

博士論文

論文題目 複合培養法を用いた希少放線菌からの創薬資源探索

氏名 星野 翔太郎

目次

略語表

序論

1. 二次代謝産物と創薬研究	1
2. 放線菌と二次代謝産物	3
3. 微生物に対する休眠生合成遺伝子の活性化	6
4. 複合培養法の開発と応用	13
5. 本研究の目的	15
6. 参考文献	16

本論

第 1 章

複合培養法により得られた希少放線菌由来 新規 polyene macrolactam 類の単離構造決定

1-1. 概要	21
1-2. 複合培養による希少放線菌 <i>Micromonospora wenchangensis</i> HEK797 株に対する Dracolactam 類の産生誘導	22
1-3. Mirilactam 生産菌 <i>Actinosynnema mirum</i> ATCC29888 株に対する 複合培養法の適用及び新規 mirilactam 誘導体の創出	39
1-4. 小括	49
1-4. 実験項	50
1-5. 参考文献	58

第 2 章

未探索希少放線菌に対する複合培養法の適用

及び新規生物活性物質の獲得

2-1. 概要	60
2-2. <i>Umezawaea</i> 属放線菌に対する複合培養法の適用と 新規 polycyclic tetramate macrolactam 類の単離構造決定	61
2-3. <i>Catenuloplanes</i> 属放線菌に対する複合培養法により得られた 新規ヘテロ環含有ペプチド catenulobactin 類の単離構造決定	74
2-4. <i>Thermobifida</i> 属放線菌に対する複合培養法の適用と生産誘導 された新規アルカロイド類の単離構造決定	85
2-5. 小括	90
2-6. 実験項	91
2-7. 参考文献	98

総括と展望

謝辞

業績

略語表

A domain	Adenylation domain
BAC	Bacterial artificial chromosome
B3LYP	Becke-3-parameter-Lee-Yang-Parr
C domain	Condensation domain
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMP	2,2-Dimethoxy propane
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
(DQF-)COSY	(Double-quantum filtered-)Correlation spectroscopy
ECD	Electronic circular dichroism
ESI-MS	Electrospray ionization-Mass spectrometry
Et ₃ N	Triethylamine
Fe(acac) ₃	Iron(III) acetylacetonate
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectrometry
GFP	Green fluorescent protein
HDAC	Histone deacetylase
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-TOFMS	High resolution-Time of flight mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
ISP	International <i>Streptomyces</i> project
LB	Luria-Bertani
(LC-)HRMS	(Liquid chromatography-)High resolution mass spectrometry
MeOzn	Methyl oxazoline
MMFF94	Merck molecular force field 94
MNBA	2-Methyl-6-nitrobenzoic anhydride
MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>

MTPA	2-Methoxy-2-trifluoromethylphenylacetic acid
MTT	Methyl thiazole-tetrazolium
NITE	National Institute of Technology and Evaluation
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
NRPS	Non-ribosomal peptide synthetase
OPLS3	Optimized potentials for liquid simulations 3
Orn	Ornithine
PCR	Polymerase chain reaction
PCM	Polarizable continuum model
pH	potential of hydrogen
PKS	Polyketide synthase
PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate
PTM	Polyene tetramate macrolactam
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Sal	Salicylic acid
SARP	<i>Streptomyces</i> antibiotic regulatory protein
SBHA	Suberohydroxamic acid
(TD-)DFT	(Time dependent-)Density functional theory
T domain	Thiolation domain
TE domain	Thioesterase domain
TFA	Trifluoroacetic acid
TFAA	Trifluoroacetic acid anhydride
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
Thr	Threonine
TZVP	Triple-zeta valence with polarization
UV	Ultraviolet

序論

1. 二次代謝産物と創薬研究

代謝とは生物が外界から取り入れた物質を変化させる過程であり、大きく**一次代謝**(primary metabolism)と**二次代謝**(secondary metabolism)に分類される。このうち一次代謝は生命活動(発生、生殖等)において必須とされる代謝経路全般を指す。糖、脂質、アミノ酸、核酸などは一次代謝の過程で生合成される化合物であり、これらは総称して**一次代謝産物**(primary metabolites)と呼ばれている。これに対して二次代謝は一次代謝以外の代謝経路、即ち生命活動を維持する上では必ずしも必要でない代謝経路全般を指す用語であり、二次代謝を通じて生合成される化合物は**二次代謝産物**(secondary metabolites)と総称される(但し一次代謝と二次代謝の境界は必ずしも明確ではなく、ある生物種では一次代謝的に作用している代謝経路でも他の生物種では二次代謝的に機能している場合もある)。

一次代謝経路は生物種を超えて保存されている場合が多く、例えば DNA や RNA を形成する核酸分子やタンパク質の構成要素となるアミノ酸など一次代謝産物については生物間の種差は小さい。その一方で二次代謝経路については生命維持に必須でないことから推測出来るように生物種による差異が極めて大きく、例えば植物が生産する二次代謝産物の種類は実に100万を超えるとされている。二次代謝産物の中には陸生植物の構造維持の為に必要であるリグニン類、ツチハンミョウなどの甲虫が分泌する毒性物質 cantharidin、雌のカイコガが性フェロモンとして分泌する bombykol など役割が明確なものも一部存在するが、大半の二次代謝産物の生物学的意義は依然として不明である。

上述のように二次代謝産物の生物学的意義は未解明な部分が多いが、極めて多様な構造を持つ二次代謝産物の中には疾病治療に対して有用な生理活性を持ち医薬品開発に結び付いたものが数多く存在する。中でも植物に含まれる二次代謝産物は生薬などの形で自然科学が成熟する遥か昔の時代から疾病治療に用いられており、例えばケシから採取されるアヘン(乳液を乾燥させたもの)は鎮痛剤として紀元前 3000 年頃にはシュメール人によって既に利用されており、また紀元前 400 年頃には古代ギリシャの医師 Hippocrates が柳の樹皮に解熱鎮痛剤としての作用がある事を記している。その後 18 世紀半ばから 19 世紀に起こった産業革命により自然科学が急速に発展すると、薬用植物に含まれる有効成分の単離同定研究が盛んに行われた。例えば上述のアヘンからは 1804 年にドイツの薬剤師 Sertürner が強力な鎮痛作用を持つ化合物を単離し morphine と命名した。また柳の樹皮からは 1830 年にフランスの薬剤師 Henri Leroux とイタリアの科学者 Raffaele Piria らが解熱鎮痛作用物質として salicin 及びその分解産物である salicylic acid を単離した。morphine は現在でも末期癌患者に対する疼痛抑制剤として臨床利用されており、salicylic

acid についてはそのアセチル誘導体が 1899 年に aspirin の名でバイエル社から上市されて以来、現在に至るまで市販の医薬品としてアメリカ合衆国を中心に幅広く利用されている。その後もタイハイヨウイチイの樹皮から単離された抗がん剤 taxol やクソニンジンより単離された抗マalaria薬 artemisinin など、植物中の二次代謝産物が医薬品開発に繋がった例は枚挙に暇がなく (artemisinin の発見者である中国の屠呦呦博士はこの業績により 2015 年度のノーベル医学・生理学賞を受賞している)、人類の歴史の中で植物由来の二次代謝産物は古代から現代に至るまで医薬品開発において重要な役割を果たして来た。

一方で糸状菌や放線菌といった微生物により産生される二次代謝産物については 20 世紀に入るまで殆ど研究されて来なかったが、「近代細菌学の開祖」として名高いドイツの Koch 及びフランスの Pasteur らによって微生物の分離培養手法が確立され、更に 1928 年にイギリスの Fleming がアオカビから世界初の抗生物質 (= 微生物が産生し、他の微生物や細胞に対して発育や増殖を阻害する化合物) である penicillin を発見すると、微生物が産生する二次代謝産物についても大きな注目が集まるようになった (Fleming はこの業績によって 1945 年にノーベル医学・生理学賞を受賞した)。例えば Waksman らは 1943 年に放線菌 *Streptomyces griseus* より抗結核薬 streptomycin を発見し、1979 年には大村らにより放線菌 *Streptomyces avermitilis* から駆虫薬 avermectin が単離された (前者は 1953 年に後者は 2015 年にそれぞれノーベル医学・生理学賞を受賞している)。この他にも多くの医薬品あるいは医薬品シード化合物が様々な微生物から単離されており、現在では微生物が産生する二次代謝産物は医薬品開発の観点において植物と双璧を為す存在となっている。更に近年の研究から海綿やホヤといった海洋無脊椎動物に含まれている二次代謝産物の大半は、それらの共生微生物が真の生産者であることが強く示唆されている。

植物や微生物が産生する二次代謝産物はコンビナトリアル化学により得られた低分子化合物と比較して大きな分子量を持ち、また多数の不斉中心を含む複雑な三次元構造を有することから、薬効標的分子に対する複雑な相互作用を実現して強力な生物活性や高い選択毒性を示す場合が多い。実際 1981 年から 2014 年までの間に上市された 1211 種類の低分子医薬品のうち純粋な合成医薬品は 35% にあたる 420 種類に留まっており、残りの 65% については二次代謝産物やその誘導体或いはそれらを模倣して化学合成された化合物等何らかの形で二次代謝産物に着想を得た化合物となっている¹。

現在臨床においては多剤耐性菌の出現や薬剤耐性を示すがん細胞の出現が大きな問題となっており、既存の医薬品とは異なる分子標的やメカニズムを有する医薬品の開発が急務となっている。従って新規二次代謝産物の探索研究は今後の創薬研究において、依然として重要な意義を持つ。

2. 放線菌と二次代謝産物

前節で述べた通り微生物は多様な二次代謝産物の生産者であるが、その中でも真正細菌(bacteria)の一種である**放線菌**は極めて高い二次代謝産物の生産能力を有している。放線菌は土壌・海水・動植物など幅広い環境中に分布しているグラム陽性細菌であり、前節で挙げた streptomycin や avermectin に加え *Streptomyces tsukubaensis* が産生する免疫抑制剤 tacrolimus、*Amycolatopsis orientalis* が産生する抗 MRSA 抗生物質 vancomycin、*Saccharopolyspora erythraea* が産生する抗生物質 erythromycin 或いは *Actinoplanes* 属放線菌から単離された血糖降下作用薬(Ⅱ型糖尿病治療薬)である acarbose など真正細菌が産生する抗生物質やその他の生物活性物質のうち、実に半数が放線菌由来であるとされている(図 1)²。

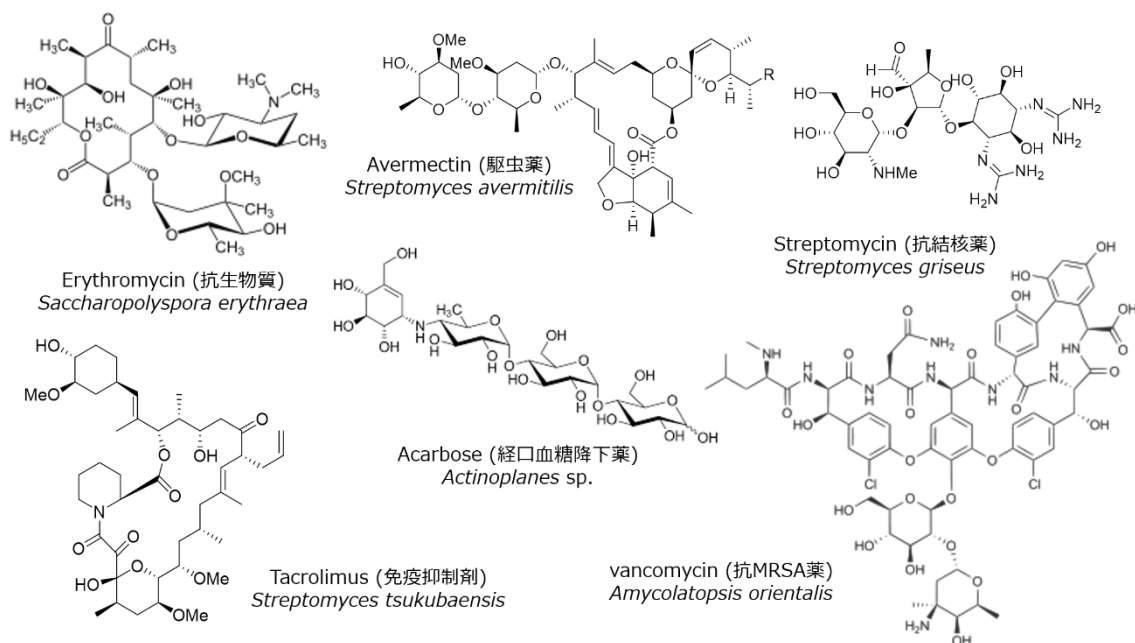


図 1: 放線菌が産生する代表的な医薬品

放線菌の中でも ***Streptomyces*** 属は分離頻度が高く、これまで 650 を超える種が同定されるなど放線菌の大部分を占める属である。更に *Streptomyces* 属は放線菌の中でも特に優れた二次代謝産物の生産能力を有しており、先程挙げた streptomycin、avermectin 及び tacrolimus の他にも数多くの二次代謝産物が *Streptomyces* 属放線菌より単離され、その数は放線菌由来二次代謝産物の約 75%に当たるとされている³。一方で *Streptomyces* 属以外の放線菌は環境からの分離頻度が比較的低いことから**希少放線菌**と呼称される(*Streptomyces* 属以外にも比較的分離頻度の高い属は存在し、これらを含めて希少放線菌と呼称する事については議論が分かれているが、以降本論文においては *Streptomyces* 属以外の放線菌を指して希少放線菌と呼称する)。一般に希少放線菌は *Streptomyces* 属と比

較して二次代謝産物の産生能力に劣るとされているが、vancomycin 生産菌 *Amycolatopsis orientalis* や erythromycin 生産菌 *Saccharopolyspora erythraea* など、幾つかの希少放線菌では *Streptomyces* 属同様高い二次代謝能を有しており、生産される二次代謝産物の中には優れた生物活性を有するものも多い⁴⁻⁶。更に希少放線菌が産生する二次代謝産物の探索研究は *Streptomyces* 属と比較して進んでおらず、希少放線菌は新規二次代謝産物を開拓する上で重要な資源になることが期待されている。

20 世紀における放線菌を含めた微生物の二次代謝産物探索研究といえば、微生物の純粋培養液から特定の生物活性を指標として目的の活性を有する化合物を探索するという方法が主流であった。1990 年代後半になるとインフルエンザウィルスに始まり、大腸菌 (*Escherichia coli*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などの全ゲノム解析が報告されるようになったが、その莫大なコストから二次代謝産物の探索にゲノム情報を利用することは困難であった。しかし 21 世紀に入るとゲノム解析の低廉化が急速に進み、目的微生物のゲノム情報を比較的容易に得られるようになった。放線菌についても 2002 年にモデル放線菌の 1 種である *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株の全ゲノム DNA 配列が初めて報告されると⁷、翌 2003 年には avermectin 生産菌 *Streptomyces avermitilis* 株⁸、2008 年には streptomycin 生産菌 *Streptomyces griseus* 株⁹ の全ゲノム配列が報告されるなど、*Streptomyces* 属のゲノム解析が急速に進められるようになった。そしてその結果、*Streptomyces* 属放線菌は従来想定されていたよりも遥かに多くの**二次代謝産物生合成遺伝子クラスター**を保有していることが明らかとなった。例えば上述の *S. avermitilis* 株については 1979 年における avermectin の発見以来極めて精力的に二次代謝産物の探索研究が行われており、これまでに 20 種類以上の二次代謝産物が単離されている。その一方でゲノム解析から *S. avermitilis* 株は少なくとも 38 種類の生合成遺伝子クラスターを保有していることが明らかとなったが、このうち実際に二次代謝産物として同定されたものは 16 種類に過ぎなかった¹⁰。即ち最も精力的に二次代謝産物の探索研究が行われてきた株でさえも、保有する生合成遺伝子クラスターの約 4 割(16/38 ≒ 42%)に相当する二次代謝産物が同定されるに留まっており残る約 6 割は通常の培養条件下では発現しない「休眠生合成遺伝子」と考えられる。そしてこの休眠生合成遺伝子クラスターの割合は他の株では更に高いものと考えられる。

その後、希少放線菌を含む放線菌のゲノム配列の解読が各所で進められ、2015 年には Metcalf らの研究グループが 830 種類の放線菌株 (341 種類の *Streptomyces* 属放線菌及び 489 種類の希少放線菌) に対してゲノム配列の解読と各株が保有する生合成遺伝子クラスターの網羅的解析を行った¹¹。その結果、想定されていた通り *Streptomyces* 属を含む *Streptomycetales* 目の放線菌が最も多くの生合成遺伝子クラスターを保有していたが (21.6/genome)、同時に *Pseudonocardiales* 目 (19.8/genome)、*Streptosporangiales*

目 (15.0/genome)、或いは *Micromonosporales* 目 (13.3/genome) に属する幾つかの希少放線菌については *Streptomyces* 属放線菌に匹敵する生合成遺伝子を保有しており、その大半が休眠状態にある事が明らかとされた (一方で *Micrococcales* 目や *Propionibacteria* 目のように殆ど生合成遺伝子クラスターを持たない希少放線菌も存在した)。また、Metcalf らは放線菌の有する生合成遺伝子クラスター間の相同性は放線菌の 16S rDNA 配列相同性に強い相関があることも明らかとした。即ち 16S rDNA 配列が大きく異なる *Streptomyces* 属とそれ以外の希少放線菌では保有する生合成遺伝子クラスターの組成は大きく異なり、結果として生産される二次代謝産物についても大きく異なることを示している。

Taxon	PKS type I	NRPS	PKS type II	Lant	TOMM	NIS	Genomes	Per-genome average
Streptomycetales	5.4	7.9	1.7	2.7	1.2	2.6	341	21.6 (3-43)
Pseudonocardiales	7.5	7	1	2.6	1	0.6	40	19.8 (1-44)
Streptosporangiales	2.9	5.8	0.5	3	1.6	1.1	14	15.0 (0-26)
Micromonosporales	4.6	4	1.3	1.4	0.7	1.3	19	13.3 (2-18)
Frankiales	4.9	1.3	1.6	1.5	0.4	0.5	11	10.2 (0-17)
Corynebacteriales	4.1	3.8	0.2	0.1	0.1	0.2	238	8.4 (0-31)
Micrococcales	0.1	0.3	0	0.2	0.1	0.3	67	1.1 (0-5)
Propionibacteriales	0	0.2	0	0.2	0	0	81	0.4 (0-8)

図 2: 各放線菌種(目)における二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの分布 (PKS: polyketide synthase, NRPS: non-ribosomal peptide synthase, Lant: Lantipeptide, TOMM: thiazole-oxazole modified microcins, NIS: NRPS independent siderophore)

このようにゲノム情報から放線菌は膨大な数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを保有し、それらの大部分が休眠状態にあることが明らかとされた。現在放線菌から新規二次代謝産物を獲得する上では**如何にしてこれら休眠生合成遺伝子を活性化させるかが重要な課題となっている。**

3. 微生物に対する休眠生成遺伝子の活性化

放線菌に対するゲノム解析により明らかとなった大量の休眠生成遺伝子クラスターは新規二次代謝産物を獲得する上で重要なターゲットであり、現在ではこれら休眠遺伝子群をいかに効率的に活性化するかが課題となっている。本節では放線菌を含む微生物の二次代謝を活性化させる代表的なアプローチについて記述する。

培養条件の検討

古典的であるが、培養条件の詳細な検討は微生物における休眠生成遺伝子の活性化を引き起す上で極めて重要である。例えば微生物の栄養源として特に重要とされる炭素、窒素及びリンなどは、その供給源を変化させることで微生物の二次代謝に大きな影響を与えることが知られている¹²。これは一次代謝と二次代謝が完全に独立した経路を持つ訳では無くその代謝経路を部分的に共有している事に起因しており、各種栄養源を変えることで微生物における一次代謝の流れが変動し、それに呼応する形で二次代謝にも影響が及ぶとされている。また、鉄や亜鉛といった主要な金属イオンは酵素タンパク質の機能発現や転写調節因子タンパク質の構造維持に必要とされており、その存在もまた二次代謝生産に影響を与えることが知られている。更に主要な金属イオン以外にも Sc^{3+} や Ce^{3+} といった希土類元素を培地中に添加する事で放線菌における休眠遺伝子の活性化が起こる事も報告されている¹³。更に特殊な例として、培地成分中の水素原子を全て重水素へと置き換えることで糸状菌における二次代謝産物の生産誘導が引き起こされることも近年報告されている¹⁴。また、培養温度、培養様式（震盪培養/静置培養、固体培養/液体培養...）、培養日数などの培地組成以外の要因が微生物の二次代謝生産に大きな影響を与える場合もある。

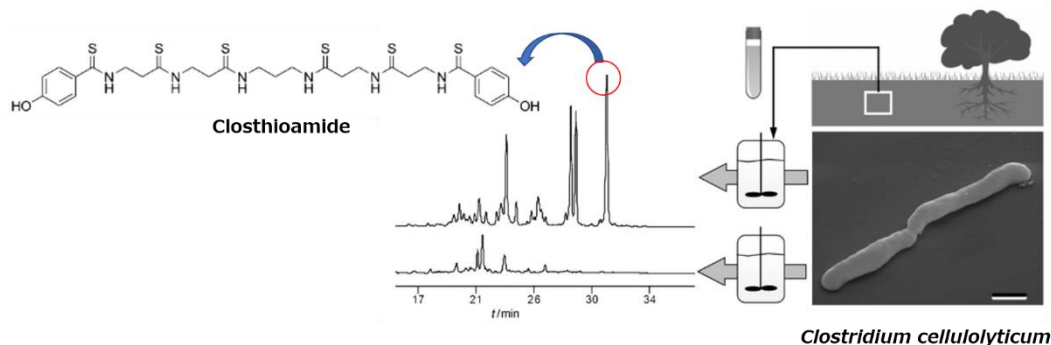


図 3: 土壌抽出物添加による土壌嫌気性細菌 *Clostridium cellulolyticum* に対する新規抗生物質 closthoamide の産生誘導

この他に微生物の培養条件を元々の生育環境に近づけることによって、休眠遺伝子の活性化が引き起こされた例も存在する。例えば海洋環境から単離された微生物については

人工海水や実際の海水を用いた生産培地が使用される場合が多く、実際に淡水性培地と比較して二次代謝生産が誘導される例も報告されている¹⁵。土壌細菌に関しても Hertweck らが汎用培地では二次代謝生産を行わない嫌気性土壌細菌 *Clostridium clulolyticum* に関して、培養液中に土壌抽出物を添加する事で特異な poly-thioamide 構造を有する抗生物質 closthioamide の生産誘導が引き起こされることを報告している(図 3)¹⁶。

エリシター分子による休眠生成遺伝子の活性化

前項とも関連する内容であるが、培地に特定の低分子を添加する事で微生物の二次代謝生産が誘導される場合があり、このような性質を持つ低分子化合物はエリシター (elicitor) と呼称される (図 4)。微生物が種特異的に生産する微生物フェロモン (bacterial pheromone) は代表的なエリシター分子の一つであり、放線菌 *Streptomyces griseus* が産生する A-factor (自身に対する streptomycin 生産誘導活性を示す) やグラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum* が産生する acyl-homoserine lactone (自身に対する紫色素 violacein 産生誘導活性を示す) などが該当する¹⁷。微生物フェロモンとして報告されている化合物の多くは極めて低い濃度 (nM オーダー) で二次代謝誘導活性を示すが、その効力は生産菌自身に限られるなど種特異性が高い場合が殆どである。

微生物フェロモン以外にも、抗生物質として知られる化合物の中には有効濃度より低い濃度域 (sublethal concentration) ではエリシター活性を持つものが知られている。例えばモデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株に、lincomycin や erythromycin 等の抗生物質を最小阻止濃度に対して 1/10 程度の濃度となるように培地に添加することで、色素性抗生物質 actinorhodin の生産誘導が引き起こされる¹⁸。また放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 株が産生するペプチド化合物 goadsporin は抗菌活性を持つと共に、より低い濃度域においては放線菌に対する幅広い二次代謝誘導活性を呈する事が報告されている^{19,20}。抗生物質による休眠遺伝子の活性化は微生物フェロモンと比較して有効濃度は 100-1000 倍程度高い (μM オーダー) が、より高い一般性を持つ場合が多い。

一方で、真核生物である糸状菌では負に帯電したゲノム DNA が正に帯電したヒストンタンパク質と複合体を形成して高度な三次元構造 (クロマチン構造) を取っており、その三次元構造をヒストンアセチル基転移酵素 (HDAC) や DNA メチル化酵素などの修飾酵素によって変化させることで epigenetic な遺伝子発現の制御を行っている。従って SBHA (HDAC 阻害剤) や RG-108 (DNA メチル化酵素阻害剤) 等糸状菌の epigenetic 制御を攪拌する低分子を培地添加する事で糸状菌の二次代謝は活性化される (Chemical epigenetic)。Chemical epigenetics は原核生物である真正細菌には適用できないという欠点があるものの糸状菌の休眠生成遺伝子活性化を行う上では極めて強力な手法であり、これまで数多くの新規二次代謝産物が chemical epigenetics を通じて単離されている²¹⁻²³。

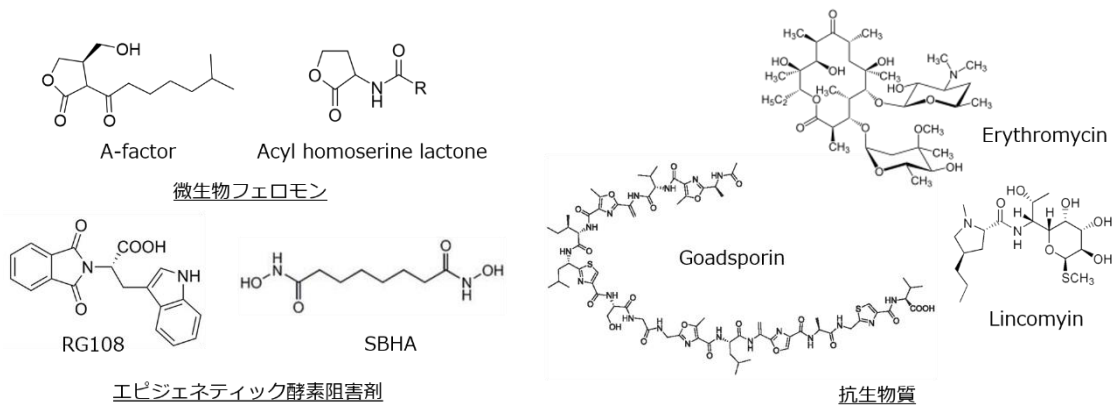


図 4: エリシター活性を有する低分子化合物

その他にも、ターゲットとした休眠生合成遺伝子クラスターを活性化させるエリシター分子スクリーニング系の開発も進められている。Seyedsayamdost らは目的の休眠生合成遺伝子クラスターのプロモーター領域下流に、遺伝子操作で GFP タンパク質遺伝子を挿入する事で化合物のエリシター活性を蛍光強度で評価する簡便なスクリーニング系を開発した (High Throughput Elicitor Screening = HiTES 法)。これにより GFP 遺伝子を導入した微生物を microwell plate 中、エリシター候補化合物の存在下で培養を行って直接蛍光強度を測定する事で、各化合物が持つエリシター活性の網羅的かつ迅速な解析を可能にした (図 5)。これまで HiTES 法を用いることで、*Burkholderia thailandensis* 株における malleilacton 生合成遺伝子に対するエリシター分子として Etoposide 及び trimetoprim²⁴ が、*Streptomyces albus* 株の surugamide 生合成遺伝子クラスターに対するエリシター分子として ivermectin 及びがそれぞれ同定されている²⁵。

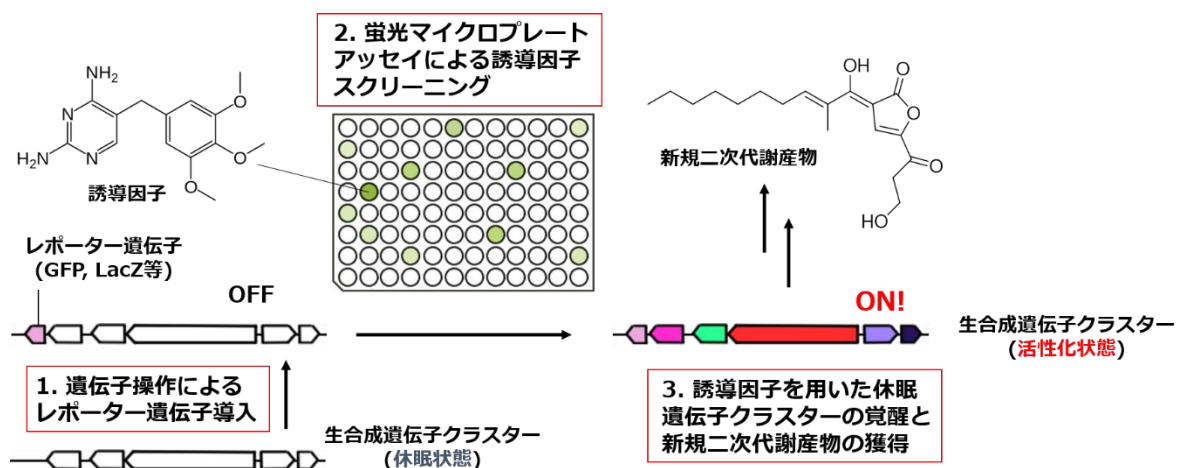


図 5: HiTES 法によるエリシター分子 (誘導因子)探索

遺伝子操作による休眠生合成遺伝子の活性化

ゲノム解析の低廉化が進んだ今日においては微生物に対する遺伝子操作もまた、休眠遺伝子の活性化における有効な手法である。遺伝子操作による休眠生合成遺伝子クラスター活性化のアプローチには幾つかの方向性があるが、代表的なものとしては内在性の転写調節因子を強制発現させる、或いは抑制的に作用している転写調節因子を不活性化させることにより、休眠生合成遺伝子の発現誘導を引き起こす例が挙げられる^{26,27}。

例えば、放線菌では特定の生合成遺伝子クラスター全体の発現を単一の転写因子が制御している場合が多く、このような転写調節因子は SARP (*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein) と呼称される。この SARP を強制発現させることは休眠遺伝子の活性化を行う上で有用なアプローチであり、例えば放線菌 *Streptomyces ambofaciens* 株に存在する SARP 遺伝子の一つを強制発現させることで stambomycin 類の産生誘導が引き起こされる²⁶。逆の例としては微生物フェロモン A-factor の受容体として知られる ArpA 遺伝子を介した転写制御が挙げられる。ArpA は A-factor 非存在下において恒常的に発現しており、より下流の転写カスケードを抑制的に制御することが知られている。一方 A-factor が ArpA 受容体に結合するとこの転写抑制が解除され、結果 streptomycin などの抗生物質の生産が誘導され、ArpA 遺伝子を破壊した場合も同様の現象が確認される²⁷。

また上記のような転写制御因子に対する直接的なアプローチの他に、内在性二次代謝産物の生合成遺伝子を破壊する事も有用な方法である。基本的に二次代謝産物の生合成前駆体は糖、核酸或いはアミノ酸といった一次代謝産物に由来しており、その供給量は有限である。よって通常の条件下で大量生産される二次代謝産物が存在している場合、仮に他の生合成遺伝子クラスターが発現していたとしても前駆体の供給不足から二次代謝産物の生産に結びつかない場合がある。この時大量生産される二次代謝産物の生合成遺伝子を破壊すると前駆体供給が復活し、見かけ上休眠状態にあった遺伝子クラスターについても化合物の生産が誘導される場合がある。例えば放線菌 *Streptomyces rochei* 7434NA4 株は通常 lankacidin 類を主要に産生するが、この生合成遺伝子を破壊する事によって pentamycin や citreodol といった二次代謝産物を新たに産生する事が報告されている²⁸。

このように遺伝子操作に基づく休眠遺伝子の活性化は極めて強力な手法であり、近年では CRISPR-Cas9 system²⁹ によるゲノム編集技術が台頭して来たこともありより盛んに行われている。その一方で遺伝子操作が可能な微生物は依然として限られており、例えば放線菌の中でも *Streptomyces* 属は比較的容易に遺伝子の強制発現や破壊といった遺伝子操作が可能であるが、それ以外の希少放線菌については比較的遺伝子操作が困難なケースが多い。また仮に遺伝子操作が可能であったとしても転写制御因子の強制発現や不活性化が、必ずしも目的とする休眠遺伝子の活性化を引き起こすとは限らずその結論を得るまでに比較的長い実験期間や複雑な実験操作が要求されるなども問題点もある。

異種発現による休眠遺伝子の活性化

異種発現 (heterologous expression)とは、対象となる遺伝子クラスターをゲノム DNA からクローニング後ベクターDNA へと組み込み、本来の生産菌とは異なる宿主微生物 (異種発現宿主)へと導入して間接的に活性化させる方法である。異種発現は目的の生合成遺伝子クラスターを含む DNA 断片さえ得られてしまえば、あとは PCR 反応による目的領域のクローニングを行いベクターへと組み込むのみである為、本来の生産菌に対する遺伝子操作が困難な場合でも適用可能という大きな利点を持つ。更に直接培養が出来ない微生物であっても、土壌や海洋といった環境中から直接抽出された DNA (メタゲノム DNA)の配列を用いることで間接的にその異種発現を行う事が出来る³⁰⁻³²。

異種発現を目的に開発された宿主微生物は大腸菌、放線菌、シアノバクテリア或いは糸状菌など多岐に渡り³³⁻³⁶、内在性の生合成遺伝子の大部分を削除した *Streptomyces avermitilis* SUKA 株のように様々な遺伝子操作を施すことで、効率的な異種発現生合成遺伝子の活性化を可能としている³⁴。

またこれまでは plasmid、fosmid 或いは cosmid などがベクターDNA として用いられ、最長 50 kbp 程度遺伝子クラスターを対象とした異種発現が主流であったが、近年では BAC (Bacterial Artificial Chromosome)と呼ばれるベクターを用いることで 100 kbp を超えるような生合成遺伝子クラスターについても異種発現が可能となっている^{37,38}。例えば 60 員環 macrolide である quinolidomycin 類の生合成遺伝子クラスターは、13 の PKS 遺伝子 (178.8 kbp)を含めその全長は 215 kbp にも及ぶが、BAC ベクターを用いて *Streptomyces avermitilis* 株へと導入する事でその異種発現が達成されている (図 6)³⁸。

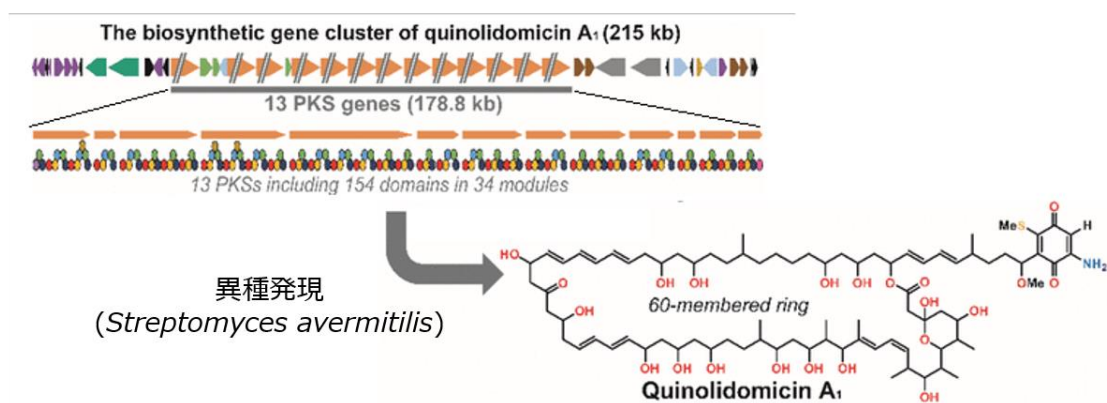


図 6: 異種発現による Quinolidomycin 類の異種生産

上述のような成功例がある一方で異種発現の成否は対象となる生合成遺伝子クラスターと異種発現宿主の相性による所が大きく、複数の実験操作を経て導入した遺伝子クラスターが宿主内で上手く発現しない、或いはその発現量が著しく低い場合も多い。また BAC ベクターを用いた異種発現は現状技術的な障壁が高く、I 型 PKS や NRPS などを含む巨大な生合成遺伝子クラスターの異種発現は依然として容易ではない現状がある。

共培養による休眠生合成遺伝子の活性化

土壌や海洋といった環境中において微生物が単独で生育する事は極めて稀であり、基本的には多様な微生物が環境中において互いに様々な形でコミュニケーションをとっている。更に微生物が持つ遺伝子の中には液体培地や寒天培地などで純粋培養を行っている時には休眠状態にあり、環境中で他の微生物から何らかの刺激を受けることで初めて活性化されるものが数多く存在する。

ある微生物の培養時に他の微生物が共存する状態はコンタミネーションと呼ばれ一般的に微生物培養を行う上では忌避すべき事象とされているが、共培養法 (Co-culture) はこれを逆手に取って 2 種類以上の微生物を一緒に培養する事で、環境中において見られる微生物間コミュニケーションを再現し休眠生合成遺伝子の活性化を狙う培養手法である。共培養を通じて新たな二次代謝産物の生産誘導が引き起こされた事例は数多く報告されているが、そのパターンは次に述べる通り大きく三通りに分類される (図 7 A-C)。

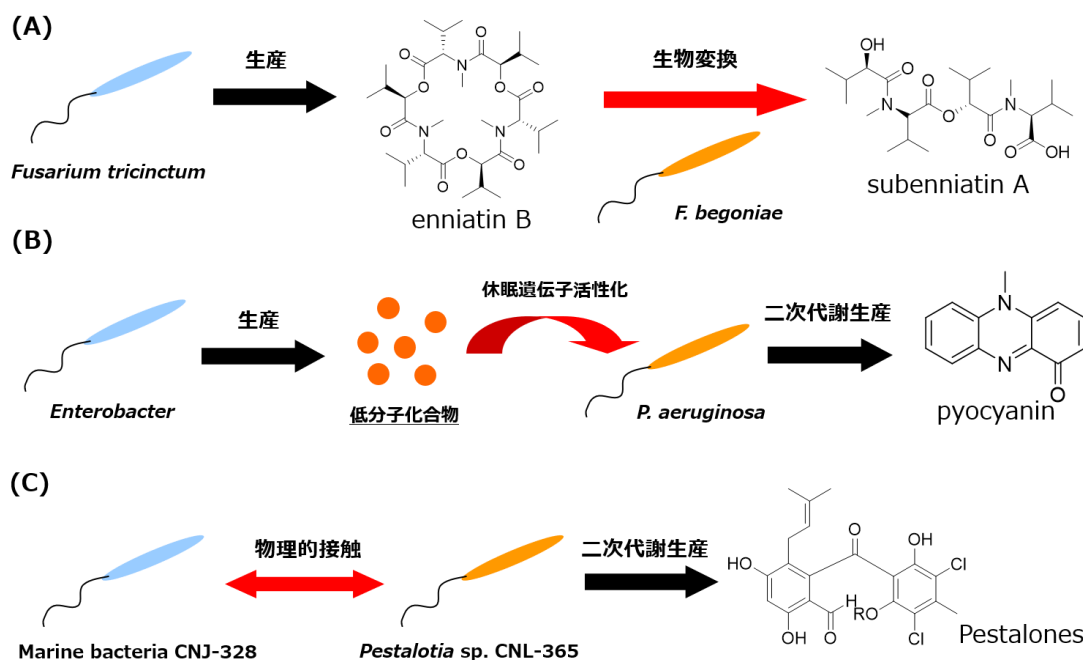


図 7: 共培養による二次代謝産物生産誘導メカニズム (A: 生物変換 B: 化学的相互作用 C: 物理的相互作用)

