

新規抗生物質トリプロペプチン類の
探索、構造決定ならびに抗菌活性に関する研究

2005年

橋爪 秀樹

東京大学図書



0012961850

東京大学総合図書館

目次

序論	6
第1編 本論	
第1章 新規抗 MRSA 物質の探索、 トリプロペプチン類の生産および単離精製	11
1.1 新規抗 MRSA 物質の探索系の構築	11
1.2 新規抗 MRSA 物質の探索結果	12
1.2.1 薬剤耐性菌に対する感受性試験	12
1.2.2 細胞壁調製画分との拮抗試験	12
1.2.3 細胞毒性試験	12
1.3 BMK333-48F3 株の分類・同定	14
1.3.1 BMK333-48F3 株の 16S rRNA 遺伝子配列の解析	14
1.3.2 BMK333-48F3 株の培養性状および生理生化学性状	14
1.4 トリプロペプチン類の生産	16
1.5 トリプロペプチン類の単離精製	17
1.6 トリプロペプチン類の培養法の検討	18
1.7 トリプロペプチン E の発酵生産	21
1.8 トリプロペプチン E の単離精製	21
1.9 要約および考察	23
第2章 トリプロペプチン類の構造解析	26
2.1 物理化学的特性	26
2.2 トリプロペプチン類の平面構造	28
2.3 構成アミノ酸の立体化学	39
2.4 ヒドロキシプロリンの立体化学	39
2.5 トリプロペプチン C の脂肪側鎖の立体化学	41
2.6 プロリンの立体化学	42
2.7 ヒドロキシアスパラギン酸の立体化学	42

2.8	トリプロペプチン類の絶対構造	44
2.9	要約および考察	45
第3章	トリプロペプチン類の生物活性	48
3.1	トリプロペプチン類の抗菌活性および細胞毒性	48
3.2	トリプロペプチン C 耐性株の出現頻度試験	51
3.3	トリプロペプチン類のマウスに対する急性毒性および亜急性毒性	52
3.4	マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおける治療効果	54
3.5	トリプロペプチン C の黄色ブドウ球菌スミス株の増殖に与える影響	55
3.6	トリプロペプチン C の高分子合成阻害様式	58
3.7	トリプロペプチン C の細胞膜障害作用の検討	59
3.8	トリプロペプチン C の細胞膜透過性に与える影響	60
3.9	トリプロペプチン C、バンコマイシンおよびヘキサクロロフェンの高分子合成 阻害様式の比較	61
3.10	黄色ブドウ球菌に対する経時殺菌曲線	63
3.11	トリプロペプチン類のマウス体内での血中濃度変遷	65
3.12	トリプロペプチン類の血清中での遊離型比率の測定	66
3.13	要約および考察	68

第2編 実験の部

第1章	新規抗 MRSA 物質の探索、 トリプロペプチン類の生産および単離精製	71
1.1	培地	71
1.2	抗菌力試験	72
1.3	細胞壁調製画分との拮抗試験	72
1.4	細胞毒性試験	73
1.5	BMK333-48F3 株の分類・同定	74
1.6	トリプロペプチン類の生産	74
1.7	トリプロペプチン類の単離精製	74
1.8	トリプロペプチン E の単離精製	75

第2章	トリプロペプチン類の構造解析	76
2.1	分析機器および各種スペクトル	76
2.2	試薬	86
2.3	マーフィー法によるアミノ酸分析	86
2.4	トリプロペプチン類の酸加水分解	86
2.5	薄層クロマトグラフィーによるトリプロペプチンC 構成アミノ酸の分析	86
2.6	トリプロペプチンC の構成アミノ酸の精製	87
2.7	ヒドロキシプロリンの立体化学	87
2.8	マーフィー法によるアミノ酸分析結果	89
2.9	トリプロペプチンC のバーチ還元	90
2.10	トリプロペプチンC のリチウムボロハイドライドによる還元	91
2.11	トリプロペプチンC の構成脂肪酸の精製および立体化学	92
第3章	トリプロペプチン類の生物活性	93
3.1	培地および試薬の調製	93
3.2	溶液の調製	94
3.3	RI 標識化合物および放射活性測定用試薬の調製	94
3.4	抗菌活性の測定	95
3.5	トリプロペプチンC 耐性株の出現頻度試験	95
3.6	急性毒性試験	95
3.7	亜急性毒性試験	96
3.8	マウス全身感染モデルにおける感染治療試験	96
3.9	トリプロペプチンC の黄色ブドウ球菌スミス株の増殖に対する影響	96
3.10	黄色ブドウ球菌スミス株の高分子合成阻害様式の検討	97
3.11	トリプロペプチンC のプロトプラストに対する影響	97
3.12	トリプロペプチンC の膜透過性に対する影響	97
3.13	黄色ブドウ球菌スミス株の経時的な高分子合成阻害様式の検討	98
3.14	黄色ブドウ球菌スミス株に対する経時的殺菌力の測定	98
3.15	血中濃度の測定	99
3.16	血清中での遊離型濃度測定	99

総括	100
謝辞	102
参考文献	103

略語

CD	circular dichroism
CFU	colony forming units
^{13}C NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	correlated spectroscopy
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
D-HMBC	decoupled- ^1H -detected heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
FABMS	fast atom bombardment mass spectrometry
Fig.	figure
HMBC	^1H -detected heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HMQC	^1H -detected multiple quantum correlation spectroscopy
^1H NMR	proton nuclear magnetic resonance
HPLC	high performance liquid chromatography
IC_{50}	50% inhibitory concentration
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenous
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optical density
s.c.	subcutaneous
TLC	thin layer chromatography
UV	ultraviolet
VRE	vancomycin resistant <i>Enterococcus</i> sp.
VRSA	vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

序論

1. 抗生物質

20 世紀の最も大きな発見の一つに抗生物質が挙げられる。抗生物質の最初の発見は 1929 年、英国の細菌学者フレミングがカビの生えた寒天平板上で細菌が増殖できないことを見いだしたことが発端となる。その後フレミングは、これがカビの生産する抗生物質ペニシリンによることを明らかにした。ペニシリンは、作用機序が人には存在しない細胞壁合成阻害であるため副作用がきわめて少なく、また抗菌力も優れていたため化学療法剤として実用化された¹⁾。かつて感染症は主要な死亡要因であったが、1940 年代半ばからのペニシリンの工業的大量生産と臨床使用を契機に、各種の抗生物質や抗菌薬が数多く実用化され、細菌感染症の管理は衛生環境の改善と相まって著しく進歩した。

2. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

抗生物質の恩恵により、感染症の脅威から解放されたかに思われたが、細菌は次々と薬剤耐性を獲得し感染症は新たな脅威となった。

今日、医療の現場において最も問題となっている薬剤耐性菌はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）である。黄色ブドウ球菌は皮膚や鼻腔に生息する常在菌で、化膿性疾患や敗血症を惹起する最も重要な日和見感染菌であり、易感染性宿主に感染するとしばしば難治性の重篤な症状を惹き起こす。黄色ブドウ球菌は元来ペニシリンに感受性であったが、ペニシリン汎用によりペニシリン耐性黄色ブドウ球菌が出現した。このペニシリン耐性黄色ブドウ球菌はペニシリン分解酵素ペニシリナーゼをコードする外来遺伝子プラスミドを持つことで耐性を獲得した²⁾。

その後、ペニシリナーゼ抵抗性ベータラクタム系抗菌薬としてメチシリンが実用化されたが、メチシリン使用後間もなくメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が出現し、さらに 1980 年以降急激に MRSA が増加した。MRSA の特徴は、メチシリンによって阻害されにくい変異型ペニシリン結合蛋白をコードする *mecA* を持ち³⁾、現在臨床で最も使用されているベータラクタム系抗生物質が無効なことである。さらに MRSA は染色体上にアミノグリコシド系およびマクロライド系抗生物質に対する耐性遺伝子⁴⁾、テトラサイクリン排出ポンプ⁵⁾ やキノロン系抗生物質の標的である DNA ジャイレースの変異⁶⁾ を獲得し、ほとんどの既存抗菌薬に耐性を示す。

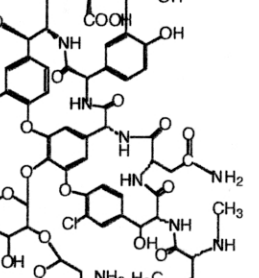
今日では高齢化社会の到来および医療技術の進歩により易感染性宿主が増加し、これまで以上に MRSA は院内感染菌として大きな脅威となっている。近年、市中で

分離される黄色ブドウ球菌に占める MRSA の割合が急激に増加しており^{7,8,9,10)}、また MRSA は市中で小児急性肺炎を惹き起こすこと⁷⁾から、これまで以上に感染症対策の重要な菌として位置付けられている。


3. バンコマイシン高度耐性黄色ブドウ球菌

上述したように MRSA は多くの抗菌薬に耐性を示し、有効な抗菌薬がほとんどない。現在本邦では抗 MRSA 剤としてアルベカシン、テイコプラニン、バンコマイシンの 3 剤が使用されているが、このうちテイコプラニンおよびアルベカシン耐性の MRSA は既に報告されている¹¹⁾。バンコマイシンは MRSA に著効を示し、小児あるいは新生児にも使用の認められているため抗 MRSA 薬の切り札として使用されている。日本では 1998 年から 2002 年の 5 年間に、臨床分離された黄色ブドウ球菌のバンコマイシンに対する感受性の低下が報告されており¹²⁾、その他にもバンコマイシン低感受性黄色ブドウ球菌 (VISA) が数多く報告されるようになった。さらに米国では 2002 年にバンコマイシン高度耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) が二株分離され、社会的に大きな注目を集めた。VRSA はバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) がもつプラスミド上に乗った外来遺伝子 *vanA* を含む一連の遺伝子群が MRSA に伝播することで誕生したと言われる。バンコマイシンは細胞壁ペプチドグリカンの末端ペプチド D-Ala-D-Ala に結合してペプチドグリカンの架橋を阻害することで抗菌力を発揮するが、VRSA では *vanA* を含む一連の遺伝子により D-Ala-D-Ala が D-Ala-D-Lac に変換され、バンコマイシンは標的であるペプチドグリカンに結合できなくなり抗菌活性を失う³⁾。VRSA はバンコマイシンの暴露によって耐性遺伝子の発現が誘導されるため、耐性遺伝子が存在しても増殖速度に悪い影響が出ない。そのため、薬剤選択圧のかかった環境では多剤耐性を獲得している VRSA は優先的に増殖でき、耐性遺伝子が短期間で蔓延する可能性が指摘されている。このように、現状でも対応の困難な MRSA に加え、さらに特効薬であるバンコマイシンに高度耐性を獲得した VRSA が出現したことにより、新規抗 MRSA 薬の開発が社会的に強く望まれるようになった。

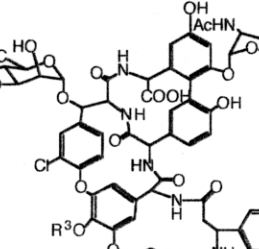
Fig. 1-1 Anti-MRSA antibiotics




vancomycin



	R ¹	R ²	R
kanamycin	OH	OH	H
kanamycin B	NH ₂	OH	H
dibekacin	NH ₂	H	H
arbekacin	NH ₂	H	COCH(OH)CH ₂ CH ₂ NH ₂ (S)



teicoplanin



	R ³	R ⁴
teicoplanin T-A2-1		
teicoplanin T-A2-2		
teicoplanin T-A2-3		
teicoplanin T-A2-4		
teicoplanin T-A2-5		
teicoplanin T-A3	H	

methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)

methicillin(beta-lactam) resistance determinant *mecA*

methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)

enhancement of murein monomer synthesis

vancomycin resistance determinant *vanA* from VRE

mecA

vanA

vancomycin intermediate-resistant *S. aureus* (VISA)

vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA)

4. 新規抗 MRSA 物質の探索

そこで著者らは、新規抗 MRSA 薬の創製を目指すこととした。新薬の開発にはまず候補化合物の存在が必須である。薬剤候補発見には、大きく分けて2つの方法がある。一つは、既存薬剤の骨格構造を有機合成的手法で修飾し、特性のより優れた化合物を得る方法と、もう一つは天然有機化合物から探す方法である。天然有機化合物からは微生物産物であるペニシリンを始め、我々の研究会でもカナマイシン^{13,14)}、ブレオマイシン¹⁵⁾、ジョサマイシン¹⁶⁾、カスガマイシン¹⁷⁾など数多くの医薬、農薬が得られている。天然有機化合物からは有機合成的に合成の困難な化合物や、これまで知られていない骨格構造を得る可能性があるなど長所が多い。また、新規骨格を有する化合物はその作用機序も新規であることが多く、交差耐性の観点から望ましい。

