

第2章 トリプロペプチン類の構造解析

土壌細菌 *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株の培養液より、6 種の新規抗菌物質トリプロペプチン類を発見および精製単離した。本章では、トリプロペプチン類の物理化学的特性、平面構造の決定および立体構造の決定について述べる。

2.1 物理化学的特性

トリプロペプチン類の物理化学的特性を Table 2.1 に示す。トリプロペプチン類は互いに類似した物理化学的特性を示し、各成分の分子式は、高分解能 FABMS スペクトルにより決定し、 $(CH_2)_n$ ずつ異なる化合物群であることがわかった。各成分とも UV スペクトルは末端吸収を示し、IR スペクトルの特徴的な吸収からラクトン (1737 cm^{-1}) およびペプチド結合 (1635 および 1537 cm^{-1} 付近) の存在が示唆された。トリプロペプチン類は、メタノール、DMSO およびブタノールに可溶で、水にわずかに溶解、クロロホルム、アセトンおよび酢酸エチルに不溶であった。トリプロペプチン類の呈色は、ライドンスミスおよび坂口試験に陽性反応を示し、ニンヒドリン試薬には陰性であった。

Table 2.1 Physicochemical properties of tripropeptin A, B, C, D, E and Z

tripropeptin						
	A	B	C	D	E	Z
$[\alpha]_D^{24}$ (MeOH)	-7.8° (c 1.0)	-7.9° (c 1.0)	-8.4° (c 1.0)	-10.8° (c 1.0)	-9.4° (c 1.0)	-14.0° (c 1.0)
HRFAB-MS(m/z)						
found	1126.5657(M+H) ⁺	1140.5788(M+H) ⁺	1154.5945(M+H) ⁺	1168.6101(M+H) ⁺	1202.5901(M-2H+Na) ⁺	1112.5475(M+H) ⁺
Calcd.	1126.5632	1140.5776	1154.5927	1168.6074	1202.5921	1112.5491
Molecular formula	C ₄₉ H ₇₀ N ₁₁ O ₁₉	C ₅₀ H ₈₁ N ₁₁ O ₁₉	C ₅₁ H ₈₃ N ₁₁ O ₁₉	C ₅₂ H ₈₅ N ₁₁ O ₁₉	C ₅₃ H ₈₇ N ₁₁ O ₁₉	C ₄₈ H ₇₇ N ₁₁ O ₁₉
UV λ_{max} (MeOH)	end absorption	end absorption	end absorption	end absorption	end absorption	end absorption
IR ν_{max} (KBr)cm ⁻¹	3375, 2923, 1737, 1635, 1538, 1450, 1263, 1203, 1097	3345, 2931, 1737, 1635, 1537, 1450, 1263, 1201, 1097	3372, 2927, 1737, 1635, 1537, 1452, 1263, 1203, 1097	3282, 2931, 1739, 1633, 1537, 1452, 1263, 1203, 1099	3336, 2925, 1741, 1635, 1538, 1452, 1265, 1201, 1097	3388, 2923, 1725, 1635, 1536, 1450, 1265, 1205, 1095
Color Reaction						
positive	I ₂ , Rydon-Smith, Sakaguchi	I ₂ , Rydon-Smith, Sakaguchi	I ₂ , Rydon-Smith, Sakaguchi	I ₂ , Rydon-Smith, Sakaguchi	I ₂ , Rydon-Smith, Sakaguchi	I ₂ , Rydon-Smith, Sakaguchi

2.2 トリプロペプチン類の平面構造

トリプロペプチン類の構造決定は主成分であるトリプロペプチン C について解析した。呈色試験の結果からトリプロペプチン C は、グアニジル基を有するペプチド系化合物であることが示唆された。また、高分解能 FABMS スペクトルおよび ^1H および ^{13}C NMR スペクトル (Fig.2.1, 2.2) よりトリプロペプチン C の分子式を $\text{C}_{51}\text{H}_{83}\text{N}_{11}\text{O}_{19}$ と決定した。

