する細胞毒性

Sagamilactam による *T. brucei brucei* strain GUTat 3.1 の増殖抑制効果は Collins et al⁵⁶⁾の方法に従って行った。GUTat 3.1 は 10% FBS 入りの Iscove's modified Dulbecco's 培地で 37°C, 5.0% CO₂ の条件下で培養した。続いて、95 μ L の trypanosome 懸濁液 ($2.0\text{--}2.5 \times 10^4$ trypanosomes per mL) を 96 穴プレートに移し、5.0% DMSO 溶液に溶かした 5.0 μ L のサンプルを入れた。作製したプレートを 37°C, 72 h で培養した。培養したプレートにアラマーブルー を 10 μ L 入れ、3-6 h 培養した。最終的に、528/20 nm の励起波長および 590/30 nm の蛍光波長を FLx800 fluorescence microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) を用いて検出した。IC₅₀ 値は the fluorescent plate reader software (KC-4; BioTek Instruments)を用いて決定した。継代培養は、24 穴細胞培養プレートを用いて、同条件のもと行った。

正常細胞 MRC-5 に対する細胞毒性は Otoguro et al⁵⁷⁾の方法に従って行った。

4-3 結果

4-3-1 Sagamilactam の抗菌活性試験

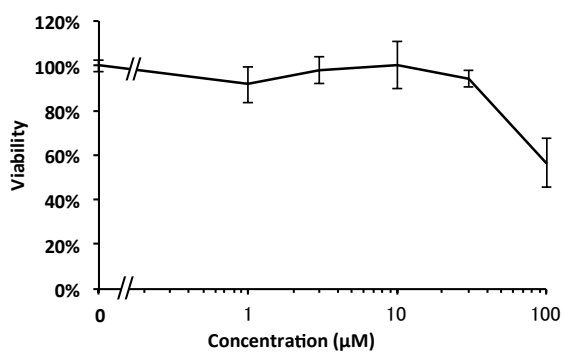
16 種抗菌活性試験の結果、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 株 に 100, 30, 10 μ g/disk の時に阻止円とクリア一度が 11mm, B、10mm, B、9mm, C となった。また、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12582 株には 100, 30, 10, 3, 1 μ g/disk の時に 30mm, D、23mm, D、14mm, D、10mm, D、9mm, D となった。その他の検定菌に対しては 100 μ g/disk でも活性を示さなかった。

4-3-2 Sagamilactam の細胞毒性試験

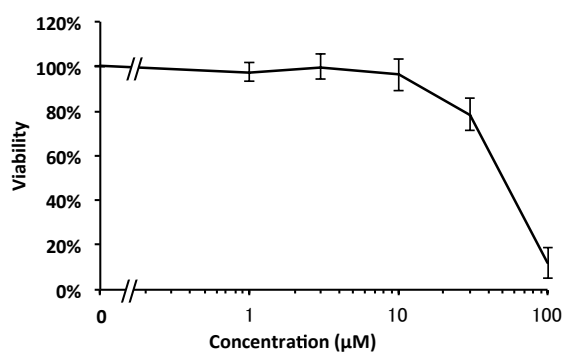
細胞毒性試験の結果を Fig. 4-1 に示した。Sagamilactam は HeLa S3 細胞に 100 μ M の時にわずかな細胞増殖抑制効果を示した。また、Jurkat 細胞では、100 μ M の濃度で細胞毒性を示し、HeLa S3 細胞より強力な活性を示した (IC₅₀ = 58 μ M)。

4-3-3 Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性評価

抗トリパノソーマ活性試験の結果を Table 4-1 に示した。Sagamilactam は、*Trypanosoma brucei brucei* GUTat 3.1 に対し、IC₅₀= 0.14 ± 0.06 μ g/mL (0.25 ± 0.11 μ M) となった。これは既存薬である suramin や eflornithine よりも強い活性を示した。



A) Hela S3 細胞を用いた細胞毒性試験



B) Jurkat 細胞を用いた細胞毒性試験

Fig. 4-1. Sagamilactam の細胞毒性試験結果

Table 4-1. Sagamilactam の抗トリパノソーマ活性結果

Compound	IC ₅₀ (μg/mL)		Selectivity index (SI)
	<i>T. b. b.</i> GUTat 3.1	MRC-5	
Sagamilactam (1)	0.14 ± 0.06	3.22	23.0
Pentamidine*	0.0016	5.71	3,614
Suramin*	1.58	>100	>63
Eflornithine (DFMO)*	2.27	>100	>44

* treatment drugs of trypanosomal disease

5 Sagamilactam 生産株の分類研究

5-1 化学分類学的性状試験

1) 試験菌の培養

YD 液体培地で 27°C で振とう培養した菌体を精製水で 2 回洗浄後集菌し、凍結乾燥を行うことで菌体を得た。

2) ジアミノピメリン酸 (DAP) 異性体分析

凍結乾燥菌体にエタノールを 10 mL を加えて攪拌し、4°C で一晩浸漬させた後、8,000 rpm, 10 分間遠心分離した。上清を除去し、50°C で一晩乾燥させ、脱脂菌体を得た。アンプル管に脱脂菌体 10 mg と 6 M HCl 1 mL を封入し、100°C で一晩加水分解を行った。加水分解サンプルを濾過し、濾液を減圧乾固することで DAP サンプルを得た。DAP サンプルおよび DAP 標品(LL-DAP, DD-DAP, meso-DAP)を cellulose TLC プレート (MERCK) にて メタノール : H₂O : 10 M HCl : ピリジン = 32 : 7 : 1 : 4 で 16 時間展開を行った。プレートを風乾させ、同様の溶媒で 6 時間再度展開した。プレートを風乾後、ニンヒドリン試薬 (和光純薬工業株式会社) を噴霧し、100°C で呈色の確認を行った。サンプルの DAP 異性体は DAP 標品と R_f 値を比較することで判定した。

3) 全菌体糖組成分析法

凍結乾燥菌体 100 mg にエタノールを加え、4°C で一晩浸漬した。8,000 rpm で 10 分遠心分離を行い、上清を除去した後、50°C で菌体を完全に乾燥させた。乾燥菌体 25 mg をねじ口中試に入れ、1 N H₂SO₄ を 1 mL 加え、試験管の口をテフロンシールで密封し、フタをしてヒートブロックにて 100°C、2 時間加水分解を行った。飽和 Ba(OH)₂ で中和し、加水分解物を小試に移し、メタノール 2 mL、クロロホルム 1 mL を加え攪拌した。3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を 4°C に一晩置き、Ba(OH)₂ を完全に析出させた。3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清にブタノールを数滴加え、濃縮乾固し、精製水 50 µL に溶解しサンプルとした。サンプル 1 µL、galactose, mannose, xylose, rhamnose 各々 1 mg/mL の混液標品を 1 µL、glucose, arabinose, madurose, ribose 各々 1 mg/mL の混液標品を 1 µL スポットしたものを cellulose TLC plate (MERCK) にスポットし、ブタノール : ピリジン : dH₂O : トルエン = 10 : 6 : 6 : 1 混液を展開溶媒にし、5 時間展開後、風乾後再び 5 時間展開した。風乾後、aniline-phthalic acid 試薬を噴霧し 100°C で数分加熱し発色させ、標品とのスポットの位置や色の比較により同定した。

4) メナキノン分析法

凍結乾燥菌体 200 mg にクロロホルム : メタノール = 2: 1 混液を加え、一晚攪拌抽出後、濾紙 (東洋濾紙 No. 2) で菌体を除去し、濃縮乾固した。アセトン 3 mL を加え、静かに可溶成分を抽出、この操作を 3 回行い、抽出液を濃縮乾固した。アセトン 3 mL に溶解し、silica gel TLC plate (MERCK) にバンド状にスポットした後、vitamin K₁ (SIGMA) を標品に用いてベンゼンで展開した。254 nm の UV で目的のスポットを確認後、スポット部分をかき取り、小試験管に入れて アセトン 3 mL で攪拌抽出し、3,000 rpm で 15 分間遠心分離後、上清を分取した。再度 アセトン 3 mL を加え攪拌し、3,000 rpm で 15 分間遠心分離後、上清を分取し、先程の上清と合わせ、濃縮乾固した。アセトン 2 mL に溶解し、0.50 µm PTFE filter (ADVANTEC) で濾過し、濃縮乾固したものを アセトン 100 µL に溶解し、サンプルとした。LC-MS (Separations Module, 2795: Waters, Photodiode Array Detector, 2996: Waters, Micromass ZQ, ZQ2000: Waters、カラム pegasil ODS 2.0 φ×50 mm、移動相 メタノール : イソプロパノール = 7: 3、流速 0.2 mL/min、カラム温度 20°C、検出 UV 270 nm、inject 量 1 µL、ニードル電圧 2,000 V、リングレンズ電圧 15 V、オリフィス 1 電圧 85 V、オリフィス 2 電圧 9V) で分析を行い、メナキノンの分子種を同定した。

5) リン脂質分析法

凍結乾燥菌体 40 mg に精製水 3 mL を加え、攪拌した。メタノール 6 mL、クロロホルム 3.75 mL を加え攪拌した後、2,000 rpm で 5 分間遠心分離してクロロホルム層を分取した。上層の水層に再度クロロホルムを 2 mL 加え、同様の条件で抽出を 2 回行った。各クロロホルム層を合わせて濃縮乾固し、クロロホルム 50 µL に溶解したものをサンプルとした。サンプルを 10 ~ 30 µL、phosphatidylglycerol (PG) (2 µg/mL) を 2 µL、diphosphatidylglycerol (DPG) (5 µg/mL) を 1 µL、Phosphatidylethanolamine (PE) (1 µg/mL) を 3 µL、phosphatidylcholine (PC) (10 µg/mL) を 5 µL、phosphatidylinositol (PI) (5 µg/mL) を 1 µL それぞれ silica gel plate にスポットした。展開溶媒として、1 次元目にクロロホルム : メタノール : dH₂O = 10 : 5 : 1、2 次元目に クロロホルム : 酢酸 : メタノール : dH₂O = 40 : 7.5 : 6 : 2 を用いて十分に展開した後風乾し、リンモリブデン酸およびニンヒドリンをそれぞれ別のプレートに噴霧し 100°C で数分加熱し発色させ、標品とのスポットの位置により同定した。

6) ミコール酸分析法

凍結乾燥菌体 50 mg に 10% KOH 2 mL を加え、試験管の口をテフロンシールで密封し、フタをしてヒートブロックにて 2 時間加水分解を行った。6 N HCl 0.6 mL で酸性化し、ヘキサン 2 mL を加え攪拌抽出した後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離して hexane 層を分取した。水層に再度ヘキサンを 2 mL 加え、同様の条件で抽出を 2 回行った。各ヘキサン層を合わせて濃縮乾固し、ベンゼン : メタノール : H_2SO_4 = 10: 20: 1 の混液を 2 mL 加えて 90. 100°C にて 2 時間 methyl ester 化を行った。精製水 2 mL に希釈し、ヘキサン 2 mL 加えて攪拌、一分静置後にヘキサン層を分取した。濃縮乾固したものをクロロホルム 60 μL に溶解し、サンプルとした。サンプル、positive control として同様の処理をした *Nocardia* sp. K10-0666、negative control として同様の処理をした *Streptomyces* sp. K04-0144 を 18 μL silica gel plate にスポットし、ヘキサン : ジエチルエーテル = 4: 1 混液を展開溶媒に TLC を行った。十分に展開した後風乾し、50% H_2SO_4 を噴霧し 100°C で数分加熱し発色させ、標品とのスポットの位置により同定した。

5-2 培養性状および形態観察

1) 培養性状試験

菌体は、YD 培地で 振とう培養し、滅菌水で 2 回洗浄したものを使用した。ISP 2 (Difco)、ISP 3 (DAIGO)、ISP 4 (Difco)、ISP 5 (DAIGO)、ISP 6 (DAIGO)、ISP 7 (DAIGO)、Mullar Hinton agar (Difco)、Nutrient agar (Difco)、Waksman agar (glucose 1.0%, peptone 0.5%, meat extract 0.5%, NaCl 0.3%, agar 1.5%)、Tap-water agar (agar 2%, tap water)、Yeast-extract starch agar (yeast extract 0.2%, soluble starch 1.0% agar 1.5%) に 1 白金耳植菌し、27°C で 3 週間培養し、生育およびコロニーの色調を目視で確認した。色調は Color Harmony Manual (Container Corporation of America) の比較によって行った。

2) 走査型電子顕微鏡による形態観察

走査型電子顕微鏡により K13-0306 株の形態観察を実施した。菌株を凍結保存 YD 培地 から ISP 4 培地 (Difco) に 1 白金耳植菌し、27°C で 20 日間培養した。光学顕微鏡で気菌糸の着生を確認した培地を 5 mm 四方に切り出し、ガラスシャーレに置き、4%オスミウム酸 (千代田純薬有限会社) を 3 滴垂らし、パラフィルムで密封し一晩蒸気固定した。風乾後、試料台にカーボンテープで固定し、試料表面に 60 秒間金を蒸着させ試料とし、走査型電子顕微鏡 (JEOL-5600) にて観察した。

5-3 生理生化学的性状試験

1) K13-0306 株の培養および調製法

K13-0306 株は YD 培地で 振とう培養し、菌体を滅菌水で 2 回洗浄した後、以下の試験に供した。

2) 炭素源の資化性試験

各糖を 10% となるように精製水で溶解し、フィルター滅菌を行った。ISP 9 (Difco) 18 mL に各糖の 10% 溶液 2 mL を加え、よく混和してシャーレに流し込み室温で放置し寒天平板を作製した。Positive control として D-glucose および negative control として滅菌水 2 mL を用いた。寒天平板培地に菌体を 1 白金耳植菌し、27°C で 3 週間培養した。

5-4 遺伝学的解析

1) 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析

YD 培地にて、十分な生育が確認されるまで 27°C で振とう培養した。培養液 1 mL 中に含まれる菌体を滅菌水で 2 回洗浄し、TE (10 mM tris: ナカライテスク, 1 mM EDTA・2Na: 和光純薬工業株式会社, pH 8.0) 0.5 mL を加え、超音波処理 (UCT-0212、株式会社大阪時計パーツ) を 5 分行った。遠心分離 (10,000 rpm, 5 分) 後、上清を DNA 溶液とした。この DNA 溶液を用いて 16S rRNA 遺伝子ユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物は、ExoSAP-IT (USB[®]) を用いて過剰なプライマーや dNTP の分解、不活化を行った後、シーケンシング反応および塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列は、Vector NTI Contig Express により配列の修正、アセンブリを行い、EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 上の BLAST 検索にて近縁種の推定を行った。

2) 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析、系統樹の作成および相同性の算出

分離株の塩基配列と EzTaxon-e のデータベースより得られた *Actinomadura* 属全種の塩基配列を用いて、Sea View (Version 4.4.2) によってアライメントを行い、近隣結合法、最大節約法、最尤法により系統樹を作製した。

3) G+C 含量測定法

(a) 精製 DNA の調製

凍結乾燥菌体 200 mg を 0.1 M saline-EDTA (0.15 M NaCl, 0.10 M EDTA 2Na 2H₂O, pH 8.0) 5 mL に懸濁し、lysozyme (SIGMA) スパーテル小さじ 1、achromopeptidase (和光純薬株式会社) ミクロスパーテル 1 加え、37°C で一晩酵素反応させた。凍結融解を 5 回繰り返し、20% SDS 水溶液を 500 μ L 加え、60°C で 2 時間処理した。放冷後、

Tris-phenol を 5 mL 加え、10,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した。上清をビーカーに移し、氷上で 3 M sodium acetate を 1/10 量、冷却したエタノールを少量加え、DNA をガラス棒で巻き取った。DNA をエタノールで 2 回洗浄後、風乾し、0.1 x SSC (Standard Saline Citrate) 3 mL に溶解した。RNase A (1 mg/mL 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) および RNase T₁ (800 units/mL 0.1M Tris-HCl, pH 7.2) を 1/40 量加え、37°C で一晩反応後、Tris-phenol を等量加え、10,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した。先程と同様に DNA 巻き取り、洗浄、風乾を行い、0.1 x SSC 3 mL に溶解したものを精製 DNA サンプルとした。濃度および純度の確認は NanoDrop Lite (Thermo Scientific) を用い、[260 nm の吸光度/280 nm の吸光度] が 1.8-2.0 のものを高純度のサンプルとした。

(b) G+C 含量測定法

300-350 µg/mL に希釈した精製 DNA 100 µL を 100°C で 10 分間加熱した後、氷上で急冷した。変性 DNA 溶液および標品として GC Analysis Standard (ヤマサ醤油株式会社) 10 µL に nuclease P₁ を 10 µL 加え、50°C で 1 時間反応した。更に、0.1 M Tris (pH 8.1) で 2.4 U/mL に調製した alkaline phosphatase 溶液 (SIGMA) を 10 µL 加えて 37°C で 1 時間反応後、HPLC (カラム CAPCELL PAK C18 UG120 S-5 mm 4.6 φ x 150 mm、移動相 0.2M NH₄H₂PO₄: CH₃CN = 40: 1、流速 1 mL/min、カラム温度 30°C、検出 UV 270 nm、inject 量 5 µL) で分析を行った。標品を参考に補正した各ピーク面積比を求め、G+C の含量を計算した。

5-5 Sagamilactam 生産株の分類学的位置

1) 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析、系統樹の作製および相同性の算出

K13-0306 株からほぼ全長である 1,432 bp の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の情報が得られた。この塩基配列に基づき、BLAST 検索により近縁種を検索したところ、*Actinomadura bangladeshensis* 3-46-b3^{T58)} と 98.4 %, *A. geliboluensis* A8036^{T59)} と 98.2%, *A. meyeræ* A288^{T60)} と 98.1%, *A. chibensis* IFM 10266^{T61)} と 98.0%の相同性を示した。16S rRNA 遺伝子塩基配列の結果から *Actinomadura* 属と推定し、*Actinomadura* 属全種と近隣結合法 (Fig. 5-1)、最大節約法 (Fig. 5-2)、最尤法 (Fig. 5-3) で系統樹を作製した。3 種の系統解析の結果、全て *A. chibensis* IFM 10266^T とクラスターを形成し、最も近縁種であることが分かった。

2) G+C 含量

G+C 含量は、74%であった。

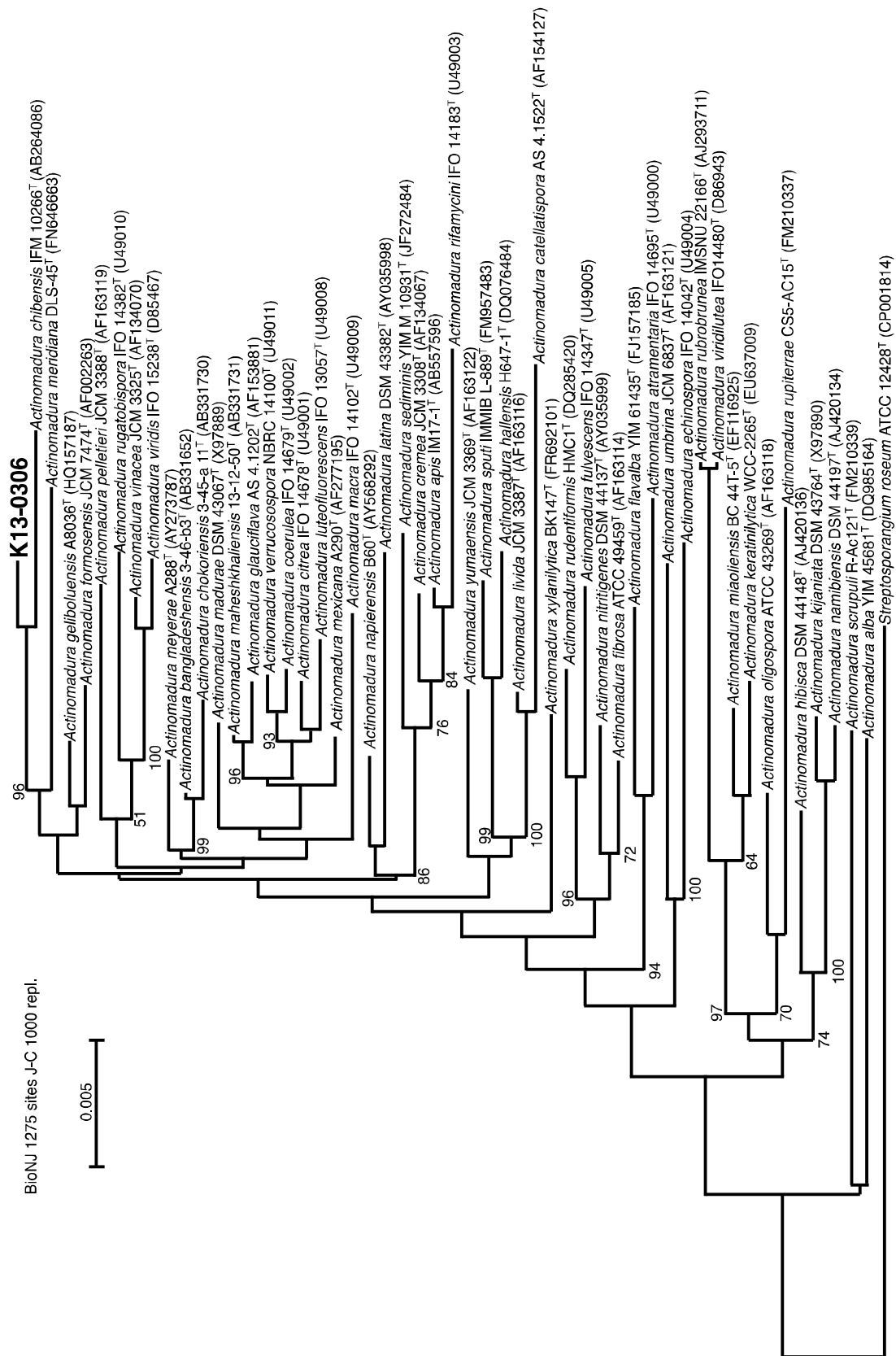


Fig. 5-1. 近隣結合法による K13-0306 株 *Actinomadura* 属全種との系統樹 (Bootstrap 値が 50%以上のものを示した)

Dnapars, boot strap with 1000 replic., 645 steps, 1275 sites (129 informative)

K13-0306

93

67

73

59

83

98

60

62

63

97

92

94

86

56

100

100

95

55

Actinomadura chibensis IM 10266^T (AB264086)

Actinomadura meridiana DLS-45^T (FN646663)

Actinomadura geliboluensis A8036^T (HQ157187)

Actinomadura formosensis JCM 7474^T (AF002263)

Actinomadura napierensis B60^T (AY568292)

Actinomadura latina DSM 43382^T (AY035998)

Actinomadura sediminis YIM M 10931^T (JF272484)

Actinomadura apis IM17-1^T (AB557596)

Actinomadura rifamycin IFO 14183^T (U49003)

Actinomadura crenea JCM 3308^T (AF134067)

Actinomadura bangladeshensis 3-46-b3^T (AB331652)

Actinomadura pelletieri JCM 3388^T (AF163119)

Actinomadura rugatobispora IFO 14382^T (U49010)

Actinomadura chokoriensis 3-45-a 11^T (AB331730)

Actinomadura meyeræ A288^T (AY273787)

Actinomadura maduræ DSM 43067^T (X97889)

Actinomadura maheshkhaliensis 13-12-50^T (AB331731)

Actinomadura glauciflava AS 4.1202^T (AF153881)

Actinomadura verrucospora NBRC 14100^T (U49011)

Actinomadura coerulea IFO 14679^T (U49002)

Actinomadura citrea IFO 14678^T (U49001)

Actinomadura macra IFO 14102^T (U49009)

Actinomadura luteofluorescens IFO 13057^T (U49008)

Actinomadura mexicana A290^T (AF277195)

Actinomadura yumaensis JCM 3369^T (AF163122)

Actinomadura livida JCM 3387^T (AF163116)

Actinomadura catellatipora AS_4.1522^T (AF154127)

Actinomadura umbrina JCM 6837^T (AF163121)

Actinomadura echinospira IFO 14042^T (U49004)

Actinomadura scrupuli R-Ac121^T (FM210339)

Actinomadura alba YIM 45681^T (DQ985164)

Actinomadura sputi IMMIB L-889^T (FM957483)

Actinomadura hallensis H647-1^T (DQ076484)

Actinomadura vinacea JCM 3325^T (AF134070)

Actinomadura viridis IFO 15238^T (D85467)

Actinomadura xylanilytica BK147^T (FR692101)

Actinomadura nitrigenes DSM 44137^T (AY035999)

Actinomadura fibrosa ATCC 49459^T (AF163114)

Actinomadura rudentiformis HMC1^T (DQ285420)

Actinomadura fulvessens IFO 14347^T (U49005)

Actinomadura miaoliensis BC 44-T-5^T (EF116925)

Actinomadura keratinilytica WCC-2265^T (EU637009)

Actinomadura rubrobrunea IMSNU 22166^T (AJ293711)

Actinomadura viridilutea IFO14480^T (D86943)

Actinomadura hibisca DSM 44148^T (AJ420136)

Actinomadura kijaniata DSM 43764^T (X97890)

Actinomadura namibiensis DSM 44197^T (AJ420134)

Actinomadura flavalba YIM 61435^T (JF157185)

Actinomadura atramentaria IFO 14695^T (U49000)

Actinomadura oligospora ATCC 43269^T (AF163118)

Actinomadura rupiterrae CS5-AC15^T (FM210337)

Streptosporangium roseum ATCC 12428^T (CP001814)

(Bootstrap 値が 50%以上のものを示した)

PhyML In(L)=-7823.6 1584 sites GTR 1000 replic. 4 rate classes

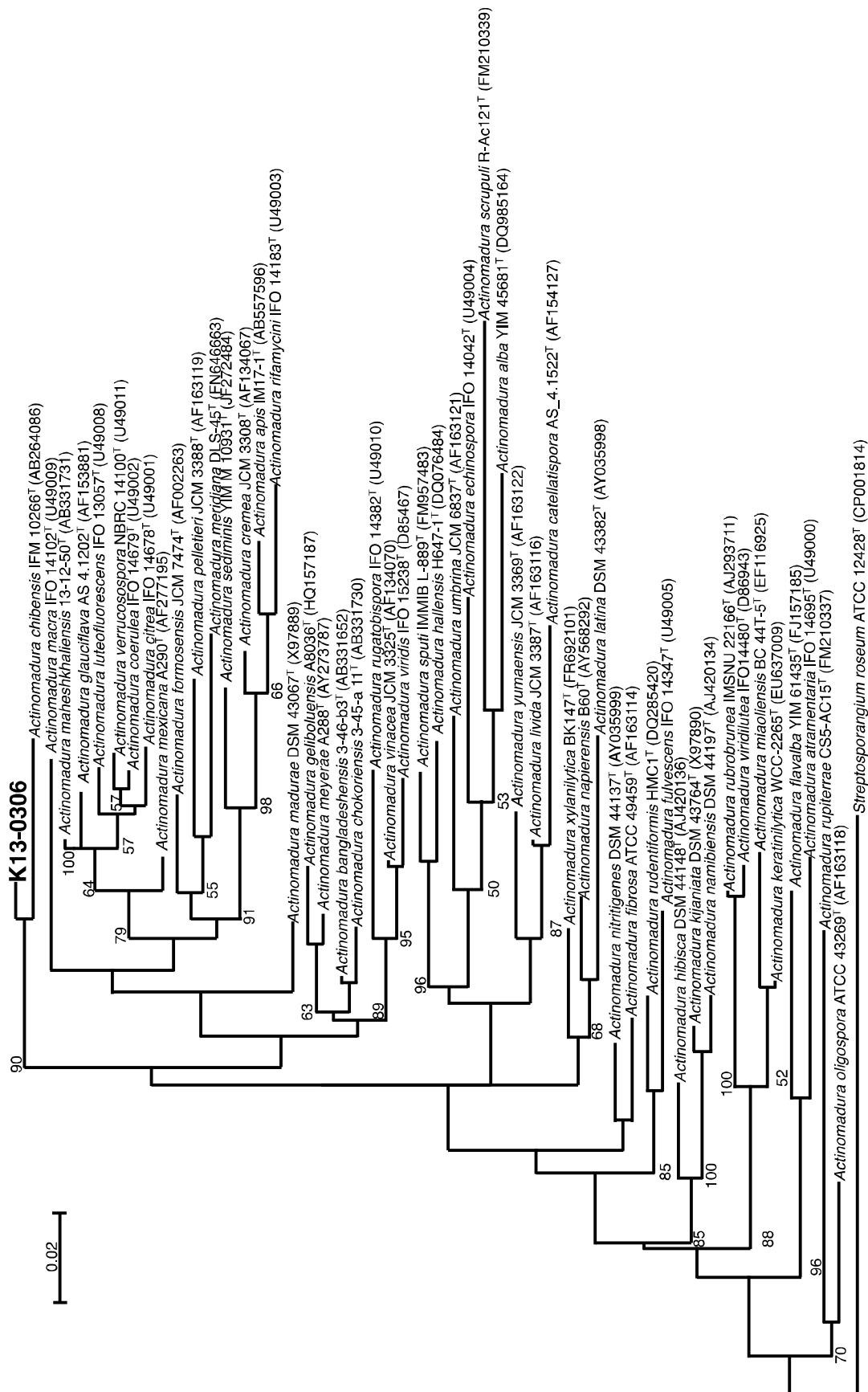


Fig. 5-3. 最尤法による K13-0306 株 *Actinomadura* 属全種との系統樹 (Bootstrap 値が 50%以上のものを示した)

3) ジアミノピメリン酸 (DAP) 異性体分析

菌株 DAP サンプルの TLC を Fig. 5-4 に示した。K13-0306 株の DAP は *meso* 型で、*Actinomadura* 属の特徴と一致した。

4) 全菌体糖組成分析

全菌体糖組成分析での TLC の結果を Fig. 5-5 に示した。全菌体糖組成として、K13-0306 株は glucose, galactose, madurose 及び ribose を有していた。

5) メナキノン分析

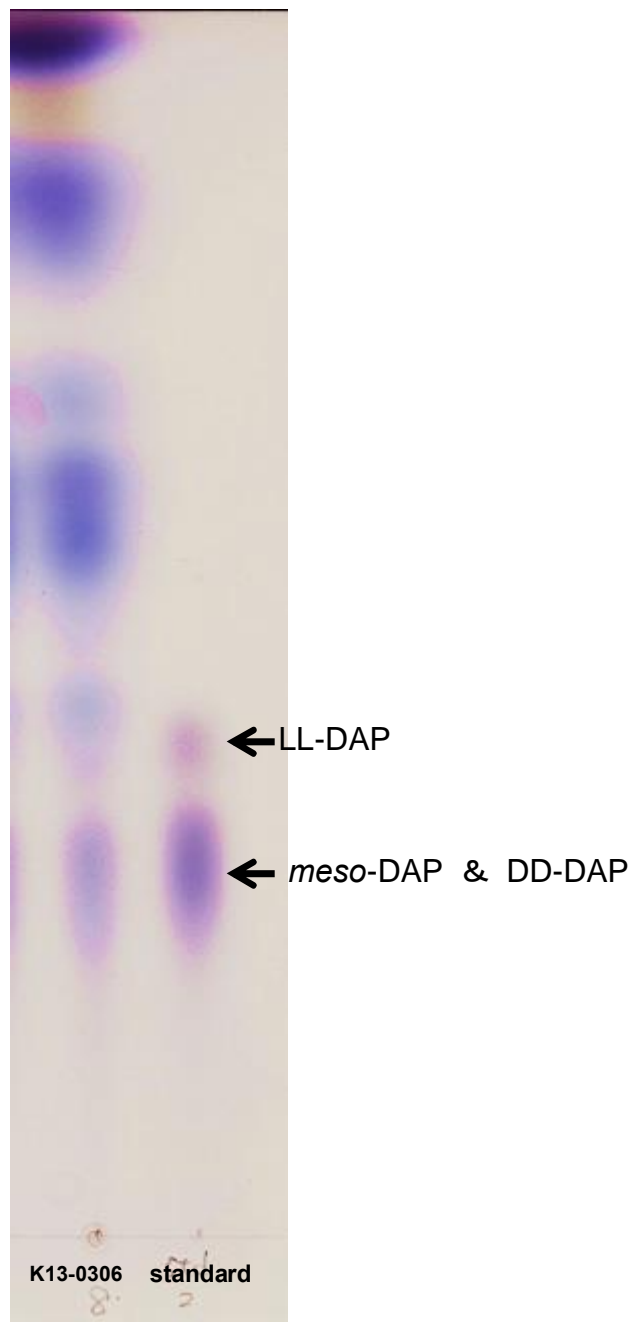
K13-0306 株の LC-MS によるメナキノン分析のチャートを Fig. 5-6 に示した。1, 2, 3, 4, 5 の順に m/z 807.6246, 809.6342, 811.6504, 813.6765, 815.6845 のナトリウム付加分子イオンピークを確認した。分子量が各々 784, 786, 788, 790, 792 であり、MK-9(H₀), MK-9(H₂), MK-9(H₄), MK-9(H₆), MK-9(H₈) の分子量と一致した。各メナキノンの面積比は、それぞれ 2%, 8%, 23%, 62%, 4% であり、主要メナキノンは MK-9(H₆) 及び MK-9(H₄) であった。

6) リン脂質分析

K13-0306 株 のリン脂質分析 TLC クロマトグラムの結果を Fig. 5-7 に示した。標品とサンプルの 1 次元及び 2 次元 TLC の R_f 値からリン脂質組成として、phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) を有していた。

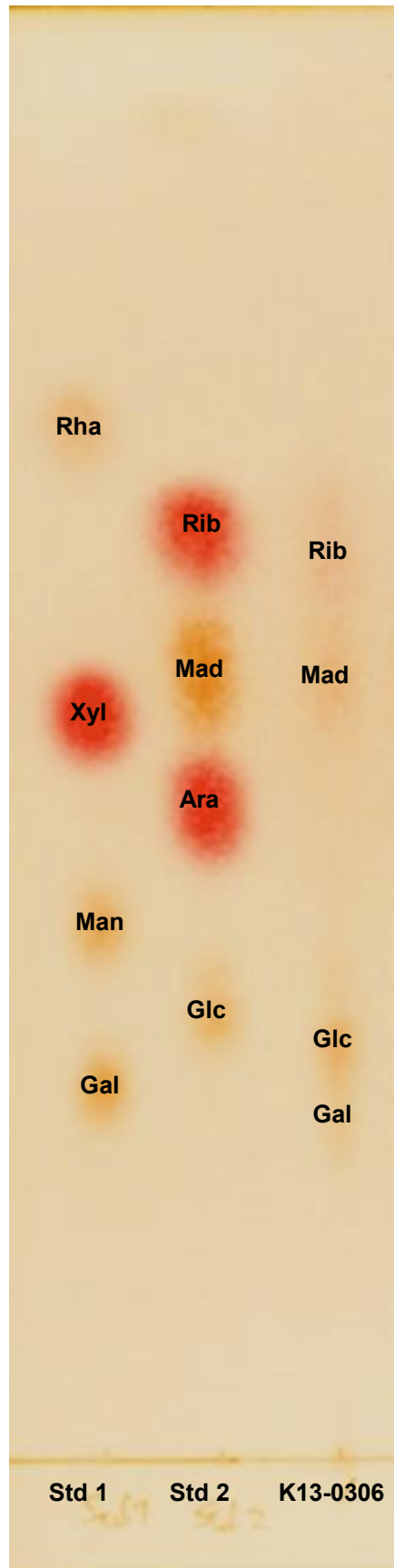
7) ミコール酸含有の有無

ミコール酸分析 TLC クロマトグラムの結果を Fig. 5-8 に示した。標品との比較から、K13-0306 株はミコール酸を有していなかった。



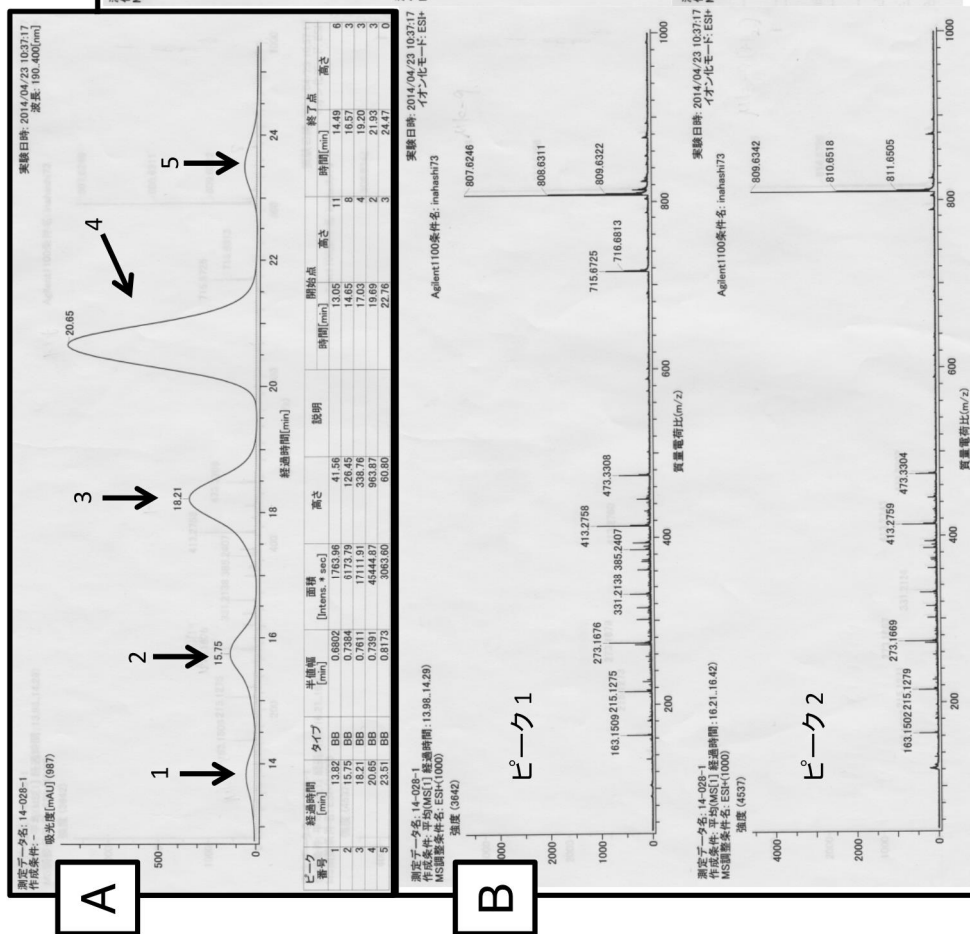
展開溶媒：メタノール：H₂O：10 M HCl：ピリジン = 32：7：1：4

Fig. 5-4. K13-0306 株の DAP 解析



展開溶媒：ブタノール：ピリジン：dH₂O：トルエン = 10：6：6：1

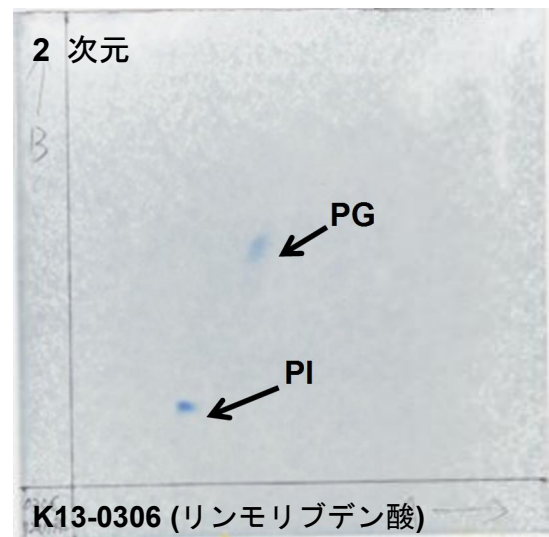
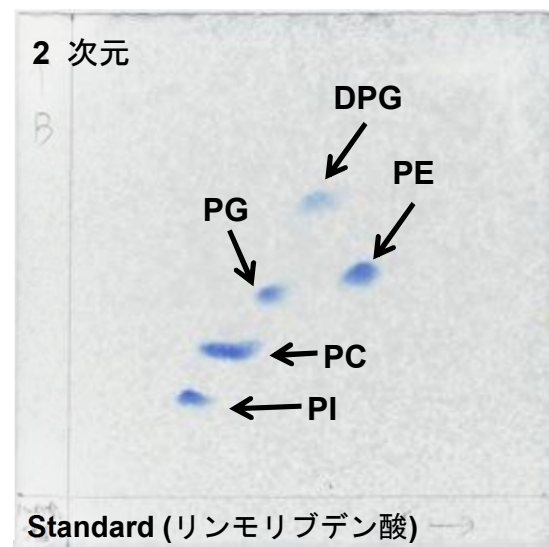
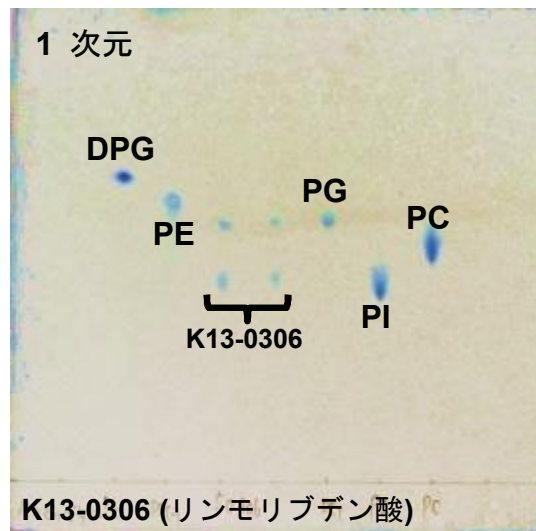
Fig. 5-5. K13-0306 株の全菌体糖解析



A : メナキノンサンプルの LC/MS チャート, B : Aで示したピークの MS 値

LC-MS 条件 : Separations Module, 2795: Waters, Photodiode Array Detector, 2996: Waters, Micromass ZQ, ZQ2000: Waters カラム pegasil ODS 2.0φ×50 mm、移動相 methanol: isopropanol = 7: 3 流速 0.2 mL/min、カラム温度 20°C、検出 UV 270 nm、inject 量 1 μL、ニードル電圧 2,000 V、リングレンズ電圧 15 V、オリフィス 1 電圧 85 V、オリフィス 2 電圧 9V

Fig. 5-6. K13-0306 株のメナキノン解析



1 次元目 : クロロホルム : メタノール : dH₂O = 10 : 5 : 1

2 次元目 : クロロホルム : 酢酸 : メタノール : dH₂O = 40 : 7.5 : 6 : 2

Fig. 5-7. K13-0306 株のリン脂質解析



展開溶媒：ヘキサン：ジエチルエーテル = 4 : 1

Fig. 5-8. K13-0306 株のミコール酸解析

8) 形態的性状

K13-0306 株の各培地における培養性状を Table 5-1 にまとめた。ISP 2, ISP 3, ISP 6, Mullar Hinton agr, Nutrient agar, Waksman agar でよく生育した。コロニーは、白色からオレンジ色のコロニーを呈した。試験を行った培地のなかで、よく生育した ISP 3 で気菌糸の着生が良く、生育は中程度であったが ISP 4 培地でも確認できた。

Table 5-1. K13-0306 の各培地における 3 週間目の培養性状

Medium	Growth	Colony color	Aerial mycerium
ISP 2	Good	Grayish red (6ie)	±
ISP 3	Good	White (a)	++
ISP 4	Moderate	White (a)	+
ISP 5	Moderate	Yellow tint (1ba)	±
ISP 6	Good	Lt. brown (5lc)	
ISP 7	Moderate	Lt. brown (5ng)	±
Mullar Hinton agar	Good	Yellowish gray (2ca)	
Nutrient agar	Good	Pale orange (5ea)	
Waksman agar	Good	Lt. yellowish red (6la)	
Tap-water agar	.	None	
Yeast-extract starch agar	Moderate	Brownish white (3ba)	

9) 電子顕微鏡写真

K13-0306 株の走査型電子顕微鏡写真を Fig. 5-9 に示した。気菌糸は約 $1\text{ }\mu\text{m}$ の楕円球形でかぎ爪状の孢子鎖を着生することが観察された。

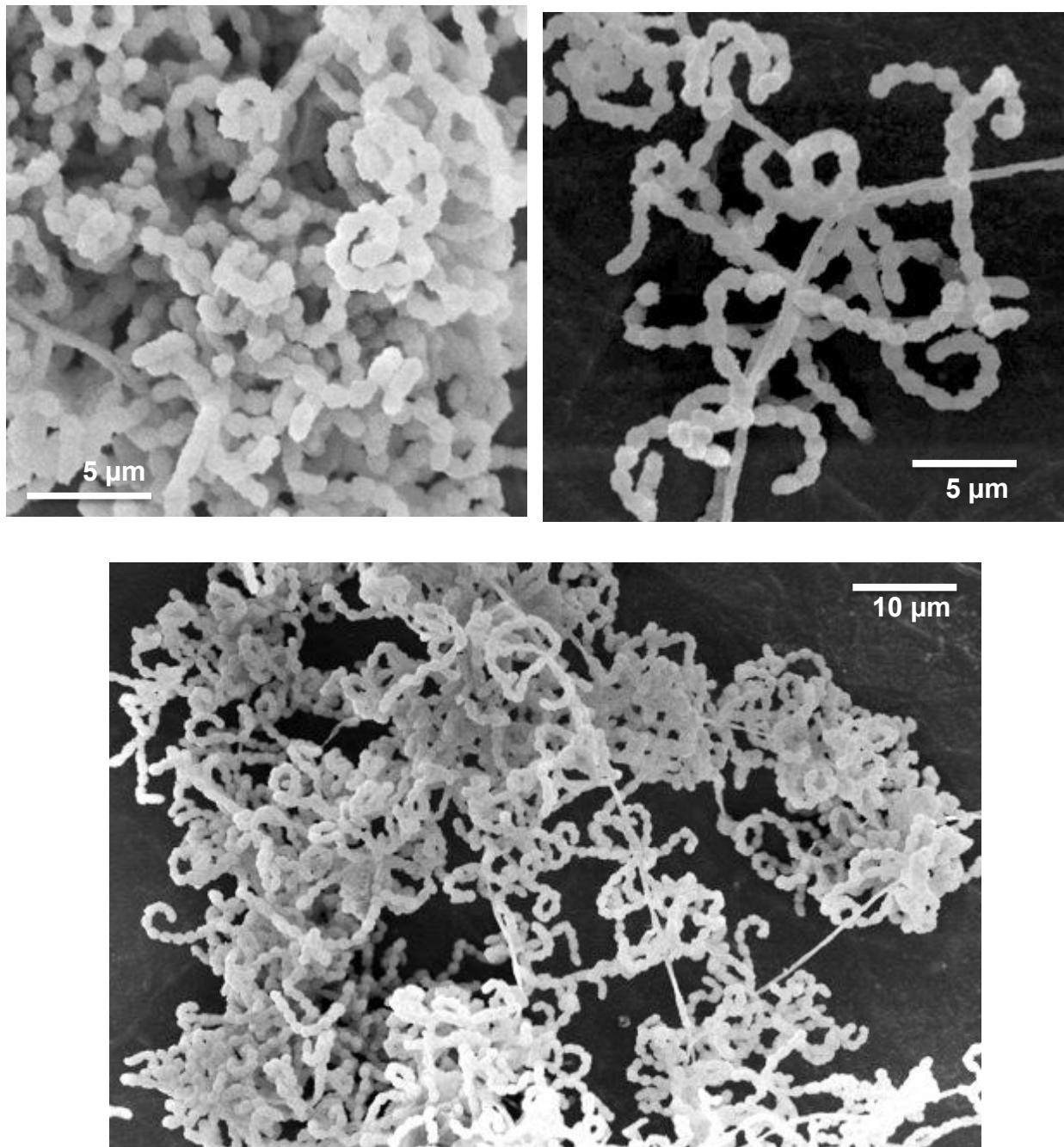


Fig. 5-9. K13-0306 株の電子顕微鏡写真 (ISP 4, 20 日間培養)

10) 炭素源の資化性試験

K13-0306 株の炭素源の資化性試験の結果を Table 5-2 にまとめた。

Starch を加水分解し、糖の資化性では、D-glucose、L-rhamnose、Cellobiose を良く資化していた。

Table 5-2. K13-0306 株の炭素源の資化性試験

		K13-0306
Starch hydrolysis		+
Utilization of :	L-arabinose	
	D-fructose	+
	D-glucose	++
	D-mannitol	
	Glycerol	+
	L-rhamnose	++
	<i>myo</i> -Inositol	
	Sorbitol	
	Galactose	
	Cellobiose	++
	(+)-D-raffinose	
	Mannose	±
	Maltose	

16S rRNA 遺伝子解析による系統解析、化学分類の全菌体糖解析より madurose を含み、リン脂質解析で PG と PI をもつこと、電子顕微鏡による形態観察からかぎ爪状の胞子鎖を着生することより、K13-0306 株は *Actinomadura* 属に属すると決定し、種レベルの分類においてはさらに詳細な検討が必要であることから、本菌株を *Actinomadura* sp. K13-0306 とした。

第2節 まとめ

第1節では34員環ポリエンマクロラクタム化合物 sagamilactam について記述した。

北里大学相模原キャンパス薬用植物園から採取したアシタバの根及びその周辺土壌から分離した株のうち、アシタバの根から 239 株、周辺土壌から 164 株の希少放線菌の中で生育の早い 23 株選択し、4 種類の生産培地で培養し、92 サンプルの培養液抽出物を作製し PC sceening を行った。まず、92 サンプルを LC/UV 解析を行い、培地依存的なピークや培地成分でないピークが見られたサンプル 27 サンプル選択し、LC/MS 解析を行った。これら 27 サンプルの中で K13-0306 株を Y19-2 培地で培養した培養液抽出物に注目した。K13-0306 株の Y19-2 培養液抽出物の溶出時間 33 分の化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 570.3577、270, 279 及び 331 nm に極大吸収を示した。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索結果、該当する化合物がないことから新規物質と推定された。

目的とする新規物質の取得のために、大量培養を行い、Diaion HP-20、シリカゲルおよび ODS によるクロマトグラムで粗精製を行い、最終的に HPLC で分取した。その結果、培養液 10 L から 8.4 mg 得た。MS および NMR 解析の結果、分子式 $C_{37}H_{47}O_4N$ で、オレフィン を 11 個有する大環状骨格であることがわかった。また、部分構造にデカリン骨格を有していた。 1H - ^{15}N HMBC より大環状ラクタム化合物であることが明らかとなり、これら構造情報より SciFinder で検索した結果、新規物質であった。よって生産菌の分離源である北里大学相模原キャンパスの土地名より sagamilactam と命名した。

本化合物は、*Kocuria rhizophila* に対しわずかな抗菌活性を示し、*Pseudomonas aeruginosa* では、わずかながら阻止円様活性 (D 判定) が濃度依存的に観察された。細胞毒性試験では、Jurkat 細胞に対して $IC_{50} = 58 \mu M$ で細胞増殖抑制効果を示した。また、抗トリパノソーマ活性試験を行った結果、*Trypanosoma brucei brucei* GUTat 3.1 に対し、抗トリパノソーマ活性を $IC_{50} = 0.14 \pm 0.06 \mu g/mL$ ($0.25 \pm 0.11 \mu M$) で示した。これは既存薬である suramin や eflornithine よりも強い活性を示した。

Sagamilactam を生産する放線菌 K13-0306 株は 16S rRNA 遺伝子塩基配列より *Actinomadura* 属と推定され、もっとも近縁種は *A. chibensis* IFM 10266^T であった。系統解析、化学分類、培養性状及び生理生化学性状の結果、本菌株は *Actinomadura* に属することがわかった。

第 2 章

海洋分離希少放線菌からの新規物質の探索

第 1 節 Mumiamicin⁶²⁾に関する研究

北里大学感染制御機構海洋バイオテクノロジー釜石研究所 (MBI) は、約 20 年前から海洋微生物を分離・保存し、微生物ライブラリーを構築してきた。MBI で保存されている微生物ライブラリーには土壌由来放線菌と異なる希少放線菌が多く含まれており、物質探索源として魅力的である。その中の放線菌代謝産物からは butenolide 類⁶³⁾(Fig. 1) などの化合物が見出されている。これら菌株を活用すべく、新規物質探索源として用いた。

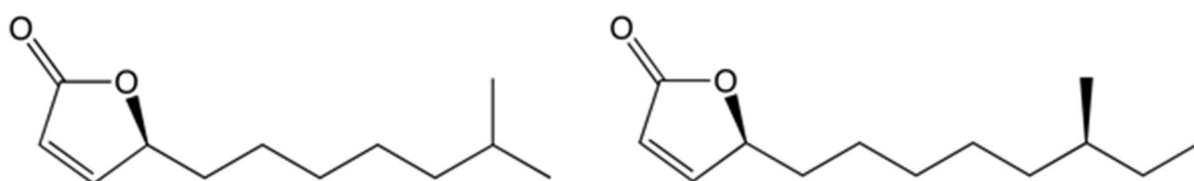


Fig. 1. Butenolide 類の構造

1. 新規物質探索に用いる菌株および培養液サンプルの選定

1-1 材料および方法

1-1-1 新規物質探索に用いる菌株の選定

北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所 (MBI) で分離された新規性の高い放線菌株、340 株から 16S rRNA 遺伝子情報を基にそれぞれの属で系統樹を作製した。この系統樹の中からランダムピックアップし、132 株を選択した (Fig. S2-1-1~S2-1-11、P 134-140)。選択した株は赤線で示した。この 132 株を 3 種の寒天培地 (Waksman、Seino、ISP 2) および 2 種の液体培地 (YD、301 seed) で生育試験を行った結果、生育良好株、27 株を選択した (Table 1-1)。

1-1-2 培地

Waksman 寒天培地

Glucose	1.0%	和光純薬工業株式会社
Peptone	0.5%	極東製薬工業株式会社
Meat extract	0.5%	極東製薬工業株式会社
NaCl	0.3%	和光純薬工業株式会社
Taiyo agar	1.5%	清水食品株式会社

Seino 寒天培地

NZ-amine	0.3%	和光純薬工業株式会社
yeast extract	0.1%	オリエンタル酵母株式会社
Meat extract	0.5%	極東製薬工業株式会社
Taiyo agar	1.5%	清水食品株式会社
CaCO ₃	0.3%	関東化学株式会社

12 培地

Glucose	1.0%	和光純薬工業株式会社
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%	関東化学株式会社
K ₂ HPO ₄	0.1%	関東化学株式会社
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1%	和光純薬工業株式会社
NaCl	0.1%	和光純薬工業株式会社
CaCO ₃	0.2%	関東化学株式会社

他の使用培地は第 1 章、第 1 節の 1-1-2 (P 10, 11) に示したものを使用した。

Table 1-1. 新規物質探索に用いた生育良好な菌株一覧

菌株	推定属	相同性(%)
04OKA-5-97	<i>Pseudonocardia</i>	89
A3C-31-2	<i>Rhodococcus</i>	100
AM174	<i>Kibdelosporangium</i>	67
AM70 030722KMB101-7	<i>Micromonospora</i>	100
HG681	<i>Kibdelosporangium</i>	84
MN1-618	<i>Pseudonocardia</i>	98
RS03-056	<i>Rhodococcus</i>	46
YM13-260	<i>Nocardioides</i>	100
YM16-177	<i>Rhodococcus</i>	93
YM16-195	<i>Verrucosipora</i>	100
YM18-001	<i>Streptoalloteichus</i>	25
YM20-055	<i>Rhodococcus</i>	98
YM20-058	<i>Streptacidiphilus</i>	74
YM22-283	<i>Rhodococcus</i>	98
YM23-297	<i>Streptacidiphilus</i>	63
YM25-058	<i>Actinomyces</i>	97
YM26-150	<i>Kibdelosporangium</i>	95
YM26-155	<i>Kibdelosporangium</i>	94
YM26-159	<i>Kibdelosporangium</i>	87
YM27-104	<i>Pseudonocardia</i>	91
YM28-095	<i>Pseudonocardia</i>	94
YM6-227	<i>Rhodococcus</i>	100
YM9-078	<i>Streptacidiphilus</i>	91
YSM3-55	<i>Pseudonocardia</i>	93
YSM4-67	<i>Pseudonocardia</i>	86
YSP-2-49	<i>Nocardioides</i>	100
YSP-2-79	<i>Mumia</i>	100