これらをふまえ、薬剤耐性菌に有効な薬剤の創製には天然から探索することが適していると考え、微生物培養液中から VRSA を含む MRSA に有効な化合物の探索を行うこととした。VRSA はこれまで 2002 年に 2 株^{18,19)}、2004 年に 1 株²⁰⁾の全 3 株が米国で臨床分離されている。それらの耐性遺伝子情報は公開されており、3 項に記載したとおりである。そこで、既存抗菌剤に耐性な黄色ブドウ球菌に著効を示し、さらにバンコマイシンと作用機序の異なる化合物は MRSA および VRSA に有効であるという着想のもと探索系を構築し、探索研究を行った。

5. トリプロペプチン類の発見

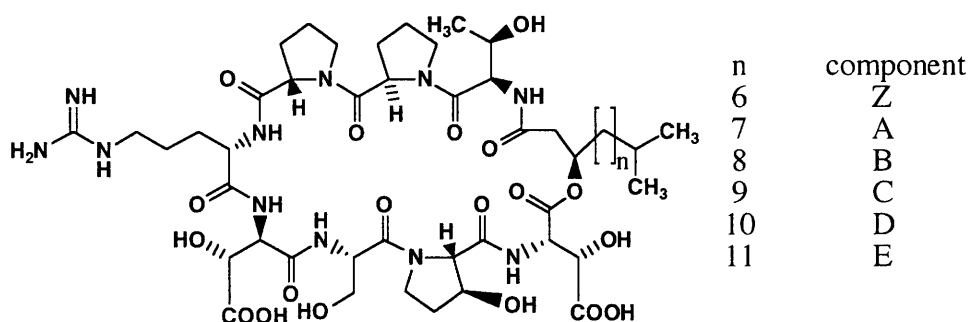
約 4000 サンプルを探索した結果、*Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株の培養液から新規構造を有する 6 種のリポペプチド系抗生物質トリプロペプチン類を発見した^{21,22,23)}。本論文は新規抗 MRSA 物質の探索、トリプロペプチン類の発見、トリプロペプチン類生産菌の分類同定、トリプロペプチン類の生産培養、単離精製、物理化学的特性、構造解析および生物活性等について述べたものである。下記に概略を記す。

第 1 章では、社会的に大きな問題となっている薬剤耐性菌 MRSA に有効な化合物の探索、生産菌の同定、トリプロペプチン類の生産および単離精製について述べる。約 4000 株の微生物培養液の中で土壌より分離した BMK333-48F3 株の培養液に目的の活性を見いだした。本菌は、系統分類の指標である 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の部分塩基配列の解析および生理生化学性状・化学性状試験より、*Lysobacter* 属に属することが明らかになった。活性成分の単離精製は、寒天平板上での黄色ブドウ球菌に対する生育阻止円を指標に以下のように行った。すなわち本菌を培養培地で

2 日間培養後、ダイアイオン HP-20 カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびダイアイオン CHP20P カラムクロマトグラフィーを用いて新規リポペプチド系化合物群トリプロペプチンA, B, C, D, E および Z を単離した。

第2章では、トリプロペプチン類の物理化学的性質および構造解析について述べる。トリプロペプチン類の平面構造は、呈色反応、赤外吸収スペクトル、高分解能質量分析および各種 NMR スペクトル解析から明らかにした。構成アミノ酸および脂肪側鎖の絶対構造はマーフィー法および分光光学的手法により明らかにした。またトリプロペプチン類分子内に 2 分子ずつ含まれるプロリンおよびヒドロキシアスパラギン酸は、バーチ還元法およびリチウムボロハイドライド還元により得られた断片をマーフィー法にて分析することで立体化学を明らかにし、トリプロペプチン C の絶対構造を決定した (Fig.1-3)。

Fig.1-3 Structures of tripropeptins



第3章では、トリプロペプチン類の生物活性について述べる。トリプロペプチン類は耐性菌を含むグラム陽性細菌に強い抗菌力を示したが、グラム陰性菌および抗酸菌には抗菌活性を示さなかった。2002 年に臨床分離された 10 株の MRSA に対してトリプロペプチン C, D および E は、バンコマイシンをはじめとする既存抗菌薬よりも強い抗菌力を示した。マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおけるトリプロペプチン類の感染治療試験およびトリプロペプチン類の構造と *in vivo* および *in vitro* の活性を比較検討した。トリプロペプチン類の生物活性を評価する過程で、トリプロペプチン耐性菌の出現率が低いこと、ならびにトリプロペプチン類においてマウスの全身感染モデルでの治療効果と抗菌力が一致しなかったという興味深い知見が得られ、これらを薬物動態および生化学的観点から解析した。

第1編 本論

第1章 新規抗 MRSA 物質の探索、

トリプロペプチン類の生産および単離精製

MRSA は院内感染の主要な起因菌で、 β ラクタム系抗生物質のみならず、ほとんどの既存抗菌抗生物質に対する耐性を獲得している。そのため現在では、MRSA に有効な抗菌薬はバンコマイシン、テイコプラニンおよびアルベカシンしかない。後者2薬剤に対して耐性を獲得した MRSA は報告されており、バンコマイシンが MRSA の切り札として使用されている。しかしながら近年、バンコマイシン高度耐性 MRSA (VRSA) が臨床分離され、新規抗 MRSA 薬の開発が急務となっている。そこで微生物培養液から新規抗 MRSA 物質を探索したところ、沖縄県の土壌より分離した土壌細菌 *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株により生産される新規抗生物質トリプロペプチン A, B, C, D, E および Z を発見した。

本章では、探索系の構築、探索結果、トリプロペプチン類生産菌の分類学的位置づけ、トリプロペプチン類の生産および単離・精製について述べる。

1.1 新規抗 MRSA 物質の探索系の構築

VRSA を含む MRSA に有効な新薬創製を目指して探索研究を行うにあたり、以下のようなコンセプトに基づき系を構築した。

すなわち抗菌薬として要求する活性が、MIC 値で $2.0 \mu\text{g/mL}$ 以下であると仮定すると、微生物培養液から新規物質を発見した当初、活性物質の生産量が $100 \mu\text{g/mL}$ 以上あることは非常に稀であるため、培養液を 80 倍希釈して菌の生育を抑制する場合、含有している活性成分の MIC が $1.25 \mu\text{g/mL}$ 以下となり要求を満たす。そこで感受性黄色ブドウ球菌スミス株、多剤耐性黄色ブドウ球菌 MS 9610 株および MRSA No.5 株に対し、微量液体希釈法において 80 倍希釈培養液で上記3株全ての生育を抑制する微生物培養液を陽性サンプルとした。