一つ目の例として、二種類の *Fusarium* 属糸状菌 *F. tricinctum* 株と *F. begoniae* 株との共培養で生産誘導された新規ペプチド subenniain 類の例が挙げられる³⁹。これは *F. tricinctum* が産生する enniain 類をもう一方の *F. begoniae* が更に代謝することで生じた化合物であることが分かっており(図 7-A)³⁹、この類型は**生物変換型** (bioconversion)と呼ばれる。生物変換型の共培養においては休眠遺伝子の活性化を伴わない場合も多いが、生物変換に関わる遺伝子の発現が共培養により活性化される例も存在する。

二つ目の例として、グラム陰性細菌 *Pseudomonas aeruginosa* は *Enterobacter* 属細菌の共存下で青色色素 pyocyanin を新たに産生することが報告されており、この事象は *Enterobacter* 側が産生する何らかの低分子が *P. aeruginosa* に作用する事で引き起こされることが明らかとなっている (図 7-B)⁴⁰。このように、一方の微生物が産生する低分子に反応してもう一方の微生物における休眠生合成遺伝子が活性化されるケースは**化学的相互作用型** (chemical interaction)と呼ばれており、前述した抗生物質によるエリシター活性化などは微生物間における化学的相互作用の一環として捉えることが出来る。

三つ目の例としては、海洋性微生物 CNJ-328 株と海洋性糸状菌である *Pestalotia* sp. CNJ-365 株の共培養によって引き起こされた、新規 benzophenone 類である pestalone の生産誘導が挙げられる⁴¹。このケースでは *Pestalotia* 属糸状菌における pestalone 類の生産誘導が 2 種類の微生物間の物理的接触によって引き起こされたことが分かっており、このようなタイプは**物理的相互作用型** (physical interaction)と呼ばれている (図 7-C)。

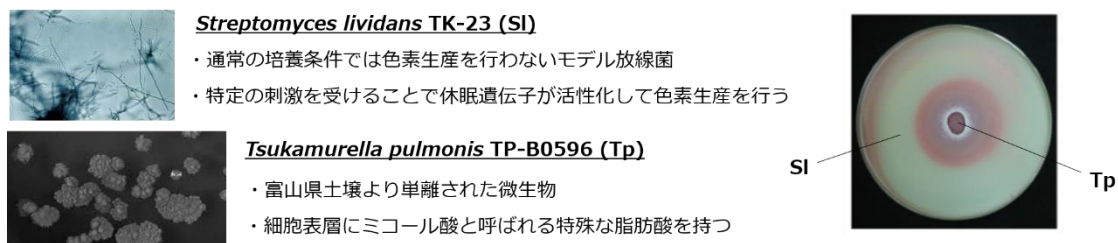
共培養法に基づく休眠遺伝子の活性化は目的とする 2 種類以上の微生物を一緒に培養するだけで達成されるため、一度適切な組み合わせの微生物を同定してしまえばその後の実験操作は極めて簡便であり、共培養法の大きな利点と言える。また、先述のエリシター分子を介した休眠遺伝子の活性化も実験操作は簡便であるが、エリシター分子自体が高価などの理由から大量調製が困難な場合も多く、培養スケールを容易に上げることが出来る共培養法はこの点においても優れていると言える。しかしながら従来の共培養法では膨大な微生物の組み合わせをスクリーニングする必要があるなど、「**適切な組み合わせ**」の微生物を発見する事自体が大変な作業であった。更に、適切な組み合わせの微生物を見つけた場合でも**相互作用の種特異性が強い**ために他の微生物に対する応用が出来ないことが多く、従来の共培養法は欠点も大きい手法であった。

4. 複合培養法の開発と応用

共培養法は前節の最後で述べた通り実験操作の簡便さやコストの低さなどの優れた特徴を持ちながら、適切な組み合わせの微生物を見つける為に多大な労力を要するなど総合的には使い勝手に難があった。しかしながら、仮に幅広い微生物と相互作用を行いその休眠生成遺伝子を普遍的に活性化するような微生物を同定することが出来れば、共培養法の持つ利点を維持しつつスクリーニングに用いる組み合わせの一方をその微生物を固定する事で、スクリーニング規模の大幅縮小が可能となるためその利便性は飛躍的に上昇する。

上記の考え方に基づき *Streptomyces* 属放線菌に対する幅広い二次代謝誘導能を持つ微生物を探索する為、尾仲らはモデル放線菌 *Streptomyces lividans* TK-23 株を播種した寒天培地を利用した網羅的な共培養スクリーニングを行った。*S. lividans* TK-23 株は2種類の色素性抗生物質 (actinorhodin 及び undecylprodigiosin)の生合成遺伝子クラスターを持つが、通常の寒天培養では休眠状態であり特定の刺激を受容した時にのみ色素生産を行う為、放線菌に対する休眠生成遺伝子の活性化能を評価する目的でしばしば使用される。この共培養スクリーニングの結果、富山県土壌由来の細菌 TP-B0596 株が *S. lividans* 株に対する色素生産誘導活性を持つことが見いだされ、16S rRNA 遺伝子の配列から *Tsukamurella pulmonis* であると同定された (図 8-A)⁴²。

(A)



(B)

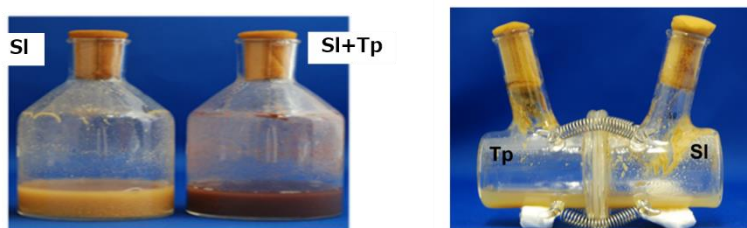


図 8: (A) ミコール酸含有細菌 (*T. pulmonis* TP-B0596 株)による寒天培地上でのモデル放線菌 (*S. lividans* TK-23 株)に対する色素産生誘導 (B) ミコール酸含有細菌は液体培養においても TK-23 株の色素生産を誘導するが(左)、両者の培養液を低分子のみ透過させる半透膜で仕切った場合色素生産は消失する(右)

TP-B0596 株を含めた *Tsukamurella* 属もまた *Corynebacteriales* 目に分類される放線菌の一種であるが、*Streptomyces* 属とは異なり保有する生合成遺伝子クラスター数は比較的少なく (図 2)、近縁種と共に細胞表層にミコール酸と呼ばれる特徴的な脂肪酸構造を保有することから**ミコール酸含有細菌**とも呼称される。尾仲らは TP-B0596 株以外の複数のミコール酸含有細菌についても *S. lividans* 株に対する色素産生誘導能を持つ事を見出した。更に尾仲らはその誘導能力はミコール酸欠損株では失われるがミコール酸そのものや、ミコール酸構造を維持した死菌体を共培養した場合には色素生産は起こらない事も明らかとしている^{42,43}。ミコール酸含有細菌が *S. lividans* 株の色素生産を引き起こす具体的なメカニズムは解明されていないものの、上述のミコール酸要求性に関する知見及び両者を低分子のみ透過させる半透膜で仕切って液体培養した場合には色素生産が起こらなかった事などから(図 8-B)、表層にミコール酸構造を保持した生細菌が *S. lividans* に対する積極的な物理的接触を行うことが引き金になっているものと考えられている。更に尾仲らはミコール酸含有細菌 TP-B0596 株を 100 種類以上の *Streptomyces* 属放線菌を対象に共培養を行いその代謝プロファイル変化を HPLC により分析した所、その多くについて二次代謝産物の生産誘導が見られ、同様の現象は *Corynebacterium glutamicum* など他のミコール酸含有細菌でも発生することを明らかとしている⁴²。

以上のことよりミコール酸含有細菌を用いた共培養は *Streptomyces* 属放線菌に対する普遍的な休眠生合成遺伝子の活性化手法であることが強く示唆され、従来の共培養法が持つ欠点を解消した新たな手法として**複合培養法**と命名された。複合培養法はこれまで多くの *Streptomyces* 属放線菌に対して適用されており、*S. endus* S-522 から単離された新規抗生物質 alchivemycin 類^{42,44,45}を筆頭に多くの新規二次代謝産物の獲得に結び付いている (図 9)^{46,47}。

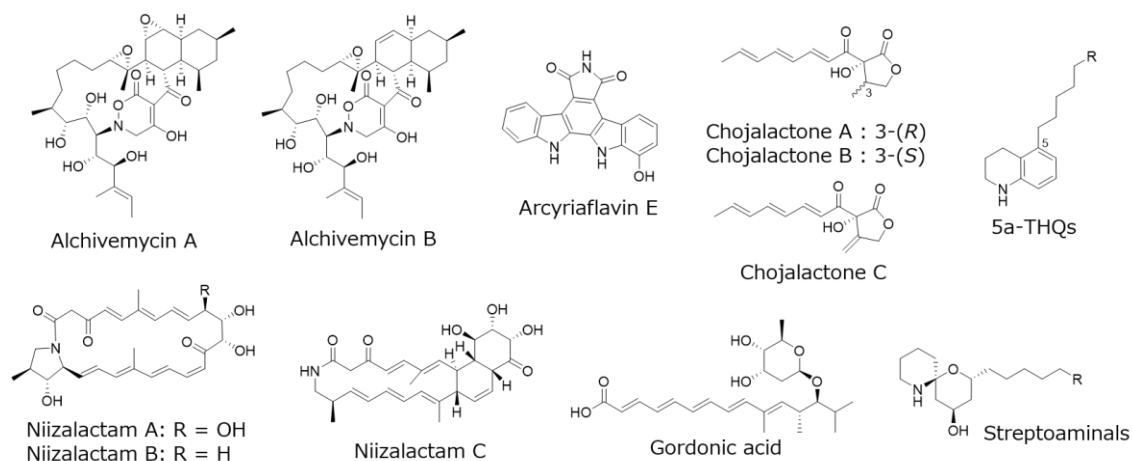


図 9: *Streptomyces* 属放線菌に対する複合培養を通じて得られた新規二次代謝産物

5. 本研究の目的

複合培養法は簡便かつ高い効率で *Streptomyces* 属の休眠遺伝子を活性化させる手法としてその地位を確固たるものとしてきた。そこで本研究ではこの複合培養法の対象を *Streptomyces* 属の壁を越え希少放線菌に対しても適用する事によって、更なる休眠生合成遺伝子の活性化及び新規二次代謝産物の獲得を目指した。前述の通り希少放線菌の中には *Streptomyces* 属に匹敵する数の生合成遺伝子クラスターを持ちながら、分離頻度が低いなどの理由から生産される二次代謝産物については見過ごされてきた種も多く存在する。また *Streptomyces* 属放線菌と違い、希少放線菌では遺伝子操作や異種発現が困難な生合成遺伝子クラスターも多くエリシター分子に関する知見も少ない。従って複合培養法が希少放線菌に対して適用可能であることが明らかとなれば、希少放線菌に眠る新規二次代謝産物を発掘する上で重要なツールとなる。

本研究では土壌から単離した株や寄託スクリーニング株など合計 40 種類の希少放線菌に対して、ミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株を用いた複合培養スクリーニングを行い、それにより得られる新規二次代謝産物の構造解析に着手した。

6. 参考文献

- [1] Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629–661.
- [2] Bérdy J (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58:1–26
- [3] Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5), 386–390.
- [4] Udvary, D. W., Zeigler, L., Asolkar, R. N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Moore, B. S. (2007). Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10376-10381.
- [5] Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 108–132.
- [6] Son, S., et al. (2018). Catenulisporolides, Glycosylated Triene Macrolides from the Chemically Underexploited Actinomycete *Catenulispora* Species. *Organic Letters*, 20(22), 7234–7238.
- [7] Thomson, N. R., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(2), 141-147.
- [8] Ikeda, H., et al. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 21(5), 526–531.
- [9] Ohnishi, Y., et al. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4050–4060.
- [10] Ikeda, H., Shin-Ya, K., & Omura, S. (2014). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 233–250.
- [11] Doroghazi, J. R., et al. (2014). A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nature Chemical Biology*, 10(11), 963–968.

- [12] Doull, J. L., & Vining, L. C. (1990). Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 32(4), 449–454.
- [13] Tanaka, Y., Hosaka, T., & Ochi, K. (2010). Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Antibiotics*, 63(8), 477–481.
- [14] Wang, B., et. al. (2015). Transferring Fungi to a Deuterium-Enriched Medium Results in Assorted, Conditional Changes in Secondary Metabolite Production. *Journal of Natural Products*, 78(6), 1415–1421.
- [15] Raju, R., Piggott, A. M., Conte, M. M., & Capon, R. J. (2010). Heronamides A - C, new polyketide macrolactams from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. A biosynthetic case for synchronized tandem electrocyclization. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8(20), 4682–4689.
- [16] Lincke, T., Behnken, S., Ishida, K., Roth, M., & Hertweck, C. (2010). Closthioamide: An unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(11), 2011–2013.
- [17] Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Cámara, M. (2007). Look who's talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483), 1119–1134.
- [18] Imai, Y., Sato, S., Tanaka, Y., Ochi, K., & Hosaka, T. (2015). Lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3869–3879.
- [19] Onaka H., et. al. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in Streptomyces. I. Purification and Characterization. *The Journal of Antibiotics*, 54(12), 1036–1044.
- [20] Igarashi, Y., et. al. (2001). Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in Streptomyces. II. Structure determination. *The Journal of Antibiotics*, 54(12), 1045–1053.
- [21] Asai, T., Chung, Y. M., Sakurai, H., Ozeki, T., Chang, F. R., Yamashita, K., & Oshima, Y. (2012). Tenuipyrone, a novel skeletal polyketide from the

- entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers. *Organic Letters*, 14(2), 513–515.
- [22] Asai, T., et. al. (2013). Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. *Organic Letters*, 15(13), 3346–3349.
- [23] Asai, T., Luo, D., Yamashita, K., & Oshima, Y. (2013). Structures and biomimetic synthesis of novel α -pyrone polyketides of an endophytic *Penicillium* sp. in *Catharanthus roseus*. *Organic Letters*, 15(5), 1020–1023.
- [24] Seyedsayamdost, M. R. (2014). High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), 7266–7271.
- [25] Xu, F., Nazari, B., Moon, K., Bushin, L. B., & Seyedsayamdost, M. R. (2017). Discovery of a Cryptic Antifungal Compound from *Streptomyces albus* J1074 Using High-Throughput Elicitor Screens. *Journal of the American Chemical Society*, 139(27), 9203–9212.
- [26] Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G. L., & Aigle, B. (2011). Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6258–6263.
- [27] Horinouchi, S., & Beppu, T. (2007). Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B*, 83(9–10), 277–295.
- [28] Cao, Z., Yoshida, R., Kinashi, H., & Arakawa, K. (2015). Blockage of the early step of lankacidin biosynthesis caused a large production of pentamycin, citreodiol and epi-citreodiol in *Streptomyces rochei*. *Journal of Antibiotics*, 68(5), 328–333.
- [29] Cho, S., Shin, J., & Cho, B. K. (2018). Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1089. <https://doi.org/10.3390/ijms19041089>.
- [30] Kang, H. S., & Brady, S. F. (2013). Arimetamycin A: Improving clinically relevant families of natural products through sequence-guided screening of soil metagenomes. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(42), 11063–11067.

- [31] Takeshige, Y., Egami, Y., Wakimoto, T., & Abe, I. (2015). Production of indole antibiotics induced by exogenous gene derived from sponge metagenomes. *Molecular BioSystems*, *11*(5), 1290–1294.
- [32] Hover, B. M., et. al. (2018). Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nature Microbiology*, *3*(4), 415–422.
- [33] Nakagawa, A., et. al. (2016). Total biosynthesis of opiates by stepwise fermentation using engineered *Escherichia coli*. *Nature Communications*, *7*, 1–8.
- [34] Komatsu, M., et. al. (2013). Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synthetic Biology*, *2*(7), 384–396.
- [35] Videau, P., Wells, K. N., Singh, A. J., Gerwick, W. H., & Philmus, B. (2016). Assessment of *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 as a Heterologous Expression Host for Cyanobacterial Natural Products: Production of Lyngbyatoxin A. *ACS Synthetic Biology*, *5*(9), 978–988.
- [36] Matsuda, Y., Quan, Z., Mitsunashi, T., Li, C., & Abe, I. (2016). Cytochrome P450 for Citreohydrinonol Synthesis: Oxidative Derivatization of the Andrastin Scaffold. *Organic Letters*, *18*(2), 296–299.
- [37] Zhang, L., et. al. (2017). Characterization of Giant Modular PKSs Provides Insight into Genetic Mechanism for Structural Diversification of Aminopolyol Polyketides. *Angewandte Chemie - International Edition*, *56*(7), 1740–1745.
- [38] Hashimoto, T., et. al. (2018). Biosynthesis of Quinolidomicin, the Largest Known Macrolide of Terrestrial Origin: Identification and Heterologous Expression of a Biosynthetic Gene Cluster over 200 kb. *Organic Letters*, *20*, 7996–7999.
- [39] Wang, J. P., Lin, W., Wray, V., Lai, D., & Proksch, P. (2013). Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begoniae*. *Tetrahedron Letters*, *54*(20), 2492–2496.
- [40] Angell, S., Bench, B. J., Williams, H., & Watanabe, C. M. H. (2006). Pyocyanin Isolated from a Marine Microbial Population: Synergistic Production between Two Distinct Bacterial Species and Mode of Action. *Chemistry and Biology*, *13*(12), 1349–1359.

- [41] Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., & Clardy, J. (2001). Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products*, *64*(11), 1444–1446.
- [42] Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., & Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(2), 400–406.
- [43] Asamizu, S., Ozaki, T., Teramoto, K., Satoh, K., & Onaka, H. (2015). Killing of mycolic acid-containing bacteria aborted induction of antibiotic production by *Streptomyces* in combined-culture. *PLoS ONE*, *10*(11), 1–17.
- [44] Igarashi, Y., et. al. (2010). Alchivemycin A, a Bioactive Polycyclic Polyketide with an Unprecedented Skeleton from *Streptomyces* sp. *Organic Letters*, *12*(15), 3402-3405.
- [45] Kim, Y., In, Y., Ishida, T., Onaka, H., & Igarashi, Y. (2013). Biosynthetic origin of alchivemycin A, a new polyketide from *Streptomyces* and absolute configuration of alchivemycin B. *Organic Letters*, *15*(14), 3514–3517.
- [46] Onaka, H. (2017). Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, *70*(8), 865–870.
- [47] Hoshino, S., Onaka, H., & Abe, I. (2018). Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2100-y>

本論

第 1 章

複合培養法により得られた希少放線菌由来

新規 polyene macrolactam 類の単離構造決定

1-1. 概要

複合培養スクリーニングの過程で、希少放線菌 *Micromonospora wenchangensis* HEK797 株はミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* との共培養条件下、新規 polyene macrolactam である dracolactam A 及び B を生産した¹。Dracolactam A 及び B はこれまでの天然物に見られない新規骨格を有しており、どちらも大環状 polyene macrolactam 分子 (micromonolactam) がエポキシ化及び引き続き自発的な分子内環化反応を引き起こすことで生成するものと推定された。更に、前駆体に相当する大環状 polyene macrolactam の生産は HEK-797 株の純粋培養においても確認されており、このことから前駆体にあたる二次代謝産物の生合成遺伝子は純粋培養条件においても発現しており、より下流の生合成経路であるエポキシ化及び分子内環化反応に関わる休眠遺伝子が複合培養を通じて活性化されるものと推測された。

大環状 Polyene macrolactam のエポキシ化及び分子内環化に関わる休眠遺伝子は他の polyene macrolactam 生産菌においても存在することが期待され、別の polyene macrolactam (mirilactam A) を生産する希少放線菌 *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 株についても同様に複合培養を行ったところ、やはり mirilactam A がエポキシ化と分子内環化を受けて生合成された新規 polyene macrolactam 類の産生が確認された²。

本章では複合培養を通じて 2 種類の希少放線菌 (*M. wenchangensis*, *A. mirum*) で引き起こされた新規 polyene macrolactam 類の生産誘導とその構造解析及び生合成経路を中心に記述する。

1-2. 複合培養による希少放線菌 *Micromonospora wenchangensis* HEK797 株に対する Dracolactam 類の産生誘導

HPLC による代謝プロファイル解析

本研究で複合培養スクリーニングを行うにあたりミコール酸含有細菌には *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 (序論図 8A 参照) を、スクリーニング対象となる希少放線菌としては製品評価技術基盤機構 (NITE) より提供されている寄託株 (RD 株及び NBRC 株) や舩倉島 (石川県輪島市) の土壌や湖沼より単離された希少放線菌を使用した。

Micromonospora wenchangensis HEK797 株は上述の舩倉島にある龍神湖より単離された希少放線菌であり、16S rDNA 配列解析に基づいて種の同定は行われた。複合培養のプロセスについては図 1-1 に示す通りであり、まず希少放線菌及びミコール酸含有細菌を液体培地中にて別々に前培養を行い、得られた前培養液の一部を物質生産用の液体培地へと継代し更に 5 日間震盪培養を継続した。培養終了後培養液に含まれる二次代謝産物を抽出する為に n-butanol を加え、butanol 抽出物を HPLC により分析した。更に希少放線菌及びミコール酸含有細菌の純粋培養液についても同様の操作にて抽出・分析を行いその HPLC プロファイルと比較することで、複合培養による二次代謝生産活性化についての評価を行った (次節以降で登場する HEK797 株以外の希少放線菌の複合培養についてもほぼ同様の手順にて培養及び HPLC 分析を行っている)。

HPLC 分析の結果 HEK797 株は複合培養条件下において 2 種類の二次代謝産物の生産を新たに行っており (図 1-2, 化合物 1 及び 2)、これら化合物の生産は HEK797 株及びミコール酸含有細菌の単独培養時においては確認されなかった。

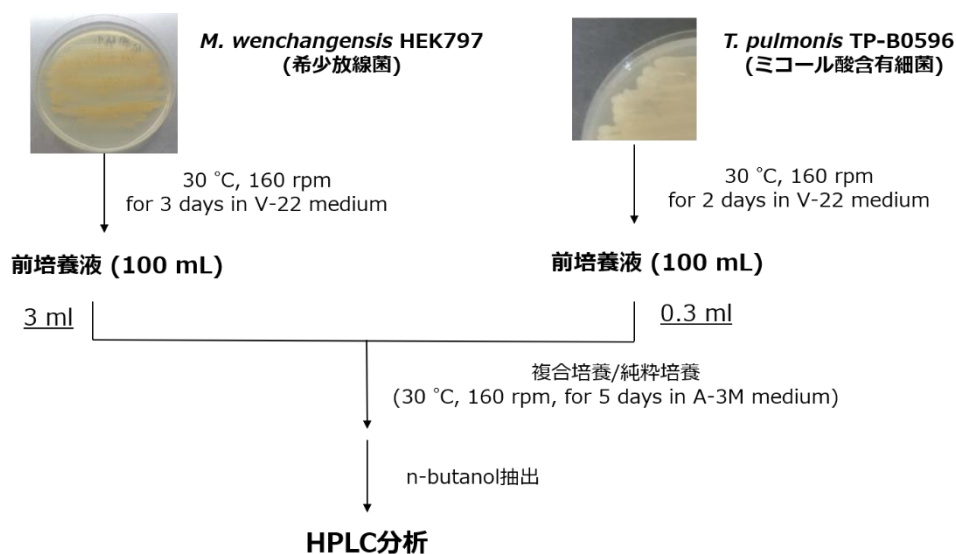


図 1-1: *M. wenchangensis* HEK797 株における複合培養及び代謝解析の流れ

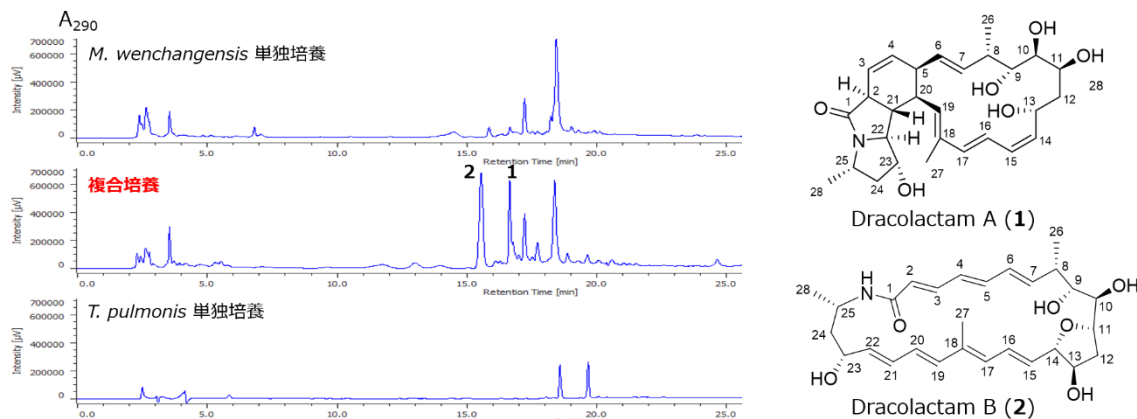


図1-2: *M. wenchangensis*の単独培養及び複合培養条件におけるHPLCプロファイル変化及び dracolactam類の構造式 (HPLC条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II column (4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) in a CH₃CN (solvent A)/H₂O with 0.05% formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (5 min) –70% (12 min) –100% (15-25 min), 1.0 ml min⁻¹).

大量培養及び化合物1及び2の単離

続いて生産誘導が見られた二次代謝産物の構造決定を行う為、HEK797株を複合培養条件下1.5 Lのスケールにて大量培養を行った。得られた複合培養液の遠心分離を行い、回収した菌体及びHP20担体 (複合培養に使用するA3M培地は成分中にHP20担体を含んでおり、遠心分離を行うと菌体と共に回収される)を凍結乾燥後メタノールにて抽出を行った。そして得られた粗抽出物に対してシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び分取逆相HPLCを行うことで、化合物1及び2をいずれも純粋な白色粉末として単離した (図1-3)。

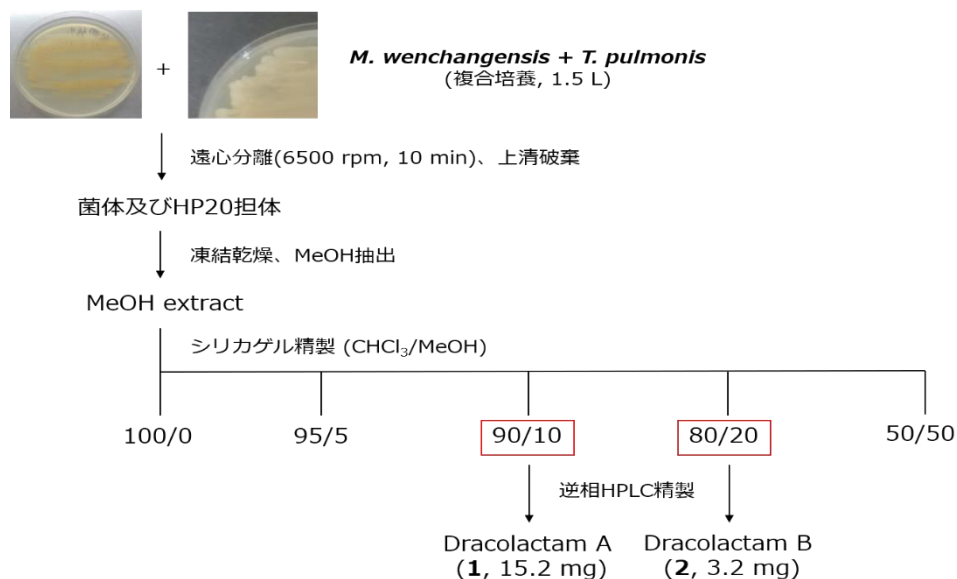


図1-3: 化合物1及び2の単離操作

化合物**1**及び (Dracolactam A)の平面構造決定

HR-TOFMS 解析により化合物 **1** の分子式は $C_{28}H_{39}NO_6$ と決定され、 ^{13}C NMR においても 28 本のシグナルが観測された。また ^{13}C NMR ではアミド/エステル領域に 1 つのシグナル (174.5 ppm)とオレフィン領域に 10 本のシグナル (138.2-121.7 ppm)が観測されており、分子量から得られる不飽和度を考慮すると化合物 **1** は 4 つの環構造を持つことが強く示唆された。続いて 1H , ^{13}C NMR, HMQC 及び COSY スペクトル解析の結果から図 1-4 に示す部分構造 I 及び II の存在が示唆された、なお 2 位と 3 位及び 8 位と 9 位のプロトン間では COSY 相関が見られなかったが、これは対応するプロトンどうしの 2 面角が約 90° であったことに起因している。更に HMBC 解析を行うことで残る C-C 結合 (C-1/C-2/C-3, C-8/C-9, C-17/C-18/C-19, C-18/C-27)についても確立された (図 1-4)。また、重 DMSO 中における 1H NMR スペクトル中には 3 つの重水交換性のシグナルが存在しており (4.33, 4.38 及び 4.65 ppm)、COSY 解析から 9 位、10 位及び 23 位に結合する水酸基のシグナルであると帰属された。また、対応するシグナルは見られていないが 11 位及び 13 位に対応する 1H , ^{13}C NMR のシグナルはいずれも低磁場シフトをしており、この部分に水酸基が結合していると推測された。最後に化合物 **1** が分子式と二重結合の個数から 4 環性構造を持つことを考慮すると、唯一の窒素原子は 1 位、22 位及び 25 位と C-N 結合を形成する必要がある、化合物 **1** の平面構造を図 1-4 に示す通り決定した。また化合物 **1** には 5 つの C-C 二重結合が存在するが、対応するカップリング定数及び NOESY 相関からその配座を 3Z, 6E, 14Z, 16E, 18Z であると決定した (図 1-4)。

以上から化合物 **1** は新規骨格を有する 4 環性の polyene macrolactam であり生産菌が龍神湖より単離されたことに基づいて dracolactam A と命名した。

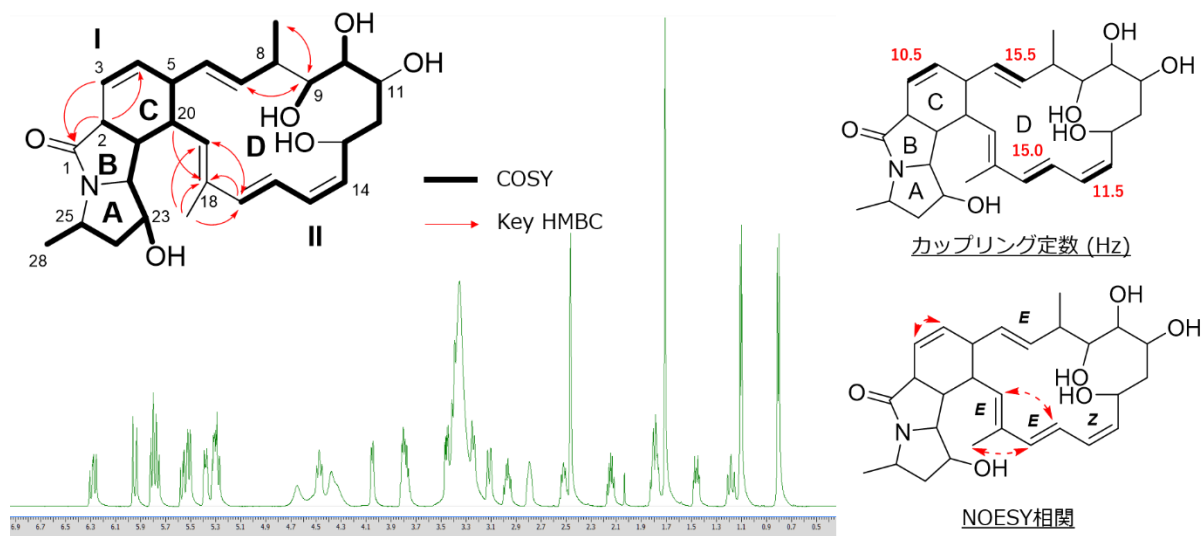


図 1-4: 化合物 **1** (dracolactam A)の NMR 解析及び平面構造決定

表 1-1: 化合物 **1** (dracolactam A) の NMR スペクトル (重メタノール中にて測定、但し 9-OH, 10-OH 及び 23-OH のシグナルのみ重 DMSO 中にて観測された値である)

No.	δ_{H} (multi., J in Hz)	δ_{C} , type of carbon
1	-	174.5, C
2	3.21 (brd, 10.0)	49.4, CH
3	5.96 (d, 10.5)	121.7, CH
4	5.50 (m)	132.4, CH
5	2.92 (m)	45.3, CH
6	5.44 (dd, 15.5, 10.5)	128.8, CH
7	5.61 (dd, 15.5, 10.0)	136.3, CH
8	2.67 (m)	38.7, CH
9	3.54 (d, 10.5)	75.7, CH
10	3.67 (dd, 2.5, 10.5)	74.0, CH
11	4.24 (brd, 8.0)	68.4, CH
12	2.05 (dd, 15.5, 8.0)	39.1, CH ₂
	1.44 (dd, 15.5, 11.0)	
13	4.71 (dd, 11.0, 9.0)	66.2, CH
14	5.39 (dd, 11.5, 9.0)	134.8, CH
15	5.91 (dd, 11.5)	127.0, CH
16	6.45 (dd, 15.0, 11.5)	123.5, CH
17	6.04 (d, 15.0)	138.2, CH
18	-	135.2, C
19	5.64 (d, 10.0)	127.6, CH
20	3.08 (ddd, 10.0, 10.0, 6.0)	40.3, CH
21	1.94 (q, 10.0)	50.0, CH
22	3.57 (dd, 10.0, 5.5)	69.7, CH
23	3.92 (m)	73.7, CH
24	2.36 (ddd, 13.0, 6.5, 6.5)	43.7, CH ₂
	1.64 (ddd, 13.0, 6.5, 6.5)	
25	3.92 (m)	48.7, CH
26	0.95 (d, 7.0)	11.1, CH ₃
27	1.78 (s)	15.3, CH ₃
28	1.23 (d, 7.0)	19.8, CH ₃
9-OH	4.38 (brs)	-
10-OH	4.33 (brs)	-
23-OH	4.65 (brs)	-

化合物 2 (Dracolactam B)の平面構造決定

HR-TOFMS 解析の結果化合物 2 の分子式も化合物 1 と同様に $C_{28}H_{39}NO_6$ であり、 ^{13}C NMR においても 28 本のシグナルが観測された。一方で ^{13}C NMR スペクトル中にはエステル/アミド領域に 1 本のシグナル (166.8 ppm) とオレフィン領域に 14 本のシグナル (141.9-123.7 ppm) が観測され、分子式より与えられる不飽和度を考慮すると 4 環性であった化合物 1 とは異なり化合物 2 は 2 環性化合物であることが強く示唆された。化合物 1 と同様に 1H , ^{13}C NMR, HMQC 及び COSY スペクトルの解析を行った所、26 位に結合したアミド性 NH 及び 9 位、10 位、13 位及び 23 位に結合した 4 つの水酸基を含め、5 つのフラグメント構造が得られた (図 1-5, フラグメント I-V)。6 位と 7 位及び 20 位と 21 位の COSY 相関は 1H NMR シグナルの overlap により、また 13 位と 14 位の COSY 相関は二面角の問題から確認出来なかったが、この部分の結合については H-8/C-6, H_2 -12/C-14 及び H-22/C-20 間の HMBC 相関に基づき決定を行い、残る C-C 結合 (C-1/C-2, C-15/C-16/C-17) についても更なる HMBC スペクトルの解析から決定された (図 1-5)。

前述の通り化合物 2 は 2 環性構造を有すると考えられたが、そのうち 1 つは C-1 位及び NH プロトンの化学シフト値 (C-1: 166.4 ppm, NH: 7.50 ppm) から大環状の lactam 構造であると考えられた。残り 1 つの環構造については酸素原子のうち 1 つが未帰属であることと C-11 位及び C-14 位の化学シフト値がいずれも低磁場シフトしていたことから (C-11: 76.8 ppm, C-14: 87.0 ppm)、11 位と 14 位が酸素原子で架橋されて生じる THF 環構造であると強く示唆され化合物 2 の平面構造を図 1-5 に示す通り決定した。また化合物 2 には 7 つの C-C 二重結合が含まれているがカップリング定数及び NOESY スペクトル解析からその全てが *E* 配座であると決定した。

化合物 2 もまた新規骨格を持つ polyene macrolactam 類であり、化合物 1 の類縁体であったことから dracolactam B と命名した。

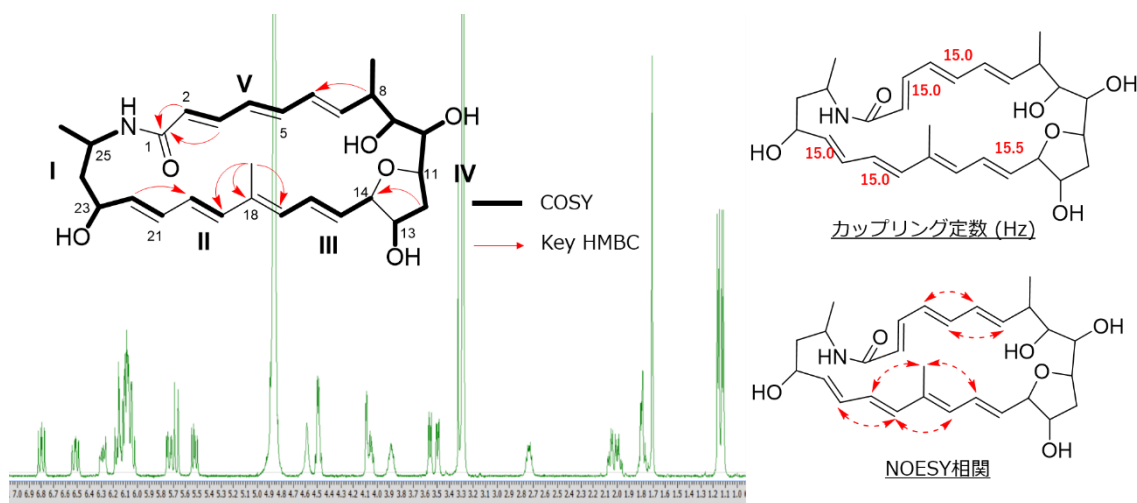


図 1-5: 化合物 2 (dracolactam B)の NMR 解析及び平面構造決定

表 1-2: 化合物 **2** (dracolactam B) の NMR スペクトル (重メタノール中にて測定、但し OH 及び NH のシグナルは重 DMSO 中にて測定した)

