

外 96-69

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

動植物に抑制作用を示す微生物
代謝産物の単離および構造決定

申 請 者

土屋 耕一

Kouichi Tsuchiya

1997年 3 月

人類はこれまでに多種多様な天然物由来の生理活性物質を見いだしてきた。そして、それらの活性物質が人類に与えてきた恩恵は計り知れない。それらは医薬としては細菌感染症治療薬、制癌剤、免疫抑制剤等に、農薬としては殺虫剤、殺菌剤、除草剤等に、さらに動物薬としての家畜等の抗寄生虫剤として利用され、その範囲が年々拡大してきている。

天然物化学研究において生産源である生物群としては、陸生の動植物、昆虫、海洋生物および微生物等が考えられるが、陸生の動植物、昆虫および海洋生物は入手時期が制限され、サンプル採集量にも限界があるなどの欠点がある。それに対し、土壌中に多数存在している微生物は時節を問わず入手でき、しかも実験室レベルの装置で用意に増殖・維持できるなどの利点がある。

本論文は微生物由来の二次代謝産物をスクリーニングの対象として選択し、医農薬分野における有用な物質を見いだすことを目的として、動物細胞の増殖、植物の生長調節および農業害虫のダニ類に生理活性を示す物質の探索研究を行った結果について述べたものである。以下に概要を示す。

本論文の第一部では、今後増え続けるであろう固形癌に対して抗腫瘍効果の期待できる物質を微生物二次代謝産物から発見するため、ヒト大腸癌細胞を用いたスクリーニング系を構築し、その細胞増殖を抑制する新規生理活性物質（NK154183AおよびNK154183B）を単離、構造決定したことについて述べている。

第一章では日本人の死亡原因として、2000年には大腸癌が胃癌を追い越して癌死亡のトップになると予想されているため、大腸癌細胞に対する新しい制癌剤の発見を第一の目標とした経緯を述べている。

第二章ではヒト大腸癌細胞増殖抑制物質のスクリーニング方法と選抜した生理活性物質の生産菌同定および単離精製について述べている。すなわち、放線菌*Streptomyces* 属の一菌株NK154183がヒト大腸癌細胞増殖抑制物質を培養液中に生産していることを見だし、その活性物質を培養液中から溶媒抽出およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより2つの活性成分として単離精製し、NK154183AおよびNK154183Bと命名した。

第三章ではNK154183AおよびNK154183Bの構造解析について述べている。2つの活性成分の内、生産量の多いNK154183Bを用いてMS、IR、NMRおよびX線結晶構造解析を実施した。その結果、NK154183Bは6,6スピロケタール環、5員環ヘミアセタールおよびアミノ糖構造を有する新規の24員環マクロライド（13-[[5-(dimethylamino) tetrahydro-6-methyl-2H-pyran-2-yl]oxy]-2,3,3',3a,4',5',6,6',7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,22,23,26,27,27a-tetracosahydro-11,12,14,16,17,27a-hexahydroxy-6'-(2-hydroxybutyl)-2,2,11,15,17,28-hexamethyl-spiro[22,26-methano-20H,24H-furo[2,3-h][1,5]dioxacyclohexasin-24,2'-[2H]pyran]-20-one）であると決定した。もう一方の活性成分であるNK154183Aは、NK154183Bとのスペクトルデータの比較検討によりNK154183Bのアグリコン部分であると決定している。（図参照）

第四章ではNK154183AおよびNK154183Bの生理活性について述べている。NK154183AおよびNK154183Bはヒト大腸癌細胞(SW1116)に対し細胞増殖抑制活性を示し、そのIC₅₀値はそれぞれ0.89 $\mu\text{g/ml}$ 、5.22 $\mu\text{g/ml}$ であることを明らかにしている。また、NK154183AおよびNK154183Bのマウス

に対する静脈内投与による急性毒性は、1.5mg/kgおよび1.25mg/kgであった。NK154183Bはヌードマウスにヒト大腸癌細胞を移植した腫瘍に対し、5日間連日腹腔内投与による制癌効果を示し、0.5、0.125mg/kg投与で約20%の増殖抑制作用を示すことを明らかにしている。NK154183Bは寒天希釈法を用いた最小発育阻止濃度(MIC)の測定により、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対してほとんど抗菌活性を示さないが、カンジダ属に対して特異的に強い抗菌活性(6.25 $\mu\text{g/ml}$)を示すことが判明した。

第二部では農業において収量の増加をもたらすために重要な作物の倒伏防止剤として期待できる物質を微生物二次代謝産物から発見するため、カイワレダイコンを用いたスクリーニング系を構築し、その生長を抑制する新規生理活性物質（ピロネチンおよびNK10958P）を単離、構造決定したことについて述べている。