1-1-3 培養液サンプルの調整

海洋由来放線菌 27 株(Table 1-1)を 3 種類の寒天培地 (Waksman、Seino、ISP 2) に塗抹し、27°C、3~7 日間静置培養を行った。それぞれの株について、3 種類のなかで最も生育のよい培地を選択し、大試験管に分注した 301 seed 培地および YD 培地 (各 10mL) に植菌して 27°C、280 rpm で 7~14 日間培養を行い、生育がよい方の培地を種培地とした。培養後、培養液を 1 mL エッペンドルフチューブに移し、-20°C で保存した (凍結ブロス)。次いで、生産培地 (12、51、54、Y19-2 および 前培養に使用した培地) 10 mL を分注した大試験管に種培養液を 2% 植菌し、27°C、280 rpm で 5~14 日間培養した。生産培養後、培養液に等量のエタノールを加えて、210 rpm で 30 分振とうした。その後、3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。エバポレーターでエタノール留去後、等量の酢酸エチルで 2 回抽出した。酢酸エチル抽出物をエバポレーターで乾固後、メタノールを 100 μ L 加え、培養液抽出物とした。

1-1-4 LC/UV-MS 解析

LC/UV および LC/MS の条件は第 1 章、第 1 節の Fig. 1-1 (P 13) に示した方法で行った。

1-1-5 生産菌の菌学

第 1 章、第 1 節の 5-4 (P 36) と同様の方法で遺伝学的解析を行った。

1-2 結果および考察

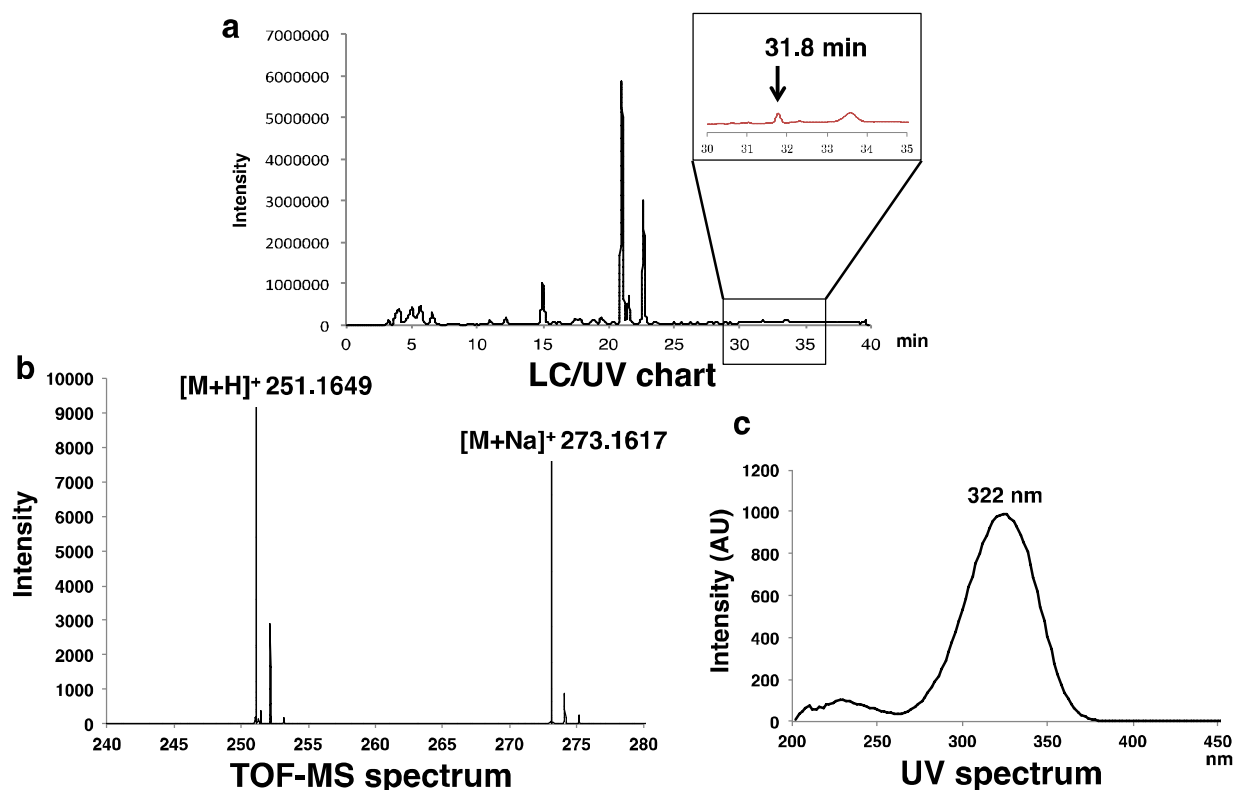
1-2-1 LC/UV-MS による生産物質のプロファイル

27 株を 5 種類の培地で作製した培養液抽出物 135 サンプルを LC/UV 解析し、1 菌株のみが生産しており、かつ、1 種類の生産培地のみで検出される物質を含む培養液抽出物 7 サンプル選択した (Fig. 1-1)。選択した培養液抽出物を LC/MS 解析し、*Mumia* sp. YSP-2-79 株 (Y19-2 培地) の培養液抽出物に含まれる物質の物理化学的性状を得た。YSP-2-79 株が生産する溶出時間 31.8 分の化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 251.1649 および $[M+Na]^+$ m/z 273.1617 が検出され、UV 極大吸収を 322 nm に示した (Fig. 1-2)。この物質の物理化学的性状を Dictionary of Natural Products で検索した結果、該当する化合物がないことから、新規物質と推定した。2 番のサンプル *Actinomyces* sp. YM25-058 株については第 2 章、第 2 節で記述する。他のサンプルについては解析中である。

サンプル	菌株名	培地	分離源
1	<i>Mumia</i> sp. YSP-2-79	Y19-2	① 海鼠池 (鹿児島県薩摩川内市)
2	<i>Actinomyces</i> sp. YM25-058	Y19-2	② 沖ノ島海水浴場 (千葉県館山市)
3	<i>Streptacidiphilus</i> sp. YM9-078	51	③ 平田湾 (岩手県釜石市)
4		54	
5	<i>Verrucosisspora</i> sp. YM16-195	51	④ 中海 境水道 (島根県)
6		301	
7	<i>Rhodococcus</i> sp. A3C-31-2	YD	⑤ 室蘭臨海実験所 (北海道室蘭市)



Fig. 1-1. LC/UV-MS 解析により選択された 5 株 7 サンプルと分離源



カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相 : 5% MeOH / 2 mM ammonium acetate (0-5 min)、5-100% MeOH / 2 mM ammonium acetate (5-35 min)、流速 : 0.5 mL / min、カラム温度 : 40 °C、イオン化 : ESI-positive、検出 m/z : 100-2000

Fig. 1-2. *Mumia* sp. YSP-2-79 株が Y19-2 培地で培養した時の LC/UV チャート (a) と mumiamicin の TOF-MS スペクトル (b) および UV スペクトル (c)

1-2-2 Mumiamicin 生産菌株の分類学的位置

YSP-2-79 株から得られた 803 bp の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の情報を基に、BLAST 検索を行ったところ、1 属 1 種の *Mumia flava* MUSC 201^{T64} (KC907394) と 100% の相同性を示した。以上のことから、YSP-2-79 株は *Mumia* 属に属すると推定された。

2. *Mumia* sp. YSP-2-79 株 が生産する二次代謝産物の精製

2-1 *Mumia* sp. YSP-2-79 の生産培養

Mumia sp. YSP-2-79 株を YD 培地で培養し、凍結ブロスとして保存した。前培養は、500 mL 容三角フラスコに 100 mL 入れた YD 培地に凍結ブロスを 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 7 日間培養した。生産培養では Y19-2 培地 100 mL を分注した 500 mL 容三角フラスコ、100 本に前培養で得られた種培養液を 2% 植菌し、210 rpm、27°C で 11 日間振盪培養した。

2-2 Mumiamicin の単離精製

Mumiamicin の精製スキームを Fig. 2-1 に示した。培養液 (10 L) に等量のエタノール (10 L) を加え、3,000 rpm、10 分間遠心分離した。その上清に 20 L の水道水を加え、Diaion HP-20 (100 i.d. × 250 mm) に供した。水でカラムを洗浄後、100% MeOH で溶出した。100% MeOH Fr. を減圧下で乾固後、少量のメタノールで懸濁、遠心することで、メタノール可溶粗精製物 (4.1 g) を回収した。この粗精製物を silica gel FL100D (60 i.d. × 200 mm) に供し、ヘキサン-クロロホルム-メタノール (10:1:0, 1:1:0, 0:100:0, 0:1:1, および 0:0:100 (v/v), 1.5 L ずつ) で 5 つのフラクションに段階溶出した。Mumiamicin が含まれている 0:100:0 fraction を減圧下で濃縮し、566.1 mg 得た。続いて、ODS column (40 i.d. × 150 mm; Senshu Scientific, Tokyo, Japan) に供し、50% MeOH 水溶液で洗浄後、70% MeOH 水溶液で溶出した。このフラクションを減圧濃縮し、230.3 mg 得た。これを少量の MeOH に溶かし、溶解したものを HPLC 分取した。保持時間 17.0 分のピークを回収し、目的物質を 7.8 mg 得た。

Mumia sp. YSP-2-79

11-day-old cultured broth (Y19-2 medium, 10 L)

| extracted with EtOH (10 L)

| centrifuged for 10 min at 3,000 rpm

Supernatant

| diluted with H₂O (20 L)

| Diaion HP-20 eluted with MeOH

MeOH eluate

| concentrated *in vacuo*

| triturated with MeOH

MeOH-soluble crude material (4.1 g)

| Silica gel open column

| eluted with *n*-hexane : CHCl₃ : MeOH

0:100:0 fraction (566.1 mg)

| ODS open column

| eluted with MeOH:H₂O

70% MeOH aq. fraction (230.3 mg)

| Preparative HPLC

| Inertsil ODS-4 (14 i.d. × 250 mm)

| 80% MeOH aq. / 0.1% formic acid

| Flow : 9.3 mL/min, UV : 330 nm

Mumiamicin (7.8 mg)



Mumiamicin の精製スキーム

Mumiamicin の分取 HPLC チャート

Fig. 2-1. Mumiamicin の精製スキームと分取 HPLC チャート

3. Mumiamicin の物理化学的性状および構造解析

3-1 Mumiamicin の物理化学的性状

物理化学的性状の測定方法は第 1 章、第 1 節の 3-2 に示す方法 (P 20-22) で行った。Mumiamicin の物理化学的性状を Table 3-1 にまとめた。この化合物は MeOH, CHCl₃ に溶解、H₂O には溶けず、UV 極大吸収は 205 および 322 nm に示した。IR absorption は 2923, 2854 および 1581 cm⁻¹ に示し、脂肪族 C-H 結合の対称および逆対称振動およびオレフィンの存在を示唆した。比旋光度を測定したが、偏光しなかったため記載していない。

Table 3-1. Mumiamicin の物理化学的性状

	Mumiamicin
Appearance	White powder
Molecular formula	C ₁₅ H ₂₂ O ₃
Molecular weight	250
ESI-MS (<i>m/z</i>)	
Calcd.	251.1641 (for C ₁₅ H ₂₃ O ₃)
Found	251.1649 [M+H] ⁺
UV _{max} ^{MeOH} nm (ε)	205 (1083), 322 (2218)
IR ν (KBr) cm ⁻¹	2923, 2854, 1581, 1411, 1257, 964
Soluble	MeOH, CHCl ₃
Insoluble	H ₂ O

3-2 Mumiamicin の構造解析

Mumiamicin は白色粉末で得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータより、分子式 $C_{15}H_{22}O_3$ と決定した($[M+H]^+$ ion at m/z 251.1649 (calculated value for $C_{15}H_{23}O_3$, 251.1641))。

1H NMR および ^{13}C NMR のスペクトルデータは Table 3-2 に示した。 1H NMR および HSQC より 6 つの methylene protons, 3 つの sp^2 methine protons および 2 つの methyl protons の存在が示唆された。 ^{13}C NMR および HSQC より、15 の carbons が観測され、それぞれ 6 つの olefinic および aromatic carbons, 172.6 ppm を示す 1 つの carbonyl carbon, 6 つの sp^3 methylene carbons, および 2 つの methyl carbons の存在が示唆された。

1H - 1H COSY より (a) C-2/C-3, (b) C-8/C-11 および (c) C-12/C-14 の 3 つの部分構造が示された (Fig. 3-1)。HMBC 解析の結果、H-2 から C-1 および C-4; H-3 から C-1, C-2, C-4 および C-5; H₃-5-Me から C-4, C-5 および C-6; H-6 から C-4, C-5, C-5-Me および C-7 に相関が出たことにより、部分構造 (a) を含む 2-プロペン酸 および 3-メチルフラン環が C-4 位で連結した構造が確認された。(b) および (c) を含んだヘプタン鎖は HMBC の相関が H₂-8 から C-6, C-7, C-9 および C-10; H₂-9 から C-7 および C-10; H₂-10 から C-11 および C-12; H₂-11 から C-10 および C-12; H₂-12 から C-13; H₂-13 から C-14; H₃-14 から C-12 および C-13 に見られたことから、フラン環の C-7 位に結合することが示された。、-不飽和カルボニル基の立体は H-2 および H-3 のカップリングコンスタントが 15.2 Hz であることから 2*E* と決定した。これまでの NMR の結果より、Fig. 2-2 に示す化合物または 1 位と 4 位の水酸基部分が結合しフラン環を形成し、7 位に水酸基が結合した化合物が考えられた。Mumiamicin の構造を決定するため、DMSO-*d*₆ で測定した。その結果、カルボン酸 (12 ppm) のケミカルシフトが DMSO-*d*₆ (Fig. S2-1-17) で観測された。加えて、trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) とカルボン酸を反応させて mumiamicin のメチルエステル体を作製した (Fig. S2-1-18~S2-1-20)。最終的に、不飽和度から考えてフラン環の存在が妥当である。これは、植物から分離された 3q-methyl-5q-pentyl-furylarylic acid⁶⁵⁾ の ^{13}C ケミカルシフトから強く支持される。以上より、新規フラン脂肪酸であることから、mumiamicin と命名した (Fig. 3-1)。

Mumiamicin の生合成は I 型 PKS および脂肪酸合成経路によって長鎖脂肪酸が作製され、4 および 7 位に水酸基が修飾されその双方の水酸基が環化することにより mumiamicin は生合成されと考えられる。

Table 3-2. Mumiamicin の ^1H and ^{13}C NMR スペクトルデータ

Position	δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult., J in Hz	HMBC
1	172.6	C		
2	110.7	CH	6.14, 1H, d, 15.2	C-1, C-4
3	131.0	CH	7.50, 1H, d, 15.2	C-1, C-2, C-4, C-5
4	145.5	C		
5	128.7	C		
6	110.8	CH	5.97, 1H, s	C-4, C-5, C-5-Me, C-7
7	160.0	C		
8	28.2	CH_2	2.60, 2H, t, 7.4	C-6, C-7, C-9, C-10
9	27.7	CH_2	1.64, 2H, m	C-7, C-10
10	29.0	CH_2	1.32, 2H, m	C-11, C-12
11	29.1	CH_2	1.25, 2H, m	C-10, C-12
12	22.6	CH_2	1.28, 2H, m	C-13
13	31.7	CH_2	1.27, 2H, m	C-14
14	14.1	CH_3	0.90, 3H, t, 6.8	C-12, C-13
5-Me	10.4	CH_3	2.12, 3H, s	C-4, C-5, C-6

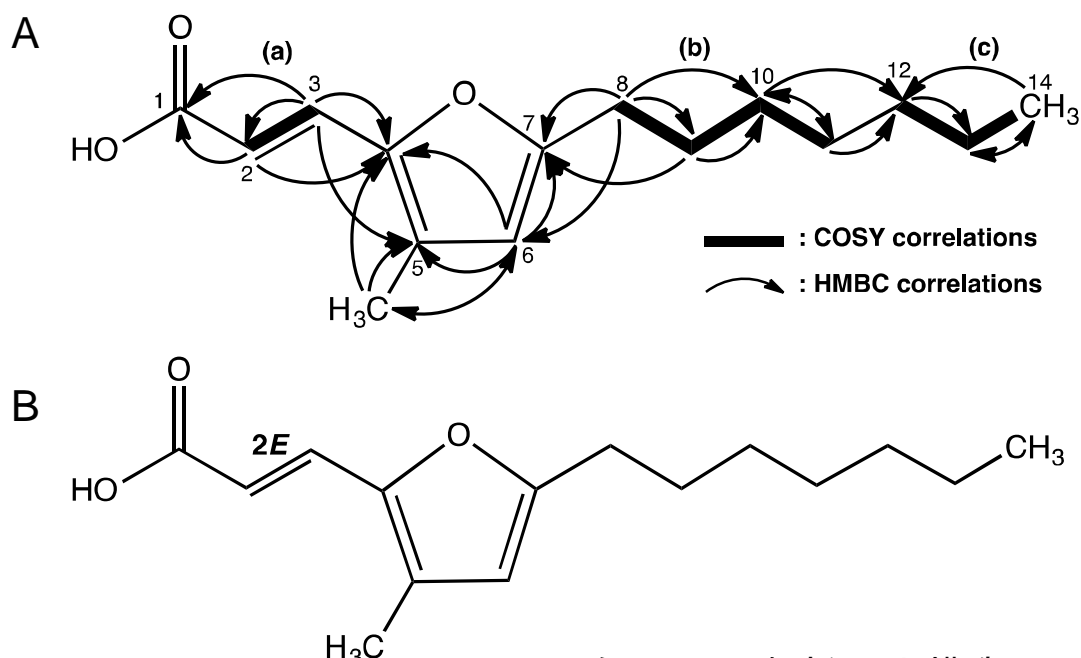


Fig. 3-1. Mumiamicin の 2 次元 NMR 解析(A)と構造(B)

4. Mumiamicin の生物活性評価

4-1 材料

4-1-1 Mumiamicin の抗菌活性

第 1 章、第 1 節の 4-4-1 に示した 1 部の菌株を使用した。

検定菌

グラム陽性細菌

Bacillus subtilis KB211 (ATCC 6633)

Kocuria rhizophila KB212 (ATCC 9341)

グラム陰性細菌

Escherichia coli KB213 (NIHJ)

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* KB88

酵母

Candida albicans KF1 (ATCC 64548)

糸状菌

Mucor racemosus KF223 (IFO4581)

4-1-2 Mumiamicin の細胞毒性試験

第 1 章 第 1 節の 4-1-2 と同様のものを使用した。

4-1-3 Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) に対する抗酸化効果

5,5-dimethyl-1-pyrroline <i>N</i> -oxide (DMPO)	Labotec, Tokyo, Japan
4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
X-band ESR Spectrometer	JEOL, Tokyo, Japan
JES-FA-100	JEOL, Tokyo, Japan
Laser power meter	PAX Co. Ltd., Sendai, Japan
2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-3-carboxamide (TPC)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA

4-2 方法

4-2-1 Mumiamicin の抗菌活性試験

第 1 章 第 1 節の 4-2-1 と同様の方法で行った。

4-2-2 Mumiamicin の細胞毒性試験

第 1 章 第 1 節の 4-2-2 と同様の方法で行った。

4-2-3 Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)に対する抗酸化効果

$\cdot\text{OH}$ の捕捉および $^1\text{O}_2$ 消光アッセイは、Katsuda et al⁶⁶⁾の方法に順じて行った。

$\cdot\text{OH}$ 捕捉アッセイでは、非平衡大気圧プラズマ装置を使用した。3 kV の正弦波交流電圧ジェット発生装置に接続し、3 L/min の流量のヘリウムガスを大気圧の供給ガスとして用いた。純水に溶解した 1 mM の mumiamicin と 300 mM の 5,5-ジメチル-1-ピロリン *N*-オキシド (DMPO) を含む反応混合物の一部 (500 μL) にプラズマジェットを 30 秒間照射した。DMSO (終濃度 3.5 M) および純水をそれぞれ陽性対照および陰性対照として用いた。標準試料として 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル (TEMPOL) (5 μM) を用いて、DMPO-OH の濃度を算出した。なお、マンガンイオンの ESR スペクトルを内部標準として用いた。ESR (X-band ESR Spectrometer; JES-FA-100) の測定条件は、掃引磁場, 331.92. 341.92 mT; 変調周波数, 100 kHz; 変調幅, 0.1 mT; 掃引時間, 2 分; 時定数, 0.03 秒; マイクロ周波数, 9.420 GHz; マイクロ波出力, 4 mW で行った。

$^1\text{O}_2$ 消光アッセイのために、 $^1\text{O}_2$ をローズベンガルのレーザー照射によって生成させた。ネオジウムヤグレーザー (波長 532 nm) と二次高調波発生を備えたレーザー装置を使用し、出力パワーは 40 mW に設定した。2 mM の mumiamicin および 50 mM 2,2,5,5-テトラメチル-3-ピロリン-3-カルボキサミド (TPC) を含む 200 μL の反応混合物を含むセミマイクロキュベットおよび 10 μM のローズベンガルをセットし、約 5×5 mm の混合物面積にレーザーを照射した。放射照度は 160 mW/cm² で行い、キュベットの光路は 10 mm に設定した。Mumiamicin を 100 μL の純水に溶解し、TPC とローズベンガルを 100 μL のリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した。陽性対照は 2.5 mM NaN_3 で、陰性対照は純水に設定した。レーザー照射後、試料を石英セルに移し、ESR スペクトルを X-band ESR Spectrometer (JES-FA-100) で記録した。ESR の測定条件は、掃引磁場, 330.50. 340.50 mT; 変調周波数, 100 kHz; 変調幅, 0.05 mT; 掃引時間, 2 分; 時定数, 0.03 秒; マイクロ周波数, 9.420 GHz; マイクロ波出力, 4 mW で行った。TPC 酸化により生成された nitroxide radical のスピン濃度を $^1\text{O}_2$ で計算するために、20 μM の TEMPOL を標準とし、マンガンイオンの ESR スペクトルを内部標準として使用した。

4-3 結果

4-3-1 Mumiamicin の抗菌活性試験

Mumiamicin の抗菌活性試験は 10 μg の mumiamicin を 6 mm ペーパーディスクに染み込ませ、活性評価したところ、弱いながら *B. subtilis* ATCC 6633, *K. rhizophila* ATCC 9341 および *E. coli* NIHJ に対し、9, 9 および 7 mm の阻止円を形成した。しかし、*X. campestris* pv. *oryzae* KB 88, *C. albicans* ATCC 64548 および *M. racemosus* IFO4581 には 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ でも活性を示さなかった。

4-3-2 Mumiamicin の細胞毒性試験

HeLa S3 および Jurkat cells を用いて細胞毒性試験を行ったが、100 μM において細胞毒性を示さなかった。

4-3-3 Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) に対する抗酸化効果

ESR 分析で、mumiamicin が $\cdot\text{OH}$ の捕捉および $^1\text{O}_2$ 消光活性を有していることがわかった (Fig. 4-1)。 $\cdot\text{OH}$ に対する 1 mM の mumiamicin のラジカル捕捉活性は陽性対照である 3.5 M DMSO よりも強かった。同様に、 $^1\text{O}_2$ に対する 2 mM の mumiamicin を用いたラジカルの消光活性は、2.5 mM NaN_3 よりも強力であった。

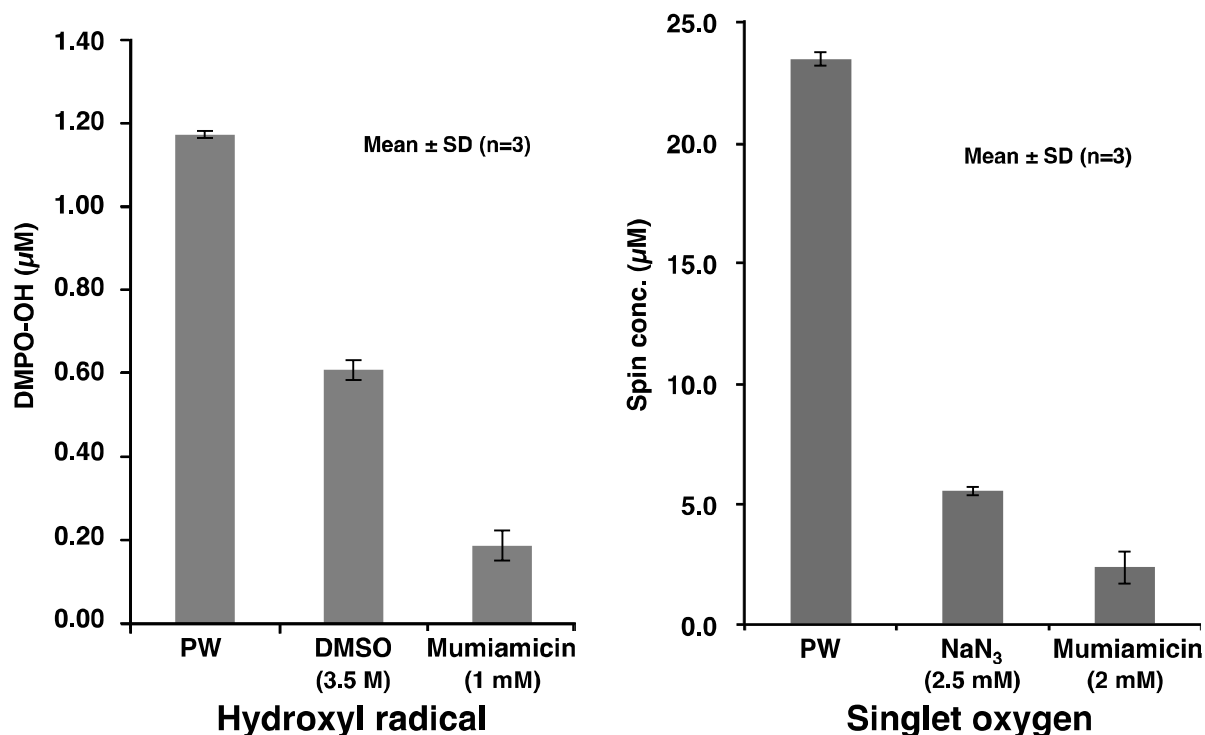


Fig. 4-1. Mumiamicin の hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) および singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) に対する抗酸化効果結果

第2節 Tatemasporine に関する研究

近年、ユニークな生物活性を示すアルカロイドが微生物の二次代謝産物として多く単離されている。例として、indolocarbazole 骨格を持つ staurosporine (Fig. 1)は微生物が生産する大変有名なアルカロイドである。Staurosporine は 1977 年に土壌分離放線菌 *Lentzea albida* AM 2282^T の培養液から発見された最初の indolocarbazole 化合物である。1986 年には、staurosporine はキナーゼの ATP 結合阻害アッセイによって、プロテインキナーゼのナノモラーインヒビターであることが見出された⁶⁷⁾。この興味深い生物活性は、多くの研究所および製薬会社による staurosporine 誘導体および選択的プロテインキナーゼ 阻害剤に関する探索研究を促し、最終的に 1988 年に慢性骨髄性白血病のヒト臨床試験に入った抗癌剤である imatinib⁶⁸⁾の開発をもたらし、2001 年に米国で承認された⁶⁹⁾。Staurosporine およびその類縁体は *Streptomyces* sp. FMA⁷⁰⁾および *Actinomadura* sp. strain 007⁷¹⁾などの海洋分離放線菌からも単離されている。以上のことから海洋分離放線菌が生産する二次代謝産物から PC screening により新規物質の探索を行った。

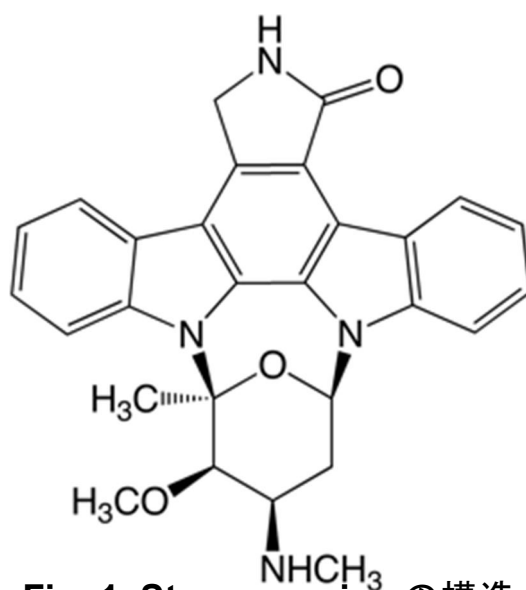


Fig. 1. Staurosporine の構造

1. 新規物質探索に用いる菌株および培養液サンプルの選定

1-1 材料および方法

1-1-1 新規物質探索に用いる菌株の選定

第2章、第2節 1-1-1 (P 54) で使用した菌株と同様のものを使用した。

1-1-2 培養液サンプルの調整

第2章、第1節 1-1-3 で記した方法で行った。

1-1-3 LC/UV-MS 解析

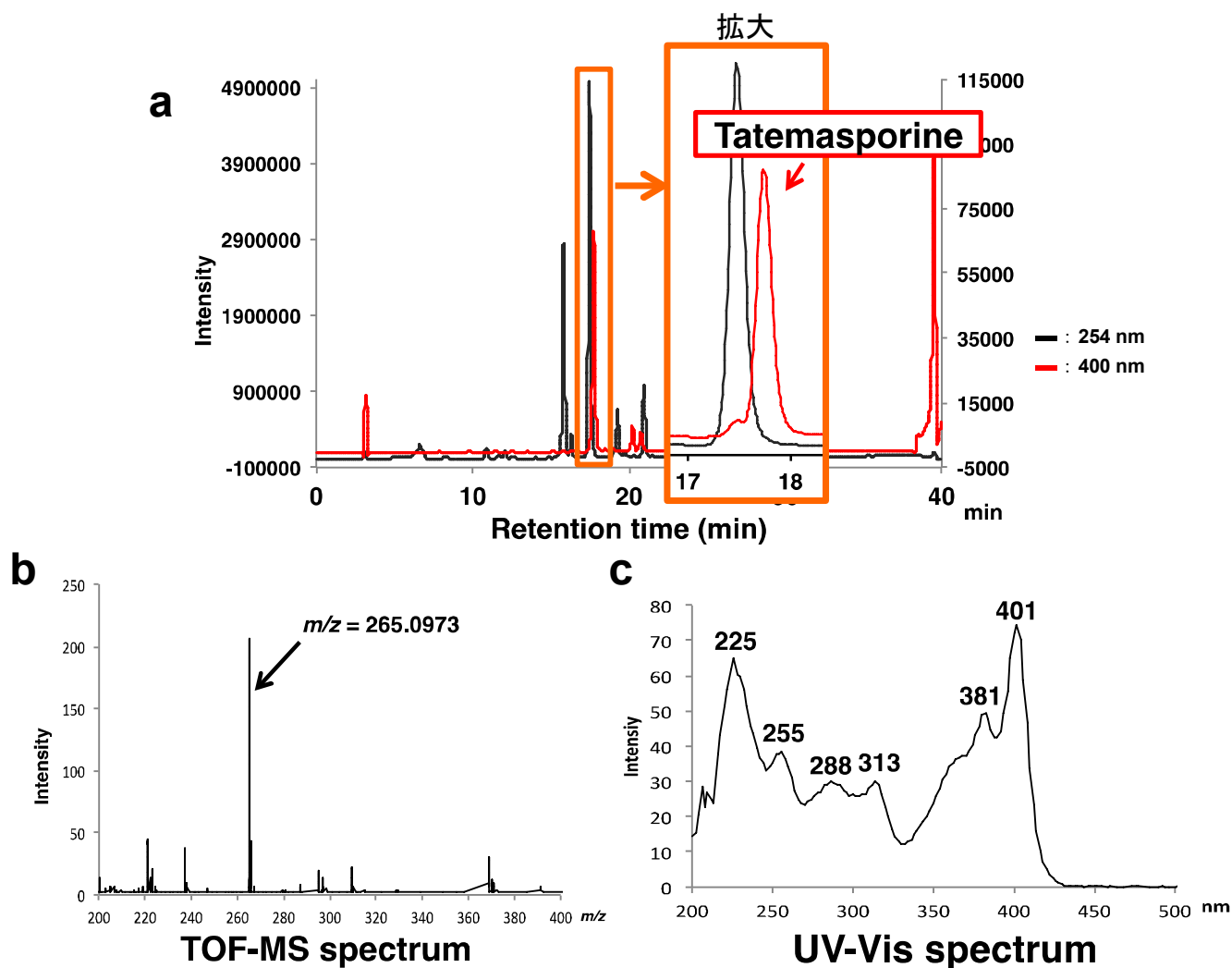
第2章、第1節 1-2-1 で記した方法で行った。

その結果、第2章第1節 1-2 の Fig. 1-1 (P 57) で示した2番のサンプルを選択した。

1-2 結果および考察

1-2-1 *Actinomyces* sp. YM25-058 株の培養液抽出物の LC/UV-MS 解析

作製した培養液抽出物 135 サンプルを LC/UV-MS 解析したところ、*Actinomyces* sp. YM25-058 株 (Y19-2 培地) の培養液抽出物に含まれる物質 (17.8 分) の物理化学的性状を得た。YM25-058 株が生産する化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 265.0973 が検出され、UV 極大吸収を 225, 255, 288, 313, 381, および 401 nm に示した (Fig. 1-1)。この物質の物理化学的性状を Dictionary of Natural Products で検索した結果、該当する化合物がないことから、新規物質と推定した。



カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相 : 5% MeOH / 2 mM ammonium acetate (0-5 min)、5-100% MeOH / 2 mM ammonium acetate (5-35 min)、流速 : 0.5 mL / min、カラム温度 : 40 °C、イオン化 : ESI-positive、検出 m/z : 100-2000

Fig. 1-1. YM25-058 株を Y19-2 培地で培養した時の LC/UV チャート (a) と tatsmasporine の TOF-MS スペクトル (b) および UV スペクトル (c)

2. *Actinomycetospora* sp. YM25-058 株 が生産する二次代謝産物の精製

2-1 *Actinomycetospora* sp. YM25-058 株の生産培養

Actinomycetospora sp. YM25-058 株は 301 seed 培地で培養し、凍結ブロスとして保存し、本菌株の生産培養に使用した。前培養では、凍結ブロスを 500 mL 三角フラスコに 100 mL 入れた 301 seed 培地に 1%植菌し、210 rpm、27°C で 7 日間培養した。生産培養では Y19-2 培地 100 mL、100 本に前培養で得られた種培養液を 1%植菌し、210 rpm、27°C で 7 日間振盪培養した。

2-2 Tatemaspentine の単離精製

Tatemaspentine の精製スキームを Fig. 2-1 に示した。培養液 (15 L) に等量の EtOH を加え抽出後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清に 105 L の水道水を加え、Diaion HP-20 (100 i.d. × 250 mm) に供した。水でカラムを洗浄後、100% MeOH で溶出した。100% MeOH Fr.を減圧下で濃縮後、1N NaOH を用いて pH 8 に調整し、6.0 L の酢酸エチルを用いて抽出した(2.644 g)。酢酸エチル層に 0.1%ギ酸水溶液 2.0 L を加え、分液した。水層を 1N NaOH で pH 8 に調整し、6.0 L の酢酸エチルでアルカロイド抽出した(1.079 g)。同様に、液液分配をもう一度行い、粗精製物 287.4 mg を得た。最終的に、HPLC 分取することで目的物質を 5.0 mg 得た。

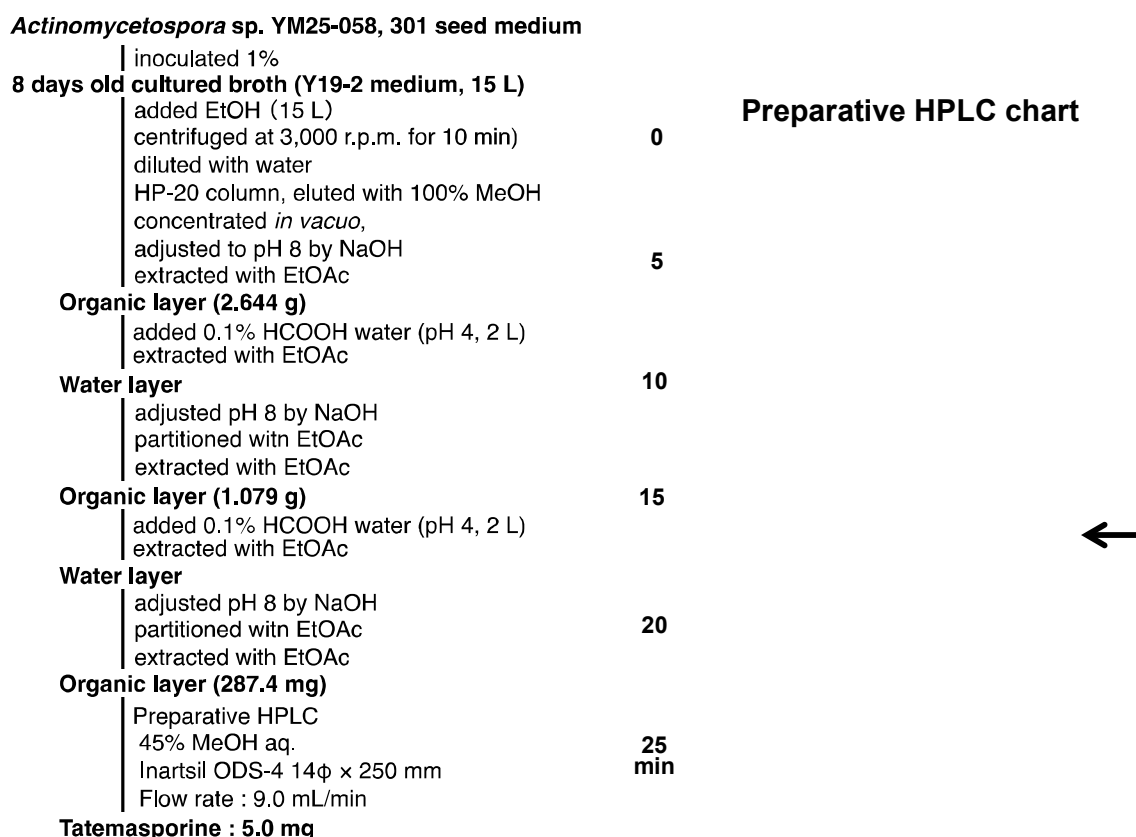


Fig. 2-1. Tatemaspentine の精製スキーム

3. Tatemasporine の物理化学的性状、構造解析および生物活性

3-1 Tatemasporine の物理化学的性状

Tatemasporine の物理化学的性状は Table 3-1 にまとめた。この化合物は MeOH, EtOH, CHCl₃, Acetone および pyridine にとけ、H₂O, CH₃CN および *n*-hexane には溶解せず、222 (43000), 250 sh (21000), 284 (15300), 323 (13100), 399 sh (17000) および 421 (36400) nm に UV 極大吸収を示した。3436 cm⁻¹ にブロードな IR 吸収があることから、水酸基の存在が確認された。

Table 3-1. Tatemasporine の物理化学的性状

Tatemasporine	
Appearance	Yellow powder
Molecular formula	C₁₆H₁₂N₂O₂
Molecular weight	264
ESI-MS (<i>m/z</i>)	
Calcd.	265.0977 (for C₁₆H₁₃N₂O₂)
Found	265.0973 [M+H]⁺
UV λ_{max}^{MeOH} nm (ε)	222 (43000), 250 sh (21000), 284 (15300), 323 (13100), 399 sh (17000), 421 (36400)
IR ν (KBr) cm⁻¹	3436, 2927, 2854, 1727, 1411, 1380, 1253, 1203, 1137, 748
Soluble	MeOH, CHCl₃, Acetone, Pyridine
Insoluble	MeCN, <i>n</i>-hexane, H₂O

3-2 Tatemasporine の構造解析

Tatemasporine は黄色粉末として得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータより、分子式 $C_{16}H_{12}N_2O_2$ と決定された ($[M+H]^+$ ion at m/z 265.0973 (consistent with a calculated value of 265.0977 for $C_{16}H_{13}N_2O_2$)).

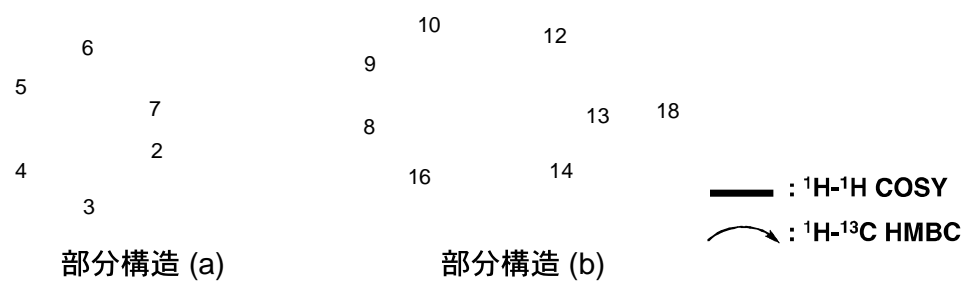
DMSO- d_6 中で測定した 1H NMR および ^{13}C NMR のスペクトルデータは Table 3-2 に示した。 1H NMR および HSQC より 1 つの sp^3 methylene および 8 つの sp^2 methines の存在が示唆された。 ^{13}C NMR および HSQC より、16 つの carbons が観測され、それぞれ 1 つの carbonyl carbon, 1 つの sp^3 methylene carbon, 8 つの sp^2 methin carbons および 6 つの sp^2 tetrasubstituted carbons に分けられた。 1H NMR および 1H - ^{15}N HSQC より、1 つの secondary amide proton の存在が示唆された (Table 3-2 および S2-2-4)。

1H - 1H COSY より、C-3/C-6 および C-9/C-10 の 2 つの部分構造が示された (Fig. 3-1)。 1H - ^{13}C HMBC 解析の結果、H-1 から C-2 および C-7; H-3 から C-2 および C-7; H-4 から C-2; H-5 から C-7; H-6 から C-2 および C-7 に相関が見られたことにより、部分構造(a)が確認され、部分構造(b)は、H-9 から C-16, H-10 から C-8, C-12 および C-15; H-12 から C-10, C-13, C-14, C-15 および C-18; H-14 から C-12, C-15, C-16 および C-18; H₂-18 から C-12 および C-14 に相関が出たことにより確認された。これら部分構造(a), (b)および残りの 1 つの carbonyl 炭素から 4 つの推定構造①～④を導いた(Fig. 3-1)。

続いて、部分構造(a)および(b)は 1H - ^{13}C HMBC のシグナルが H-1 から C-16; H-6 から C-8 および H-9 から C-7 に観測されたことにより、(a)および(b)は 8 および 16 位で結合することが示され、推定構造③および④は除外された。また、残っていた 17 位のカーボンは 166.6 ppm を示し、 1H - ^{15}N HSQC より、1 つの secondary amide proton の存在が示唆されていることから 17 位はアミドカーボンであることが示された。さらに 1H - ^{15}N HMBC より、H-3 から N-1 にシグナルが観察され(Fig. S2-2-6)、最終的に、 1H selective ROESY correlation が H-6 および H-9 に観察されたことにより(Fig. S2-2-8)、Fig. 3-2 に示した構造と決定した。本化合物は生産菌の分離源である千葉県館山市に因んで、tatemasporine と命名した。

Table 3-2. Tatemasporine の化学シフト

Position	δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult., J in Hz	δ_N (ppm)
1			12.72, 1H, s	128.0, NH
2	139.46	C		
3	113.41	CH	7.94, 1H, d, 8.2	
4	126.31	CH	7.49, 1H, t, 7.1	
5	120.43	CH	7.32, 1H, t, 7.4	
6	120.23	CH	8.21, 1H, d, 7.8	
7	120.35	C		
8	116.58	C		
9	115.53	CH	8.29, 1H, d, 6.9	
10	125.14	CH	8.61, 1H, d, 6.9	
11				207.0
12	113.27	CH	8.09, 1H, s	
13	139.13	C		
14	116.49	CH	6.73, 1H, s	
15	127.67	C		
16	133.38	C		
17	166.60	C		
18	60.84	CH ₂	4.56, 2H, s	
18-OH			5.46, 1H, br s	



Structure ①

Structure ②

Structure ③ $\text{R}_1:\text{NH}$, $\text{R}_2:\text{C=O}$

Structure ④ $\text{R}_1:\text{C=O}$, $\text{R}_2:\text{NH}$

Fig. 3-1. 部分構造 (a) および (b) の 2D NMR 解析と推定構造①～④

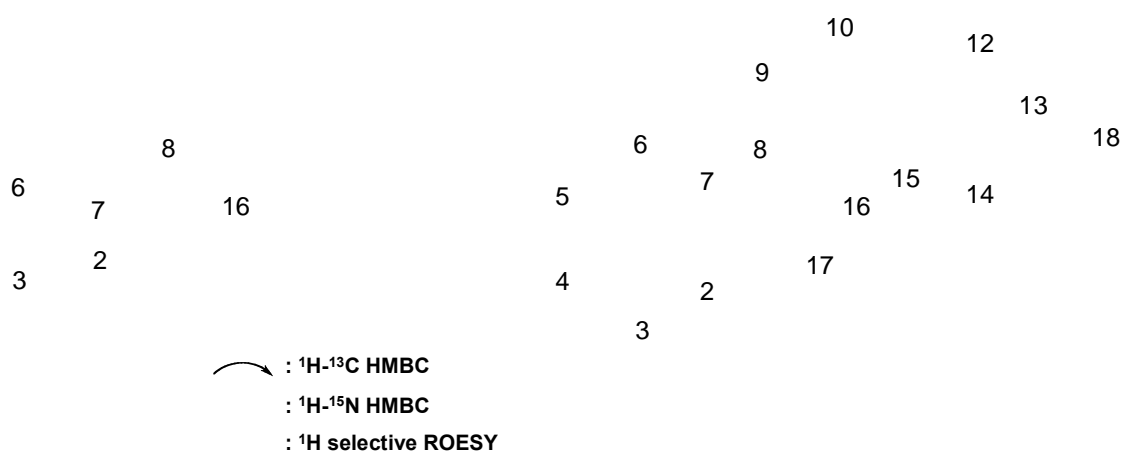


Fig. 3-2. Tatemasporine の 2D NMR 解析と構造

3-3 Tatemaspentine の生物活性

Tatemaspentine の生物活性評価結果を Table 3-3 に示した。Tatemaspentine は今回行った評価系では生物活性は見られなかった。

Table 3-3. Tatemaspentine の生物活性評価まとめ

Antimicrobial activities	
<i>Bacillus subtilis</i> KB211 (ATCC 6633)	>100 µg/disk
<i>Kocuria rhizophila</i> KB212 (ATCC 9341)	>100 µg/disk
<i>Escherichia coli</i> KB213 (NIHJ)	>100 µg/disk
<i>Xanthomonas canpestris</i> pv. <i>oryzae</i> KB88	>100 µg/disk
<i>Candida albicans</i> KF1 (ATCC 64548)	>100 µg/disk
<i>Mucor racemosus</i> KF223 (IFO 4581)	>100 µg/disk
12 gene knockout <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>15 µg/disk
Cytotoxicities	
HeLa S3 cells	IC ₅₀ >100 µM
Jurkat cells	IC ₅₀ >100 µM
Circumvent effect	
ABK-resistant MRSA	
MEPM-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>15 µg/disk
<i>Escherichia coli</i>	>15 µg/disk
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>15 µg/disk
Enzymatic inhibitory activities	
FabI	IC ₅₀ >300 µg/mL
GloI	IC ₅₀ >300 µg/mL
Type III assay	IC ₅₀ >300 µg/mL

4. Tatemaspentine 生産株の分類学的位置

4-1 方法

第 1 章、第 1 節と同様の方法で行った。

4-2 結果

YM25-058 株の各培地における培養性状を Table 4-1 にまとめた。ISP 2, ISP 6 および Maltose-BENNETT'S medium (0.1% yeast extract, 0.1% beef extract, 0.2% N-Z amine, 1.0% maltose, 1.5% agar, distilled water, pH 7.3) でよく生育した。コロニーカラーはうす黄色からオレンジ色のコロニーを呈した。気菌糸はどの培地でも着生し、電子顕微鏡による形態観察では孢子鎖を形成することが観察された(Fig. 4-1)。化学分類では、YM25-058 株は細胞壁にジアミノ酸として *meso*-diaminopimelic acid を含み (Fig. 4-2)、全菌体糖として glucose, galactose, arabinose および ribose を持つ (Fig. 4-3)。主要メナキノンは MK-8(H₄)であり (Fig. 4-4)、PE, OH-PE, DPG および PC が検出された (Fig. 4-5)。YM25-058 株 からほぼ全長である 1,462 bp の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の情報が得られた。この塩基配列にもとづき、BLAST 検索により近縁種を検索したところ、*Actinomycetospora straminea* IY07-55^T 株⁷²⁾と 98.97% の相同性を示した (Fig. 4-6)。以上の結果より、YM25-058 株は *Actinomycetospora* 属に属すると決定した。

Table 4-1. YM25-058 株の各培地における 3 週間目の培養性状

	Growth	Colony color	Aerial mycelium
ISP2a	Good	Yellow orange (3la)	+
ISP3a	Moderate	Pale yellow (2ga)	+
ISP4a	Moderate	Pale yellow orange (3ga)	++
ISP5a	Moderate	Pale yellow (2ga)	+
ISP6a	Good	Yellow orange (3ia)	+
ISP7a	Moderate	Bamboo (2fb)	+
YSa	Moderate	Dull.Y.orange (3ia)	+
Maltose-BENNETT'S	Good	Dull.Y.orange (3ia)	++

Fig. 4-1. YM25-058 株の電子顕微鏡写真 (ISP 4, 20 日間培養)

LL-DAP →

***meso*-DAP & DD-DAP →**

Standard YM25-058

展開溶媒：メタノール：H₂O：10 M HCl：ピリジン = 32：7：1：4

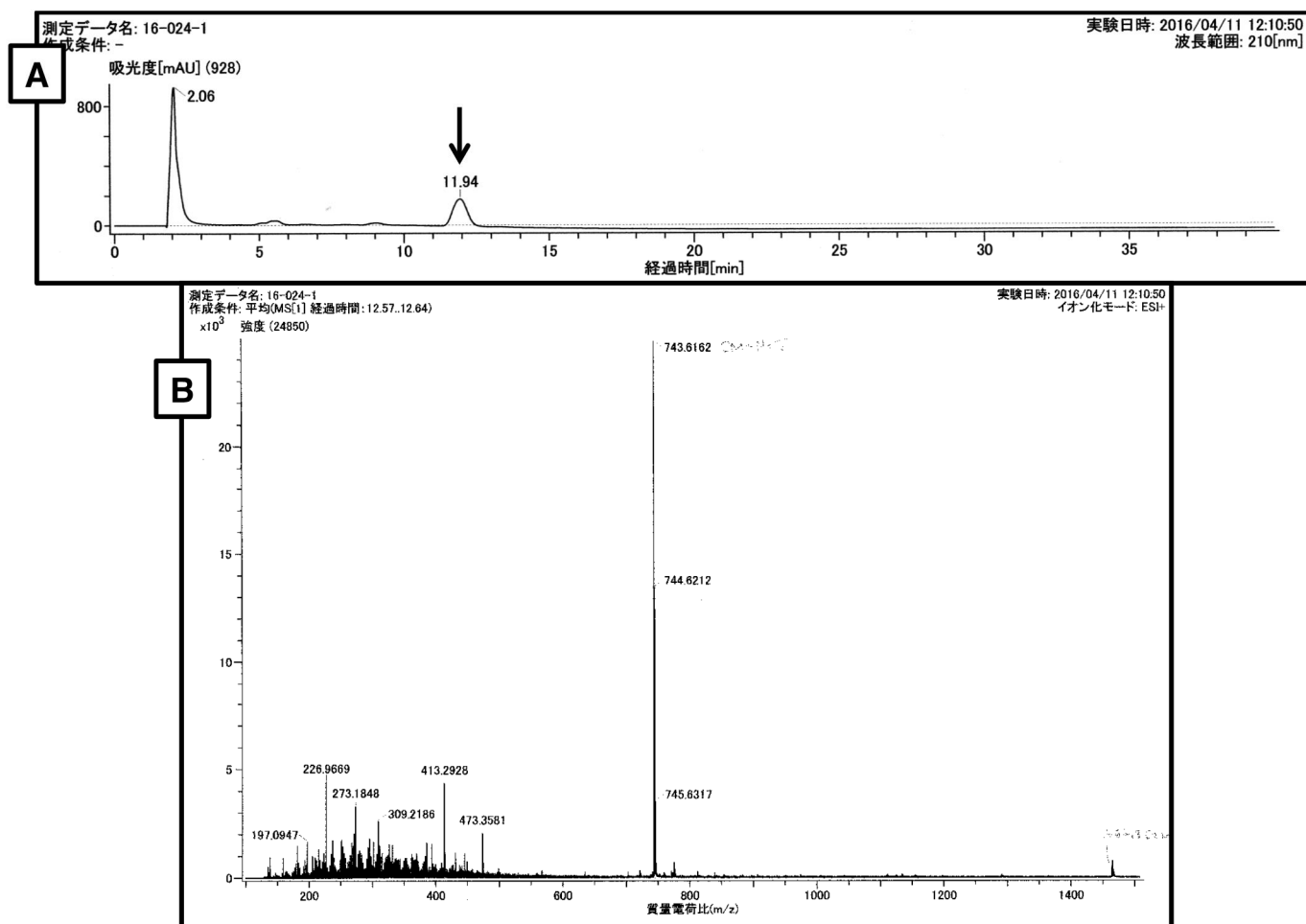
Fig. 4-2. YM25-058 株の DAP 解析

	Rha	
	Rib	Rib
Xyl		
Ara	Man	Ara
	Glc	Glc
Gal		Gal

Std 2 Std 1 YM25-058

展開溶媒：ブタノール：ピリジン：dH₂O：トルエン = 10：6：6：1

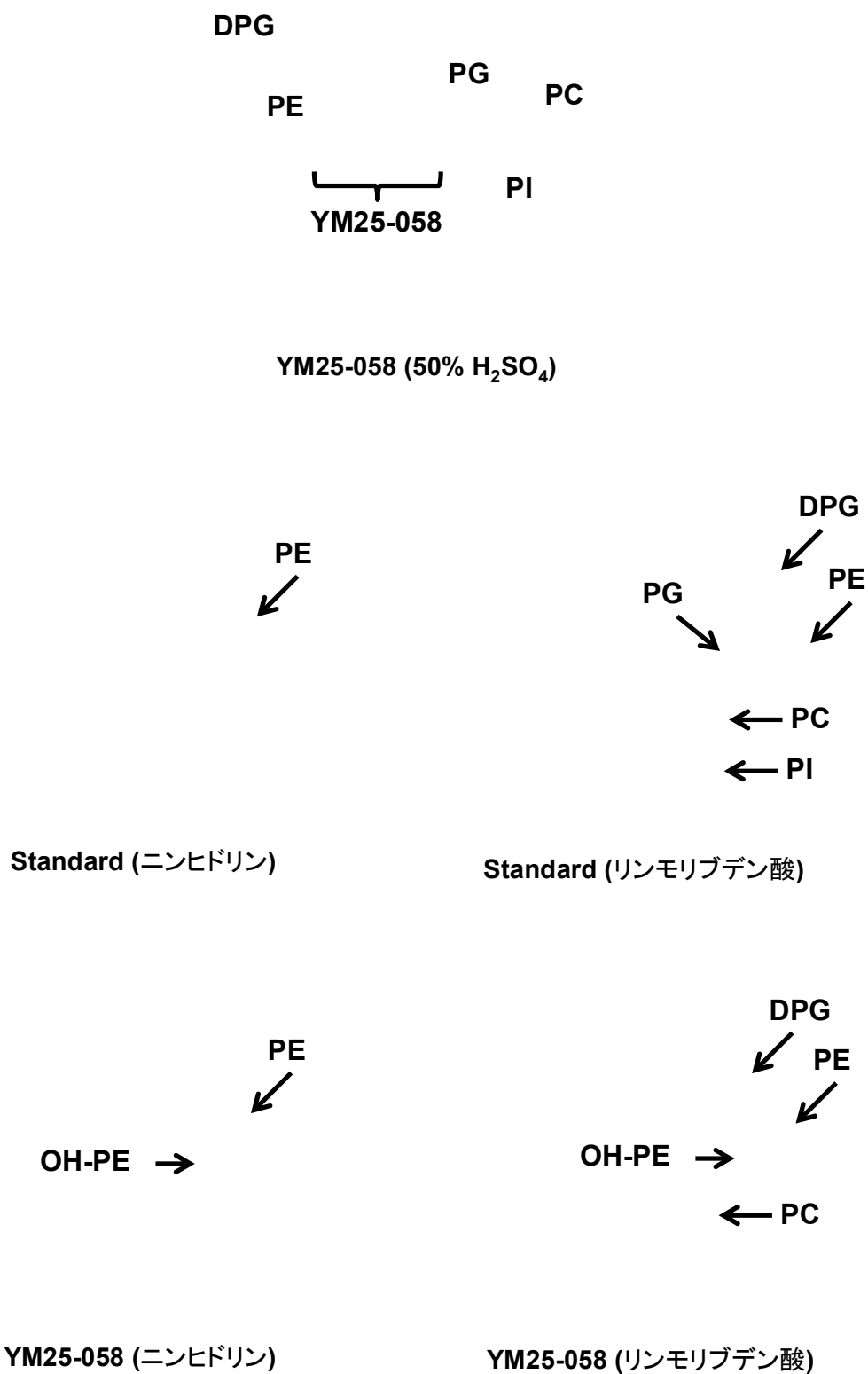
Fig. 4-3. YM25-058 株の全菌体糖解析



A : メナキノンサンプルの LC/MS チャート、B : A で示したピークの MS 値

LC-MS 条件 : Separations Module, 2795: Waters, Photodiode Array Detector, 2996: Waters, Micromass ZQ, ZQ2000: Waters、カラム pegasil ODS 2.0 $\phi \times 50$ mm、移動相 メタノール: イソプロパノール = 7: 3、流速 0.2 mL/min、カラム温度 20°C、検出 UV 270 nm、inject 量 1 μ L、ニードル電圧 2,000 V、リングレンズ電圧 15 V、オリフィス 1 電圧 85 V、オリフィス 2 電圧 9V