No.	δ_{H} (multi., J in Hz)	δ_{C} , type of carbon
1	-	166.8, C
2	5.68, (d, 15.0)	123.7, CH
3	6.80 (dd, 15.0, 11.5)	140.3, CH
4	6.05 (dd, 15.0, 11.5)	128.2, CH
5	6.29 (dd, 15.0, 11.0)	139.9, CH
6	6.08 (m)	129.5, CH
7	6.09 (m)	141.9, CH
8	2.74 (m)	38.8, CH
9	3.50 (dd, 9.0, 2.5)	79.2, CH
10	3.56 (dd, 9.0, 2.5)	75.0, CH
11	4.49 (m)	76.8, CH
12	2.06 (dd, 13.5, 5.5) 1.99 (ddd, 13.5, 9.5, 4.5)	37.5, CH ₂
13	4.09 (d, 4.0)	75.3, CH
14	4.49 (m)	87.0, CH
15	5.74 (dd, 15.5, 6.0)	133.0, CH
16	6.52 (dd, 15.5, 11.5)	127.8, CH
17	6.06 (d, 11.5)	129.4, CH
18	-	135.9, C
19	6.17 (d, 15.0)	136.2, CH
20	6.05 (m)	128.2, CH
21	6.14 (m)	131.1, CH
22	5.52 (dd, 15.0, 9.5)	134.6, CH
23	4.06 (m)	72.7, CH
24	1.81 (m) 1.78 (m)	42.9, CH ₂
25	3.89 (m)	43.3, CH
26	1.12 (d, 6.5)	17.1, CH ₃
27	1.71 (s)	12.5, CH ₃
28	1.16 (d, 7.0)	21.6, CH ₃
9-OH	4.53 (d, 5.0) ^a	-
10-OH	4.56 (d, 6.5) ^a	-
13-OH	4.96 (d, 2.5) ^a	-
23-OH	4.65 (d, 4.0) ^a	-
NH	7.50 (d, 8.5) ^a	-

Dracolactam Aの相対立体化学決定

続いて平面構造が決定された 2 種類の dracolactam 類のうち比較的配座自由度が低く、且つ主生成物であった dracolactam A についてその相対化学決定に着手した。図 1-4 に示す通り dracolactam A は 4 環性化合物であるが、特に配座自由度の低い 5/5/6 縮環構造 (A-C 環) 及び比較的配座自由度の高い 16 員環部分 (D 環) に分けられる。このうち A-C 環部分については図 1-6 に示す通り NOESY スペクトルを解析することでその相対化学を完全に決定することが可能であった。即ち H-2/H-20, H-2/H-22, H-5/H-20, H-20/H-22 及び H-22/H-28 に対応する NOESY 相関より H-2, H-5, H-20, H-22, H₃-28 は同じ側に存在しており、逆に H-19/H-21, H-19/H-23 及び H-21/H-23 における NOESY 相関から H-19, H-21, H-23 及び H-25 が反対側の面に存在していると決定された。

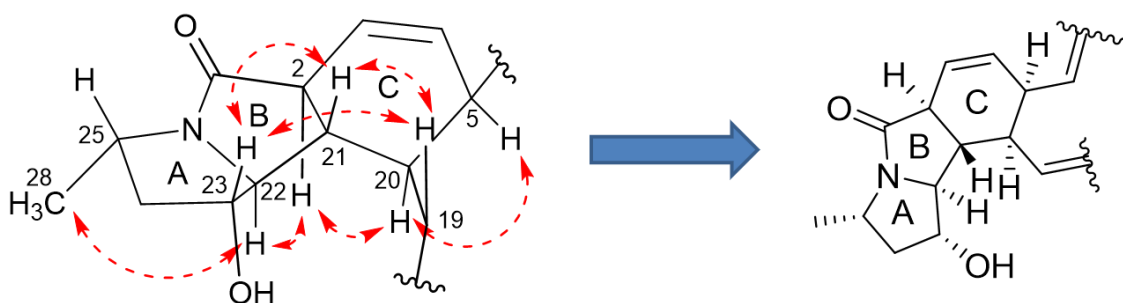


図 1-6: NOESY 解析を用いた A-C 環部分の相対立体化学決定

一方で配座自由度の高い D 環 (16 員環) 部分の相対化学については NMR 解析単独による議論が困難であった為、D 環部分の C-9 位から C-13 位にかけて存在する 1,2,3,5-tetraol 構造に関するアセトナイド保護体を合成し、各保護体の ¹³C NMR 解析結果に基づく相対立体化学の決定を目指した。Dana 及び Rychnovsky らの先行研究よって 1,2-diol 及び 1,3-diol 構造の相対化学は対応するアセトナイド保護体の ¹³C NMR シグナル帰属に基づいて決定可能であることが報告されており^{3,4}、これに倣って dracolactam A についてもアセトナイド化反応を行うこととした (図 1-7、1-8)。

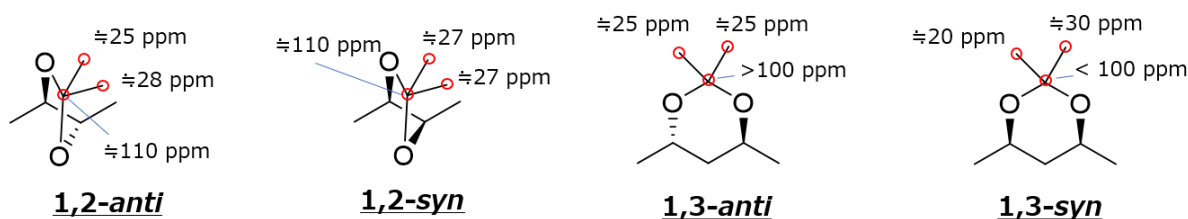


図 1-7: Acetonide 保護体の ¹³C NMR 解析に基づく 1,2-及び 1,3-diol の相対化学決定

Dracolactam A のアセトナイド保護を行うにあたり溶媒及び反応試薬に関する条件検討を行った所、2,2-dimethoxy propane (DMP)/acetone 混合溶媒中 pyridinium p-toluenesulfonate (PPTS)を酸触媒とすることで dracolactam A のアセトナイド化反応が速やかに進行した。更に反応温度についても検討を行った所、室温条件 (30℃)では 9,11 位の 1,3-diol 部分のアセトナイド保護体である化合物 **3** が主生成物であり、一方より低温条件 (4℃)においては 9,10 位の 1,2-diol 部分及び 11,13 位の 1,3-diol 部分に対するアセトナイド保護体である化合物 **4** が主生成物であった (図 1-8)。化合物 **3** 及び **4** に関して ^{13}C NMR シグナルの帰属を行い図 1-7 に基づいて立体解析を行ったところ、C-9/C-10 部分の 1,2-diol は *anti* 型、C-9/C-11 及び C-11/C-13 の 1,3-diol はいずれも *syn* 型であり、最終的に 1,2,3,5-tetraol 部位の相対化学は $9R^*$, $10S^*$, $11S^*$, $13R^*$ であると決定された。

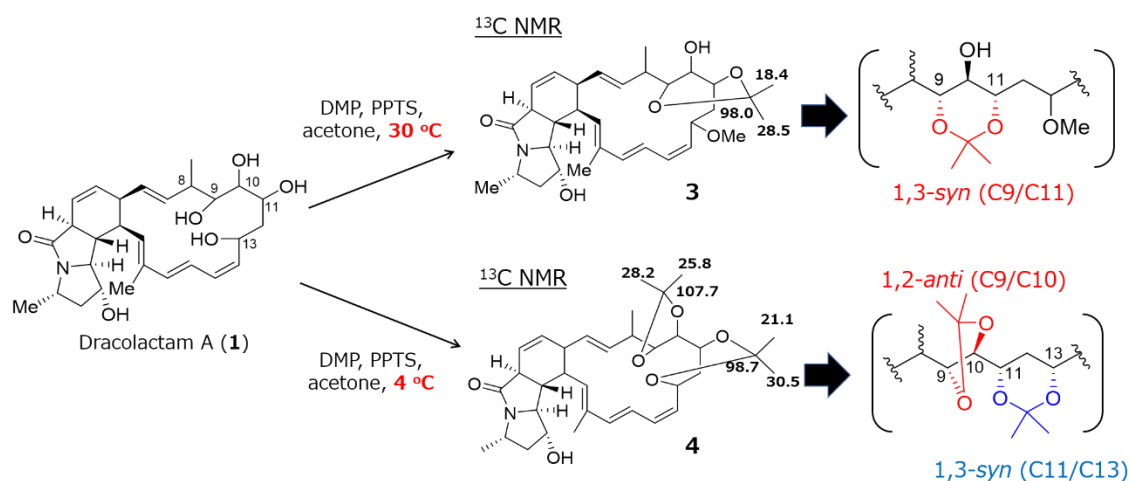


図 1-8: Dracolactam A のアセトナイド化反応及び 1,2,3,5-tetraol 構造の相対化学決定

D 環部分の残された相対立体化学に関する議論を行う為、先程合成したアセトナイド保護体のうち化合物 **3** について更なる NMR 解析を行った。化合物 **3** は誘導体化前の dracolactam A と比べて 9 位と 11 位が acetonide 基により保護されている為、D 環部分の配座自由度が低下していることが期待された。まず acetonide 構造中のメチル基 (1.46 ppm)及び H-9, H-11 のシグナル間で強い NOESY 相関が観測されており、H-9/H-10 及び H-10/H-11 間の結合定数がいずれも 9.0 Hz であった事から、acetonide 部分は“chair conformation”を保持していると考えられた (図 1-9)。続いて 16 員環中の残りのプロトンについても H-5/H-7, H-6/H-8, H-8/H-9 及び H-19/H-20 間において強い NOESY 相関が観測され、また H-5/H-6, H-6/H-7, H-7/H-8, H-8/H-9 及び H-19/H-20 間における結合定数から、化合物 **3** では H-19/H-20 及び H-5 から H-11 までの隣接する全ての水素原子が互いに *anti*-periplanar (H-6/H-7 については *E* 配座)の関係にあることが分かった (図 1-9)。上述の配座解析に加えて、H-10/H-19 間に渡環性の NOESY 相関が観測され逆に 26

位のメチル基からは渡環性の NOESY が観測されなかった事 (すなわち 26 位のメチル基は D 環の“外側”を向いている)を考慮すると、化合物 **3** の D 環部分は図 1-9 に示す配座を有すると考えられ、以上の議論から元の dracolactam A における相対立体化学は図 1-2 に示す通りであると決定した。

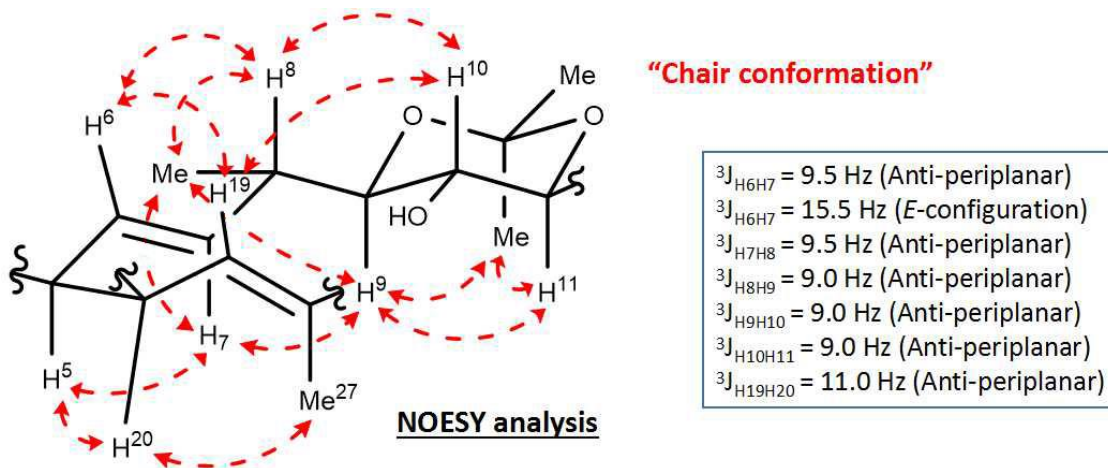


図 1-9: 化合物 **3** の NMR 解析及び D 環部分の配座解析

表 1-3: 化合物 **3** の NMR スペクトル (重メタノール中)

No.	δ_H (multi., J in Hz)	δ_C , type of carbon
1	-	174.3, C
2	3.25 (m)	49.5, CH
3	5.96 (d, 10.5)	121.9, CH
4	5.47 (m)	132.2, CH
5	2.96 (m)	45.3, CH
6	5.50 (dd, 15.5, 9.5)	130.3, CH
7	5.45 (dd, 15.5, 9.5)	133.5, CH
8	2.21 (m)	45.3, CH
9	3.35 (dd, 9.0, 9.0)	77.3, CH
10	3.27 (m)	72.0, CH
11	3.83 (dd, 9.0, 9.0)	69.4, CH
12	1.90 (ddd, 14.0, 10.5, 2.0) 1.70 (ddd, 14.0, 9.5, 2.0)	43.1, CH ₂
13	4.77 (dd, 9.5, 9.5)	74.8, CH
14	5.30 (dd, 11.0, 9.5)	133.2, CH
15	6.14 (m)	130.3, CH
16	6.08 (m)	122.6, CH
17	6.08 (m)	140.3, CH
18	-	135.2, C
19	5.63 (d, 11.0)	131.5, CH
20	3.18 (m)	40.0, CH
21	2.00 (ddd, 12.0, 9.5, 9.5)	49.6, CH
22	3.57 (dd, 9.5, 6.0)	69.4, CH
23	3.92 (m)	73.7, CH
24	2.38 (ddd, 14.0, 7.0, 7.0) 1.63 (ddd, 13.0, 6.5, 6.5)	43.7, CH ₂
25	3.90 (m)	48.5 CH
26	1.06 (d, 7.0)	18.2, CH ₃
27	1.85 (s)	12.5, CH ₃
28	1.23 (d, 6.5)	19.8, CH ₃
29	-	98.0, C
30 (Me _{ax})	1.46 (s)	18.4, CH ₃
31 (Me _{eq})	1.29 (s)	28.5, CH ₃
32	3.14 (s)	55.0, CH ₃

表 1-4: 化合物 4 の NMR スペクトル (重クロロホルム中)

No.	δ_{H} (multi., J in Hz)	δ_{C} , type of carbon
1	-	172.8, C
2	3.13 (brd, 11.5)	50.3, CH
3	6.04 (m)	122.4, CH
4	5.50 (m)	132.5, CH
5	2.94 (m)	45.3, CH
6	5.50 (m)	130.2, CH
7	5.31 (dd, 15.5, 6.0)	135.3, CH
8	3.08 (m)	35.0, CH
9	3.84 (dd, 10.0, 4.5)	82.4, CH
10	3.89 (m)	81.1, CH
11	4.24 (m)	68.1, CH
12	1.82 (m)	33.7, CH ₂
13	4.66 (ddd, 7.5, 7.5, 7.5)	66.9, CH
14	5.76 (dd, 10.5, 6.5)	132.1, CH
15	6.14 (dd, 10.5, 10.5)	130.7, CH
16	7.24 (m)	126.1, CH
17	5.96 (d, 16.0)	135.1, CH
18	-	135.8, C
19	6.02 (d, 8.5)	127.5, CH
20	3.02 (m)	40.2, CH
21	1.91 (m)	50.7, CH
22	3.53 (dd, 8.0, 6.0)	69.5, CH
23	3.82 (m)	74.4 CH
24	2.46 (ddd, 14.0, 7.0, 7.0)	43.8, CH ₂
	1.69 (m)	
25	3.89 (m)	48.3 CH
26	1.09 (d, 6.5)	18.4, CH ₃
27	1.88 (s)	17.3, CH ₃
28	1.27 (d, 6.5)	21.1, CH ₃
29	-	107.7, C
30	1.47 (s)	28.2, CH ₃
31	1.34 (s)	25.8, CH ₃
32	-	98.7, C
33 (Me _{ax})	1.50 (s)	21.1, CH ₃
34 (Me _{eq})	1.48 (s)	30.5, CH ₃
23-OH	3.48 (s)	-

Dracolactam Bの相対立体化学及び絶対立体化学の決定

Dracolactam A及びBはその骨格は大きく異なるが置換基の位置など類似する点は多く、後述の通り両化合物は共通の前駆体から生合成されると考えられた。従って2つの類縁体間で立体化学は保存されており、14位の立体中心を除けばdracolactam Bの相対立体化学については先程決定したdracolactam Aに倣い図1-10Aに示す通りであると考えられた。その一方でdracolactam Bの14位における立体化学はdracolactam Aでは対応する不斉中心が存在していない為更なる議論を行う必要があった。

まず、NOESY解析に基づいて14位における相対立体化学の決定を試みたが、有用な相関を観測する事は出来なかった。その一方で13位と14位のプロトン間のカップリング定数(0 Hz)より対応する二面角は約 90° であることが明らかとなった(図1-10B)。一方でNapolitanoらによる先行研究からTHF環を構成する水素原子同士の二面角は1,2-*cis*であれば -60° から $+60^\circ$ の範囲、1,2-*trans*であれば $+60^\circ$ から $+180^\circ$ (或いは -180° から -60°)の範囲に限定されることが示されており(図1-10C)⁵、二面角が約 90° である13位及び14位の水素原子は互いに1,2-*trans*関係にあることが分かった。従って既に決定された13位の相対化学に基づいて14位の相対化学も図1-10Bに示す通り決定された。

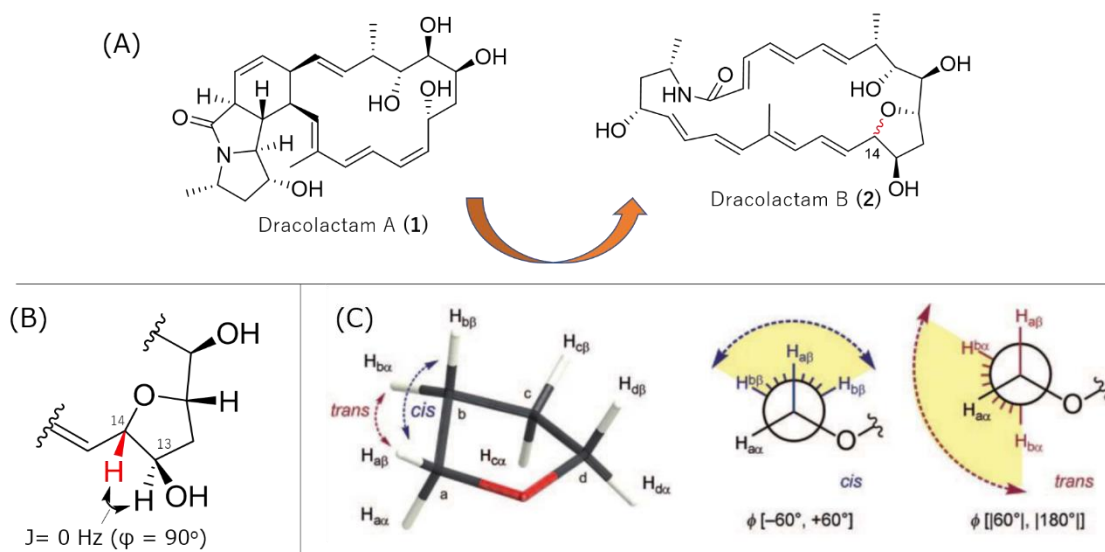


図 1-10: (A) dracolactam A の相対立体化学に基づく dracolactam B における相対立体化学の決定 (B) dracolactam B の 13 位と 14 位水素間の二面角及び 14 位の相対立体化学 (C) THF 環中の水素原子同士がとり得る二面角⁵

続いて、dracolactam 類の絶対立体化学については MTPA エステルの NMR 解析を用いた改良 Mosher 法⁶により行った。最初に dracolactam A のアセトナイド保護体である化合物 **3** 及び **4** に対して MTPA エステルの導入を試みたものの、目的とするエステル体を得ることが出来なかった。

そこで、もう一つの類縁体である dracolactam B に対して改良 Mosher 法を適用する事とした。改良 Mosher 法を適用するにあたって dracolactam B は 4 つの水酸基を有しており、直接エステル化反応を行うと反応生成物が様々な MTPA エステルの混合物となることが想定された。そこで MTPA エステルの導入に先立ち dracolactam B に対して acetonide 保護を行う事で反応点となる水酸基の数を減らし、その後改めてエステル化反応を行う計画を立てた (図 1-11)。DMP/methanol 混合溶媒中 PPTS を酸触媒として室温にて反応を行った所、9 位と 10 位に acetonide 基が導入され 23 位の水酸基がメチル化された誘導体 **5** が得られた。更に化合物 **5** の 13 位に存在する水酸基に対して 2-Methyl-6-nitrobenzoic Anhydride (MNBA) を縮合剤としたエステル化反応を行うことで (S)-MTPA エステル体 **6a** 及び (R)-MTPA エステル **6b** をそれぞれ得た (図 1-11)。最後に得られた各 MTPA エステルに対して ^1H NMR シグナルの帰属を行い、その化学シフト差を改良 Mosher 法による規則に当てはめることで dracolactam B の 13 位における絶対立体化学は R であると決定した (生合成的な背景から dracolactam A の絶対化学についても dracolactam B と同様であると考えられた)。

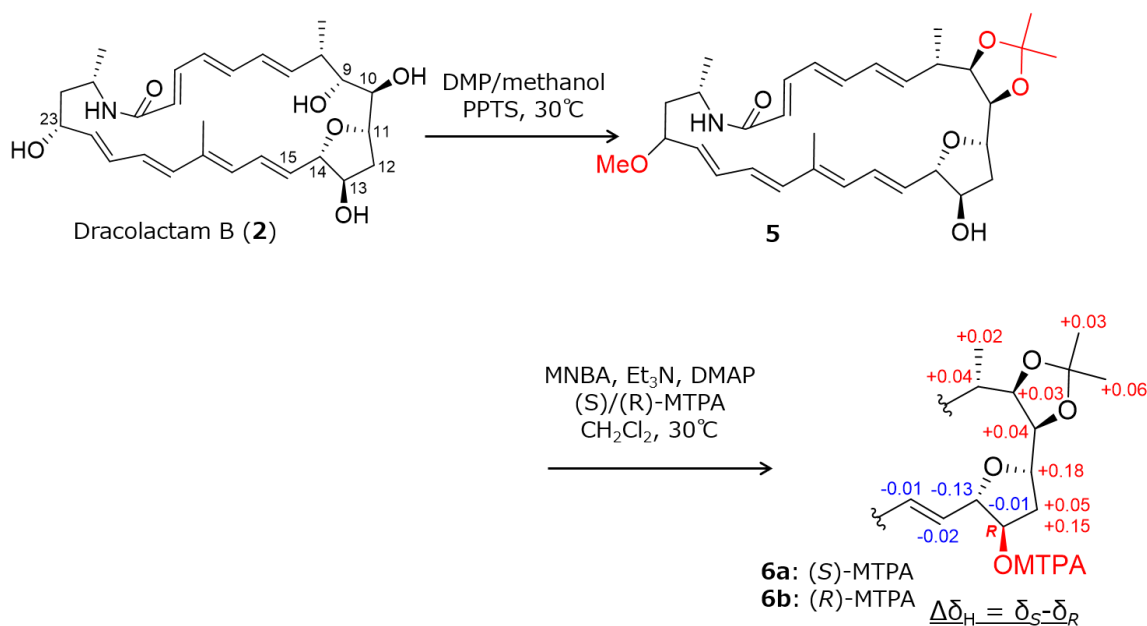


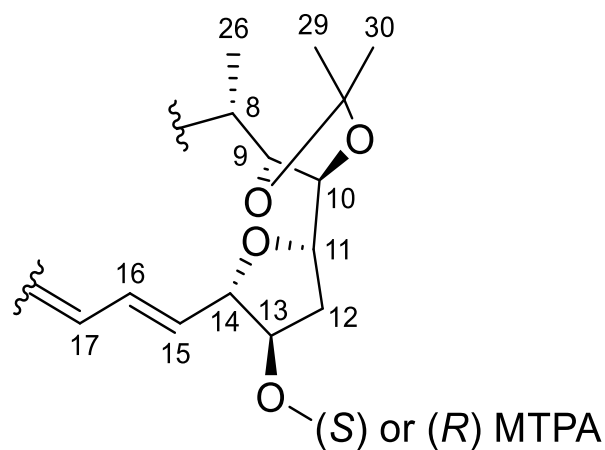
図 1-11: Dracolactam B に対する改良 Mosher 法の適用と絶対立体化学の決定

表 1-5: 化合物 **5** の ^1H NMR 帰属 (重 DMSO 中にて測定)

No.	δ_{H} (multi., J in Hz)
1	-
2	5.73 (d, 15.5)
3	6.57 (dd, 15.5, 11.0)
4	6.16 (dd, 15.0, 11.0)
5	6.24-6.28 (m)
6	6.04-6.09 (m)
7	6.24-6.28 (m)
8	2.60 (m)
9	3.93 (m)
10	3.80 (dd, 9.0, 4.0)
11	4.13 (ddd, 9.0, 9.0, 5.5)
12	1.90 (dd, 13.0, 5.5)
13	3.93 (m)
14	4.36 (d, 4.0)
15	5.77 (m)
16	6.35 (dd, 15.0, 11.5)
17	6.04-6.09 (m)
18	-
19	6.04-6.09 (m)
20	5.97 (dd, 15.0, 10.5)
21	6.04-6.09 (m)
22	5.31 (dd, 15.0, 10.5)
23	3.49 (m)
24	1.71 (m)
	1.54 (m)
25	3.73 (m)
26	1.10 (d, 7.0)
27	1.57 (s)
28	0.97 (d, 7.0)
Acetonide Me	1.31 (s)
23-OMe	3.04 (s)
NH	7.52 (d, 7.5)
13-OH	5.09 (d, 3.0)

表 1-6: 化合物 **6a** 及び **6b** の ^1H NMR シグナル帰属 (MTPA エステルの周辺領域のみ抜粋)

	6a (<i>S</i> -MTPA)	6b (<i>R</i> -MTPA)	$\Delta\delta_{\text{H}}$ ($\delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$)
8	2.53 (m)	2.49 (m)	+ 0.04
9	4.00 (m)	3.97 (m)	+ 0.03
10	3.90 (dd, 9.5, 4.5)	3.86 (m)	+ 0.04
11	4.02 (m)	3.84 (m)	+ 0.18
12	2.17 (dd, 14.0, 5.5)	2.02 (m)	+ 0.15
13	5.29 (d, 4.0)	5.30 (m)	(- 0.01)
14	4.56 (d, 4.5)	4.69 (d, 5.0)	- 0.13
15	5.80 (dd, 15.0, 4.5)	5.82 (dd, 15.5, 5.0)	- 0.02
16	6.40 (dd, 15.0, 11.5)	6.41 (dd, 15.5, 12.0)	- 0.01
17	6.07 (d, 11.5)	6.07 (m)	0.00
26-Me	1.09 (d, 7.0)	1.07 (d, 7.0)	+ 0.02
29-Me	1.29 (s)	1.26 (s)	+ 0.03
30-Me	1.26 (s)	1.20 (s)	+ 0.06



Dracolactam 類の生合成経路

Dracolactam A 及び B の生合成については大環状 polyene macrolactam である前駆体 **7** に対するエポキシ化が鍵反応になるものと考えられた (図 1-12A)。即ち、化合物 **7** より生じたエポキシド中間体が分子内のアミド由来窒素原子による求核攻撃を受けて pyrrolidinol 環を形成後、更に分子内 Diels-Alder 反応を受ければ dracolactam A を生成し (経路 a)、一方で 11 位の水酸基がポリエン部分に攻撃してエポキシド開裂を伴う THF 環形成を行えば dracolactam B が生成されると考えられる (経路 b)。

更に、化合物 **7** に関しては同一の平面構造を持つ化合物が micromonolactam として別の *Micromonospora* 属放線菌より単離されており(立体化学は決定されていない)⁷、興味深いことにこれと同じ分子量及び UV 吸収を持つ化合物が HEK797 株の純粋培養からも確認された (図 1-12B)。このことから前駆体である化合物 **7** の生合成遺伝子クラスターについては複合培養の有無によらず常に発現しており、複合培養を行うことで化合物 **7** から dracolactam 類への変換を担う休眠遺伝子群が活性化したと考えられた。実際に生産菌である *Micromonolactam* sp. I2-32 株から同定された micromonolactam 生合成遺伝子クラスター⁷ 中に化合物 **7** の変換に関わると考えられる遺伝子は含まれておらず、HEK797 株についても化合物 **7** 自体の生合成遺伝子クラスターと dracolactam 類への変換を担う遺伝子は別々の領域に存在する事が強く示唆された。

また、化合物 **7** を *T. pulmonis* の純粋培養液に投与した所 dracolactam 類の生産は見られなかったことから、ミコール酸含有細菌が化合物 **7** を dracolactam 類へと変換している生物変換型 (序論図 7A 参照) に該当する可能性は低いと思われる。

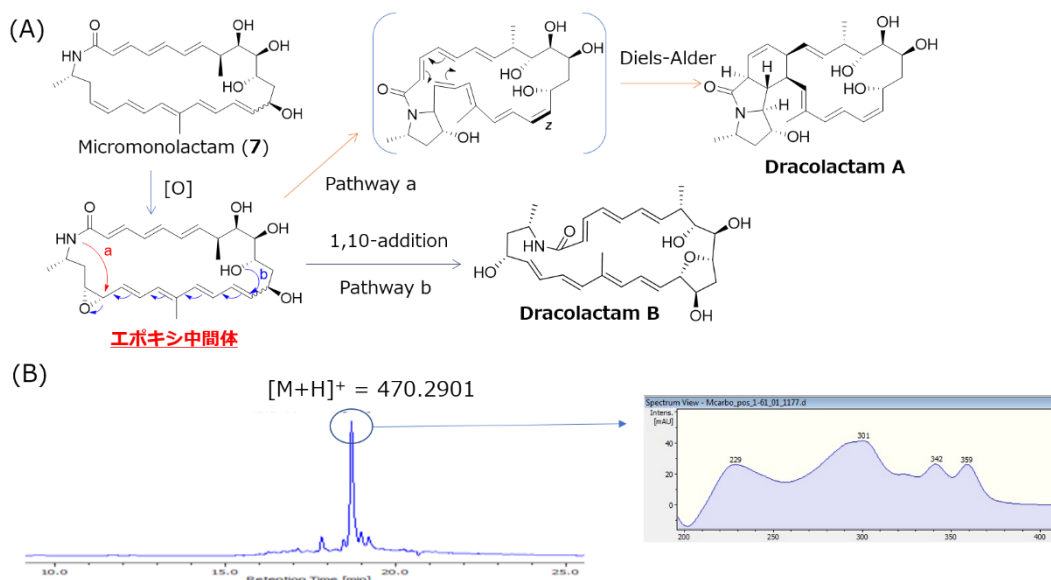


図 1-12: (A) Dracolactam 類の推定生合成経路 (B) HEK797 株の純粋培養条件における化合物 **7** (推定生合成前駆体)の産生確認 (HPLC 条件は図 1-2 と同様)

Dracolactam 類の生物活性試験

今回取得した 2 種類の dracolactam 類について P388 細胞 (マウス白血病細胞株) 及び幾つかの微生物 (*Candida albicans*, *Bacillus cereus*, メチシリン感受性黄色ブドウ球菌及び *Tsukamurella pulmonis*) に対する細胞毒性及び生育阻害活性の評価を行ったが、いずれの化合物についても明確な細胞毒性及び微生物の生育阻害活性は見られなかった。

1-3. Mirilactam 生産菌 *Actinosynnema mirum* NBRC14064 株に対する複合培養法の適用及び新規 mirilactam 誘導体の創出

複合培養法を用いた大環状 polyene macrolactam 類の環化誘導

前節で述べた dracolactam 類以外にも、大環状 polyene macrolactam 分子がエポキシ化及び引き続く分子内環化反応を経て生合成されたと考えられる二次代謝産物はこれまでに幾つか報告されており、heronamide A (heronamide C を前駆体とする)、niizalactam A (sceliphrolactam を前駆体とする) 或いは ciromicin B などが挙げられる (図 1-13)⁸⁻¹¹。

興味深いことに niizalactam 類及び ciromicin 類は dracolactam 類と同様に、ミコール酸含有細菌との複合培養を通じて産生誘導されることが報告されており、中でも niizalactam 生産菌である *Streptomyces* sp. NZ-6 株は dracolactam の場合と同様に前駆体である sceliphrolactam は純粋培養条件でも生産され、*T. pulmonis* との複合培養によって初めて niizalactam 類を生産するようになる⁹。更に heronamide, ciromicin 及び sceliphrolactam については生合成遺伝子クラスターが同定されているが、大環状 polyene macrolactam のエポキシ化を行うと考えられる遺伝子群はいずれの生合成クラスター内にも含まれておらず、ゲノム中の別の領域にコードされていることが強く示唆された^{8,12,13}。

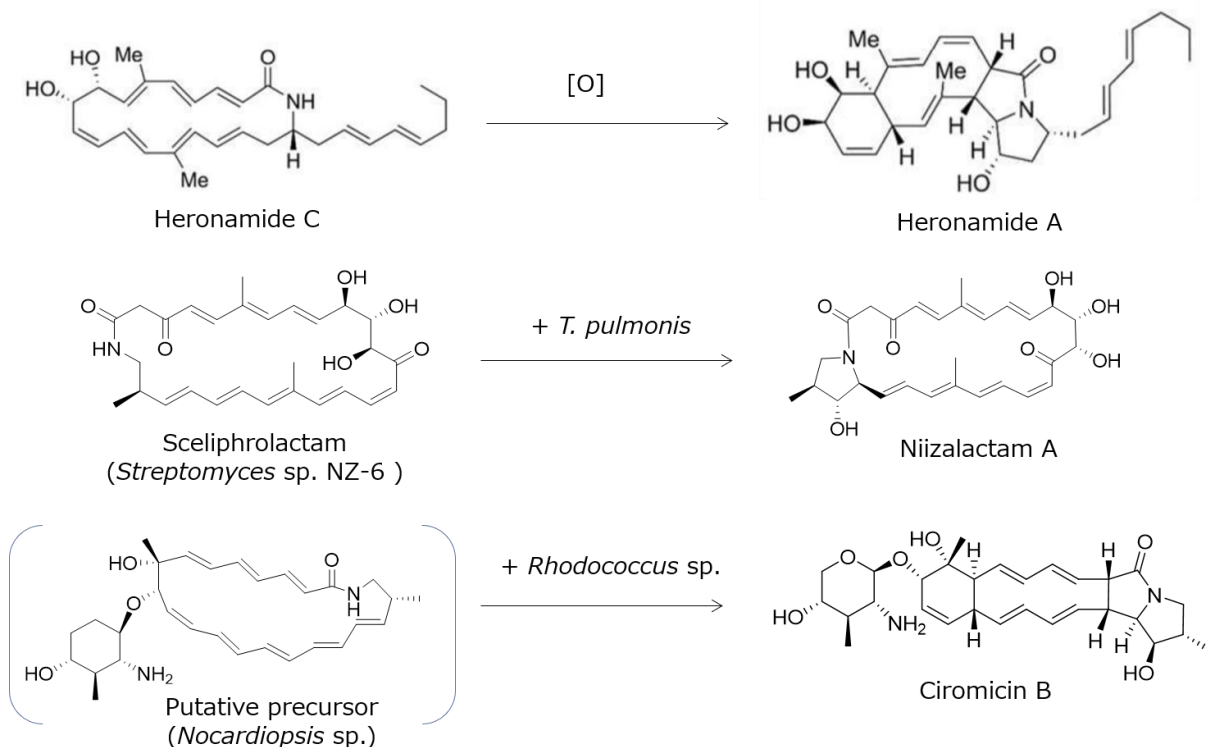


図 1-13: 大環状 polyene macrolactam がエポキシ化を介した環化反応を起こして生じたと考えられる二次代謝産物の一例

以上のことから、sceliphrolactam や micromonolactam といった大環状 polyene macrolactam 生産菌の中には対応する polyene macrolactam 類の分子内環化 (エポキシ化)に関わる遺伝子群をそれ自身の生合成遺伝子クラスターとは独立して有する種が存在し、更に分子内環化に関わる遺伝子群は休眠状態にある場合が多くその活性化について複合培養法が有効である可能性が示唆された。

Mirilactam 生産菌に対する複合培養法の適用

上記の仮説が正しいとすればこれまでに大環状 polyene macrolactam 生産菌として報告されている放線菌に対して複合培養を行うことで休眠遺伝子群を活性化が起こり、polyene macrolactam の環化体に相当する新規二次代謝産物の獲得が期待出来る。そこで先行研究から mirilactam A (**8**)産生菌として知られる希少放線菌 *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 株を対象に複合培養を行うこととした。Mirilactam A は 26 員環構造を持った polyene macrolactam であり (図 1-14)、dracolactam の前駆体と推定されている micromonolactam (**7**)の 8-demethyl 体に相当する二次代謝産物である¹⁴。また mirilactam 類の生合成遺伝子クラスターも *A. mirum* 株のゲノムより同定されているが、これまでと同様に分子内環化 (エポキシ化)に関連する遺伝子群は含まれていなかった。

まず *A. mirum* 株の単独培養を行い、その butanol 抽出物を HPLC にて分析した所、先行研究の通り mirilactam A (**8**)及びその類縁体である mirilactam B (**9**)の生産が確認された (図 1-14)。続いて *M. wenchangensis* 株と同様の手順 (図 1-1)にて *A. mirum* 株とミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* の複合培養及び HPLC 分析を行った所、mirilactam A 及び B に加え、3 つの二次代謝産物の生産が新たに確認された (**10-12**, 図 1-14)。LC-HRMS による解析からこれらピークの分子式はいずれも $C_{27}H_{37}NO_6$ と計算され、化合物 **8** (分子式: $C_{27}H_{37}NO_5$)に酸素原子が一つ付加した類縁体であることが強く示唆された。また、化合物 **10-12** 以外にも幾つか二次代謝産物の生産誘導が見られ分子量から化合物 **9** に酸素原子が一つ付加した類縁体であることが示唆されたが、収量が少ないために構造決定には至っていない。

続いて化合物 **10-12** の構造決定を行う為 *A. mirum* 株を複合培養条件にて大量培養を行った。図 1-15 に示す通り 2.0 L の複合培養液から遠心分離によって菌体回収を行い、凍結乾燥後 methanol/chloroform 混合溶媒による抽出を行った。その後抽出物に対してシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる粗精製及び逆相 HPLC による最終精製を行った所、各化合物 **10-12** をいずれも白色粉末として単離する事が出来た。

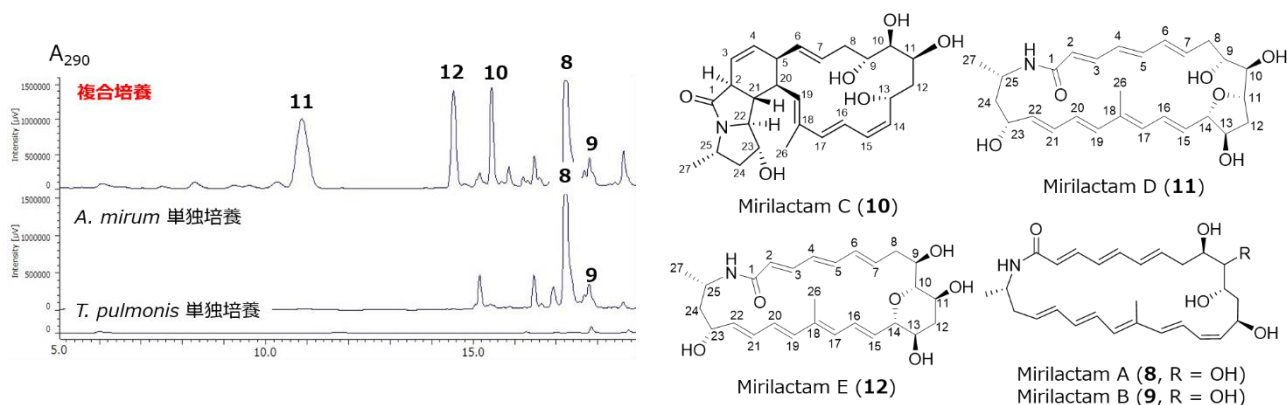


図 1-14: *A. mirum* 株の単独培養及び複合培養条件における HPLC プロファイル変化及び化合物 **8-12** の構造式 (HPLC 条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II column (4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) in a CH₃CN (solvent A)/H₂O with 0.05% formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (5 min) -70% (12 min) -100% (15-25 min), 1.0 ml min⁻¹).