Fig.2.1 ^1H NMR spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$

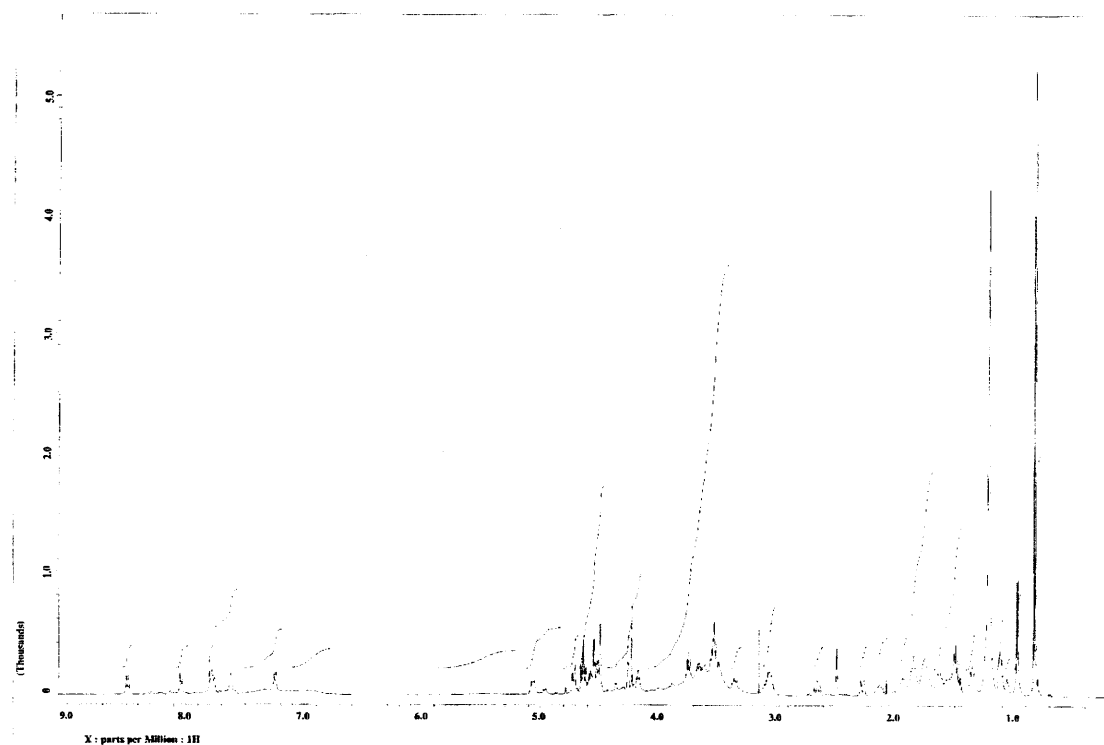
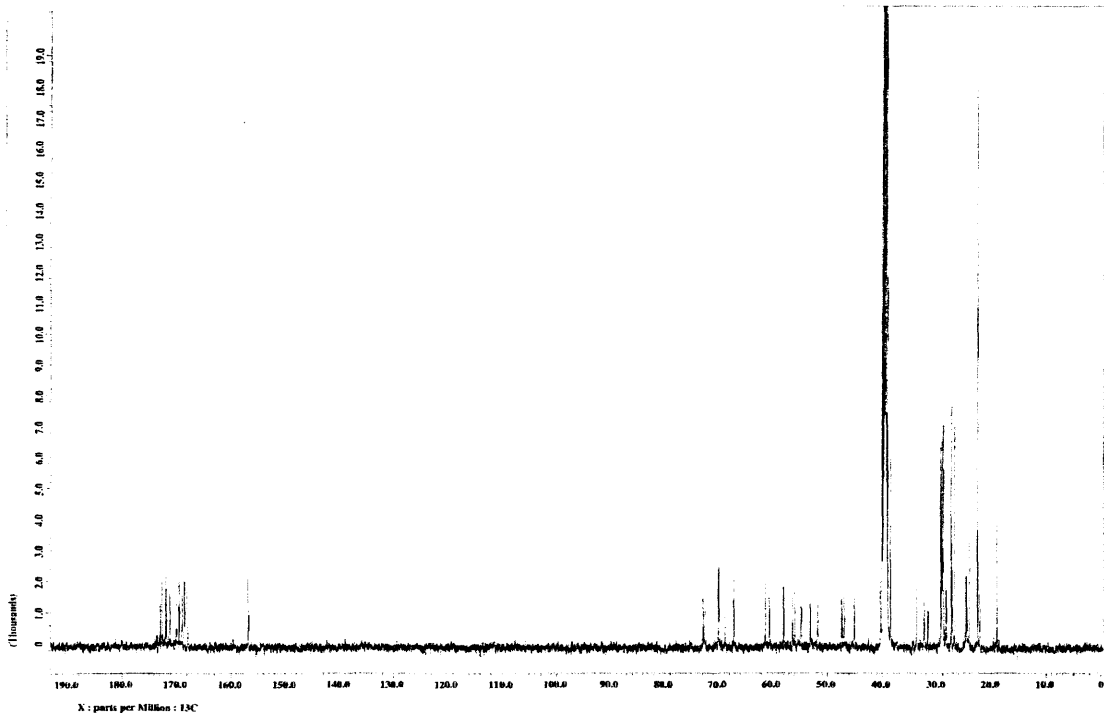