Fig. 4-4. YM25-058 株のメナキノン解析



1 次元目 : クロロホルム : メタノール : dH₂O = 10 : 5 : 1

2 次元目 : クロロホルム : 酢酸 : メタノール : dH₂O = 40 : 7.5 : 6 : 2

Fig. 4-5. YM25-058 株のリン脂質解析

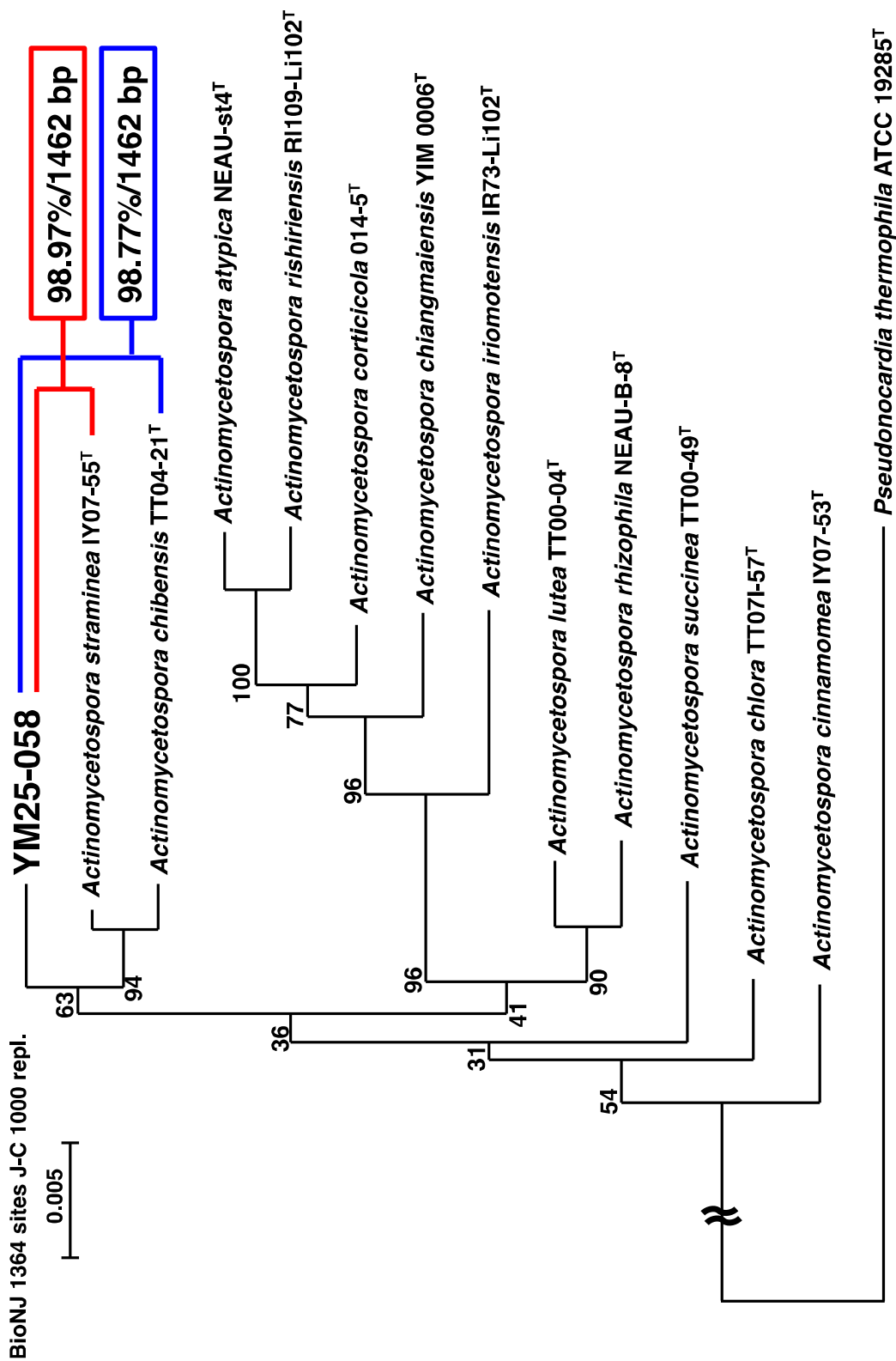


Fig. 4-6. 近隣結合法による YM25-058 株と *Actinomycetospora* 属全種との系統樹

第3節 まとめ

第1節では新規フラン脂肪酸である mumiamicin を単離した。

北里大学釜石研究所で分離された株から、27 株を選択し、5 種類の生産培地で培養した 135 サンプルの培養液抽出物を作製した。135 サンプルを LC/UV 解析を行い、培地依存的なピークや培地成分でないピークが見られた 5 サンプル 7 ピークを選択し、LC/MS 解析を行った。これら 7 ピークの中で YSP-2-79 株を Y19-2 で培養した培養液抽出物に注目した。YSP-2-79 株の Y19-2 培地での培養液抽出物に含まれる LC/UV で溶出時間 31.8 分の化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 251.1648、322 nm に UV 極大吸収を示した。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索結果、該当する化合物がないことから新規物質（後に mumiamicin と命名）と推定された。

Mumiamicin の取得を目的に、大量培養を行い、Diaion HP-20、シリカゲルおよび ODS によるクロマトグラフィーで粗精製を行い、最終的に HPLC で分取した。その結果、培養液 10 L から mumiamicin を 7.8 mg 得た。MS および NMR 解析の結果、脂肪鎖にフラン環を有する新規フラン脂肪酸であった。よって生産菌の属名より mumiamicin と命名した。

本化合物は、*B. subtilis* ATCC 6633, *K. rhizophila* ATCC 9341 および *E. coli* NIHJ に対し、10 μ g/disk で抗菌活性を示した。また ESR 分析より、mumiamicin の \cdot OH に対するラジカル捕捉活性は終濃度 1 mM 陽性対照である 3.5 M DMSO よりも強かった。同様に、 1O_2 に対する 2 mM の mumiamicin を用いたラジカルの消光活性は、2.5 mM NaN_3 よりも強力であった。

第2節ではインドリジンとキノリンが結合した新規骨格である tatemasperine を単離した。

第1節で述べた同様のサンプルの中で YM25-058 株を Y19-2 培地で培養した培養液抽出物に注目した。YM25-058 株の Y19-2 培地での培養液抽出物に含まれる LC/UV で溶出時間 17.8 分の化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 265.0973、225, 255, 288, 313, 381 および 401 nm に UV 極大吸収を示した。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索結果、該当する化合物がないことから新規物質（後に tatemasperine と命名）と推定された。

Tatemasperine の取得を目的に、大量培養を行い、Diaion HP-20 および酸塩基による液液分配で粗精製を行い、最終的に HPLC で分取した。その結果、培養液 15 L から tatemasperine を 5.0 mg 得た。MS および NMR 解析の結果、キノリンにインドリジンが結合した新規骨格であった。よって本化合物を生産菌の分離源である千葉県館山市に因んで tatemasperine と命名した。Tatemasperine は各種生物活性評価を行ったが生物活性は見られなかった。

第 3 章

北里生命科学研究所保有菌株を用いた 新規物質の探索

第 1 節 Virantmycin B および C に関する研究

北里微生物資源ライブラリーには、既知物質および新規物質を生産する微生物 1,000 株以上を保有している。これらの菌株は長期間保存されており、これら長期保存株を、菌株の生存および化合物の生産試験が実施された。Avermectin、staurosporine および virantmycin⁷³⁾を生産する株もこのライブラリーに含まれている。

このライブラリーを用いた PC スクリーニングにより、nanaomycin F, G, H (Fig. 1) および iminimycin A, B (Fig. 2) などの様々な新規化合物が発見されている。これらは主に 54 培地培養液抽出物から探索がなされた。未だ解析されていない 51 培地培養液抽出物に着目し、PC screening を用いて新規物質の探索を行った。

Nanaomycin F

Nanaomycin G

Nanaomycin H

Fig. 1. Nanaomycin F, G, H の構造

Iminimycin A

Iminimycin B

Fig. 2. Iminimycin A, B の構造

1. 新規物質探索に用いる菌株および培養液サンプルの選定

1-1 新規物質探索に用いる菌株の選定

精製候補化合物は北里微生物資源ライブラリーに含まれている放線菌 344 株を用いて収集した 51 培地の培養液抽出物の LC/MS データから主成分解析ソフト MarkerView™ (SCIEX, Massachusetts, USA) を用いて選択した。MarkerView™ 上では培養液抽出物に含まれる化合物が一つ一つプロットとして表示される。また、プロットが 344 株のうちのどの株で生産されている物質であるかを見ることができる。主成分解析により新規性の高い化合物と新規性の低い化合物を分類し、選択した化合物の物性情報 (m/z 値、組成式、HPLC 溶出時間及び UV 極大吸収値など) を Dictionary of Natural Products で検索して新規と推定された化合物を生産する菌株を選定した。

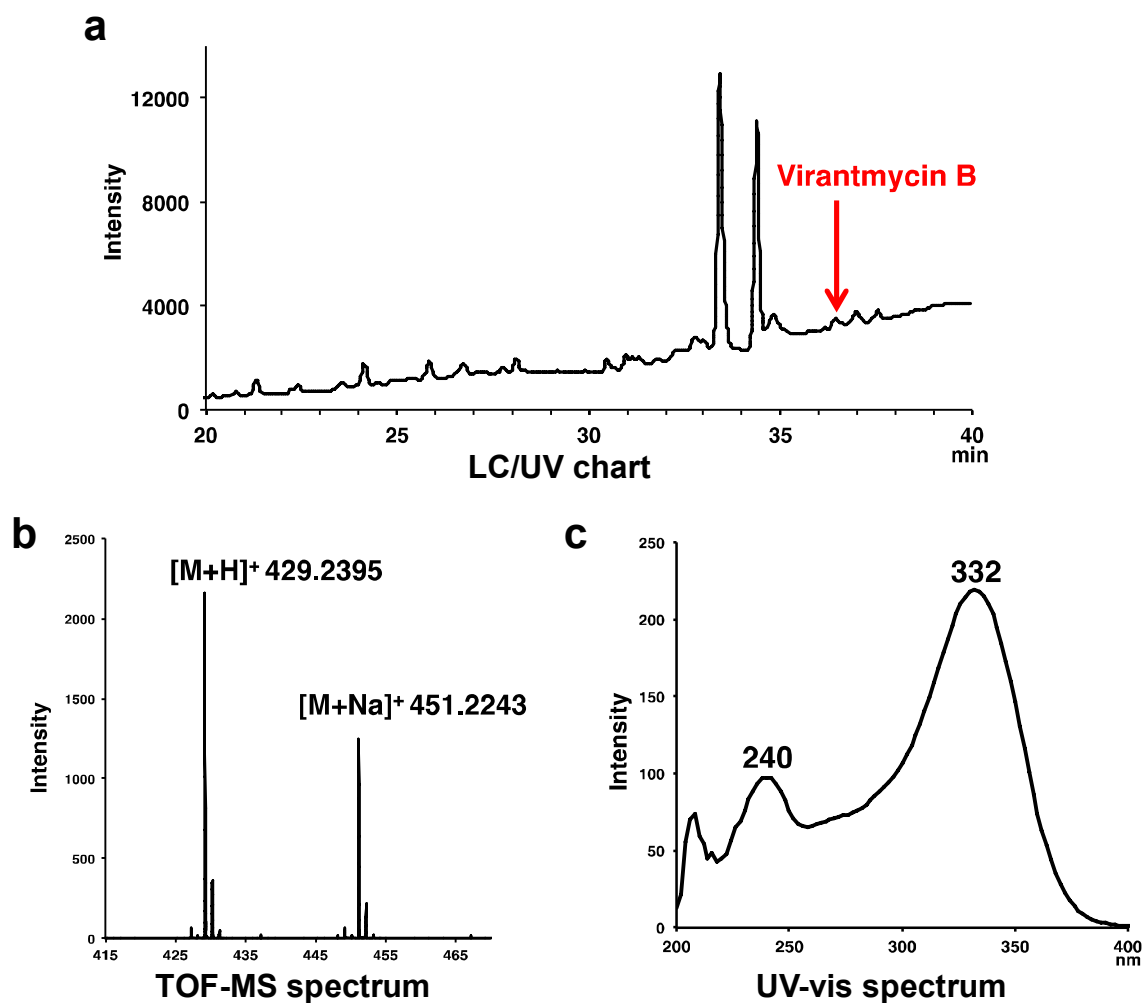
1-2 結果および考察

1-2-1 MarkerView™ を用いた新規物質の探索

主成分解析を行った結果、Table 1-1 に示した 17 の菌株の培養液から 21 ピークが新規物質と推定された。この 21 ピークからまず、dityromycin⁷⁴⁾生産菌として登録された *Streptomyces* sp. AM-2504 株から標的物質の単離精製を行った。選択した培養液抽出物を LC/MS 解析し、*Streptomyces* sp. AM-2504 株の培養液抽出物に含まれる物質の物理化学的性状を得た。AM-2504 株が生産する溶出時間 36.5 分の化合物は、 $[M+H]^+$ m/z 429.2395 および $[M+Na]^+$ m/z 451.2243 が検出され、UV 極大吸収を 240, 332 nm に示した (Fig. 1-1)。この物質の物理化学的性状を Dictionary of Natural Products で検索した結果、該当する化合物がないことから、新規物質と推定した。

Table 1-1. MarkerView™ による新規物質と推定されたピーク一覧

No.	Strain	m/z	Rt	Producing compound
1	<i>Streptomyces</i> sp. AM-2504	429	36.5-37	Dityromycin
2	<i>Streptomyces</i> sp. KP-2324	867	40-41.5	Tubercidin
3	<i>Streptomyces</i> sp. OS-1993	239.000-239.140	29.5-30.5	Chloramphenicol
4	<i>Streptomyces</i> sp. NA-337	199.001-199.124	30.5-31	NA-337
5	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> AM-3672	520.627-520.904	35.48, 35.93	Herbimycin A
6	<i>Streptomyces herbaceus</i> AM-3279	619.4 659.247-659.461	34.4 34.3, 34.51	9-β-D-Arabinofuranosyladenine (AraA)
7	<i>Streptomyces</i> sp. OM-0704	497	34.13	Diazaquinomycin A
8	<i>Streptomyces</i> sp. MA-0023	737.117-737.261	31-32	Globopeptin
9	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> KM-11026	371.008-371.151 444.931-445.171 513.996-514.262	30-31 21-22 18.15	
10	<i>Streptomyces</i> sp. AC-1978	258.982-259.140	25-25.5	Takaokamycin
11	KM12-593	524.111-524.301	24.5-25.5	
12	<i>Streptomyces</i> sp. AM-7650	470 566.126-566.463	28.06 35-36	
13	<i>Streptomyces</i> sp. AM-4900	335.130-335.241	34-35	
14	<i>Streptomyces</i> sp. KP-2395	630	37.0-37.4	Xanthohumol
15	<i>Streptomyces</i> sp. AM-3468	420.262-420.329	37.5-38.5	BA-17039A
16	<i>Streptomyces</i> sp. AM-9225	487.100-487.292	32-33	
17	<i>Streptomyces</i> sp. SA-2189	199.005-199.117	29-30	



カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相 : 5% MeOH / 2 mM ammonium acetate (0-5 min)、5-100% MeOH / 2 mM ammonium acetate (5-35 min)、流速 : 0.5 mL / min、カラム温度 : 40 °C、イオン化 : ESI-positive、検出 m/z : 100-2000

Fig. 1-1. AM-2504 株を 51 培地で培養した時の LC/UV-MS チャート(a) と virantmycin B の TOF-MS スペクトル(b)および UV スペクトル(c)

2. *Streptomyces* sp. AM2504 株 が生産する二次代謝産物の精製

2-1 *Streptomyces* sp. AM2504 株の生産培養

Streptomyces sp. AM2504 株は 301 seed 培地で培養し、凍結ブロスとして保存し、本菌株の培養に使用した。前培養では、凍結ブロスを 500 mL 容三角フラスコに 100 mL 入れた 301 seed 培地に 1%植菌し、210 rpm、27°C で 3 日間培養した。生産培養では 51 培地, 60 L (Jar 培養装置 3 基)、に前培養で得られた種培養液を 1%植菌し、210 rpm、27°C で 7 日間 Jar 培養した。

2-2 Virantmycin B および C の単離精製

Virantmycin B および C の精製スキームを Fig. 2-1 に示した。培養液 60 L を 12,000 rpm, 10 分で遠心分離後、その上清を Diaion HP-20 (100 i.d. × 80 mm) に供した。30% MeCN 水溶液で洗浄後、60% MeCN 水溶液で溶出させ、減圧下で濃縮後、目的物質を含む粗精製物(11 g)を得た。この粗精製物を silica gel FL100D (65 i.d. × 90 mm) に供し、CHCl₃/MeOH (100:0-1, 100:0-2, 50:1-1, 50:1-2, 10:1-1, 10:1-2, 1:1-1, 1:1-2 および 0:100 (v/v), 1.5 L ずつ)で 9 つのフラクションに段階溶出した。100:0-2 および 50:1-1 フラクションを合わせ濃縮乾固させ、1,134 mg 得た。続いて、ODS column (30 i.d. × 100 mm)に供し、40% MeCN 水溶液で洗浄後、60%MeCN 水溶液で溶出した。このフラクションを減圧濃縮し、少量の MeOH に溶かし、MeOH 可溶部を HPLC 分取した。26-27 および 28-32 分のピークを回収し、目的物質である virantmycin B および C をそれぞれ 24 mg, 27 mg 得た。

Streptomyces sp. AM-2504 strain

inoculated 1 mL into seed medium
incubated for 3 days at 27 °C, 210 rpm
inoculated 1% into 51 medium (20 L x 3)
incubated for 7 days at 27 °C
centrifuged

Supernatant

HP-20 column chromatography (100 i.d. x 80 mm)
MeCN/H₂O system

60% MeCN (11 g)

concentrated *in vacuo*
Silica gel chromatography (65 i.d. x 90 mm)
CHCl₃/MeOH system, 1.5 L each

100:0-2 50:1-1
(670 mg) (464 mg)

concentrated *in vacuo*
ODS column chromatography (30 i.d. x 100 mm)
MeCN/H₂O system, 750 mL each

60% MeCN

concentrated *in vacuo*
trituated with MeOH

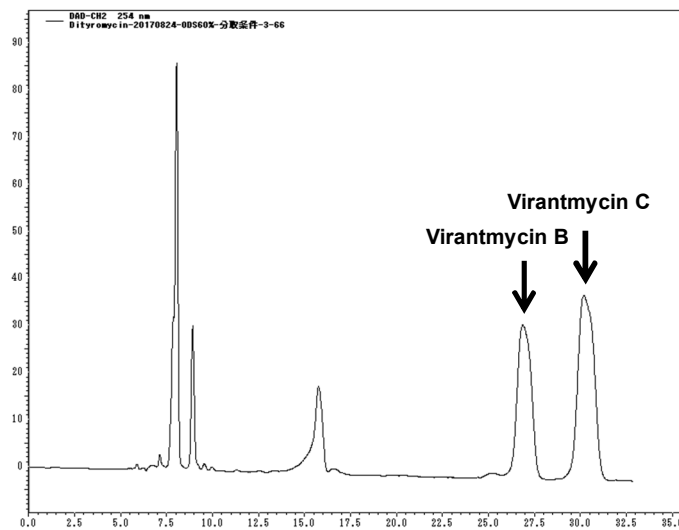
MeOH soluble crude material (107 mg)

Preparative HPLC
Inertsil C8-4 (14 i.d. x 250 mm)
66% MeOH aq. / 0.1% formic acid
Flow : 4.7 mL/min, UV : 300 nm

Virantmycin B (1) : 24 mg

Virantmycin C (2) : 27 mg

Virantmycin B および C の精製スキーム



Virantmycin B および C の分取 HPLC チャート

Fig. 2-1. Virantmycin B および C の精製スキームと分取 HPLC チャート

3. Virantmycin B および C の物理化学的性状および構造解析

3-1 Virantmycin B および C の物理化学的性状

Virantmycin B および C の物理化学的性状を Table 3-1 に示した。IR 吸収がそれぞれ 1604 および 1608 cm^{-1} に見られ、アミドの存在が示唆された。化合物の溶解性は双方 MeOH および CHCl_3 に溶け、 H_2O には溶けなかった。

Table 3-1. Virantmycin B および C の物理化学的性状

	Virantmycin B	Virantmycin C
Appearance	White powder	White powder
Molecular formula	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$
Molecular weight	428	428
ESI-MS (m/z)		
Calcd.	429.2390 (for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$)	429.2390 (for $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5$)
Found	429.2395 $[\text{M}+\text{H}]^+$	429.2376 $[\text{M}+\text{H}]^+$
$[\alpha]_{\text{D}}^{24.3}$ ($c = 0.1$, MeOH)	-44.4	+34.8
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ)	206 (28700), 226 sh (12100), 262 (23000), 281 sh (20300), 307 sh (18600)	206 (26500), 225 sh (11600), 262 (23400), 281 sh (18800), 306 sh (16400)
IR ν (KBr) cm^{-1}	3386, 2923, 1604, 1508, 1373, 1326, 1106, 755	3386, 2923, 1608, 1496, 1369, 1326, 1106, 755
Melting point	88°C	106°C
Soluble	MeOH, CHCl_3	MeOH, CHCl_3
Insoluble	H_2O	H_2O

3-2 Virantmycin B の構造解析

Virantmycin B は白色粉末で得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータより、分子式 $C_{24}H_{32}N_2O_5$ と決定された ($[M+H]^+$ ion at m/z 429.2395 (calculated value for $C_{24}H_{33}N_2O_5$, 429.2390))。

$CDCl_3$ 中で測定した 1H NMR および ^{13}C NMR のスペクトルデータを Table 3-2 に示した。 1H NMR および HSQC より 1 つの sp^3 methine、6 つの sp^3 methylenes、1 つの methoxy を含んだ 4 つの methyl および 3 つの sp^2 methines の存在が示唆された。

^{13}C NMR および HSQC より 24 の carbon が観測され、それぞれ 3 つの sp^2 methines carbons、7 つの sp^2 tetra substituted carbons、2 つの carbonyl carbons、5 つの sp^3 methylene carbons、1 つの sp^3 oxygenated methylene carbon、3 つの methyl carbons、1 つの methoxy carbon、1 つの oxygenated sp^3 methine および 1 つの 57.6 ppm を示すヘテロ原子が結合した sp^3 quaternary carbon に分けられた。

1H - 1H COSY より、C-5/C-6, C-8/C-9, C-11/C-12 および C-3q/C-4q のつながりが観測されたことから、4 つの部分構造が示された (Fig. 3-1)。HMBC 解析の結果、H-2 から C-4, C-6, C-7 および C-8; H-5 から C-1 および C-3; H-6 から C-2, C-4 および C-7; H₂-8 から C-2, C-3, C-4, C-9 および C-10; H-9 から C-3, C-8, C-10 および C-16; H₂-16 から C-9, C-10, C-11 および C-19; H₃-19 から C-16; H₂-11 から C-9, C-10, C-12, C-13 および C-16; H₂-12 から C-11, C-13, C-14 および C-17; H₃-15 から C-13, C-14 および C-18; H₃-17 から C-12, C-13 および C-14; H₃-18 から C-13, C-14 および C-15 にシグナルが観測されたことより、部分構造(a)が確認された (Fig 3-1)。これらの結果は virantmycin のケミカルシフトから支持される。また、HMBC により H₂-3q から C-1q C-2q C-4q および C-5q H₂-4q から C-2q C-3q および C-5q 2qOH から C-1q C-2q および C-3q にシグナルが観察されたことから、部分構造(b)であるハイドロキシサイクロペンテノン構造が確認された (Fig 3-1)。最終的に、7-NH から C-7, C-1q C-2q および C-5q に HMBC の相関が観察されたことから、部分構造(a)および(b)が 7-NH を介して結合することが示された。よって、Fig 3-1 に示す構造と決定され、放線菌初のテトラヒドロキノリン化合物である virantmycin の類縁物質であったため、virantmycin B と命名した。

また ROESY 相関が H_a-8/H_b-11, H-9/H_a-12, H-9/H_a-16 および H-9/H_b-16 に観察され、H_a-11/H_a-12; 11.6 Hz および H_b-11/H_b-12; 12.0 Hz のカップリングコンスタントが大きいことから、virantmycin B の相対立体化学は C-9 および C-10 が R^* および R^* と決定した。よって Fig. 3-3(a) に示す構造と決定した。

Virantmycin B の生合成は Yoo, S., et al で報告されている⁷⁵⁾。前駆体として benzastatin A^{76, 77)} のアミノオレフィンがエポキシ化されたオレフィン部位の 10 位にアタックすることで、テトラヒドロキノリン骨格が形成される。その後、ハイドロキシサイクロペンテノンが結合することにより生合成されると考えられる。

3-3 Virantmycin C の構造解析

Virantmycin C は白色粉末で得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータより、分子式 $C_{24}H_{32}N_2O_5$ と決定された ($[M+H]^+$ ion at m/z 429.2376 (calculated value for $C_{24}H_{33}N_2O_5$, 429.2390))。

$CDCl_3$ 中で測定した 1H NMR および ^{13}C NMR のスペクトルデータは Table 3-2 に示した。 1H NMR および HSQC より 1 つの sp^3 methine、6 つの sp^3 methyl を含み、1 つの methoxy を含んだ 4 つの methyl および 3 つの sp^2 methines の存在が示唆された。

^{13}C NMR および HSQC より 24 の carbon が観測され、それぞれ 3 つの sp^2 methines carbons、7 つの sp^2 tetra substituted carbons、2 つの carbonyl carbons、6 つの sp^3 methylene carbons、1 つのヘテロ原子が結合した sp^3 methine、3 つの methyl carbons、1 つの methoxy carbon および 1 つの 73.0 ppm を示した oxygenated sp^3 quaternary carbon に分けられた。

1H - 1H COSY より、C-5/C-6, C-8/C-9, C-11/C-12 および C-3q/C-4q のつながりが観測されたことから、4 つの部分構造が示された。HMBC 解析の結果、H-2 から C-4, C-6, C-7 および C-8; H-5 から C-1 および C-3; H-6 から C-2, C-4 および C-7; H-8 から C-2, C-3, C-4, C-9 および C-10; H-9 から C-8 および C-16; H₂-11 から C-9, C-10, C-12 および C-16; H₂-12 から C-10, C-11, C-13, C-14 および C-17; H₃-15 から C-13, C-14 および C-18; H₂-16 から C-9, C-10, C-11 および C-19; H₃-17 から C-12, C-13 および C-14; H₃-18 から C-13, C-14 および C-15; H₃-19 から C-16 にシグナルが観測されたことより、部分構造(a)が確認された(Fig 3-2)。また、HMBC により H₂-3q から C-1q C-2q C-4q および C-5q H₂-4q から C-2q C-3q および C-5q 2qOH から C-1q C-2q および C-3q にシグナルが観察されたことから、部分構造(b)であるハイドロキシサイクロペンテノン構造が確認された(Fig 3-2)。最終的に、7-NH から C-7, C-1q C-2q および C-5q に HMBC の相関が観察されたことから、部分構造(a)および(b)が 7-NH を介して結合することが示された。よって、Fig 3-2 に示す構造と決定され、virantmycin C と命名した。

ROESY 相関が H_b-8/H-9, H_a-8/H_{ab}-11, H-9/H_a-16, および H_b-12/H_b-16 に観察され、H_a-11/H_a-12; 12.3 Hz および H_b-11/H_b-12; 12.5 Hz のカップリングコンスタントが大きいことから、virantmycin C の相対立体化学は C-9 および C-10 が S^* および R^* と決定した。よって Fig. 3-3(b) に示す構造と決定した。

Virantmycin C の生合成は virantmycin B と同様の合成経路であると推測できる。Benzastatin A のアミノオレフィンがエポキシ化された 9 位のオレフィンにアタックすることで、インドリン骨格が形成される。その後、ハイドロキシサイクロペンテノンが結合することにより生合成されると考えられる。

Table 3-2. Virantmycin B および C の ^1H and ^{13}C NMR スペクトルデータ

Position	Virantmycin B			Virantmycin C		
	δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult	δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult
1	119.4	C		120.4	C	
2	130.4	CH	7.57, 1H, d, 2.0	124.0	CH	7.56, 1H, d, 1.6
3	117.6	C		128.8	C	
4	146.9	C		155.4	C	
5	113.8	CH	6.53, 1H, d, 8.4	107.7	CH	6.57, 1H, d, 8.4
6	127.3	CH	7.53, 1H, dd, 8.4, 2.0	128.6	CH	7.58, 1H, dd, 8.4, 1.6
7	166.6	C		166.8	C	
8	32.6	CH ₂	H _a 3.12, 1H, dd, 16.8, 4.6 H _b 2.85, 1H, dd, 16.8, 5.5	29.9	CH ₂	H _a 3.08, 1H, dd, 16.0, 9.4 H _b 2.99, 1H, dd, 16.0, 9.4
9	67.2	CH	3.95, 1H, dd, 5.5, 4.6	66.3	CH	4.17, 1H, dd, 9.4, 9.4
10	57.6	C		73.0	C	
11	33.3	CH ₂	H _a 1.82, 1H, ddd, 13.8, 11.6, 5.5 H _b 1.52, 1H, ddd, 13.8, 12.0, 5.6	32.6	CH ₂	H _a 1.56, 1H, ddd, 13.9, 12.3, 5.1 H _b 1.47, 1H, ddd, 13.9, 12.5, 5.2
12	27.7	CH ₂	H _a 2.08, 1H, m H _b 2.04, 1H, m	28.1	CH ₂	H _a 2.15, 1H, ddd, 12.6, 12.3, 5.2 H _b 2.01, 1H, ddd, 12.6, 12.5, 5.1
13	126.7	C		127.0	C	
14	124.7	C		124.6	C	
15	19.9	CH ₃	1.62, 3H, s	20.0	CH ₃	1.64 ^β , 3H, s
16	74.9	CH ₂	H _a 3.66, 1H, d, 8.8 H _b 3.50, 1H, d, 8.8	78.4	CH ₂	H _a 3.53, 1H, d, 9.2 H _b 3.43, 1H, d, 9.2
17	18.4	CH ₃	1.61 ^α , 3H, s	18.3	CH ₃	1.64 ^β , 3H, s
18	20.5	CH ₃	1.61 ^α , 3H, s	20.6	CH ₃	1.66, 3H, s
19	59.5	CH ₃	3.40, 3H, s	59.5	CH ₃	3.42, 3H, s
7-NH			7.88, 1H, s			7.88, 1H, s
1'	115.1	C		115.1	C	
2'	172.8	C		172.7	C	
3'	25.6	CH ₂	2.63, 2H, m	25.5	CH ₂	2.63, 2H, m
4'	32.1	CH ₂	2.55, 2H, m	32.1	CH ₂	2.55, 2H, m
5'	197.5	C		197.5	C	
2'-OH			13.71, 1H, s			13.72, 1H, s

α, β : overlapped

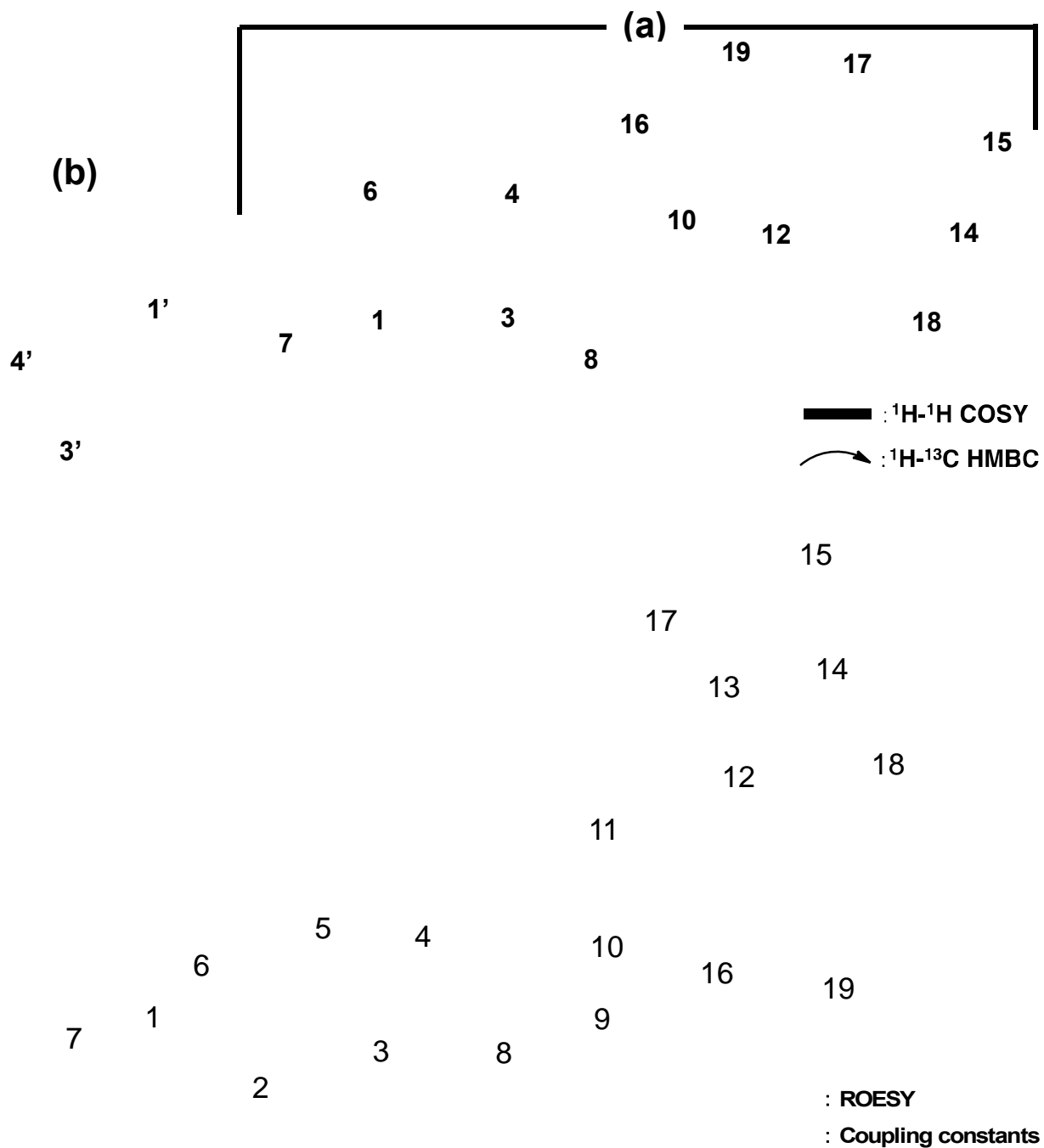


Fig. 3-1. Virantmycin B の 2D NMR 解析と相対立体構造の決定

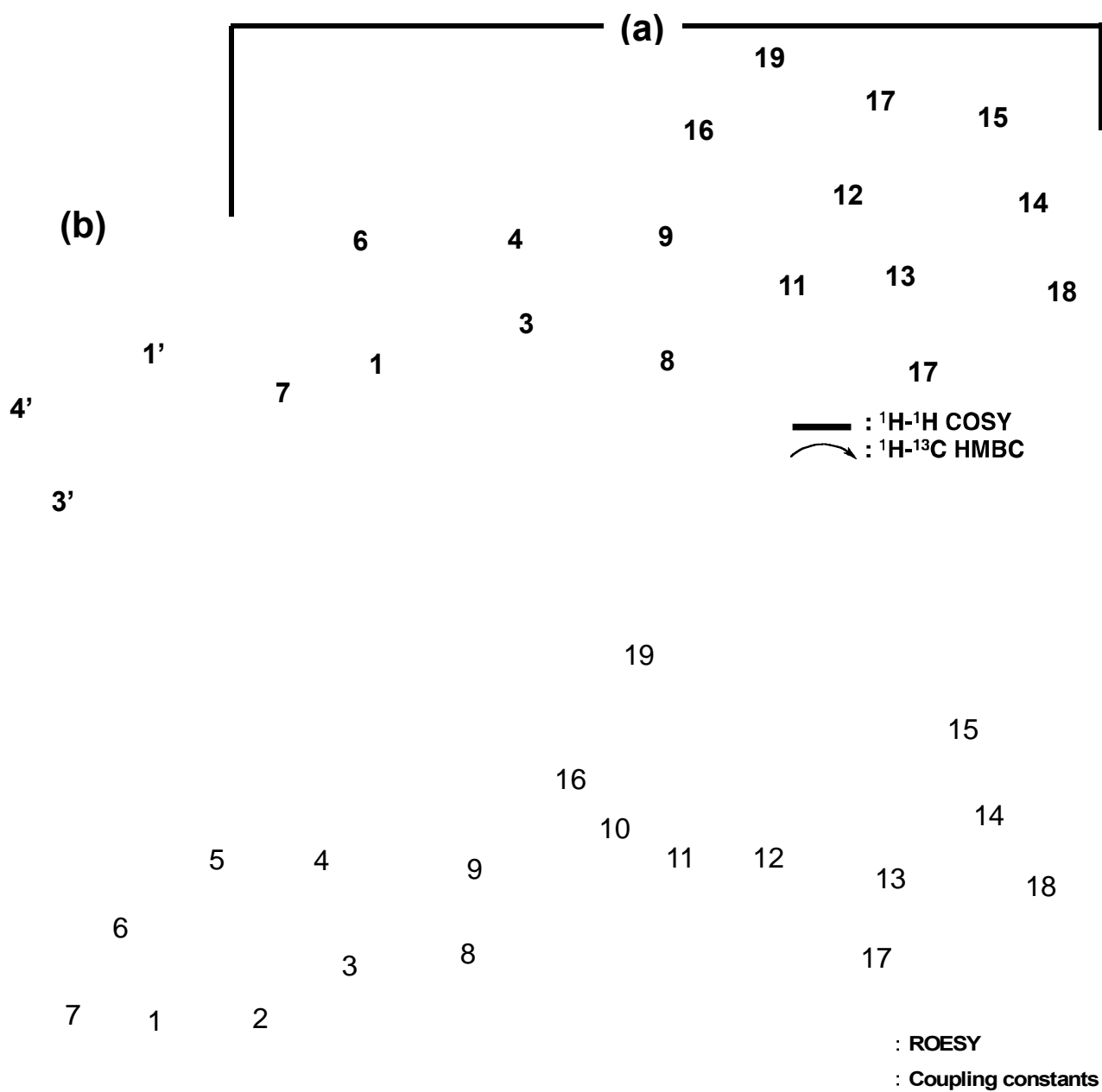
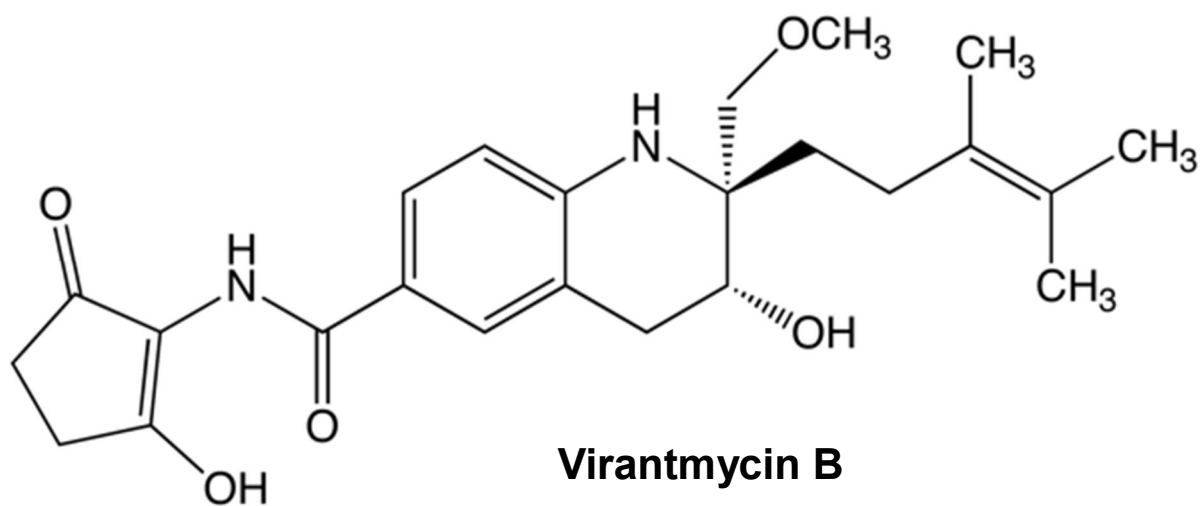


Fig. 3-2. Virantmycin C の 2D NMR 解析と相対立体構造の決定

(a)



(b)

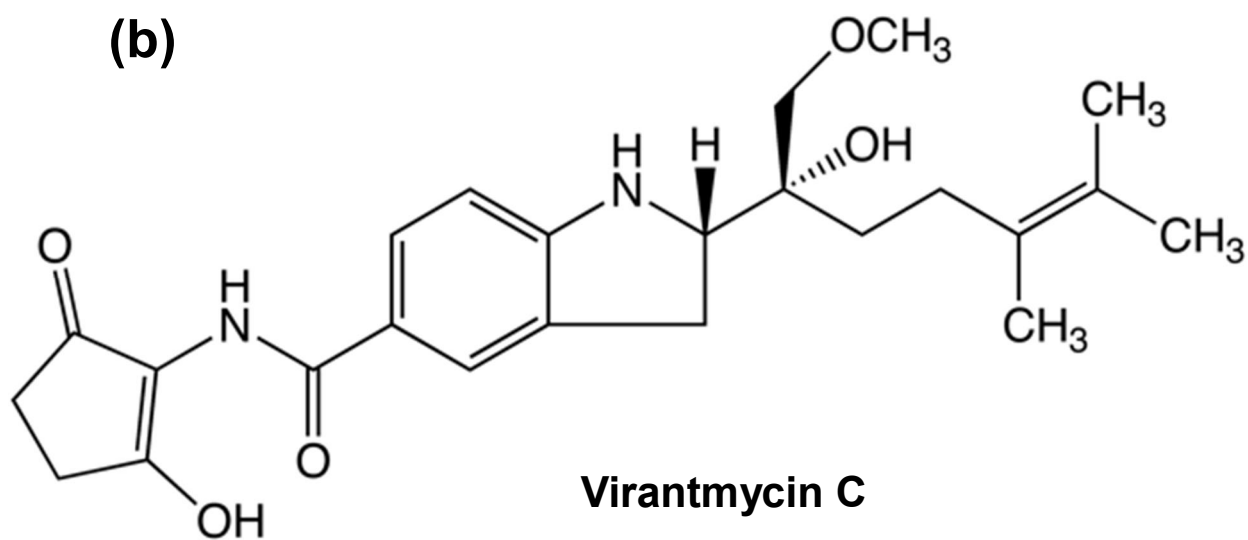


Fig. 3-3 Virantmycin B (a) および C (b) の構造

4. Virantmycin B および C の生物活性評価

4-1 方法および結果

4-1-1 Virantmycin B および C の抗菌活性試験

抗菌活性試験は第 2 章第 1 節 4-1-1 (P 28) に示した検定菌を用いて 6 mm ペーパーディスクを用いて評価した。その結果、virantmycin B は *B. subtilis* ATCC 6633 および *M. racemosus* IFO 4581 に 100 µg/disk においてそれぞれ 13 mm および 9 mm の阻止円を示した。Virantmycin C は *B. subtilis* ATCC 6633 および *M. racemosus* IFO 4581 に 30 µg/disk においてそれぞれ 10 および 9 mm の阻止円を示した。しかし、virantmycin B および C はそれぞれ *K. rhizophila* ATCC 9341, *E. coli* NIHJ, *X. oryzae* pv. *oryzae* KB88 および *C. albicans* ATCC 64548 に 100 µg/disk において阻止円を示さなかった。

4-1-2 Virantmycin B および C の細胞毒性試験

細胞毒性試験は第 1 章第 1 節 4-1-2 (P 29) に示したガン細胞株を用いて行った。しかし、どの細胞にも 100 µM で細胞毒性を示さなかった。

第2節 Pyrizomicin A および B に関する研究

大村創薬グループでは、希少放線菌 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の培養液より、新規物質 mangromicin A~I (Fig. 1)、K10-0216 KA および KB (Fig. 2)⁷⁸⁾ を報告している。Mangromicin は、tetrahydrofuran および 5, 6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone を有し、炭素のみで構成された pentadecane 骨格を形成するユニークな化合物である。Mangromicin は抗トリパノソーマ活性およびラジカル消去活性が報告されている。また、mangromicin A の全合成研究は Takada et al⁷⁹⁾によって達成された。

K10-0216 KA および KB は、ステロイド骨格を有する化合物であり、K10-0216 KB は 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪蓄積阻害活性は陽性対照である testosterone よりも強い阻害活性を示した。

Mangromicin や K10-0216 KA, KB などのユニークな天然物は PC screening によって発見されている。さらに今回 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株より PC screening にて新規化合物 pyrizomicin A および B を発見した。本節では、pyrizomicin A および B の培養、単離精製、構造決定、生物活性および生合成研究について述べる。

Mangromicin A	Mangromicin B					
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
		Mangromicin D	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-CH ₂ OH	-H	-CH ₃
		Mangromicin F	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ OH	-H	-CH ₃
		Mangromicin G	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-CH ₃	-H	-CH ₂ OH
		Mangromicin H	-CH ₂ CH ₃	-CH ₃	-H	-CH ₃
Mangromicin E	Mangromicin C	Mangromicin I	-CH ₂ CH ₃	=CH ₂	-OCH ₃	-CH ₃

Fig. 1. Mangromicin A-I の構造

	R ₁	R ₂
K10-0216 KA	-OH	-H
K10-0216 KB	-O-	

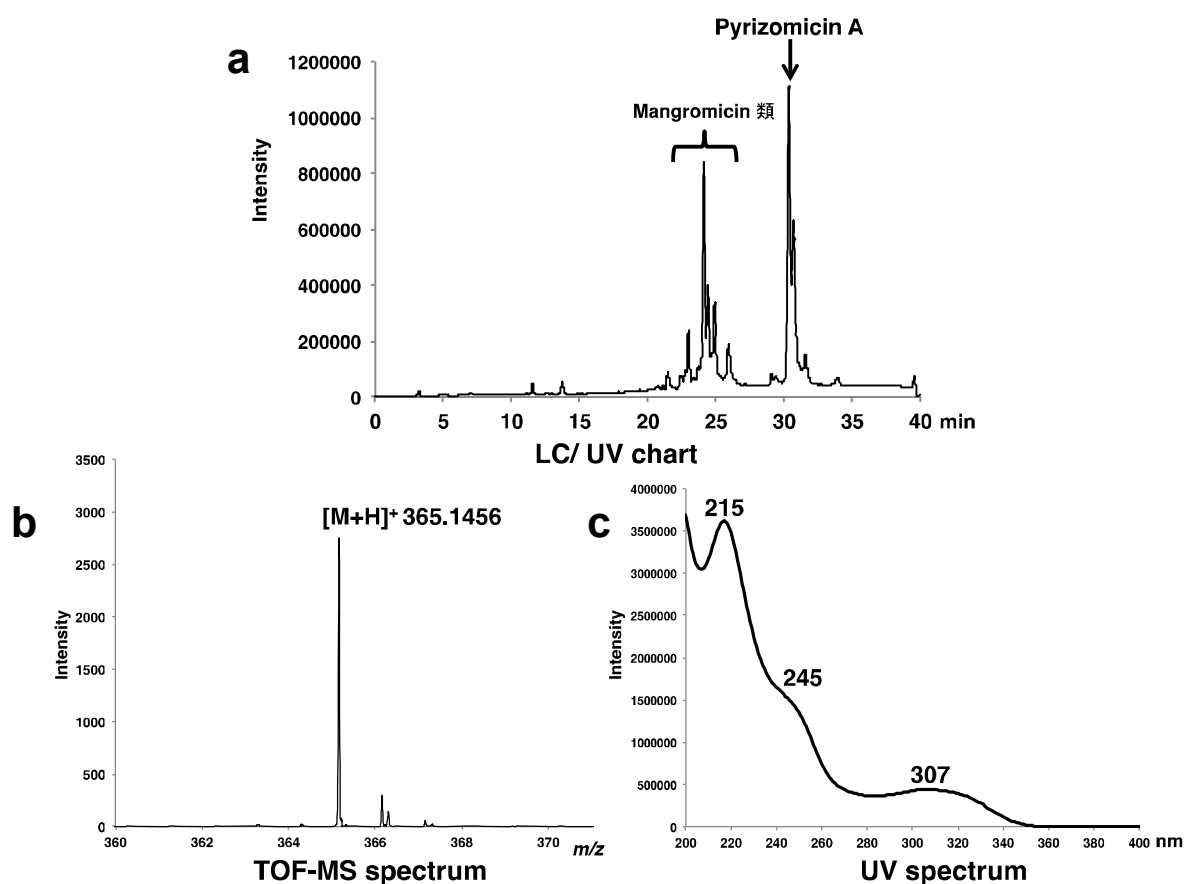
Fig. 2. K10-0216 KA および KB の構造

1. *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株を用いた PC screening

1-1 スクリーニング方法および結果

前任者による mangromicin の培養検討により、スターチおよびドライイーストが mangromicin の生産に大きく影響することが示された⁴⁴⁾。そこで、mangromicin 類の大量取得のために 58 培地 (5.0% soluble starch (Wako), 0.5% glycerol (Wako), 1.0% defatted wheat germ (Nisshin Pharma, Tokyo, Japan), 1.0% dry yeast (JT Foods, Tokyo, Japan) および 0.3% CaCO_3) にて培養を行った。この培養液を用いて PC screening を行った。

生産培養において、mangromicin 類以外のピーク (Rt. 30 分) が確認された (Fig. 1-1)。Rt. 30 分のピークの物理化学的性状を測定したところ、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 365.1456 が観測され、分子式は $\text{C}_{18}\text{N}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ と推定し、215, 245 および 307 nm に UV 極大吸収を示した (Fig. 1-1)。これらの情報を Dictionary of Natural Product にて解析したところ、該当する化合物がなく、新規物質と推定した。



カラム : Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相 : 5% MeOH / 2 mM ammonium acetate (0-5 min)、5-100% MeOH / 2 mM ammonium acetate (5-35 min)、流速 : 0.5 mL / min、カラム温度 : 40 °C、イオン化 : ESI-positive、検出 m/z : 100-2000

Fig. 1-1. K10-0216 株を 58 培地で培養した時の LC/UV チャート(a)、TOF-MS spectrum (b) および UV spectrum (c)

1-2 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の培養および pyrizomicin の精製

1-2-1 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の培養

2013 年 7 月 25 日に -20°C で保存されていた 301 seed グリセロールストックを用いて本菌株の培養を行った。なお、本実験では、前培養に 301 seed 培地、生産培養に 58 培地を用いた。

前培養では、グリセロールストックしておいた K10-0216 株培養液を 301 seed 培地 100 mL に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 5 日間振盪培養を行った。生産培養では、58 培地 120~130 mL を分注した 500 mL 容三角フラスコ 120 本に前培養で得られた種培養液を 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 8 日間振盪培養した。

1-2-2 Pyrizomicin の単離精製

Pyrizomicin A および B の精製スキームを Fig. 1-2 に示した。生産培養開始から 8 日後、培養液に等量の EtOH (15 L) を加えて培養を停止し、メカニカルスターラーを用いて 2 時間攪拌した。その後、Sharples 遠心分離機を用いて 12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。続いて EtOH を留去後、水層を酢酸エチルで 3 回抽出した。酢酸エチル層を回収しエバポレーターにて濃縮乾固することで酢酸エチル粗精製物を 7.99 g 取得した。この粗精製物を flash chromatography にて silica gel 60N (60 i.d. × 200 mm; Kanto Chemical co., Inc., Tokyo, Japan) に供し、*n*-hexane-EtOAc-CHCl₃-MeOH 系にて分画した (20:1:0:0, 10:1:0:0, 5:1:0:0, 1:1:0:0, 0:0:50:1, 0:0:20:1, 0:0:10:1, 0:0:5:1, 0:0:2:1, および 0:0:0:100 (v/v), 2.0 L ずつ)。溶出画分 (0:0:5:1 および 0:0:2:1) を減圧下乾固することで目的物質を含む画分を 1.38 g 得た。最終的に一部 (100 mg) を HPLC (カラム : Inertsil ODS-4 14 × 250 mm, カラム温度 : 40 °C, 移動相 : 80% methanol aq + 0.1% formic acid, 流速 : 9.3 mL/min, 検出 : UV 220 nm) により溶出時間 12.2 および 15.4 分付近のピークを分取することで pyrizomicin A および B をそれぞれ 5.9 mg、1.3 mg 得た。

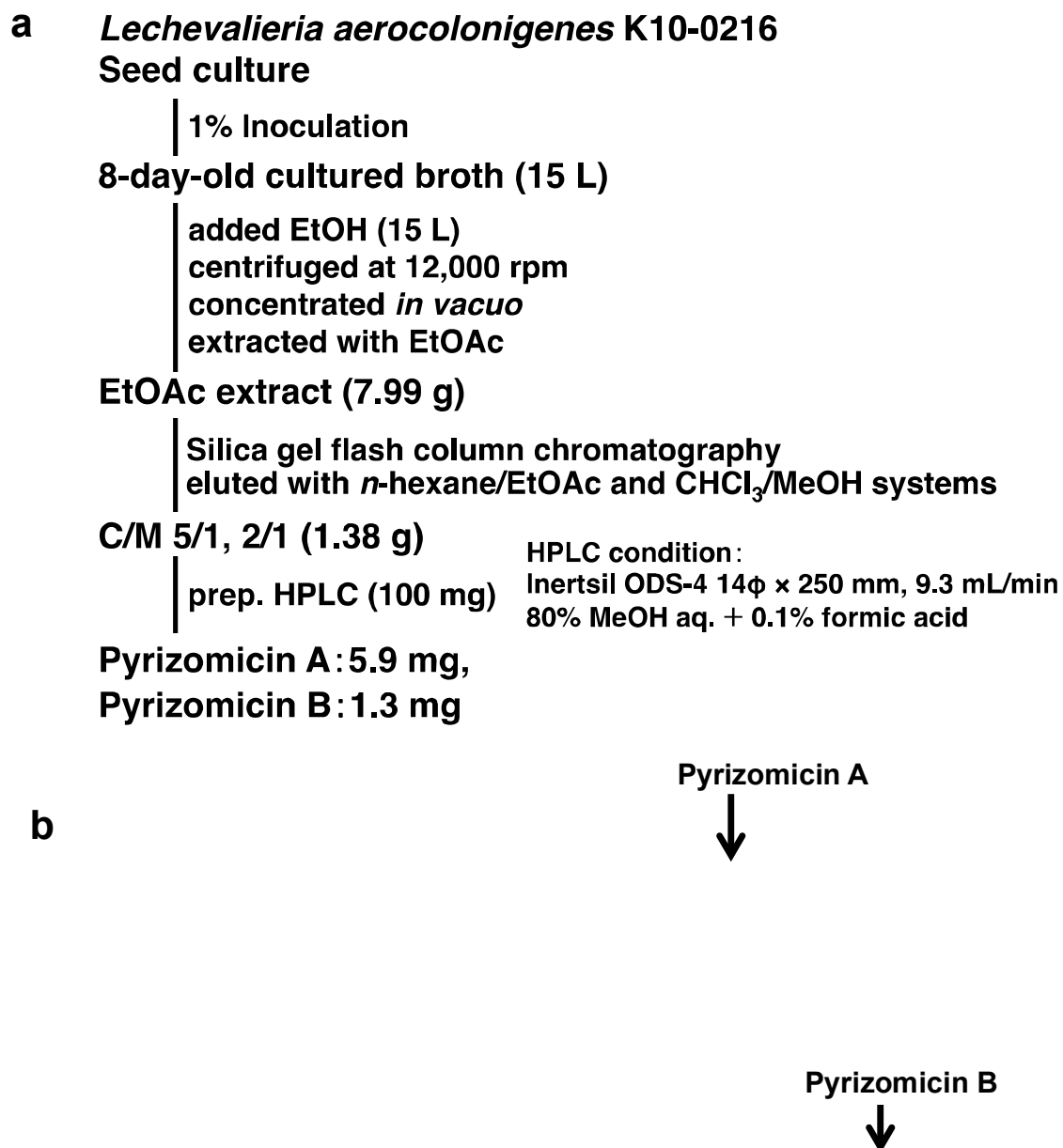


Fig. 1-2. Pyrizomicin A および B の精製スキーム (a) と分取チャート (b)