A. mirum* + *T. pulmonis
(複合培養, 2.0 L)

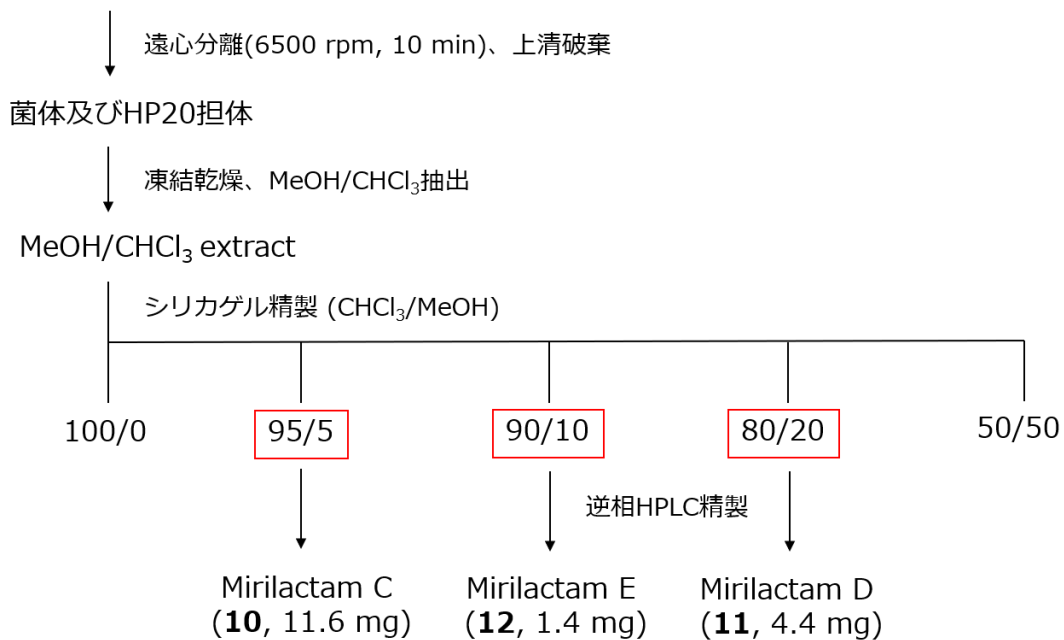


図1-15: 化合物**10-12**の単離操作

化合物 **10-12** の平面構造決定

続いて化合物 **10-12** の NMR 解析を行った。最初に収量が最も多かった化合物 **10** について解析したところ、その NMR スペクトルは dracolactam A (**1**) と高い一致を示した。そこで dracolactam A の NMR スペクトルとの詳細な比較を行った所化合物 **10** には dracolactam A の 26 位に相当するメチル基が存在しておらず、また dracolactam A に存在する 8 位の CH シグナルが CH₂ へと置き換わっていた為 (δ_{H} 2.58, 2.05/ δ_{C} 37.2)、化合物 **10** は dracolactam A の 8-demethyl 誘導体であることが示唆された。続いて COSY スペクトル解析を行った所 2 つのフラグメント構造 (図 1-16A, フラグメント I 及び II) が得られ、更に HMBC スペクトルの解析を行うことで各フラグメント及び残る窒素及び炭素原子間の結合を全て確立した (図 1-16A)。更に NOESY 相関 (図 1-16B) 及びオレフィンプロトン間のカップリング定数から、各オレフィンにおける配座解析を行い化合物 **10** の平面構造を一通り決定した。化合物 **10** は当初推測通り dracolactam A の 8-demethyl 体に当たる新規化合物であった。

続いて化合物 **11** の NMR 解析を行った所、その NMR スペクトルは dracolactam B と良い一致を示し、同様に化合物 **11** は dracolactam B の 8-demethyl 体であると推測された。続く COSY スペクトル解析から 4 つのフラグメント構造 (図 1-16A, フラグメント I-IV) が得られ、残る化学結合については HMBC スペクトル解析及び分子式に基づいて決定した。また、化合物 **11** には 7 つの二重結合が存在しているが、この部分については NOESY 相関 (図 1-16C) 及びカップリング定数解析からいずれも *E* 配座と決定した。従って化合物 **11** もまた推測通り dracolactam B の 8-demethyl 体に当たる新規化合物であった。

続いて残る化合物 **12** の NMR 解析を行ったところ、そのスペクトルは化合物 **11** に類似しており化合物 **12** に関しても 7 つの二重結合を有する二環性化合物であることが示唆された。続いて化合物 **10** 及び **11** の場合と同様に COSY 及び HMBC スペクトル解析を行った所、C-C 結合及びアミド結合の様式に関して化合物 **11** 及び **12** は全く同様であった。その一方で化合物 **12** の HMBC スペクトルを詳細に検討した所、化合物 **11** では観測され得ない H-10 位 (3.17 ppm) から C-14 位 (79.5 ppm) への相関が確認されたことから化合物 **12** は化合物 **11** における THF 環構造が THP 環へと置き換わった新規化合物であると考えられ、このことは C-10 位の化学シフトが化合物 **11** と比較して大幅に低磁場シフトしている事からも支持された (化合物 **11**: 73.7 ppm, 化合物 **12**: 82.5 ppm)。また、化合物 **12** に存在する全てのオレフィン部分の配座はこれまでと同様に NOESY 解析及びカップリング定数の解析からいずれも *E* 配座であると決定された (図 1-16C)。

後述するように化合物 **10-12** はいずれも mirilactam A (**8**) を共通の生合成前駆体として得られた化合物と考えられた事から、各々 mirilactam C-E と命名した。

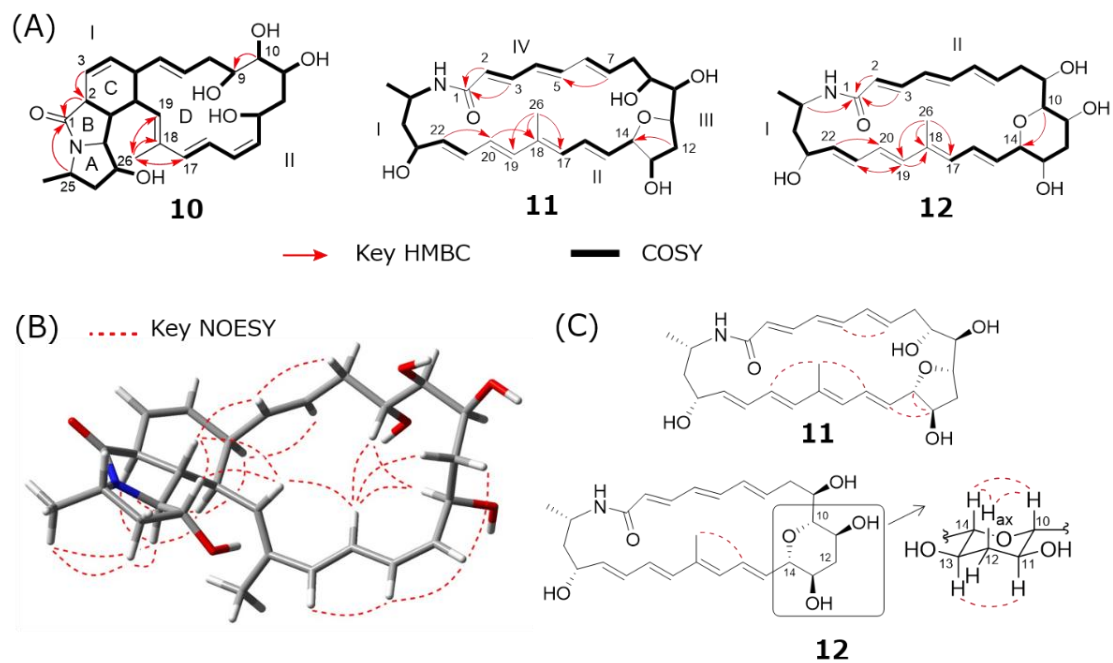


図 1-16: (A) 化合物 **10-12** の COSY 及び HMBC 解析 (B) 化合物 **10** における NOESY 解析 (C) 化合物 **11** 及び **12** に対する NOESY 解析

表 1-7: 化合物 **10-12** の NMR スペクトル (いずれも重メタノール中で測定。但し交換性プロトンについて記載があるものは重 DMSO 中で測定)

Position	Mirilactam C (10)		Mirilactam D (11)		Mirilactam E (12)	
	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J in Hz)	δ_{C}
1	-	174.5	-	166.8	-	166.0
2	3.21 (brd, 11.5)	49.5	5.73, (d, 15.0)	123.6	5.75, (d, 15.0)	121.9
3	5.96 (d, 10.0)	121.8	6.94 (dd, 11.0, 15.0)	140.5	6.80 (dd, 11.0, 15.0)	141.4
4	5.52 (ddd, 3.5, 3.5,	132.1	6.09 (dd, 11.0, 15.0)	128.1	6.11 (dd, 11.0, 15.0)	126.8
5	2.97 (m)	45.3	6.39 (dd, 10.5, 15.0)	139.8	6.21 (dd, 11.0, 15.0)	141.1
6	5.45 (dd, 10.5, 15.5)	131.5	6.16 (m)	132.1	6.08 (dd, 11.0, 15.5)	128.6
7	5.71 (ddd, 5.0, 10.5,	129.3	5.99 (dd, 7.5, 15.0)	134.6	5.94 (ddd, 5.5, 11.0,	136.7
8	2.58 (m)	37.2	2.62 (ddd, 7.5, 7.5, 15.0)	35.1	2.58 (m)	40.8
	2.05 (m)		2.48 (m)		2.38 (m)	
9	3.51 (m)	73.6	3.81 (ddd, 3.5, 6.5, 6.5)	74.5	3.76 (ddd, 4.5, 8.0,	74.5
10	3.51 (m)	76.6	3.34 (dd, 6.5, 9.0)	73.7	3.17 (dd, 8.0, 9.0)	82.5
11	4.20 (m)	69.0	4.38 (ddd, 6.5, 9.0, 9.0)	80.2	3.71 (ddd, 4.5, 9.0,	69.3
12	2.06 (m)	39.7	2.11 (dd, 6.5, 13.5)	37.8	2.36 (ddd, 4.5, 4.5,	41.3
	1.48 (ddd, 2.0, 11.0,		2.02 (ddd, 4.5, 9.0, 13.5)		1.53 (ddd, 11.0, 11.0,	
13	4.72 (dd, 10.0, 11.0)	65.9	4.27 (d, 4.5)	74.3	3.29 (ddd, 4.5, 9.5,	70.5
14	5.39 (dd, 10.0, 11.0)	134.8	4.53 (brd, 4.0)	86.5	3.65 (dd, 4.0, 9.5)	79.5
15	5.92 (dd, 11.0, 11.0)	126.9	5.67 (dd, 4.0, 15.5)	132.3	6.00 (dd, 4.0, 15.0)	129.3
16	6.39 (dd, 11.0, 15.5)	123.3	6.53 (ddd, 1.0, 11.0,	127.4	6.62 (ddd, 2.0, 11.0,	127.0
17	6.06 (d, 15.5)	138.3	5.98 (d, 11.0)	129.5	6.10 (d, 11.0)	130.0
18	-	135.1	-	136.1	-	135.8
19	5.64 (d, 11.0)	128.5	6.12 (m)	136.2	6.16 (d, 15.5)	136.4
20	3.08 (ddd, 6.5, 11.0,	40.3	6.11 (m)	128.6	6.08 (dd, 11.0, 15.5)	128.1
21	1.94 (ddd, 9.5, 11.5,	49.9	6.16 (m)	130.3	6.17 (dd, 11.0, 15.0)	131.2
22	3.57 (dd, 5.0, 9.0)	69.7	5.59 (dd, 12.5, 15.0)	135.7	5.46 (dd, 9.5, 15.0)	134.2
23	3.92 (m)	73.7	4.14 (m)	71.8	4.14 (ddd, 4.0, 9.5,	73.1
24	2.36 (ddd, 6.5, 6.5,	43.7	1.86 (m)	44.0	1.85 (ddd, 1.0, 4.0,	43.0
	1.64 (ddd, 6.5, 6.5,		1.67 (m)		1.61 (ddd, 10.5, 10.5,	
25	3.92 (m)	48.6	4.05 (m)	42.9	3.95 (m)	42.0
26	1.79 (s)	15.0	1.74 (s)	12.0	1.74 (s)	11.9
27	1.23 (d, 7.0)	19.8	1.15 (d, 6.5)	21.7	1.23 (d, 7.0)	22.2
9-OH	4.47 (brs)	-	4.36 (d, 2.5)	-	-	-
10-OH	4.39 (brs)	-	4.77 (d, 5.0)	-	-	-
11-OH	4.18 (brs)	-	-	-	-	-
13-OH	4.55 (brs)	-	5.00 (brs)	-	-	-
23-OH	4.67 (brs)	-	4.73 (brs)	-	-	-
NH	-	-	7.61 (d, 9.5)	-	-	-

Mirilactam C-E の相対立体化学決定

続いて化合物 **10-12** の相対立体化学の議論を行ったが dracolactam 類の場合と同様、まず最も収量が多く更に比較的配座自由度の低い 4 環性構造を持つ mirilactam C (**10**) に着目してその相対立体化学の決定を目指した。Mirilactam C に存在する 4 つの環構造のうち (図 1-16A, A-D 環)、A-C 環構造については強固な 5/5/6 縮環より構成されているため dracolactam A の場合と同様にして NOESY 解析と幾つかの特徴的なカップリング定数に基づきその相対化学を完全に決定した。

続いて比較的配座自由度の高い D 環部分 (16 員環) についても dracolactam A の場合と同様にまず 1,2,3,5-tetraol 構造に着目して、アセトナイド保護及び得られた誘導体の ^{13}C NMR 解析に基づく相対化学の決定を目指した。Mirilactam C を基質として反応温度及び反応溶媒を検討した結果、methanol/DMP 混合溶媒中で PPTS を酸触媒として低温 (4°C) にて反応を行った所 C-10 位及び 11 位に acetonide 基が導入された誘導体 **13** が、acetone/DMP 混合溶媒中で PPTS を酸触媒に常温反応を行った所 C-9 位と 10 位及び 11 位と 13 位の 2 か所に acetonide 基が導入された誘導体 **14** がそれぞれ得られた (図 1-17)。誘導体の acetonide 部分における ^{13}C NMR シグナルの帰属を行い、図 1-7 に則り 1,2,3,5-tetraol 部の相対化学を検討したところ、9*R**, 10*R**, 11*S**, 13*R** と決定された。

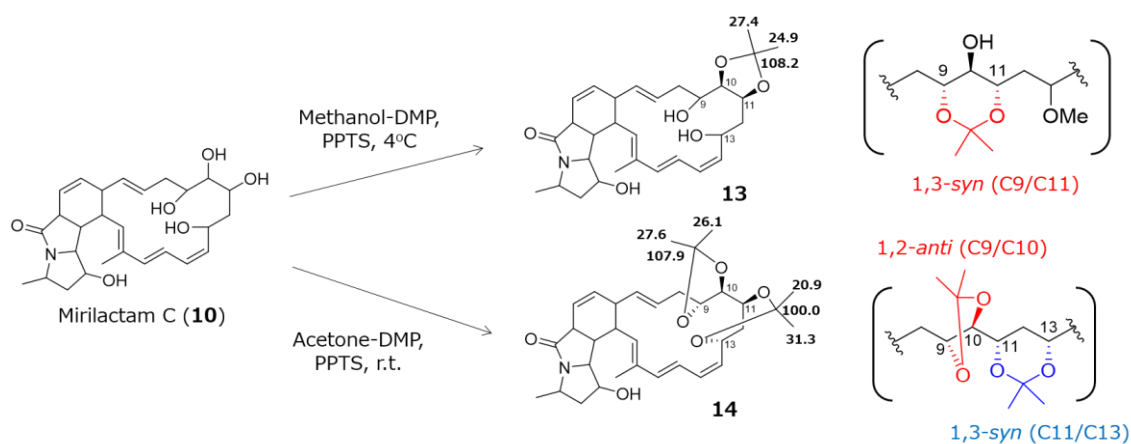


図 1-17: Mirilactam C (**10**) の acetonide 保護及び 1,2,3,5-tetraol 部位の相対立体化学

上述の A-C 環部分の NMR 解析及び acetonide 保護による 1,2,3,5-tetraol 部位の相対化学に関する解析結果から、mirilactam C (**10**) が取りうる相対立体化学は図 1-18A に示す 2 通りに絞られた (**10A** 及び **10B**)。最終的な mirilactam C の相対化学決定を行う為 **10A** 及び **10B** に対して分子力場法による配座生成を行い、得られた各配座について NMR スペクトルとの比較を行う事とした。まず Mirilactam C の候補として考えられる **10A** 及び **10B** について OPLS3 分子力場¹⁵ による配座生成を行った所、**10A** から 27 種類及び **10B** から 24 種類の配座を最安定配座から 40 kJ/mol 以内に存在する配座として得られた

(図 1-18A)。これら合計 51 種類の配座に対し実際の NMR スペクトルから得られる隣接水素原子間の二面角 (図 1-18B、特に 10 Hz 以上カップリング定数を持つ水素原子同士は互いに anti-periplanar の関係にあり、0 Hz に近いものは約 90°であることが強く示唆される)や NOESY 相関 (図 1-16B、特に H9/H13 や H9/H16 などの渡環 NOESY 相関)を全て満たす配座の絞り込みを行った。その結果 **10A** から生成された 27 配座のうち 7 配座は実際の NMR スペクトルを正確に反映する配座を与えた一方、**10B** から生成された配座の中に NMR スペクトルの結果を反映するものは存在していなかった。以上のことから mirilactam C の相対立体化学は **10A** であると決定した。

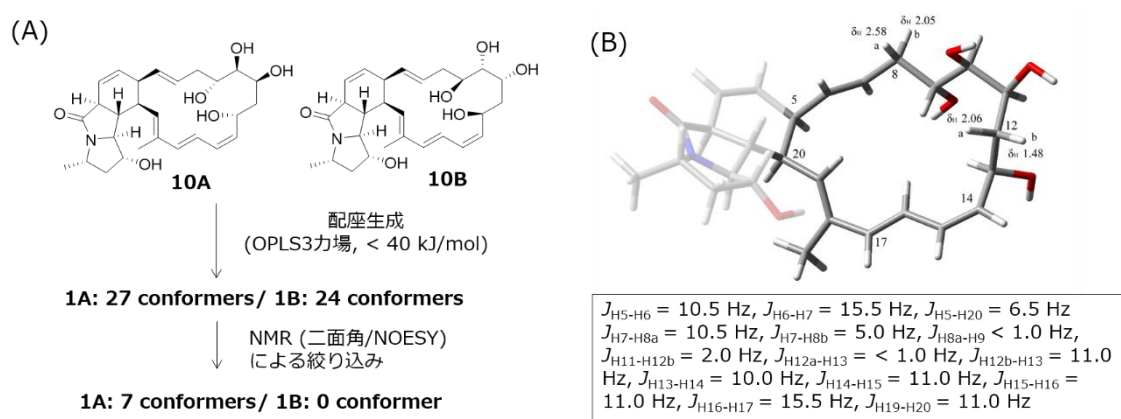


図 1-18: (A) 最終候補となる mirilactam C の相対配置 (**10A** 及び **10B**)に対する配座解析の概略 (B) Mirilactam C の D 環部分に関するカップリング定数解析

また mirilactam C-E はいずれも共通の生合成前駆体 mirilactam A から生じると考えられることから、その相対化学についても互いに保存されていると考えられる。従って上述の議論により決定された mirilactam C の相対立体化学に倣うことで mirilactam D 及び E の相対立体化学はそれぞれ THF 及び THP 環部分の 14 位を除き全て決定することが出来る。一方 mirilactam D の 14 位の相対立体化学については 13 位と 14 位のプロトン間のカップリング定数が 0 Hz であったこと (すなわち 13 位と 14 位のプロトン間の二面角が約 90°)から dracolactam B で行った議論と全く同様にして決定した (図 1-10B 及び C)。一方で mirilactam E の 14 位における相対配置については、THP 環における各種 NOESY 相関に基づいて決定した (図 1-16C、H-10/H-14 及び H-12_{ax}/H-14)。

Mirilactam C-E の絶対化学決定

Mirilactam 類の絶対化学を決定する為、量子化学計算による mirilactam C (**10**) の ECD スペクトルの予測及び実測値との比較を行った。まず mirilactam C の ECD スペクトル予測を行う為、先程の分子力場計算によって得られた各配座 (図 1-18A) について密度汎関数法 (DFT 法) に基づく構造最適化及び自由エネルギー計算を行った。その後、時間依存密度汎関数法 (TD-DFT 法) によって構造最適化を行った各配座について ECD スペクトル計算を行い、ボルツマン分布に基づく重ね合わせを経て最終的な予測 ECD スペクトルを出力した (図 19、互いにエナンチオマーである **10A1** 及び **10A2** について計算を行っている)。

こうして得られた両エナンチオマーの予測 ECD スペクトルを実測の ECD スペクトルと比較した所、一方のエナンチオマーについて良い一致を示したことから mirilactam C の絶対化学について図 1-14 に示す通り決定した (**10A1**, 図 1-19)。また残る mirilactam D 及び E の絶対立体化学についても生合成背景 (図 1-20) を考慮すると mirilactam C と同一であると考えられる。

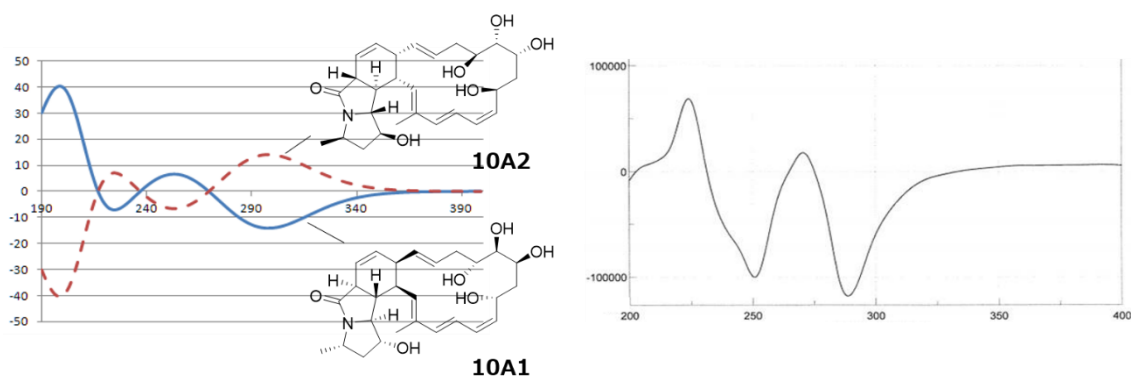


図 1-19: Mirilactam C の予測 ECD スペクトル (左側) 及び実測 ECD スペクトル (右側)

Mirilactam C-E の生合成経路

得られた化学構造から、化合物 **10-12** はいずれも dracolactam 類の場合と同様に mirilactam A がエポキシ化及び分子内環化反応を受けて生合成されることが強く示唆された (図 1-20)。また mirilactam C 及び D の生合成経路は図 1-12A に示した dracolactam A 及び B の生合成経路に対応するものであった一方 (図 1-20 path a 及び b)、mirilactam E は 11 位の水酸基の代わりに 10 位の水酸基がポリエーテル部分に攻撃することで生じた化合物であり、対応する生合成経路は dracolactam 類では存在しない (図 1-20, path c)。この点に関して、micromonolactam (**7**) と比べて mirilactam A (**8**) では 8 位のメチル基を欠いており、結果として図 1-20 に示すエポキシ中間体における各コンフォメーション間の安定性に変化を与え 10 位の水酸基がポリエーテル部に攻撃可能な配座を取り得るようになった事が原因と考えられる。更に推定前駆体である mirilactam A を *T. pulmonis* の純粋培養液に

添加した所、mirilactam C-E への変換は見られなかったことから、やはり mirilactam A の分子内環化 (エポキシ化) を担う遺伝子群も *A. mirum* 株のゲノム中にコードされており、本節の冒頭で推測したとおり複合培養を通じて休眠状態が解除されたものと思われる。

また、先行研究により提唱された前駆体である mirilactam A の立体化学¹⁴ と図 1-20 に示す生成経路によって推測される mirilactam C-E の立体化学は、本節で NMR 及び計算化学に基づいて決定した立体化学と完全に一致した。

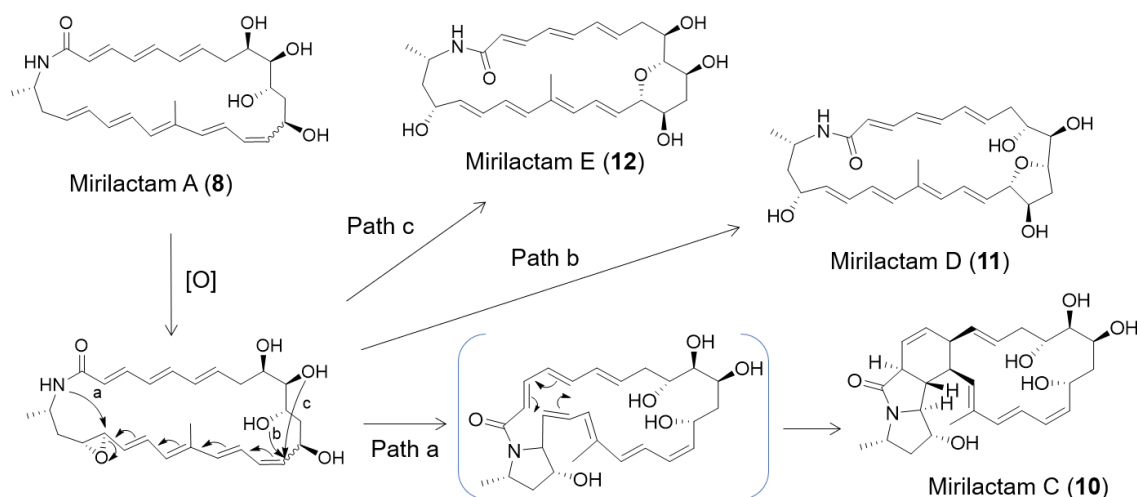


図 1-20: Mirilactam C-E の推定生成経路

Mirilactam C-E の生物活性試験

最後に mirilactam C-E についていくつかのヒト癌細胞株に対する細胞毒性の検討及び幾つかの微生物株に対する抗菌アッセイを行った。ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa, ヒト乳がん細胞株 MCF-7 或いはヒト肺がん細胞株 A549 など複数の細胞株に対する細胞毒性を測定したが、特に細胞毒性は検出されなかった。*Bacillus cereus* 及びメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 及び *Candida albicans* に対する生物活性も評価したが、明確な生育阻害活性が確認されることは無かった。

1-4. 小括

本章では二種類の希少放線菌種 *Micromonospora wenchangensis* HEK797 株及び *Actinosynnema mirum* NBRC14046 株に対して複合培養を行うことで、新規骨格を有する polyene macrolactam 化合物である dracolactam 類及び mirilactam C-E を獲得した。

以上の結果は従来適用範囲が *Streptomyces* 属放線菌に限定されていた複合培養法が、希少放線菌に対しても適用可能であることを強く示唆するものであり、今後希少放線菌を含めた放線菌全般に対する休眠生合成遺伝子の活性化手法として複合培養法が有効であることを強く示唆している。

1-5. 実験項

実験機器

各化合物の旋光度については全て JASCO DIP-1000 digital polarimeter を用いて測定を行い、UV スペクトルは化合物 **10** については SHIMAZU UV-1280 にて測定を行い、それ以外の化合物は全て JASCO MD-2010 Plus multiwavelength を用いて測定した。各 NMR スペクトルのうち、化合物 **12** については Bruker AVANCE III 900 spectrometer (^1H : 900 MHz, ^{13}C : 225 MHz)を用いて測定を行い、残りの化合物については JEOL ECX-500 または ECA-500 (いずれも ^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz)を用いて計測した。また化合物 **10** の ECD スペクトルはメタノール中 Circular Dichroism Spectrometer (J-805 series, JASCO)を用いて測定した。また、dracolactam 類及びその誘導体の HRMS 測定については 6550 iFunnel Q-TOF-MS (Agilent)を装着した UPLC-MS(1290 Infinity UHPLC)を用いて行い、mirilactam C-E 及びその誘導体については Bruker Compact QqTOF mass を用いて行った。

本項で使用した微生物

本項で使用した微生物株のうち、*Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株は過去に富山県土壌から単離された株¹⁶であり、共同研究を行っている東京大学農学部の尾仲宏康教授より分与頂いた。また、希少放線菌 *Micromonospora wenchangensis* HEK797 株は石川県輪島市の舳倉島に存在する龍神湖の沈殿物から 2008 年に単離され、その 16S rRNA 遺伝子の部分配列に基づいて同定された株であり、同じく東京大学の尾仲教授より分与頂いた (*Micromonospora wenchangensis* 2602GPT1-05 株の 16S rRNA 遺伝子に対して 100%の塩基相同性を示した)。また、mirilactam A 生産菌である *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 株は製品評価技術基盤機構 (NITE)に寄託されている株を購入して使用した。

複合培養による二次代謝誘導の確認

ISP2 寒天培地 (0.4% Glucose, 1.0% Malt extract, 0.4% Yeast extract, pH = 7.2) 上に各希少放線菌及び *T. pulmonis* 株を播種し 30℃にて 1–2 週間培養後、これらの寒天培地の一部を切り取り前培養用の V-22 培地 (1.0% Starch, 0.5% Glucose, 0.2% Yeast extract, 0.3% NZ Case, 0.3% CaCO₃, 0.5% Tryptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, pH = 7.0)が入ったフラスコへと植菌した (各 100 ml, 但し希少放線菌培養にはバツフル付きフラスコ、*T. pulmonis* については通常の三角フラスコを使用)。その後 160 rpm 及び 30℃の条件で前培養 (希少放線菌: 3 日、*T. pulmonis*: 2 日)を行った。前培養完了後、希少放線菌 (*M. wenchangensis*/*A. mirum*)の前培養液 3 ml 及び *T.*

pulmonis 株の培養液 0.3 ml をそれぞれ取り、物質産生培地である A-3M 培地 (2.0% Starch, 1.5% Pharma media, 0.5% Glucose, 2.0% Glycerol, 0.3% Yeast extract, 1.0% HP-20, pH =7.2)100 mlが入ったバツフル付きフラスコへと植菌し物質生産を行う為 5 日間、前培養と同じ条件にて震盪培養を行った。また複合培養時と代謝プロファイルの比較を行う為、各希少放線菌及び *T. pulmonis* 株の単独培養も同じ行程で行った。

続いて代謝解析を行う為、各培養液 10 ml を回収して等量の n-butanol を加えて攪拌後遠心分離によって n-butanol 層を回収、減圧濃縮を行った。そして残渣に 500 μ l のメタノールを加えて溶解させ、HPLC 分析を行った (HPLC 条件は図 1-2 の説明文中に記載)。

Dracolactam 類の単離

上述と同様の手順で調整した *M. wenchangensis* HEK797 株及び *T. pulmonis* TP-B0596 株の複合培養液 (A-3M 培地、100 ml x 15 本)を回収後、遠心分離を行い菌体及び HP-20 担体を回収した (物質生産用培地である A-3M 培地は成分として HP-20 担体を含んでおり、遠心分離を行う段階では菌体側含まれる)。凍結乾燥した菌体及び HP-20 担体はメタノール (800 ml)による抽出後減圧濃縮を行い粗抽出物とした。

得られた粗抽出物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール系)による分画を行い、メタノール/クロロホルム = 0/100, 5/95, 10/90, 20/80, 50/50 の計 5 つのフラクションを得た。HPLC により各フラクションの分析を行った結果 dracolactam A (**1**)及び B (**2**)は 10/90 及び 20/80 の 2 つのフラクションに跨る形で存在していたため、これらのフラクションについては濃縮後再度同じ溶媒系にてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。同様にメタノール/クロロホルム = 0/100, 5/95, 10/90, 20/80, 50/50 の 5 つのフラクションに分画後 HPLC 分析を行った所、dracolactam A は 10/90 フラクション、dracolactam B は 20/80 フラクションで主に検出された。最後にこれらフラクションに対して分取 HPLC (Cosmosil Cholester column, 10 x 250 mm, Nacalai Tesque, Japan)による最終精製を行うことで 15.2 mg の dracolactam A 及び 3.2 mg の dracolactam B をそれぞれ白色粉末として獲得した。

Dracolactam A (**1**): white powder. $[\alpha]_D^{25} -31.7^\circ$ (c 0.113, MeOH); UV (CH₃CN) λ_{max} : 218 nm, 295 nm; HRMS m/z 486.2859 [M+H]⁺ (calcd for C₂₈H₃₉NO₆, 486.2850); ¹H and ¹³C NMR: 表 1-1 参照

Dracolactam B (**2**): white powder. $[\alpha]_D^{25} -301.1^\circ$ (c 0.013, MeOH); UV (CH₃CN) λ_{max} : 271 nm; HRMS m/z 486.2860 [M+H]⁺ (calcd for C₂₈H₃₉NO₆, 486.2850); ¹H and ¹³C NMR: 表 1-2 参照

Dracolactam A の acetonide 保護 (誘導体 **3** 及び **4** の合成)

まず反応性を確認するため、ごく少量の dracolactam A (**1**)を DMP (2,2-dimethoxy propane)とアセトンの 1:1 混合溶媒 (300 μ l)に溶かし、酸触媒として数片の PPTS (pyridinium p-toluenesulfonate)を加えた後に遮光下様々な温度にて終夜攪拌を行った。反応溶液を HPLC によって分析した所 30 $^{\circ}$ Cで攪拌した場合化合物 **3** が、4 $^{\circ}$ Cで攪拌した場合には化合物 **4** がそれぞれ主生成物として生じていた。

続いて、NMR 解析に十分な量の acetonide 保護体を得る為、2.0 mg の dracolactam A (**1**)を上述の反応条件にて化合物 **3** 或いは化合物 **4** へと変換させ、それぞれの反応溶液についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行うことで 1.6 mg の化合物 **3** 及び 1.3 mg の化合物 **4** をそれぞれ獲得した。

HRMS of **3**: m/z 540.3323 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{45}NO_6$, 540.3320)

HRMS of **4**: m/z 566.3504 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{34}H_{47}NO_6$, 566.3476)

NMR data of **3** and **4**: 表1-3及び表1-4を参照

Dracolactam B の acetonide 保護 (誘導体 **5** の合成)

反応を行う為、2.0 mg の dracolactam B (**2**)を DMP 及びメタノールの 1:1 混合溶媒 (1.0 ml)へと溶解させ、酸触媒である PPTS を数片加えた後遮光及び室温条件 (約 30 $^{\circ}$ C)にて 12 時間攪拌した。その後反応溶液に 5 ml の飽和 $NaHCO_3$ 溶液を加えて反応を停止させた。反応溶液に酢酸エチル (5 ml x 3)を加えて抽出を行い減圧濃縮の後にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。最終的にメタノール/クロロホルム = 2/98 フラクションより 1.2 mg の化合物 **5** が単離された。

HRMS of **5**: m/z 540.3326 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{32}H_{45}NO_6$, 540.3320)

1H NMR (in d_6 -DMSO): 表 1-5 参照

化合物 **5** の MTPA エステル化反応 (化合物 **6a** 及び **6b** の合成)

化合物 **5** 及び数片の DMAP (N, N-dimethyl-aminopyridine)を 0.5 ml の脱水 CH_2Cl_2 へと懸濁させた後、そこへ 3.0 mg の MNBA (2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride)、2.5 μ l のトリエチルアミン及び 3.0 mg の(S)-MTPA を添加して、遮光条件及び常温にて 3 時間攪拌を行った。反応混合物については直接シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行い 0.3 mg の化合物 **6a** を得た。また、同様の手順を(S)-MTPA の代わりに(R)-MTPA を用いて行うことで、0.5 mg の化合物 **5** から 0.2 mg の化合物 **6b** を得た。

HRMS of **6a**: m/z 756.3722 [M+H]⁺ (calcd for C₄₂H₅₂F₃NO₈, 756.3718)

HRMS of **6b**: m/z 756.3723 [M+H]⁺ (calcd for C₄₂H₅₂F₃NO₈, 756.3718)

Key NMR data of **6a** and **6b**: 表1-6参照

化合物 7 及び 8 の *T. pulmonis* 株に対する投与実験

まず代謝解析の際と同様の条件下 *T. pulmonis* 株を V-22 培地にて前培養を行い、0.3 ml の前培養液を A-3M 培地 (100 ml) へと加えて 160 rpm, 30°C にて震盪培養を行った。72 時間培養を続けた段階で 1.0 ml のメタノールに溶解させた *M. wenchangensis* 株の n-butanol 抽出物 (A-3M 培地 100 ml 中で 5 日間培養後同量の n-butanol にて抽出を行ったもの、抽出物中には十分量の化合物 7 が含まれている) を加えて更に 48 時間培養を継続した。培養完了後、70 ml の n-butanol を加えて代謝物の抽出を行い HPLC にて分析した所、化合物 7 の存在は確認された一方で、dracolactam A 及び B への変換は確認されなかった。

同様に A-3M 培地にて 72 時間培養した *T. pulmonis* 株の培養液に対して *A. mirum* NBRC 14064 株の n-butanol 抽出物 (調製方法は *M. wenchangensis* 株と同様、抽出物中には十分量の化合物 8 を含んでいる) を加えて更に 48 時間追加で培養を行った。その後培養液を n-butanol にて抽出後 HPLC による代謝解析を行ったが、やはり化合物 8 は検出された一方で変換後の代謝物である mirilactam C-E については検出されなかった。