また、VRSA はバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) と同じバンコマイシン耐性因子 *vanA* 遺伝子群を獲得している。そのため MRSA に対し前述の抗菌活性を有し、バンコマイシンと作用機序の異なる化合物は VRSA にも有効であると考えられる。なお、バンコマイシンなどのグリコペプチド系化合物はペプチドグリカン中間体であるムレインモノマーに結合し細胞壁の重合を阻害することで抗菌活性を発揮するため、細胞壁調製画分によって抗菌力が拮抗する²⁴⁾。そこで、この拮抗現象を利用してグリ

コペプチド系化合物の排除を行い、バンコマイシンと作用機序の異なるものを選抜した。

さらに選択性のない毒性物質の排除のため哺乳動物由来細胞に対する細胞毒性試験を行い、抗菌活性に対する細胞毒性の選択係数が高いものを陽性サンプルとした。

1.2 新規抗 MRSA 物質の探索結果

微生物培養液サンプル 3996 検体から目的の活性を探索した結果、既存抗菌薬の耐性菌の生育を阻害したサンプル数 283、そのうち細胞壁調製画分との拮抗現象が見られなかったサンプル数 215、さらに哺乳動物細胞に対する毒性が認められなかったものは、BMK333-48F3 株の培養液 1 サンプルであった。詳細は下記のとおりであった (Table.1.1)。

1.2.1 薬剤耐性菌に対する感受性試験

BMK333-48F3 株の培養液の感受性試験は感受性黄色ブドウ球菌スミス株、多剤耐性黄色ブドウ球菌 MS 9610 株および MRSA No.5 株に対し、微量液体希釈法において 80 倍希釈培養液で上記 3 株全ての生育を抑制した。

1.2.2 細胞壁調製画分との拮抗試験

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバンコマイシン溶液の円筒拡散法での生育阻止円の直径は、黄色ブドウ球菌スミス株に対し、通常培地では 20.5 mm、細胞壁添加培地では 17.0 mm、枯草菌 *Bacillus subtilis* PCI219 株に対し通常培地では 27.0 mm、細胞壁添加培地では 15.0 mm と細胞壁添加により抗菌活性に拮抗作用が認められた。一方、BMK333-48F3 株の培養液では黄色ブドウ球菌スミス株および枯草菌 *Bacillus subtilis* PCI219 株に対しそれぞれ 23.5 mm, 26.0 mm の生育阻止円を示し、細胞壁添加により拮抗作用が認められず、本培養液の活性成分がバンコマイシンと異なる作用機序を持つことが示唆された。

1.2.3 細胞毒性試験

BMK333-48F3 株の培養液は、最終濃度 25% で L-1210 細胞の増殖を 24.1% 阻害した。液体希釈法による抗菌力試験とこの細胞毒性試験の希釈倍率から本培養液は高い選択係数を示した。

Table 1.1 Screening result of culture broth of BMK333-48F3

I. Antimicrobial activity

test organism	x80 dilution
<i>S. aureus</i> Smith	inhibited
<i>S. aureus</i> 9610	inhibited
<i>S. aureus</i> No.5 (MRSA)	inhibited

II. Cell wall antagonism

cell wall preparation	<i>Bacillus subtilis</i> PCI219 (mm)	
	-	+
BMK333-48F3	26.0	26.0
vancomycin 200 µg/ml	27.0	15.0

III. Cytotoxicity

test cell	cytotoxicity (final 25% Broth)
L-1210	negative

1.3 BMK333-48F3 株の分類・同定

1.3.1 BMK333-48F3 株の 16S rRNA 遺伝子配列解析

Escherichia coli numbering system の 67 番から 305 番目に該当する BMK333-48F3 株の 16S rRNA 部分塩基配列を解読し、日本 DNA データバンク (DDBJ) で相同性検索 (FASTA および BLAST) を行ったところ、*Lysobacter enzymogenes*、*Lysobacter* sp. C3 および *Lysobacter* sp. IB-9374 の 16S rRNA 部分塩基配列と 100% の相同性を示した。また、解読した塩基配列を下記に示した。

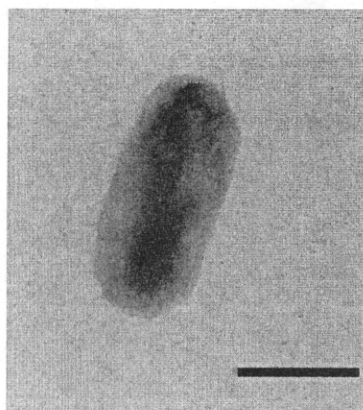
```
ggcagcacagaggagcttgctccttgggtggcgagtggcggacgggtgaggaatacgtc  
ggaatctgcctatttgtgggggataacgtagggaaacttacgctaataccgcatacgaccta  
cgggtgaaagtgggggaccgcaaggcctcacgcagatagatgagccgacgtcggattag  
ctagttggcggggtaaaggcccaccaaggcgacgatccgtagctggtctgagaggatgat
```

1.3.2 BMK333-48F3 株の培養性状および生理生化学性状

性状試験の結果を Table 1.2 に示した。BMK333-48F3 株の透過型電子顕微鏡写真を Fig.1.1 に示す。本菌株は、好気性グラム陰性桿菌で、鞭毛、芽胞および子実体の形成は認められず、滑走性を有した。寒天培地での生育は半透明で非常に粘性に富んでいた。本菌はキチンを分解し、ゼラチンを液化し、カゼインを消化し、ミルクを凝固・ペプトン化する。細胞の大きさは $0.5\sim0.8 \times 1.6\sim2.0 \mu\text{m}$ であった。生育温度範囲は $20\sim37^\circ\text{C}$ で、生育至適温度は $24\sim30^\circ\text{C}$ であった。DNA の G+C 含量は 70.5 モル % であった。糖類からの酸およびガスの生成試験は、次の通りであった。グルコース、アラビノース、マルトースおよびトレハロースから少量の酸の生成が認められたが、D-キシロース、D-マンノース、D-フラクトース、D-ガラクトース、シュクロース、D-ソルビトール、D-マンニトール、イノシトール、グリセロールおよびスターチからは酸の生成が認められなかった。また、ガスの生成はいずれの糖からも認められなかった。BMK333-48F3 株の特徴を要約すると、本株はグラム陰性桿菌で、キチンを分解し、滑走性を有し、また子実体の形成は認められず、DNA の G+C モル% が 70.5% であった。

上述の BMK333-48F3 株の性状試験は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology の記載されている *Lysobacter* 属の特徴^{25,26)}と一致していた。よって BMK333-48F3 株を *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 とした。