2. Pyrizomicin A および B の物理化学的性状および構造解析

2-1 Pyrizomicin A および B の物理化学的性状

第 1 章, 第 1 節の 3-1 (P 20) に示した方法で行った。

Pyrizomicin A および B の物理化学的性状を Table 2-1 に示した。両化合物ともに黄色油状物質として得られ、UV-vis、IR は同様の値を示した。旋光度を測定したが、双方ともに偏光しなかったため、割愛した。

Table 2-1. Pyrizomicin A および B の物理化学的性状

	Pyrizomicin A	Pyrizomicin B
Appearance	Yellowish oil	Yellowish oil
Molecular formula	$C_{18}H_{24}N_2O_4S$	$C_{19}H_{26}N_2O_4S$
Molecular weight	364	378
<i>ESI-MS (m/z)</i>		
Calcd.	365.1535 (for $C_{18}H_{25}N_2O_4S$)	379.1692 (for $C_{19}H_{27}N_2O_4S$)
Found	365.1525 $[M+H]^+$	379.1685 $[M+H]^+$
UV λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ)	220 (25200), 241 (22000), 307(6500)	220 (25400), 241 (21600), 307(6600)
IR ν (KBr) cm^{-1}	3228, 2927, 1731, 1577	3251, 2919, 1731, 1577
Soluble	MeOH, $CHCl_3$	MeOH, $CHCl_3$
Insoluble	H_2O	H_2O

2-2 PyrizomicinA および B の構造解析

Pyrizomicin A は黄色の油状化合物として得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータにより、分子式 $C_{18}H_{24}N_2O_4S$ と決定された ($[M+H]^+$ ion at m/z 365.1525 (calculated value for $C_{18}H_{25}N_2O_4S$, 365.1535))。

CD_3OD 中で測定した 1H NMR および ^{13}C NMR のスペクトルデータおよび類縁化合物 WS75624 A の論文⁸⁰⁾中の報告値を Table 2-2 に示した。 1H NMR および HSQC より 1 つの sp^3 methine, 4 つの sp^3 methylene, 2 つの methoxy を含んだ 4 つの methyl および 2 つの sp^2 methine の存在が示唆された。 ^{13}C NMR および HSQC より 18 の carbon が観測され、それぞれ 2 つの sp^2 methine carbons、6 つの sp^2 tetrasubstituted carbons、1 つの carbonyl carbon、4 つの sp^3 methylene carbons、1 つの sp^3 methin carbon、2 つの methyl carbons および 2 つの methoxy carbons に分けられた。

1H - 1H COSY より C-1+ \leftrightarrow C-4+および C-5+ \leftrightarrow C-6+のつながりが観測されたことから 2 つの部分構造が示された(Figure 2-1)。HMBC 解析の結果、H-3 から C-4, C-5 および C-7; 4 位の O-Me から C-4; 5 位の O-Me から C-5; H-5q から C-6, C-2q および C-4q に相関が観測されたことから 4, 5-dimethoxy-6-thiazolyl-picolinic acid 骨格 (pyrizomicin の部分構造) であることが確認された。また、HMBC により H₂-1+ から C-2+ および C-3+; H₂-2+ から C-1+; C-3+ および C-4+; H₂-4+ から C-2+; C-5+ および C-6+; H-5+ から C-4+ および C-6+; H₃-6+ から C-4+; C-5+ および C-6+ に相関が観測されたことより、メチレン鎖が決定された。最終的に HMBC より、H-1+ および H-2+ から C-2q にシグナルが観察されたことから、4, 5-dimethoxy-6-thiazolyl-picolinic acid 骨格とメチレン鎖は 2q 位で結合することがわかった。以上より、Fig. 2-1 に示した構造と決定され、pyrizopmicin A と名付けた。Pyrizomicin A は、WS75624 A のメチレン鎖から水酸基が無くなった構造であると考えられ、4, 5-dimethoxy-6-thiazolyl-picolinic acid 骨格は WS75624 A⁸⁰⁾ のケミカルシフトからも裏付けされる。さらに C-5+のケミカルシフトも WS75624 A と異なることが確認された (Table 2-2)。

Pyrizomicin B は黄色の油状化合物として得られ、HR-ESI-MS および NMR スペクトルデータにより、分子式 $C_{19}H_{26}N_2O_4S$ と決定された ($[M+H]^+$ ion at m/z 379.1685 (calculated value of $C_{19}H_{27}N_2O_4S$ for 379.1692))。Pyrizomicin B は分子式および 1H NMR より、1 つのメチレンが増えた pyrizomicin A の類縁体であると考えられた。ケミカルシフトより、5-dimethoxy-6-thiazolyl-picolinic acid 骨格 (2 位から 7 位および 2q 位から 5q 位)、ヒドロキシメチル基 (OMe の 4 位および 5 位)、1 つのカルボニル基 (7 位) が確認された(Table 2-2)。最終的に HR-ESI-MS およびメチレン鎖の末端がダブルット (0.8 ppm, 6H)であることから、pyrizomicin B は 1 つメチレン鎖が長くなった構造であると決定され、pyrizomicin B と命名した。

Table 2-2. Pyrizomicin A, B および WS75624 A のケミカルシフト

Pyrizomicin A						Pyrizomicin B				WS75624 A ⁸⁰⁾			
Position	δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult	HMBC		δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult		δ_c (ppm)	mult.	δ_H (ppm), int., mult	
2	145.6	C				143.9	C			144.6	C		
3	109.2	CH	7.86, 1H, s	C-4, C-5, C-7		109.1	CH	7.84, 1H, s		109.1	CH	7.81, 1H, s	
4	163.2	C				162.4	C			163.3	C		
5	147.3	C				146.8	C			147.3	C		
6	143.2	C				142.4	C			142.8	C		
7	167.2	C				166.1	C			166.5	C		
OMe on 4	57.3	CH ₃	4.11, 3H, s	C-4		57.1	CH ₃	4.08, 3H, s		57.4	CH ₃	4.09, 3H, s	
OMe on 5	61.0	CH ₃	4.01, 3H, s	C-5		60.8	CH ₃	4.00, 3H, s		61.0	CH ₃	4.00, 3H, s	
2'	173.5	C				171.6	C			173.5	C		
4'	149.1	C				148.6	C			148.6	C		
5'	123.5	CH	8.36, 1H, s	C-6, C-2', C-4'		122.6	CH	8.36, 1H, s		123.8	CH	8.32, 1H, s	
1"	34.1	CH ₂	3.11, 2H, t, 7.8	C-2', C-2", C-3"		34.2	CH ₂	3.04, 2H, t, 7.2		34.0	CH ₂	3.13, 2H, m	
2"	31.6	CH ₂	1.82, 2H, m	C-2', C-1", C-3", C-4"		31.8	CH ₂	1.74, 2H, m		31.9	CH ₂	1.85, 2H, m	
3"	29.1	CH ₂	1.44, 2H, m			30.7	CH ₂	1.30, 2H, m		24.9	CH ₂	1.54	
4"	39.7	CH ₂	1.26, 2H, m	C-2", C-5", C-6"		30.5	CH ₂	1.30, 2H, m		44.3	CH ₂	1.50, 4H, m	
5"	28.0	CH	1.55, 1H, m	C-4", C-6"		40.3	CH ₂	1.18, 2H, m		71.3	C		
6"	23.0	CH ₃	0.89, 6H, d, 6.6	C-5", C-6"		27.6	CH	1.53, 1H, m		29.2	CH ₃	1.18, 6H, s	
7"						23.0	CH ₃	0.88, 6H, d, 6.4					

Fig. 2-1. Pyrizomicin A の 2D NMR 解析と pyrizomicin B の構造

3. Pyrizomicin の生物活性評価

3-1 方法

Pyrizomicin A および B の抗菌活性は 6 種の微生物(*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KB 88, *Candida albicans* KF1 および *Mucor racemosus* IFO 4581)を用い、ペーパーディスク法(6 mm disk, Advantec, Co., Ltd., Tokyo, Japan) にて評価した。微生物の寒天培地は以下培地を用いた。細菌には nutrient agar (Sanko Junyaku, Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、真菌には 1.0% glucose, 0.5% yeast extract および 0.8% agar で作成した培地を用いた。化合物が含まれたペーパーディスクを各プレートにのせ、*X. oryzae* pv. *oryzae* KB 88 以外の細菌は 37 °C で 24 h. 培養し、真菌および *X. oryzae* pv. *oryzae* KB 88 は 27 °C で 24 - 48 h. 培養した。

3-2 結果

Pyrizomicin A および B は *B. subtilis* ATCC 6633, *K. rhizophila* ATCC 9341, *E. coli* NIHJ, *X. oryzae* pv. *oryzae* KB 88 および *C. albicans* KF1 に 12, 15, 14, 14 および 12 mm (Pyrizomicin A), 10, 9, 9, 11 および 8 mm (Pyrizomicin B)の抗菌活性を示した。しかし、pyrizomicin A, B とともに 10 µg/disk で *M. racemosus* IFO4581 には活性を示さなかった (Table 3-1)。

Table 3-1. Pyrizomicin A および B の抗菌活性試験

	Pyrizomicin A (µg/disk)			Pyrizomicin B (µg/disk)		
	10	3	1	10	3	1
<i>Bacillus subtilis</i> KB211 (ATCC 6633)	12 mm	7 mm	–	10 mm	8 mm	–
<i>Kocuria rhizophila</i> KB212 (ATCC 9341)	15 mm	–	–	9 mm	–	–
<i>Escherichia coli</i> KB213 (NIHJ)	14 mm	–	–	9 mm	–	–
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KB88	14 mm	10 mm	–	11 mm	8 mm	–
<i>Candida albicans</i> KF1 (ATCC 64548)	12 mm	–	–	8 mm	–	–
<i>Mucor racemosus</i> KF223 (IFO 4581)	–	–	–	–	–	–

4. Pyrizomicin の生合成研究

Mangromicin 生産菌である *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株より新規物質 pyrizomicin 類を見出した。Pyrizomicin はチアゾール環とピリジン環がつながった骨格をしており、その様な骨格を有する天然物の報告は AFA0320⁸¹⁾, WS75624 A および B⁸²⁾、karnamicin 類⁸³⁾で、生合成に関する報告はない。

4-1 Pyrizomicin 生産菌のゲノム DNA 抽出

YD 培地で 2 日培養した K10-0216 株培養液 20 mL を、4°C、3500 rpm、10 分間遠心し、上清を捨て集菌した。TE (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0) を 20 mL 加えよく懸濁し、4°C、3500 rpm、10 分間遠心し上清を捨てた。TE を 10 mL 加えよく懸濁し 10 mg/mL lysozyme (SIGMA) を 10 mL 加え室温で 30 分、ゆっくり転倒混和した。さらに、10 % SDS を 1 mL 加え室温で 5 分 ゆっくり転倒混和した後、70°C で 5 分 静置し、氷上に 5 分 静置した。5 M potassium acetate を 2.5 mL 加え、氷上に 15 分 静置した。Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 25:24:1 (pH 7.9、nacalai tesque)を 10 mL 加え、室温で 10 分 ゆっくり転倒混和した。20°C、7000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。再び phenol/chloroform/isoamyl alcohol を 10 mL 加え、同様の操作を繰り返した後、回収した上清に 2 mL の 3 M sodium acetate を加え、0.6 倍量の 2-propanol を加え、4°C、7000 rpm、10 分間遠心し、上清を捨てた。沈殿物を 70% ethanol (4°C) でリンスし、風乾させ TE を 500 µL、RNase (SIGMA、0.1 mg/mL) を 5 µL 加えた。

4-2 *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株のドラフトゲノムシーケンス解析 および pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの推定

マングロマイシン生合成経路解明のためにすでに用意されていたドラフトゲノムシーケンスデータをもとに解析を行った。シーケンスデータを antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) で解析した結果、Fig. 4-1 に示した PKS-NRPS ハイブリッド酵素を含む遺伝子クラスターを pyrizomicin の生合成遺伝子クラスターとして推定した。本生合成遺伝子クラスターはビピリジン化合物である caerulomycin の生合成遺伝子経路と類似しており⁸⁴⁾、NRPS-PKS ハイブリッド酵素やアミドハイドロレース、オキシジェネース、オーメチルトレンスフェレース等の修飾酵素、LuxR ファミリーや TetR ファミリーの転写制御因子を含んでいる。脂肪酸をスターターとして、NRPS によりシステインが縮合および環化され、チアゾリヌユニットが形成される。その後、PKS モジュールにより ケトエステルが合成される。C 末端側の NRPS モジュールにシステインがロードされたのちに ORF7 のデハイドロジェネースによる、オレフィン形成に伴い、チアゾリルベータケトエステル体への求核反応により、中間体が形成される。さらに続く非酵素的反応により、ハイドロキシピリジン体が形成。その後、NRPS によりロイシンが付加され、チオエステラーゼにより、リリースされる。その後、アミドハイドロレースによるロイシンの切断、および、種々の修飾酵素の反応により、pyrizomicin が合成されると推定した。

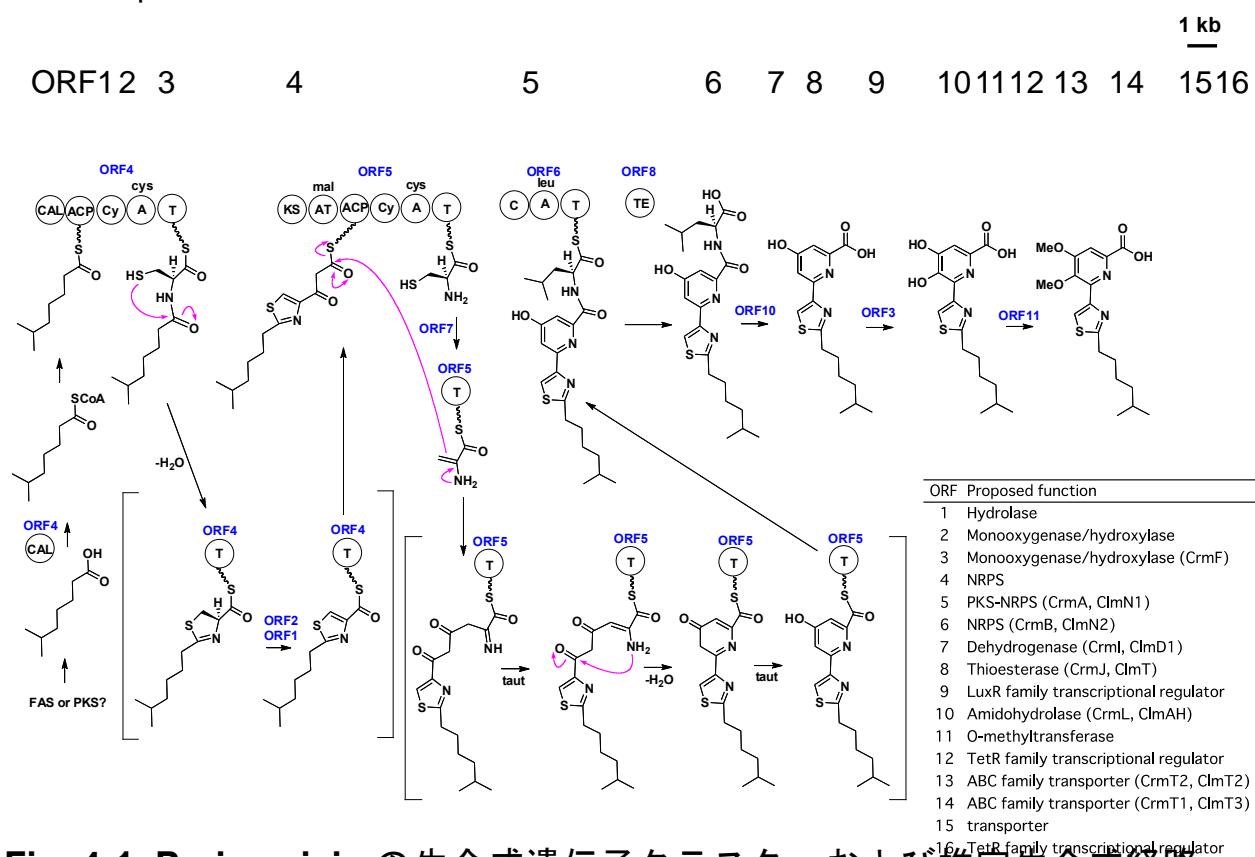


Fig. 4-1. Pyrizomicin の生合成遺伝子クラスターおよび推定生合成経路

4-3 コスミドライブラリーの作製

コスミドベクター pOJ446 を BamHI (Takara Bio) で消化し、Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 処理後、ethanol 沈殿を行った。放線菌ゲノム DNA 約 3-5 g を含む反応液 100 L (5 本) に MboI (Takara Bio) の量をそれぞれ 1, 0.1, 0.01, 0.005, 0.001 L となるように加え、37℃で 1 時間反応させることで DNA を消化した。70℃, 15 分で酵素を失活させた後、電気泳動により DNA が部分的に消化されたサンプルを選択した (Fig. 4-2 の lane 4 および 5)。Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 処理後、ethanol 沈殿を行い、アルカリフォスファターゼ BAPC75 (Takara Bio) を用いて 37℃, 30 時間反応させることで脱リン酸化を行った。再び Phenol/chloroform/isoamyl alcohol 処理および ethanol 沈殿を行った。T4 DNA ligase (Takara Bio) を用いて BamHI 消化 pOJ446 と MboI 部分消化ゲノム DNA とのライゲーションを 16℃, over night で行った (Fig. 4-3)。ライゲーション物を ethanol 沈殿後、滅菌水 3 L に溶解させ、Packaging Extract (LAMBDA INN, ニッポンジーン) に添加し、室温で 2 時間反応させた。反応液に SM buffer (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄·7H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) および 0.002% (w/v) gelatin per 1L) を 350 L 添加することでパッケージング溶液を作製した。*E. coli* XL1 Blue MRFq (Agilent Technologies) の over night culture を LB 培地 (0.2% maltose, 10mM MgSO₄ 含有) に 1% 植菌し、37℃で 3 時間 (OD = 0.5) 培養した。*E. coli* XL1 Blue MRFq 培養液 25 L にパッケージング溶液 25 L を添加し、30℃で 30 時間培養した。その後、LB 200 L 添加し、30℃で 1 時間培養し、apramycin (25 g/mL) 添加 LB 寒天培地に塗布し、30℃で 2 日間培養した。

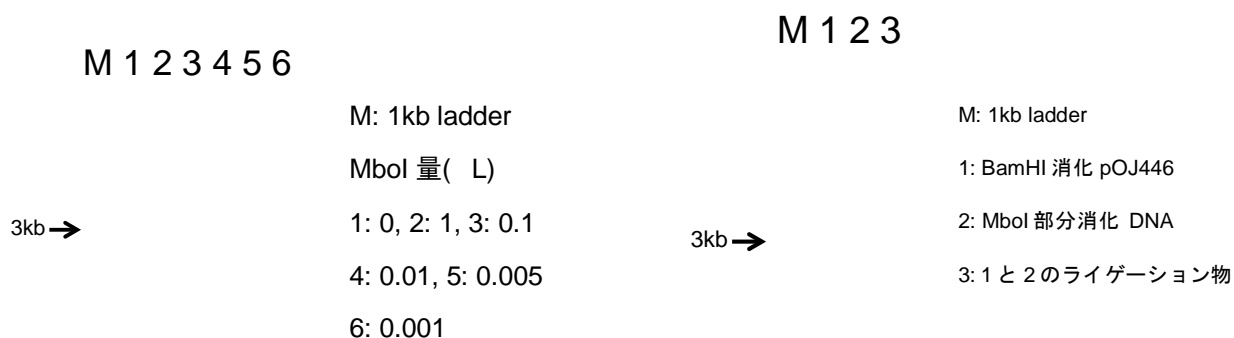


Fig. 4-2. ゲノム DNA の MboI 消化

Fig. 4-3. DNA のライゲーション

4-4 コスミドライブラリーからの pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの探索

コスミドライブラリーの大腸菌プレート (約 2000 コロニー/枚) 20 枚を用いて、プレート 1 枚の全コロニーを LB に回収し、LB で 2 回洗浄後、LB 1 mL に懸濁し、コロニー懸濁液を作製した。Pyrizomicin 生合成遺伝子上流領域を増幅させるプライマー (pzm-UF および pzm-UR)、中流領域を増幅させるプライマー (pzm-CF および pzm-CR) および下流領域を増幅させるプライマー (pzm-DF および pzm-DR) (Table 4-1 および Fig. 4-4A) を用いて Fig. 4-5(A) の条件で PCR を行うことで、コロニー懸濁液より pyrizomicin 生合成遺伝子の探索を行った。電気泳動により目的のサイズの PCR 産物が検出されたコロニー懸濁液について、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍希釈した後、それぞれ apramycin (25 μ g/mL) 含有 LB 寒天培地 5 枚に 100 μ L ずつ塗布し、27 $^{\circ}$ C、2 日間培養した。同様の操作を繰り返すことにより、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの中流領域および下流領域を含むコスミド含有大腸菌を取得した。取得した大腸菌から NucleoSpin Plasmid EasyPure (MACHEREY-NAGEL) を用いてコスミド (cosmid 14-9-3) を抽出し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit およびプライマー (pOJ446-BamHI-L または pOJ446-BamHI-R) を用いて Fig. 4-5(B) の条件で Big Dye 反応を行った。得られた反応物を用いてシーケンス解析を行うことで、インサートの両端約 500 bp の配列を決定した。それらの配列をゲノムシーケンスデータから検索することにより、cosmid 14-9-3 には pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの中流から下流領域を含めた約 34 kb の DNA が挿入されていることを決定した (Fig. 4-4B)。

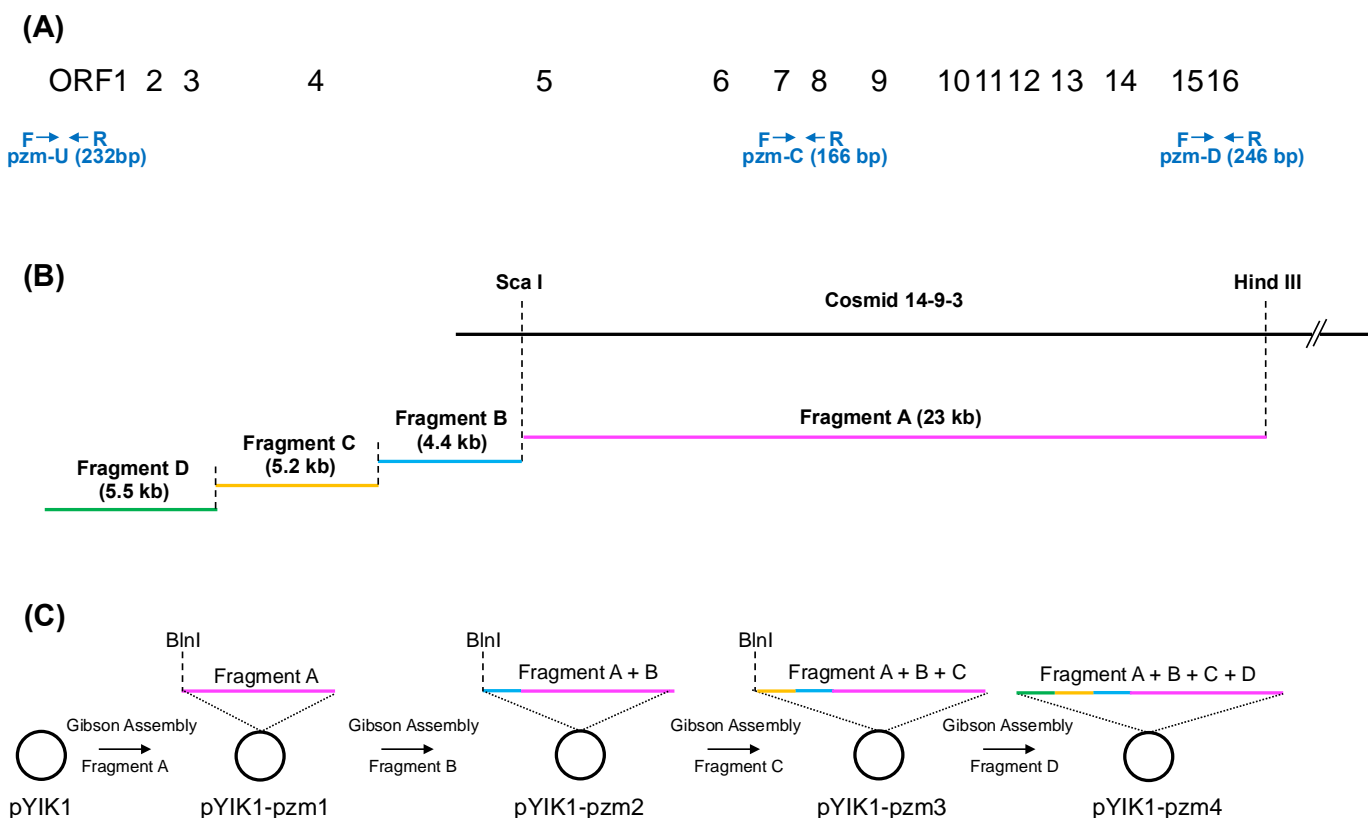


Fig. 4-4. (A) スクリーニングに用いたプライマーの位置

(B) 取得したコスミドの領域と PCR で増幅させた領域

(C) Gibson Assembly による prizomicin 生合成遺伝子クラスターのクローニング

Table 4-1. プライマーリスト

Primer	Sequence (5' to 3')
コスミドライブラリーからprizomicin生合成遺伝子の探索に用いたプライマー	
pzm-UF	TGATGATGCTCTGCTGATCC
pzm-UR	TCTGGGAGACAAGGAGATCG
pzm-CF	ACAGAATCCCAGTGGTGGAC
pzm-CR	TCCAACAGTTGACTGCGTTT
pzm-DF	CACGGTGAACATCCTGCTG
pzm-DR	GAGCAGGTCGTCCAGCAAC
シーケンス解析に用いたプライマー	
pOJ446-BamHI-L	TACCACGGCCTCTGACGGCT
pOJ446-BamHI-R	CGGCACCTGTCCTACGAGTT
Gibson Assemblyに用いたプライマー	
pYIK1-A-pzm	GCAGCGTCTGCACGCGCTCCCGCCAGTACTCCTAGGGCCGGTCGACTCTAGAGGAT
pYIK1-B-pzm	GTTTCAGGATATTGACCAGTCAGCGAGTGCGATCAAAGCTTAGAGCGCCTTGTAGGCCT
pzm-fragment B-F	CTAGAGTCGACCGGCCCTAGGTGCTCAGAGGACGAGGAAG
pzm-fragment B-R	CTGCACGCGCTCCCGCCAGTACT
pzm-fragment C-F	CTAGAGTCGACCGGCCCTAGGGTTTTCCAAGCTGTGAAGG
pzm-fragment C-R	CCTTCCTCGTCTCTGAGC
pzm-fragment D-F	TAGAGTCGACCGGCCCTAGGCGCATGTCTCCTTCCTTCTC
pzm-fragment D-R	CCTTCACAGCTTGGAAAACC
A2297-BstZ17I	GTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACATCGTCGCCGCACTTATG
B6586-BstZ17I	TGATAGCTTGTCATGCCACGTAGCGATAGCGGAGTGATACTTCTTCGCCCTGCGAGAG
orf9発現ベクターの作製に用いたプライマー	
orf9-F	CTAGAGTCGACCGGCATGCAGGAGGAGATTGATGAGTTTCGACG
orf9-R	GATTACCAGATCTGCAGCCAGGTCACGAGTCTCCACAGCA

(A)				
10x ThermoPol Buffer	2.0 mL	95°C	30 sec	35 cycles
dNTP mix (2.5 mM)	1.6 mL	95°C	15 sec	
Forward primer (100 mM)	0.1 mL	59°C	30 sec	
Reverse primer (100 mM)	0.1 mL	68°C	30 sec	
DMSO	1.0 mL	68°C	3 min	
DNA	1.0 mL			
NEB Taq DNA pol.	0.1 mL			
H ₂ O	14.1 mL			

(B)				
Premix	1.0 mL	96°C	30 sec	25 cycles
5x Sequencing Buffer	2.0 mL	96°C	15 sec	
Primer (5 mM)	0.5 mL	50°C	30 sec	
DNA	2.0 mL	60°C	30 sec	
H ₂ O	4.5 mL			

(C)						
5x Buffer	2.0 mL	98°C	30 sec	35 cycles	primer	annealing temp.
dNTP mix (2.5 mM)	1.6 mL	98°C	15 sec		pYIK1-A-pzm/pYIK1-B-pzm	X = 66°C
Forward primer (100 mM)	0.1 mL	X°C	30 sec		A2297-BstZ17I/B6586-BstZ17I	X = 62°C
Reverse primer (100 mM)	0.1 mL	72°C	4 min		orf9-F/orf9-R	X = 70°C
DMSO	0.4 mL	72°C	5 min			
DNA	1.0 mL					
Phusion DNA pol.	0.2 mL					
H ₂ O	14.6 mL					

(D)				
5x Buffer	2.0 mL	98°C	30 sec	35 cycles
5x GC enhancer	2.0 mL	98°C	15 sec	
dNTP mix (2.5 mM)	1.6 mL	66°C	30 sec	
Forward primer (100 mM)	0.1 mL	72°C	4 min	
Reverse primer (100 mM)	0.1 mL	72°C	5 min	
DNA	1.0 mL			
Q5 DNA pol.	0.1 mL			
H ₂ O	13.1 mL			

Fig. 4-5. PCR 条件

DNA fragments mixture	3.0 mL
4x isothermal buffer	1.25 mL
T5 exonuclease (0.2U/mL)	0.1 mL
Phusion DNA pol.	0.06 mL
Taq DNA ligase	0.5 mL

50°C, 1h

Fig. 4-6. Gibson Assembly 条件

4-5 Pyrizomicin 生合成遺伝子クラスター全領域のクローニング

コスミドライブラリーより pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの中流から下流領域が得られたが、上流から中流領域は取得できなかった。当遺伝子クラスターの全領域をクローニングするために上流から中流領域を3つの断片に分けてPCRで増幅させた後、コスミドで得られた領域とそれぞれの断片を結合させることとした。まず、4-4で得られた Cosmid 14-9-3 を Scal と Hind III (New England Biolabs) で消化することで fragment A を作製した。プラスミド pYIK1 を鋳型とし、プライマー (pYIK1-A-pzm および pYIK1-B-pzm) を用いて Fig. 4-5(C) で PCR を行うことで pYIK1 の PCR 産物を作製した。Fragment A と pYIK1 の PCR 産物を Gibson Assembly⁸⁵⁾により Fig. 4-6 の条件で結合させることにより、pYIK1-pzm1 を作製した (Fig. 4-4C)。なお、Gibson Assembly 後のクローニングは、*E. coli* NEB10-beta chemically competent cells (New England Biolabs) を使用し、常法に従って行った。次に、K10-0216 株のゲノム DNA を鋳型とし、3種類のプライマーペア (pzm-fragment B-F & B-R, pzm-fragment C-F & C-R および pzm-fragment D-F & D-R) を用いて Fig. 4-5(D)の条件で PCR を行い、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) で精製することで、3種類の PCR 産物 (fragments B, C および D; Fig. 4-4B) を作製した。pYIK1-pzm1 の BlnI (Takara Bio) 消化物と fragment B を Gibson Assembly で結合させることで pYIK1-pzm2 を作製した (Fig. 4-4C)。同様に、pYIK1-pzm2 の BlnI 消化物を fragment C と結合させることで pYIK1-pzm3 を、pYIK1-pzm3 の BlnI 消化物を fragment D と結合させることで pYIK1-pzm4 を作製した (Fig. 4-4C)。さらに、プライマー (A2297-BstZ171 および B6586-BstZ171) を用いて Fig. 4-5C の条件で PCR を行うことでプラスミド pIJ10702 から apramycin 耐性遺伝子、integrase 遺伝子および *attP* を増幅させた。得られた PCR 産物と pYIK1-pzm4 の BstZ171 (New England Biolabs) 消化産物を Gibson Assembly で結合させることで pYIK3-pzm4 を作製した。

4-6 *orf9* (LuxR ファミリー転写制御因子をコードする遺伝子) の発現ベクターの作製

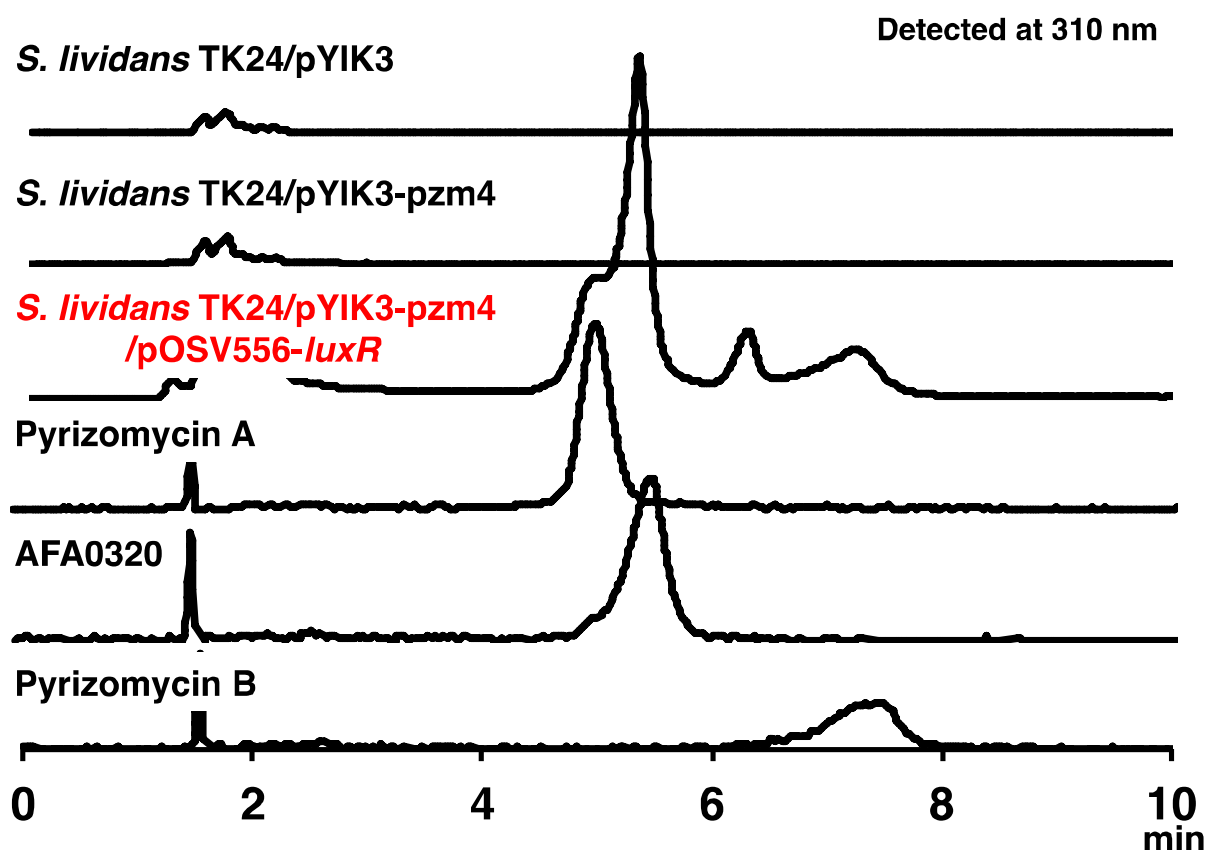
K10-0216 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマー (*orf9*-F および *orf9*-R) を用いて Fig. 4-5C の条件で PCR を行い、*orf9* を増幅させた。得られた PCR 産物とプラスミド pOSV556t の BamHI 消化産物を Gibson Assembly で結合させ、pOSV556t-*luxR* を作製した。

4-7 接合伝達による大腸菌から放線菌へのプラスミド導入

E. coli DH5 /pUB307 (kanamycin 耐性; 終濃度 25 g/mL)、*E. coli* ET12567 (chloramphenicol 耐性; 終濃度 25 g/mL) および *E. coli* NEB10-beta pYIK3-pzm4 (ampicillin および apramycin 耐性; 終濃度 100 および 25 g/mL) の overnight culture を抗生物質含有 LB 培地 10 mL に 1%植菌し、37℃で 4 時間培養した。LB 培地で 2 回洗浄後、3,000 rpm, 10 分間遠心し、上清を捨て、菌体を LB 培地 200 L に懸濁させた。放線菌 *Streptomyces lividans* TK24 の孢子液を LB 培地 500 L に懸濁させ、50℃で 10 分間ヒートショックさせた。ヒートショックさせた孢子懸濁液に各大腸菌懸濁液を 100 L ずつ混ぜ、12,000 rpm, 2 分間遠心し、上清を捨てた。LB 培地 100 L を加え、10 倍、100 倍希釈液を作製し、それらを SFM (2% soybean meal, 2% mannitol, 2% agar, tap water) に塗布し、30℃で 16 時間培養した。滅菌水 1 mL に nalidixic acid (25 mg/mL) 20 L および apramycin (25 mg/mL) 20 L を加えた後、プレート全体に塗布した (この操作では、nalidixic acid は大腸菌を除去するために、apramycin は pYIK3-pzm4 が導入された放線菌を選択するために添加している)。30℃でさらに 1 週間培養し、apramycin 耐性を獲得した放線菌コロニーを釣菌した。また、同様の方法で pOSV556t-*luxR* (選択マーカー : 大腸菌; ampicillin, 放線菌; hygromycin B) を *S. lividans* TK24/pYIK3-pzm4 に導入した。

4-8 Pyrizomycin 生合成遺伝子クラスターの異種発現

接合伝達により pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターを導入した菌株およびその対象株 (*S. lividans* TK24/pYIK3, *S. lividans* TK24/pYIK3-pzm4, *S. lividans* TK24/pYIK3-pzm4/pOSV556-luxR) を用いて生産培養を行った。301 seed 培地で 27°C、300 rpm、3 日間培養した菌株を 58 培地に 1%植菌し、4 日間培養した。その培養液にエタノールを加え抽出後、LC/UV にて pyrizomicin の生産を確認した。LC/UV は、0.1% ギ酸を入れた 80%MeOH のアイソクラティックの条件で UV 検出を 310 nm に設定し解析した。標品は培養液から取得した pyrizomicin A および B、K10-0216 株の培養液より得られた AFA0320 を用いた。その結果を Fig. 4-7 に示した。*S. lividans* TK24 に空ベクターおよび pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターを導入した時では、pyrizomicin の生産が確認されなかった。しかし、赤字で示した pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターおよび LuxR の両方を導入した菌株で pyrizomicin 類の生産が確認された。よって、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターを同定し、その生合成遺伝子は LuxR ファミリー転写制御因子によって正に制御されることが示唆された。



カラム: Inertsil ODS 3.0 × 250 mm、移動相: 80% MeOH / 0.1% HCOOH (0-10 min)、
流速: 0.5 mL / min、カラム温度: 40 °C、UV 検出: 310 nm

Fig. 4-7. Pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの異種発現結果

第3節 まとめ

第1節では virantmycin 新規類縁体である virantmycin B および C を単離した。

北里微生物資源ライブラリーに登録されている放線菌の 51 培養液を用いた MarkerView による PC screening により、17 株、21 ピークが選択された。この中で、*Streptomyces* sp. AM-2504 株の培養液抽出物に注目した。AM-2504 株の 51 培地培養液抽出物の溶出時間 36.5 分の化合物は、 $[M+Na]^+$ 451, 2243, 240 および 332 nm に UV 極大吸収を示した。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索結果、該当する化合物がないことから新規物質と推定された。

Virantmycin B の取得を目的に、Jar を用いて大量培養を行い、Diaion HP-20、シリカゲルおよび ODS によるクロマトグラフィーで粗精製を行い、最終的に HPLC で分取した。その結果、培養液 60 L から 24 mg および 27 mg を得た。MS および NMR 解析の結果、テトラヒドロキノリン骨格およびインドリン骨格を有する化合物であった。本化合物は北里研究所で単離された *Streptomyces nitrosporeus* AM-2722 株が生産する virantmycin と構造が類似していることから、virantmycin B および C と命名した。

Virantmycin B は *B. subtilis* ATCC 6633 および *M. racemosus* IFO4581 に 100 $\mu\text{g}/\text{disk}$ においてそれぞれ 13 mm および 9 mm の阻止円を示した。Virantmycin C は *B. subtilis* ATCC 6633 および *M. racemosus* IFO 4581 に 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$ においてそれぞれ 10 および 9 mm の阻止円を示した。

第2節ではチアゾールとピリジンが結合した pyrizomicin A および B を単離した。

Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216 株は mangromicin A-I および K10-0216 KA および KB を生産し、mangromicin の生産性向上のため前任者により培養検討が行われた結果、スターチおよびドライイーストが mangromicin の生産に大きく影響することが示された。この培地を用いて PC screening を行った結果、溶出時間 30 分の化合物は、 $[M+H]^+$ 365.1456, 215, 250 および 306 nm に UV 極大吸収を示した。この解析データを Dictionary of Natural Products で検索結果、該当する化合物がないことから新規物質と推定された。

Pyrizomicin の取得を目的に、大量培養を行い、酢酸エチル抽出およびシリカゲルクロマトグラフィーで粗精製を行い、最終的に HPLC で分取した。その結果、培養液 15 L から 5.9 mg および 1.3 mg 得た。MS および NMR 解析の結果、チアゾリルピリジン骨格に脂肪鎖が結合した構造であり、SciFinder で検索した結果、新規物質であった。よって本化合物を pyrizomicin A および B と命名した。

両化合物は *B. subtilis* ATCC 6633, *K. rhizophila* ATCC 9341, *E. coli* NIHJ, *X. oryzae* pv. *oryzae* KB 88 および *C. albicans* KF1 に 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で抗菌活性を示した。

Pyrizomicin の生合成研究を行った結果、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの全領域および LuxR family 転写制御因子の両方を導入した株でのみ生産が確認された。よっ

て、pyrizomicin の生合成遺伝子クラスターの同定並びにそのクラスターは LuxR family 転写制御因子によって正に制御されることが示唆された。

総括

本研究で得られた新規化合物の一覧を Fig. 1 に示した。

第 1 章では土壌分離希少放線菌より sagamilactam を取得した。

Sagamilactam はジエン、トリエンおよびテトラエン共役オレフィンおよびデカリン骨格を含有する新規な 34 員大環状ラクタムであり、ディールス-アルダー反応による環化を示唆している。私の知る限りでは、sagamilactam は放線菌によって産生される最大の環状ラクタムを構成する。大環状ラクタムは、大環状ラクトンと比較し放線菌株の産物として報告が少ない。それにもかかわらず、ラクタム化合物は、多種多様な生物学的活性を示すことが示されている。例えば、大村のグループは以前に *Streptomyces scabrisporus* KM-4927^{T86)} の培養液中で hitachimycin⁸⁷⁾ を取得している。Hitachimycin は、19 員環大環状ラクタム抗生物質であり、抗菌、抗真菌および抗腫瘍活性も示す。最近、生物学的に活性なポリエン大環状ラクタムである lobosamide A および B⁸³⁾ が、海洋由来の *Micromonospora* sp. RL09-050-HVF-A の代謝産物から単離された。Lobosamide A および B は、ヒトアフリカトリパノソーマ症の原虫である *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} < 10 \mu M$) の増殖阻害を阻害した。Sagamilactam は lobosamide A および B のものよりも *Trypanosoma brucei* ($IC_{50} = 0.25 \mu M$) に対してより強力な増殖阻害活性を示した。したがって、大環状ラクタムである sagamilactam を含むは新規な抗トリパノソーマ薬のリード化合物となることが期待される。

第 2 章では海洋分離希少放線菌より mumiamicin および tatemasporeine を取得した。

Mumiamicin は脂肪鎖にフラン環を有するフラン脂肪酸であった。植物⁸⁸⁾、菌類⁸⁹⁾ および魚類⁹⁰⁾ を含む様々な生物から二次代謝物としていくつかのフラン脂肪酸が単離されており、フラン脂肪酸は、抗酸化および抗炎症活性などの様々な生物学的活性を示すことが知られている。Mumiamicin は、放線菌由来のフラン脂肪酸の最初の報告であり、さらに *Mumia* 属からの二次代謝産物は初の報告である。Mumiamicin は、ヒドロキシシラジカルの捕捉および一重項酸素の消光活性を示した。独自の PC スクリーニング続けることで、海洋に生息する微生物からさらに多くの新規化合物を発見する可能性が高まると考える。

Tatemasporeine はキノリンとインドリジンが結合した骨格をしており、未だ報告例の無い新規骨格であった。また、tatemasporeine は PKS、NRPS 及びメバロン酸経路などの生合成が推定できない構造であり、新規な生合成経路で合成される可能性がある。Tatemasporeine は未だ生物活性は見出されていないが、新たな創薬リード化合物になる可能性を秘めている。よって今後様々な生物活性評価系にかけることで活性が見出されることを期待する。

第 3 章では北里微生物資源ライブラリーより virantmycin 新規類縁体である virantmycin

B および C および pyrizomicin A および B を取得した。放線菌初のテトラヒドロキノリン化合物である virantmycin は大村グループで 1981 年に報告された化合物であり、抗ウイルス活性が知られている。その後、benzastatin 類が報告され、その中に virantmycin C のファーマコアであるインドリン骨格化合物も含まれている。しかし、virantmycin および benzastatin 類は分子内にヒドロキシサイクロペンタノンを持つものがなく、今回が初の報告である。現在は抗菌活性しか見出していないが、virantmycin はもともと抗ウイルス活性化合物として報告しているので、今後抗ウイルス活性評価系にて活性が見出される可能性が高いと考えられる。Virantmycin B および C は dityromycin 生産菌として北里微生物資源ライブラリーに約 40 年間長期保存されていた菌株の培養液から新たに発見されたものである。また、同じ長期保存菌株の二次代謝産物から nanaomycin 新規類縁体および iminimycin A および B が見出されていることから、PC screening の有用性ととも北里微生物資源ライブラリーが未知化合物の宝庫であることが検証できた。

Pyrizomicin A および B はピリジン環とチアゾール環をもつ新規物質である。放線菌代謝産物の中で、チアゾリルピリジン骨格を持つ化合物は karnamicin 類、WS 75624 類、AFA0320 の 3 種の化合物のみであり、その生産菌は全て *Pseudonocardiaceae* 科に属する *Lechevalieria* 属放線菌からのみである。この結果は、希少放線菌に焦点を当て探索しなければ得られない結果であると言える。1 つの菌株からサイクロペンタデカン骨格の mangromycin 類 9 化合物およびステロイド化合物 K10-0216 KA, KB と同一の生産株 *L. aerocolonigenes* K10-0216 から今回新たにピリジン環とチアゾール環を有する pyrizomicin A および B を発見した。これらはいずれも PC screening によって発見した化合物であり、1 菌株から骨格の異なる 3 種類、計 13 類縁体を発見することができた。1 菌株の化合物生産能力を最大限生かせる PC screening の有用性を示せたと言える。また、pyrizomicin の生合成研究を行い、pyrizomicin 生合成遺伝子クラスターの同定およびその遺伝子クラスターの発現は LuxR ファミリー転写制御因子により制御されていることが示唆された。

今回、骨格の異なる 5 種、計 7 化合物をそれぞれ由来の異なる放線菌から見出した。これら物質は、ユニークな骨格を有する化合物が多く、創薬の新たなリード化合物として期待される。PC screening が過去に行われたがこれだけ新規物質を見出したのは、1 点目に探索があまりされていない属、すなわち希少放線菌に着目したからであると言える。過去に希少放線菌を用いて化合物の探索があまりされていないため、新規物質の発見に至ったのではないかと考える。2 点目は LC/UV-MS を用いたことで、検出感度が飛躍的に向上し、生産が少ない化合物でも検出できるようになったからであると言える。過去にドラーゲンドルフ試薬による PC screening が行われた dityromycin 生産菌の *Streptomyces* sp. AM-2504 株からさらに新規物質を見出したことで立証できた。また、本論文中には記述はしていないが、2 株ほど大量培養し、化合物の単離精製を行ったが、それらは残念ながら既知化合物になってしまった。その中の 1 つは構造解析した時は新規化合物であったが論文作成段階で他のグループに先を越されてしまったものがある。

しかしながら、全体で7株培養し、その中の5つの株から高確率（約70%）で新規物質を取得できたことは、PC screening の有用性が実証できたと証明できる。今後、より精度を増し、化合物の検索段階で自動化できるようになれば、とてつもなく社会にインパクトを与える研究に発展すると確信している。

未だ、天然には発掘されていない新規化合物が眠っており、それらを掘り起こしていける可能性があるのはPC screening が最適ではないかと私は思う。

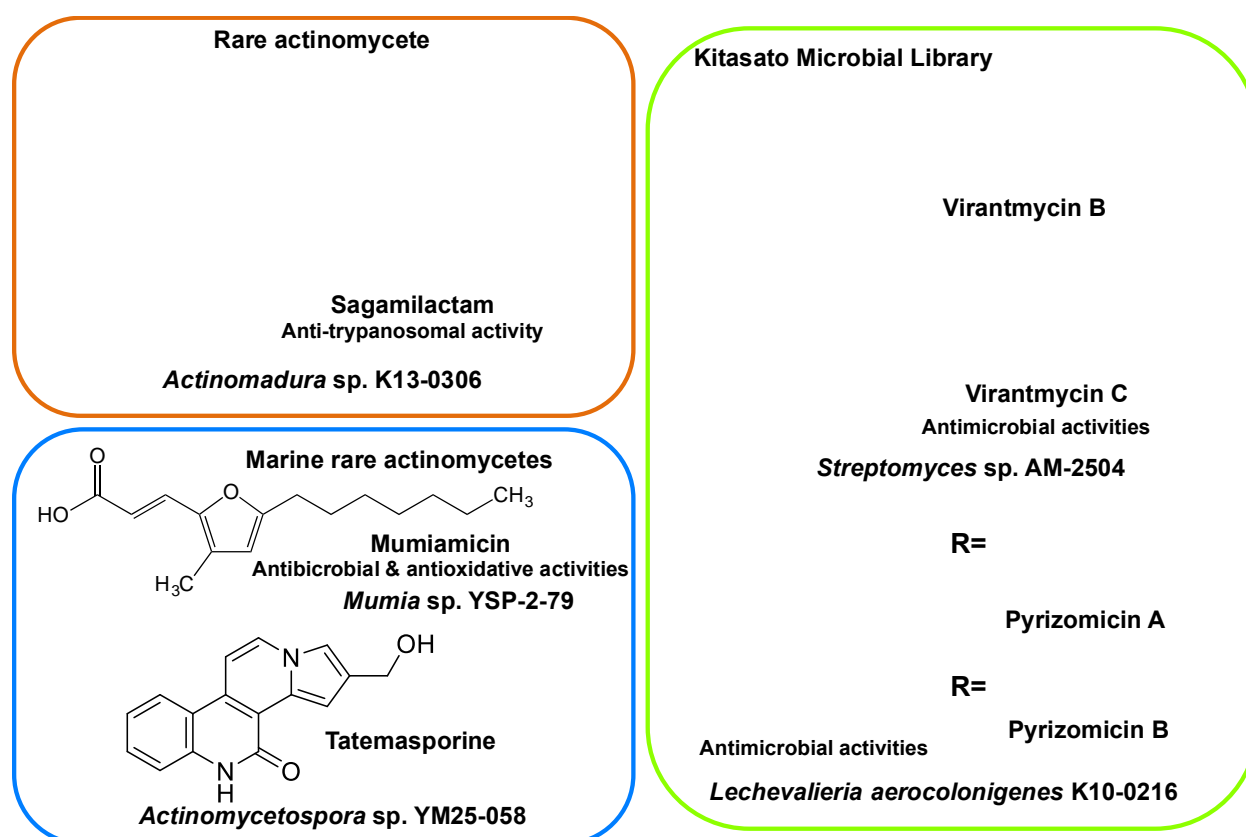


Fig. 1. 本研究で得られた新規化合物一覧

添付資料

第 1 章 土壌分離希少放線菌からの新規物質の探索

第 1 節 Sagamilactam に関する研究

Figure S1-1 ^1H NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-2 ^{13}C NMR spectrum of sagamilactam at 120 MHz in CD_3OD

Figure S1-3 gCOSY NMR Spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-4 DQF-COSY NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD
(magnification of olefin moiety)

Figure S1-5 TOCSY NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-6a gHMQC NMR spectrum in high-field region of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-6b gHMQC NMR spectrum in low-field region of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-7 ^1H - ^{13}C HMBC NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-8 ^1H - ^{15}N HMBC NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