Fig.2.2 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$



トリプロペプチン C の構成アミノ酸を確認するため、トリプロペプチン C の酸加水分解生成物をセルロース TLC に展開後、ニンヒドリン試薬で呈色したところ、スレオニン、セリン、アルギニン、ヒドロキシプロリン、プロリンおよびヒドロキシアスパラギン酸が存在することがわかった。

次にトリプロペプチン C の平面構造を各種 NMR スペクトル解析により決定した。トリプロペプチン C の ^1H および ^{13}C NMR スペクトル (500 および 125 MHz) の帰属を Table 2.2 に示した。トリプロペプチン C の DEPT および HMQC NMR スペクトルの解析より、3 個のメチル炭素、22 個のメチレン炭素、14 個のメチン炭素、1 個の sp^2 4 級炭素および 11 個のカルボニル炭素が存在することを明らかにした。さらに ^1H - ^1H COSY および HMBC スペクトル解析から、トリプロペプチン C の分子内に β ヒドロキシ脂肪酸および 8 個のアミノ酸、すなわちスレオニン、セリン、アルギニン、ヒドロキシプロリン、2 分子のプロリンおよび 2 分子のヒドロキシアスパラギン酸の存在が明らかにされた (Fig.2.3)。

続いて先に得られたトリプロペプチン C の部分構造を、HMBC スペクトルで観測されたロングレンジ相関より連結した。すなわち β -ヒドロキシアスパラギン酸 (II) のアルファ位のメチンプロトン (H-2, δ_{H} 4.62) からヒドロキシプロリンのカルボニル炭素 (C-5, δ_{C} 169.9) に、ヒドロキシプロリンのアルファ位のメチンプロトン (H-6, δ_{H} 4.23) からセリンのカルボニル炭素 (C-10, δ_{C} 167.9) に、セリンのアミドプロトン (δ_{H} 7.25) から β -ヒドロキシアスパラギン酸 (I) のカルボニル炭素 (C-13, δ_{C} 168.5) に、 β -ヒドロキシアスパラギン酸 (I) のアミドプロトン (δ_{H} 8.49) からアルギニンのカルボニル炭素 (C-17, δ_{C} 171.2) に、アルギニンのアミドプロトン (δ_{H} 7.77) からプロリン (I) のカルボニル炭素 (C-23, δ_{C} 172.6) に、プロリン (I) のメチレンプロトン (H-27, δ_{H} 3.35) からプロリン (II) のカルボニル炭素 (C-28, δ_{C} 172.0) に、プロリン (II) のメチンプロトン (H-29, δ_{H} 4.18) からスレオニンのカルボニル炭素 (C-33, δ_{C} 169.0) に、スレオニンのアルファ位のメチンプロトン (H-34, δ_{H} 4.52) および 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸のメチンプロトン (H-39, δ_{H} 5.06) から 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸のカルボニル炭素 (C-37, δ_{C} 169.5) にロングレンジ相関が観測されたことから、アミド結合を介した 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸-スレオニン-プロリン-プロリン-アルギニン- β -ヒドロキシアスパラギン酸-セリン-ヒドロキシプロリン- β ヒドロキシアスパラギン酸の配列を明らかにした (Fig.2.4)。