Fig.1.1 Electron micrograph of strain BMK333-48F3



bar; 1 μ m

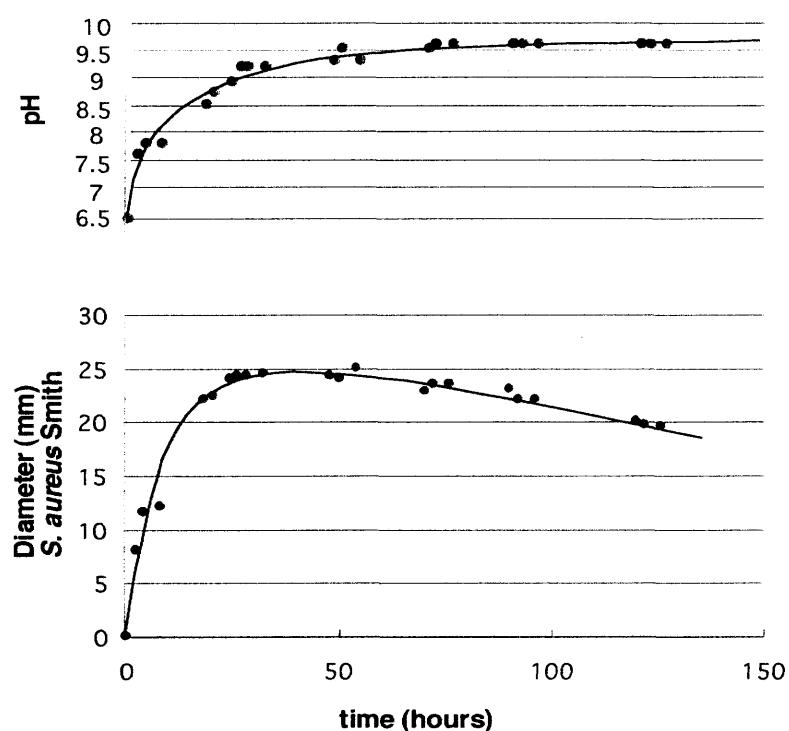
Table 1.2 Taxonomic data of strain BMK333-48F3

Characterization		Characterization	
Gram stain	-	Decomposition of glucose	+
Motility	-	D-mannose	-
Gliding	+	maltose	+
Fruit bodies	-	sucrose	-
G+C contents	70.5%	D-galactose	-
Peptonization of milk	+	D-fructose	+
Coagulation of milk	+	arabinose	-
Chitin degradation	+	inositol	-
Catalase	+	D-mannitol	-
Oxidase	+	trehalose	+
Urease	-	D-sorbitol	-
Indole test	-	D-xylose	-
H ₂ S test	-	cellobiose	-
Nitrate reduction	+	glycerol	-
Denitrification	-	starch	-
Methyl red test	-	salicin	-
Voges-Proskauer test	-	lactose	-
Citrate utilization	+	Acid fast	-
Hydrolysis of Casein	+	Pigments	+
Esclin	+	pH range for growth	6.0-9.0
Gelatin liquefaction	+	Temperature range for growth	20-37°C
O/F test	oxidation	Optimum growth temperature	24-30°C

1.4 トリプロペプチン類の生産

寒天斜面培地で培養した *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株（以下、生産株）を、トリプロペプチン生産培地に接種し、27℃ で 18 時間振盪培養した。得られた種母培養液を培養培地に接種して 27℃ で振盪培養し、Fig.1.2 にその時のトリプロペプチン類生産の培養曲線を示した。pH は培養開始直後から上昇し、それ以降も緩やかに上昇を続けた。トリプロペプチン類の生産は、黄色ブドウ球菌スミス株に対する寒天平板上での生育阻止円を指標に調べた。トリプロペプチン類の生産は約 40 時間後に最高値を示し、50 時間後以降に緩やかに低下した。このことから本培養は 48 時間で行うこととした。

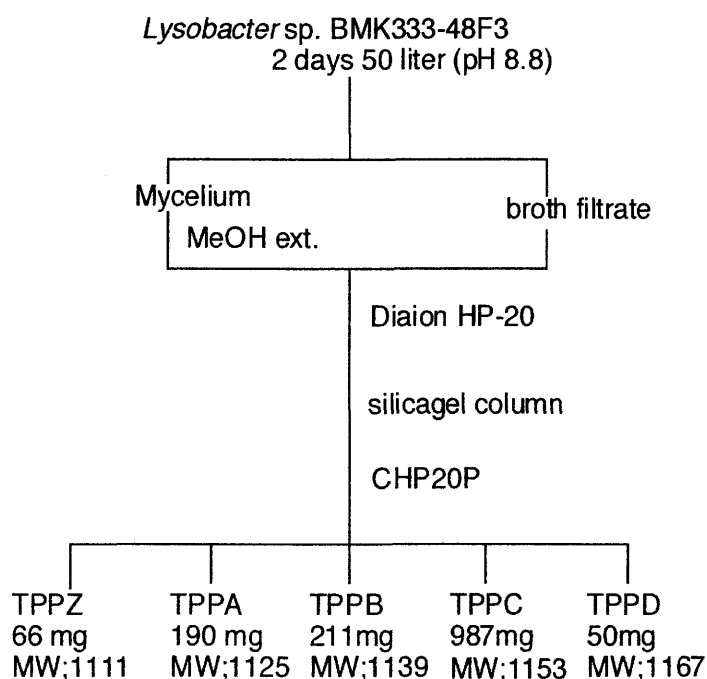
Fig.1.2 Fermentation of *Lysobacter* sp. BMK333-48F3



1.5 トリプロペプチン類の単離精製

トリプロペプチン類生産培地で培養した培養液を遠心分離して培養ろ液と菌体に分離した。菌体はメタノール 10 L で抽出後に減圧下濃縮し、培養ろ液とあわせ、この混合溶液 50 L を、ダイアイオン HP-20 カラム (6 L) に吸着させ、蒸留水、50% メタノール水、65% アセトン水各々 18 L で順次溶出した。活性成分は 65% アセトン水で溶出し、これを減圧下で濃縮して油状物質 30 g を得た。得られた油状物質をシリカゲルカラム (1500 mL) にのせ、クロロホルム：メタノール：水 (10:5:1, v/v, 4500 mL)、ブタノール：メタノール：水 (4:1:2, v/v, 4500 mL) で順次クロマトグラフィーを行い、活性画分を集め粗精製物 10.8 g を得た。これを 50% メタノール水で溶解し、ダイアイオン CHP20P カラム (250 mL) に吸着させ、アセトン-水の濃度勾配法で順次溶出した。40% アセトン水溶出画分よりトリプロペプチン Z 65.7 mg、45% アセトン水溶出画分よりトリプロペプチン A 189.7 mg、45% および 50% アセトン水溶出画分よりトリプロペプチン B 210.6 mg、45% および 50% アセトン水溶出画分よりトリプロペプチン C 986.6 mg、50、55 および 60% アセトン水溶出画分よりトリプロペプチン D 50.1 mg を単離した (Fig.1.3)。