Figure S1-9 ROESY NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

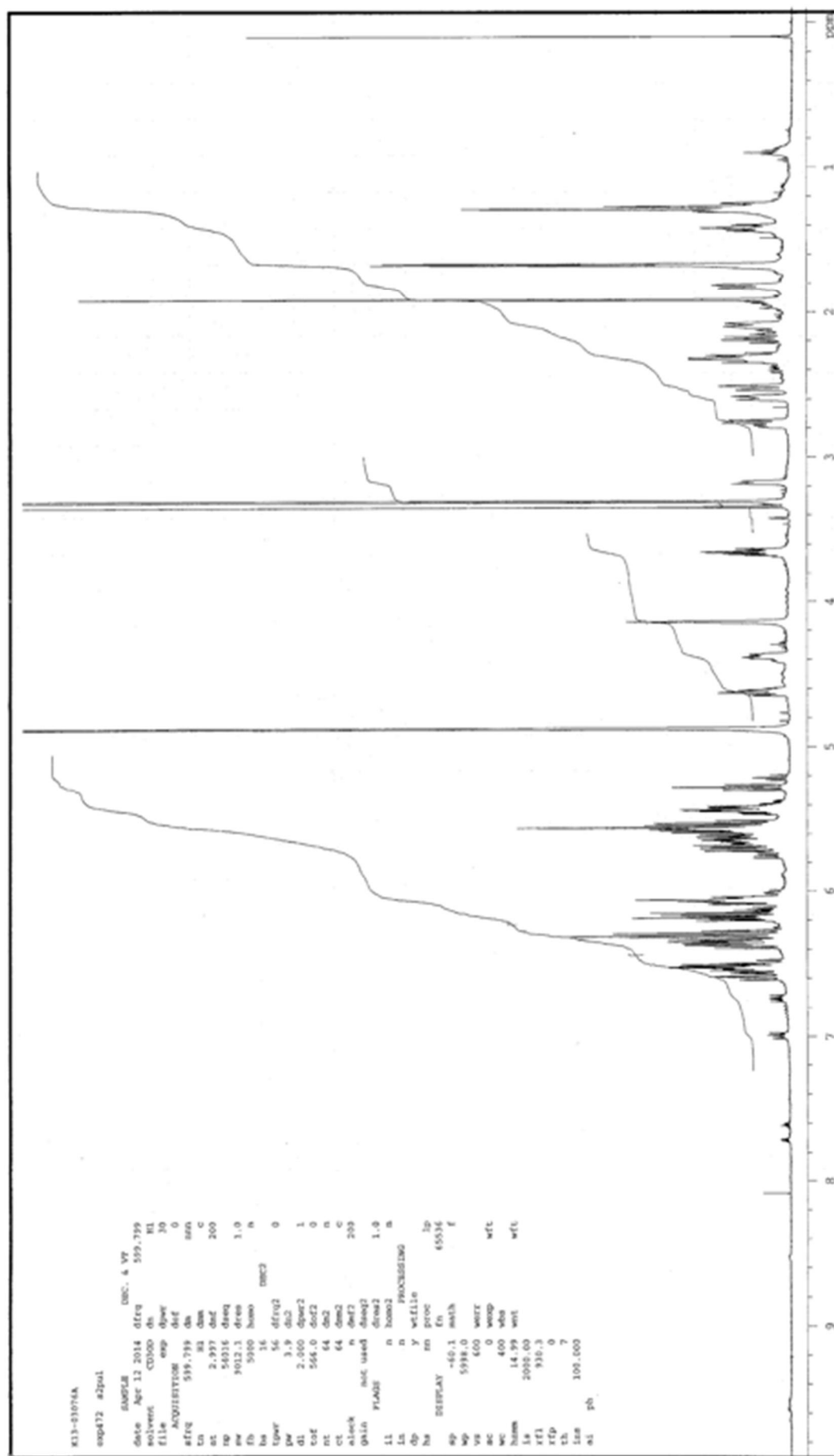


Figure S1-1 ^1H NMR spectrum of sagamilactam in CD_3OD

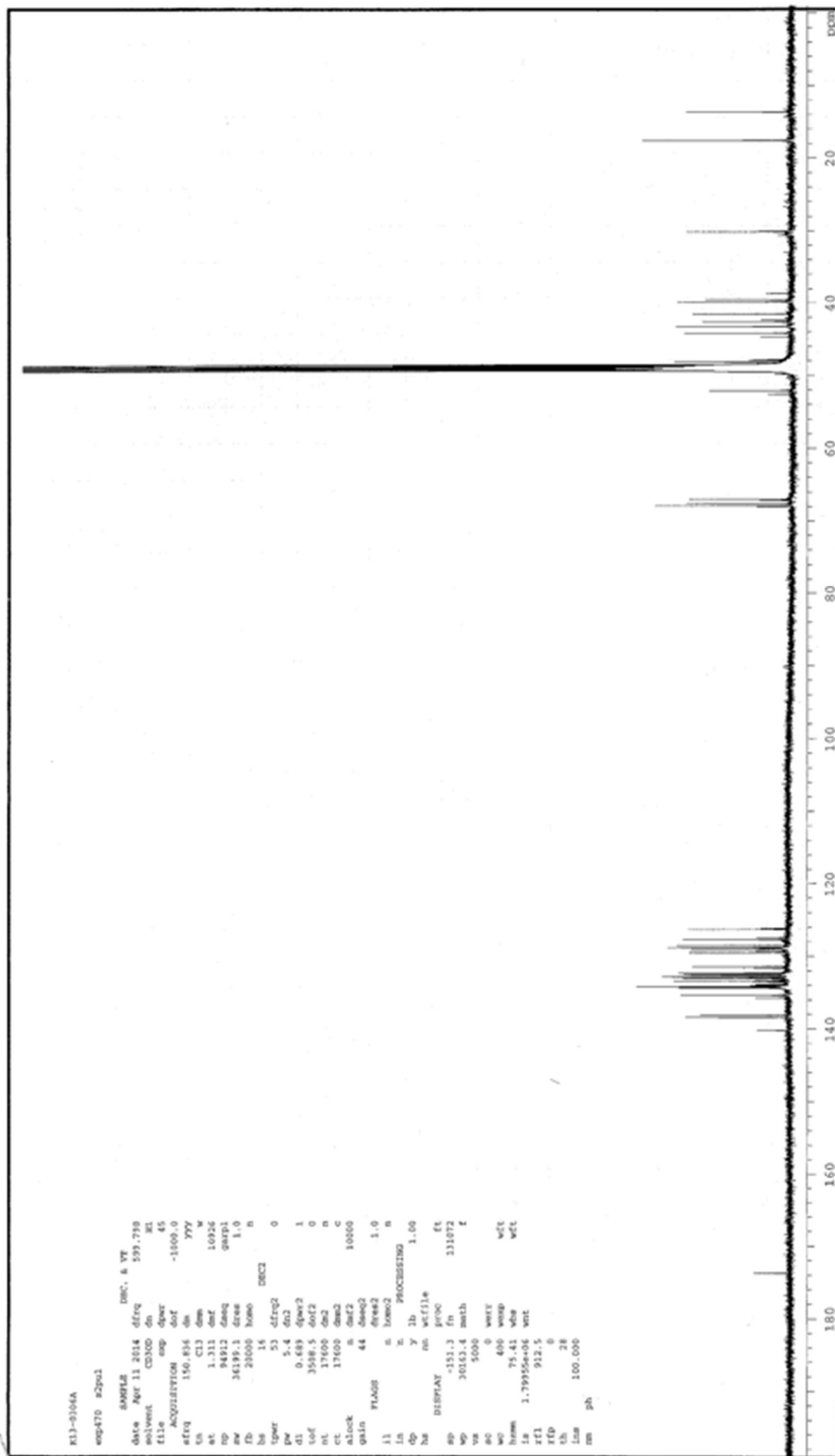


Figure S1-2 ¹³C NMR spectrum of sagamilactam at 120 MHz in CD₃OD

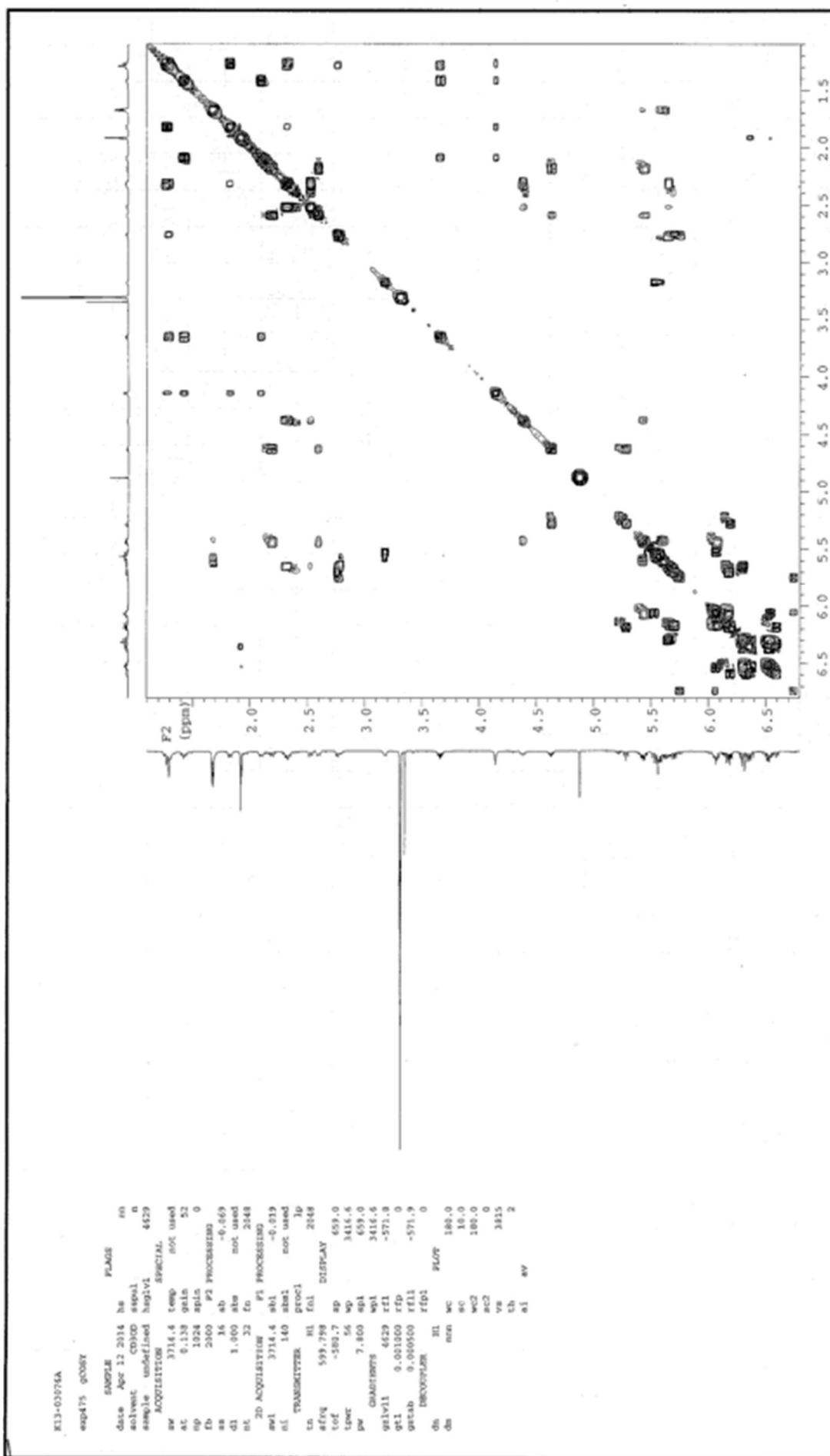
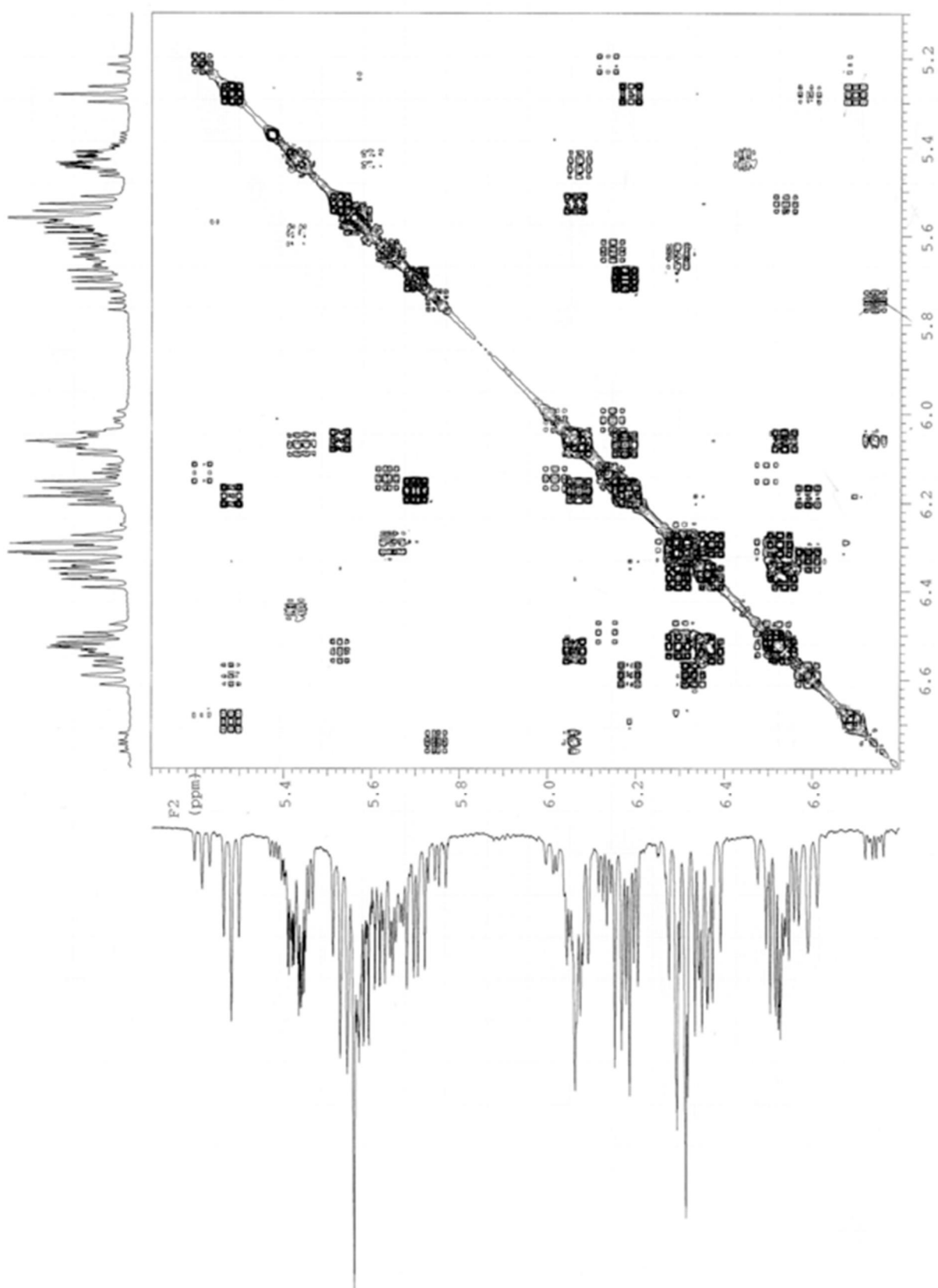


Figure S1-3 gCOSY NMR Spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD₃OD



**Figure S1-4 DQF-COSY NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD₃OD
(magnification of olefin moiety)**

R13-03076A
 esq439 TOCSY
 SAMPLE
 date Apr 14 2014
 solvent CD3OD
 sample undefined
 ACQUISITION
 pw 3534.8
 ac 0.145
 qb 1024
 ss 2050
 dl 1.050
 nl 32
 pw1 3534.8
 nl 290
 TRANSMITTER
 afreq 559.798
 tcf -634.5
 tpsw 56
 pw 7.800
 mix 0.140
 alpw 51.3427
 alpm 40.800
 trfm 0.0020
 FREQUENCY
 satmoda ypo
 satpwr 0
 satdly 1.500
 satfrc -81.2
 DECOUPLER
 dn non
 dn 447
 al 2
 ph

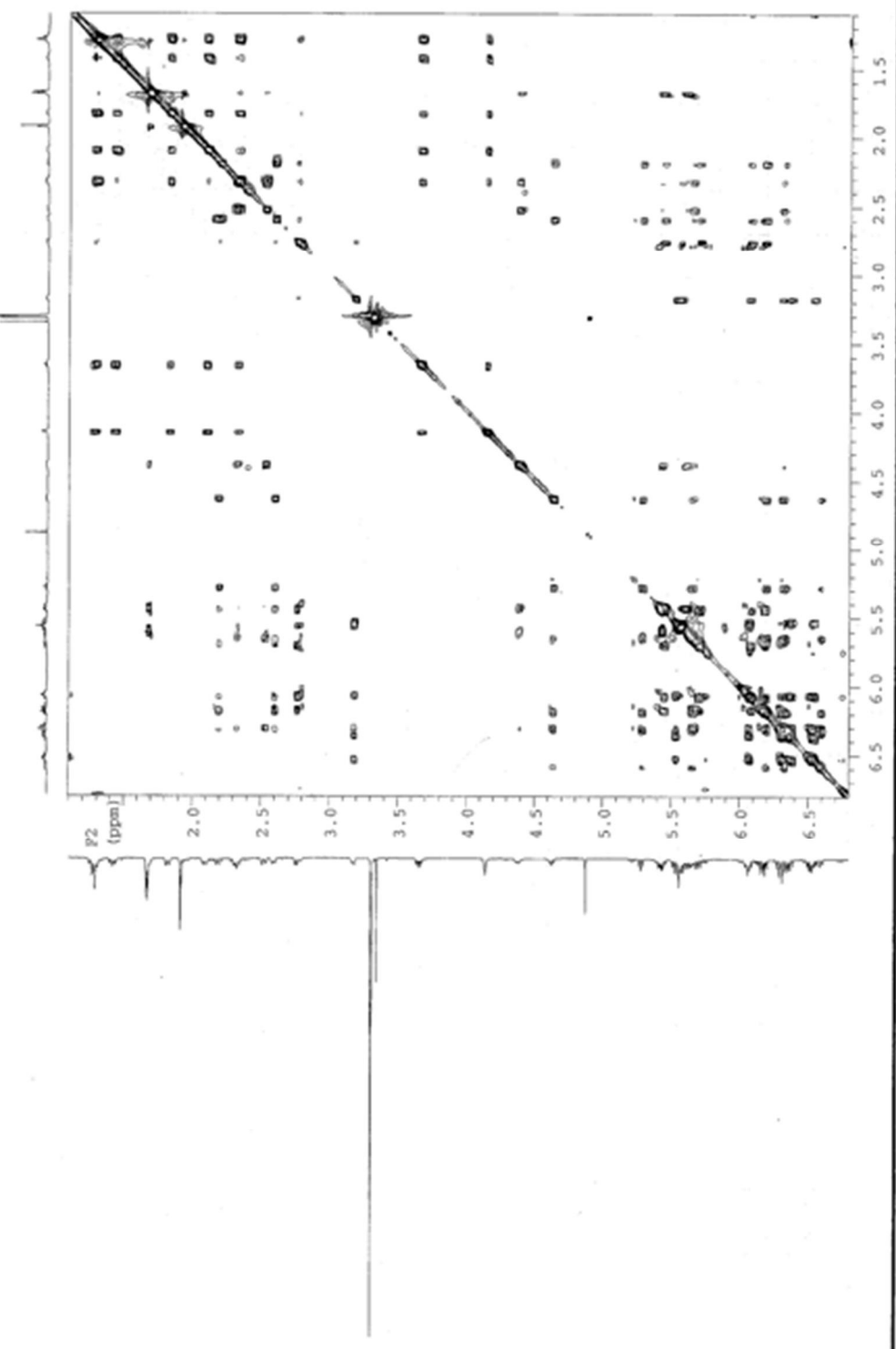


Figure S1-5 TOCSY NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD₃OD

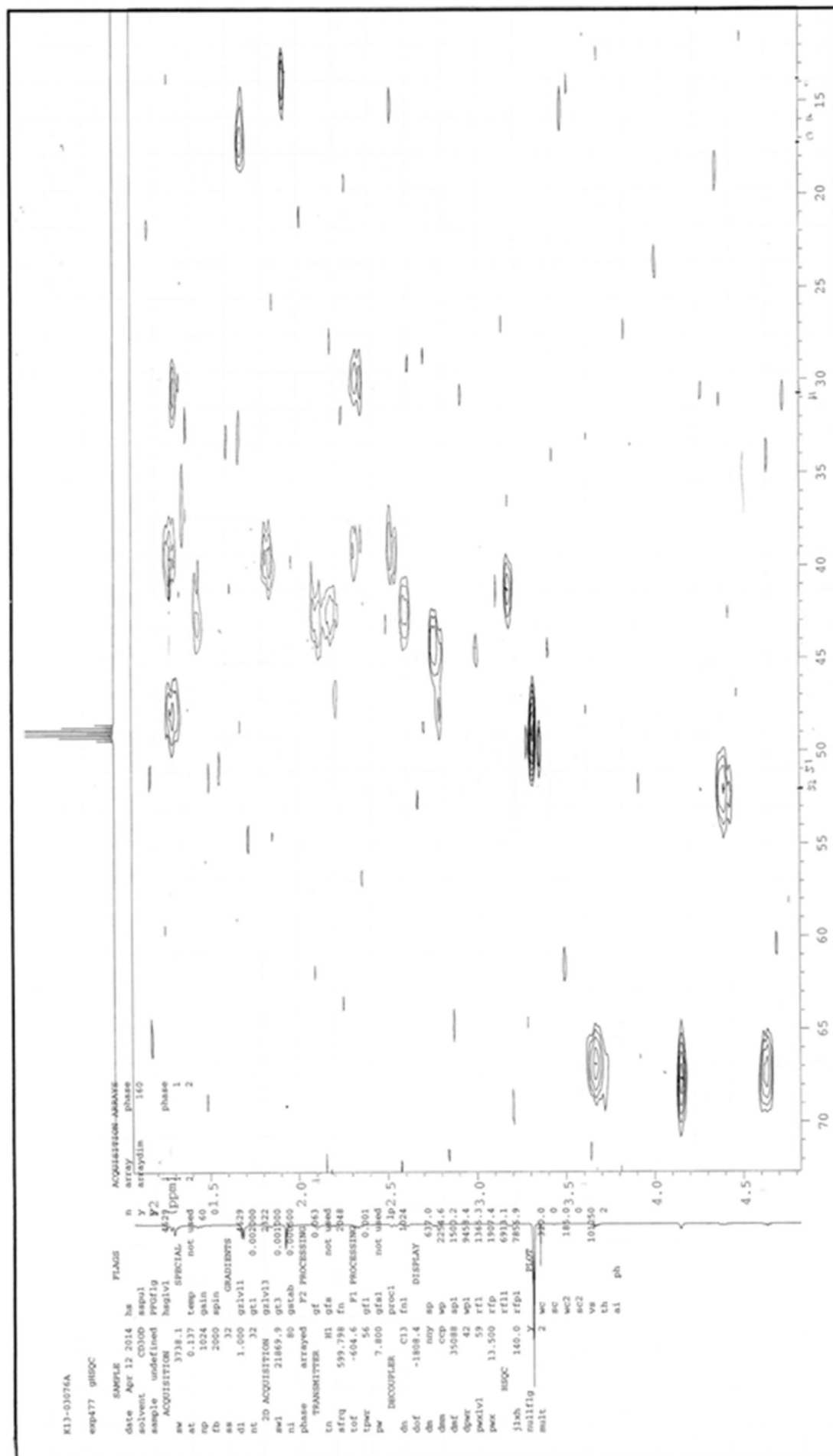


Figure S1-6a gHMQC NMR spectrum in high-field region of sagamilactam at 600 MHz in CD₃OD

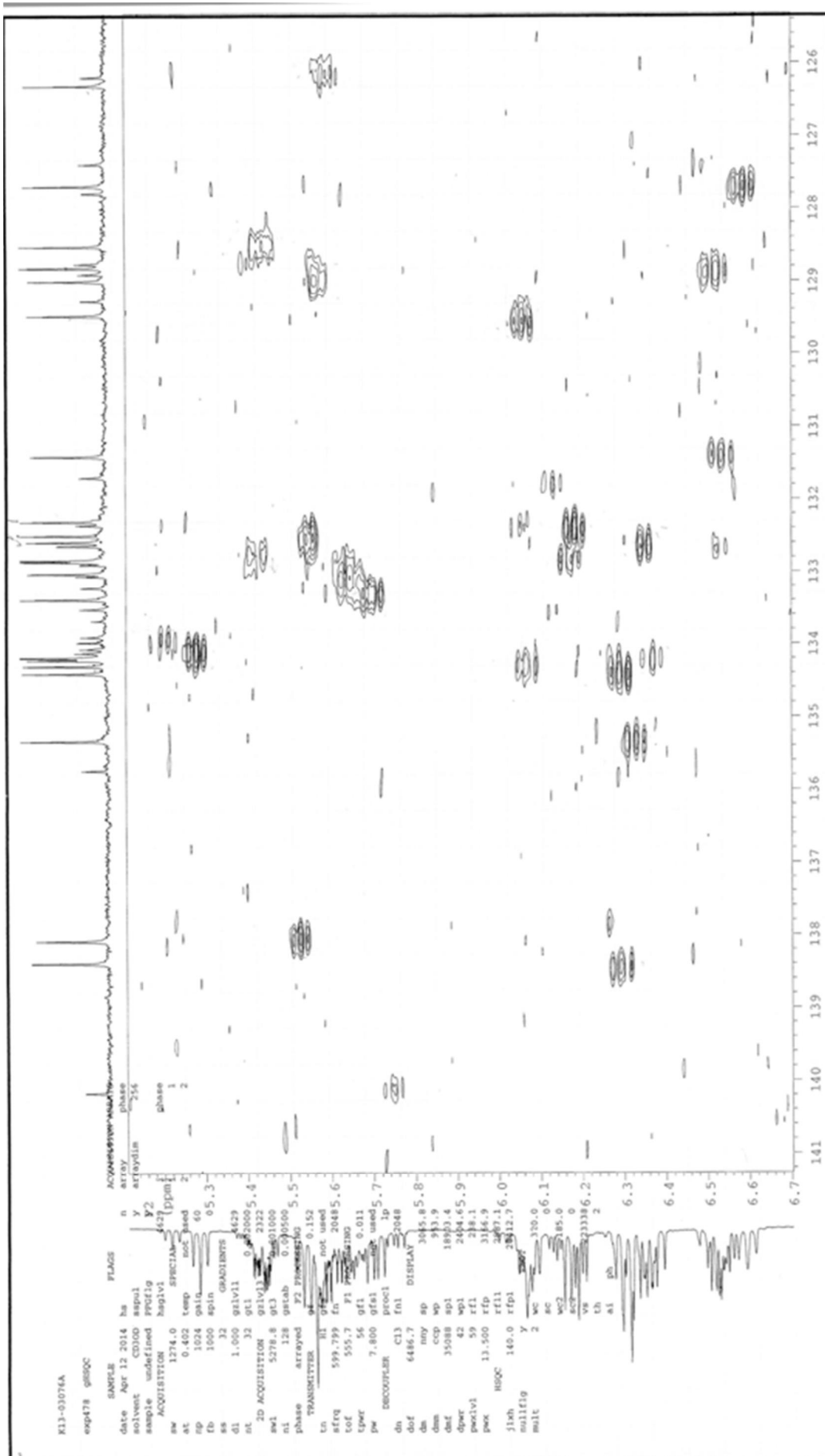


Figure S1-6b gHMQC NMR spectrum in low-field region of sagamilactam at 600 MHz in CD₃OD

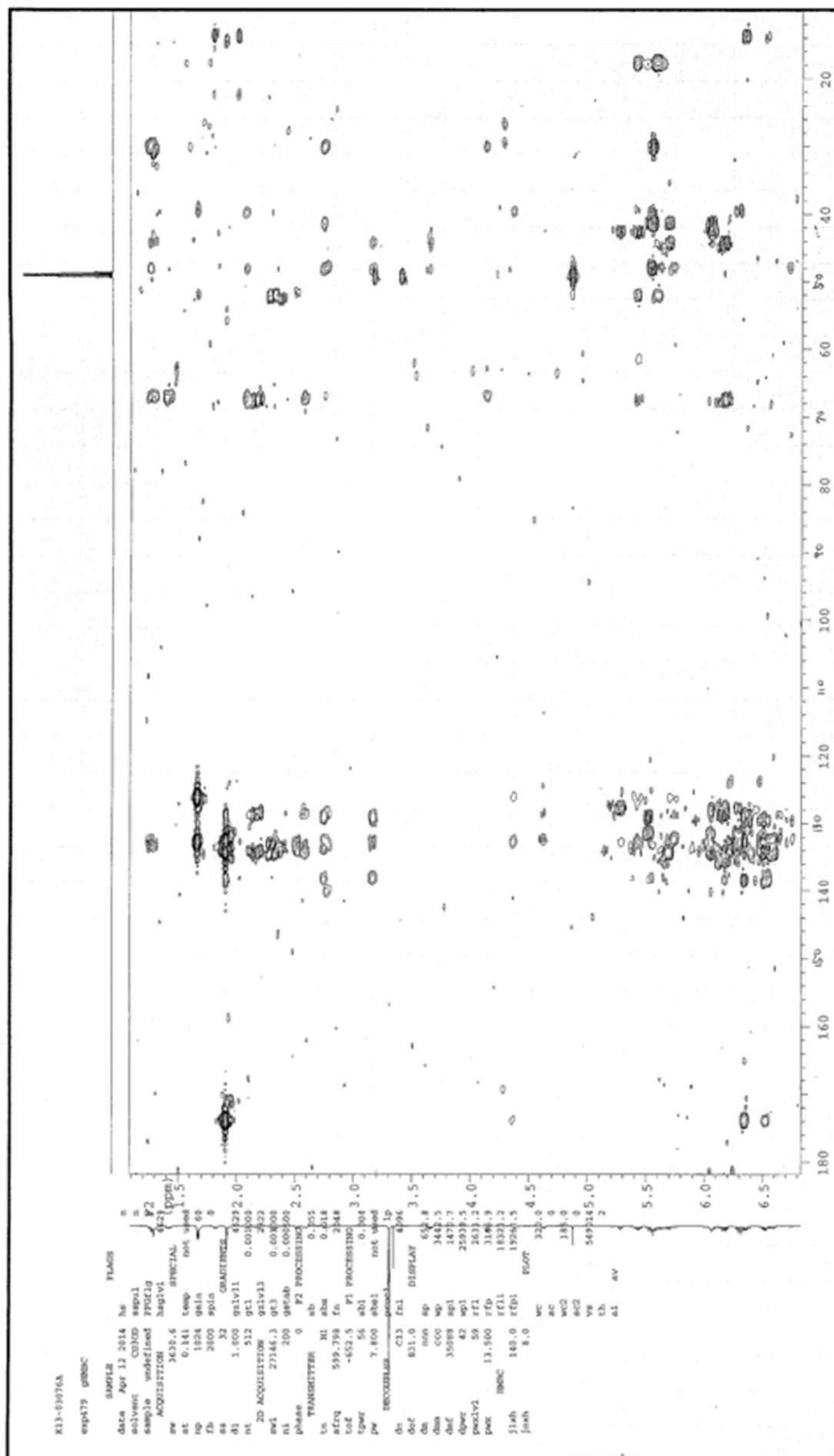


Figure S1-7 ^1H - ^{13}C HMB NMR spectrum of sagamylactam at 600 MHz in CD_3OD

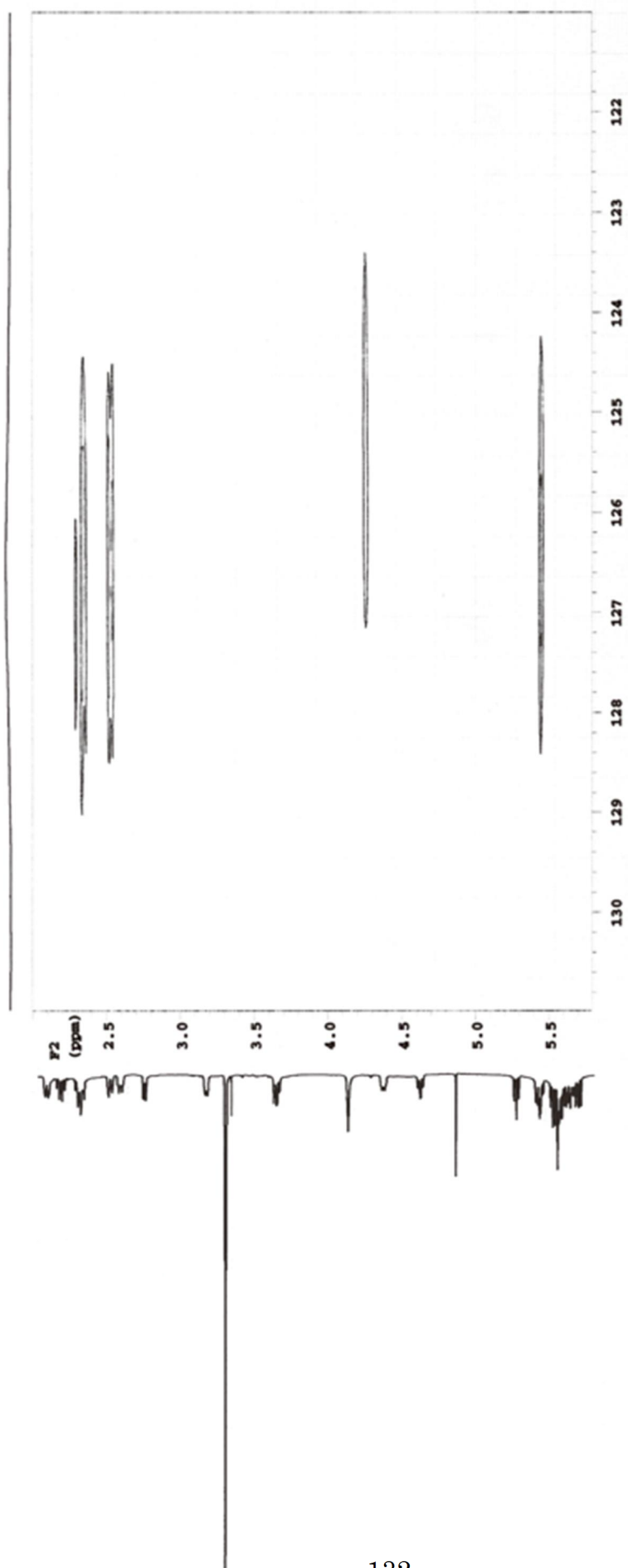


Figure S1-8 ^1H - ^{15}N HMBC NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD_3OD

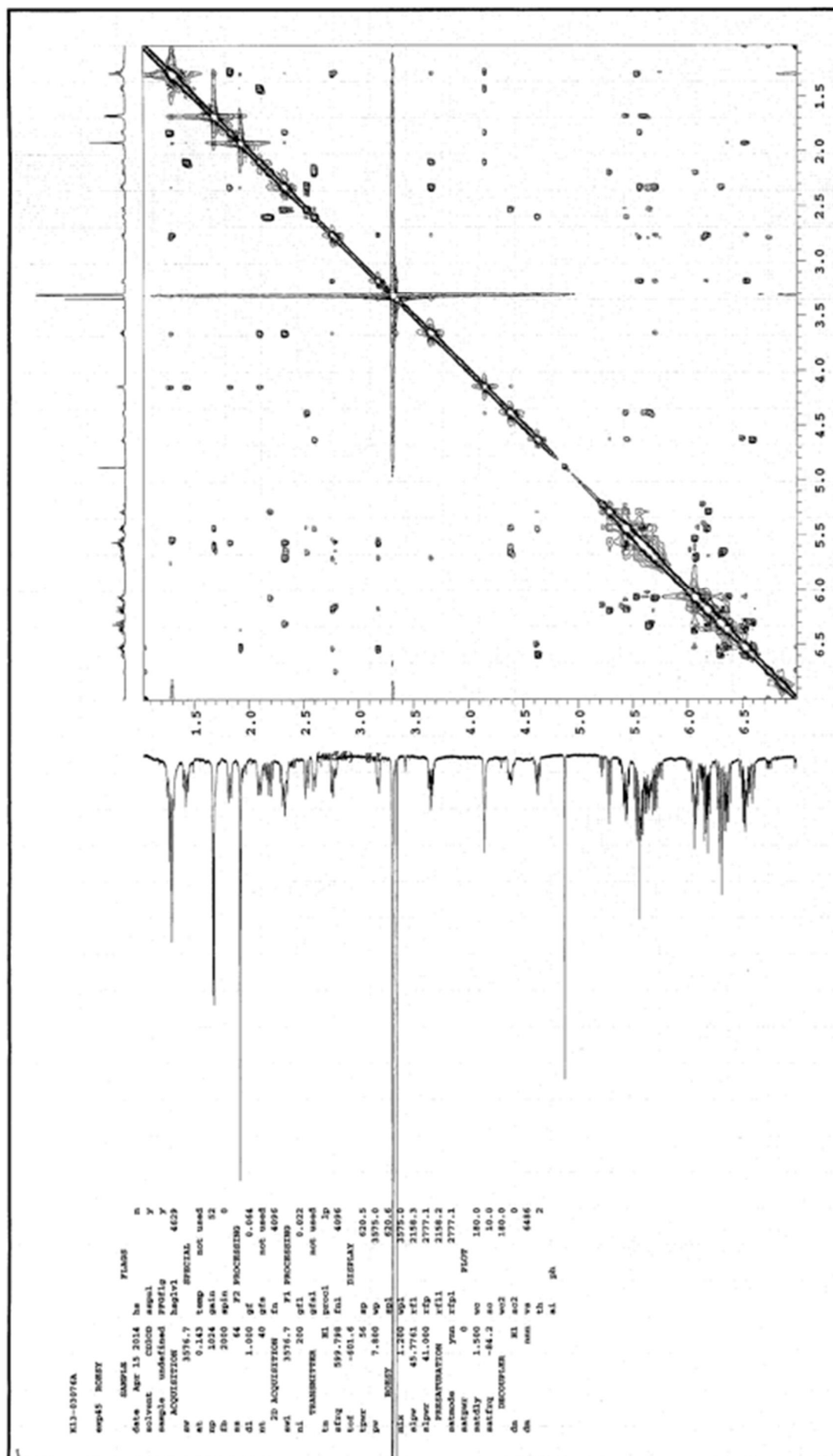


Figure S1-9 ROESY NMR spectrum of sagamilactam at 600 MHz in CD₃OD

第2章 海洋分離希少放線菌からの新規物質の探索

第1節 Mumiamicin に関する研究

Figure S2-1-1 *Kibdelosporangium* 属の系統樹

Figure S2-1-2 *Micromonospora* 属の系統樹

Figure S2-1-3 Figure S2-1-1①の拡大図

Figure S2-1-4 Figure S2-1-1②の拡大図

Figure S2-1-5 Figure S2-1-1③の拡大図

Figure S2-1-6 Figure S2-1-1④の拡大図

Figure S2-1-7 *Nocardioides* 属の系統樹

Figure S2-1-8 *Pseudonocardia* 属の系統樹

Figure S2-1-9 *Streptoacidifilus* 属の系統樹

Figure S2-1-10 *Verrucosispora* 属の系統樹

Figure S2-1-11 *Rhodococcus* 属の系統樹

Figure S2-1-12 ^1H NMR Spectrum of Mumiamicin in CDCl_3

Figure S2-1-13 ^{13}C NMR Spectrum of Mumiamicin in CDCl_3

Figure S2-1-14 HSQC Spectrum of Mumiamicin in CDCl_3

Figure S2-1-15 HMBC Spectrum of Mumiamicin in CDCl_3

Figure S2-1-16 COSY Spectrum of Mumiamicin in CDCl_3

Figure S2-1-17 ^1H NMR Spectrum of Mumiamicin in $\text{DMSO}-d_6$

Procedures 1 Preparation of Mumiamicin methyl ester

Figure S2-1-18 LC/MS spectrum of Mumiamicin methyl ester

Figure S2-1-19 ^1H NMR Spectrum of Mumiamicin methyl ester in CDCl_3

Figure S2-1-20 HMBC Spectrum of Mumiamicin methyl ester in CDCl_3

BioNJ 423 sites J-C 1000 repl.

釜石 *Kibdelosporangium* 属

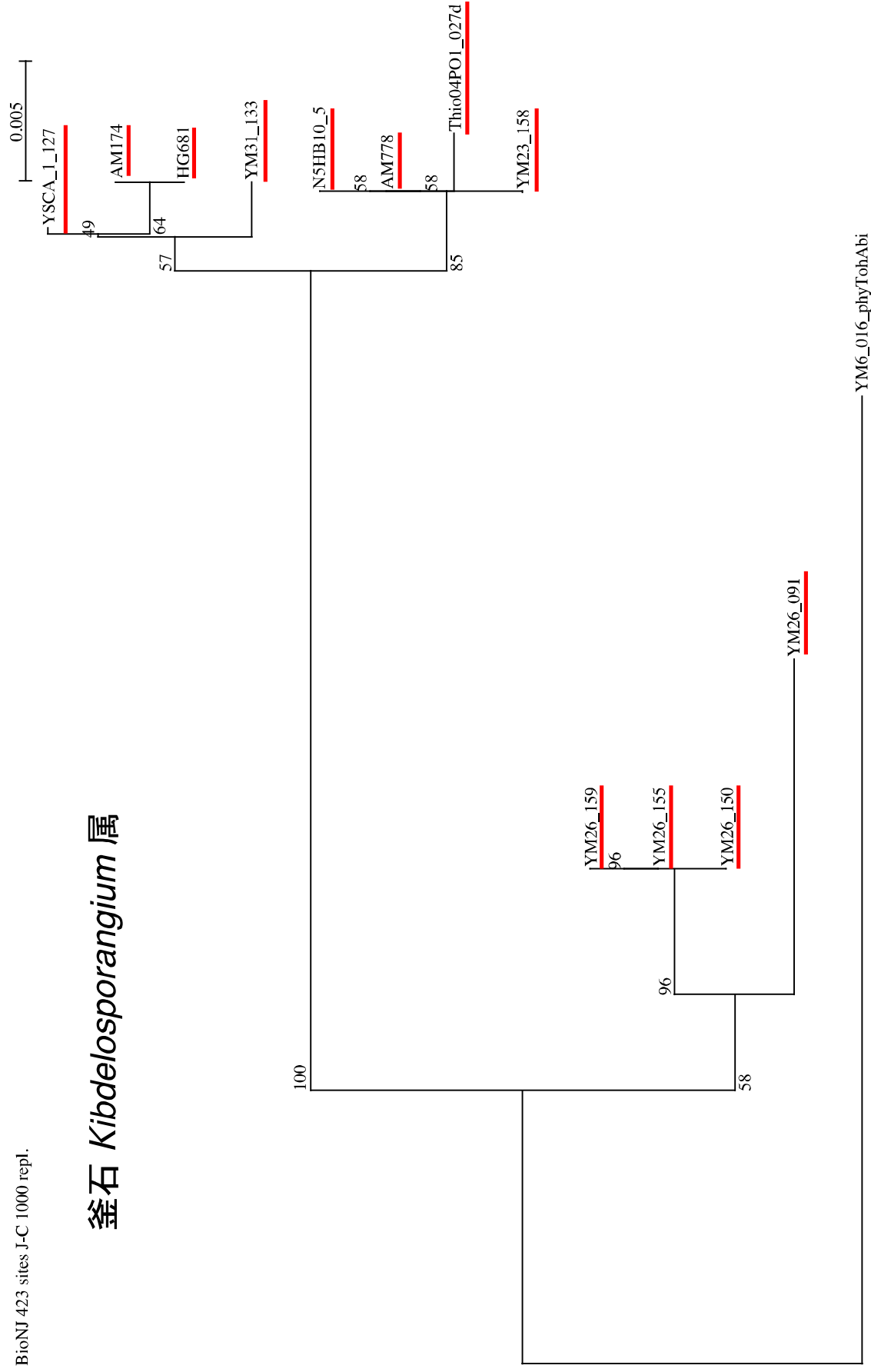


Figure S2-1-1 *Kibdelosporangium* 属の系統樹

BioNJ 407 sites J-C 100 repl.

釜石 *Micromonospora* 属

②

Figure S2-1-2 *Micromonospora* 属の系統樹

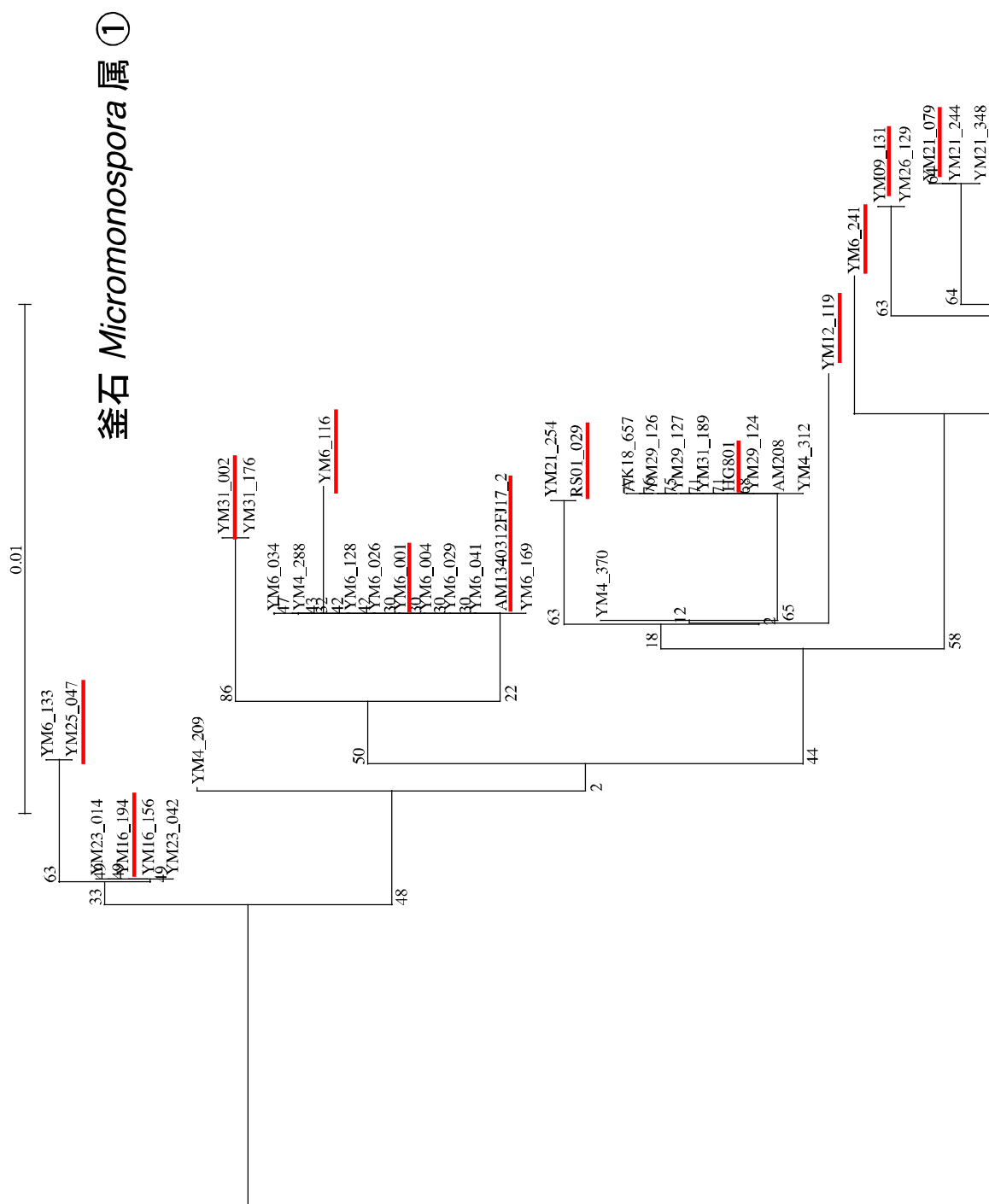
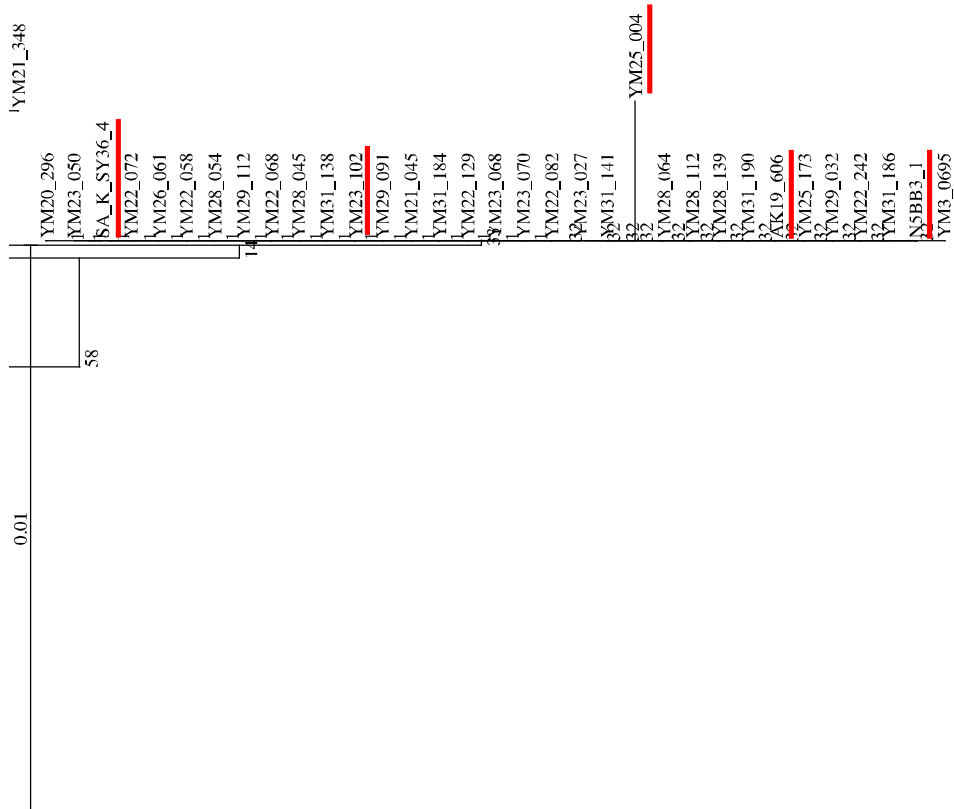


Figure S2-1-3 Figure S2-1-1①の拡大図



釜石 *Micromonospora* 属 ②

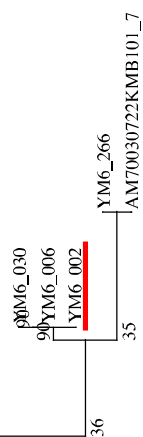


Figure S2-1-4 Figure S2-1-1②の拡大図

釜石 *Micromonospora* 属 ③

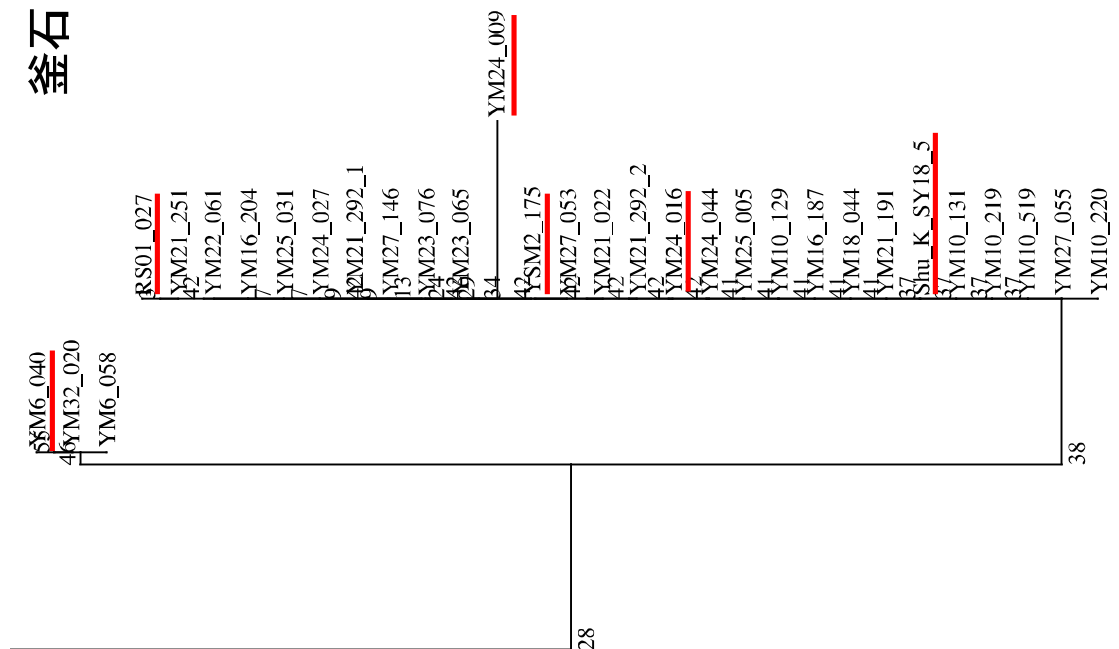


Figure S2-1-5 Figure S2-1-1③の拡大図

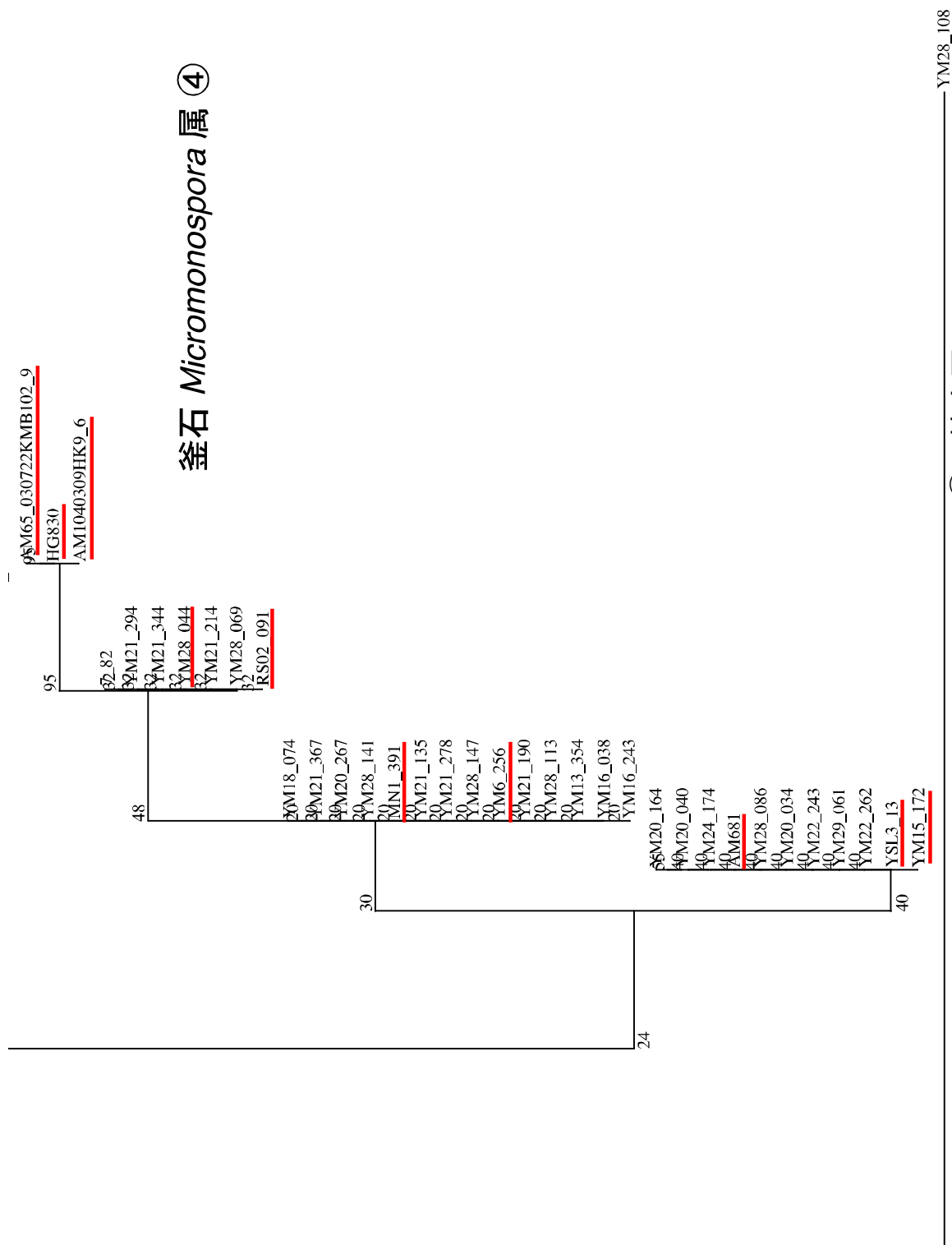


Figure S2-1-6 Figure S2-1-1④の拡大図

HUGO



0.005

釜石 *Pseudonocardia* 属

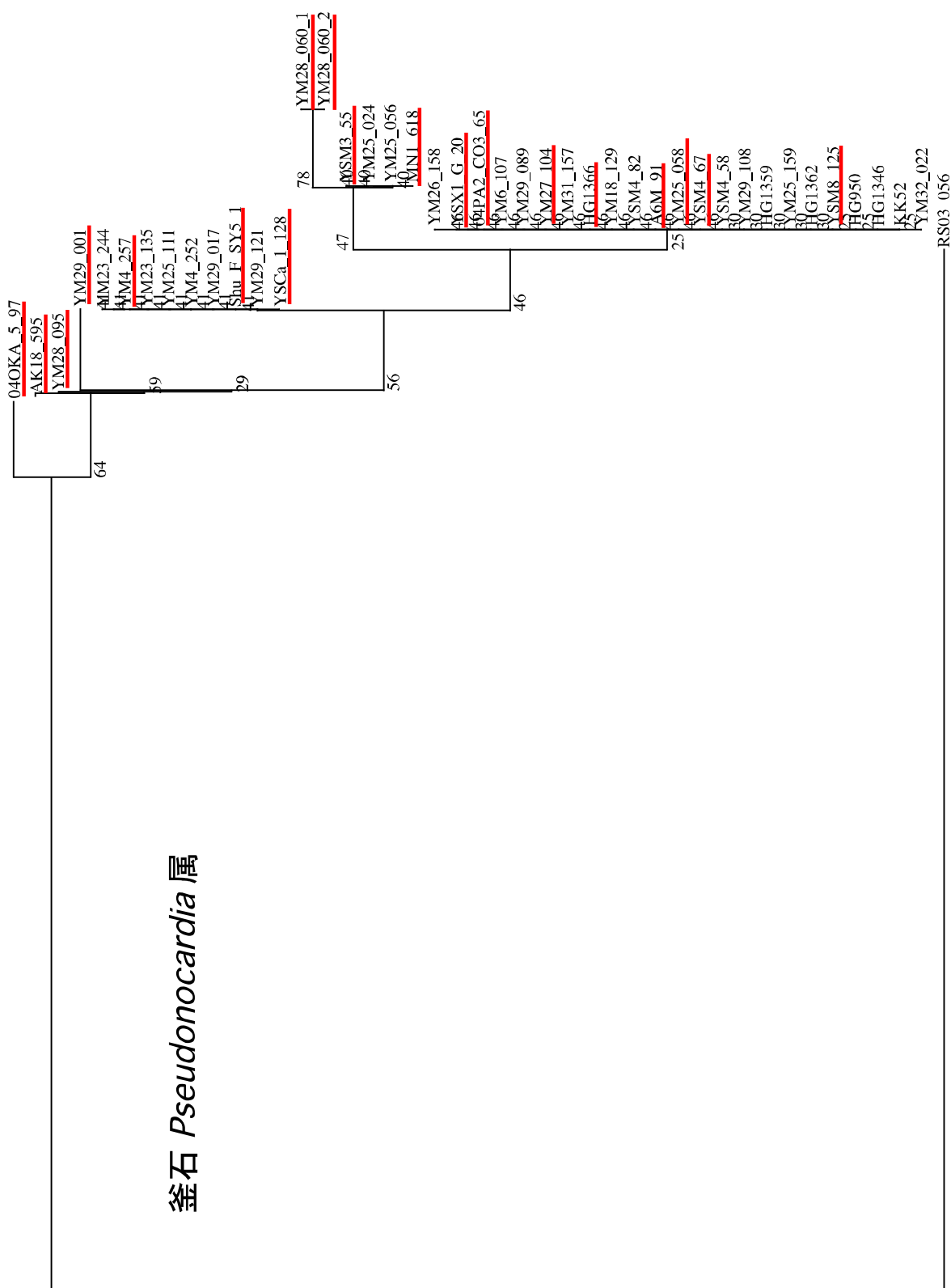


Figure S2-1-8 *Pseudonocardia* 属の系統樹

BioNJ 457 sites J-C 1000 repl.