Table 2.2 ^{13}C and ^1H NMR data of tripropeptin C in $\text{DMSO-}d_6$

position	type	$\delta \text{ C}^*$	$\delta \text{ H}^*(\text{multiplicity, } J \text{ (Hz)})$
1	>C=O	168.6	
2	>CH-N	54.8	H:4.62 (1H, m), NH:7.80 (1H, d, 10.0)
3	>CH-O	70.0	4.55 (1H, d, 2.4)
4	>C=O	171.8	
5	>C=O	169.9	
6	>CH-N	68.8	4.23 (1H, s)
7	>CH-O	72.5	4.26 (1H, d, 3.8)
8	-CH ₂ -	32.3	1.75 (2H, m)
9	-CH ₂ N<	45.0	3.53 (1H, m), 3.66 (1H, m)
10	>C=O	167.9	
11	>CHNH-	53.1	H:4.58 (1H, m), NH:7.25 (1H, d, 8.0)
12	-CH ₂ O-	61.3	3.53 (2H, m)
13	>C=O	168.5	
14	>CHNH-	56.3	H:4.64 (1H, m), NH:8.49 (1H, d, 8.4)
15	>CH-O	70.0	4.5 (1H, d, 2.0)
16	>C=O	172.9	
17	>C=O	171.2	
18	>CHNH-	51.7	H:4.55 (1H, m), NH:7.77 (1H, d, 8.6)
19	-CH ₂ -	28.9	1.56 (1H, m), 1.63 (1H, m)
20	-CH ₂ -	24.7	1.35 (2H, m)
21	-CH ₂ NH-	40.3	H:3.06 (2H, m), NH:7.62 (m)
22	-N=C(N-)N-	156.9	
23	>C=O	172.6	
24	>CH-N	60.6	4.72 (1H, m)
25	-CH ₂ -	31.7	1.93 (1H, m), 2.13 (1H, m)
26	-CH ₂ -	22.2	1.78 (2H, m)
27	-CH ₂ -N	46.9	3.35 (1H, m), 3.49 (1H, m)
28	>C=O	172.0	
29	>CH-N	57.9	4.18 (1H, t, 12.4)
30	-CH ₂ -	29.0	1.63 (2H, m)
31	-CH ₂ -	24.4	1.75 (1H, m), 1.85 (1H, m)
32	-CH ₂ -N	47.3	3.54 (1H, m), 3.61 (1H, m)
33	>C=O	169.0	
34	>CHNH-	56.0	H:4.52 (1H, d, 7.0), NH:8.04 (1H, d, 8.4)
35	>CH-O	67.2	3.74 (1H, m)
36	-CH ₃	19.0	0.97 (3H, d, 6.6)
37	>C=O	169.5	
38	-CH ₂ -	40.1	2.28 (1H, d, 12.0), 2.66 (1H, m)
39	>CH-O	72.8	5.06 (1H, m)
40	-CH ₂ -	33.7	1.50 (2H, m)
41	-CH ₂ -	24.1	1.21 (2H, m)
42	-CH ₂ -	29.1	1.21 (2H, m)
43	-CH ₂ -	29.1	1.21 (2H, m)
44	-CH ₂ -	29.1	1.21 (2H, m)
45	-CH ₂ -	29.1	1.21 (2H, m)
46	-CH ₂ -	29.1	1.21 (2H, m)
47	-CH ₂ -	26.8	1.13 (1H, m), 1.21 (1H, m)
48	-CH ₂ -	38.5	1.13 (1H, m), 1.21 (1H, m)
49	>CH-	27.4	1.49 (1H, m)
50	-CH ₃	22.5	0.83 (3H, d, 7.0)
51	-CH ₃	22.5	0.83 (3H, d, 7.0)

* 125 MHz, chemical shift in ppm.

* 500 MHz, chemical shift in ppm.