Fig.1.3 Purification procedure of tripropeptins



1.6 トリプロペプチン類の培養法の検討

第2章で述べるように、トリプロペプチン類の構造は、共通の環状ペプチド骨格を持ち、連結したメチレン数の異なる末端の分岐した脂肪側鎖を構成要素としている。トリプロペプチン類は発酵生産すると構造の差異がわずかな多成分の混合物として得られるため、生産物の収束およびコントロールが課題となった。そこでトリプロペプチン類が分岐脂肪側鎖を持つことに注目し、その生合成機構を利用して生産物のコントロールを試みた。

分岐脂肪鎖は分岐アミノ酸もしくは代謝中間体である分岐アミノ酸由来のケト酸をスターターとして、マロニル CoA の縮合反応をくり返して生合成されることが知られている^{28,29)}。このことからロイシンから生合成される脂肪側鎖はトリプロペプチン A および C の脂肪側鎖であり、一方、トリプロペプチン Z, B および D の脂肪側鎖はバリンから生合成されると推測される (Fig.1.4)。

トリプロペプチン類培養培地にロイシンを添加して培養したところ、予期したとおりトリプロペプチン A および C が選択的に生産され、さらに新たなピークが検出された (Fig.1.5, Table 1.3)。ロイシンを培地に添加した時のトリプロペプチン類の発酵生産ではトリプロペプチン Z, B および D が生産されないため、通常の培養時に比べ単離効率が著しく改善した。一方、トリプロペプチン類培養培地にバリンを過剰量添加して培養したところ、トリプロペプチン類の生産比は変わらなかった。

次に、ロイシンおよびバリンのそれぞれの分岐脂肪酸生合成中間代謝物であるイソバレリル酸、3-メチル-2-オキソブタン酸を培地中に添加してトリプロペプチン類の発酵生産を行った。その結果、添加濃度依存的に対応する成分の生産比率が増加した (Table 1.4)。バリン型脂肪酸生合成において、バリン添加では影響が見られず、3-メチル-2-オキソブタン酸添加で対応する脂肪側鎖を持つトリプロペプチン生産が増加したことから、*Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株はバリン由来分岐脂肪酸生合成の初期段階にある脱アミノ反応もしくはその後の酸化反応酵素が欠失していると考えられた。このときトリプロペプチン類の生産比率は変化するが、総生産量は変わらなかった。

Fig.1.4 Biosynthesis of tail-branched fatty acid

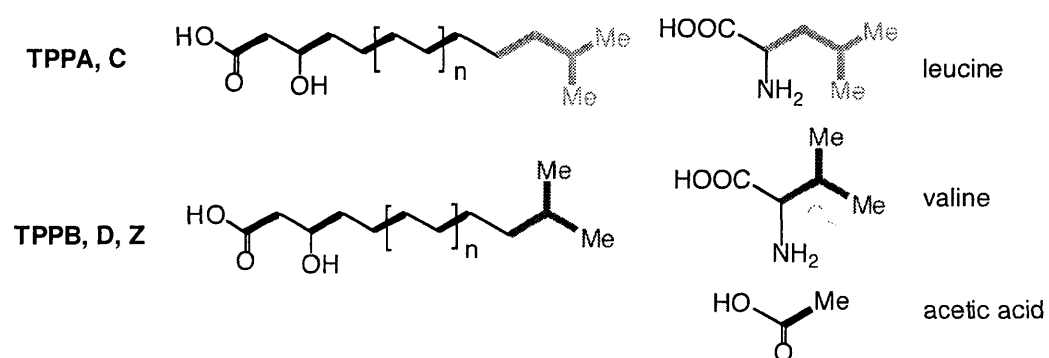


Fig.1.5 Effect of leucine addition on triproteins production

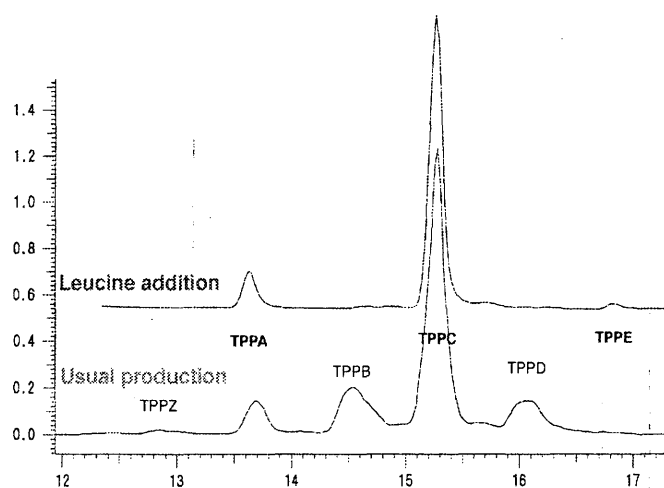


Table 1.3 Effect of addition of branched amino acid on tripropeptins production

amino acid	dose (mg/ml)	Ratio/total TPPs (%) ^{a)}			
		TPPA	TPPB	TPPC	TPPD
control	0	8.4	8.9	71.3	11.4
L-Valine	10	6.3	8.9	72.1	12.7
L-Leucine	0.31	3.9	4.2	87.1	4.8
	0.63	4.4	2.3	90.8	2.5
	1.25	7.6	0.3	92.1	0
	10	7.6	0.2	92.1	0.1

^{a)}Percentage values are calculated by the peak area of HPLC analysis

Table 1.4 Effect of addition of branched amino acid derivatives on tripropeptins production

amino acid derivatives	dose (mg/ml)	Ratio/total TPPs (%) ^{a)}			
		TPPA	TPPB	TPPC	TPPD
control	0	8.4	8.9	71.3	11.4
isovaleric acid	2.5	11.2	0.5	87.8	0.5
	10	11.5	0	88.5	0
3-methyl-2-oxobutanoic acid	2.5	9.8	6.4	73.6	10.2
	5.0	9.6	10.4	65.8	14.2
	10	9.5	20.2	45.2	25.1

^{a)}Percentage values are calculated by the peak area of HPLC analysis

1.7 トリプロペプチン E の発酵生産

トリプロペプチン類発酵生産の最適化の過程で、ロイシンを添加した培地でトリプロペプチン生産菌を培養するとトリプロペプチン A および C が選択的に生産され、さらに新たなピークを見いだした。このピークはトリプロペプチン類と同様に紫外吸収がエンド吸収のみであること、さらに HPLC での保持時間が他のトリプロペプチン類と等間隔であることから、類縁化合物であることが示唆された。