抗菌活性試験

抗菌活性試験に使用する微生物株 (*Candida albicans*, *Bacillus cereus*, MSSA 及び *T. pulmonis*) はそれぞれ LB 培地で静止期に到達するまで前培養を行い、得られた前培養液を 2% の濃度となるように 50°C 程度に保温した LB 寒天培地へと添加後、シャーレへと移してそのまま放冷することで抗菌アッセイ用の LB 寒天培地を作成した。

その後、dracolactam 類及び mirilactam C-E を含ませた 6 mm ペーパーディスク (10 µg, 5 µg, 2.5 µg, 1.25 µg/disk) をそれぞれの微生物前培養液を含む LB 寒天培地へと乗せて 30°C、2 日間培養を行い阻止円の形成を確認した。なお、negative control としては各化合物の溶媒であるメタノールを、positive control としては ampicillin (Nacalai Tesque), chloramphenicol (Nacalai Tesque) 及び cycloheximide を使用した。

P388 細胞株を用いた dracolactam 類の細胞毒性試験

Dracolactam 類の細胞毒性試験に用いた P388 マウス白血病細胞株は RPMI 1640 培地 (Wako Chemicals, 10 µg/ml の penicillin 及び streptomycin, また 10% のウシ胎児血清を添加したもの) 中 37°C、5% CO₂ 雰囲気下培養を行った。その後 96well plate 上に 1 × 10⁵ cell/ml となるように P388 細胞培養液 100 µl を加え、そこへ 100 µl の

dracolactam 溶液 (100 mM に調製した dracolactam 類のメタノール溶液に上述の RPMI 培地を加えて作成したもの)を終濃度が 100 μ M から 0.78 μ M まで二倍希釈系列となるように加え、4 日間 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 雰囲気下で培養を行った。

培養完了後、1 mg/ml に調製した methyl thiazole-tetrazolium (MTT)の DMSO 溶液 50 μ l を 96 well plate へと加え更に 4 時間培養を行った。その後遠心分離によって上清を取り除き、沈殿物に 50 μ l の DMSO を加えて溶解させた後 microplate reader により 570 nm の吸光測定から細胞生存率を算出した。また、negative control としては dracolactam 類溶液の際に使用したメタノールを、positive control としては doxorubicin を使用した。

Mirilactam C-E の単離

Dracolactam 類の単離を行った場合と同様の手順で調整した *A. mirum* NBRC14064 株及び *T. pulmonis* TP-B0596 株の複合培養液 2.0 L (A-3M 培地、100 ml x 20 本)を回収後、遠心分離を行い菌体及び HP-20 担体を回収した。凍結乾燥を行った菌体及び HP-20 担体はメタノール及びクロロホルムの等量混合溶媒 (800 ml)による抽出後、減圧濃縮を行い粗抽出物とした。

得られた粗抽出物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール系)を用いて分画し、メタノール/クロロホルム = 0/100, 5/95, 10/90, 20/80, 50/50, 100/0 の計 6 つのフラクションを得た。HPLC により各フラクションに対して分析を行った結果、mirilactam C は 5/95 フラクション、mirilactam D は 20/80 フラクション、そして mirilactam E は 10/90 フラクションより検出された。最終的にこれらフラクションについて分取 HPLC (Cosmosil C₁₈-ARII column, 10 x 250 mm, Nacalai Tesque, Japan)を用いて精製することで 11.6 mg の mirilactam C、4.4 mg の mirilactam D 及び 1.4 mg の mirilactam E をそれぞれ白色粉末として獲得した。

Mirilactam C (**10**): White powder; $[\alpha]_D^{25}$ -11.5 $^{\circ}$ (c 0.443, MeOH); UV λ_{\max} (CH₃CN) nm: 211, 273; HR-ESI-MS m/z 472.2705 [M+H]⁺ (calcd for C₂₇H₃₇NO₆, 472.2699); ¹H and ¹³C NMR data: 表 1-7 参照

Mirilactam D (**11**): White powder; $[\alpha]_D^{25}$ -14.7 $^{\circ}$ (c 0.257, MeOH); UV λ_{\max} (CH₃CN) nm: 211, 294; HR-ESI-MS m/z 472.2683 [M+H]⁺ (calcd for C₂₇H₃₇NO₆, 472.2699); ¹H NMR and ¹³C NMR data: 表 1-7 参照

Mirilactam E (**12**): White powder; $[\alpha]_D^{25}$ +3.9 $^{\circ}$ (c 0.227, MeOH); UV λ_{\max} (CH₃CN)

nm: 211, 293; HR-ESI-MS m/z 472.2691 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{27}H_{37}NO_6$, 472.2699); 1H NMR and ^{13}C NMR data: 表 1-7 参照

Acetonide 誘導体 **13** の合成

1.5 mg の mirilactam C (**10**)を DMP-メタノール等量混合溶媒に溶解させ、酸触媒として数片の PPTS を加え遮光条件及び 4℃にて 4 時間攪拌を行った。その後減圧濃縮により溶媒を除去し、水-酢酸エチル系による分液を行った。酢酸エチル層については分取 HPLC (Cosmosil C_{18} -ARII column, 10 x 250 mm)による更なる精製を行い 0.8 mg の化合物 **13** を獲得した。

化合物 **13**: White powder; 1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ : 1.23 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.28 (3H, s), 1.34 (3H, s), 1.48 (1H, dd, $J = 13.5, 13.5$ Hz), 1.63 (1H, ddd, $J = 7.0, 7.0, 14.0$ Hz), 1.79 (3H, s), 1.81 (1H, m), 1.97 (1H, ddd, $J = 9.5, 12.5, 12.5$ Hz), 2.08 (1H, m), 2.37 (1H, ddd, $J = 7.0, 7.0, 14.0$ Hz), 2.50 (1H, m), 2.97 (1H, m), 3.08 (1H, m), 3.25 (1H, m), 3.57 (1H, m), 3.69 (1H, m), 3.88-3.95 (3H, m), 4.51 (1H, dd, $J = 5.5, 10.0$ Hz), 4.95 (1H, m), 5.35 (1H, dd, $J = 8.5, 10.5$ Hz), 5.47-5.55 (2H, m), 5.59 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 5.78 (1H, m), 5.89 (1H, dd, $J = 10.5, 10.5$ Hz), 5.97 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 6.05 (1H, d, $J = 15.0$ Hz), 6.43 (1H, dd, $J = 10.5, 15.0$ Hz); ^{13}C NMR data: HMBC 及び HMQC 解析に基づいて acetonide 領域のみ ^{13}C シグナルの帰属を行った (図 1-17 参照); HR-ESI-MS m/z 512.3022 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{30}H_{41}NO_6$, 512.3014).

Acetonide 誘導体 **14** の合成

1.5 mg の mirilactam C (**10**)を DMP-アセトン等量混合溶媒に溶解させ酸触媒として数片の PPTS を加えた後、常温・遮光条件にて 1 時間攪拌を行った。反応後、減圧濃縮により溶媒除去を行いシリカゲルクロマトグラフィーによる精製へと供し、0.4 mg の化合物 **14** をメタノール/クロロホルム = 2/98 フラクションより得た。

化合物 **14**: White powder; 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.10 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.19 (3H, s), 1.26 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.43 (3H, s), 1.48-1.53 (3H, m), 1.59 (1H, m), 1.75 (3H, s), 1.94 (1H, m), 2.36 (1H, m), 2.52 (1H, m), 3.00 (2H, m), 3.11 (1H, m), 3.46 (1H, dd, $J = 3.0, 9.5$ Hz), 3.75 (1H, m), 3.87 (1H, m), 3.99 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 4.13 (1H, m), 4.26 (1H, m), 4.67 (1H, d, $J = 4.0$ Hz), 4.98 (1H, m), 5.29 (1H, m), 5.34-5.38 (2H, m), 5.50 (1H, m), 5.59 (1H, dd, $J = 5.0, 15.0$ Hz),

5.93-5.96 (2H, m), 6.03 (1H, d, $J = 15.0$), 6.40 (1H, dd, $J = 11.5, 15.0$ Hz); ^{13}C NMR data: HMBC 及び HMQC 解析に基づいて acetonide 領域のみ ^{13}C シグナルの帰属を行った (図 1-17 参照); HR-ESI-MS m/z 552.3347 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_6$, 552.3327).

分子力場計算による mirilactam C の配座解析

本項における全ての分子力場計算は計算用ソフトウェアである MacroModel (Schrodinger 社)を用いて行った。まず NMR から導かれた二種類の候補化合物 **10A** 及び **10B** の初期配座について OPLS3 力場による構造最適化 (maximum iterations: 2500, convergence threshold: 0.05)を行い、エネルギー極小値に相当する配座へと導きこれを改めて input とした。続いて得られた input 配座を初期値として OPLS3 力場による配座サンプリングを行い (torsional sampling/Monte-Carlo Multiple Minimum algorithm, maximum number of step: 2000, maximum atom deviation cutoff: 2.0 Å)、最安定配座より 40 kJ/mol 以上高いエネルギーを持つ配座については切り捨てを行った。

結果図 1-18A でも示されている通りジアステレオマー**10A**からは 27 配座、ジアステレオマー**10B**からは 24 配座が生成された。その後得られた各配座について実際の NMR データから得られるプロトン間の二面角 (カップリング定数)及び距離情報 (NOESY 相関)に基づいて更なる配座の絞り込みを行った所、ジアステレオマー**10A** から生じた 27 配座のうち 7 配座は NMR によるプロトン間の情報と一切の矛盾を示さなかったが、ジアステレオマー**10B** から生じた配座の中に NMR の結果を満たす配座は存在せず、mirilactam C における相対化学は **10A** の通りであると結論付けられた。

DFT/TDDFT 計算に基づく mirilactam C の絶対立体決定

本項における DFT/TDDFT 計算は全て計算ソフトウェアである Gaussian 09 (Gaussian 社)を用いて行った。まず上述の分子力場計算と NMR データによる絞り込みによって得られた **10A** 由来の 7 つの安定配座に対して、DFT 法による構造最適化及び振動解析を行った (計算条件: B3LYP/6-31G (d) with Polarizable Continuum Model (PCM) in methanol)。構造最適化に加えて振動解析を行うことで DFT 計算によって最適化された構造が極小値であるか否かを判断し (得られた構造がエネルギー極小の場合虚振動は見られないが、極大であった場合 1 つ或いはそれ以上の虚振動バンドが見られるためその判別は容易である)、更に各最適化構造のギブズ自由エネルギーを算出する事が出来る。今回 DFT 計算を行った 7 つ最適化構造はいずれもエネルギー極小であり、それぞれのギブズ自由エネルギーの値についても算出された。

続いて ECD スペクトルの予測を行う為、DFT 計算で得られたギブズ自由エネルギーに

に基づいて各配座のボルツマン分布を計算した。その結果与えられた 7 つの配座の比率上位 2 配座のみで全体の約 95%を占めることが明らかとなったため、この 2 つに絞って ECD スペクトル計算を行うこととした (図 1-21)。2 つの配座に関する ECD スペクトル予測は TDDFT 法により行い (計算条件: B3LYP/TZVP with PCM in methanol)、得られた計算値をボルツマン分布に基づいた重ね合わせを行い最終的な予測 ECD スペクトルとした。またエナンチオマーの関係にある分子同士の ECD スペクトルは互いに鏡面関係になるため、残るエナンチオマーの予測 ECD スペクトルは、今回計算したスペクトルを反転させたものを使用した。最後に予測スペクトルとメタノール中で測定した実際の ECD スペクトルを比較する事によって mirilactam C の絶対立体化学を決定した。

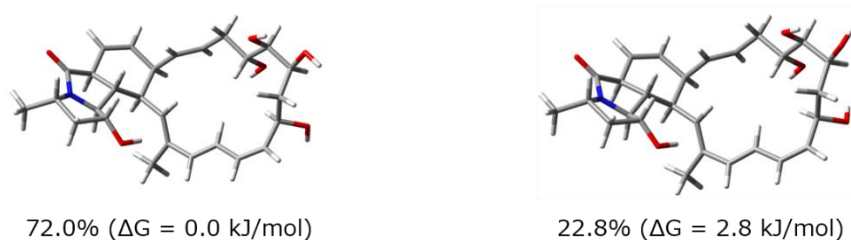


図 1-21: ECD スペクトル計算に用いた安定配座

ヒトがん細胞株を用いた mirilactam C-E の細胞毒性試験

Mirilactam C-E の細胞毒性アッセイに利用した株のうち、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞株)及び MCF-7 細胞 (ヒト乳がん細胞株)については α -MEM 培地、A549 細胞 (ヒト肺がん細胞)は DMEM 培地にて培養した (いずれの培地もウシ胎児血清 (10%)、penicillin (10^4 U/ml)及び streptomycin (10 mg/L)を添加している)。Mirilactam C-E の細胞毒性アッセイは Cell Counting Kit-8 (CCK-8)を用いて行った。すなわち 2×10^3 cell/ml に調製したそれぞれのがん細胞培養液 100 μ l を 96 well plate へと加え、そこへ終濃度 3.13 μ M-100 μ M となるように各化合物を加え 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 雰囲気下で 72 時間培養を行った。その後 100 μ l の CCK-8 溶液を 96-well plate へと加えて 1 時間培養を行い、450 nm の吸収を測定し、positive control には 5-fluoro uracil を使用した。

1-6. 参考文献

- [1] Hoshino, S., Okada, M., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H., & Abe, I. (2017). Mycolic Acid Containing Bacterium Stimulates Tandem Cyclization of Polyene Macrolactam in a Lake Sediment Derived Rare Actinomycete. *Organic Letters*, 19(18), 4992–4995.
- [2] Hoshino, S. et. al. (2018). Mirilactams C – E , Novel Polycyclic Macrolactams Isolated from Combined-Culture of *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 and Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin*, 66(6), 660–667.
- [3] Rychnovsky, S. D., & Skalitzky, D. J. (1990). Stereochemistry of alternating polyol chains: ¹³C NMR analysis of 1,3-diol acetonides. *Tetrahedron Letters*, 31(7), 945–948.
- [4] Dana, G., & Danechpajouh, H. (1980). Carbon-13 NMR study of the stereoisomerism of 4,5-disubstituted 2,2-dimethyl-1,3-dioxolanes. *Bulletin de la Societe Chimique de France II*, 395-399.
- [5] Napolitano, J. G., Gavín, J. A., García, C., Norte, M., Fernández, J. J., & Hernández, A. (2011). On the Configuration of Five-Membered Rings : A Spin – Spin Coupling Constant Approach, *Chemistry A European Journal*, 17(23), 6338–6347.
- [6] Seco, M., Quin, E., & Riguera, R. (2002). A practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols , amines and carboxylic acids by NMR. *Tetrahedron : Asymmetry Report*, 12(53), 2915–2925.
- [7] Skellam, E. J., Stewart, A. K., Strangman, W. K., & Wright, J. L. C. (2013). Identification of micromonolactam, a new polyene macrocyclic lactam from two marine *Micromonospora* strains using chemical and molecular methods: Clarification of the biosynthetic pathway from a glutamate starter unit. *Journal of Antibiotics*, 66(7), 431–441.
- [8] Raju, R., Piggott, A. M., Conte, M. M., & Capon, R. J. (2010). Heronamides A - C, new polyketide macrolactams from an Australian marine-derived *Streptomyces* sp. A biosynthetic case for synchronized tandem electrocyclization. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8(20), 4682–4689.
- [9] Hoshino, S., Okada, M., Wakimoto, T., Zhang, H., Hayashi, F., Onaka, H., & Abe, I. (2015). Niizalactams A-C, Multicyclic Macrolactams Isolated from Combined Culture of *Streptomyces* with Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Journal of Natural*

Products, 78(12), 3011–3017.

[10] Derewacz, D. K., Covington, B. C., McLean, J. A., & Bachmann, B. O. (2015). Mapping Microbial Response Metabolomes for Induced Natural Product Discovery. *ACS Chemical Biology*, 10(9), 1998–2006.

[11] Oh, D. C., Poulsen, M., Currie, C. R., & Clardy, J. (2011). Sceliphrolactam, a polyene macrocyclic lactam from a wasp-associated *Streptomyces* sp. *Organic Letters*, 13(4), 752–755.

[12] Zhu, Y., et. al. (2015). Characterization of Heronamide Biosynthesis Reveals a Tailoring Hydroxylase and Indicates Migrated Double Bonds. *ChemBioChem*, 16(14), 2086–2093.

[13] Low, Z. J., et. al. (2018). Identification of a biosynthetic gene cluster for the polyene macrolactam sceliphrolactam in a *Streptomyces* strain isolated from mangrove sediment. *Scientific Reports*, 8(1), 1594.

[14] Schulze, C. J., et. al. (2015). Genome-Directed Lead Discovery: Biosynthesis, Structure Elucidation, and Biological Evaluation of Two Families of Polyene Macrolactams against *Trypanosoma brucei*. *ACS Chemical Biology*, 10(10), 2373–2381.

[15] Harder, E., et. al. (2016). OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 281–296.

[16] Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., & Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 400–406.

本論

第 2 章

未探索希少放線菌に対する複合培養法の適用 及び新規生物活性物質の獲得

2-1. 概要

本章ではこれまで物質探索研究が殆ど (或いは一切)行われて来なかった希少放線菌属 (=未探索希少放線菌)に着目して複合培養法を適用することで、より効率的な新規二次代謝産物の獲得を目指した。結果、複合培養を通じて二次代謝の活性化が確認された 3 種類全ての未探索希少放線菌株 (*Umezawaea*、*Catenuloplanes* 或いは *Thermobifida*)について二次代謝物の単離構造決定を行った結果、いずれも新規化合物として Umezawamide 類¹、Catenulobactin 類²及び Thermobifidamide 類を獲得した。

これら新規二次代謝産物のうち Umezawamide 類は抗真菌活性を持つ polyene tetramate macrolactam 系化合物、Catenulobactin 類は siderophore 活性 (Fe(III)イオン結合能)を持つヘテロ環含有ペプチド、そして Thermobifidamide 類は新規構造と特異な生合成背景を有するアルカロイドと各々の代謝物が持つ生物活性、化学構造及び生合成背景は極めて多様であった。

本章ではこの 3 種類の未探索希少放線菌から複合培養法を通じて得られた新規二次代謝産物の単離構造決定、生物活性評価及びその推定生合成経路について詳細な記述を行う。

2-2. *Umezawaea* 属放線菌に対する複合培養法の適用と新規 polycyclic tetramate macrolactam 類の単離構造決定

未探索希少放線菌が産生する二次代謝産物

一概に希少放線菌と言ってもその生合成遺伝子クラスターの保有数にはかなりのばらつきがあり(序論図 2 参照)、また各放線菌種が保有する生合成遺伝子クラスター間の相同性はその 16S rRNA 遺伝子配列相同性に強く依存することが報告されている³。例えば前章で複合培養の対象とした *Micromonospora* 属及び *Actinosynnema* 属は希少放線菌の中では比較的多くの生合成遺伝子クラスターを保有する放線菌属である。その一方でこれらの放線菌属 (特に *Micromonospora* 属⁴)を対象とした物質探索研究の例は多く、従って今後 *Micromonospora* 属や *Actinosynnema* 属放線菌を対象とした二次代謝産物の探索研究は既知化合物を再単離してしまうリスクが高いと言える。

逆に言えば新規化合物を効率的に獲得する上で、これまで物質探索研究が行われていない希少放線菌属 (便宜上**未探索希少放線菌**と呼称する)をターゲットとすることが一つの有効なアプローチであることが期待される。この未探索希少放線菌を“未探索”たらしめる理由は大きく分けて 2 通りあり、1 つ目は Micrococcales 目及び Propionibacteriales 目放線菌のようにそもそも二次代謝産物の生合成遺伝子を殆ど持たない場合 (序論図 2 参照)であり、2 つ目は環境中の分離頻度が低い為に物質探索研究に至らない場合である。

前者の未探索希少放線菌から新規二次代謝産物を得ることは難しいが、後者のケースについては分離頻度が低いながらも高い二次代謝生産能力を有する希少放線菌は多く存在する為、複合培養法を含めた二次代謝産物の探索ターゲットとして大きな魅力を持つ。例えば 2009 年に新属として提唱された *Actinoallomurus* 属放線菌は、大半を植物共生菌として単離されているがいずれも高い二次代謝能を有する事が示唆されており⁵、実際に抗トリパノソーマ活性を有する actinoallolide 類⁶や高度にハロゲン化された allocyclinone 類⁷など特異な構造や活性を持つ二次代謝産物を生産する。また 2006 年に新属として提唱された土壌放線菌 *Catenulispora* 属は、他の放線菌に比べて分離用培地上の生育が極めて遅い等の要因から分離報告自体が極めて少ない。一方で二次代謝産物を産生する能力には長けており、抗マラリア活性を有する catenulisporolide 類⁸が単離されている (図 2-1)

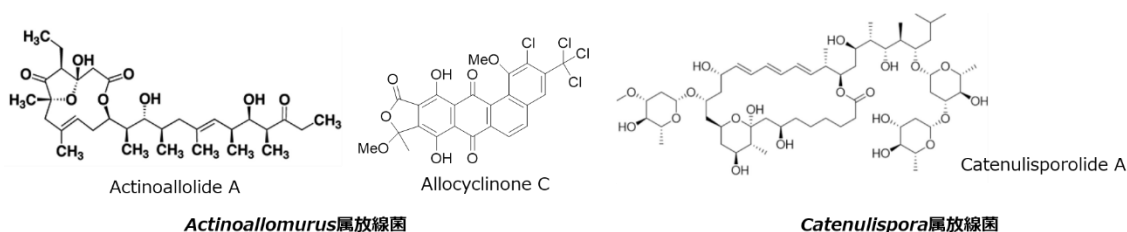


図 2-1: 未探索希少放線菌から単離された新規二次代謝産物の例

このように未探索希少放線菌の中には新規二次代謝産物の宝庫と捉えられる種も数多く存在しており、本章ではこれら未探索希少放線菌を対象とした複合培養スクリーニングを行うことで、より効率的な新規二次代謝産物の獲得を目指した。本研究を行うにあたり未探索希少放線菌属ソースとして製品評価技術基盤機構 (NITE) にスクリーニング用微生物として登録されている RD 株を使用した。

Umezawaea 属放線菌に対する複合培養法の適用

Umezawaea 属放線菌は 2007 年に新属として提唱された比較的歴史の浅い放線菌であり、これまで分類学的及び生態学的な研究がいくつかなされているが、これまでの所二次代謝産物の生産報告は一切無い^{9,10}。一方 *Umezawaea* 属自体は *Pseudonocardiales* 目に分類される希少放線菌属であることから、高い二次代謝産物の生産能力を有する事が期待され (序論図 2 参照)、RD 株の 1 つである *Umezawaea* sp. RD066910 株についてミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* を用いた複合培養を行った。

前章の図 1-1 と同様の手順にて RD066910 株と *T. pulmonis* 株との複合培養を行い、HPLC による代謝プロファイルを確認した所 RD066910 株の単独培養時と比較して 3 種類の二次代謝産物の産生誘導が確認された (化合物 **15-17**, 図 2-2)。続いてこれら化合物の単離構造決定を行う為 2.0 L のスケールにて A-3M 培地中複合培養を行い、培養液の遠心分離を行うことで上清と菌体 (及び培地中の HP-20 担体) へと分離した。上清は酢酸エチルを用いて、菌体については凍結乾燥後にメタノールを用いて抽出を行い粗抽出物とした。粗抽出物の HPLC 解析から化合物 **15** は上清抽出物、化合物 **16** 及び **17** は菌体抽出物中に大部分が存在していた (図 2-3)。

はじめに化合物 **15** の構造決定を行う為上清抽出物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる粗精製及び逆相分取 HPLC による最終精製を行い、最終的に 2.8 mg の化合物 **15** を得た (詳細は実験項にて記載)。単離した化合物 **15** について NMR 解析を行った所そのスペクトルは既知天然物である nakienone A¹¹ のものと完全に一致した。Nakienone A は 1995 年に類縁体 nakienone B 及び C と共にサンゴ礁に生じたラン藻より単離され、その後も幾つかの海洋無脊椎動物より単離されている二次代謝産物である^{11,12}。一方でラン藻以外の微生物における nakienone A の産生報告は無く、類縁化合物に関しても根圏土壌由来の希少放線菌 *Actinoalloteichus nanshanensis* NEAU 119 株より単離された cycleptenone 誘導体の単離報告が唯一であった¹³。従って今回の複合培養を通じて得られた nakienone A は新規化合物でこそなかったものの、従来の放線菌が産生する二次代謝産物とは一線を画する構造を有しており、未探索希少放線菌の二次代謝産物探索研究における有用性を示唆する結果であった。

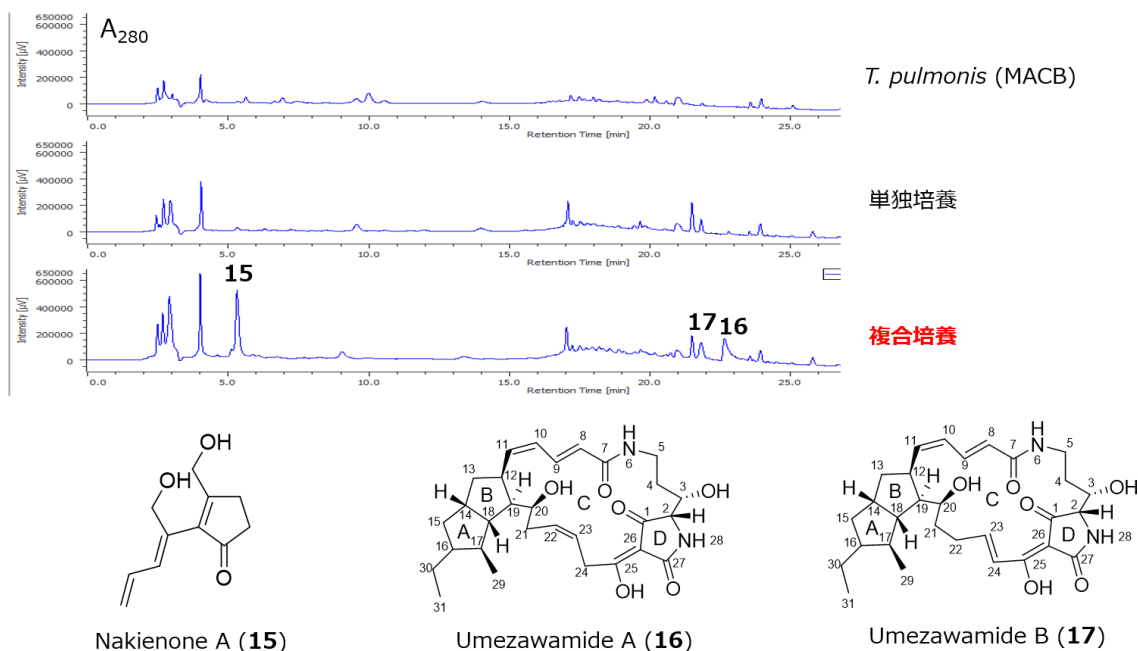


図2-2: *Umezawaea* sp. RD066910株における複合培養代謝物のHPLC解析及び化合物**15-17**の化学構造 (HPLC条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II column (4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) in a CH₃CN (solvent A)/H₂O with 0.05% formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (5 min) -70% (12 min) -100% (15-25 min), 1.0 ml min⁻¹).

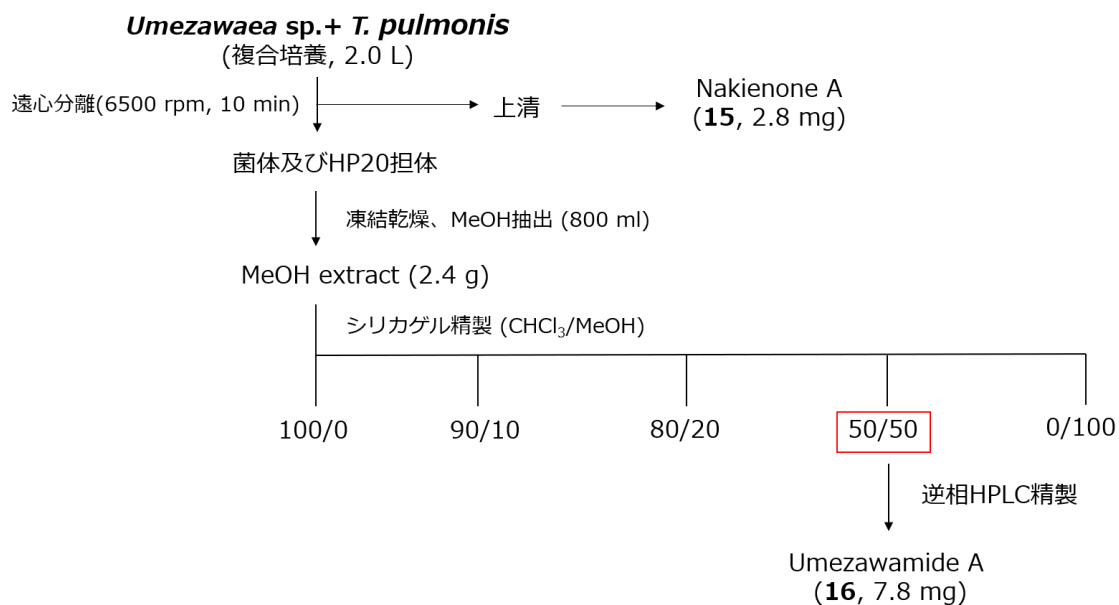


図 2-3: 化合物 **15** 及び **16** の単離プロセス (化合物 **15** の詳細に関しては実験項参照)

化合物 **16** の単離及び安定性評価

続いて代謝物 **16** 及び **17** の単離構造決定を行う為、菌体メタノール抽出物に対してシリカゲルクロマトグラフィーによる粗精製及び逆相分取 HPLC による最終精製を行った所、7.8 mg の化合物 **16** を白色粉末として得た (図 2-3)。一方で minor product であった化合物 **17** については収量が少なく、この時点では単離に至らなかった。

得られた化合物 **16** の構造決定を行う為複数の重溶媒条件中 NMR 解析を試みたが、この化合物はいずれの重溶媒中でも化学的に不安定であり、構造解析に必要な長時間の NMR 解析を行う事が出来なかった。このうち大半の重溶媒中において化合物 **16** の NMR シグナルは 2 つ以上化合物に由来する複雑なシグナルへと変化していった為、重溶媒中でどのような現象が起こっているかを把握する事が困難であった。しかしながら化合物 **16** の NMR スペクトルを重 DMSO 溶媒中計測した場合、化合物は別の単一化合物に由来すると思われるシグナルへと変化しく様子が見られた。そして化合物 **16** を NMR 管中にて 3 日間常温放置した結果変換は完全に完了しており、生成物は化学的に安定であった (図 2-4A)。

続いて重 DMSO 内でどのような変換が起こっているかを明らかとする為に HPLC 解析を行った。すると重 DMSO 中にて 3 日間放置した場合、NMR 解析の場合と同様に化合物 **16** に由来するピークは殆ど消失しており、代わりに UV 吸収が長波長シフトを起こした別のピークが生じていた (図 2-4B)。興味深いことに新しく生じたピークは微量成分と考えられていた化合物 **17** のピークと完全に一致しており、従って化合物 **16** は DMSO 中において共役系の延長を伴う何らかの非酵素的な反応によって化合物 **17** へと変換されているものと考えられた。上述の通り化合物 **17** は培養液中では微量成分であるものの、化合物 **16** の NMR サンプル (重 DMSO 中) から容易に調製が可能であり、更に化学的に安定である為 NMR 解析を行う上ではこちらの方がより適していると考えられた。

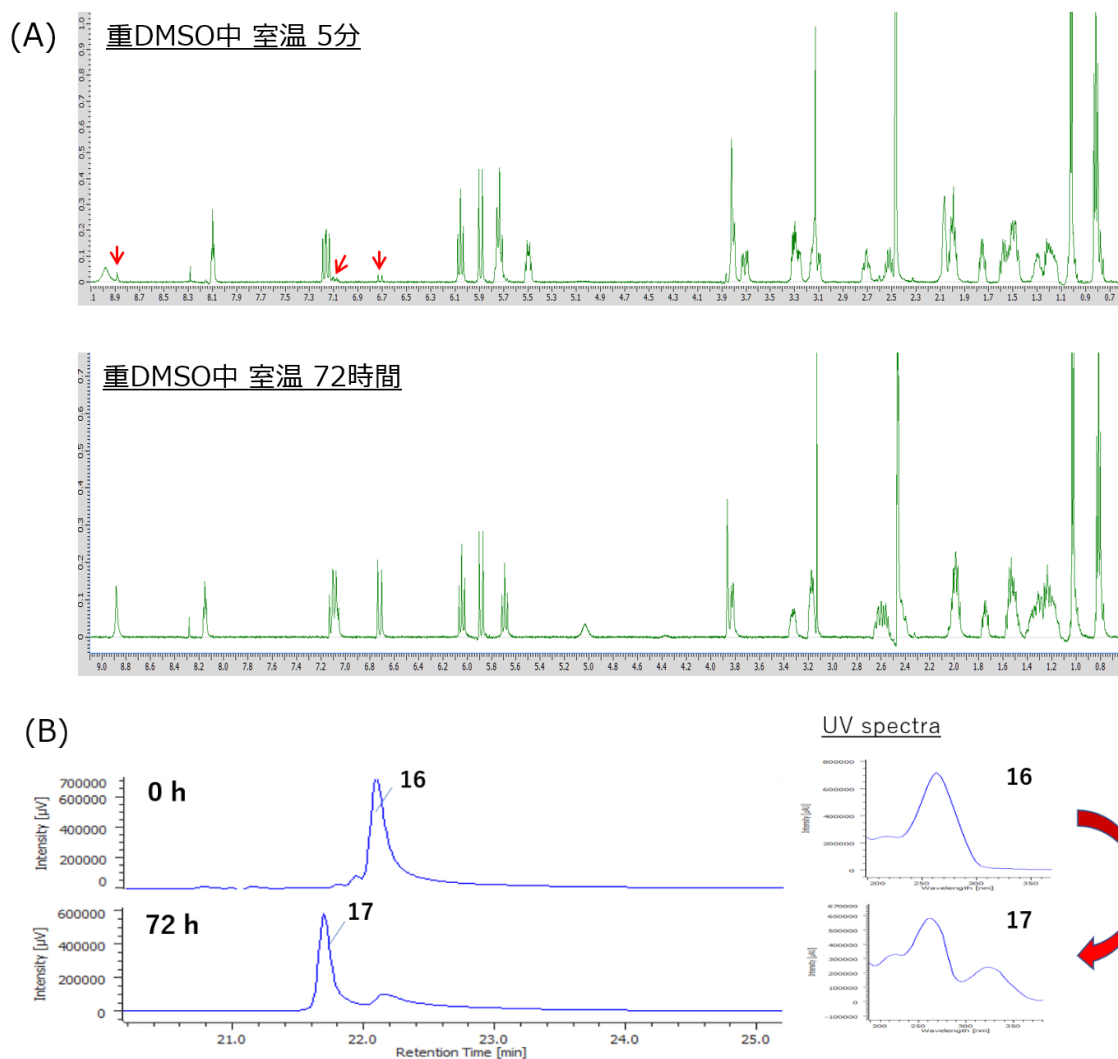


図 2-4: (A)化合物 **16** の重 DMSO 中における変換反応。NMR 測定直後 (5 分後)の時点で既に一部変換が始まっており (赤矢印ピーク参照)、72 時間後には完全に別の化合物へと変換されていた。(B)化合物 **16** 変換反応に関する HPLC 解析 (HPLC 条件は図 2-2 と同一)。

化合物 **17** の平面構造決定

上述の議論からまず化合物 **17** について NMR 解析に基づく構造解析を行う。単離した化合物 **16** のおよそ半量について重 DMSO 中化合物 **17** へと変換した。HRMS 解析により化合物 **17** の分子式は $C_{29}H_{40}N_2O_6$ と決定され、実際 ^{13}C NMR スペクトルにおいては 29 本のシグナルが観測された。また、 ^{13}C NMR シグナルを化学シフトに基づいて分類を行うとカルボニル/エノール領域に 4 本 (193.4, 176.2, 174.3 及び 167.2 ppm)、オレフィン領域に 6 本 (150.1-121.1 ppm)のシグナルが観測された。これらとエノールの α 位に相当するシグナル (100.5 ppm)の存在を考慮すると化合物 **17** は 7 つの不飽和結合を有し、分子式の持つ不飽和度を考慮すると 4 環性化合物であることが強く示唆された。

続いて重 DMSO 中での ^1H NMR 解析からアミドに由来する 2 つの重水交換性シグナル (8.88、8.15 ppm) 及びヒドロキシ基に由来する 1 つの重水交換性シグナル (5.03 ppm) が観測され、更に HSQC 及び DQF-COSY 解析を行うことによって化合物 **17** における 3 つの部分構造が図 2-5 に示す通り確立された (部分構造 I-III)。一方 C-2/C-3 間及び C-16/C-17 間の結合は ^1H NMR の overlap から DQF-COSY によっては確立できなかった。

続いて DQF-COSY では明らかとならなかった化合物 **17** における残りの化学結合の構築を行う為 HMBC スペクトル解析を行った (図 2-5)。まず、 ^1H NMR の overlap によって確認出来なかった C-2/C-3 及び C-16/C-17 間の結合は H-2/C-3、H-2/C-4 及び H₃-29/C-16 に相当する HMBC 相関に基づいて構築された。また、C-1 に対する HMBC 相関 (H-2/C-1 及び NH-28/C-1) から C-1/C-2 間の構造が構築され、C-7 に対する HMBC 相関 (H-5/C-7、NH-6/C-7、H-8/C-7 及び H-9/C-7) から N-6/C-7/C-8 間の結合が確立された。更に、H-23/C-25、H-24/C-25 及び H-24/C-26 に相当する HMBC 相関から C-24/C-25/C-26 間の結合が確立された。

一方で C-1/C-26、C-26/C-27 及び C-27/N-28 に相当する結合は HMBC によっても構築出来なかったが、化合物 **17** が 4 環性構造である事と UV 吸収から 4 番目の環構造がテトラミン酸であることが示唆された。実際 C-1、C-27 及び C-28 位の化学シフトを既知テトラミン酸誘導体と比較すると良く一致しており¹⁴⁻¹⁶、また H-2/C-27 における HMBC 相関も考慮することで 4 番目の環構造は C-1/C-26、C-26/C-27 及び C-27/N-28 間の結合を含むテトラミン酸構造 (D 環、図 2-5) であると決定した。また対応する ^1H NMR シグナルは観測されなかったが、化合物 **17** の分子式及び C-20 位の低磁場シフトした化学シフト (72.4 ppm) から C-20 位には水酸基が結合する必要があるとあり、全ての原子間の化学結合を図 2-5 に示す通り決定した。また、化合物 **17** には 3 つの C-C 二重結合が存在するが、これらの配座については対応する vicinal coupling の値 (H8/H9: 15.0 Hz, H10/H11: 12.0 Hz, H23/H24: 16.0 Hz) から 8*E*, 10*Z*, 23*E* と決定された。以上より化合物 **17** は新規構造を持つ polyene tetramate macrolactam (PTM) 誘導体であることが明らかとなった。