釜石 *Streptoacidifilus* 属

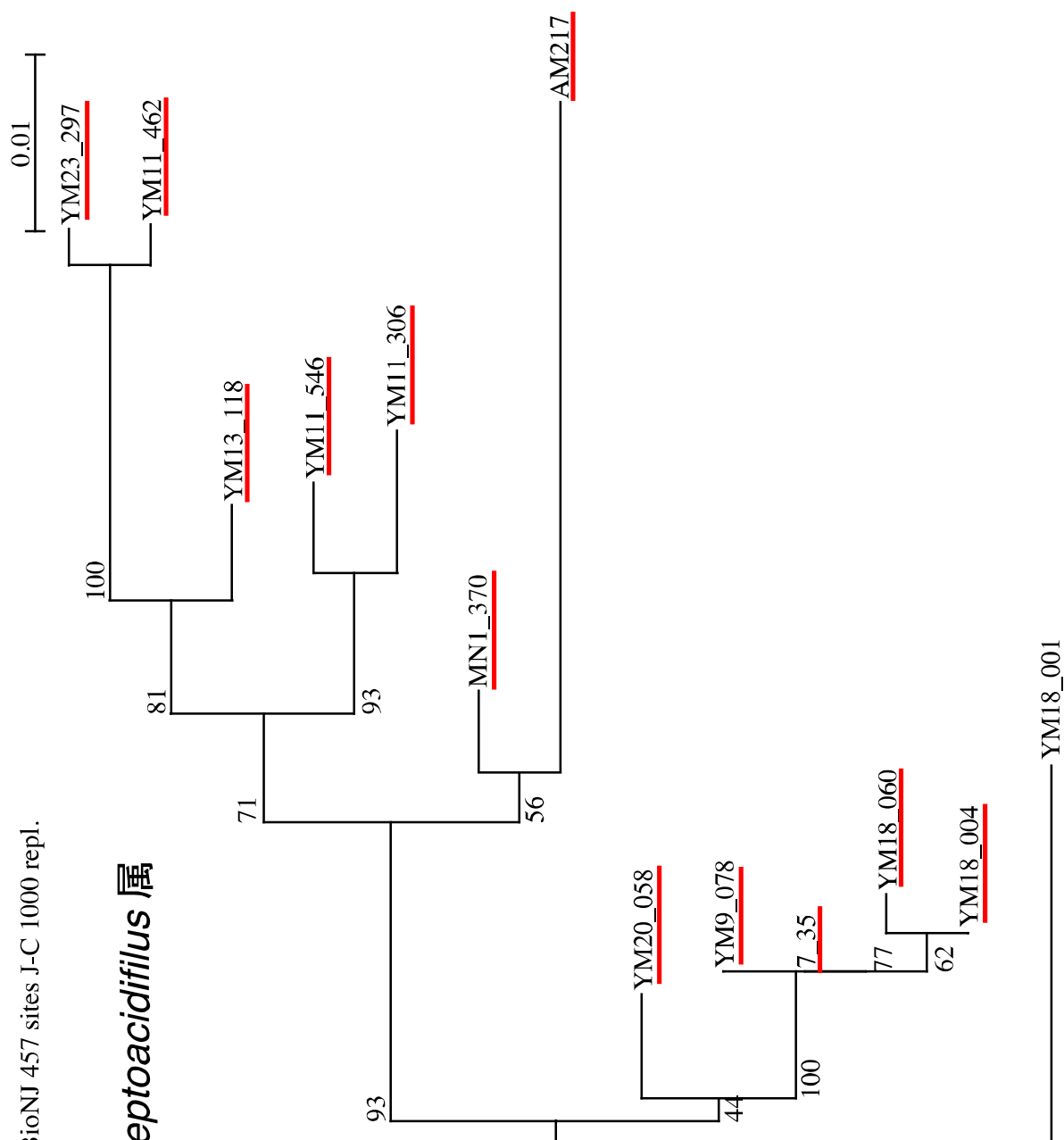


Figure S2-1-9 *Streptoacidifilus* 属の系統樹

BioNJ 462 sites J-C 1000 repl.

釜石 *Verrucosispora* 属

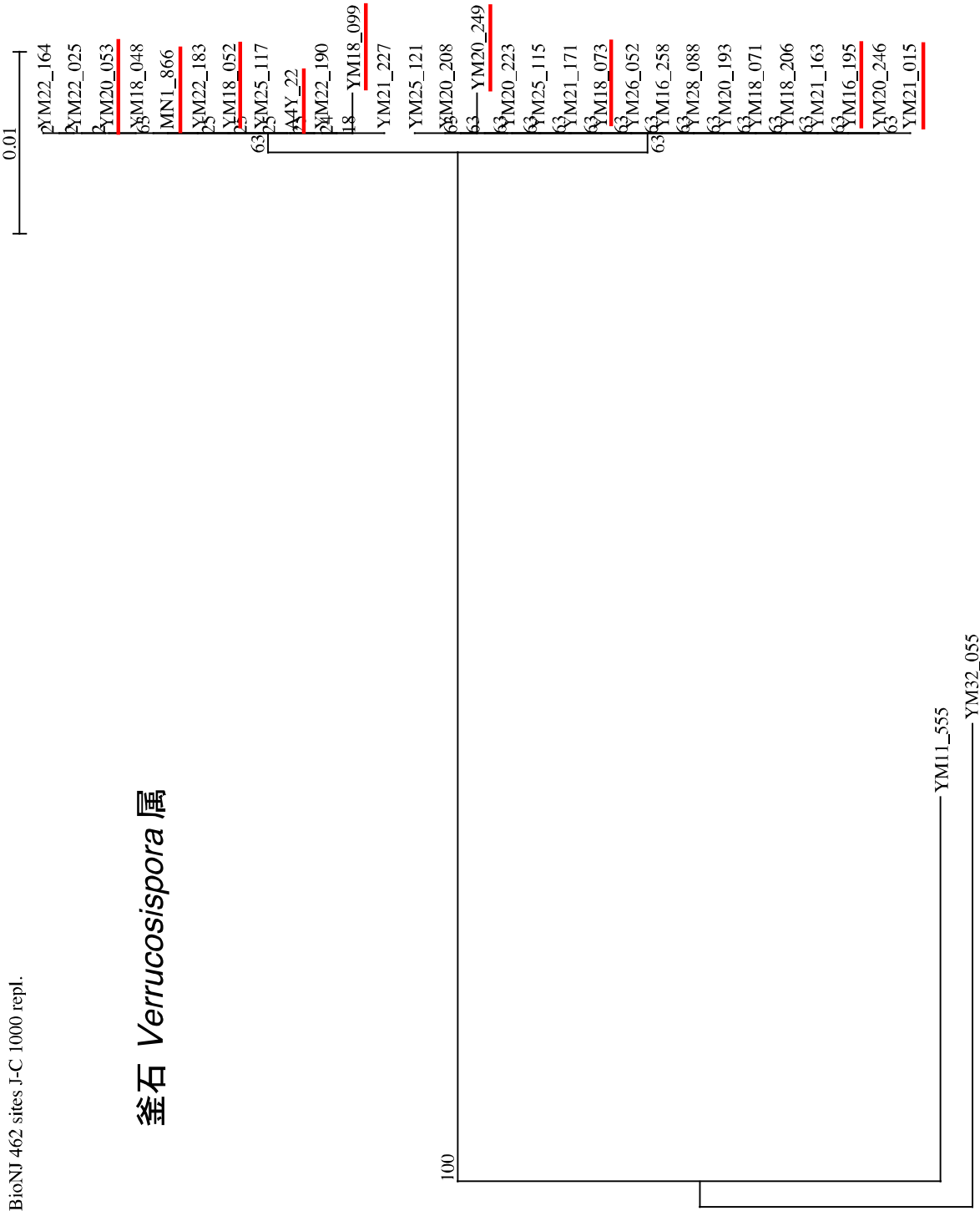


Figure S2-1-10 *Verrucosispora* 属の系統樹



Figure S2-1-11 *Rhodococcus* 属の系統樹

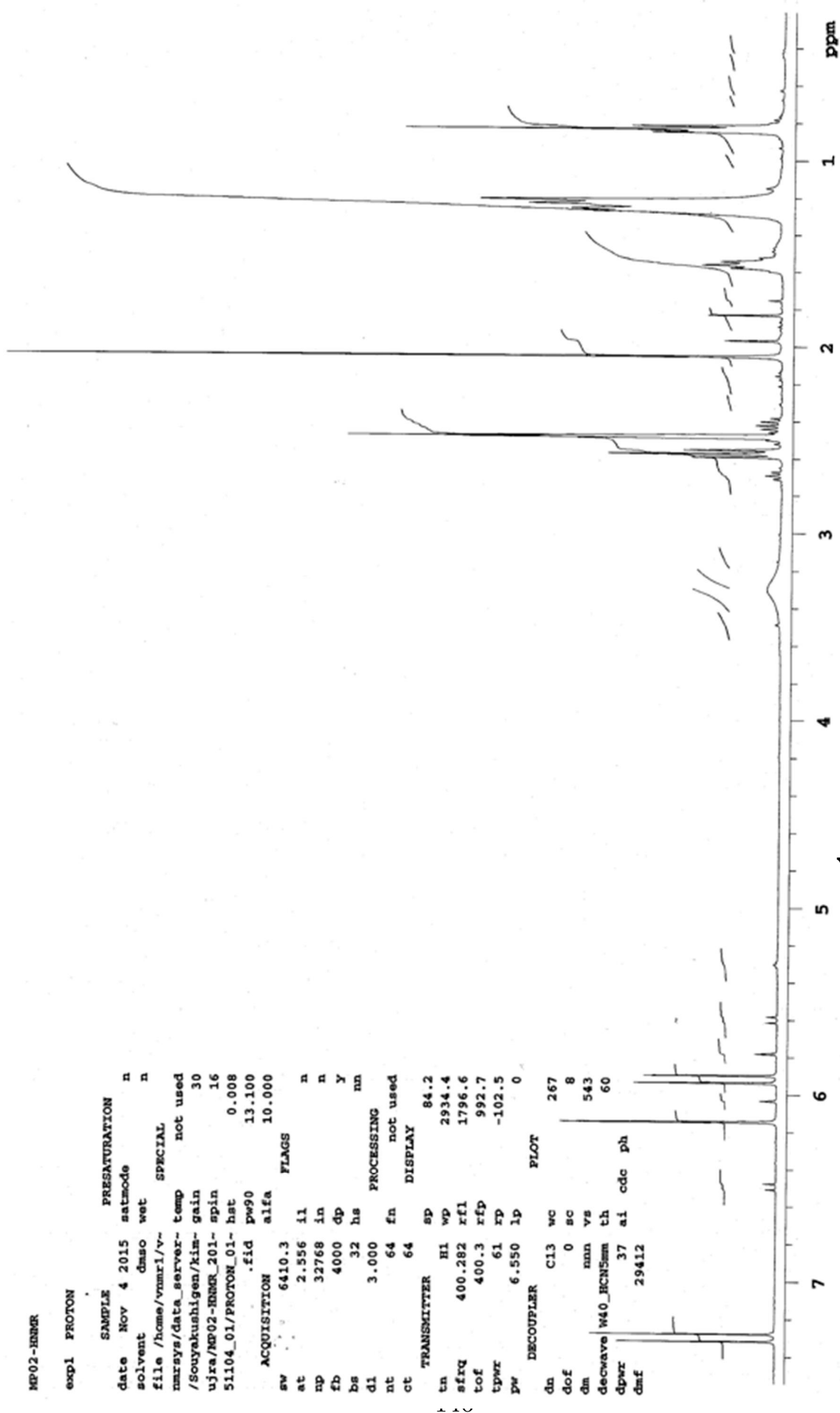


Figure S2-1-12 ¹H NMR Spectrum of Mumiamicin in CDCl₃

MP02-C_BC_QC_COSY

exp2 CARBON

```
SAMPLE      PRESATURATION
date Oct 28 2015 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file /home/vmar1/v- SPECIAL
narrays/data_server~ temp not used
/Souyakushigen/kim~ gain 30
ujra/MP02-C_BC_QC ~ spin 20
COSY_20151028_01/C~ hst 0.008
ARBON_01.fid pw90 11.312
ACQUISITION alfa 10.000
sw 24038.5 FLAGS
at 1.363 il n
np 65536 in n
fb 17000 dp y
bs 16 hs nn
d1 2.000 PROCESSING
nt 4096 lb 0.50
ct 4096 fn not used
TRANSMITTER DISPLAY
tn C13 sp -236.7
sfrq 100.660 wp 17818.3
tof 1029.4 rfl 9200.1
tpwr 57 rfp 7750.0
pw 5.656 xp -150.9
DECOUPLER lp 0
dn H1 FLOT
dof 0 wc 267
dm YYY sc 8
decwave w vs 253279
dpr 43 th 22
dmf 9757 ai cdc ph
```

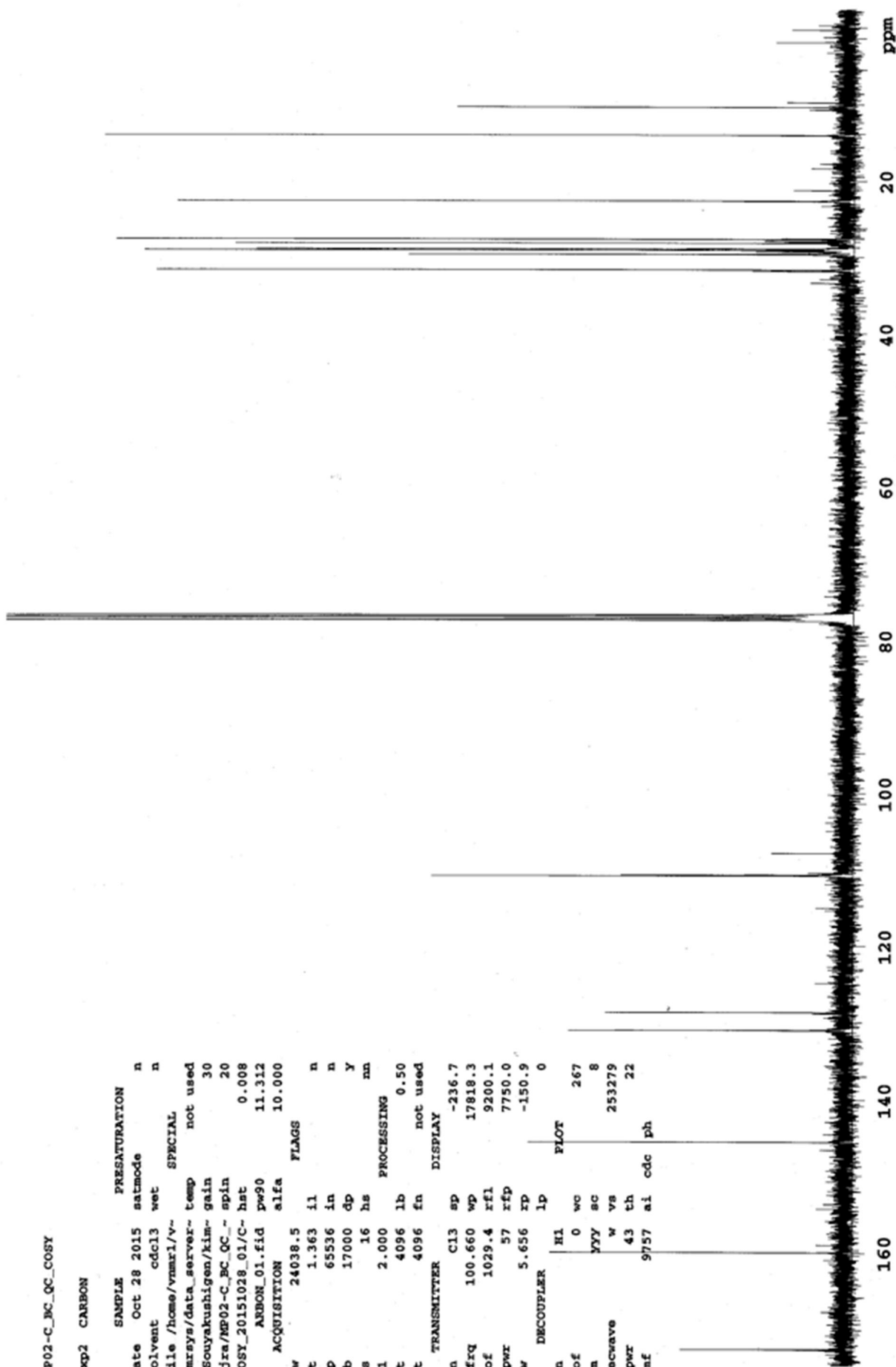


Figure S2-1-13 ¹³C NMR Spectrum of Mumiamicin in CDCl₃

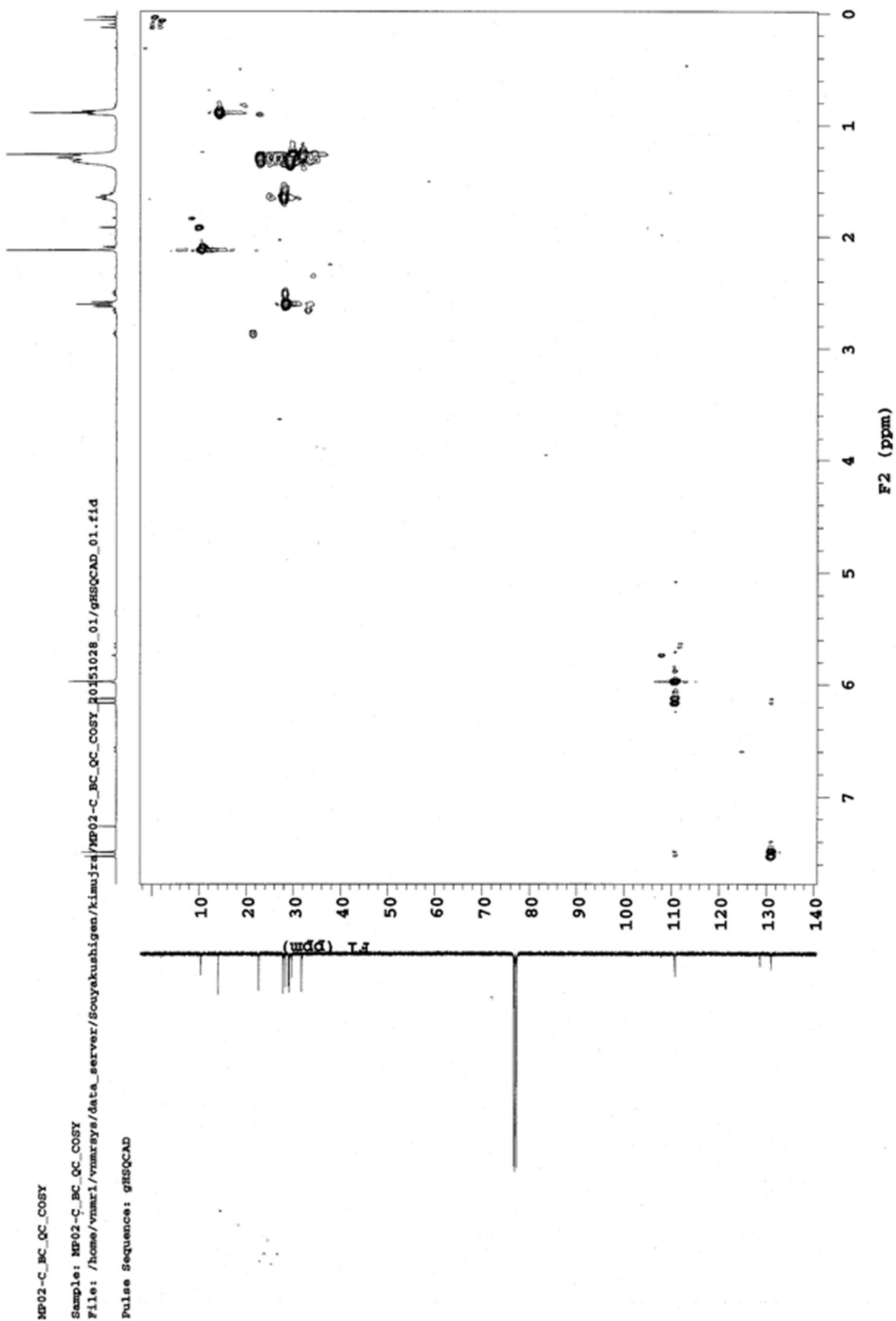
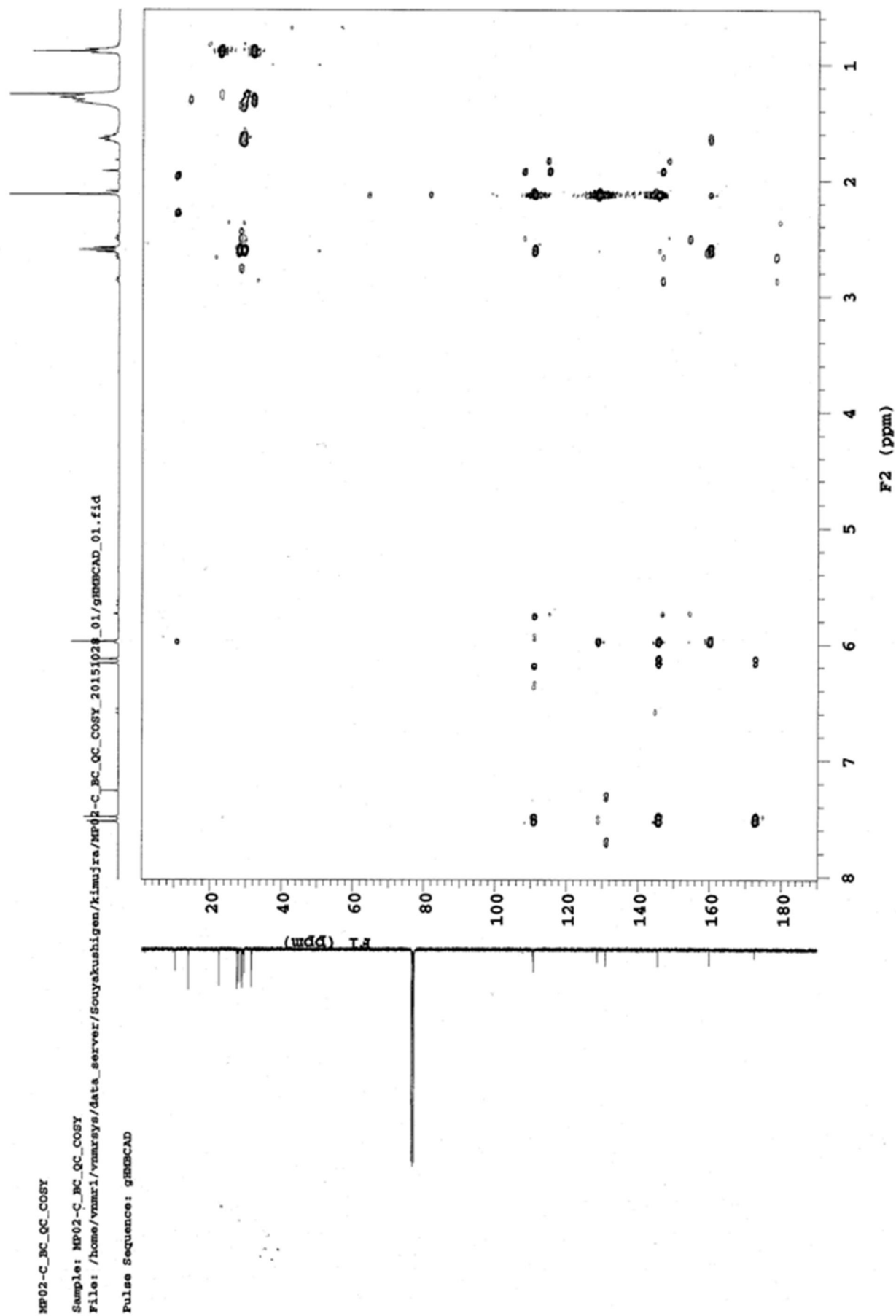


Figure S2-1-14 HSQC Spectrum of Mumiamicin in CDCl_3



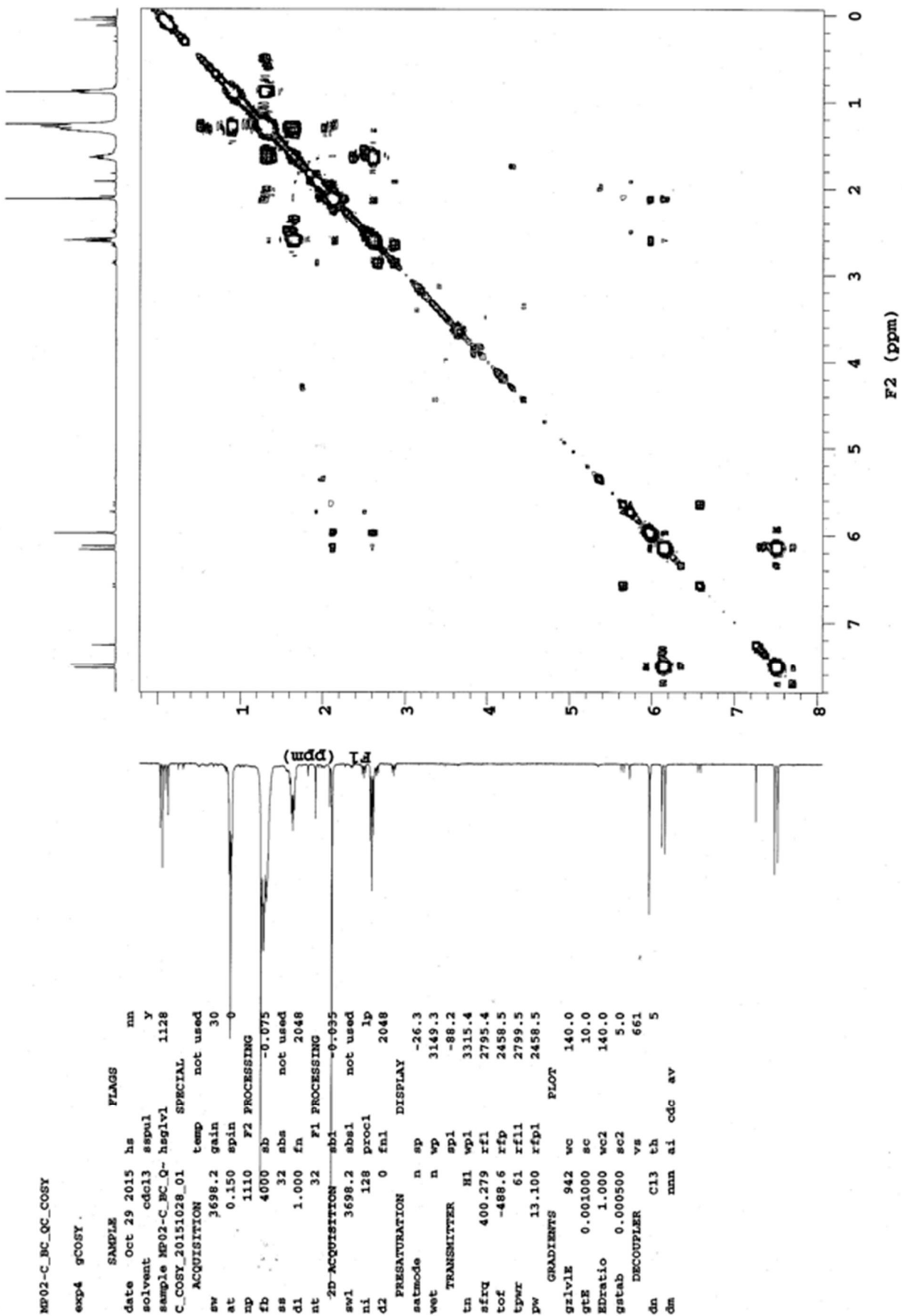


Figure S2-1-16 COSY Spectrum of Mumiamicin in CDCl₃

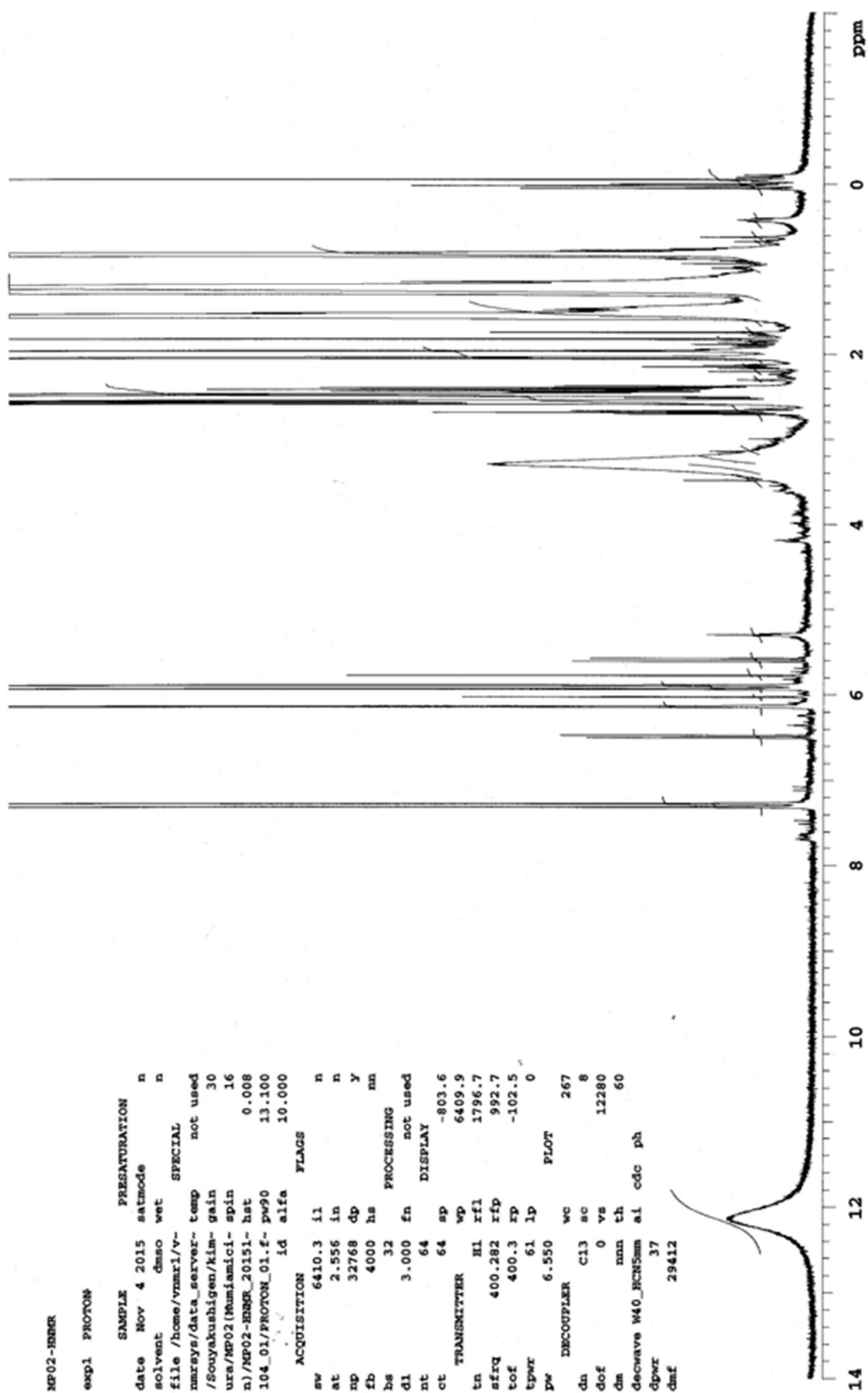


Figure S2-1-17 ^1H NMR Spectrum of Mumiamicin in $\text{DMSO}-d_6$

Procedures 1 Preparation of Mumiamicin methyl ester

Preparation of mumiamicin methyl ester

A solution of mumiamicin (2 mg) in benzene (200 μ L) was treated with 20 μ L TMSCHN₂ (10% by wt in hexane). After over night at room temperature, the solution was evaporated to dryness. The residue obtained was purified by preparative HPLC (95% MeOH aq. contain 0.1% formic acid) to give 1 mg of methyl ester as an oil.

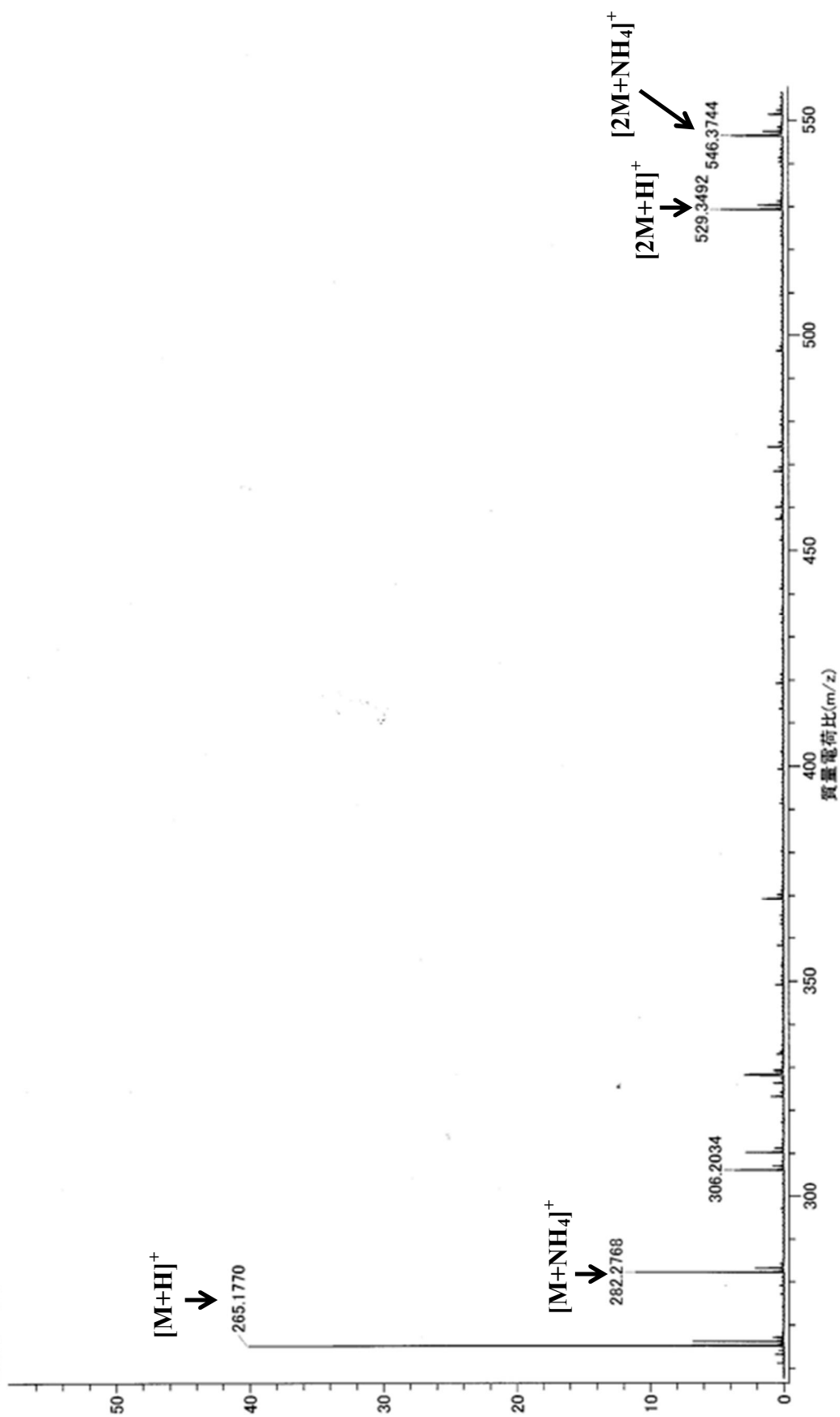


Figure S2-1-18 LC/MS spectrum of Mumiamicin methyl ester

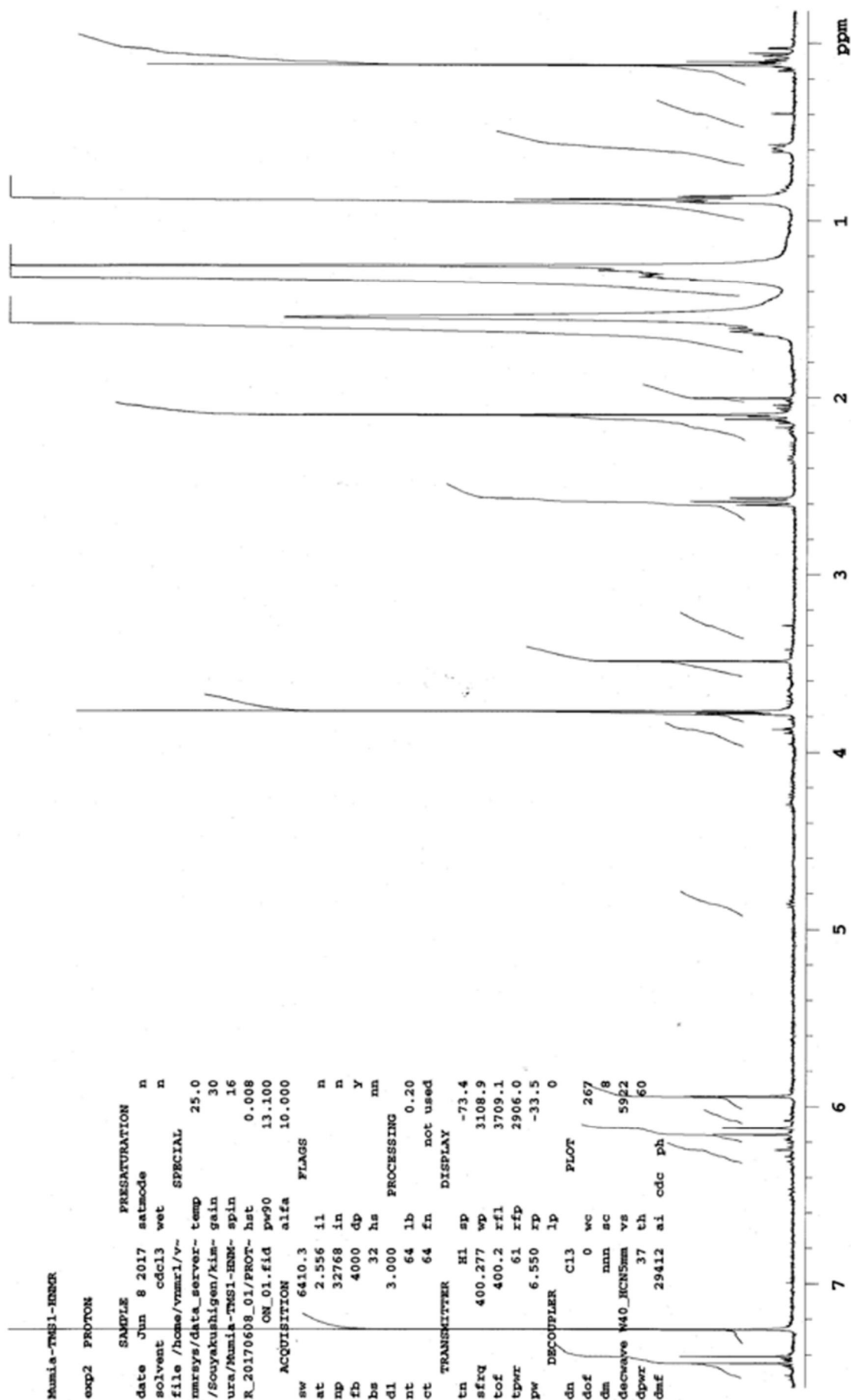


Figure S2-1-19 ¹H NMR Spectrum of Mumiamicin methyl ester in CDCl₃

Mumiamicin-TMS1-HMBC

Sample: Mumiamicin-TMS1-HMBC

File: /home/vnmr1/vnmr3/varsys/data_server/Souyakushigen/Kimura/Mumiamicin-TMS1-HMBC_20170608_01/gHMBCAD_01.fid

Pulse Sequence: gHMBCAD

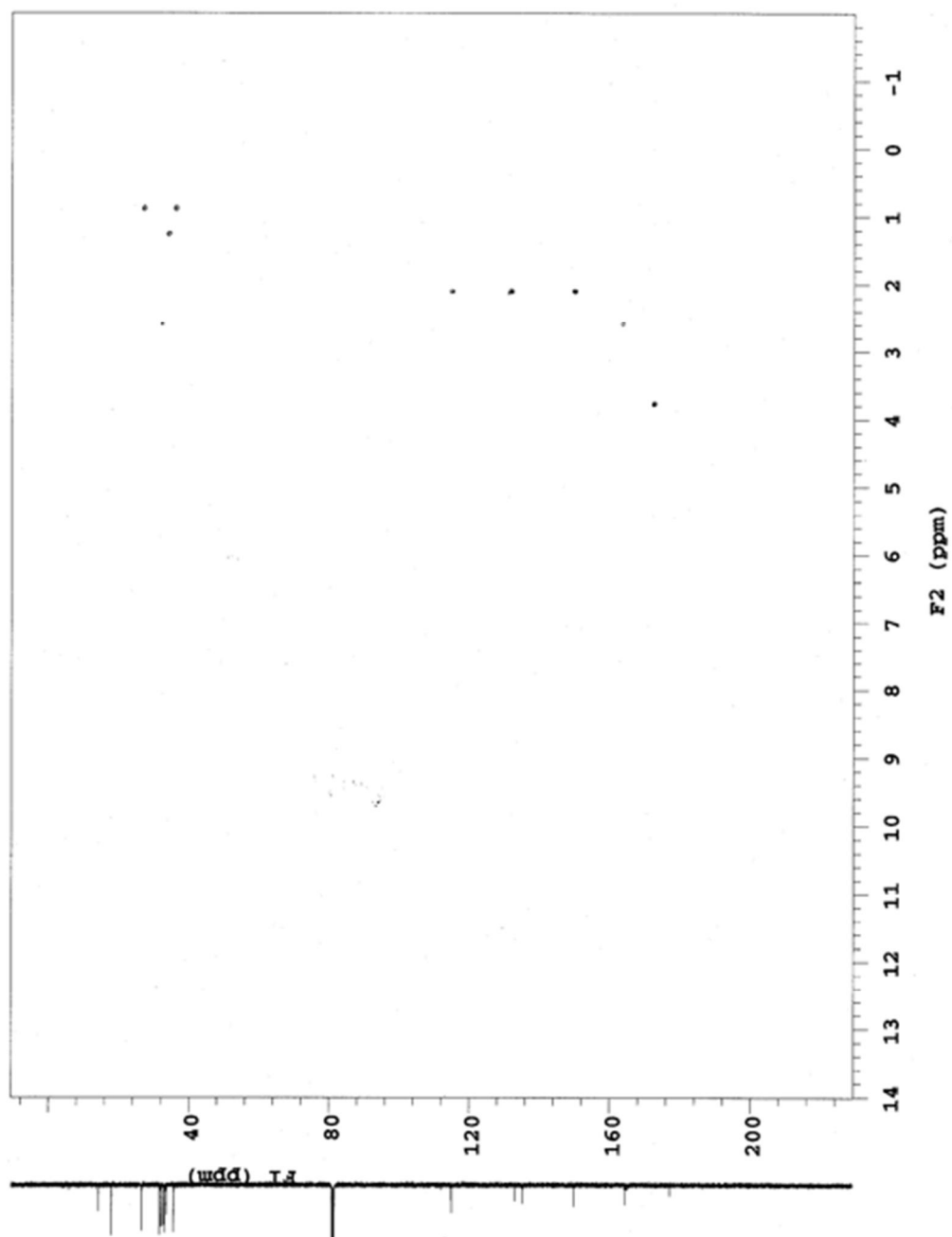


Figure S2-1-20 HMBC Spectrum of Mumiamicin methyl ester in CDCl₃

第2節 Tatemasporine に関する研究

Figure S2-2-1 ^1H NMR Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-2 ^{13}C NMR Spectrum of tatemasporine at 200 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-3 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-4 $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HSQC Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-5 $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-6 $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ HMBC Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-7 COSY Spectrum of tatemasporine at 400 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

Figure S2-2-8 ^1H selective ROESY of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO-}d_6$

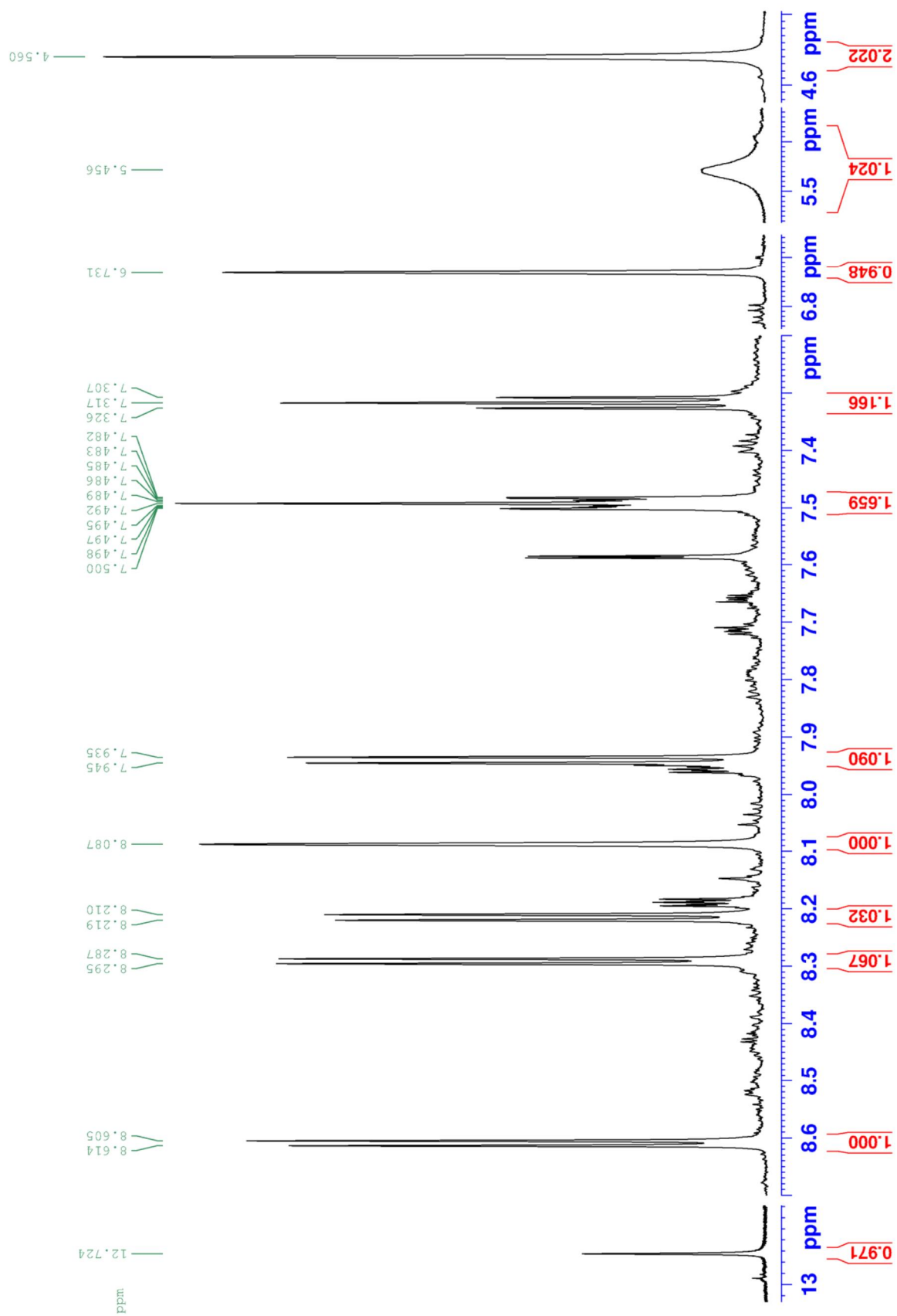


Figure S2-2-1 ¹H NMR Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in DMSO-*d*₆

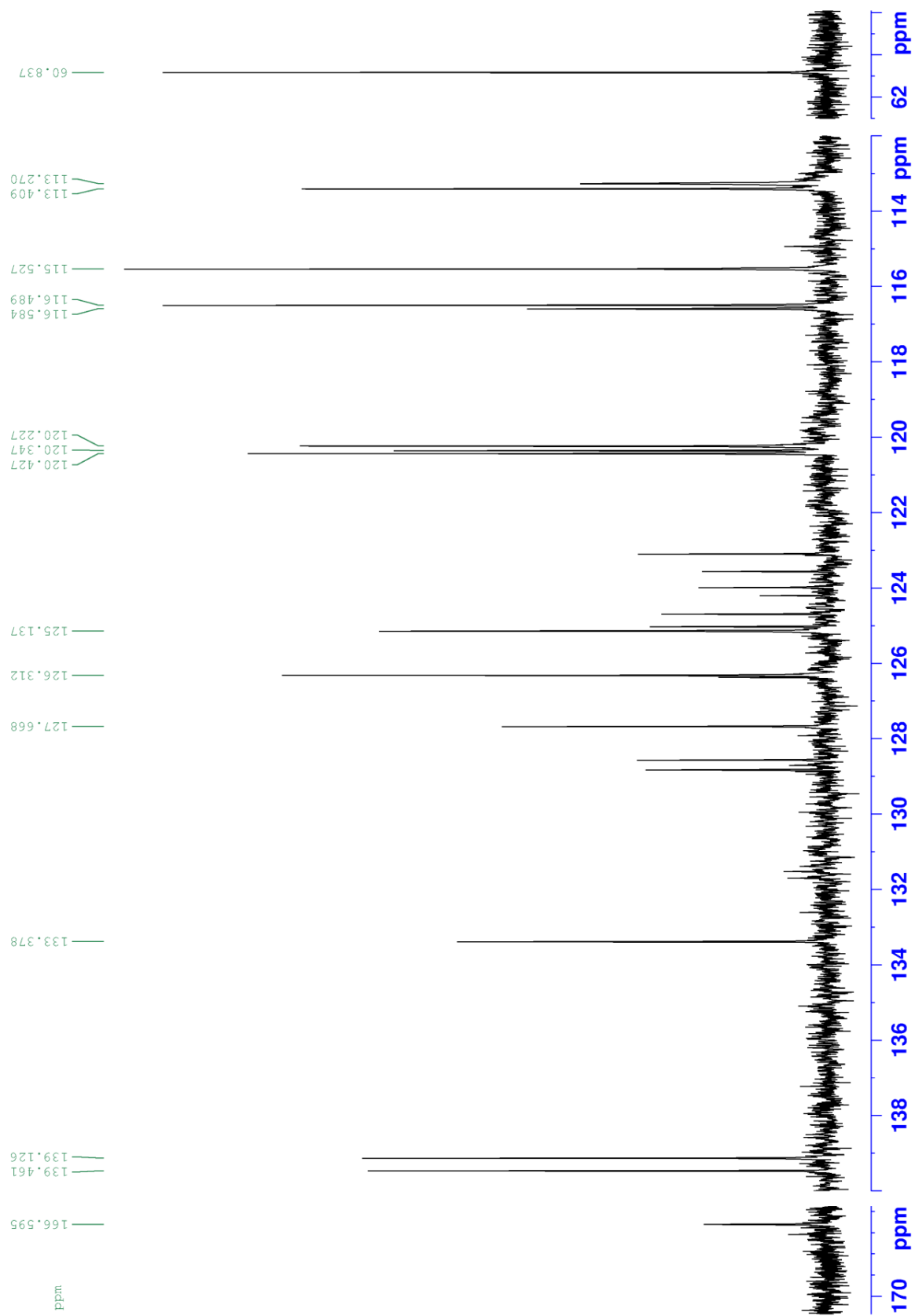


Figure S2-2-2 ¹³C NMR Spectrum of tatemasporine at 200 MHz in DMSO-*d*₆

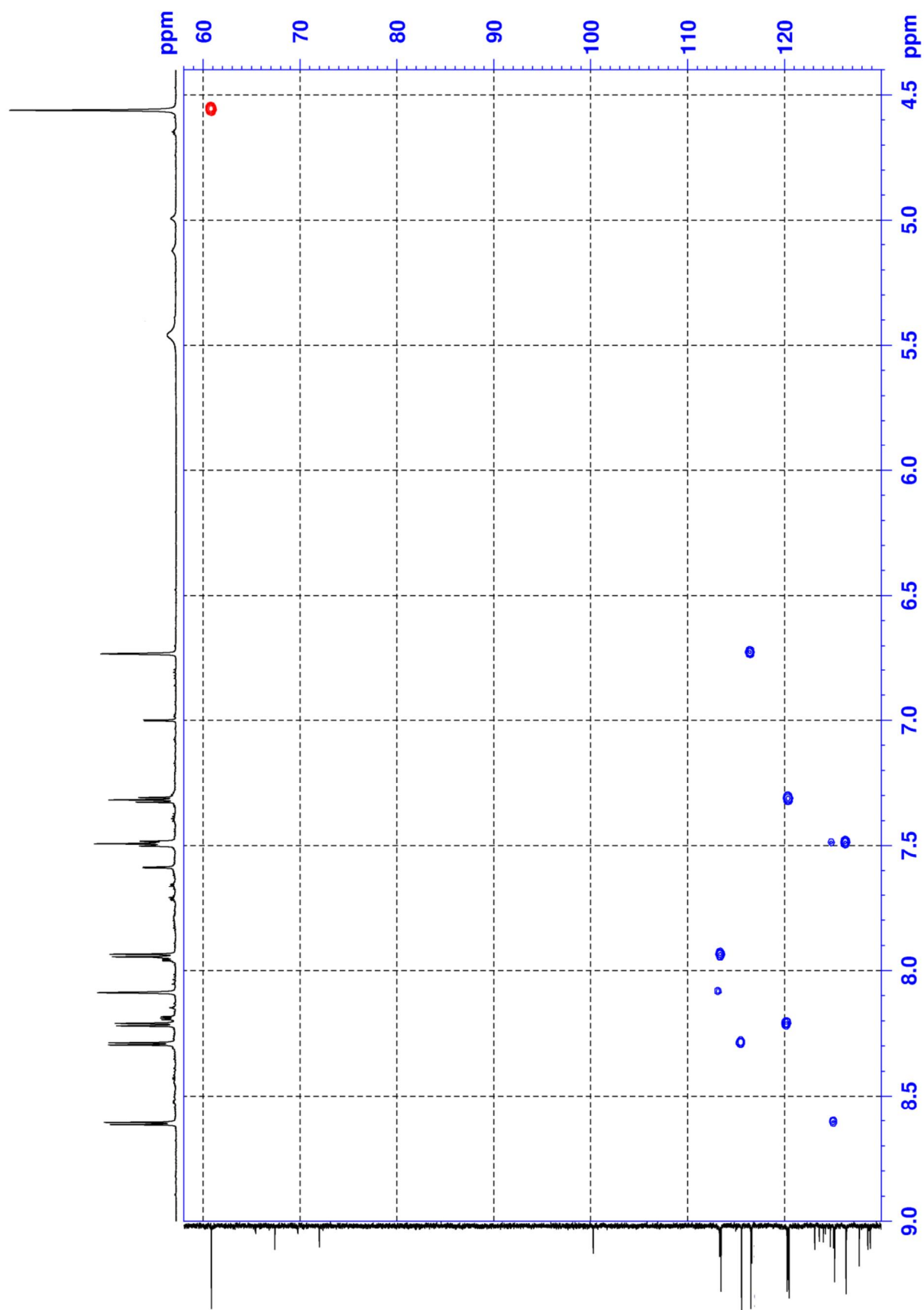


Figure S2-2-3 ^1H - ^{13}C HSQC Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO}-d_6$