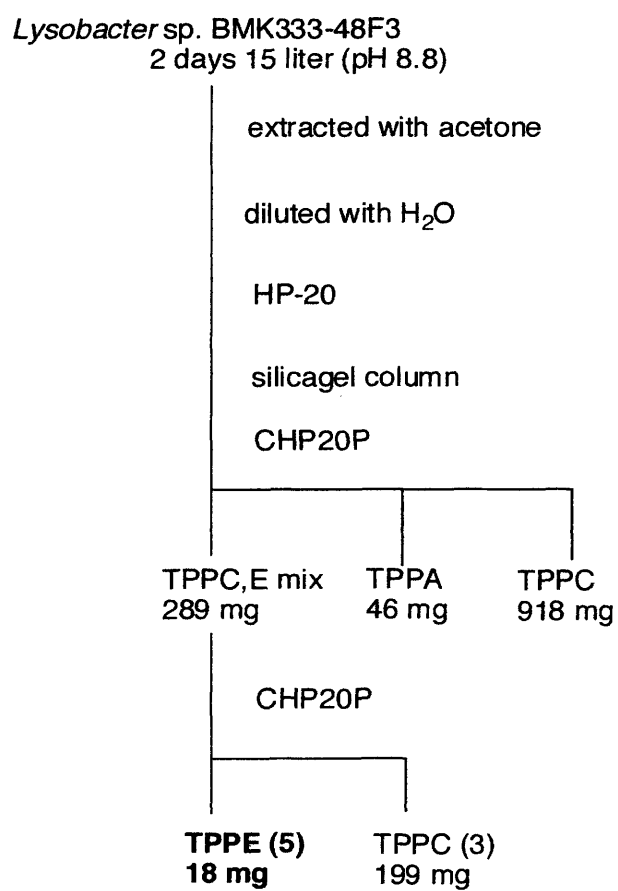
このロイシン添加培養時に新たに出現したピークの化合物（トリプロペプチン E）を得るため、トリプロペプチン類培養培地にロイシンを加えて、トリプロペプチン類発酵生産を行った。培養法は培地組成を除き 1.4 項と同様に行った。また培養液の抗菌活性を経時的に調べたところ、ロイシン添加の影響は認められず、Fig.1.2 と同様であった。

1.8 トリプロペプチン E の単離精製

トリプロペプチン E は、以下のように発酵生産および単離精製した (Fig.1.6)。生産菌をトリプロペプチン E 生産培地で 48 時間培養した培養液 15 L に等量のアセトンを加えミキサーで十分に攪拌し、60 L の蒸留水を加えて希釈した後、湿容量 1 L のダイアイオン HP20 レジンを加え、さらに攪拌した。この混合液をろ過し、化合物の吸着しているレジンを 3 L の蒸留水および 3 L のメタノールで洗浄後、アセトン 3 L にて活性区を溶出し、得られたアセトン溶出画分を減圧乾固して 30 g の茶褐色の油状物を得た。この油状物を 1 L のシリカゲルカラムにのせ、3 L のクロロホルム：メタノール：水 = 10：5：1 の混合溶液にて洗浄後、3 L のブタノール：メタノール：水にて溶出し、減圧乾固後 5.1 g の黄褐色油状物を得た。これを 30% メタノール水に溶解後、1 M 塩酸で pH を 2.6 に調整し、湿容量 250 mL のダイアイオン CHP20P レジンカラムにのせ、アセトン-水の濃度勾配法にて順次溶出した。アセトン-水 = 18：22 および 20：20 の溶出画分から 45.7 mg のトリプロペプチン A を、20：20、22：18、23：17 の溶出画分から 918.4 mg のトリプロペプチン C を、23：17 から 26：14 の溶出画分から トリプロペプチン C およびトリプロペプチン E の混合物 288.9 mg を得た。

この混合物を少量の蒸留水に溶解後、pH を 2.0 に調整し、湿容量 30 mL のダイアイオン CHP20P カラムにのせ、アセトニトリル-水の濃度勾配法により順次溶出した。アセトニトリル：水 = 33：67 および 34：66 の溶出画分から 198.5 mg のトリプロペプチン C を、36：64 から 37：63 の溶出画分から 17.5 mg のトリプロペプチン E を精製単離した。純度は HPLC で確認した。

Fig.1.6 Purification procedure of tripropeptin E



1.9 要約および考察

第1章では、開発が急務とされている薬剤耐性菌 MRSA・VRSA に有効な新薬候補化合物を微生物培養液 3996 サンプルの中から探索し、沖縄県那覇市の土壌より分離された一細菌 BMK333-48F3 株の培養液に目的の活性を見いだした。

BMK333-48F3 株の 16S rRNA 部分塩基配列の相同性検索の結果、3 株の *Lysobacter* 属のデータと 100% の相同性を示した。さらに BMK333-48F3 株の培養性状および生理生化学性状を調べたところ、本株はグラム陰性菌で、鞭毛はなく、運動性が認められず、滑走性を有していた。滑走性を有する細菌は、すべてグラム陰性菌であることが知られており²⁷⁾、DNA の GC モル%、さらには子実体形成能の有無により分類学的に細分化される²⁶⁾ (Fig.1.7)。BMK333-48F3 株は、系統分類の指標である 16S rRNA 部分塩基配列、培養性状および生理生化学性状などから *Lysobacter* 属に属する細菌であると同定し、本株を *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株とした。

次に *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株の培養液より活性成分の精製単離を行った。菌体メタノール抽出画分と培養上清を、ダイアイオン HP-20、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて粗精製を行い、ダイアイオン CHP20P カラムクロマトグラフィーを行うことで 5 種の活性成分トリプロペプチン A, B, C, D および Z を単離した。トリプロペプチン E は、培養の最適化の過程で、培地中にロイシンが過剰量存在するとき生産されるものとして発見された。トリプロペプチン類の発酵生産において、培地中のロイシン濃度に依存してトリプロペプチン A および C 成分が選択的に生産され、あわせてトリプロペプチン Z, B および D は生産されなくなり、アミノ酸の添加により生産物の収束が達成された (Fig.1.6, Table 1.2)。他のリポペプチド系化合物においても、培地にアミノ酸を添加することで代謝物の生産性の向上ならびに生産物の制御は行われており^{30,31,32)}、リポペプチド系化合物の生産のコントロールに有効かつ実用的な方法である。