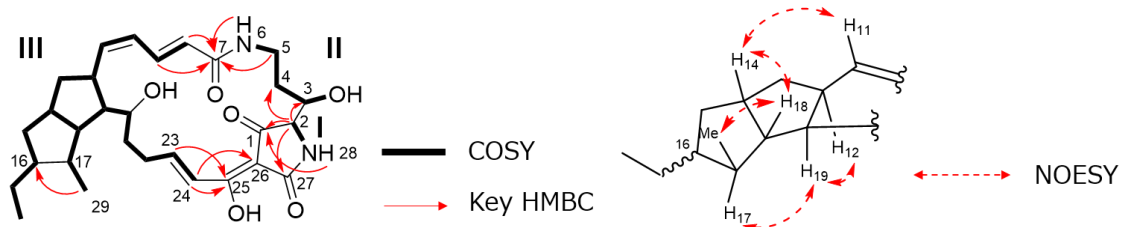


図 2-5: 化合物 **17** (omezawamide B) の二次元 NMR 解析

表 2-1: 化合物 **17** の NMR シグナル帰属 (重メタノール中、但し*印は重 DMSO 中)

	δ_{H} (multi., J in Hz)	δ_{C} , type of carbon
1	-	193.4, C
2	4.01 (d, 2.0)	68.4, CH
3	4.05 (ddd, 2.0, 2.0, 8.0)	69.8, CH
4	1.53 (m)	30.9, CH ₂
	1.43 (m)	
5	3.61 (ddd, 3.5, 3.5, 13.0)	36.3, CH ₂
	2.88 (dd, 13.0, 13.0)	
6 (NH)	8.15 (dd, 6.0, 6.0)*	-
7	-	167.2, C
8	5.99 (d, 15.0)	124.3, CH
9	7.42 (dd, 12.0, 15.0)	134.3, CH
10	6.15 (dd, 12.0, 12.0)	125.1, CH
11	5.86 (dd, 12.0, 12.0)	140.0, CH
12	3.40 (m)	44.7, CH
13	1.73 (dd, 8.0, 13.0)	40.2, CH ₂
	1.62 (m)	
14	2.72 (m)	42.1, CH
15	2.14 (m)	40.0, CH ₂
	0.92 (m)	
16	1.45 (m)	53.9, CH
17	1.37 (m)	47.5, CH ^b
18	2.12 (m)	56.4, CH
19	1.90 (ddd, 6.0, 9.5, 9.5)	57.1, CH
20	3.33 (m)	73.5, CH
21	1.52 (m)	35.1, CH ₂
22	2.56 (m)	29.5, CH ₂
	2.10 (m)	
23	7.23 (ddd, 5.0, 10.0, 16.0)	150.1, CH
24	6.96 (d, 16.0)	121.1, CH ₂
25	-	174.3, C
26	-	99.5, C
27	-	176.2, C
28 (NH)	8.88 (s)*	-
29	1.13 (d, 6.5)	17.7, CH ₃
30	1.67 (m)	26.3, CH ₂
	1.13 (m)	
31	0.92 (dd, 7.5, 7.5)	11.6, CH ₃
	5.03 (brs)*	

化合物 **16** の平面構造決定

続いて NMR 解析により決定された化合物 **17** の平面構造を念頭に置くことにより、化合物 **16** についても構造解析を行うこととした。まず HRMS 解析により、化合物 **16** の分子式は化合物 **17** 同様に $C_{29}H_{40}N_2O_6$ であると決定された。続いて化合物 **16** の各重溶媒中での安定性を改めて評価した所、重メタノール及び重アセトンを用いた場合比較的短時間であれば NMR による解析が可能であった為、以降はこの 2 種類の重溶媒を用いて NMR 解析を行った。重メタノール中における 1H 及び ^{13}C , COSY 及び HMQC スペクトルから化合物 **16** と化合物 **17** の構造は互いに類似していることが示唆されたが (図 2-6A)、化合物 **17** の C-22 位に相当するメチレン及びテトラミン酸と共役した C-23/C-24 位のオレフィン構造に対応するシグナルは観測されなかった。その代わりに重メタノール中で測定した化合物 **16** の NMR シグナルから C-22 及び C-23 部分が孤立 cis-オレフィン構造に置き換わっていることが強く示唆され (22 位: 5.81/129.0 ppm, 23 位: 5.54/122.0 ppm, H-22/H-23: 11.0 Hz) その構造は図 2-6A に示す通り化合物 **17** の C-23/C-24 位における二重結合が異性化した化合物であると推測された。化合物 **16** の 24 位はテトラミン酸及びオレフィン構造に挟まれている活性メチレンであるため、重メタノール中ではプロトン交換を引き起こし対応するシグナルは観測されなかったが、重アセトン中では対応するシグナル (δ_H : 3.31, 4.00 ppm, δ_C : 32.3 ppm) 及び 23 位との COSY 相関が見られた。

以上の結果より化合物 **16** も化合物 **17** 同様 PTM 誘導体であり、互いに二重結合の位置異性体であることが明らかとなった。両化合物を比較するとオレフィン及びテトラミン酸構造が共役している化合物 **17** の方が孤立オレフィン構造を有する化合物 **16** より化学的に安定であると考えられ、重 DMSO 中や培養液中において非酵素的な異性化反応を引き起こしたものと考えられる (図 2-6B)。化合物 **16** 及び **17** はいずれも新規 PTM 誘導体であり、*Umezawaea* 属放線菌から初めて単離された二次代謝産物であった為それぞれ Umezawamide A (**16**) 及び B (**17**) と命名した。

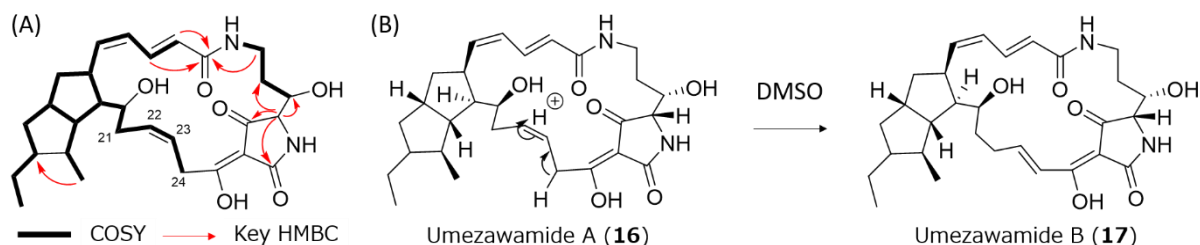


図 2-6: (A) 化合物 **16** の COSY 及び HMBC 相関 (B) 化合物 **17** の推定生成機構

表 2-2: 化合物 **16** の NMR シグナル帰属 (重メタノール中、但し*を付したシグナルは重アセトン中でのみ観測された)

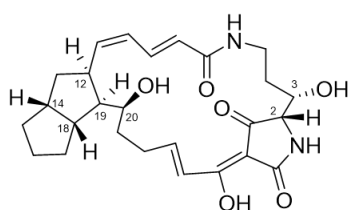
	δ_{H} (multi., J in Hz)	δ_{C} , type of carbon
1	-	192.8, C*
2	3.93 (s)	68.8, CH*
3	3.97 (m)	69.7, CH
4	1.73 (m) 1.40 (m)	30.2, CH ₂
5	3.52 (m) 2.93 (m)	36.5, CH ₂
6 (NH)	7.45 (m)*	-
7	-	167.7, C
8	5.95 (d, 15.0)	124.5, CH
9	7.42 (dd, 11.5, 15.0)	134.7, CH
10	6.13 (dd, 11.5, 11.5)	125.8, CH
11	5.86 (dd, 11.5, 11.5)	140.5, CH
12	3.34 (m)	43.8, CH
13	1.75 (m) 1.57 (m)	40.6, CH ₂
14	2.64 (m)	41.9, CH
15	2.09 (m) 0.86 (m)	40.2, CH ₂
16	1.34 (m)	53.5, CH
17	1.30 (m)	48.0, CH
18	2.11 (m)	55.8, CH
19	1.93 (m)	56.1, CH
20	3.46 (ddd, 4.5, 4.5, 9.0)	72.4, CH
21	2.26 (m)	33.8, CH ₂
22	5.81 (m)	129.0, CH
23	5.54 (d, 11.0)	121.7, CH
24	4.00 (m)* 3.31 (m)*	32.3, CH ₂ *
25	-	186.4, C*
26	-	100.5, C*
27	-	177.1, C*
28 (NH)	7.87 (brs)*	-
29	1.08 (d, 6.0)	17.7, CH ₃
30	1.64 (m) 1.08 (m)	26.2, CH ₂
31	0.93 (dd, 7.5, 7.5)	11.7, CH ₃

分子力場法による Umezawamide B の配座解析

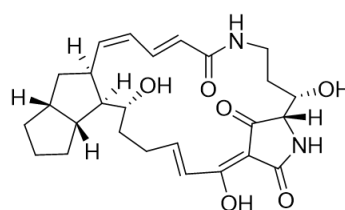
Umezawamide 類は 4 つの環構造から成っており (図 2-2, A-D 環)、このうち A 及び B 環に相当する 5/5 員環構造について化合物 **17** に対する NOESY 及びカップリング定数を用いた相対立体化学の解析を行った (図 2-5)。まず H-12/H-19 及び H-17/H-19 における強い NOESY 相関からこれら H-12, H-17 及び H-19 はこの 5/5 縮環構造において同じ向きに存在することが強く示唆された。一方 H-11/H-14, H-14/H-18 及び H-18/H₃-29 における NOESY 相関及び H-11/H-12 間の大きなカップリング定数 (12.0 Hz) から H-11, H-14, H-18 及び H₃-29 は H-12, H-17 及び H-19 に対して反対に位置していると決定された。よって A 及び B 環上に存在する 6 か所の不斉中心のうち 16 位以外の 5 か所について相対立体化学が決定されたが、残る 16 位についてはシグナル間の激しい overlap から NOESY 及びカップリング定数の解析はいずれも困難でありこれまでの所未解明である。

更に C 環状の 2 位及び 3 位の水素間のカップリング定数は 2.0 Hz と比較的小さな値を示しており、類縁化合物に対する NMR 及び配座解析からこの部分の相対化学は 2S*, 3S* であることが強く示唆された¹⁴。

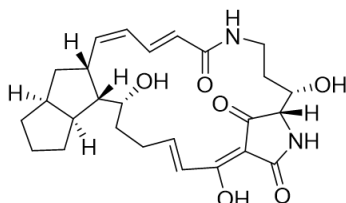
一方で残る相対立体化学については C 環部分における配座自由度の高さ等の理由により NMR 単独による解析は困難であった。そこで前章で mirilactam C に対して行った分子力場法による配座生成及び NMR スペクトルとの比較を umezawamide B に対しても行うことで相対化学の更なる絞り込みを行った。Umezawamide B 中のテトラミン酸構造は本来複数の互変異性体を取りうるが、先行研究¹⁵より PTM 類縁体におけるテトラミン酸部位はその大部分が図 2-7 に示す互変異性体として存在する事が報告されている。また計算コストを削減する為、C 環部分の配座や ECD スペクトルに対する影響が少ないと考えられた 16 位及び 17 位については各置換基を水素原子に置き換え、これと先述の NOESY 及びカップリング解析から許容される相対立体化学を踏まえ 4 種類のモデル化合物を設定し (図 2-7, **17A-D**)、Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94) 力場による配座生成を行った。続いて **17A-17D** から生成された各配座のうち存在比率として上位 99% 以内に分布する各配座について NMR スペクトル、とりわけ H-9/H-21 間における渡環 NOESY 相関、H-19/H-20 間のカップリング定数 (9.5 Hz) 及び H-23 位の特徴的なシグナル系 (ddd, J= 5.0, 10.0, 16.0 Hz) の三点に着目しつつ、NMR スペクトルに符合した配座の選択を行った。その結果 **17A** からは 11 種類、**17C** からは 14 種類がそれぞれ NMR に符合する配座として得られた一方で、**17B** 及び **17D** から得られた配座のうち NMR スペクトルに符合するものは存在しなかった (図 2-7)。従って umezawamide B の相対立体としては **17A** か **17C** のいずれかであることが強く示唆された。



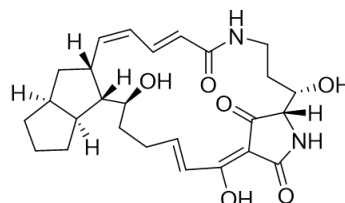
17A (2S*, 19S*, 20S*)



17B (2S*, 19S*, 20R*)



17C (2S*, 19R*, 20R*)



17D (2S*, 19R*, 20S*)

図 2-7: 分子力場法による配座生成を行った umezawamide B のモデル化合物

量子計算による Umezawamide B の ECD スペクトル予測及び立体化学決定

続いて umezawamide B の絶対立体化学を含めた更なる立体化学情報を得る為、分子力場法及び NMR 解析より得られた 2 つのモデル化合物 **17A** 及び **17C** (及び各エナンチオマー) について量子化学計算による ECD スペクトル計算を行い、実測値との比較を行った。

Mirilactam C の場合と同様に密度汎関数法 (DFT 法) に基づいて構造最適化及び自由エネルギー計算を行い、ボルツマン分布に基づいて各配座の占有率を算出した。続いて時間依存密度汎関数法 (TDDFT 法) 及び連続誘電体モデル (PCM) を用いて各配座のメタノール中における ECD スペクトル予測を行い、先程のボルツマン分布に基づく各スペクトルの重ね合わせを行い各絶対配座に対応する 4 種類の予測 ECD スペクトルを得た (図 2-8)。4 種類の立体異性体に対応する予測 ECD スペクトルは互いに異なる傾向のコットン効果を示しておりその区別は容易であった。そして、この予測スペクトルを実際にメタノール中で計測した umezawamide B (**17**) の ECD スペクトルと比較を行った所 **17A** におけるエナンチオマーの一つである 2S, 19S, 20S 体が極めて良い一致を示したことからその絶対立体化学について図 2-2 に示す通り決定した (前述の通り C-16 位の立体は本研究では未解明)。

また、もう一方の類縁体である umezawamide A (**16**) については立体化学に関する議論は行っていないが図 2-6B に示す通り非酵素的な反応によって umezawamide B へと変換されることは明らかであり、従ってその立体化学は互いに一致すると考えられる。

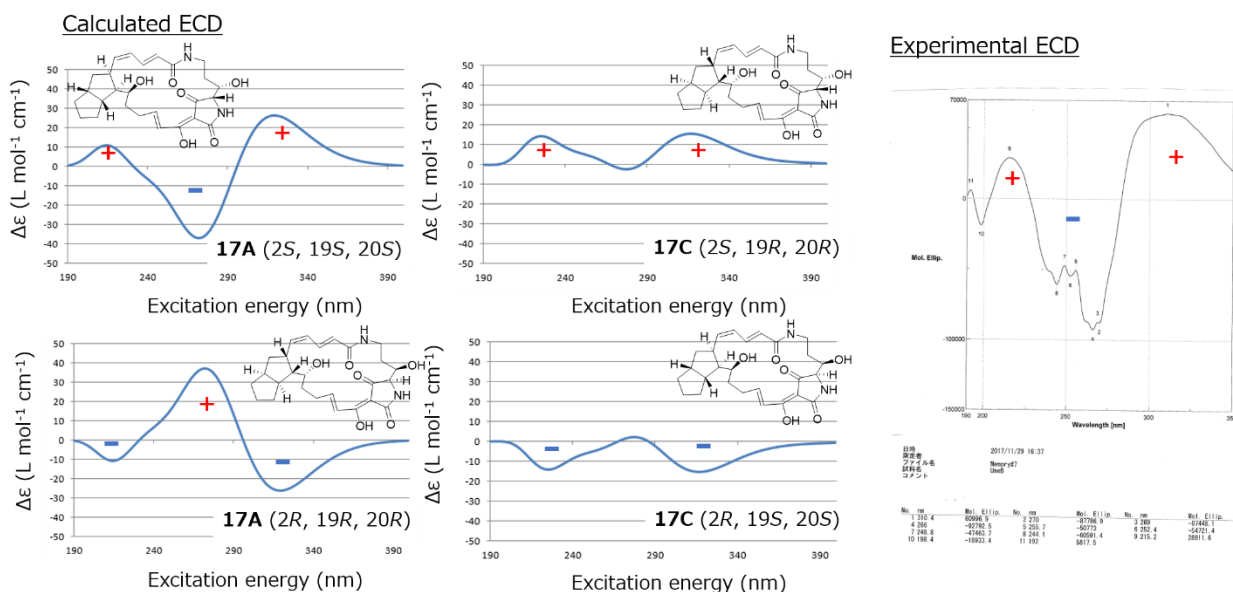


図 2-8: モデル化合物 **17A** 及び **17C** の予測 ECD 及び実測 ECD スペクトル

Umezawamide 類の生物活性評価

Polyene tetramate macrolactam (PTM)構造はこれまで umezawamide 類を含む幾つかの二次代謝産物中に見られており、これまで単離された PTM 類縁体の中には細胞毒性や抗真菌活性といった生物活性を持つものが数多く知られている¹⁴⁻¹⁶。

そこで 2 種類の umezawamide 類に対して P388 マウス白血病細胞株への細胞毒性及び各種抗菌アッセイを行った。その結果化合物 **16** 及び **17** はいずれも P388 細胞に対する細胞毒性を示し IC₅₀ についてはそれぞれ 3.7 及び 4.8 μM と計算された。また抗菌アッセイの結果化合物 **16** は *Candida albicans* 株に対する抗真菌活性を示し、5 μg/6 mm disk の条件において 1.7 mm の阻害ゾーンを形成したが、化合物 **17** では抗真菌活性は見られなかった (図 2-9A)。また、*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* 及び MSSA などの真正細菌については化合物 **16** 及び **17** いずれについても増殖阻害活性は観測されなかった。

PTM 類が細胞毒性を呈するメカニズムについては今の所明らかとなっていないが、抗真菌活性については PTM 類の一種である alteramide B がβ-tubulin 重合阻害を介してアポトーシスを引き起こすことが報告されており¹⁶、alteramide B と tubulin との docking simulation 及び分子動力学法による解析から C 環 (20 員環)部分の配座が結合に重要であることが示唆されている (図 2-9B)。今回の場合でも umezawamide A における C-22/C-23 位の二重結合が C 環の配座を規定し、tubulin との結合即ち抗真菌作用を起こすと考えられる。従ってこの二重結合が異性化した umezawamide B においては抗真菌活性を失ったものと考えられる。

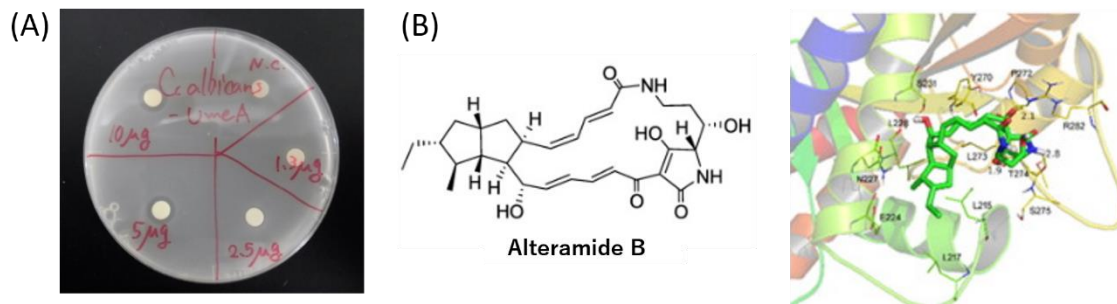


図 2-9: (A) Umezawamide A に対する抗菌アッセイ (B) Alteramide B の構造式及び tubulin との docking simulation¹⁶

Umezawamide 類の推定生合成経路

PTM 誘導体に関しては様々な骨格や修飾様式を持つものが報告されているが、その生合成経路の初期段階は共通していることが明らかとされている (図 2-10)^{17,18}。即ちこれまで報告されている PTM 類は全て 2 分子の hexaketide unit 及び ornithine を building block としており、PKS (polyketide synthase)-NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) hybrid 酵素がこれら building block を縮合してテトラミン酸誘導体である化合物 **18** として後に、酸化還元酵素が触媒する 5 員環形成により中間体 **19** を形成する。この中間体 **19** が更なる環化、酸化、ハロゲン化、二重結合異性化など様々な酵素的あるいは非酵素的な変換を受けることによって umezawamide 類を含めた多様な PTM 誘導体が生合成される。

PKS-NRPS 及び 5 員環形成を触媒する酸化還元酵素は PTM 生合成遺伝子クラスター内では保存されている為、*in silico* 解析によって微生物ゲノム中から PTM 生合成遺伝子クラスターを同定する事が可能である。*Umezawaea* sp. RD066910 株のゲノム情報はこれまで得られていないが、ミコール酸含有細菌である *T. pulmonis* TP-B0596 株のドラフトゲノム配列から PTM 生合成遺伝子クラスターは同定されなかった。このことから umezawamide 類の生合成遺伝子クラスターは *Umezawaea* 属放線菌側のゲノムに存在しており、複合培養によってその発現が活性化されたものと考えられる

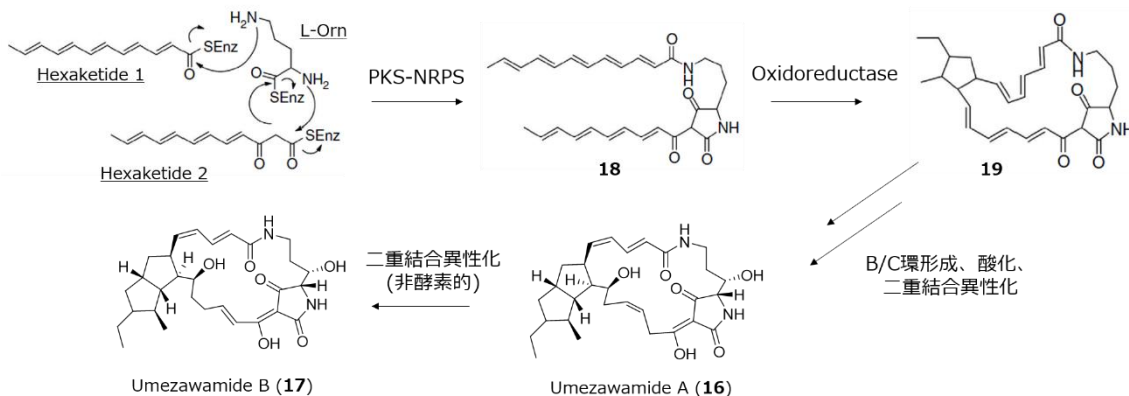


図 2-10: Umezawamide 類の推定生合成経路

2-3. *Catenuloplanes* 属放線菌に対する複合培養法により得られた新規ヘテロ環含有ペプチド catenulobactin 類の単離構造決定

Catenuloplanes 属放線菌に対する複合培養法の適用及び catenulobactin 類の単離

Catenuloplanes 属は 1993 年に新属提唱された Pseudonocardiales 目に分類される希少放線菌であり¹⁹、更にこれまで二次代謝産物の単離報告がない放線菌属であった為 *Umezawaea* 属と同様新規二次代謝産物を得られる期待の高い未開拓希少放線菌と考えられた。そこで今回 RD 株より *Catenuloplanes* sp. RD067331 株を選択しミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* との複合培養を行うこととした。これまでの希少放線菌とほぼ同様の手順にて複合培養及び純粋培養を行い HPLC による代謝解析を行った所、複合培養条件下 2 つの代謝物の産生が大幅に増加しており (図 2-11, 化合物 **20** 及び **21**)、ピーク面積から計算したところ複合培養時における産量は純粋培養時と比較して化合物 **20** では約 12.9 倍、化合物 **21** では約 19.4 倍であった。

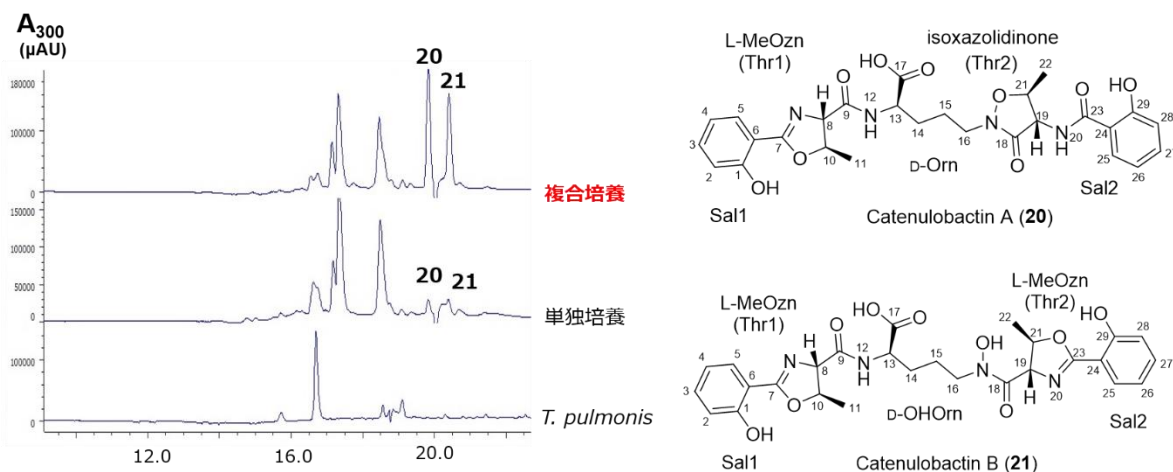


図2-11: *Catenuloplanes* sp. RD067331株の複合培養代謝物のHPLC解析及び化合物**20**, **21**の化学構造 (HPLC条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II column (4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) in a CH₃CN (solvent A)/H₂O with 0.05% formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (5 min) –70% (12 min) –100% (15-25 min), 1.0 ml min⁻¹).

続いて NMR による構造解析を行う為、RD067331 株の大量培養 (2.0 L)及び化合物 **20** 及び **21** の単離精製を行った (図 2-12)。本節では培養条件の検討結果から、これまで使用していた A-3M ではなく K-HP 培地 (組成は実験項を参照)を使用しているが本培地も成分として HP-20 担体を含んでおり、培養液に対して遠心分離を行うことで樹脂は菌体と共に回収される。得られた菌体及び樹脂を凍結乾燥後にメタノール/クロロホルム等量混合

溶媒による抽出及び減圧濃縮を行い、粗抽出物を得た。この粗抽出物に対してシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる粗精製及び引き続き逆相分取 HPLC による最終精製を行うことで、3.1 mg の化合物 **20** 及び 2.4 mg の化合物 **21** をそれぞれ得た。

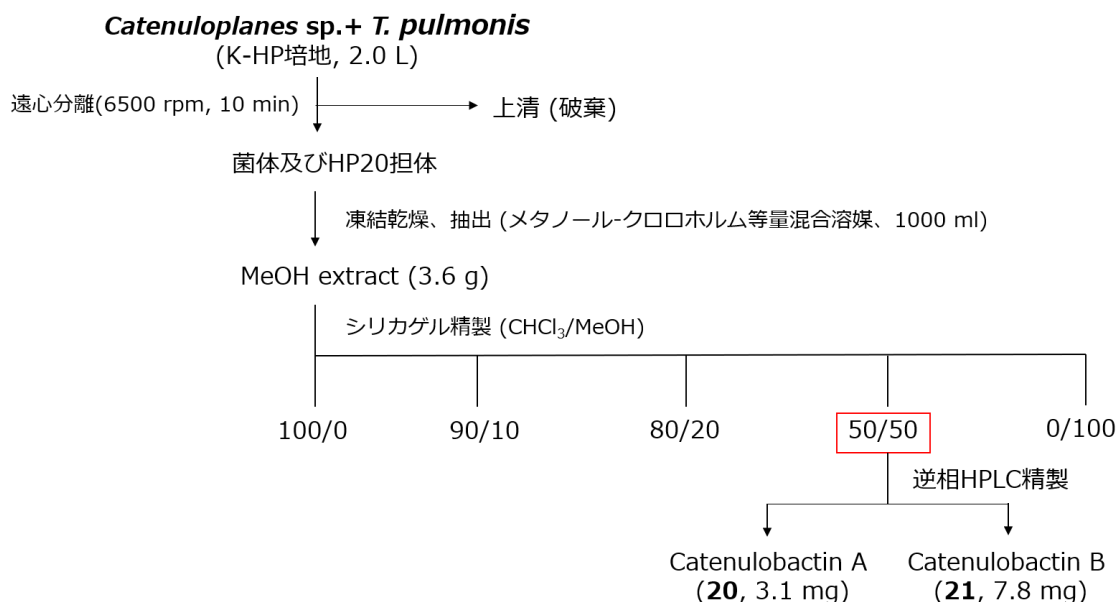


図 2-12: 化合物 **20** 及び **21** の単離プロセス

Catenulobactin A (化合物 **20**) の NMR 解析

化合物 **20** の分子式は HR-MS 解析より $C_{27}H_{30}N_4O_9$ であり、その不飽和度は 14 と計算された。HRMS 解析により与えられた分子式の通り化合物 **20** の ^{13}C NMR スペクトル中には 27 本のシグナルが観測され、 1H NMR 及び HMQC シグナル解析からその内訳は 5 つのカルボニル/イミド酸エステル (173.5-165.9 ppm)、酸素が結合した 2 つの芳香族 4 級炭素 (160.2 及び 159.7 ppm)、2 つの芳香族 4 級炭素 (115.7 及び 110.6 ppm)、8 つの芳香族メチン炭素 (134.7-117.1 ppm)、酸素/窒素が結合した脂肪族メチン炭素 (79.5-52.5 ppm)、3 つの脂肪族メチレン炭素 (45.0、28.8 及び 23.6 ppm) 及び 2 つのメチル炭素 (21.1 及び 17.2 ppm) であった。またこれに加えて重 DMSO 中の 1H NMR では 2 つのアミド性交換プロトン (9.21 及び 8.42 ppm) 及び 1 つのフェノール性の交換プロトン (11.79 ppm) が観測された。従って化合物 **20** に含まれる不飽和結合は 10 個であり、不飽和度から 4 つの環構造を持つことが強く示唆された。

続いて更なる構造情報を得る為に COSY 及び HMBC スペクトルの解析 (図 2-13) を行った。まず芳香族領域の COSY 解析から 2 つのオルト二置換ベンゼン間の存在が強く示唆され、各芳香族メチン水素からの HMBC 相関を組み合わせることによっていずれもサリチル酸に由来することが明らかとなり (図 2-11、Sal1 及び Sal2)、11.79 ppm の交換性プ

ロトンは対応するフェノール性水酸基に帰属されるものと考えられる。続いて H-8/H-10/H₃-11 間の COSY 相関と H-8/C-9 及び H-10/C-9 における HMBC 相関から 1 つ目の threonine 残基 (図 2-11、Thr1) の存在が示唆され、更に対応するアミド水素のシグナルが観測されなかった事と C-8 及び C-10 位の ¹³C NMR 化学シフトが修飾されていない一般的な threonine 残基と比較して大幅な低磁場シフトを起こしていたことから(図 2-14)、この threonine 残基は methyl oxazoline (MeOzn) 構造を取っているものと思われる。同様に NH-20/H-19/H-21/H₃-22 間の COSY 相関と H-19/C-18 位における HMBC 相関から 2 つ目の threonine 残基 (Thr2) の存在が、更に 12 位から 16 位水素にかかる COSY 相関と H-13/C17 及び H-14/C-17 における HMBC 相関から ornithine 残基 (Orn) も存在がそれぞれ示唆された。

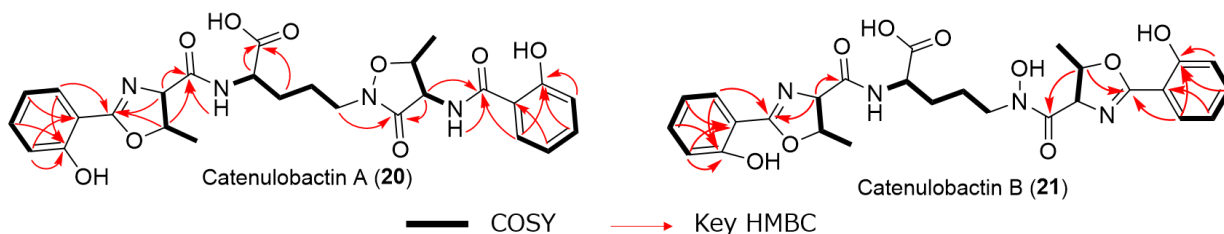


図 2-13: 化合物 **20** 及び **21** の COSY/HMBC 解析

position	20		21		22	23	24
	Thr1 (MeOzn)	Thr2 (isoxazolidinone)	Thr1 (MeOzn)	Thr2 (MeOzn2)			
a	169.9	167.6	169.8	169.5	165.2	167.3	173.2
b	73.9	57.7	73.9	70.8	70.3	57.0	60.6
c	79.5	78.6	79.5	79.3	78.7	77.8	68.1
d	21.1	17.2	21.0	20.9	20.6	16.6	20.1

図 2-14: 化合物 **20**, **21** 及び関連化合物 ^{20,21} における threonine 残基の ¹³C NMR 帰属

続いて HMBC 解析に基づき各アミノ酸及びサリチル酸ユニット間の結合について決定を行った。まず Orn 及び Thr2 残基に由来するアミド水素からの HMBC 相関 (NH-12/C-9 及び NH-20/C-23)に基づくと Thr1/Orn 及び Thr2/Sal2 の各残基間はペプチド結合を形成していると考えられた。また、H-8/C-7 及び H-10/C-7 における HMBC 相関から Thr1 残基における methyl oxazoline 環は Sal1 ユニットとの間で形成されていることも分かった。最後に H-16/C-18 における HMBC 相関から Orn/Thr2 残基間についてもアミド結合を形成していることが強く示唆され、これにより化合物 **20** における 5 つのユニット間の配列を完全に決定した。

これまでの議論から 10 か所の不飽和結合及び 3 つの環構造の存在 (2 つのベンゼン環及び 1 つの methyl oxazoline 環)が明らかとなったが、先述の通り化合物 **20** の不飽和度は 14 であるためもう 1 つ環構造が存在する必要がある。これに関して分子式及び ornithine 側鎖の NH 水素シグナルが観測されなかった点を考慮すると、Orn 側鎖の窒素原子及び Thr 残基の水酸基との間で N-O 結合を形成することで isoxazolidinone 骨格を形成し、これが 4 つ目の環構造であると考えられた。Isoxazolidinone 環の形成を確認する為、当該箇所の ^{13}C NMR 化学シフトについてそれぞれ methyl oxazoline、isoxazolidinone 及び未修飾の threonine 残基を持つ既知化合物 (**22-24**, 図 2-14)^{20,21} の ^{13}C NMR 化学シフトとの比較を行った所、Thr2 残基における ^{13}C NMR 化学シフトの傾向は isoxazolidinone 骨格を持つ pseudomonine (**23**)のものと同じ一致を示していた。

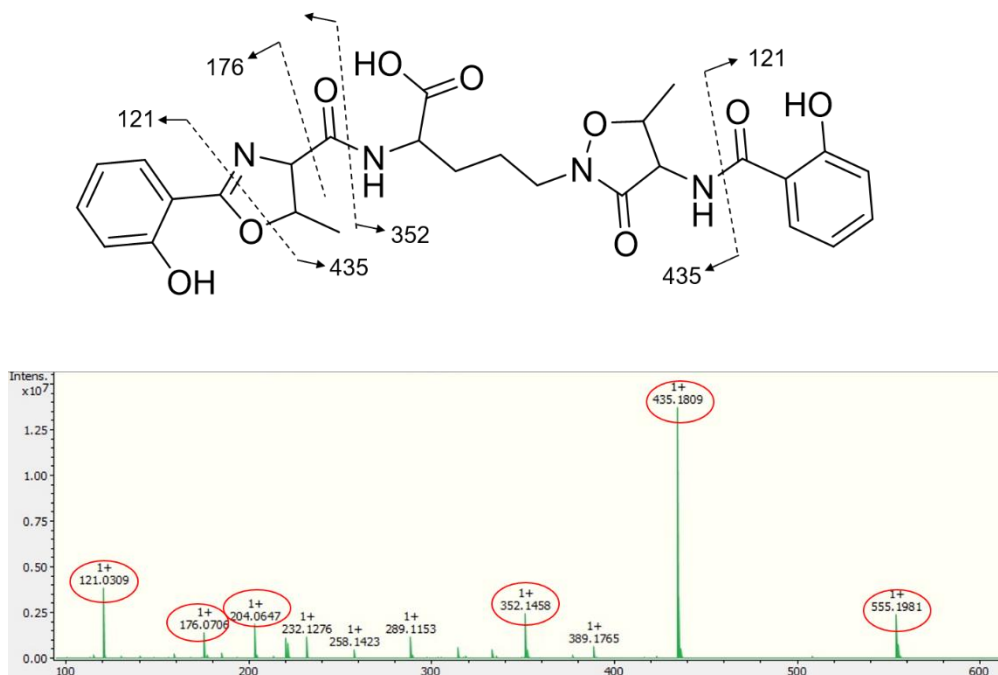


図 2-15: 化合物 **20** の LC-MS/MS フラグメント解析

以上の結果から化合物 **20** は methyl oxazoline 及び isoxazolidinone 骨格を有する新規ヘテロ環含有ペプチドであることが明らかとなり、catenulobactin A と命名した。また、最後に LC-MS/MS による化合物 **20** のフラグメントパターン解析を行ったが、その結果は NMR 解析によって決定された構造を反映していた (図 2-15)。

化合物 **21** の NMR 解析

HRMS 解析から化合物 **21** の分子式は化合物 **20** と同じ $C_{27}H_{30}N_4O_9$ であり、 ^{13}C NMR スペクトルにおいても 27 本のシグナルが観測された。化合物 **21** の NMR スペクトルは化合物 **20** のものと良い一致を示しており、こちらについても 2 分子のサリチル酸、2 分子の threonine 残基及び 1 分子の ornithine 残基が化合物 **20** と同じ順番にて結合したペプチド化合物であることが示唆された (図 2-13)。その一方で 2 つ存在する threonine 残基のうち Thr2 側の ^{13}C NMR 化学シフトが大きく異なっており、図 2-14 の通り isoxazolidinone 環を含む pseudomonine (**23**) より methyl oxazoline 環を持つ pre-pseudomonine (**22**) に対して良い一致を示していた。このことから、化合物 **21** における Thr2 残基は Thr1 同様サリチル酸との間で methyl oxazoline 骨格を形成しているものも考えられた。また化合物 **21** の 1H NMR においても Orn 側鎖に相当するアミド水素シグナルは観測されていないことから、側鎖の窒素原子は水酸基が結合した *N*-OH 構造を持っていると推測され、分子式及び LC-MS/MS による解析によっても支持された (図 2-16)。

化合物 **21** もまた 2 つのヘテロ環 (いずれも methyl oxazoline) を有する新規ペプチド化合物であり、catenulobactin B と命名した。

