

審査の結果の要旨

氏名 星野 翔太郎

本学位論文の著者である星野翔太郎は「複合培養法を用いた希少放線菌からの創薬資源探索」と題し、ミコール酸含有細菌との共培養を利用した希少放線菌における休眠生合成遺伝子の活性化及び、生産誘導された新規二次代謝産物の構造解析研究を行った。

放線菌は環境中に広く分布するグラム陽性細菌の一種で、多様な薬理活性物質（二次代謝産物）を生産することから創薬研究上において重要な地位を占め、それらは高い二次代謝生産能を有する主要種の *Streptomyces* 属放線菌と、*Streptomyces* 属以外の比較的分離頻度の低い放線菌属（希少放線菌）に大別されている。近年のゲノム解析から放線菌が持つ二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの数、これまで単離された二次代謝産物の数と比べて遥かに多く（即ち生合成遺伝子クラスターの大部分が休眠状態にある）、更に *Streptomyces* 属放線菌のみでなく一部の希少放線菌についても相当数の生合成遺伝子クラスターが休眠状態で存在することが明らかとなった。希少放線菌は *Streptomyces* 属放線菌と比べて物質探索研究が進んでいないことから、休眠生合成遺伝子を活性化させることでより効率的な新規二次代謝産物の獲得に結び付くことが期待される。星野は上記の背景を踏まえ、以前に報告されていたミコール酸含有細菌が共培養条件下で *Streptomyces* 属の休眠生合成遺伝子を効率的に活性化させる現象（複合培養法）に着目し、本手法を希少放線菌に対しても用いる事で効率的な新規生理活性物質の探索を目指した。

1. 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

第一章の前半では希少放線菌の一種 *Micromonospora wenchangensis* HEK-797 株に対してミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株との複合培養を行い、新規骨格を持った polyene macrolactam 分子である dracolactam A 及び B を獲得している。Dracolactam 類は複雑な炭素骨格と多数の不斉中心を有する化合物であったが、詳細な NMR 解析に基づいて平面構造及び一部の相対立体化学を決定している。更に dracolactam 類の acetonide 保護体や MTPA エステルを誘導体化反応によって調製後、それぞれ NMR 解析を行うことで残る相対及び絶対立体化学についても完全に決定している。星野は決定した化学構造に基づき 26 員環の大環状 polyene macrolactam 分子を前駆体として、それがエポキシ化と更なる分子内環化を経て dracolactam 類が生じる生合成経路を提唱した。そしてエポキシ化以降の生合成遺伝子は他の大環状 polyene macrolactam 生産株にも分布しており、*M. wenchangensis* と同様に複合培養を介して活性化されて多環性の polyene macrolactam 生産を引き起こすという仮説を立てた。

本章の後半において星野は上述の仮説を立証し更なる新規 polyene macrolactam 類を獲得する為、別の 26 員環 polyene macrolactam 分子である mirilactam 類を生産する希少放線菌 *Actinosynnema mirum* NBRC 14064 株についても複合培養法を適用した。結果、*A. mirum* 株においても複合培養法の適用によって新たな二次代謝産物の生産誘導が確認され、それらは仮説通り mirilactam A がエポキシ化と分子内環化を受けて生じた新規 polyene macrolactam 類であった (mirilactam C-E)。Mirilactam C-E の構造解析については dracolactam 類と同様に誘導体化反応及び NMR 解析を中心に行われたが、絶対立体化学については分子力場計算及び量子化学計算によって得られた mirilactam C の ECD 予測スペクトルに基づいて決定している。以上の結果は複合培養法が希少放線菌についても適用可能であることを示す重要な知見であった。

2. 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

第一章の結果により複合培養法が *Streptomyces* 属以外の希少放線菌属に対しても適用可能であることが分かった。これを踏まえ第二章ではより効率的な新規二次代謝産物の獲得を目的として、希少放線菌の中でも分離頻度が特に低く二次代謝産物の探索研究がこれまで殆ど、或いは一切行われていなかった属（未探索希少放線菌）について複合培養法を適用した。その結果未探索希少放線菌である *Umezawaea* 属、*Catenuloplanes* 属及び *Thermobifida* 属に分類される 3 種類の株について二次代謝産物の生産誘導見られ、

単離構造決定を行った結果いずれも新規化合物であることが明らかとなった。

Umezawamide 放線菌より単離された新規 polycyclic tetramate macrolactam 分子である *umezawamide* 類は本属より初めて報告された二次代謝産物であり、その構造解析は NMR 解析に加え分子力場計算に基づく配座解析及び量子化学計算による ECD スペクトル予測に基づいて行われた。更に本化合物はマウス白血病細胞 P-388 株に対する細胞毒性及び *Candida albicans* に対する抗真菌活性が確認された。続いて *Catenuloplanes* 属放線菌より単離された新規ペプチド *catenulobactin* 類も当該属より初めて単離された二次代謝産物であり、天然物としては珍しい isoxazolidinone 構造を有していた。その絶対立体化学を含めた構造については NMR 解析に加えて、キラル GC-MS を用いた加水分解産物のアミノ酸分析を行うことで完全に決定した。加えて *catenulobactin B* は 3 価の鉄イオンに対するキレート活性を有しており、いわゆる微生物シデロフォアとしての機能を持つものと考えられた。最後に *Thermobifida* 属放線菌より単離された新規アルカロイド *thermobifidamide* 類は NMR による構造解析により、これまでの天然物としては類を見ない構造を有することが分かり、その生合成背景についても全く新規であることが推測された。

このように未探索希少放線菌を対象とした複合培養法は、二次代謝生産が誘導された菌株全てにおいて新規化合物の獲得に繋がり、得られた化合物の生合成背景や生物活性についても多彩であった。このことは未探索希少放線菌が複合培養における極めて優れたターゲットであることを示している。

以上、本研究において星野は希少放線菌に対する複合培養法を通じて 5 種類の希少放線菌株から合計 11 種類の新規化合物の単離構造決定を達成し、希少放線菌に対する効率的な新規二次代謝産物の探索手法としての複合培養法の地位を確立した。更に本研究を通じて得られた二次代謝産物の生合成遺伝子を同定し、それぞれの転写解析を行うことで複合培養法のメカニズム解明に貢献することも期待され、よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。