また、トリプロペプチン類の生産菌である *Lysobacter* 属細菌は、土壌からの分離頻度は放線菌のように高くないが、トリプロペプチン類以外にも β ラクタム系化合物であるセファバチン (Fig.1.8)^{33,34,35)} やリポペプチド系化合物である WAP-8294A (Fig.1.10)³⁶⁾、カタノシン (Fig.1.11)³⁷⁾、ライソバクチン (Fig.1.11)²⁴⁾、環状ペプチドのラクティビシン (Fig.1.9)³⁸⁾ など多くの興味深い生理活性物質を生産することが報告されている。そのため *Lysobacter* 属細菌は新規生理活性物質の探索源として期待される。

Fig.1.7 Characteristics of gliding bacteria

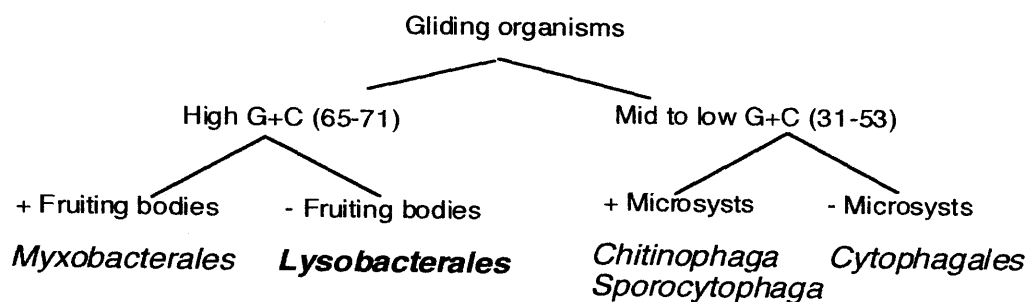
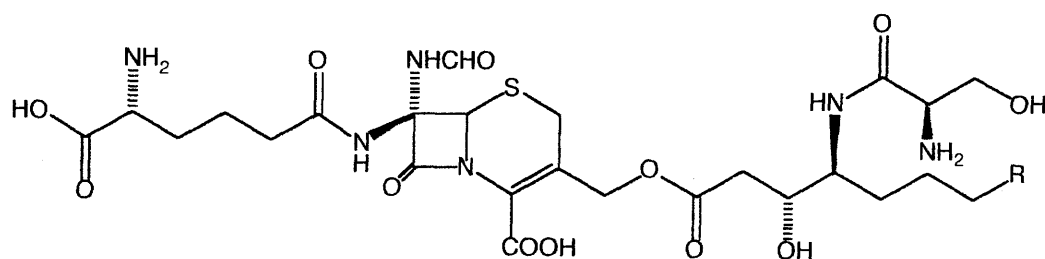


Fig.1.8 Structure of cephabacins



cephabacin F₄ R=-NHCH(=NH)NH₂
 cephabacin F₇ R=-CH₂NH₂

Fig.1.9 Structure of lactivicin

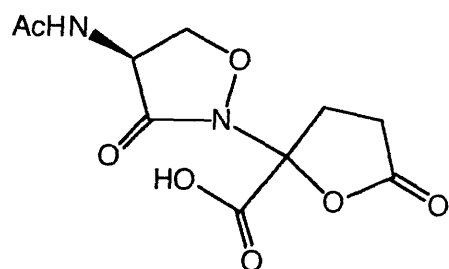
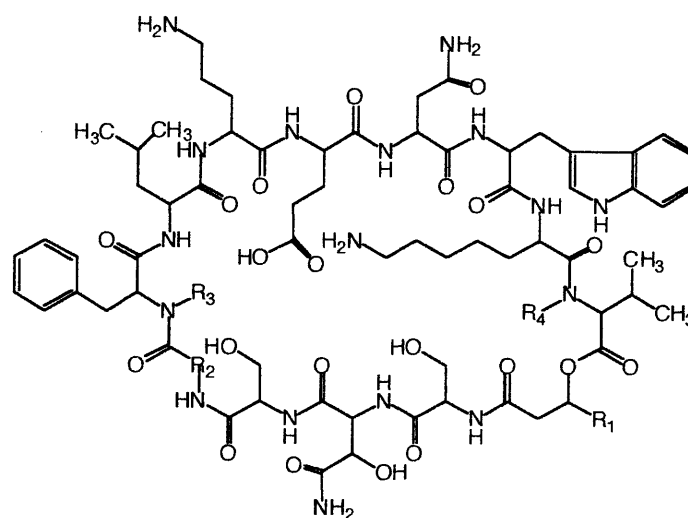
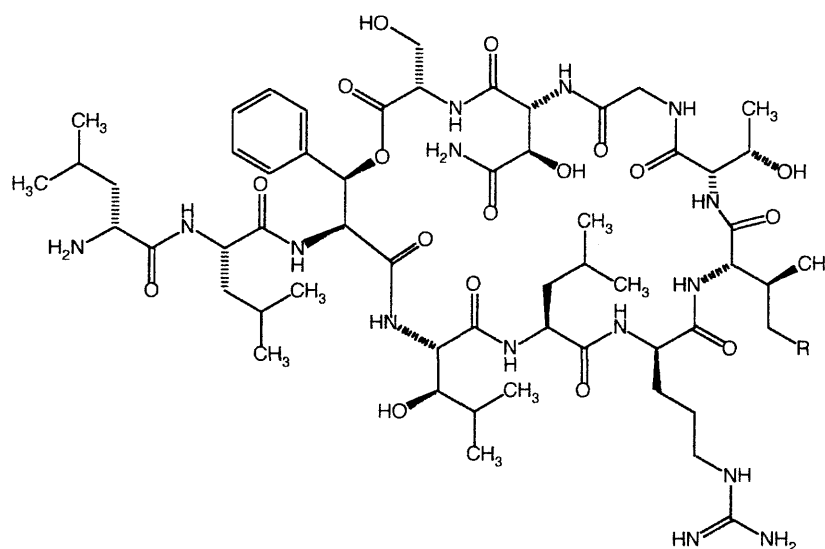


Fig.1.10 Structure of WAP-8294



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
WAP-8294A1	(CH ₂) ₄ CH ₃	CH ₂	CH ₃	CH ₃
WAP-8294A2	(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	CH ₂	CH ₃	CH ₃
WAP-8294A4	(CH ₂) ₄ CH(CH ₃) ₂	CH ₂	CH ₃	CH ₃
WAP-8294Ax8	(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	CH ₂	CH ₃	H
WAP-8294Ax9	(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	CH ₂	H	CH ₃
WAP-8294Ax13	(CH ₂) ₃ CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂	CH ₃	CH ₃

Fig.1.11 Structure of katanosins and lysobactin



katanosin A R=H
lysobactin (=katanosin B) R=CH₃