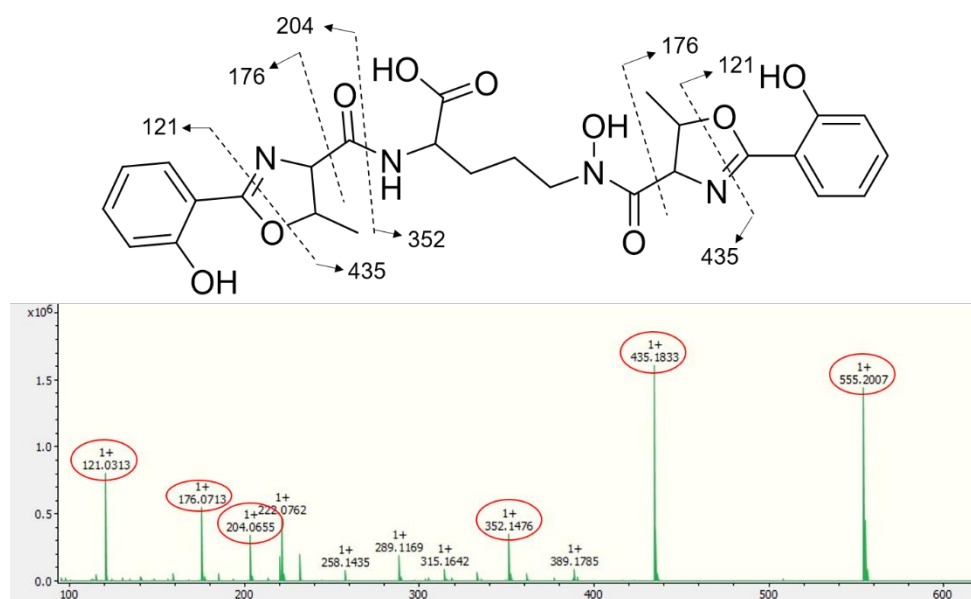


図 2-16: 化合物 **21** の LC-MS/MS フラグメント解析

表 2-3: Catenulobactin 類の NMR シグナル帰属 (重 DMSO 中、^{a-g} を付したシグナル帰属については交換可能、また化合物 **20** の 11.79 ppm におけるシグナルは 1-OH 及び 29-OH の一方或いは両方に帰属される)

position	Catenulobactin A (20)		Catenulobactin B (21)	
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_C , type	δ_H (J in Hz)
1	159.7, C	-	159.8 ^c , C	-
1-OH	-	(11.79, s)	-	12.02 ^g , s
2	117.1, CH	6.96, d (7.5)	117.1, CH	6.97, m
3	134.7 ^a , CH	7.43 ^b , dd (7.5)	134.6 ^d , CH	7.43, m
4	119.6, CH	6.90, m	119.6 ^e , CH	6.91, m
5	128.6, CH	7.59, d (7.5)	128.6 ^f , CH	7.59, m
6	110.6, C	-	110.6, C	-
7	165.9, C	-	165.9, C	-
8	73.9, CH	4.53, d (7.5)	73.9, CH	4.52, d (7.5)
9	169.9, C	-	169.8, C	-
10	79.5, CH	4.84, dq (7.5, 6.5)	79.5, CH	4.81, m
11	21.1, CH ₃	1.43, d (6.5)	21.0, CH ₃	1.42, d (6.5)
12(NH)	-	8.42, brd (7.5)	-	8.39, brd (7.0)
13	52.5, CH	4.18, m	52.6, CH	4.18, m
14	28.8, CH ₂	1.79, m	29.0, CH ₂	1.75, m
		1.69, m		1.60, m
15	23.6, CH ₂	1.61-1.57, m	23.2, CH ₂	1.63-1.58, m
		3.56, m		3.65, m
16	45.0, CH ₂	3.45, m	47.8, CH ₂	3.45, m
17	173.5, C	-	173.7, C	-
18	167.6, C	-	169.5, C	-
19	57.7, CH	4.70, dd (10.5, 7.5)	70.8, CH	5.02, d (5.5)
20(NH)	-	9.21, d (7.5)	-	-
21	78.6, CH	4.42, dq (10.5, 6.0)	79.3, CH	4.91, m
22	17.2, CH ₃	1.35, d (6.0)	20.9, CH ₃	1.42, d (6.5)
23	169.4, C	-	165.9, C	-
24	115.7, C	-	110.6, C	-
25	128.8, CH	7.84, d (8.0)	128.4 ^f , CH	7.59, m
26	119.3, CH	6.89, m	119.5 ^e , CH	6.91, m
27	134.6 ^a , CH	7.40 ^b , dd (7.5)	134.5 ^d , CH	7.43, m
28	118.0, CH	6.91, m	117.1, CH	6.97, m
29	160.2, C	-	158.7 ^c , C	-
29-OH	-	(11.79, s)	-	11.79 ^g , s

Catenulobactin A における isoxazolidinone 環形成機構

Catenulobactin A に見られる isoxazolidinone 構造は天然においては珍しく、図 2-14 に示した pseudomonine などごく一部の天然物においてその存在が見出されているのみである。この他 Acinetobactin (**25**) は isoxazolidinone 環を有する数少ない天然物の一つで、1994 年に日和見感染症原因菌として知られる *Acinetobacter baumannii* から単離され²²、その後 Walsh らにより生合成遺伝子クラスターが同定された²³。同時に Walsh らは NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) を含む acinetobactin 生合成遺伝子クラスターの産物として methyl oxazoline 環及び *N*-OH 構造を持った化合物 **26** を得ており、これが acinetobactin の前駆体であるという興味深い知見を明らかにした。またその後の研究により化合物 **26** は非酵素的かつ立体反転を伴った分子内転位反応によって **25** へと変換される事、更にこの転位反応は中性～弱塩基性条件 (pH = 7.0-8.0) において大幅に加速される事が明らかとされた (図 2-17A)^{23,24}。

上述の先行研究をふまえて catenulobactin B (**21**) の構造に着目すると化合物 **26** 同様に *N*-OH 構造が methyl oxazoline 環に隣接しており、catenulobactin A における isoxazolidinone 環構造も同様の分子内転位反応によって生じると推測された。そこで実際に単離した catenulobactin B の一部を室温で pH = 7 に調節したリン酸緩衝液へと加えた所、推測された通りその大半が速やかに catenulobactin A へと変換されていた (図 2-17B)。

この事から catenulobactin A は catenulobactin B から生じた artifact である可能性が高いと考えられる。なお培養終了時における培地の pH は約 7.0 であったが全ての化合物 **21** が化合物 **20** へと変換されてはいなかった。この理由については明らかではないが、恐らく生合成された catenulobactin B の大半が菌体内に存在、或いは培地中の HP-20 担体に吸着されたことで転位反応が抑制されたのではないかと考えられる。

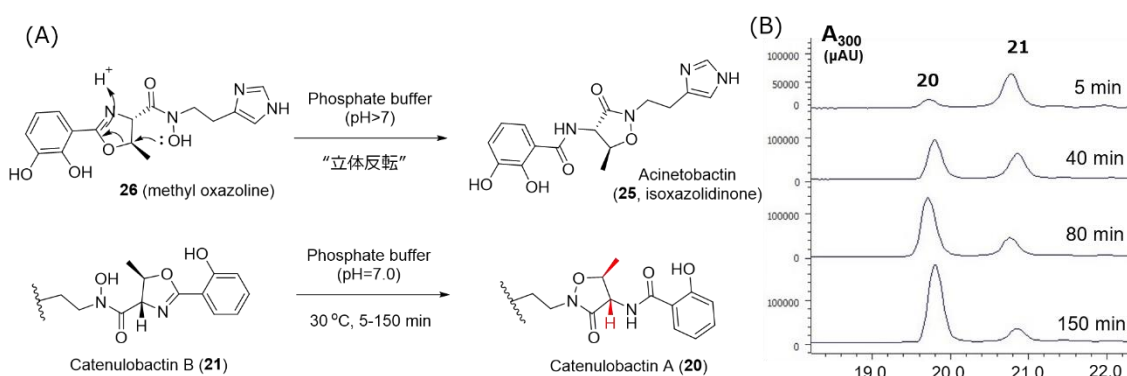


図 2-17: (A) acinetobactin 及び catenulobactin A における isoxazolidinone 環の推定生成機構 (B) リン酸緩衝液 (pH = 7.0, 室温) における catenulobactin A の生成

Catenulobactin 類の立体化学決定

Catenulobactin 類は 4 つの環構造を有するが、これまで構造解析を行って来た化合物と異なり分子全体としては極めて flexible な直鎖構造である為カップリング定数や NOESY といった NMR 解析によってその立体化学に議論を行うことは困難である。一方でペプチド分子中の methyl oxazoline 環は酸加水分解することで threonine へと変換され、N-hydroxy-ornithine についても加水分解の過程で水酸基を失って ornithine へと変換されることが知られており、いずれのアミノ酸も全ての立体異性体を含めて市販されている。そこで catenulobactin A 及び B について酸加水分解を行い、生じた加水分解産物を誘導体化後キラル GC-MS 解析によってアミノ酸標品と比較する事で catenulobactin 類の絶対配置を含めた立体化学の検討を行うことにした (図 2-18)

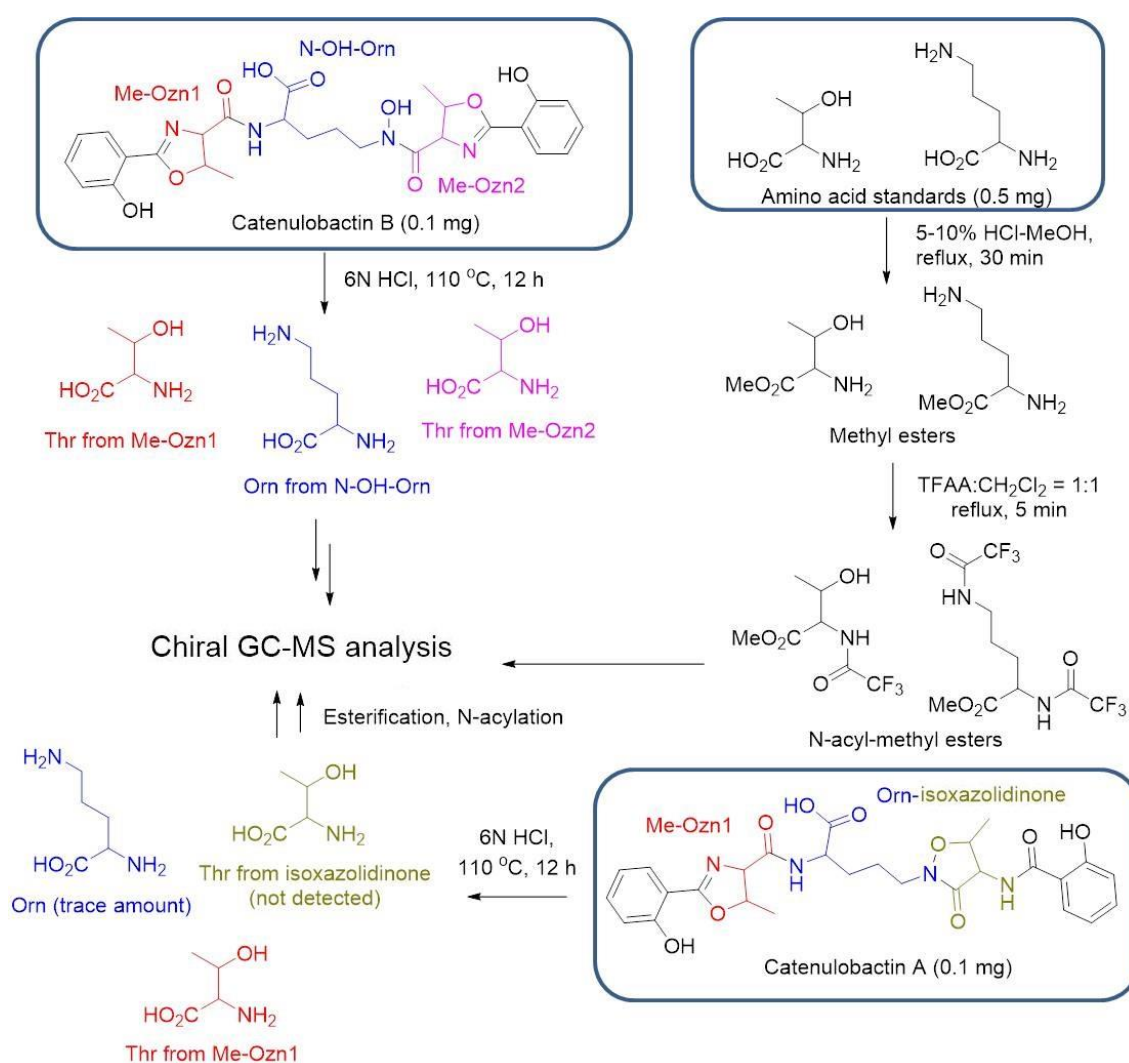


図 2-18: キラル GC-MS 分析を利用した catenulobactin 類の立体化学決定の流れ

まず catenulobactin 類の酸加水分解を行うにあたりキラル GC-MS 分析に使用する標品の調製を行った。分析を行う 6 種類のアミノ酸 (Thr: 4 種類, Orn: 2 種類)はいずれも市販されているが、このままでは GC-MS による検出が出来ない為図 2-18 に示す通りカルボキシル基のメチルエステル化及びアミノ基の TFA 化反応を行うことで揮発性の高いアミノ酸誘導体へと変換した。そしてキラル GC-MS による分析を行ったところ、各アミノ酸誘導体は十分なピーク強度及び分離度を示した (図 2-19)。続いて catenulobactin 類におけるアミノ酸残基の立体化学を決定する為、6N HCl 中 110℃にて catenulobactin 類の完全加水分解を 12 時間かけて行い、得られた加水分解産物を同様の手順にて誘導体化後にキラル GC-MS 分析へと供した。

結果、いずれの加水分解産物からも L-Thr 及び D-Orn のみが主要ピークとして検出された為 catenulobactin 類の絶対立体化学は catenulobactin A における isoxazolidinone 環部分を除いて図 2-11 に示す通り決定された。一方で残る isoxazolidinone 環の立体化学についても前駆体である catenulobactin B から A へと至る転位反応が立体反転を伴うことを考慮するとやはり図 2-11 に示す通りであると決定された。また、19 位及び 21 位の間の相対化学については H-19/H-21 間のカップリング定数 (10.5 Hz)及び H-19/H₃-22 間の NOESY 相関によっても支持され、以上により catenulobactin 類における全ての絶対配置を含めた立体化学を決定した。

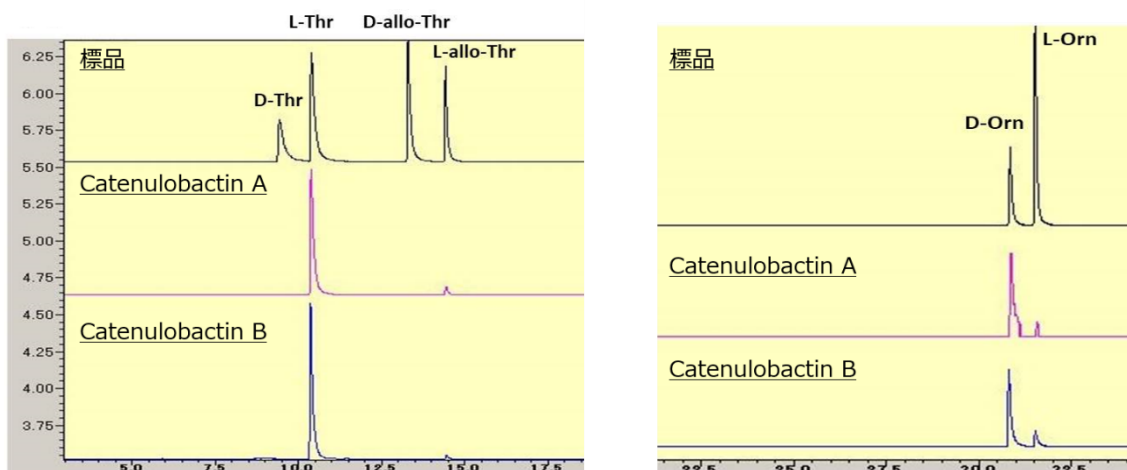


図 2-19: アミノ酸標品及び catenulobactin 類加水分解産物誘導体のキラル GC-MS 分析 (Thr 残基は m/z 155 のフラグメント、Orn 残基は m/z 166 のフラグメントイオンで検出)

Catenulobactin 類の生物活性試験

最後に catenulobactin 類に対する生物活性評価を行った。まず、これまでの化合物と同様にして細胞毒性試験及び抗菌アッセイを行った所 catenulobactin B に関しては P388 マウス白血病細胞株に対する細胞毒性 ($IC_{50} = 22.4 \mu M$)が確認されたものの、それ以外の生物活性は検出されなかった。

また catenulobactin 類は acinetobactin や化合物 **22-24** などと類似した部分構造を有しており、これらの化合物はいずれも環境中の Fe^{3+} イオンにキレートすることで水溶性を上昇させ Fe^{3+} の bioavailability を向上させる siderophore としての活性を有することが報告されている (微生物やイネ科植物は siderophore 分子を用いることで、bioavailability の低い Fe^{3+} を効率的に活用している)。そこで catenulobactin 類についても Fe^{3+} に対する結合能を評価する為、それぞれの化合物を過剰量のアセチルアセトン鉄(III) ($Fe(acac)_3$)で処理した後に LC-MS による解析を行った。その結果 catenulobactin B (**21**)のアセチルアセトン処理物では新たなピークが観測され (図 2-20A)、MS スペクトルにおいて $^{54}Fe/^{56}Fe$ の同位体パターンが観測されたことから catenulobactin B は Fe^{3+} と 1:1 複合体を形成し、微生物 siderophore としての性質を持つことが強く示唆された (図 2-20B)。

その一方で catenulobactin A ではアセチルアセトン鉄(III)処理を行っても鉄(III)複合体の形成は見られなかった。これについては恐らく catenulobactin B における N-OH 構造が鉄(III)キレート活性に必須であり、この箇所が転位反応によって isoxazolidinone 環へと変換されてしまった事が主な原因と考えられる。

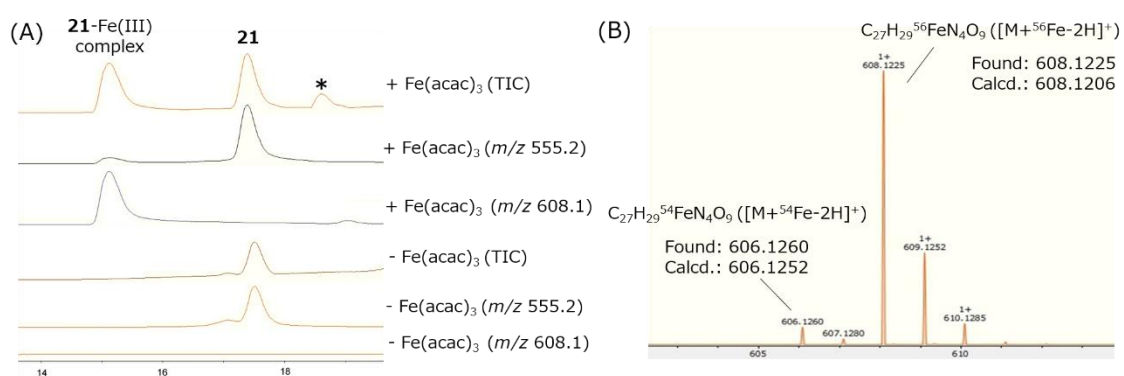


図 2-20: (A) Catenulobactin B 単独及びアセチルアセトン鉄(III) ($Fe(acac)_3$)処理物の LC-MS 解析 (B) Catenulobactin B- Fe^{3+} 複合体の HRMS スペクトル

Catenulobactin 類の推定生合成経路

ペプチド型のシデロフォア生合成は NRPS (非リボソームペプチド合成酵素) を介して行われることが知られており、Catenulobactin 類も同様と考えられる。NRPS は 1 分子のアミノ酸の伸長、或いは開始基質の導入に対して module と呼ばれる繰り返し構造が対応しており、module は更にアミノ酸伸長や修飾に必要な複数の domain から構成される。

NRPS を構成する domain 構造のうち A domain (特定のアミノ酸や開始基質を選択的にアデニル化して活性化させる)、T domain (フリーのチオール基を持ち、アデニル化した基質とチオエステル結合を形成する、peptidyl carrier protein = PCP domain と同)、C domain (前 module までに伸長されたペプチド鎖と当該 module の T ドメインに結合したアミノ酸間のペプチド結合形成を触媒する) 及び TE domain (最終 module にて基質の切り離しを行う) は NRPS による一連の反応を行う上で必須であり、開始モジュールでは A+T、伸長 module では C+A+T そして終結 module では C+A+T+TE が基本構成となる (図 2-21)。このほかにも NRPS 産物の多様性に寄与する様々な domain の存在が知られており、例えば C domain に代わって methyl oxazoline 環などのヘテロ環形成を触媒する Cy (Cyclization) domain や、導入した L-アミノ酸 (今回は *N*-hydroxy ornithine) を D-アミノ酸へと変換する E (Epimerization) domain などが知られている。

図 2-21 の通り catenulobactin 類は chorismate (シキミ酸経路の中間体) から生じる salicylic acid を基質とし、3 つの module (Module 1-3) から構成される NRPS により生合成されると考えられる。即ち Module 1 の T ドメインに結合した salicylic acid は、Module 2 の Cy domain に触媒される形で methyl oxazoline 環形成を伴って Threonine と縮合し、先行研究²⁵でも類似の反応が見られるように Module 3 の C domain によって *N*-hydroxyl-ornithine (E domain の作用によって D 体となっている) に存在するアミノ基及びヒドロキサム酸部位とそれぞれペプチド結合を形成する。その後 TE domain による切り出しを経て catenulobactin B が生じ、非酵素的な転位反応により catenulobactin A へと変換される (図 2-17A)。

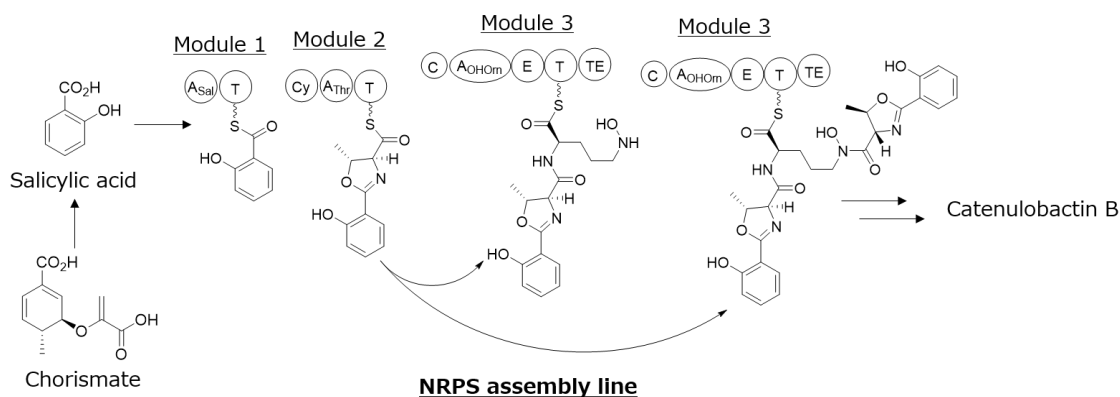


図 2-21: Catenulobactin B の推定生合成経路

2-4. *Thermobifida* 属放線菌に対する複合培養法の適用と生産誘導された新規アルカロイド類の単離構造決定

Thermobifida 属放線菌に対する複合培養法の適用

Thermobifida 属は 1998 年に同定され Pseudonocardiales 目に分類される希少放線菌であり、これまで挙げた *Umezawamide* 属や *Catenuloplanes* 属放線菌と比較すると比較的分離例は多い²⁶。また本属の中には名前の通り好熱性の種が多く、それらが示すポリマー分解能力や好熱性の分解酵素に関する研究は数多く行われている²⁷。その一方で本属が生産する二次代謝産物の探索研究については殆ど報告例がなく、調べた限りにおいては *Thermobifida fusca* より単離された siderophore 化合物である fuscachelin 類²⁵ が唯一であった。そこで本研究では *Thermobifida* 属放線菌の一種である *Thermobifida* sp. RD007847 株を対象としてミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* との複合培養を行った。

これまでの希少放線菌と同様に K-HP 培地にて *Thermobifida* sp. RD007847 株の純粋培養及び複合培養を行い、その butanol 抽出物を HPLC にて分析を行った所新たに 2 つの代謝産物 (化合物 **27** 及び **28**) の生産誘導が確認された (図 2-22A)。構造決定を行う為、*Thermobifida* 属放線菌を K-HP 培地中 2.0 L の大量培養を行い図 2-22B に示す手順にて分離精製を行った所、0.9 mg の化合物 **27** 及び 0.3 mg の化合物 **28** をそれぞれ獲得した。

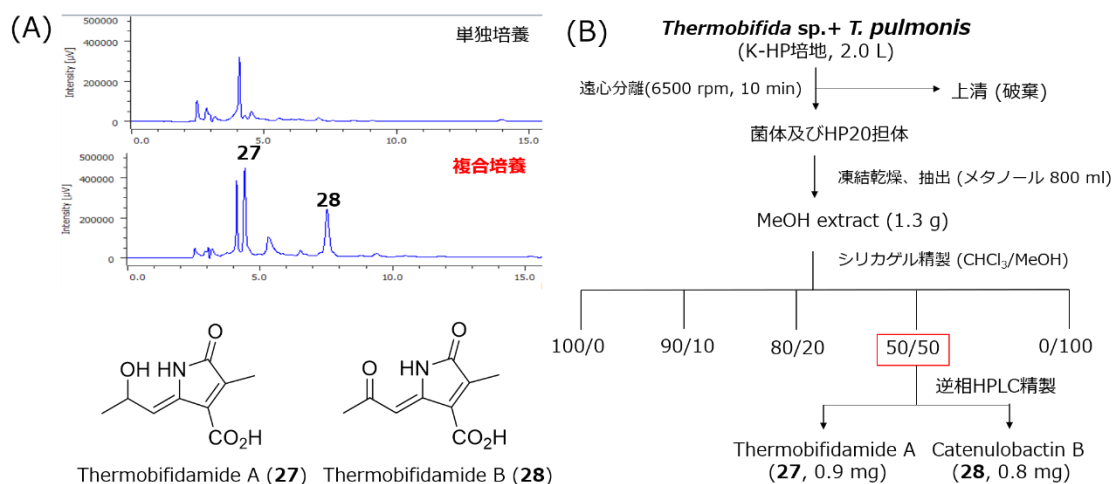


図2-22: (A) *Thermobifida* sp. RD007847株の複合培養代謝物のHPLC解析及び化合物**27**, **28**の化学構造 (HPLC条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II column (4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) in a CH₃CN (solvent A)/H₂O with 0.05% formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (5 min) –70% (12 min) –100% (15-25 min), 1.0 ml min⁻¹). (B) 化合物**27**及び**28**の単離精製スキーム

化合物**27**及び**28**のNMR解析

化合物 **27** の分子式は HRMS 解析から $C_9H_{11}NO_4$ であり、 ^{13}C NMR スペクトルにおいても 9 本のシグナルが観測された。 1H , ^{13}C NMR 及び 1H - ^{13}C HMQC 相関から 9 本の ^{13}C NMR シグナルの内訳は 2 つのカルボニル炭素 (170.9 及び 166.3 ppm), 3 つの 4 級オレフィン炭素 (137.8、134.6 及び 134.0 ppm), オレフィン性メチン炭素 (119.8 ppm), 酸素が結合した脂肪族メチン炭素 (63.2 ppm) 及び 2 つのメチル基 (24.6 及び 10.6 ppm) であり。また重 DMSO 中の 1H NMR における交換性プロトン (9.95 ppm) のシグナルは、 1H - ^{15}N HSQC スペクトルにおいて窒素原子 (130 ppm) への相関が観測されたことから NH プロトンであると分かった (図 2-23)。また上記の結果から化合物 **27** には 4 つの不飽和結合が存在しており、不飽和度を考慮すると 1 つの環構造を持つことが強く示唆された。

続いて COSY スペクトルの解析を行った所、H-8/H-9 及び H-9/H-10 間に相関が観測されたことから C-8/C-9/C-10 間の結合は確立されたが、それ以外の結合に関する情報は得られなかった。そこで 1H - ^{13}C 及び 1H - ^{15}N HMBC スペクトルの解析を行った所、H-8/C-4 及び H-9/C-4 における HMBC 相関から C-4/C-8 間、そして H-8/N-5 及び NH-5/C-4 における HMBC 相関から C-4/N-5、更に H-8/C-3 における HMBC 相関から C-3/C-4 間の結合が確立された。また、 H_3 -6 のシグナルからは C-1, C-2 及び C-3 に対して HMBC 相関が観測されており、C-1/C-2/C-3 間及び C-2/C-6 間の結合についても確立された。

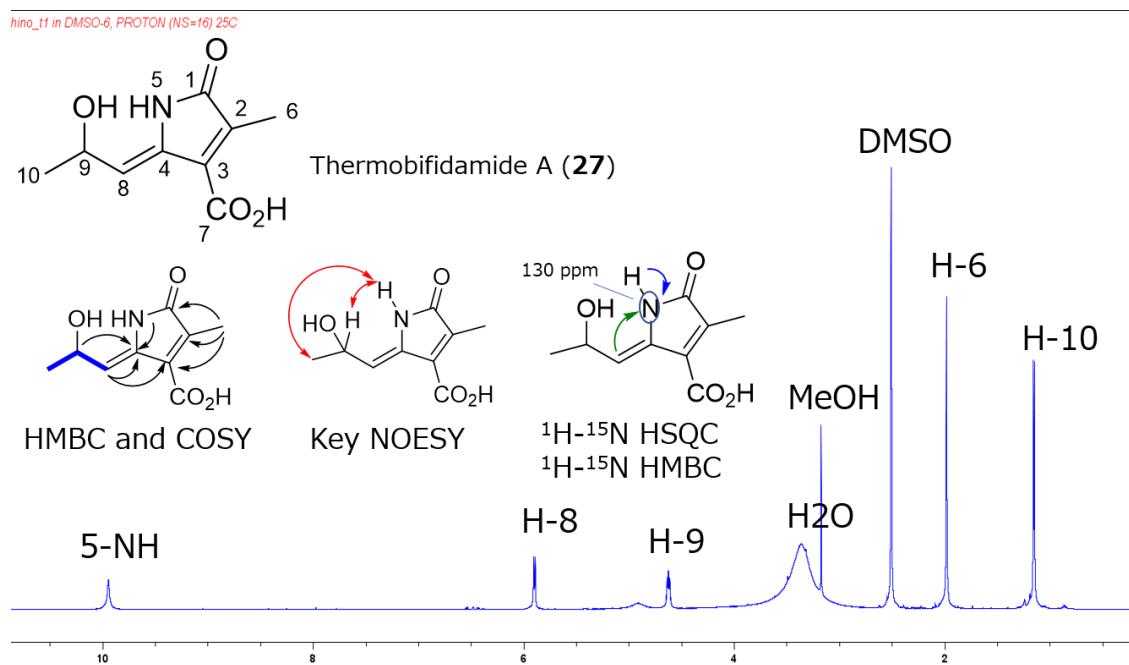


図 2-23: 化合物 **27** の 1H NMR スペクトル及び各種 2 次元 NMR 相関

一方不飽和度から化合物 **27** には環構造が 1 つ存在しており、この為 C-1/N-5 間はアミド結合を形成することで不飽和 γ -lactam 骨格を形成するものと思われる。更に化合物 **27** の negative mode における MS スペクトルでは分子量が 44 小さいフラグメントイオンが確認されており (図 2-24)、カルボキシル基の存在が強く示唆された。HMBC 相関などは観測されていないものの、この部分については唯一未帰属であった 166.3 ppm (C-7 位)のシグナルがカルボン酸として C-3 位に結合していると考えられる。また、C-4/C-8 間の二重結合については NH-5/H-9 及び NH-5/H₃-10 における NOESY 相関 (図 2-23)から Z 配座であると決定され、最終的に化合物 **27** は図 2-22 に示す平面構造を持った新規化合物であった為 Thermobifidamide A と命名した。

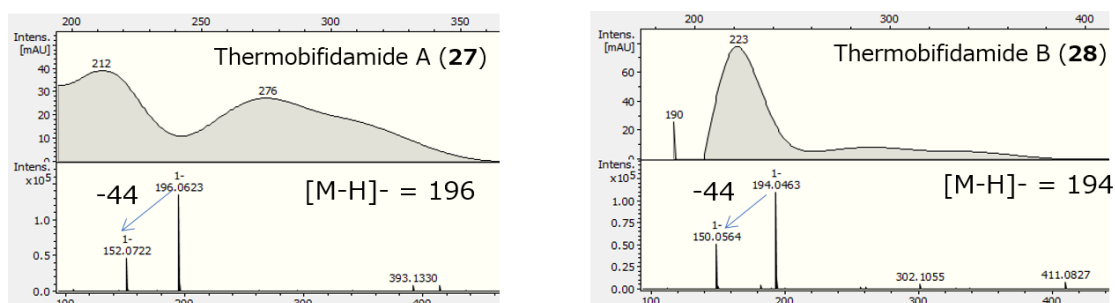


図 2-24: 化合物 **27** 及び **28** の UV 及び MS スペクトル

化合物 **28** の分子式は HRMS 解析から C₉H₉NO₄ と決定され、化合物 **27** に対して H₂ 分子が脱離した構造であることが示唆された。また UV スペクトルが全体的に長波長領域へとシフトしており、化合物 **28** と比べて長い共役系を有していると推測された (図 2-24)。

続いて化合物 **28** の NMR 解析を行ったが本化合物は収量が低く、加えて測定を行った重 DMSO 中で不安定であった為現段階では ¹H NMR 及び COSY スペクトルのみが得られている (図 2-25)。化合物 **28** の ¹H NMR スペクトル中には合計 4 本のシグナルが観測され、その内訳は 1 つの交換性プロトン (10.02 ppm), 1 つのオレフィンプロトン (6.50 ppm, singlet)及び 2 つのメチルプロトン (2.21 及び 2.01 ppm)であり、化合物 **27** と類似している点もあるが化合物 **27** で見られた 9 位のプロトン (4.62 ppm)に対応するシグナルは観測されなかった。また COSY 解析においても化合物 **27** で見られたような相関については一切観測されなかった。

化合物 **28** の構造を完全に決定する為には更なる NMR 解析が必要であるが、分子量や UV 吸収の長波長シフト或いは 9 位水素の NMR シグナルが消失している事を考慮すると、現段階では図 2-25 に示す平面構造である可能性が高い。

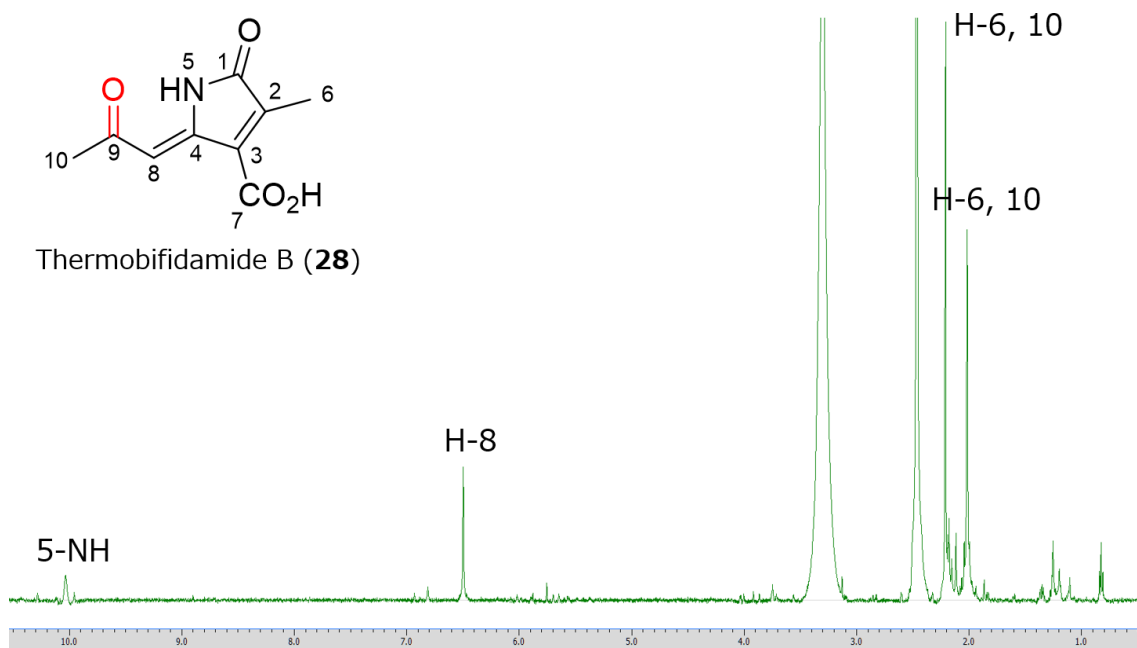


図 2-25: 化合物 **28** の ^1H NMR スペクトル及び推定構造式

表 2-4: Thermobifidamide 類の NMR シグナル帰属 (重 DMSO 中で測定)

position	Thermobifidamide A (27)		Thermobifidamide B (28)
	δ_C , type	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)
1	170.9, C	-	-
2	134.6, C	-	-
3	137.8, C	-	-
4	134.0, C	-	-
5 (NH)	-	9.95, s	10.02, s
6	10.6, CH ₃	1.98, s	2.01 or 2.21, s
7	166.3, C	-	-
8	119.8, CH	5.90, d (8.5)	6.50, s
9	63.2, CH	4.62, m	-
10	24.6, CH ₃	1.15, q (6.5)	2.01 or 2.21, s

Thermobifidamide 類の生合成経路

Thermobifidamide 類は α,β -不飽和- γ -butyrolactam 骨格を基本としてその全てが炭素性官能基によって置換された特異な構造を持っている為、先行研究からその生合成経路に関する情報を得ることは難しい。現在考えられる thermobifida 類の推定生合成経路としては図 2-26A に示すような、5 置換ベンゼン誘導体(**29**)の酸化的開裂を出発点としたものが挙げられる。即ち **29** におけるベンゼン環の酸化的開裂によって直鎖化合物 **30** が生成し、二重結合の異性化によって **31** へと変換された後にエナミンとカルボキシル基の間で不飽和 γ -lactam 環が形成され thermobifidamide B (**28**)となる経路である。また、この経路が正しいとすれば先に生じた thermobifidamide B のケトンが還元されることでアルコール体である thermobifidamide A (**27**)になると考えられる。