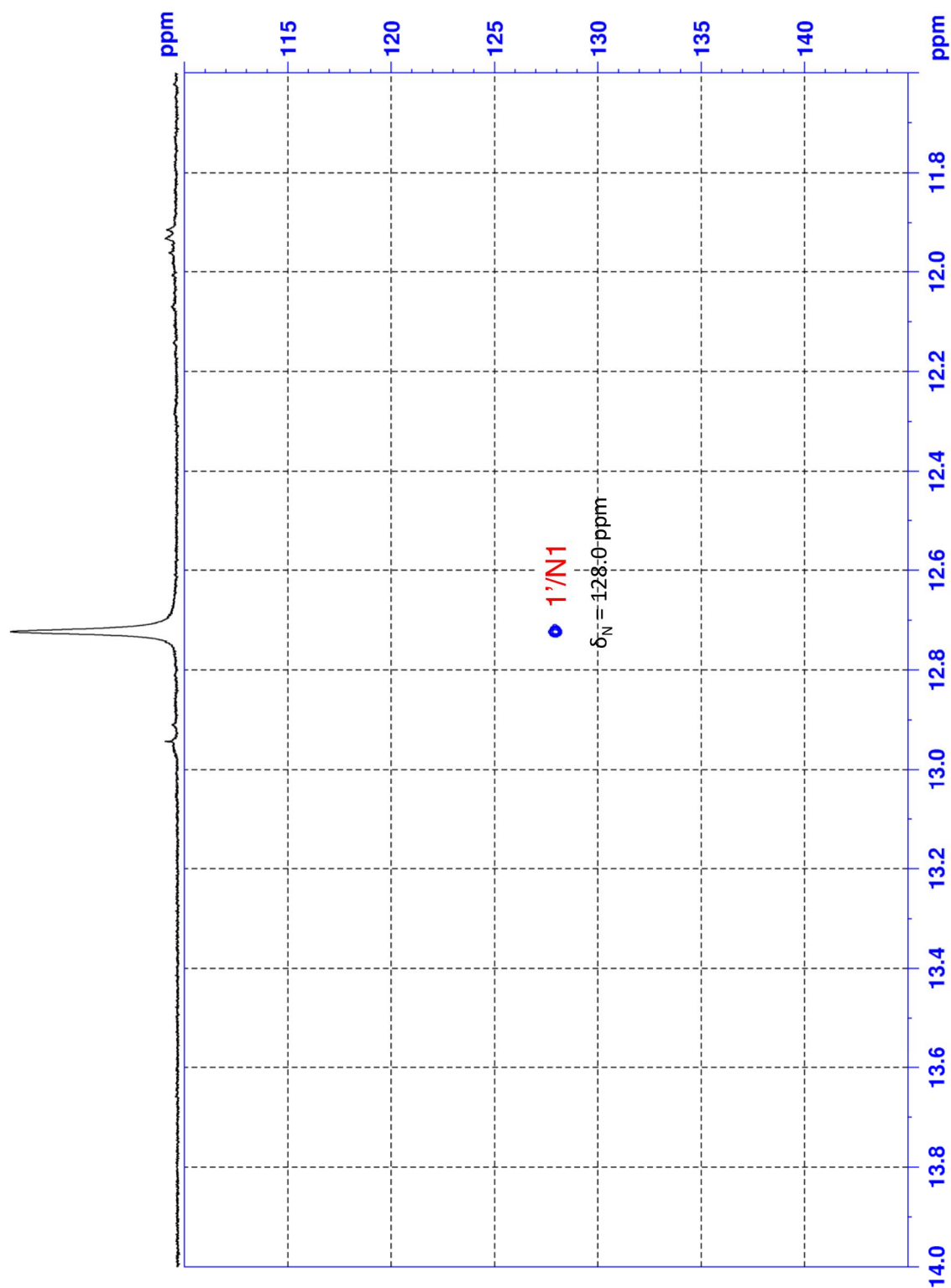
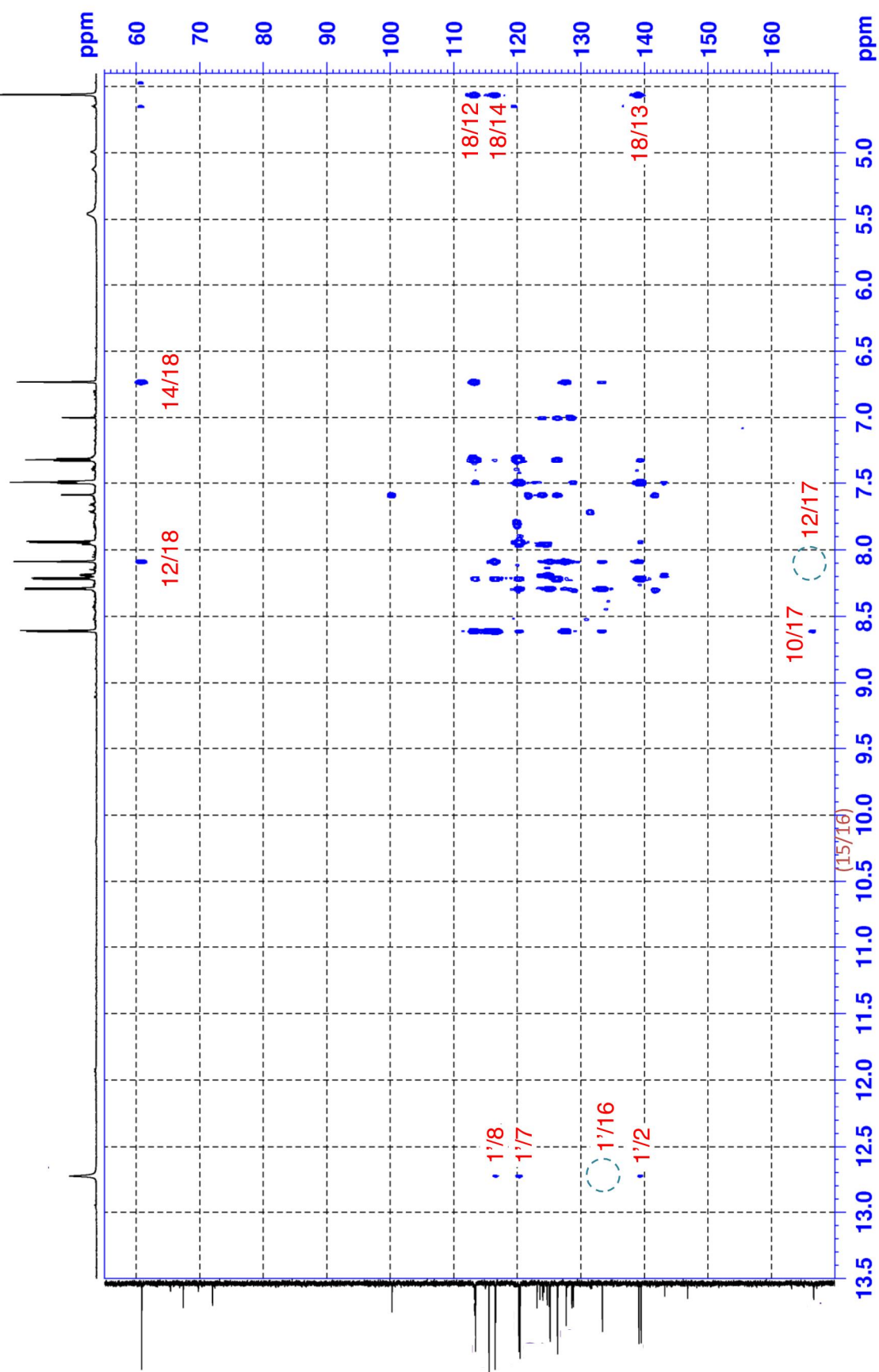


Figure S2-2-4 ^1H - ^{15}N HSQC Spectrum of tatemaspiorine at 800 MHz in $\text{DMSO}-d_6$

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ HMBC



9

※ は contour level を下げると 見える シグナル

radashima800M01.106.1

Figure S2-2-5 ^1H - ^{13}C HMBC Spectrum of tatemasporine at 800 MHz in $\text{DMSO}-d_6$

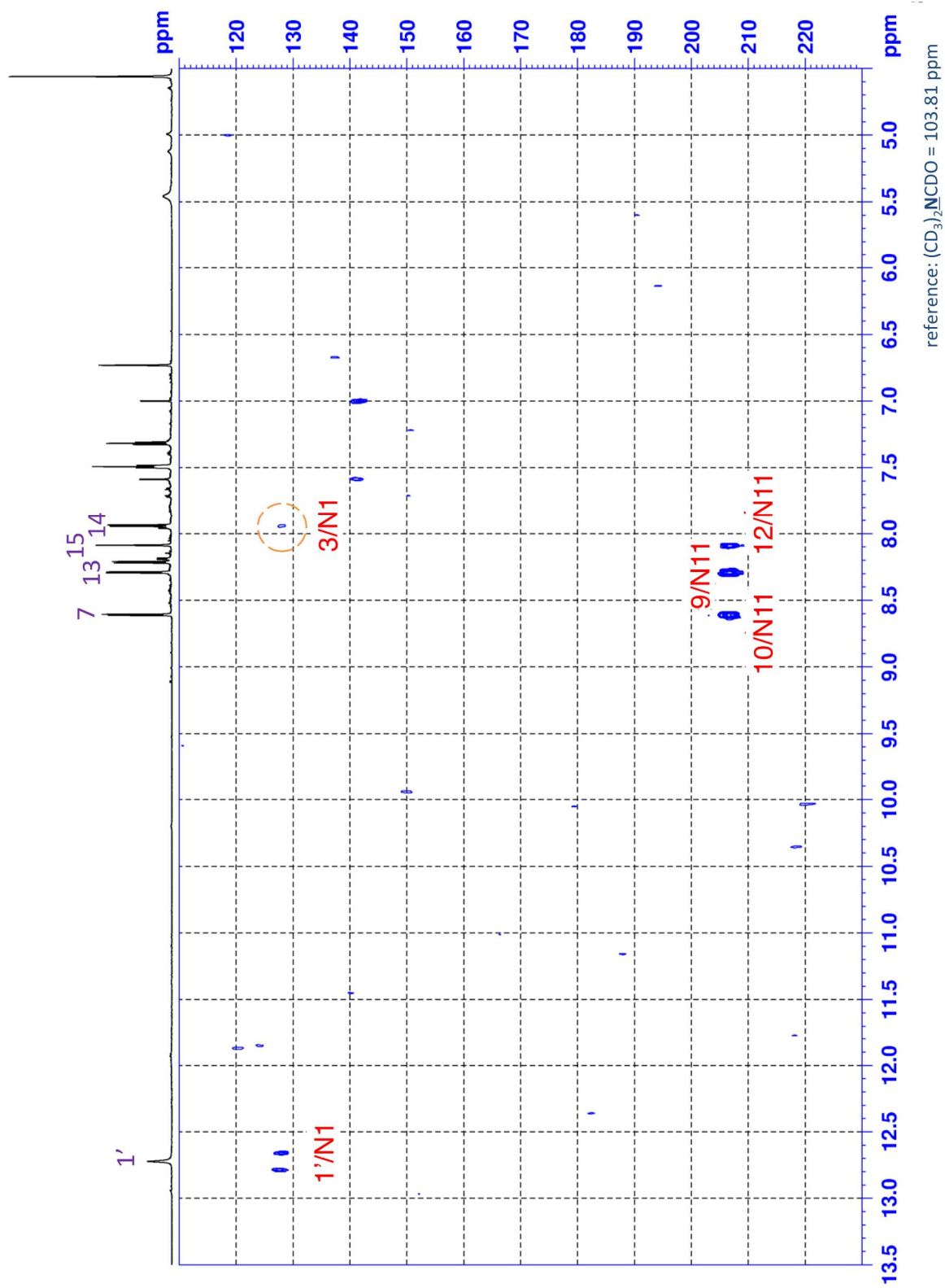


Figure S2-2-6 ^1H - ^{15}N HMBC Spectrum of tatemaspiorine at 800 MHz in DMSO- d_6

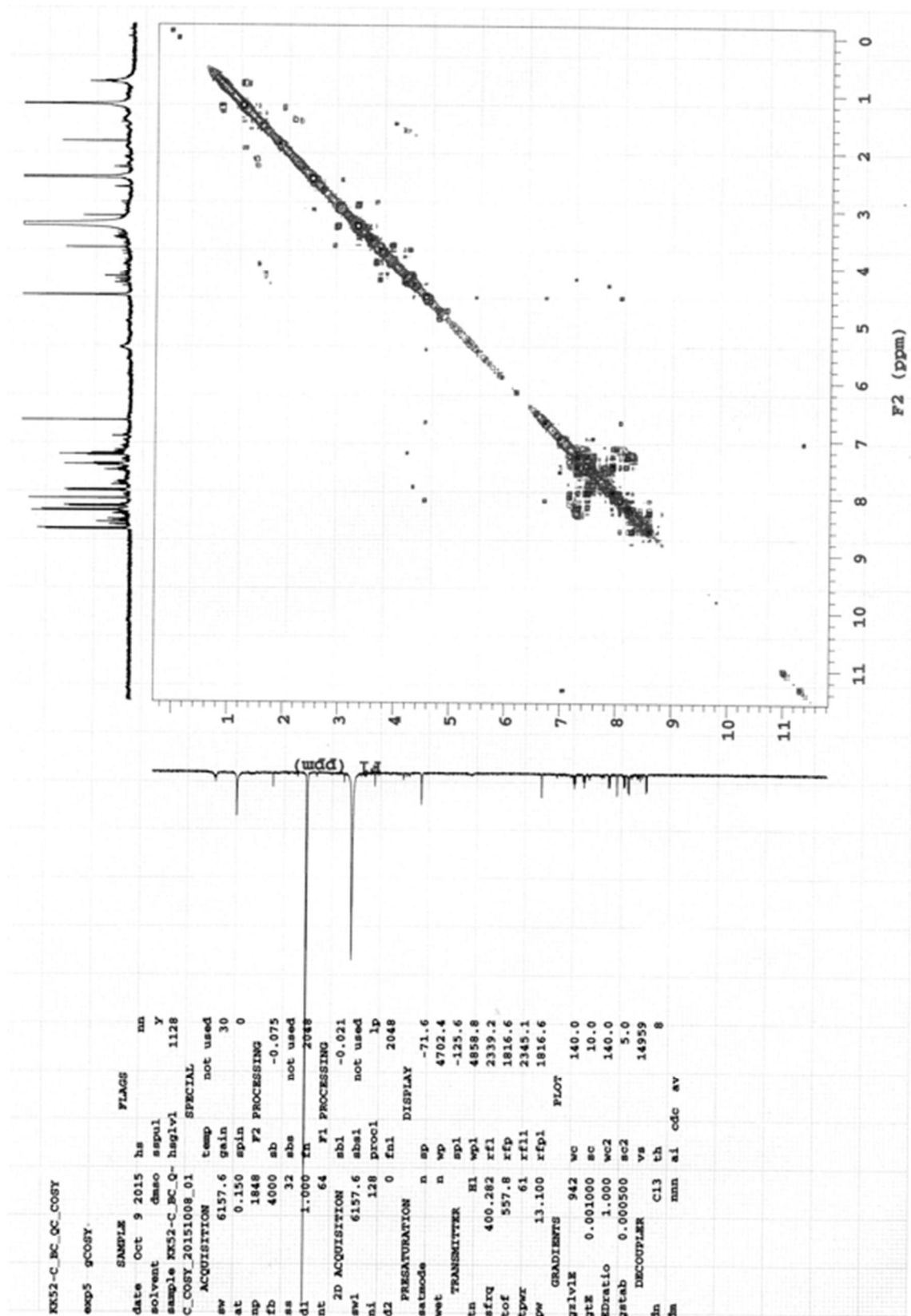


Figure S2-2-7 COSY Spectrum of tatemaspiorine at 400 MHz in DMSO- d_6

^1H selective ROESY (spin lock: 200 msec)

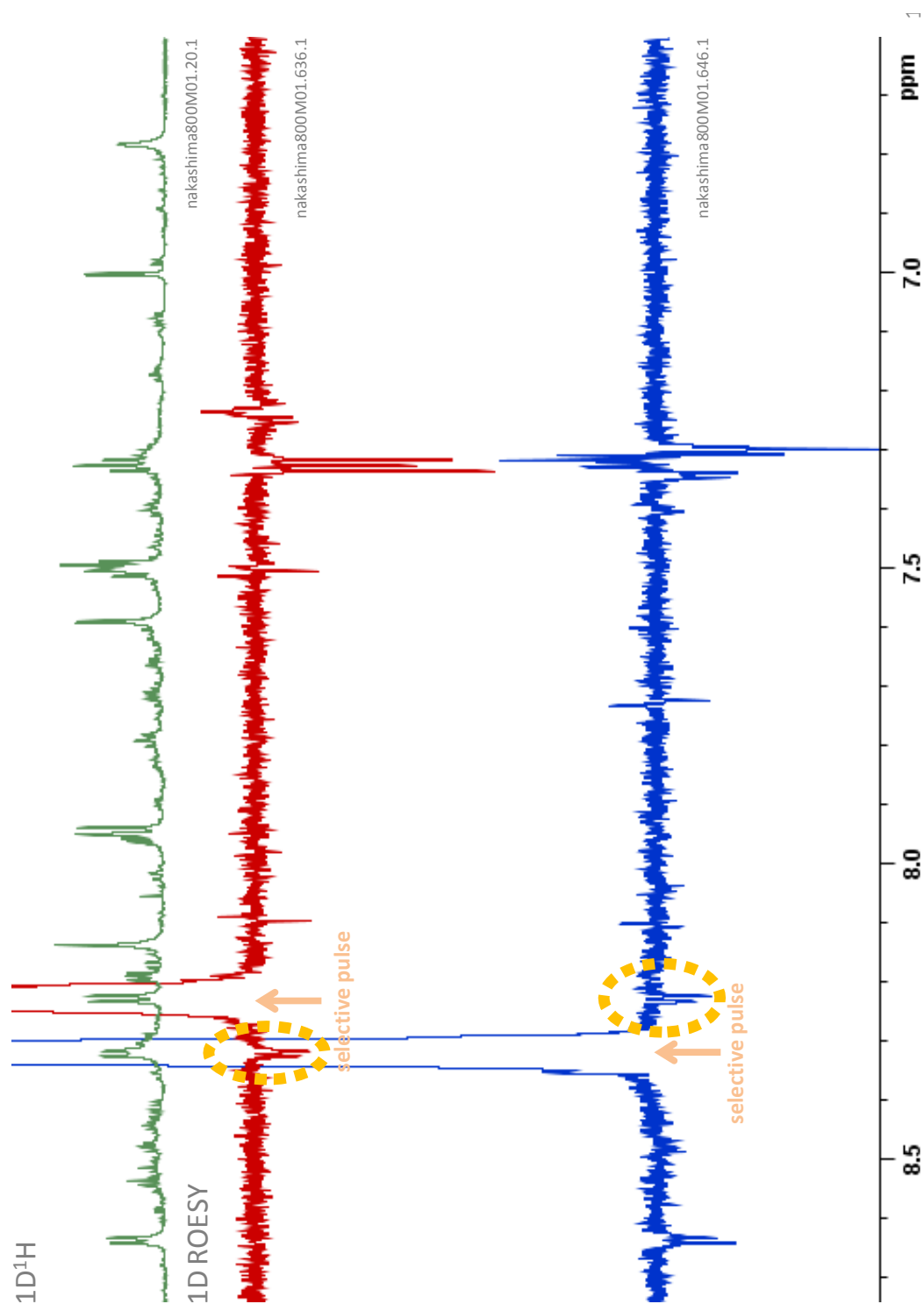


Figure S2-2-8 ^1H selective ROESY of tatemaspiorine at 800 MHz in $\text{DMSO}-d_6$

第3章 北里生命科学研究所保有菌株を用いた新規物質の探索

第1節 Vitrantmycin B および C に関する研究

Figure S3-1-1 ^1H NMR Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-2 ^{13}C NMR Spectrum of virantmycin B at 100 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-3 HSQC Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-4 HMBC Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-5 COSY Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-6 ROESY Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-7 ^1H NMR Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-8 ^{13}C NMR Spectrum of virantmycin C at 100 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-9 HSQC Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-10 HMBC Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-11 COSY Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

Figure S3-1-12 ROESY Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

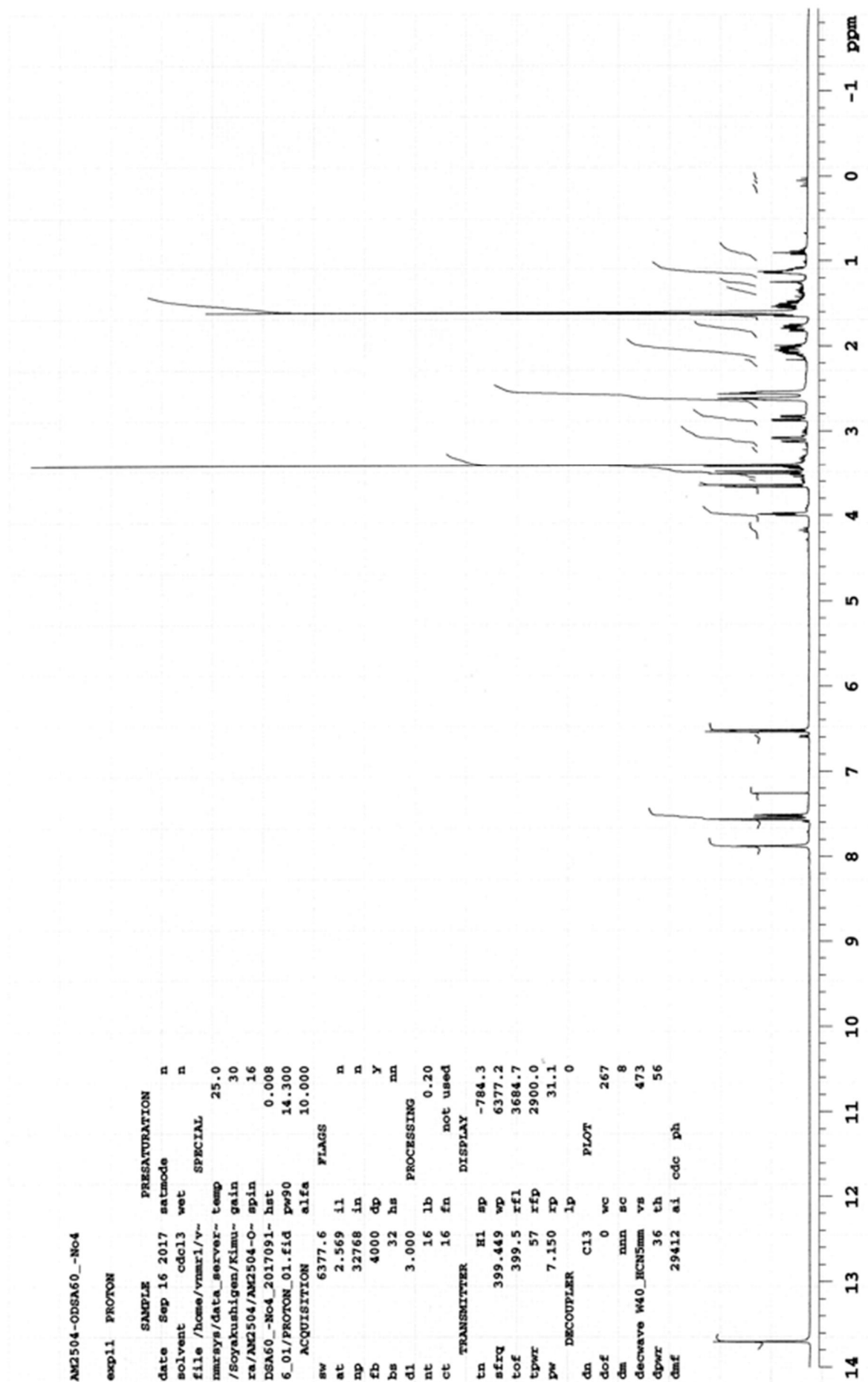


Figure S3-1-1 ^1H NMR Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

AM2504-ODS60_-No4-ALL

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Sep 11 2017	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	/home/vmr1/v-	SPECIAL	
mrssys/data_server-temp	25.0		
/Soyakushigen/Kimu-gain	30		
re/AM2504-ODS60_-N-spin	20		
o4-ALL_20170911_01-hst	0.008		
/CARBON_01.fid	pw90	11.588	
ACQUISITION	alfa	10.000	
sw	24038.5	FLAGS	
at	1.363	il	n
rp	65536	in	n
fb	17000	dp	y
bs	16	hs	nn
d1	2.000	PROCESSING	
nt	4096	lb	0.50
ct	4096	fn	not used
TRANSMITTER			
tn	C13	sp	-1471.3
sfrq	100.452	wp	24037.7
tof	1027.2	rf1	9206.0
tpwr	56	rfp	7734.0
pw	5.794	rp	-57.5
DECOUPLER			
dn	H1	lp	0
dof	0	wc	267
dm	Y77	sc	8
decwave	w	vs	316076
dpcw	40	th	17
dmf	9662	ai	cdc ph

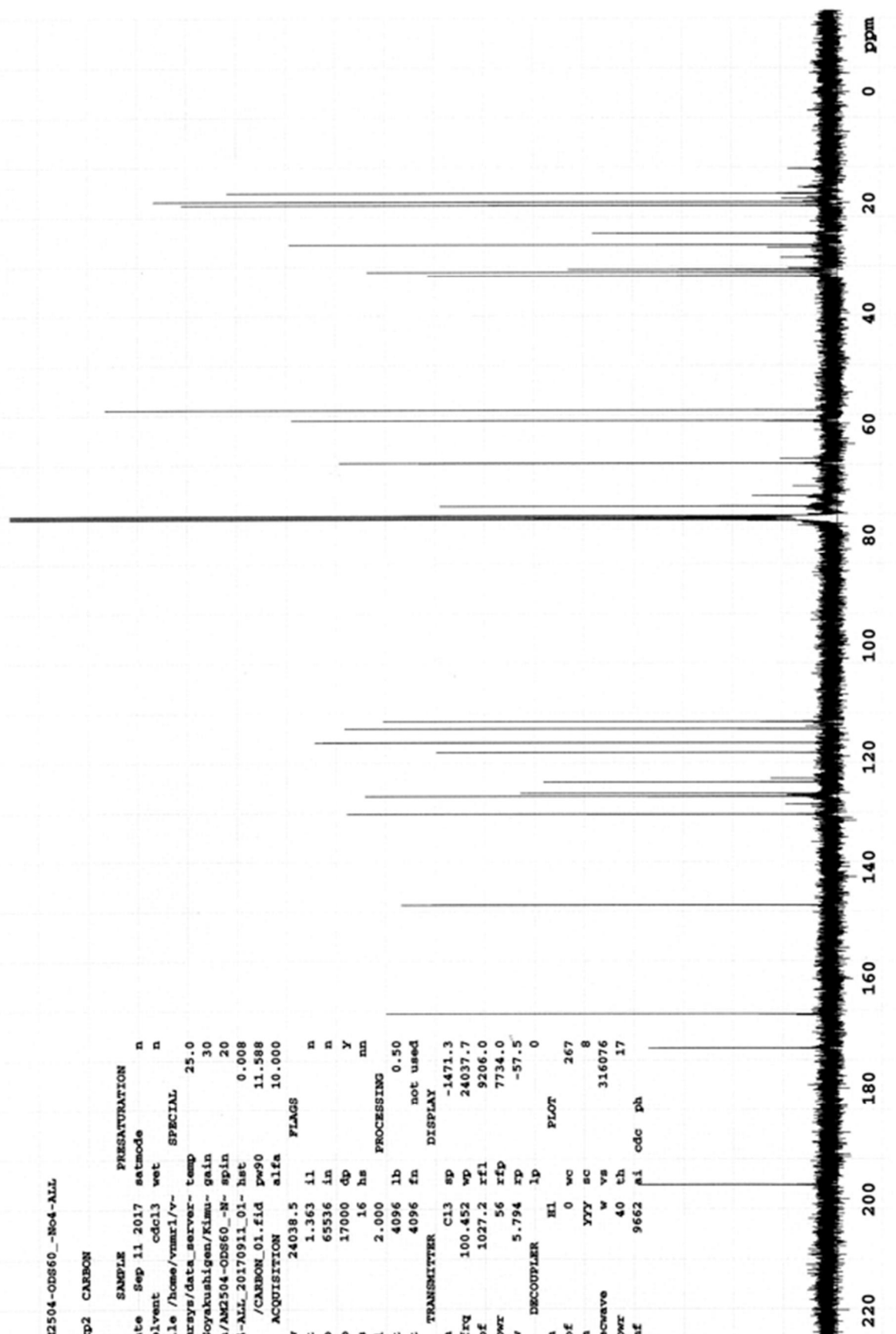


Figure S3-1-2 ^{13}C NMR Spectrum of virantmycin B at 100 MHz in CDCl_3

AM2504-ODS60_-No4-ALL

Sample: AM2504-ODS60_-No4-ALL

File: /home/vmr1/vmr1s/data_server/Soyakushigen/Kimura/AM2504-ODS60_-No4-ALL_20170911_01/gHSQCAD_01.fid

Pulse Sequence: gHSQCAD

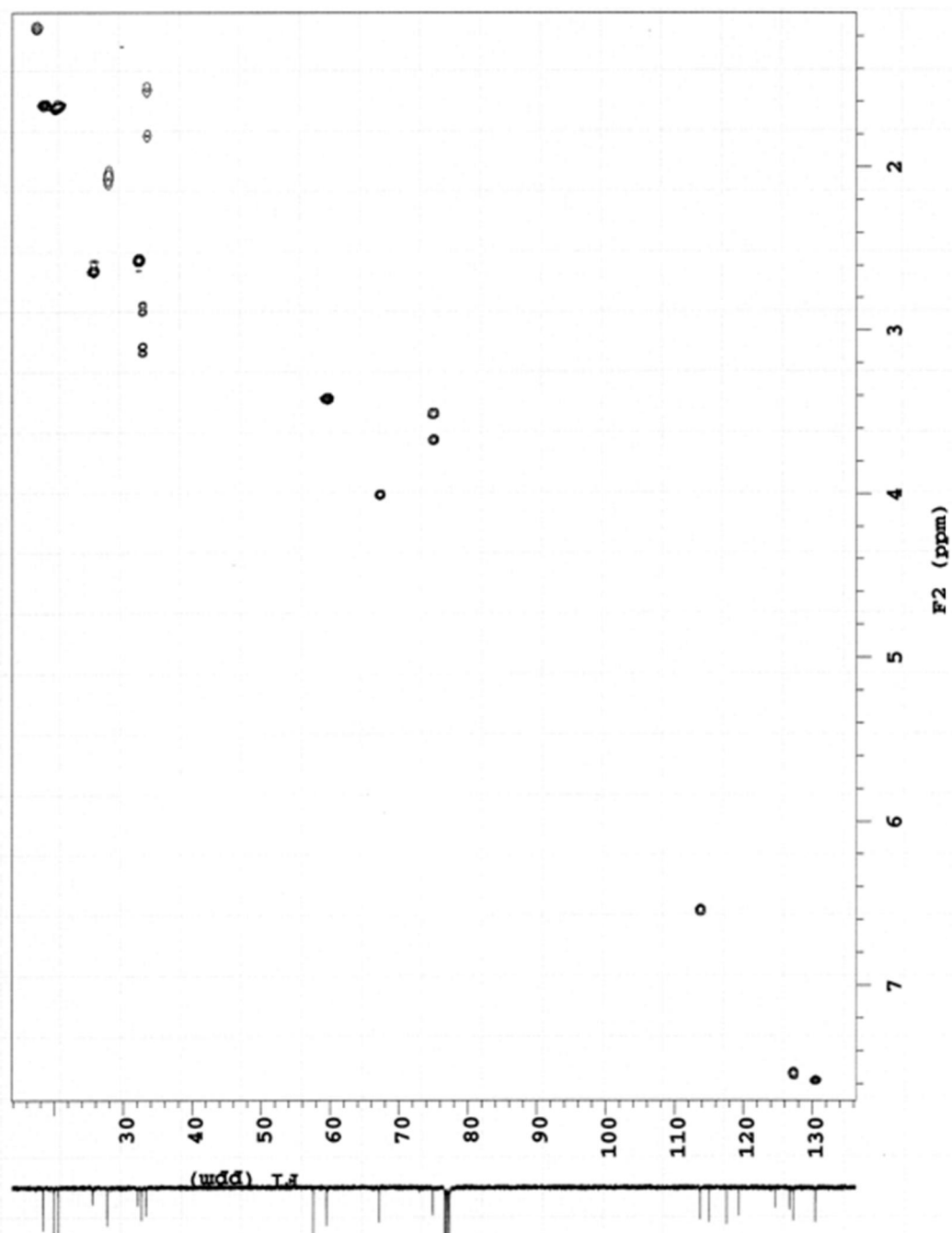


Figure S3-1-3 HSQC Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

AM2504-ODS60_No4-ALL

Sample: AM2504-ODS60_No4-ALL

File: /home/vmar1/vmarsys/data_server/Soyakushigen/Kimura/AM2504-ODS60_No4-ALL_20170911_01/gHBCAD_01.fid

Pulse Sequence: gHBCAD

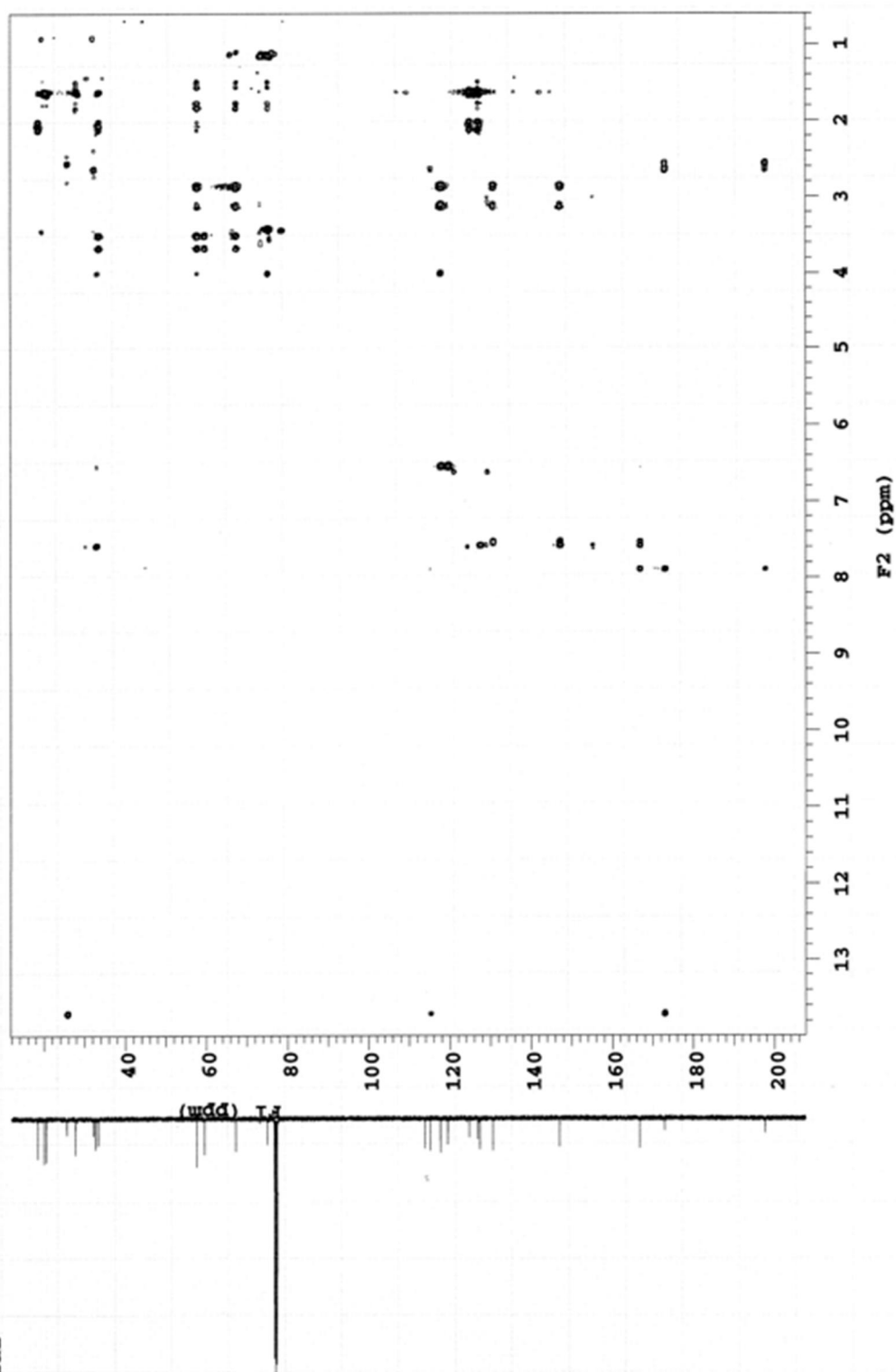


Figure S3-1-4 HMBC Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl_3

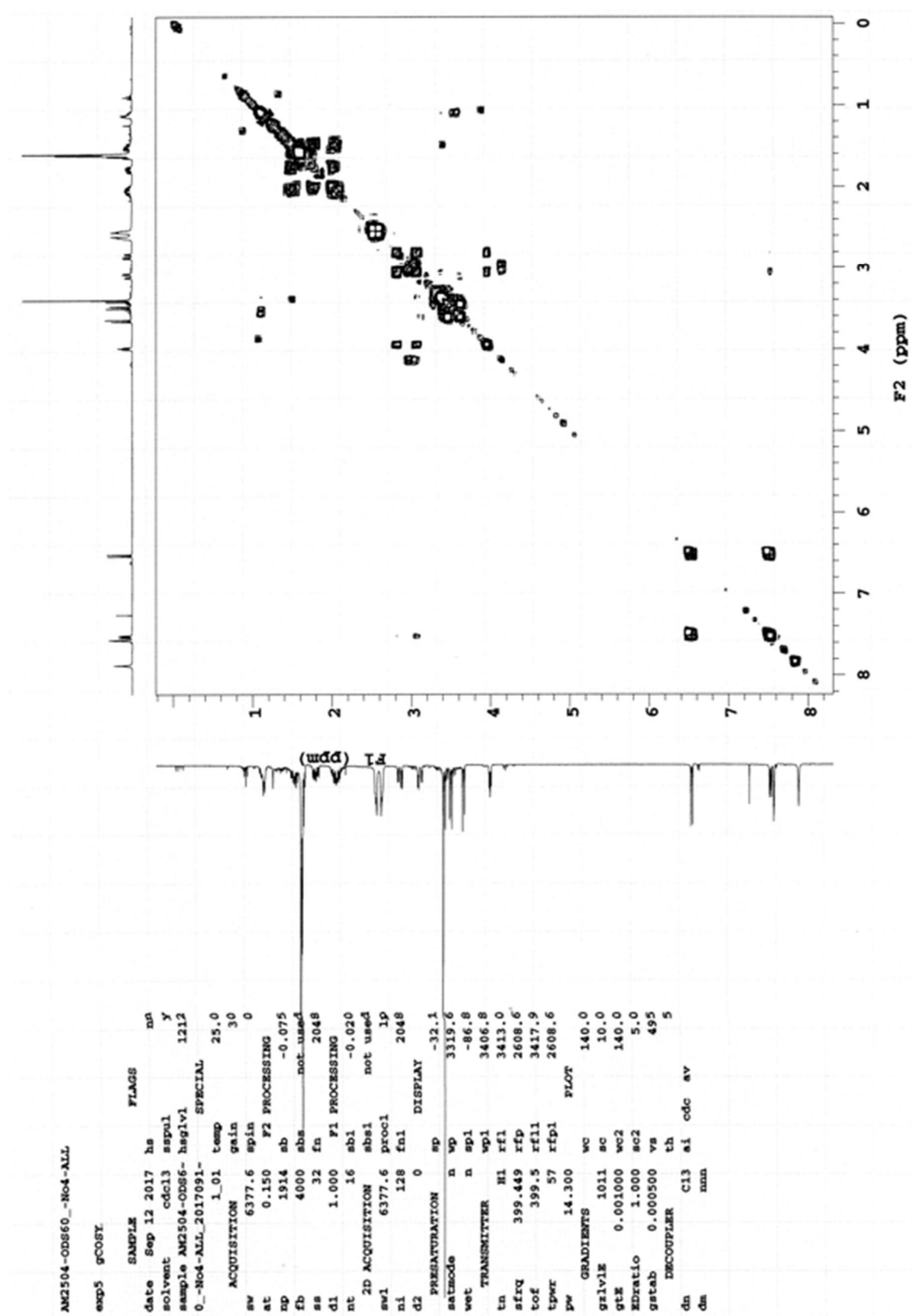


Figure S3-1-5 COSY Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl₃

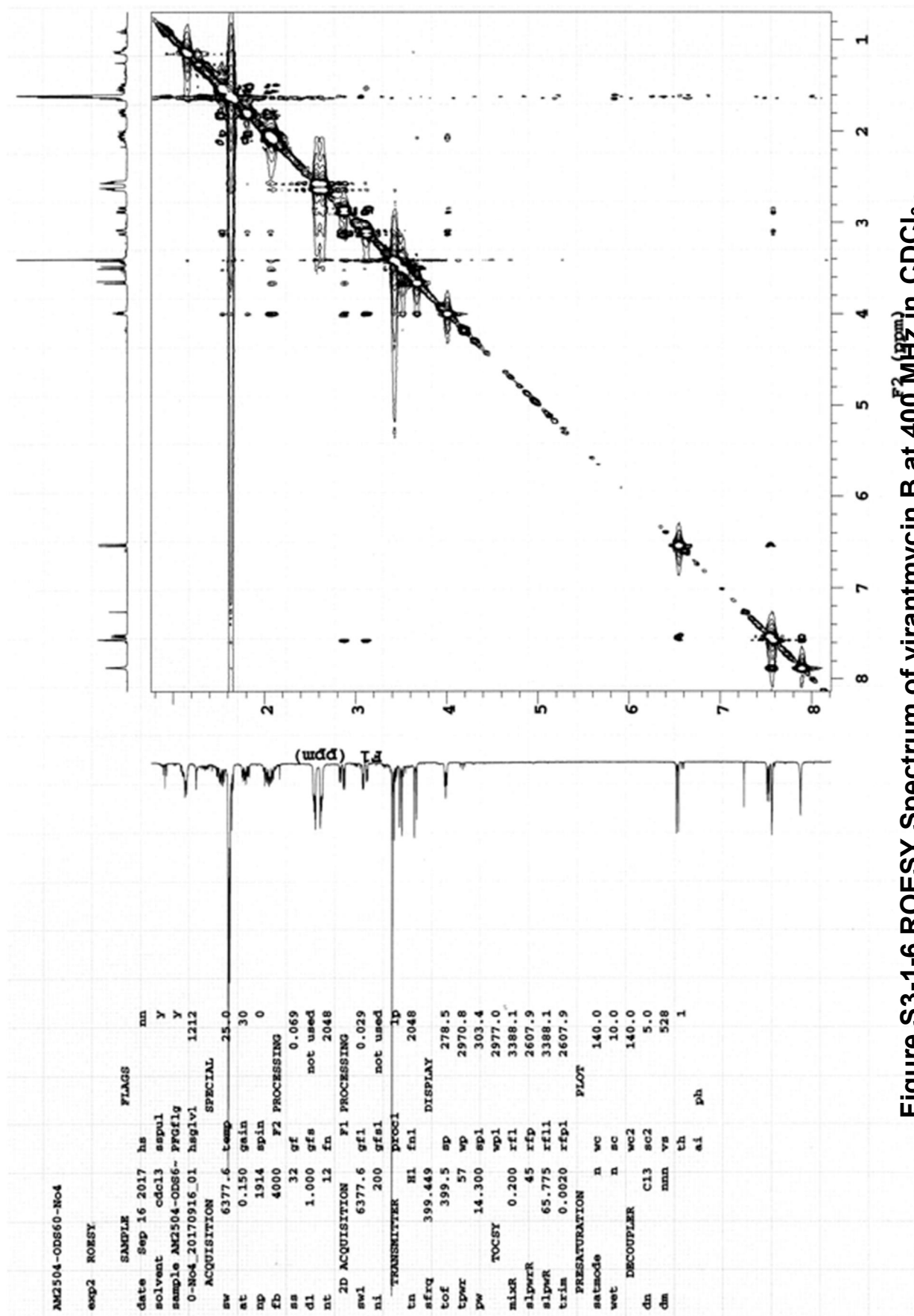


Figure S3-1-6 ROESY Spectrum of virantmycin B at 400 MHz in CDCl₃

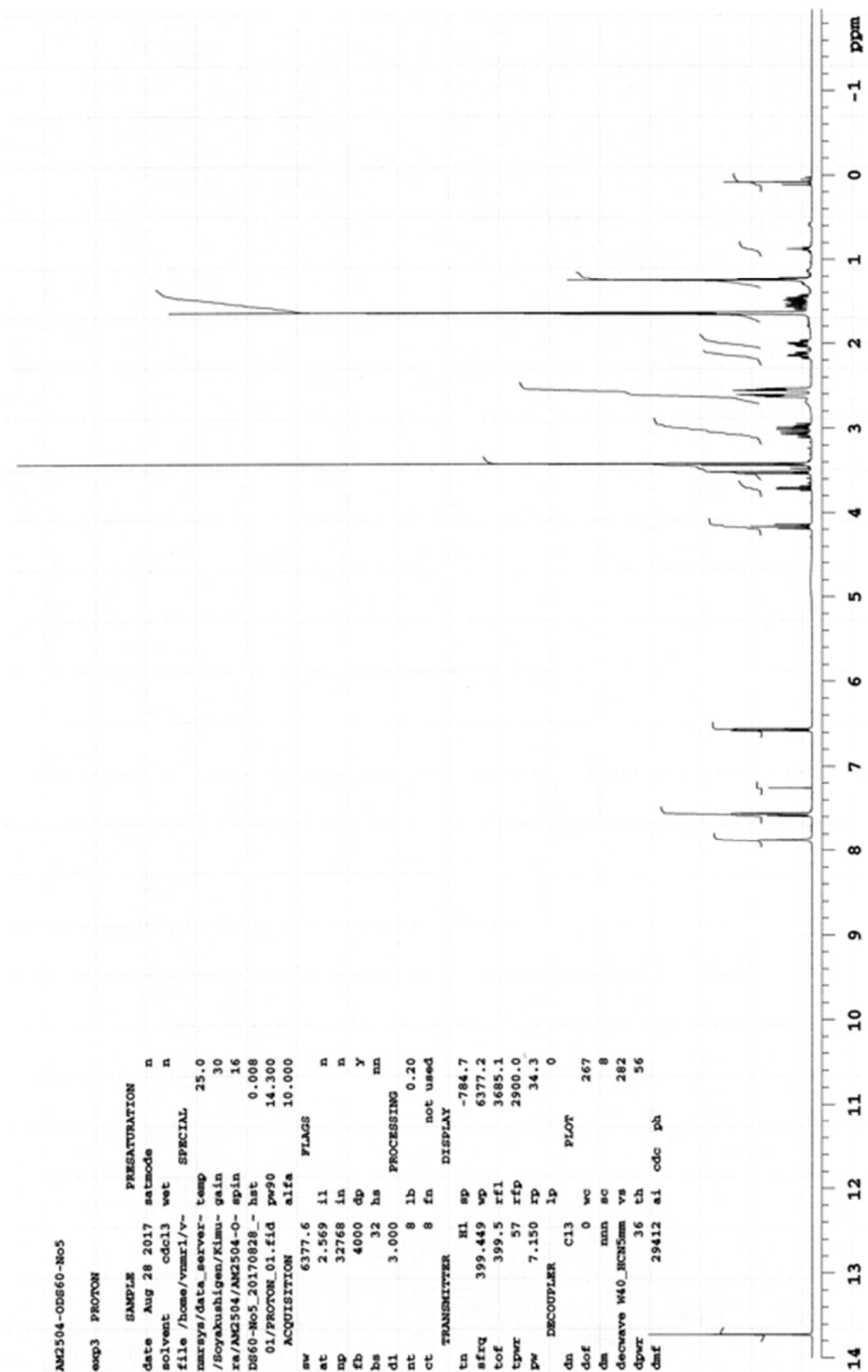


Figure S3-1-7 ^1H NMR Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

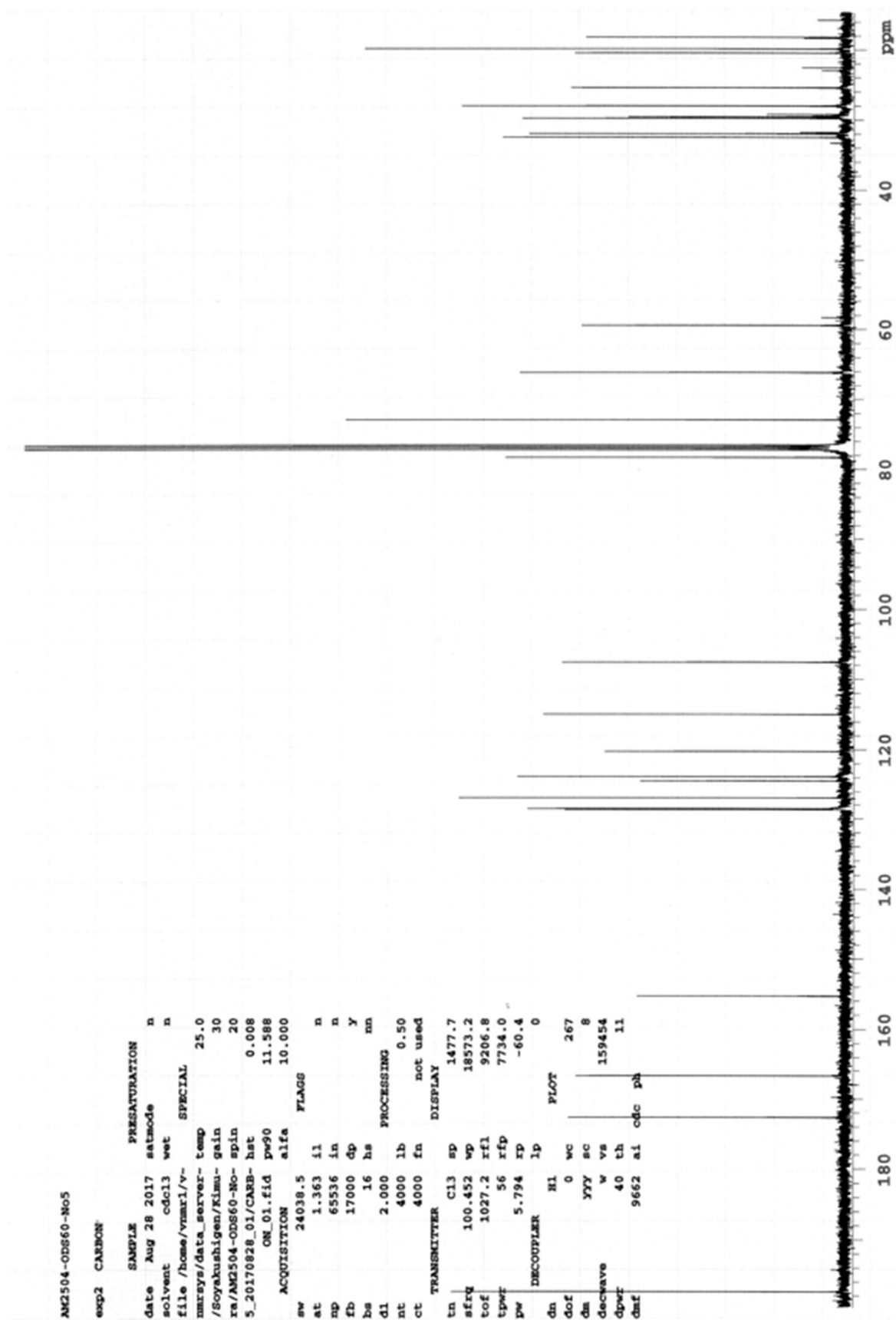


Figure S3-1-8 ^{13}C NMR Spectrum of virantmycin C at 100 MHz in CDCl_3

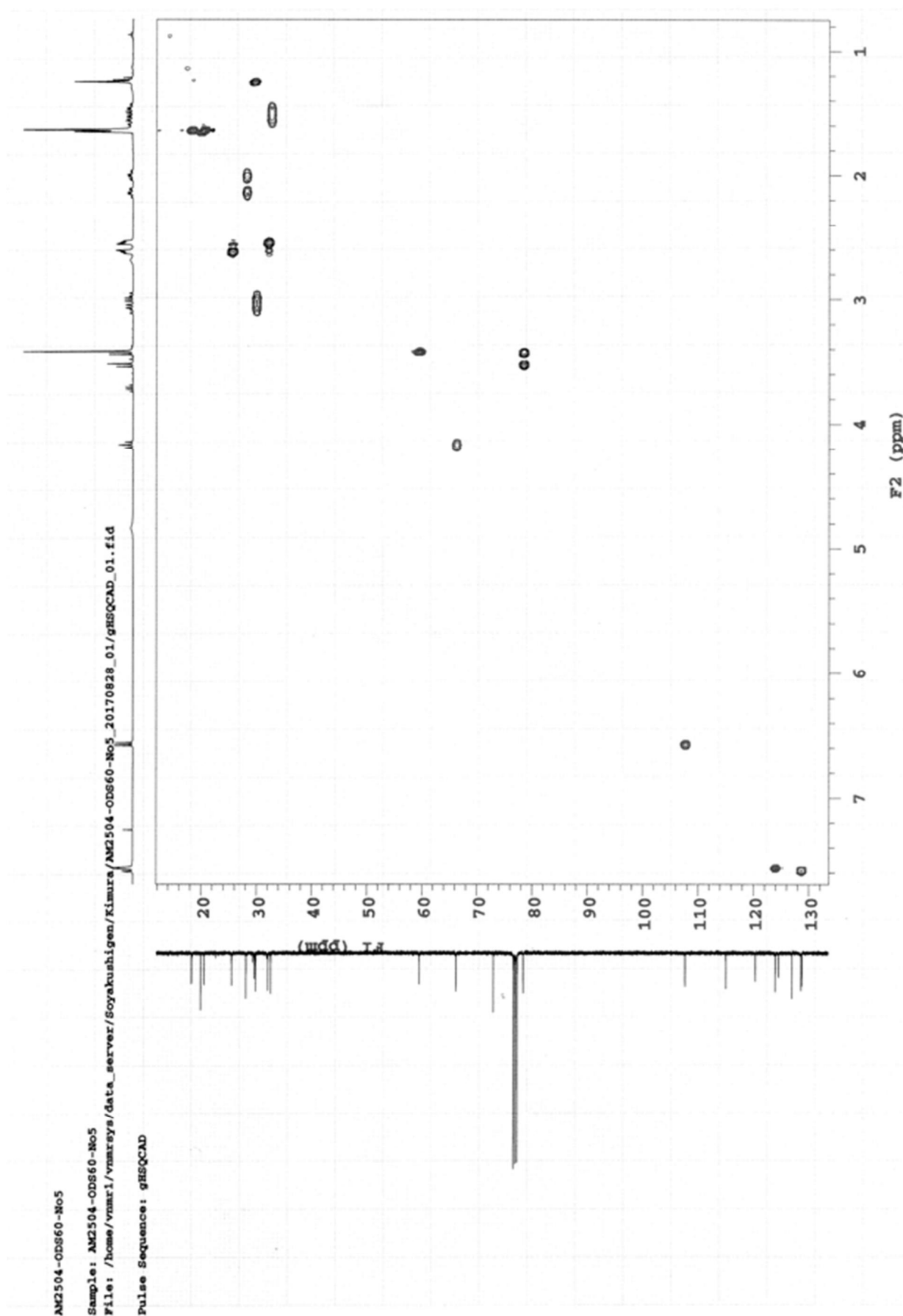


Figure S3-1-9 HSQC Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl_3

AM2504-ODS60-No5

Sample: AM2504-ODS60-No5

File: /home/vmr1/vmrays/data_server/Soyakushigen/Kimura/AM2504-ODS60-No5_20170828_01/gmBCAD_01.fid