第一章ではイネやコムギなどの収量や品質の低下を防ぎ、さらに機械による収穫効率の向上をもたらす作物倒伏防止剤として期待できる新規生理活性物質の発見を目標とした経緯を述べている。

第二章では植物生長抑制物質のスクリーニング方法と選抜した生理活性物質の生産菌同定および単離精製について述べている。すなわち、放線菌*Streptomyces* 属の一菌株NK10958が植物生長抑制物質を培養液中に生産していることを見だし、その活性物質を培養液中から溶媒抽出およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより2つの活性成分に単離精製し、それぞれをピロネチンおよびNK10958Pと命名した。

第三章ではピロネチンおよびNK10958Pの構造解析について述べている。2つの活性成分の内、生産量の多いピロネチンを用いてMS、IRおよびNMRスペクトルの解析により δ ラクトン構造を有する新規化合物であることを明らかにし、さらに、X線結晶構造解析および改良Mosher法により、その構造を(5R,6R)-5-ethyl-5,6-dihydro-6-((E)-(2R,3S,4R,5S)-2-hydroxy-4-methoxy-3,5-dimethyl-7-nonenyl)-2H-pyran-2-oneであると決定した。もう一方の活性物質であるNK10958Pはピロネチンとのスペクトルデータの比較検討により、ピロネチンのデメチル体であると決定している。（図参照）

第四章ではピロネチンおよびNK10958Pの生理活性について述べている。ピロネチンおよびNK10958Pは、ともに125ppmの濃度でソルガムに対し約50%の生長抑制活性を示し、さらに、両物質ともイネおよびコムギに対しても生長抑制作用を示し、その活性は茎葉部より根部に対してより強く生長抑制活性を示すことを明らかにしている。また、ピロネチンがヒト卵巣癌細胞の細胞周期をG2+M期で停止させることを明らかにしている。

第三部では農作物に多大な被害をもたらしているナミハダニの防除が期待できる物質を微生物二次代謝産物から発見するため、ナミハダニを用いたスクリーニング系を構築し、その殺ダニ活性を有する新規生理活性物質（グアラマイシン）を単離、構造決定したことについて述べている。

第一章では、農業用害虫であるナミハダニの繁殖力が強く、集団で生活をするため近親交配が容易に起き、速やかに薬剤抵抗性を獲得することから、既存薬と作用の異なる新規殺ダニ活性物質の発見を目標とした経緯を述べている。

第二章では殺ダニ活性物質のスクリーニング方法と選抜した生理活性物質の生産菌同定および単離精製について述べている。すなわち、放線菌 *Streptomyces* 属の一菌株NK11687が殺ダニ活性物質を培養液中に生産していることを見だし、その活性物質を培養液中から活性炭、陽イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーにより単離精製し、グアラマイシンと命名した。

第三章ではグアラマイシンの構造解析について述べている。そのMS、IRおよびNMRスペクトルの解析により、gulosamineとgalactoseを含有する異常アミノ酸であることを明らかにしている。さらに、グアラマイシンのメタノリシスを行った後、アグリコン部分と二糖部分とに分離し、結晶化したアグリコン部分の絶対構造をそのX線結晶構造解析により明らかにしている。また、二糖部分は無水酢酸/ピリジンの条件でアセチル化物へ導き、単離精製後その分子旋光度から絶対構造を推定した。その推定に基づきグロサミンとメチル- α -ガラクトシドより二糖部分を合成し、天然物由来の誘導体と物理化学的性質を比較することにより二糖部分の絶対構造をD-D糖の組み合わせであることを確証している。これらのX線結晶構造解析および合成的手法を用いることによりグアラマイシンの構造を(2R, 3S, 4S)-2-O-[4-O-(2-amino-2-deoxy- β -D-gulopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]-2, 3, 4-trihydroxy-4-[(2S, 3S, 4S, 5S)-3, 4-dihydroxy-5-hydroxy-methylpyrrolidin-2-yl]butanoic acidであると決定している。(図参照)

第四章ではグアラマイシンの生理活性について述べている。グアラマイシンは250 μ g/mlの濃度で野生のナミハダニに対して100%の殺ダニ活性を示すことを明らかにしている。さらに、グアラマイシンが既存の合成殺ダニ剤ケルセンに抵抗性のナミハダニに対して野生のナミハダニと同等の活性を示すことを明らかにし、既存薬と作用の異なる新規物質であることを見いだしている。グアラマイシンはグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対してほとんど抗菌活性を示さず、また、ヒト卵巣癌細胞に対する細胞増殖抑制作用が極めて弱いことを明らかにしハダニ以外の動植物に害を与えない可能性を示している。