こうしたベンゼン環誘導体の開裂反応を触媒する酸化酵素については幾つか報告例があり、農薬ペンタクロロフェノール分解菌 *Sphingobium chlorophenolicum* から単離された酸化酵素 PcpA は化合物 **32** のような hydroquinone 誘導体を基質とした酸化的開裂反応を触媒し、**33** のような不飽和 γ -lactone 誘導体へと変換することが報告されている²⁸。しかしながら図 2-26A で示した生合成経路は何らかの実験結果によって裏付けられたものではなく、**29** に相当する化合物についても今の所検出できていない。従って本化合物の生合成経路を解明するにあたっては同位体投与実験や、遺伝子の転写解析などによって生合成経路や生合成遺伝子に関する情報を獲得してゆく必要がある。

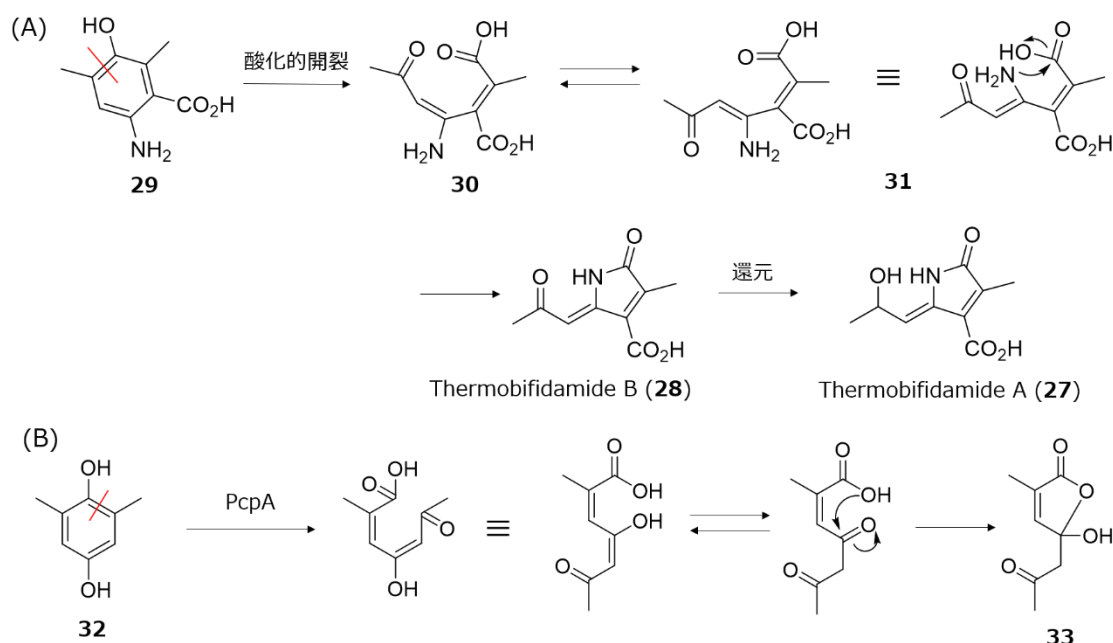


図 2-26: (A) Thermobifidamide 類の推定生合成経路 (B) *Sphingobium chlorophenolicum* 株由来の酸化酵素 PcpA が触媒するベンゼン環の酸化的開裂反応

2-5. 小括

本章ではこれまで殆ど物質探索が行われて来なかった希少放線菌属 (=未探索希少放線菌) に着目し複合培養スクリーニングを行った結果、3 種類 (*Umezawaea*, *Catenuloplanes* 及び *Thermobifida*) の未利用起草放線菌株について二次代謝産物の生産誘導が確認された。構造解析の結果いずれの株についても新規二次代謝産物を生産しており未利用希少放線菌の有用性を示す結果となった。

また得られた二次代謝産物は抗真菌活性を有する polyene tetramate macrolactam (*Umezawamide* 類)、siderophore として機能するペプチド (*Catenulobactin* 類)、或いは特異な化学構造と生合成背景を持つアルカロイド化合物 (*thermobifidamide* 類) とそれぞれの活性や化学構造及び生合成背景が多岐に渡っていたことも特筆すべき点であった。

2-6. 実験項

実験機器

各化合物の旋光度については全て JASCO DIP-1000 digital polarimeter を用いて測定を行い、UV スペクトルは catenulobactin 類では SHIMAZU UV-1280 を、omezawamide 類及び thermobifidamide 類については JASCO MD-2010 Plus multiwavelength を用いて測定した。各化合物の NMR スペクトルのうち、thermobifidamide A 全般及び omezawamide B の 重メタノール中での測定は Bruker AVANCE III 900 spectrometer (^1H : 900 MHz, ^{13}C : 225 MHz)を用いて行い、残りの測定は JEOL ECX-500 または ECA-500 (いずれも ^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz)を用いた。また omezawamide B の ECD スペクトルはメタノールを溶媒として Circular Dichroism Spectrometer (J-805 series, JASCO)を用いて測定した。化合物 HRMS スペクトルについては本項では全て Bruker Compact QqTOF mass を用いて獲得した。

本項で使用した微生物

本項で使用した微生物のうち、ミコール酸含有細菌 *T. pulmonis* TP-B0596 株については前項の実験項において記述した通りである。一方で未開拓希少放線菌種である *Umezawamide* sp. RD066910 株、*Catenuloplanes* sp. RD067331 株及び *Thermobifida* sp. RD007847 についてはいずれも製品評価技術基盤機構 (NITE)により収集・保管されている購入可能なスクリーニング株 (RD 株)であった。なお各 RD 株の同定については、16S rRNA 遺伝子配列に基づいて属レベルで行われており、種レベルの同定は行われていない。

複合培養による二次代謝誘導の確認

前項と同様に ISP2 寒天培地上に播種した *T. pulmonis* 及び各 RD 株を 30℃にて 1-2 週間培養後、これらの寒天培地の一部を切り取り前培養用の V-22 培地にて前培養を行った。前培養完了後、各 RD 株の前培養液 3 ml 及び *T. pulmonis* 株の培養液 0.3 ml をそれぞれ取り、前項で物質産生培地として使用した A-3M 培地 または別の物質産生培地である K-HP 培地 (2.5% Starch, 1.5% Soybean meal, 0.2% Yeast extract, 0.4% CaCO_3 , pH = 7.2)100 ml がそれぞれ入った 500 ml バッフル付きフラスコへと植菌し、物質生産を行う為 5 日間前培養と同じ条件にて震盪培養を行った。また、複合培養時との比較を行う為各希少放線菌及び *T. pulmonis* 株の単独培養も同じ行程で行った。

続いて代謝物解析を行う為、各培養液 10 ml を回収して *Umezawaea* 属及び *Catenuloplanes* 属放線菌については凍結乾燥後に 10 ml のメタノール-クロロホルム等量

混合溶媒 10 ml による抽出を行い、*Thermobifida* 属放線菌については培養液に直接 n-butanol を 10 ml 加えて抽出を行った。その後得られた抽出液を減圧濃縮後、残渣を少量のメタノール (約 500 μ L) に溶解させて HPLC にて分析した (分析条件については図 2-2, 図 2-11 及び図 2-22A における説明文中に記載)。結果、omezawamide 類の産生誘導は A-3M 培地で、catenulobactin 類及び thermobifidamide 類の生産誘導は K-HP 培地中においてそれぞれ誘導されていた。

Nakienone A (化合物 15) の単離

Umezawaea sp. RD066910 株及び *T. pulmonis* TP-B0596 株の複合培養液 (A-3M 培地、100 ml x 20 本) を集めた後、遠心分離により上清を回収した。得られた上清に 1.2 L の酢酸エチルを加えて常温にて終夜攪拌を行い、再度遠心分離を行い酢酸エチル層を回収後減圧濃縮を行い粗抽出物 1.1 g を得た。

得られた上清の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール系) によって分画し、メタノール/クロロホルム = 0/100, 10/90, 20/80, 50/50, 100/0 のフラクションを得た。HPLC により各フラクションに対して分析を行った結果、化合物 15 は 10/90 及び 20/80 の 2 つのフラクションに跨る形で存在していたためこれらのフラクションを回収後、分取 HPLC (Cosmosil Cholesterol column, 10 x 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) を用いて精製することで 2.8 mg の化合物 15 を黄色油状物質として得た。最終的に単離した化合物 15 の NMR スペクトルを文献¹¹と比較する事で化合物 15 が nakienone A であると決定した。

Umezawamide A (化合物 16) の単離

化合物 15 の単離の際用いた培養液 2.0 L の遠心分離後に得られた菌体及び HP-20 担体を含む画分に関して、凍結乾燥後に 800 ml のメタノールにて抽出及び減圧濃縮を行い 2.8 g の粗抽出物を獲得した。

得られた菌体 (及び HP-20) のメタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール系) によって分画し、メタノール/クロロホルム = 0/100, 10/90, 20/80, 50/50, 100/0 のフラクションを得た。HPLC により各フラクションに対して分析を行った結果、化合物 16 はメタノール/クロロホルム = 50/50 フラクション中に大部分が含まれており、この画分を回収後分取 HPLC (Cosmosil Cholesterol column, 10 x 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) による最終精製を行い 7.8 mg の化合物 16 を白色粉末として得た。なお化合物 17 についてはこの時点では収量が少なかった為、単離には至っていない。

Umezawamide A (**16**): White powder; UV (CH₃CN) λ_{\max} : 263 nm; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 22.7$ (c 0.05, MeOH); HRTOFMS (m/z): 511.2826 [M-H]⁻ (calculated for C₂₉H₃₉N₂O₆, 511.2814)

Umezawamide B (化合物 **17**)の調製

単離した Umezawamide A (**16**)のうち 3.8 mg を重 DMSO へと溶かして NMR 管 (5 mm)へと封入後、常温・遮光条件にて放置した。その後 ¹H NMR によって反応を追跡し、72 時間後の測定時には全て化合物 **17** へと変換されたことを確認した。その後 NMR 管から溶液を回収後、凍結乾燥によって重 DMSO を除去して 3.7 mg の化合物 **17** を得た。

Umezawamide B (**17**): Pale yellow powder; UV (CH₃CN) λ_{\max} : 225, 263, 323 nm; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 98.1$ (c 0.08, MeOH); HRTOFMS (m/z): 511.2828 [M-H]⁻ (calculated for C₂₉H₃₉N₂O₆, 511.2814)

分子力場計算による umezawamide B の配座解析

本項における全ての分子力場計算は計算用ソフトウェアである Spartan '14 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA)を用いて行った。まず図 2-7 で示した 4 つのモデル化合物(**17A-17D**)について、MMFF (Merck Molecular Force Field)力場による配座探索を行い、最安定配座より 40 kJ/mol 以上高いエネルギーを持つ配座については切り捨てを行った。その後得られた各配座について実際の NMR データから得られるプロトン間の二面角 (カップリング定数)及び距離情報 (NOESY 相関)に基づいて更なる配座の絞り込みを行った所、**17A** から生じた 4 配座 (図 2-27)及び **17C** から生じた 3 配座 (図 2-28)は NMR によるプロトン間の二面角や距離情報を反映した配座を与えた一方で、**17B** 及び **17D** より生じたいずれの配座からも NMR データを反映した配座は得られなかった。

DFT/TDDFT 計算による umezawamide B の ECD スペクトル予測及び立体化学決定

全ての DFT/TDDFT 計算は前章の mirilactam C の場合と同様計算ソフトウェアである Gaussian 09 を用いて行った。まず、上述の配座解析で得られた **17A** 由来の 4 配座及び **17C** 由来の 3 配座について DFT 法による構造最適化及び振動解析 (計算条件: B3LYP/6-31G(d) with PCM in methanol)を行い、各最適化構造に対してギブズ自由エネルギーを算出すると共に虚振動の有無を確認した。いずれの配座についても虚振動バンドの存在は確認されなかった為、それぞれのボルツマン分布を求めた (図 2-27 及び 2-28)。

その後構造最適化を行った各配座について TDDFT 法による ECD スペクトル予測 (計算条件: B3LYP/TZVP with PCM in methanol)を行い、得られた各 ECD スペクトルの計算

値 (図 2-27 及び 2-28) をボルツマン分布に基づいて重ね合わせることで、最終的な予測 ECD スペクトルとした。尚対応するエナンチオマーの予測 ECD スペクトルについては、今回計算した一方のデータについて反転させたものをそのまま使用した。最後に 4 種類の立体異性体に対する予測 ECD スペクトルを、メタノール中で計測した umezawamide B の ECD スペクトルと比較する事でその立体化学を決定した。

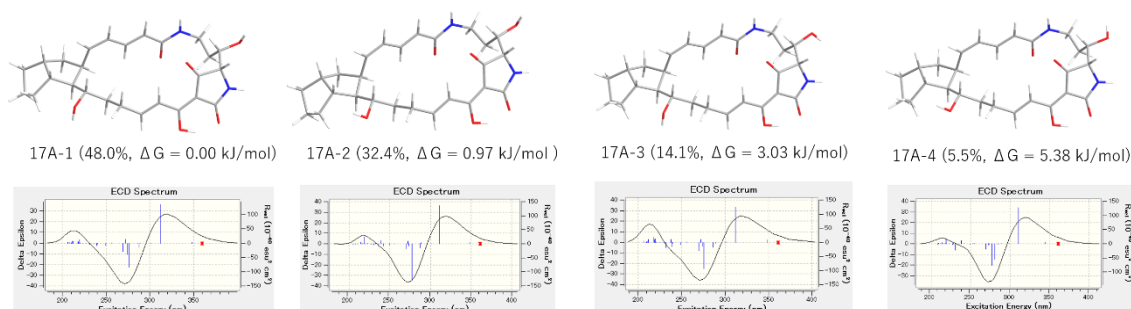


図 2-27: モデル化合物 **17A** の各安定配座に対するボルツマン分布及び予測 ECD スペクトル

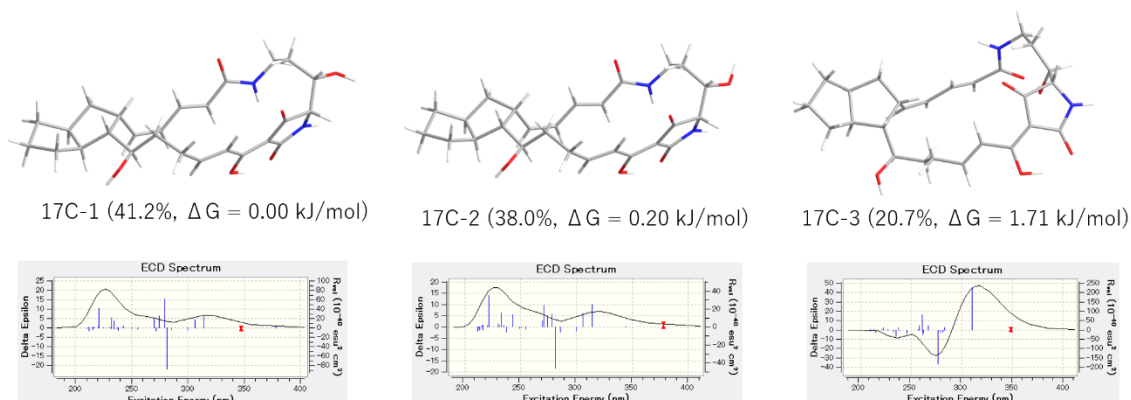


図 2-28: モデル化合物 **17C** の各安定配座に対するボルツマン分布及び予測 ECD スペクトル

P388 細胞株を用いた Umezawamide 類及び Catenulobactin 類の細胞毒性試験

前章の実験項 1-4 における「P388 細胞株を用いた dracolactam 類の細胞毒性試験」と同様の手順にて行い、positive control として doxorubicin を使用した。

Umezawamide 類及び Catenulobactin 類に対する抗菌活性試験

Umezawamide 類及び Catenulobactin 類の抗菌活性試験については前章の実験項 1-4 における「抗菌活性試験」に倣い同様の手順にて行った。なお、umezawamide A の *C. albicans* 株に対する阻害ゾーンは阻止円半径と本アッセイで使用したペーパーディスク半径の差によって定義した。

Catenulobactin 類の単離

Catenuloplanes sp. RD067331 株及び *T. pulmonis* TP-B0596 株の複合培養液 (K-HP 培地、100 ml × 20 本) を回収後、遠心分離を行い菌体及び培地成分として含まれていた HP-20 担体を回収した。得られた菌体及び HP-20 担体は凍結乾燥を行いメタノール/クロロホルム等量混合溶媒 1 L による抽出後、減圧濃縮により粗抽出物 3.6 g を得た。

得られた粗抽出物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール系) を用いて分画し、メタノール/クロロホルム = 0/100, 10/90, 20/80, 50/50 及び 100/0 の計 5 つのフラクションを得た。HPLC により各フラクションに対して分析を行った結果 catenulobactin A (**20**) 及び B (**21**) はいずれも 50/50 フラクション中に存在していた。最終的に当該フラクションを濃縮し、分取 HPLC (Cosmosil C₁₈-ARII column, 10 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) を用いて最終的な精製を行うことで 3.1 mg の catenulobactin A 及び 2.4 mg の catenulobactin B をそれぞれ白色粉末として獲得した。

Catenulobactin A (**20**): White powder; $[\alpha]_D^{25} -19.9^\circ$ (c 0.033, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 206, 238, 303 nm; ¹H and ¹³C NMR data: 表 2-3 参照; HR-ESI-MS m/z 555.2075 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₇H₃₁N₄O₉, 555.2092).

Catenulobactin B (**21**): White powder; $[\alpha]_D^{25} +55.7^\circ$ (c 0.023, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 206, 244, 306 nm; ¹H and ¹³C NMR data: 表 2-3 参照; HRESIMS 555.2071 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₇H₃₁N₄O₉, 555.2092).

Catenulobactin B (**21**) から catenulobactin A (**20**) への異性化反応

0.1 mg の catenulobactin B (**21**) を 0.1 M リン酸バッファー (0.1 ml, pH = 7.0) が入った 1.5 ml のエッペンドルフチューブへと加え、30℃にて保温することで反応を開始する。反応開始後、5 分、40 分、80 分及び 150 分後に反応液 10 μ l を取り HPLC にて分析を行い異性化反応の進行を確認した。

HPLC 条件: Cosmosil 5C₁₈-MS-II column (4.6 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan) in a CH₃CN (solvent A)/H₂O with 0.05% formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (5 min) –70% (12 min) –100% (15-25 min), 1.0 ml min⁻¹).

Chiral-phase GC-MS による catenulobactin 類のアミノ酸解析

耐圧ガラスチューブに catenulobactin A または B を 0.1 mg 封入し、そこへ 6 M 塩酸 0.4 ml を加えて密閉し、110℃にて 12 時間加熱を行い完全に加水分解を行った。得ら

れた加水分解産物について凍結乾燥を行って塩酸を除去した後、残渣に 5-10%塩酸-メタノール試薬 (0.4 ml, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)を加えた。その後密閉状態で 110℃、30 分の条件で反応を行い加水分解産物中に含まれる各アミノ酸のカルボキシル基をメチルエステルへと変換した。反応終了後、減圧濃縮によってメタノール及び塩酸を除去し得られた残渣に対してジクロロメタン-TFAA (trifluoroacetic acid anhydride)等量混合液 0.4 ml を加えて密閉条件下 110℃、5 分間反応を行い加水分解産物中に含まれる各アミノ酸のアミノ基をトリフルオロアセチル基にて誘導体化した。その後アルゴンを吹き付けることで TFAA 及びジクロロメタンを除去し、残渣に 0.3 ml のアセトンを加えて GC-MS 解析用のサンプルとした。スレオニンの立体異性体 (DL-Thr 及び DL-*allo*-Thr)及びオルニチンの立体異性体 (DL-Orn)についても同様に誘導体化反応を行い標準物質とした。

キラル GC-MS 分析は CP-Chirasil-DEX column (Alltech, 0.25 mm x 25 m; He as the carrier gas; program rate: 50-200℃ at 4℃/min)を用いて行い、保持時間に基づいて加水分解産物中に含まれるアミノ酸の同定を行った。

Catenulobactin 類の鉄結合能評価

Catenulobactin A または B の 1 mg/ml メタノール溶液 50 μ l を二等量のアセチルアセトン鉄(III) (Fe(acac)₃, 64 μ g)を含むメタノール溶液 50 μ l と混和し、室温にて 1 時間放置後 Cosmosil 2.5C₁₈-MS-II column (2.0 x 75 mm, Nacalai Tesque, Japan)を備えた LC-MS にて解析を行った。また、比較の為アセチルアセトン鉄(III)処理を行っていない catenulobactin A 及び B のメタノール溶液についても LC-MS による解析を行った。

LC-MS 条件: CH₃CN (solvent A)–20 mM formic acid (solvent B) gradient system (solvent A: 20% (3 min), 100% (15–20 min), 0.2 mL/min), positive ion mode.

Thermobifidamide 類の単離

Thermobifida sp. RD007847 株及び *T. pulmonis* TP-B0596 株の複合培養液 (K-HP 培地、100 ml x 20 本)を回収後、遠心分離を行い菌体及び培地成分として含まれていた HP-20 担体を回収した。得られた菌体及び HP-20 担体は凍結乾燥を行いメタノール 800 ml による抽出後、減圧濃縮により粗抽出物 1.3 g を得た。

得られた粗抽出物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール系)を用いて分画し、メタノール/クロロホルム = 0/100, 10/90, 20/80, 50/50 及び 100/0 の計 5 つのフラクションを得た。HPLC により各フラクションに対して分析を行った結果 thermobifidamide A (**27**)及び B (**28**)はいずれも 50/50 フラクション中に存在していた。最終的に当該フラクションを濃縮し、分取 HPLC (Cosmosil C₁₈-ARII column,

10 x 250 mm, Nacalai Tesque, Japan)を用いて最終的な精製を行うことで 0.9 mg の thermobifidamide A 及び 0.3 mg の thermobifidamide B を得た。

Thermobifidamide A (**27**): yellowish oil; ^1H and ^{13}C NMR data: 表 2-4 参照; HR-ESIMS m/z 196.0613 $[\text{M-H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$, 196.0610).

Thermobifidamide B (**28**): green amorphous; ^1H NMR data: 表 2-4 参照; HRESIMS 194.0461 $[\text{M-H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_4$, 194.0448).

2-7. 参考文献

- [1] Hoshino, S., et. al. (2018). Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *Journal of Antibiotics*, 71(7), 653–657.
- [2] Hoshino, S., Ozeki, M., Awakawa, T., Morita, H., Onaka, H., & Abe, I. (2018). Catenulobactins A and B, Heterocyclic Peptides from Culturing *Catenuloplanes* sp. with a Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Journal of Natural Products*, 81(9), 2106–2110.
- [3] Doroghazi, J. R., et. al. (2014). A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nature Chemical Biology*, 10(11), 963–968.
- [4] Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 108–132.
- [5] Pozzi, R., et. al. (2011). The genus *Actinoallomurus* and some of its metabolites. *Journal of Antibiotics*, 64(1), 133–139.
- [6] Inahashi, Y., et. al. (2015). Actinoallolides A-E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *actinoallomurus fulvus* MK10-036. *Organic Letters*, 17(4), 864–867.
- [7] Cruz, J. C. S., et. al. (2017). Allocyclinones, hyperchlorinated angucyclinones from *Actinoallomurus*. *Journal of Antibiotics*, 70(1), 73–78.
- [8] Son, S., et. al. (2018). Catenulisporolides, Glycosylated Triene Macrolides from the Chemically Underexploited Actinomycete *Catenulispora* Species. *Organic Letters*, 20(22), 7234–7238.
- [9] Labeda, D. P., & Kroppenstedt, R. M. (2007). Proposal of *Umezawaea* gen. nov., a new genus of the Actinosynnemataceae related to *Saccharothrix*, and transfer of *Saccharothrix tangerinus* kinoshita et al. 2000 as *Umezawaea tangerina* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(12), 2758–2761.
- [10] Chu, X., et. al. (2015). *Umezawaea endophytica* sp. nov., isolated from tobacco root samples. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(3), 667–672.
- [11] Nagle, D. G., & Gerwick, W. H. (1995). Nakienones A-C and nakitriol, new cytotoxic cyclic C₁₁metabolites from an okinawan cyanobacterial (*Synechocystis* sp.)

- overgrowth of coral. *Tetrahedron Letters*, 36(6), 849–852.
- [12] Ogi, T., Margiastuti, P., Teruya, T., Taira, J., Suenaga, K., & Ueda, K. (2009). Isolation of C₁₁cyclopentenones from two didemnid species, *Lissoclinum* sp. and *Diplosoma* sp. *Marine Drugs*, 7(4), 816–832.
- [13] Wang, X. J., Zhang, J., Qian, P. T., Wang, J. D., Liu, C. X., & Xiang, W. S. (2014). Three new cyclopentenone derivatives from *Actinoalloteichus nanshanensis* NEAU 119. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(6), 587–592.
- [14] Cao, S., Blodgett, J. A. V., & Clardy, J. (2010). Targeted discovery of polycyclic tetramate macrolactams from an environmental *Streptomyces* strain. *Organic Letters*, 12(20), 4652–4654.
- [15] Xu, L., Wu, P., Wright, S. J., Du, L., & Wei, X. (2015). Bioactive Polycyclic Tetramate Macrolactams from *Lysobacter enzymogenes* and Their Absolute Configurations by Theoretical ECD Calculations. *Journal of Natural Products*, 78(8), 1841–1847.
- [16] Ding, Y., et. al. (2016). Alteramide B is a microtubule antagonist of inhibiting *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(10), 2097–2106.
- [17] Luo, Y., et. al. (2013). Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. *Nature Communications*, 4, 1–8.
- [18] Saha, S., et. al. (2017). Activation and characterization of a cryptic gene cluster reveals a cyclization cascade for polycyclic tetramate macrolactams. *Chemical Science*, 8(2), 1607–1612.
- [19] Yokota, A., Tamura, T., Hasegawa, T., & Huang, L., H. (1993) *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a New Genus of the Order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(4), 805–812.
- [20] Shapiro, J. A., & Wencewicz, T. A. (2017). Structure-function studies of acinetobactin analogs. *Metallomics*, 9(5), 463–470.
- [21] Seyedsayamdost, M. R., Cleto, S., Carr, G., Vlamakis, H., João Vieira, M., Kolter, R., & Clardy, J. (2012). Mixing and matching siderophore clusters: Structure and biosynthesis of serratiochelins from *serratia* sp. V4. *Journal of the American Chemical Society*, 134(33), 13550–13553.
- [22] Yamamoto, S., Okujo, N., & Sakakibara, Y. (1994) Isolation and structure elucidation of acinetobactin., a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Archives of Microbiology*, 162(4), 249–254.

- [23] Wuest, W. M., Sattely, E. S., & Walsh, C. T. (2009). Three siderophores from one bacterial enzymatic assembly line. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(14), 5056–5057.
- [24] Shapiro, J. A., & Wencewicz, T. A. (2016). Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-Triggered Siderophore Swapping. *ACS Infectious Diseases*, *2*(2), 157–168.
- [25] Dimise, E. J., Widboom, P. F., & Bruner, S. D. (2008). Structure elucidation and biosynthesis of fuscachelins, peptide siderophores from the moderate thermophile *Thermobifida fusca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(40), 15311–15316.
- [26] Zhang, Z., Wang, Y., & Ruan, J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*(2), 411–422.
- [27] Wei, R., Oeser, T., & Zimmermann, W. (2014). Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 89). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00007-X>
- [28] Machonkin, T. E., & Doerner, A. E. (2011). Substrate specificity of *Sphingobium chlorophenolicum* 2,6-dichlorohydroquinone 1,2-dioxygenase. *Biochemistry*, *50*(41), 8899–8913.

総括と展望

本研究では 5 種類の希少放線菌種に対する複合培養の結果として、11 種類の新規二次代謝を獲得した (下図)。今回複合培養スクリーニングに用いた希少放線菌株は合計 40 種類であったが、そのうち二次代謝産物の生産誘導を実際に引き起こしたものは全体の 25% に当たる 10 種類であり、うち 5 種類は既知化合物の生産誘導を行ったり得られる化合物が微量であったりして新規化合物の獲得に至らなかったものの、残る 5 種については本論文で述べた通り新規二次代謝産物の単離構造決定へと結びついた。

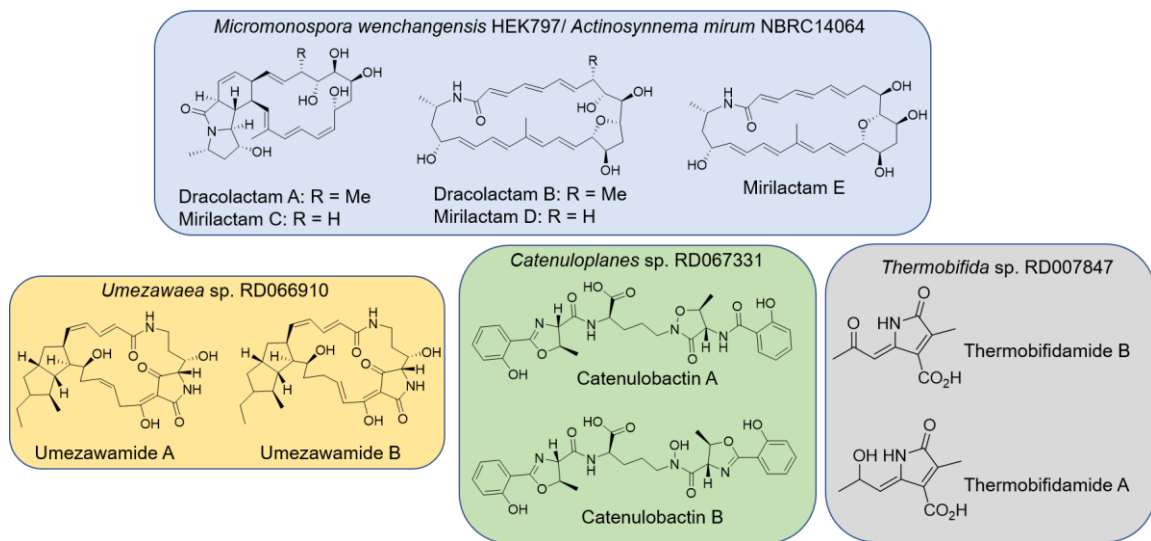


図: 本研究で希少放線菌から単離された新規二次代謝産物

第 1 章では 2 つの希少放線菌 (*M. wenchangensis* HEK797 / *A. mirum* NBRC14064) に対する複合培養によって得られた新規 polyene macrolactam 類である Dracolactam 類及び Mirilactam C-E の構造解析及び生合成経路について記述した。これらの化合物はいずれも 26 員環の大環状ポリエーノマクロラクタム分子が、エポキシ化及び更なる分子内環化反応を引き起こすことで生じた多環性化合物であり、いずれも天然物では例の無い新規骨格を持つ化合物群であった。

興味深いことに前駆体であるポリエーノマクロラクタム分子はそれぞれの希少放線菌の純粋培養時においても生産されていた。従って複合培養によって活性化されるのより下流のエポキシ化及び分子内環化に関わる遺伝子群であり、それらは前駆体となる polyene macrolactam の生合成遺伝子クラスターとは異なる領域に存在することが示唆された。現段階ではこの下流の生合成経路を担う遺伝子群の同定には至っておらず *in silico* による推

測も困難と考えられるが、この遺伝子群が複合培養条件でのみ活性化するという点を考慮すれば複合培養条件と非複合培養条件での転写解析を行うことで目的遺伝子の解明に繋がることが期待される。Polyene macrolactam の多段階環化を触媒する遺伝子は今回使用した放線菌以外にも広く分布する事が期待されており、仮に遺伝子が同定できればゲノムマッピングと複合培養を組み合わせることで更なる新規骨格を持った polyene macrolactam 類の獲得に繋がることが期待される。

続く第 2 章ではこれまで殆ど物質探索が行われて来なかった 3 種類の希少放線菌属 (=未探索希少放線菌)に対して複合培養法を適用する事で、6 種の新規二次代謝産物の獲得を達成、その構造解析及び生合成経路について記述を行った。本研究のスクリーニングにおいて二次代謝産物の活性化が見られた 10 株のうち、いわゆる未探索希少放線菌に該当した株はこの 3 種類のみであり、複合培養法により休眠生合成遺伝子の活性化が引き起こされた未探索希少放線菌株では、その全てに関して新規二次代謝産物の獲得に結び付いた事になる。また得られた二次代謝産物も抗真菌活性を有する PTM 系化合物 Umezawamide, シデロフォア活性を示すペプチド系化合物 Catenulobactin 或いは特異な化学構造を持つアルカロイド thermobifidamide と多様な生物活性や生合成背景を有していた。

筆者は過去に *Streptomyces* 属放線菌に対しても同様の複合培養スクリーニングを行い幾つかの新規二次代謝産物を獲得したが、複合培養により休眠遺伝子活性化が確認された株に対して実際に新規二次代謝産物を生産していた株の割合は 2 割程度に留まっていた。従って希少放線菌は *Streptomyces* と同様にミコール酸含有細菌との相互作用を通じてその休眠遺伝子を活性化させるが、そこから新規二次代謝産物が獲得される可能性はより高く、複合培養のターゲットとして *Streptomyces* 属と比較しても優れていることが示唆された。また近年では微生物の原位置培養 (土壌などの環境中で微生物を直接培養する方法) を補助する iChip デバイスの出現など、従来は困難であった希少放線菌の分離培養にも光明が差しており、今後はこうした未探索希少放線菌をターゲットとした複合培養を行うことで更なる新規二次代謝産物の獲得が期待される。更にこれまでの得られた化合物の生合成遺伝子クラスター及び発現解析を通じて、複合培養法の更なるメカニズム解明に繋がることが期待される。現状は black box な箇所が多い複合培養法であるが、その全容が解明されればその機構を利用することで、更に効率的な休眠生合成遺伝子活性化手法の開発に結び付くことが期待される。

参考文献

[1] Ling, L. L., et. al. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455–459.

謝辞

はじめに本研究を遂行するにあたり、指導教官としてご指導ご鞭撻を頂きました阿部郁朗教授に深く感謝申し上げます。阿部教授の研究室に配属されてからおおよそ 6 年の間に経験した事は何物にも代えがたく、今後研究者として独り立ちしてゆく上での起点となるものであります。東京大学大学院農学生命科学研究科の尾仲宏康教授は複合培養法の開発者として、また時には研究界における大先輩として、筆者が学部 4 年の頃よりご指導ご鞭撻を数多く頂きました。本博士論文の完成は尾仲教授のご指導無くしては為し得ないものであり、心より厚く御礼申し上げます。

北海道大学大学院薬学研究科の脇本敏幸教授は著者が当研究室に配属されてから 2 年間、准教授として数多くのご指導を頂きました。天然物の単離構造決定に関する考え方や今後研究者として生きてゆくための心構えなど、脇本先生からは非常に多くの事を学ばせて頂きました。また北海道大学に栄転された以降も学会等でお会いする折にも、非常に有意義なアドバイスを数多く頂いており、深く感謝申し上げます。神奈川大学工学部物質生命科学科の岡田正弘教授は脇本先生の後任として当研究室の准教授に着任され、神奈川大学に栄転されるまでの間数多くのご指導を頂きました。特に本研究で使用した各種計算化学手法の導入に関しましては、岡田先生のご指導のもと行われたものであります。また、岡田先生は当研究室の准教授として赴任される以前は中部大学で准教授として研究室を運営されており、研究上のアドバイスのみならず他大学の教育環境など貴重なお話を伺う機会も多く、研究者あるいは教育者としての知見を深められたと実感しておりこの場を借りて深謝申し上げます。当研究室の淡川孝義講師には筆者が配属された当時より微生物培養や遺伝子操作などの実験手法について基礎から丁寧に指導頂き、その他論文作成のアドバイスなど研究生活を送るにあたって大変お世話になりこの場にて深く御礼申し上げます。また直接的な指導関係にはありませんでしたが、当研究室の森貴裕助教には筆者の配属当時より数多くのアドバイスや激励を頂いており、この場にて厚く御礼申し上げます。

富山大学和漢医薬総合研究所の森田洋行教授及びウォンチンピァウ助教には二次代謝産物の生物活性評価や ECD スペクトルを測定するにあたって大変お世話になり、心より感謝申し上げます。また二次代謝産物の高分解能 NMR 解析については理化学研究所の林文晶博士及び張恵平博士に大変お世話になり厚く御礼申し上げます。東京大学大学院農学生命科学研究科の浅水俊平特任助教には本研究で使用した舂倉島産希少放線菌の単離及びミコール酸含有細菌の培養法に関するご指導等、非常にお世話になっており心より御礼申し上げます。

ハーバード大学研究員の張驪驛博士は筆者が配属された当時、当研究室の先輩として研究計画及び実験操作について非常に丁寧に指導頂きました。また研究以外の話をさせ

て頂く機会も多く、非常に快適な研究生生活を過ごすことが出来厚く御礼申し上げます。三橋隆章修士は配属当時より互いに切磋琢磨を行って来たメンバーとして研究あるいは研究以外についても色々と交流する機会が多く、筆者も多くの事を学ぶことが出来たと実感しており非常に感謝しております。尾関雅弘修士には本研究を遂行するにあたり、化合物の単離や誘導体化反応に関する一部の実験操作を補佐して頂き、厚く御礼申し上げます。その他にも研究室に所属する多くの人たちの支えを受けて本研究を遂行出来たものと考えており、この場を借りて深く御礼申し上げます。

研究生生活を送るにあたってリーディング大学院 GPLLI の学生、或いは日本学術振興会の特別研究員 (DC1)として少なからぬ奨学金を受給しており、これら奨学金は金銭的な不安を抱えずに研究に専念する上では不可欠な存在でありました。この点につきましても関係者各位に心より御礼申し上げます。

最後となりますが、博士後期課程修了まで精神的及び金銭的に支えて頂いた両親及び妹に対する最大限の感謝を以て謝辞を締めさせて頂きたいと思っております。

業績

(第 1 章発表論文, 査読付き国際誌)

[1] **Hoshino, S.**, Okada, M., Awakawa, T., Asamizu, S., Onaka, H., & Abe, I. (2017). Mycolic Acid Containing Bacterium Stimulates Tandem Cyclization of Polyene Macrolactam in a Lake Sediment Derived Rare Actinomycete. *Organic Letters*, 19(18), 4992–4995.

[2] **Hoshino, S.** *et. al.* (2018). Mirilactams C – E , Novel Polycyclic Macrolactams Isolated from Combined-Culture of *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 and Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin*, 66(6), 660–667.

(第 2 章発表論文, 査読付き国際誌)

[3] **Hoshino, S.**, *et. al.* (2018). Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *Journal of Antibiotics*, 71(7), 653–657.

[4] **Hoshino, S.**, Ozeki, M., Awakawa, T., Morita, H., Onaka, H., & Abe, I. (2018). Catenulobactins A and B, Heterocyclic Peptides from Culturing *Catenuloplanes* sp. with a Mycolic Acid-Containing Bacterium. *Journal of Natural Products*, 81(9), 2106–2110.

(博士後期課程在学中の受賞歴)

[5] 日本薬学会第 138 年会 優秀発表賞 (口頭発表の部, 2018 年)

[6] 第 7 回食品薬学シンポジウム 優秀発表賞 (口頭発表の部, 2017 年)

[7] 日本生薬学会第 64 回年会 優秀発表賞 (口頭発表の部, 2017 年)