Fig.2.3 Partial structure of tripropeptin C

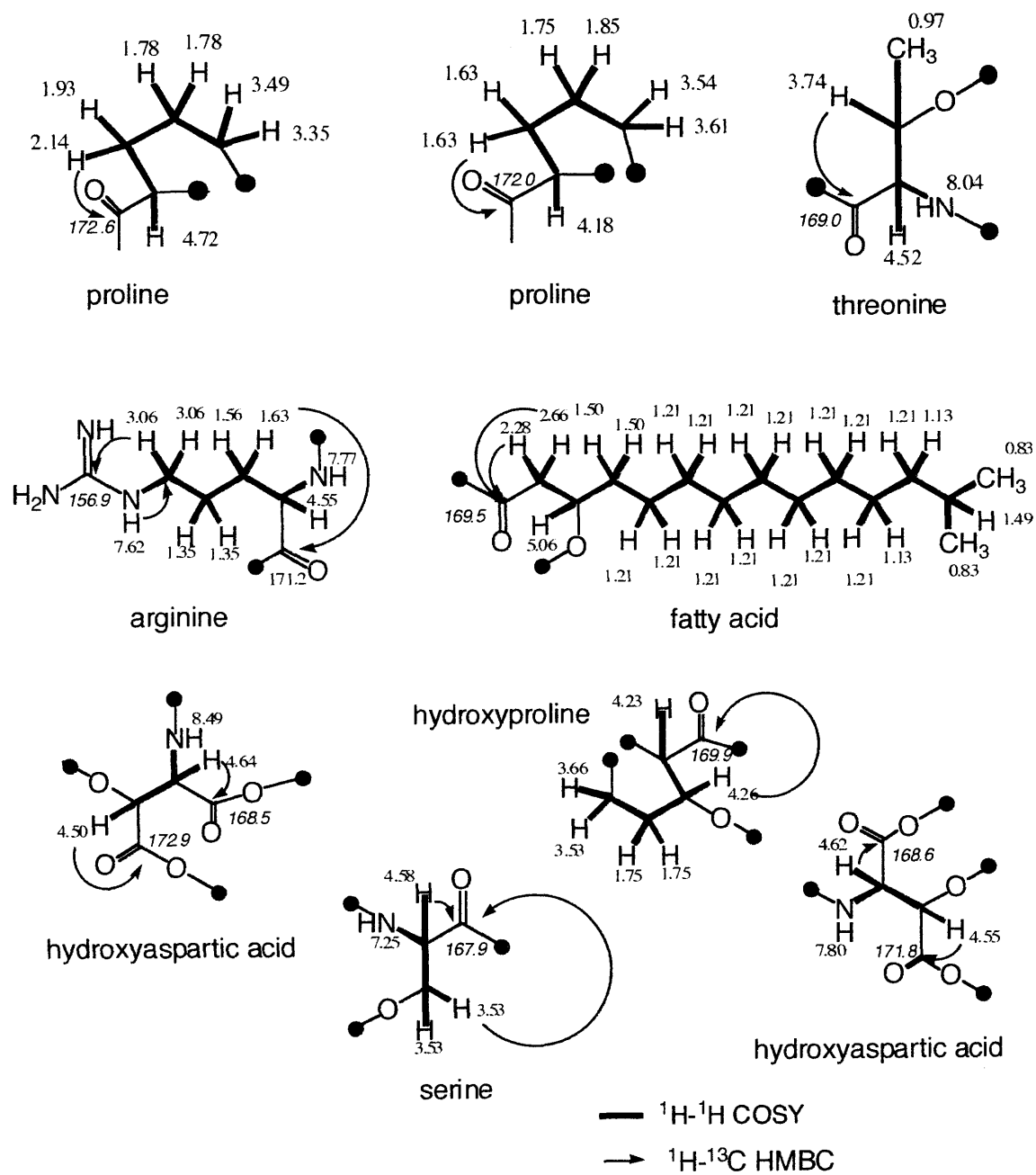
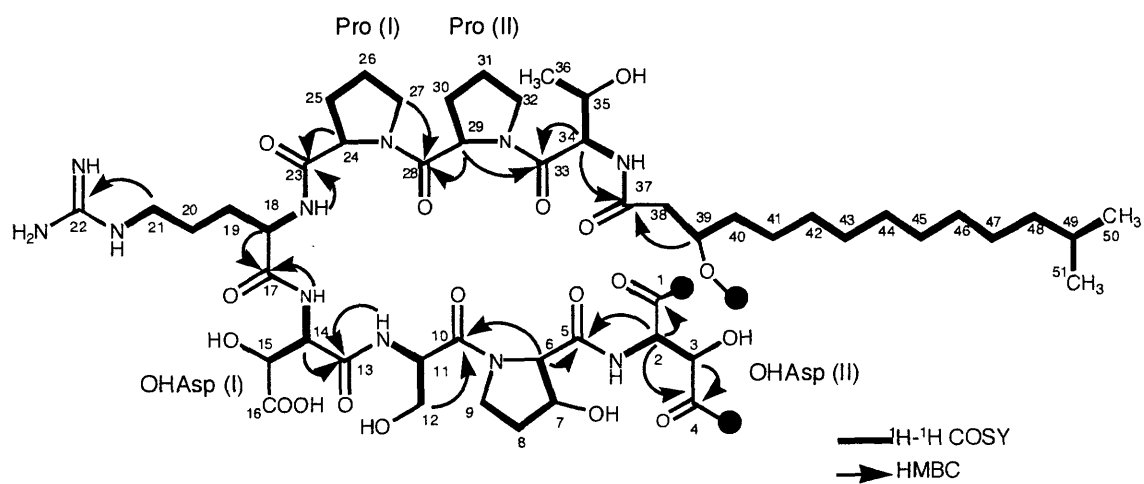