Pulse Sequence: gmBCAD

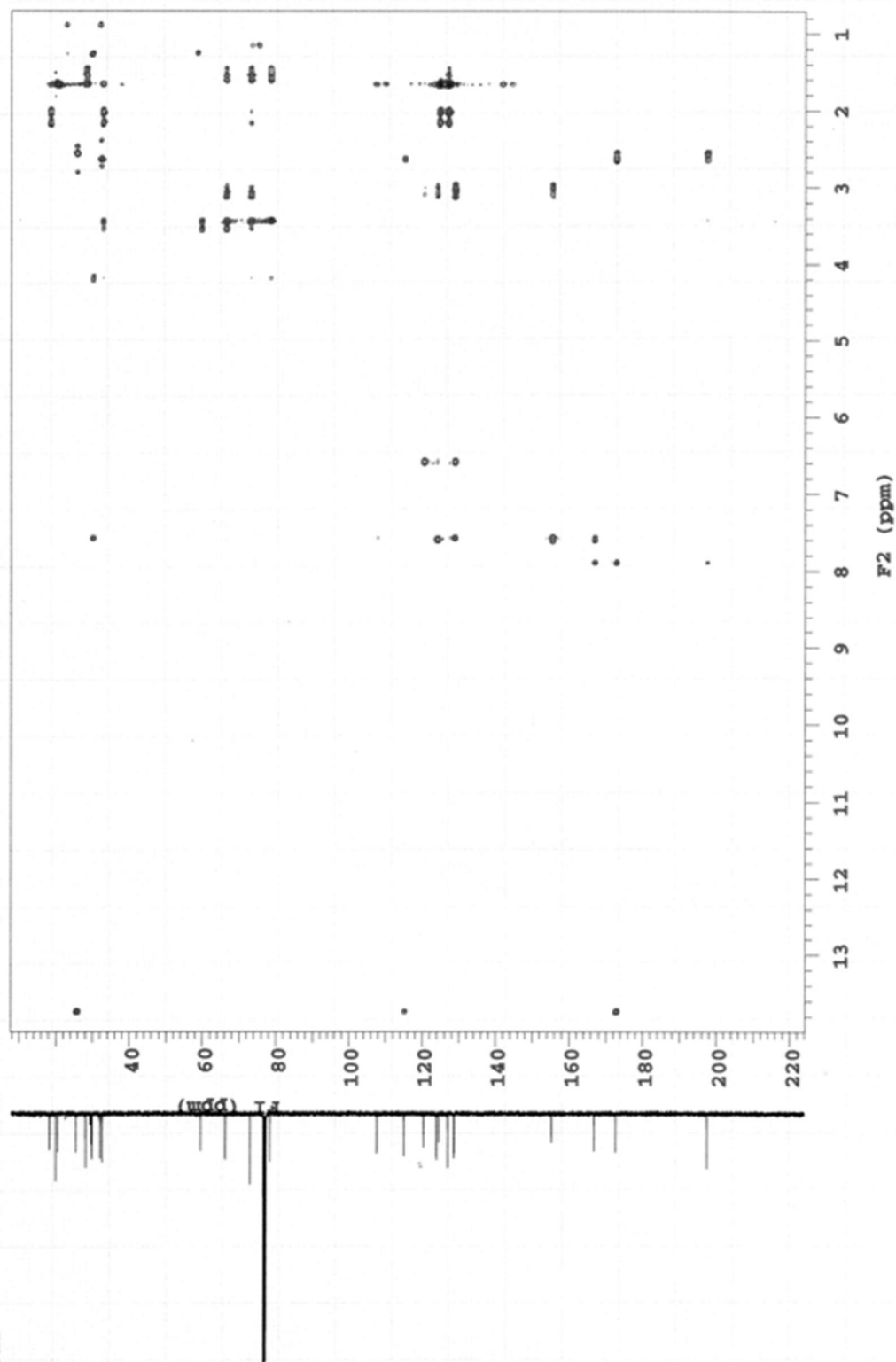
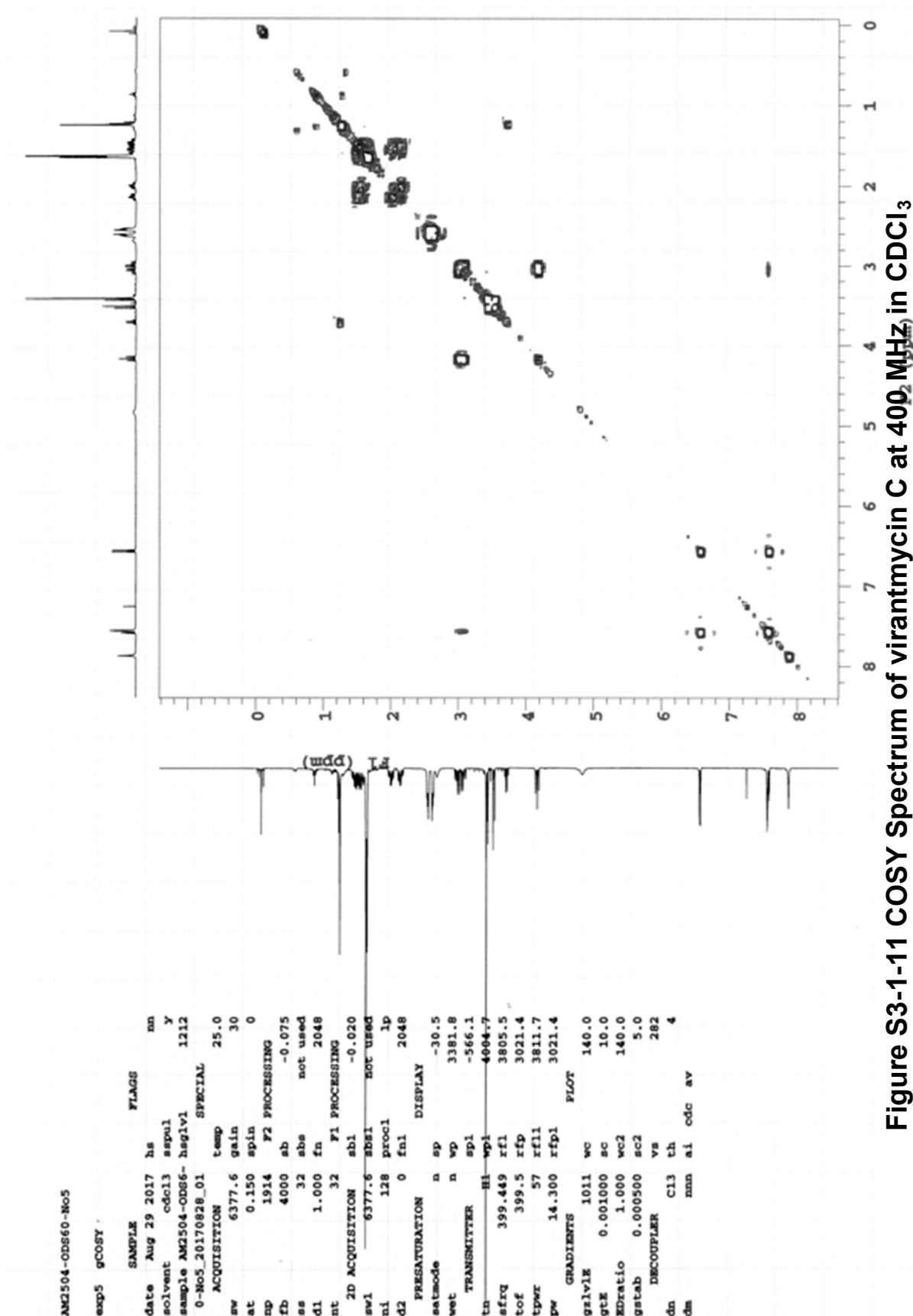


Figure S3-1-10 HMBC Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl₃



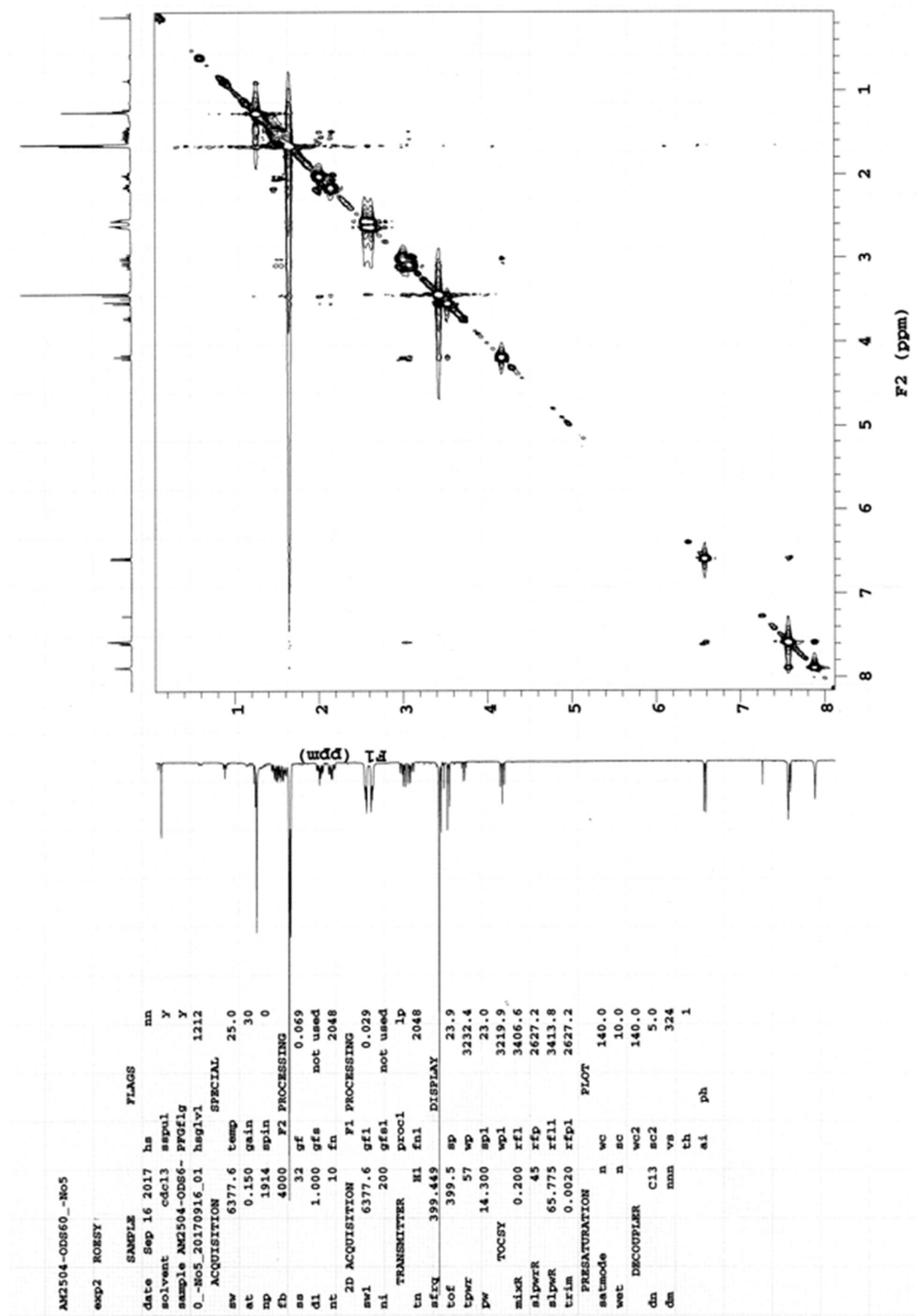


Figure S3-1-12 ROESY Spectrum of virantmycin C at 400 MHz in CDCl₃

第 2 節 Pyrizomicin に関する研究

Figure S3-2-1 ^1H NMR Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-2 ^{13}C NMR Spectrum of pyrizomicin A at 100 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-3 HSQC Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-4 HMBC Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-5 COSY Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-6 LC/MS Spectrum of pyrizomicin B

Figure S3-2-7 ^1H NMR Spectrum of pyrizomicin B at 400 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-8 Expanded ^1H NMR Spectrum of pyrizomicin B at 400 MHz in CD_3OD

Figure S3-2-9 ^{13}C NMR Spectrum of pyrizomicin B at 400 MHz in CD_3OD

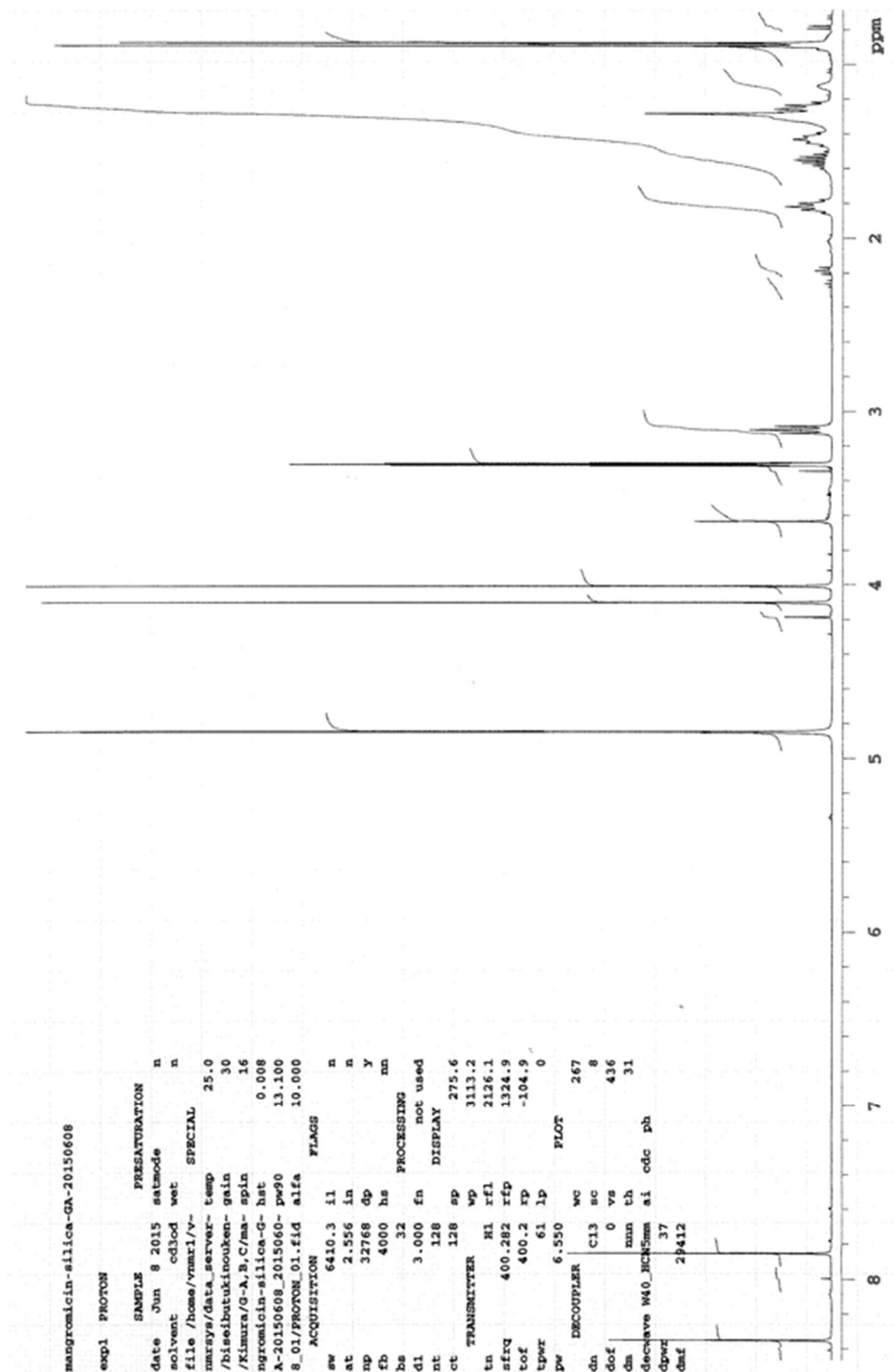


Figure S3-2-1 ^1H NMR Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD_3OD

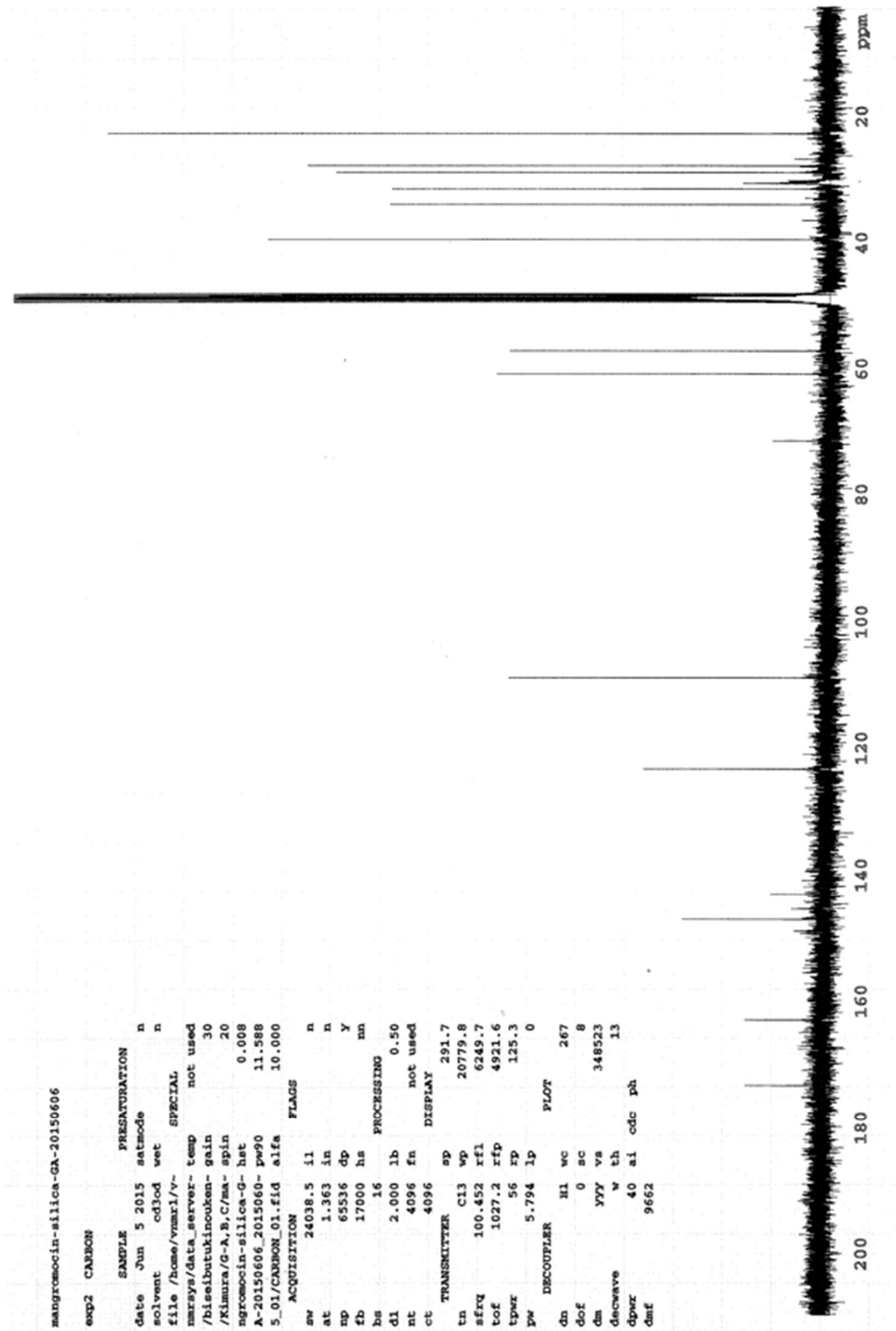


Figure S3-2-2 ¹³C NMR Spectrum of pyrizomicin A at 100 MHz in CD₃OD

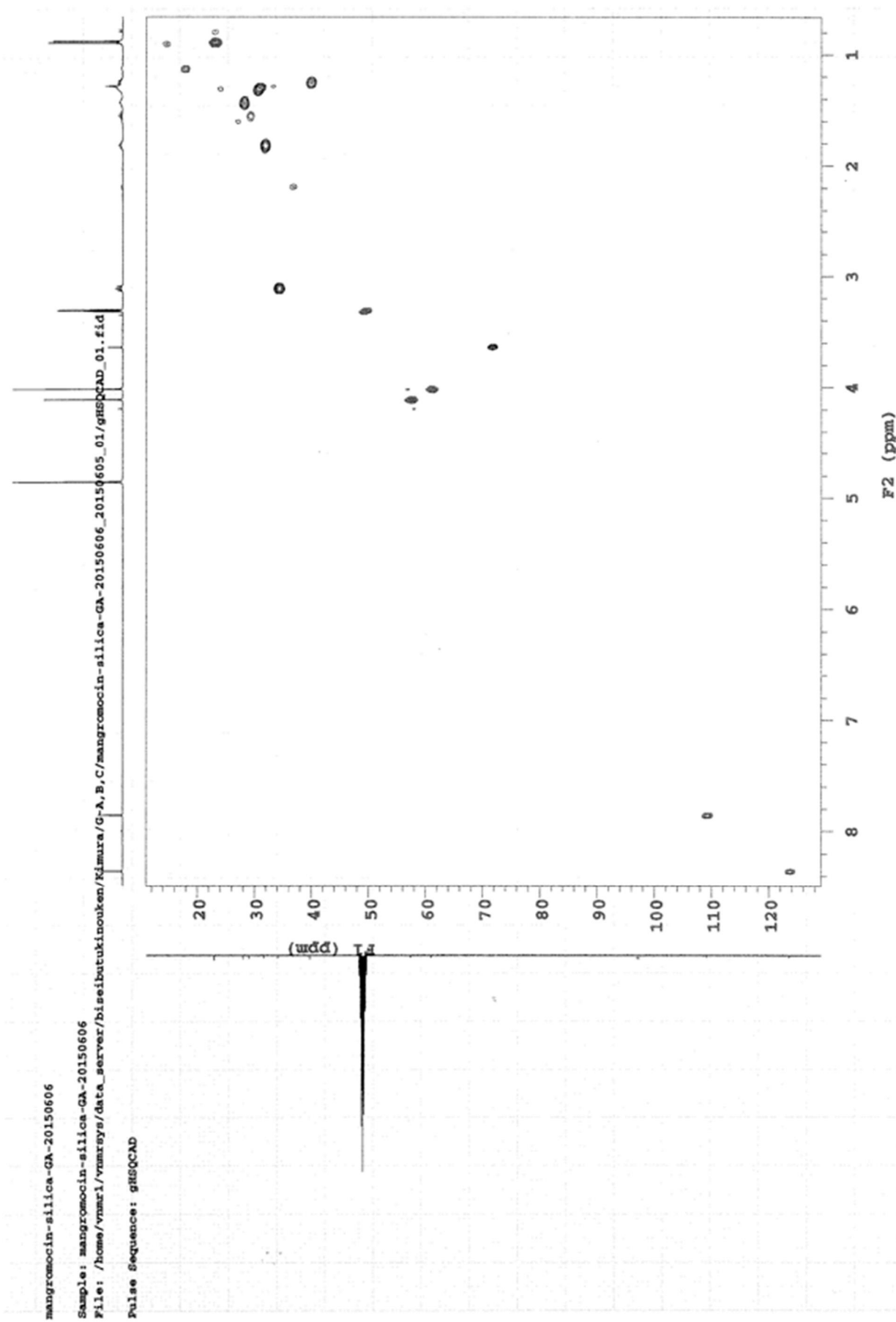
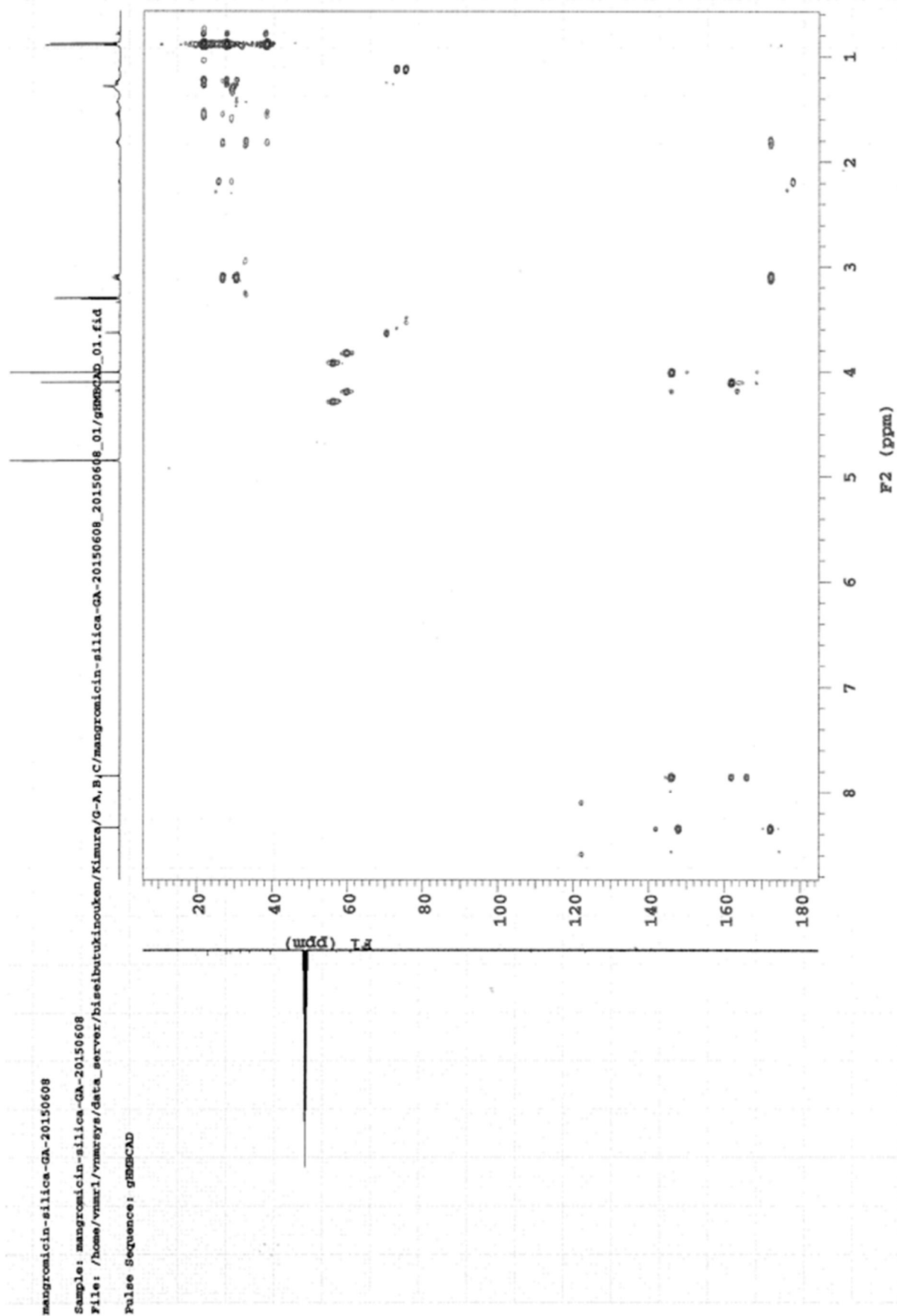


Figure S3-2-3 HSQC Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD_3OD



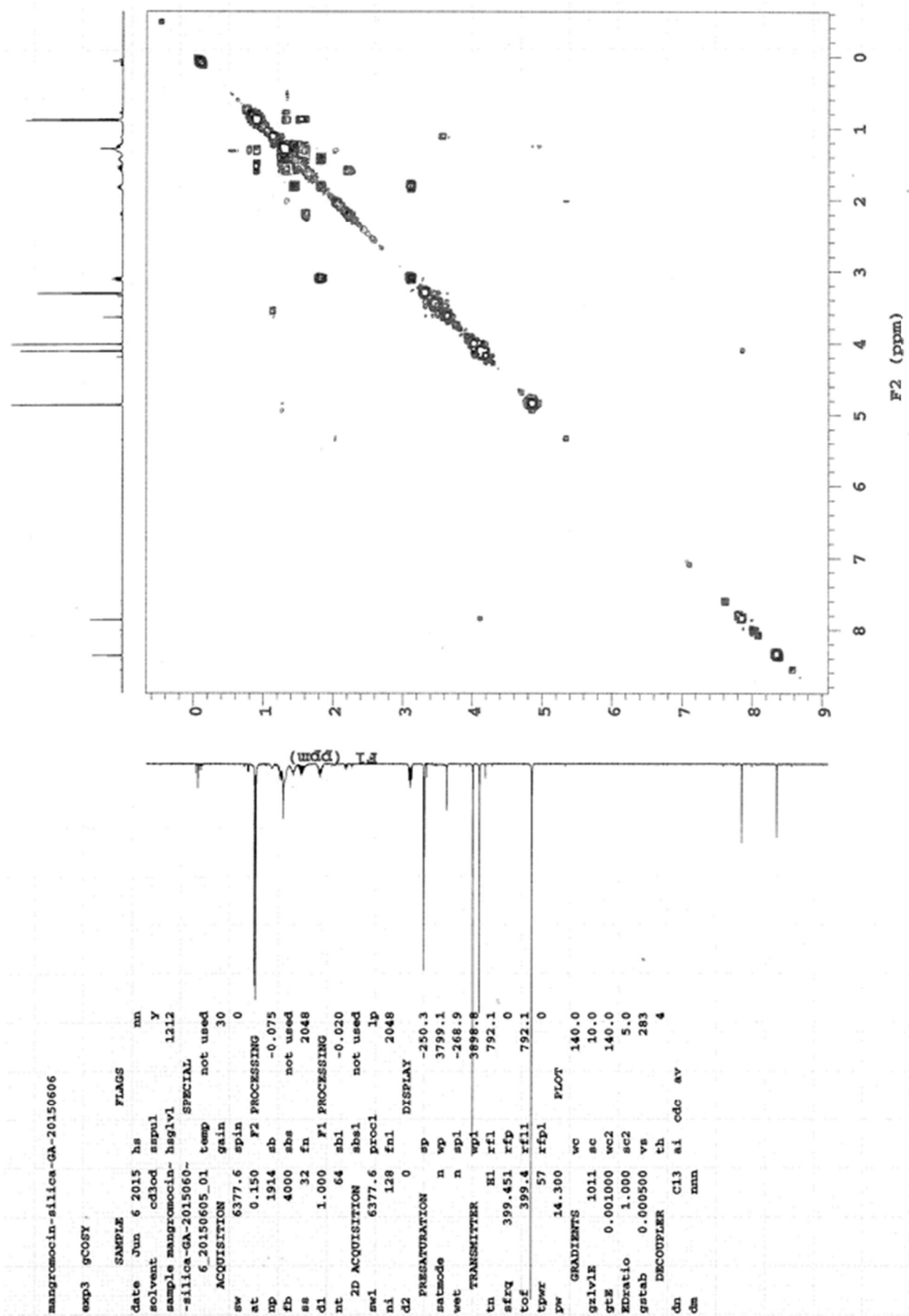


Figure S3-2-5 COSY Spectrum of pyrizomicin A at 400 MHz in CD₃OD

データ: 15-1059-1

試料名:

説明:

イオン化モード: ESI(+)

処理履歴: m/z 軸決定 [ピーク検出 [重心, 30, 面積], ベース補正 [5.0%], 平滑化 [3]], ベース補正 [5.0%], 平均 [MS [1] 7.78, 7.80]

測定日時: 2016/03/15 17:58:08

測定者: Administrator

質量校正データ: 無し

作成日時: 2016/03/15 18:33:59

作成者: Administrator

電荷数: 1

許容誤差: 5.00 (mmu)

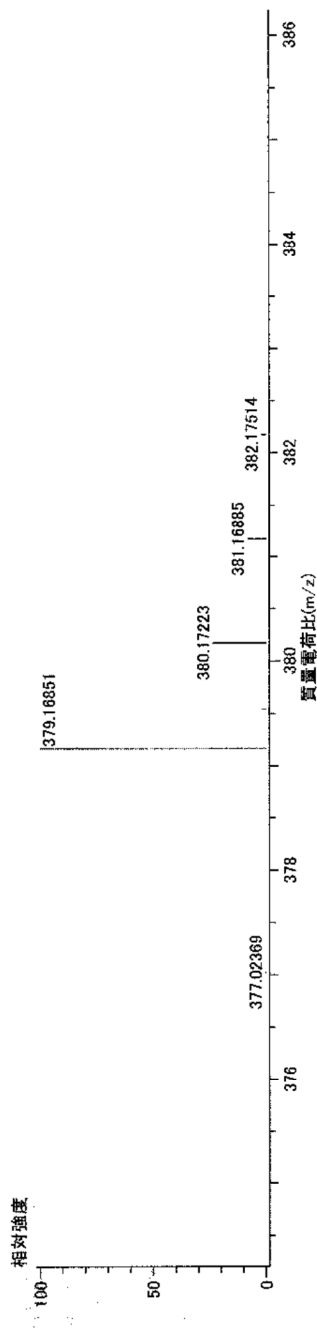
不飽和数: -1.5 .. 20.0 (端数: 5)

元素: ^{12}C : 0 .. 100, ^1H : 0 .. 200, ^{14}N : 0 .. 2, ^{16}O : 0 .. 5, ^{32}S : 0 .. 1

質量	強度	相対強度	計算質量	質量差 mmu	質量差 ppm	推定組成式	不飽和数
379.16851	273952.25	100.00	379.16915	-0.64	-1.70	$^{12}\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_1$	7.5
			379.16980	-1.30	-3.42	$^{12}\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{O}_2$	16.5
			379.16578	2.73	7.19	$^{12}\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$	12.5
			379.17317	-4.67	-12.31	$^{12}\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{S}_2$	12.5

測定データ名: 15-1059-1
作成条件: 平均 [MS [1] 経過時間: 7.78, 7.80]
MS 調査条件名: ESI+(2000)

実験日時: 2016/03/15 17:58:08
イオン化モード: ESI+
Agilent1100 条件名: ACN20-100% 8min 100% 2min



組成式: $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

モノアイソトピック質量: 379.16915

説明:

平均質量: 379.49476

作成日時: 2016/03/15 18:34:01

実験者: Administrator

作成者: Administrator

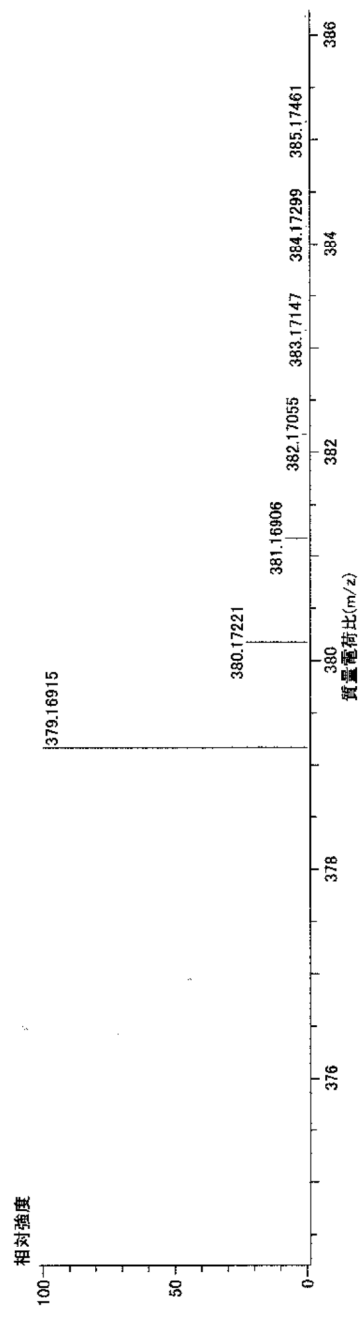


Figure S3-2-6 LC/MS Spectrum of pyrizomicin B

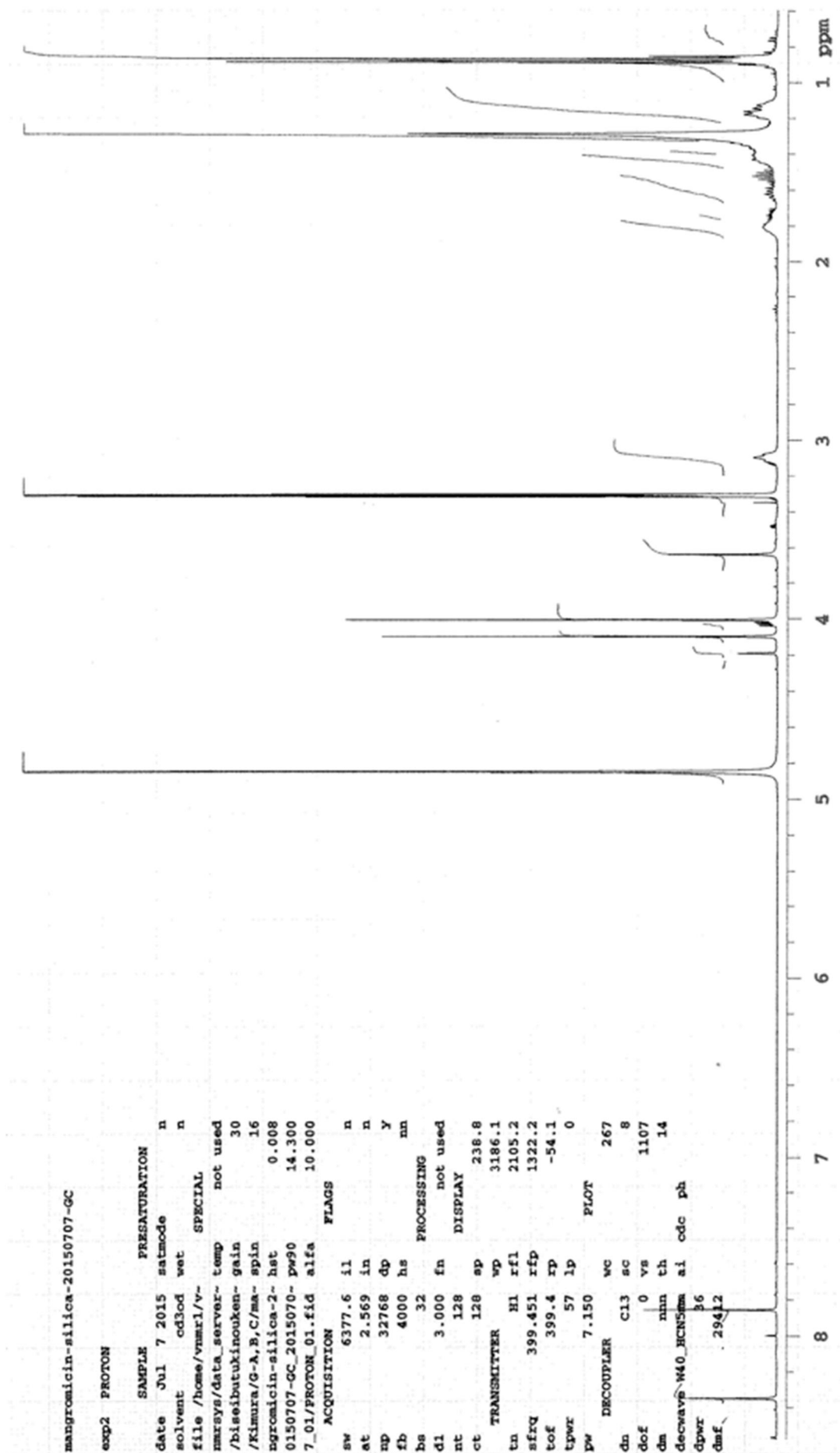


Figure S3-2-7 ¹H NMR Spectrum of pyrizomicin B at 400 MHz in CD₃OD

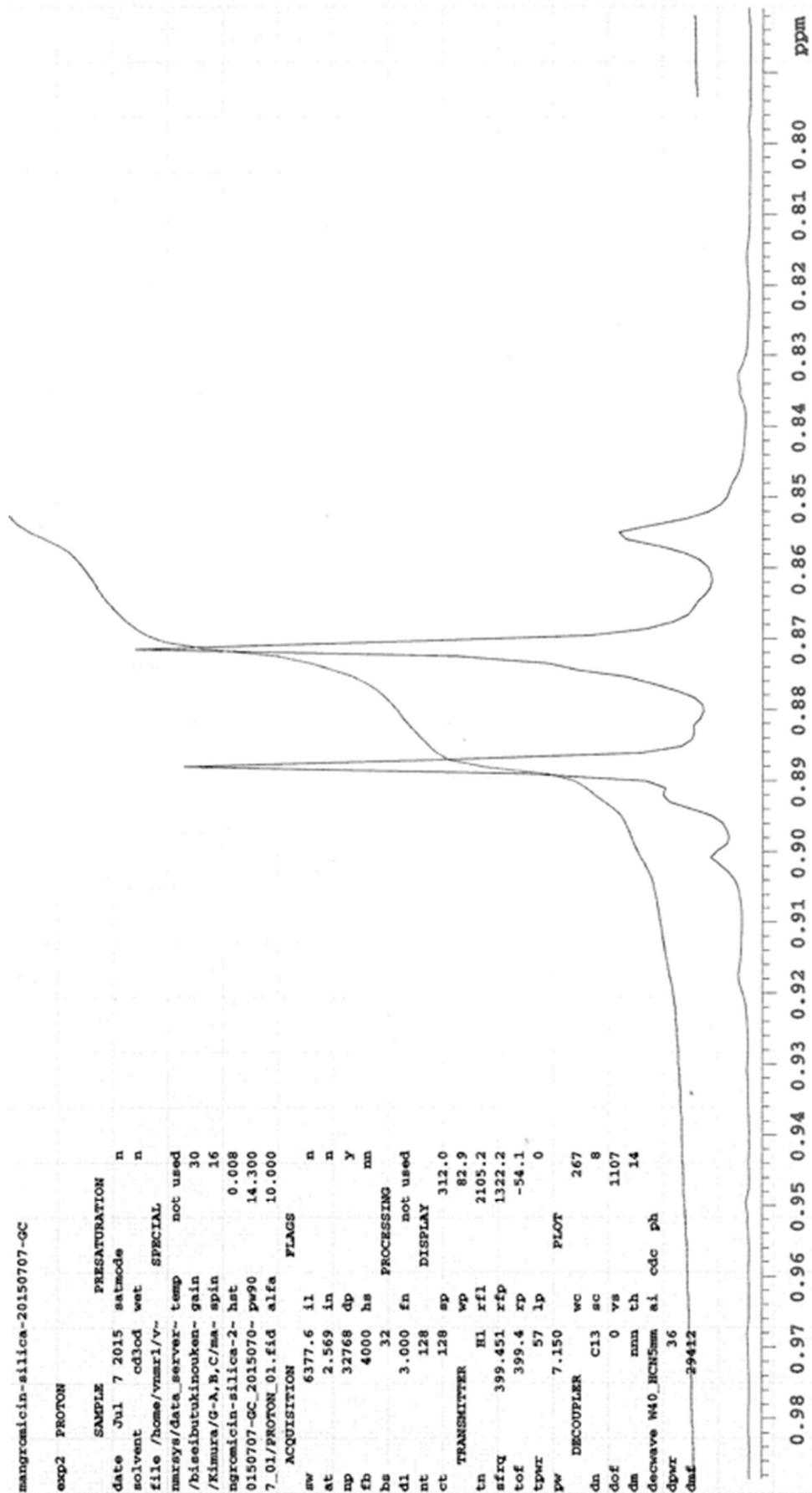


Figure S3-2-8 Expanded ¹H NMR Spectrum of pyrizomicin B at 400 MHz in CD₃OD

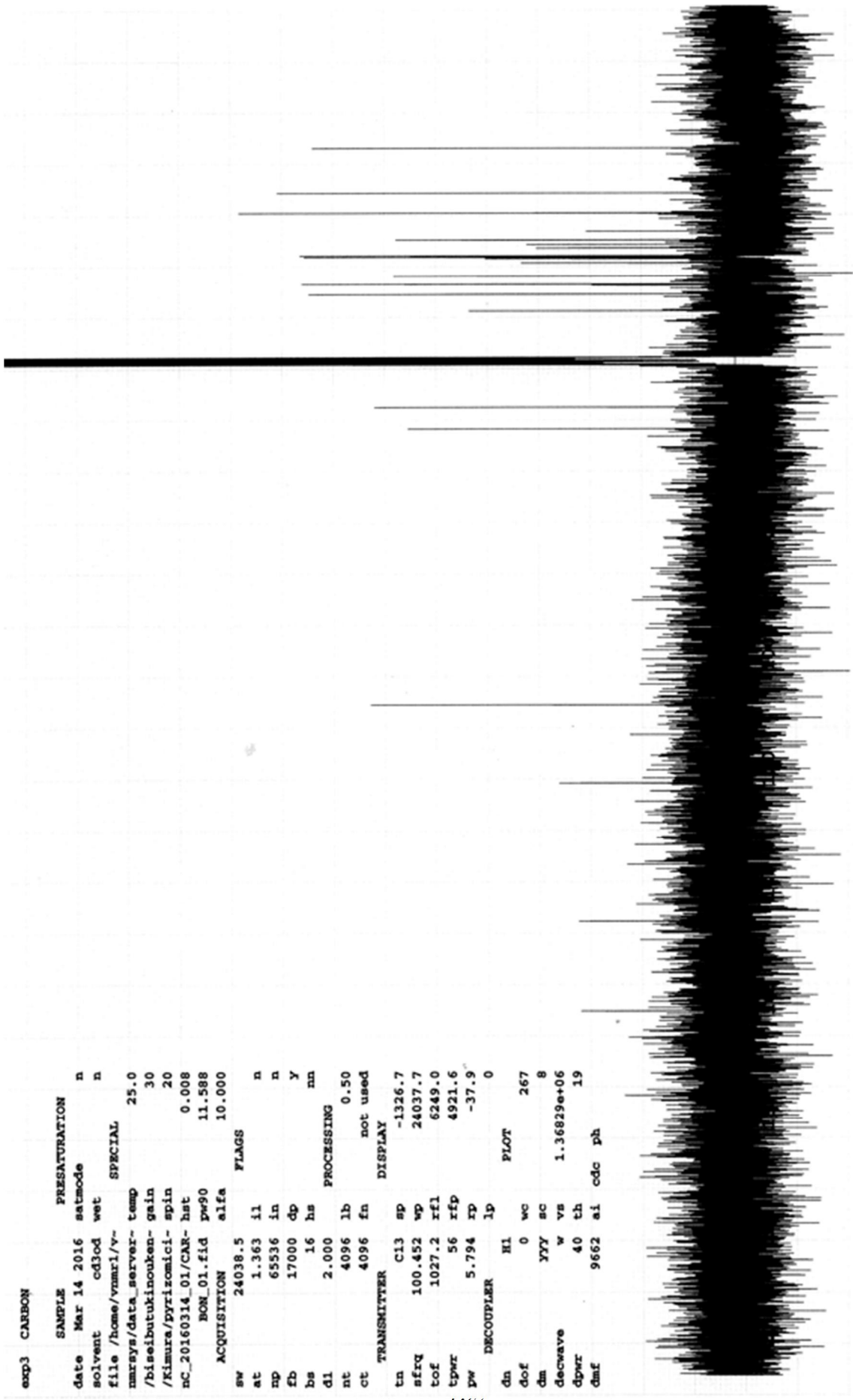


Figure S3-2-9 ¹³C NMR Spectrum of pyrizomicin B at 400 MHz in CD₃OD

参考文献

- 1) 日本放線菌学会編 放線菌の分類と同定 日本学会事務センター (2001).
- 2) 荒川賢治 *生物工学*, **89**, 82 (2011).
- 3) János Bérdy., *J. Antibiot.*, **58**, 1-26 (2005).
- 4) Margalith, P., *et al.*, *Mycopathol. Mycol. Appl.* **8**, 321. 30 (1960).
- 5) Lechevalier, M. P., *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 29-37 (1986).
- 6) *Br. Med. J.*, **2**, 1085-1086 (1952).
- 7) Labeda D.P., *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 19-22 (1987).
- 8) *Can. Med. Assoc. J.*, **76**, 493 (1957).
- 9) Waksman, S.A., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **42**, 231-249 (1941).
- 10) Umenzawa, H., *et al.*, *J. Antibiot.*, **19**, 200 (1966).
- 11) Matsuo, H., *et al.*, *Fems. Microbiol. Lett.* **153**, 83-88 (1997).
- 12) Weiss, R.B., *et al.*, *Seminars in Oncology* **19** (6): 670. 86 (1992).
- 13) Skerman, V.B.D., *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**, 225-420 (1980).
- 14) Kino, T., *et al.*, *J. Antibiot.*, **40**, 1249. 1255 (1987).
- 15) Muramatsu, H., *et al.*, *J. Antibiot.*, **66**, 251-254 (2013).
- 16) Iwasa, T., *J. Antibiot.*, **12**, 595-602 (1970).
- 17) Newman D.J., *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **79**, 629-661 (2016).
- 18) 高橋洋子、バイオサイエンスとインダストリー、**70**, 178-179 (2012).
- 19) 佐藤文治、ファルマシア、**50**, 127-131 (2014).
- 20) Miklos *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**, 218-227 (2003).
- 21) Bérdy, J., *J. Antibiot.*, **65**, 385-395 (2012).
- 22) Kavita, T., and Rajinder K.G., *Crit. Rev. Biotechnol.*, **32**, 108-132 (2012).
- 23) Nett M, *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1362-1384 (2009).
- 24) Jenson, P.R. *et al.*, *Environ. Microbiol.* **7**, 1039-1048 (2005).
- 25) Hong, K., *et al.*, *Mar. Drugs*, **7**, 24-44 (2009).
- 26) 落合純也、北里大学感染制御科学府 2010 年度修士論文
- 27) Feling, R.H., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 355-357 (2003).
- 28) Bister, B., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 2574-2576 (2004).
- 29) Russo, P., *et al.*, *EXCLI J.*, **14**, 228-236 (2015).
- 30) mura, S., *Splendid Gifts from Microorganisms* (2015).
- 31) KIM *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2011-2014 (2002).
- 32) Burg, R.W. *et al.*, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **3**, 361-367 (1979).
- 33) Také, A *et al.*, *J. Antibiot.*, **68**, 322-327 (2015).
- 34) mura, S., *et al.*, *J. Antibiot.*, **44**, 113-6 (1991).
- 35) mura, S., *et al.*, *J. Antibiot.*, **35**, 1013-1019 (1982).

- 36) mura, S., *et al.*, *J. Antibiot.*, **34**, 1253-1256 (1981).
- 37) mura, S., *et al.*, *J. Antibiot.*, **39**, 1211-1218 (1986).
- 38) Labeda, D.P., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1045-1050 (2001).
- 39) mura, S., *et al.*, *J Antibiot.*, **48**, 535-548 (1995).
- 40) Nakashima, T. *et al.*, *Biochem. Pharm.*, **134**, 42-55 (2017).
- 41) Osada, H., *Biosci. Bioeng Blochem.*, **74**, 1135-1140 (2010).
- 42) Sawa, R., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **64**, 101-104 (2016)
- 43) Nakashima, T. *et al.*, *J. Antibiot.*, **66**, 311-317 (2013).
- 44) Inahashi, Y., *et al.*, *Org. Lett.*, **17**, 864-867 (2015)
- 45) Nakashima, T., *et al.*, *J. Antibiot.*, **67**, 253-260 (2014).
- 46) Nakashima, T., *et al.*, *J. Antibiot.*, **67**, 533-539 (2014).
- 47) Nakashima, T., *et al.*, *J. Antibiot.*, **68**, 220-222 (2015).
- 48) Nakashima, T., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 596-600 (2015).
- 49) Nakashima, T., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 765-770 (2017).
- 50) Nakashima, T., *et al.*, *J. Antibiot.*, **69**, 611-615 (2016).
- 51) Nakashima, T., *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **57**, 3284-3286 (2016).
- 52) Matsumoto, A., *et al.*, *J. Antibiot.*, **70**, 514-519 (2017).
- 53) Kimura, T. *et al.*, *J. Antibiot.*, **69**, 818-824 (2016).
- 54) Bister, B. *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 2574-2576 (2004).
- 55) Momose, I., *et al.*, *J Antibiot.*, **52**, 781-786 (1999).
- 56) Collins, M. D., *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **100**, 221-230 (1977).
- 57) Otaguro, K., *et al.*, *J Antibiot.*, **54**, 658-663 (2001).
- 58) Ara I., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 1653-1659 (2008).
- 59) Sazak A., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **62**, 2011-2017 (2012).
- 60) Quintana E.T., *et al.*, *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, 511-517 (2003).
- 61) Hanafy A., *et al.*, *Mycopathologia.*, **162**, 281-287 (2006).
- 62) Kimura, T., *et al.*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, *in press*.
- 63) Igarashi, Y., *et al.*, *J. Antibiot.*, **68**, 345-347 (2015).
- 64) Lee, L.H., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **64**, 1461-1467 (2014).
- 65) Kimura, Y., *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1977-1982 (2010).
- 66) Katsuda, Y., *et al.*, *PLoS One.* 10(8):e0134704 (2015).
- 67) Tamaoki, T., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397-402 (1986).
- 68) Capdeville, R., *et al.*, *Nat. Rev., Drug Discovery* 1, 493-502 (2002).
- 69) Nakano, H., *et al.*, *J. Antibiot.*, **62**, 17-26 (2009).
- 70) Peng, Fu., *et al.*, *Org. Lett.*, **14**, 2422-2425 (2012).

- 71) Xiao-Xian, Han., *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 6137-6140 (2005).
- 72) Tamura, T., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**, 1275-1280 (2011).
- 73) mura, S., *et al.*, *J. Antibiot.*, **33**, 1395-1396 (1980).
- 74) mura, S., *et al.*, *Agricult. Biol. Chem.*, **41**, 1827-1828 (1977).
- 75) Sung-eun, Y., *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **20**, No. 2 (1999).
- 76) Kim, W.G., *et al.*, *J. Antibiot.*, **49**, 26-30 (1996).
- 77) Kim, W.G., *et al.*, *Tetrahedron* **53**, 4309-4316 (1997).
- 78) Nakashima, T., *et al.*, *J. Antibiot.*, **68**, 348-350 (2015).
- 79) Takada, H., *et al.*, *Org. Lett.*, **19**, 230-233 (2017).
- 80) Tsurumi, Y., *et al.*, *J. Antibiot.*, **48**, 1066-1072 (1995).
- 81) 特開平 11-60572
- 82) Tsurumi, Y., *et al.*, *J. Antibiot.*, **48**, 1073-1075 (1995).
- 83) Nishio, M., *et al.*, *J. Antibiot.*, **42**, 852-868 (1989).
- 84) Zhu, Y., *et al.*, *Org. Lett.*, **11**, 2666-2669 (2012).
- 85) Daniel, G.G., *et al.*, *Nature Methods*, **6**, 343-345 (2009).
- 86) Ping, X., *et al.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 577-581 (2004).
- 87) mura, S., *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4713-4716 (1982).
- 88) Schulze, C.J., *et al.*, *ACS. Chem. Biol.*, **10**, 2373-2381 (2015).
- 89) Ma, Y.M., *et al.*, *Nat. Prod. Res.*, **30**, 79-84 (2016).
- 90) Hammann, S., *et al.*, *Lipids.*, **50**, 611-620 (2015).

謝辭

本研究を行うにあたり多大なご指導ご鞭撻を頂き、あらゆる面で支えて下さいました北里大学北里生命科学研究so感染制御科学府教授 塩見 和朗 博士に謹んでお礼申し上げます。

また、貴重な研究環境を与えて下さいました学校法人北里研究所特別栄誉教授である大村 智 博士に心より感謝申し上げます。

本研究は北里大学感染制御科学府創薬資源微生物学寄付講座である中島 琢自 特任准教授の直接のご指導のもと行われたものであり、数々のご指導を頂きましたことを心からお礼申し上げます。また、学部生の頃から放線菌について多くのご指導ご鞭撻を賜りました学校法人北里研究所 名誉教授 高橋 洋子 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究における菌株の保存、生産菌の菌学に際してご指導をして下さった北里大学感染制御科学府微生物機能研究室 松本 厚子 博士、菌株の培養に際してご指導をして下さった北里大学感染制御科学府資源研究センター 野中 健一 博士、物質の構造解析に際してご指導をして下さった北里大学生命科学研究so熱帯病研究センター 岩月 正人 博士および北里大学感染制御科学府創薬資源微生物学寄付講座 須賀 拓弥 博士、物質の各種機器分析を行っていただき、その解析についてご指導して下さいました北里大学薬学部共有機器室 佐藤 倫子 様、長井 賢一郎 博士、生合成研究に際してご指導をして下さった北里大学感染制御科学府創薬資源微生物学寄付講座 稲橋佑起 博士、生物活性評価を行っていただきました北里大学感染制御科学府創薬資源微生物学寄付講座 松尾 洋孝 博士、ドラフトゲノムシーケンスを行っていただきました東京大学大学院農学生命科学研究科 葛山 智久 博士、菌株の提供をしていただいた北里大学海洋生命科学部三陸臨海教育研究センター 笠井 宏朗 博士、各種 NMR 測定をしていただいたサントリー生命科学財団 森 祥子 様、ESR による抗酸化活性の測定をしていただいた東北大学大学院歯学研究科 庭野 吉己 博士、分離源の提供をしていただきました北里大学薬学部付属薬用植物園 福田 達男 博士に心より御礼申し上げます。

本研究を行うにあたりご協力を賜りました北里大学生命科学研究so 三浦 広美 博士、浅見 行弘 博士、森 美穂子 博士、土橋 和之 博士、酒井 一成 氏、常盤 俊之 氏 その他北里大学北里生命科学研究so創薬グループの皆様に感謝いたします。

最後に研究生活を支えてくれた、父 木村 強、母 木村 久美子に深く感謝いたします。

平成 30 年 1 月 木村 徹