Fig.2.4 ^1H - ^1H COSY and HMBC experiments of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$



HMBC スペクトルの解析では、 β ヒドロキシアスパラギン酸 (II) および脂肪側鎖の周辺構造に関して明らかにするには至らなかった。トリプロペプチン C の IR スペクトルから、分子内にラクトン構造の存在が示唆されているが、エステル結合を介したプロトン-カーボン間の結合定数は小さいために HMBC スペクトルでは遠隔相関が確認できなかったと考えられた。そこで小さい結合定数を示す遠隔相関を見ることができる D-HMBC³⁹⁾により未決定部位の遠隔相関の検出を試みた。すなわちトリプロペプチン C を DMSO- d_6 : D₂O (10:1) に溶解し、1 M の水酸化ナトリウムで pH を 8.0 に調整したのち、¹H NMR, ¹³C NMR (Table 2.3)、D-HMBC スペクトル (Fig.2.5) を測定し³⁹⁾、3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸のメチンプロトン (H-39, δ_H 4.91) から β -ヒドロキシアスパラギン酸 (II) のカルボニル炭素 (C-1, δ_C 170.5) へのロングレンジ相関を観測することでラクトン周辺の構造を明らかにし、これによりトリプロペプチン C の平面構造を決定した (Fig.2.6, Fig.2.7)。

また、トリプロペプチン A, B, D, E および Z の平面構造は、トリプロペプチン C と同様に決定した。トリプロペプチン類の NMR データを Table 2.4 に示した。本化合物群がペプチド系化合物であり、ヒドロキシプロリンを含めプロリンが 3 分子あることから、これらをトリプロペプチン類と命名した。

Fig.2.5 D-HMBC spectrum of tripropeptin C in DMSO- d_6 : D₂O (10:1)+NaOH (pH 8.0)

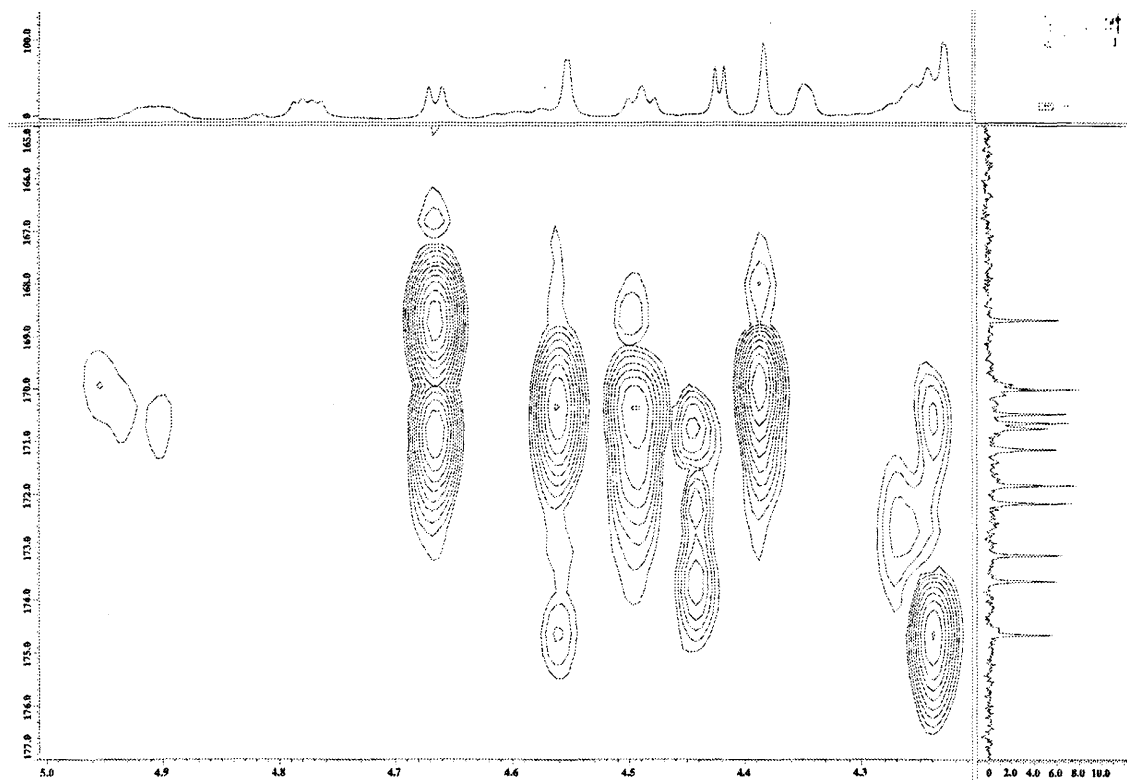


Fig. 2.6 ^1H - ^1H COSY and HMBC experiments of tripropeptin C in DMSO- d_6

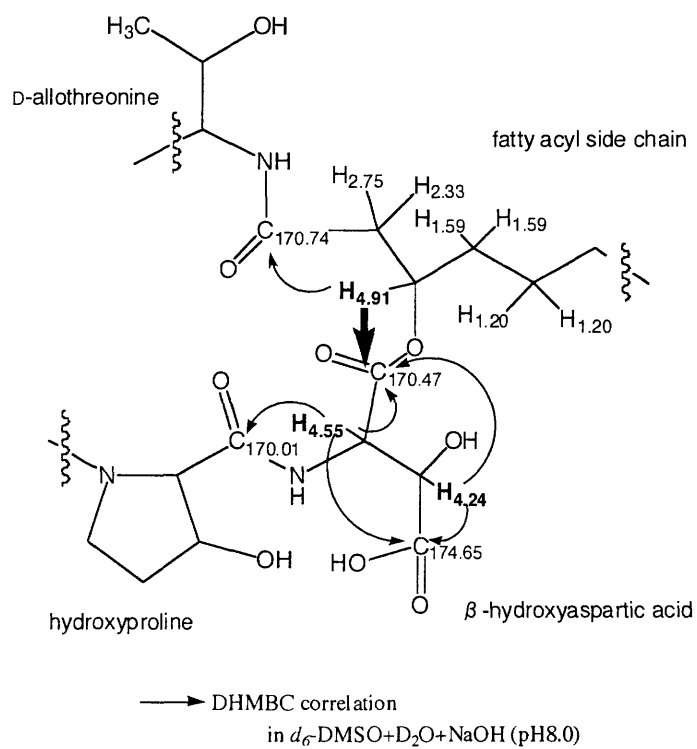


Fig.2.7 Planar structure of tripropeptin C

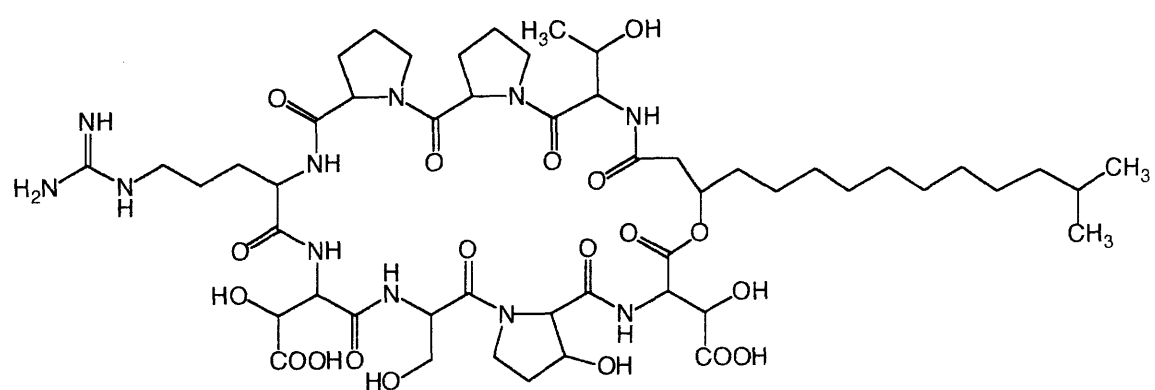


Table 2.3 ^{13}C and ^1H NMR data of tripropeptin C in $\text{DMSO-}d_6$: D_2O (10:1)+NaOH (pH 8.0)

position	type	$\delta \text{ C}^a$	$\delta \text{ H}^b$ (multiplicity, J (Hz))
1	>C=O	170.5	
2	>CH-N	55.3	4.62 (1H, s)
3	>CH-O	71.0	4.24 (1H, m)
4	>C=O	174.7	
5	>C=O	170.0	
6	>CH-N	67.5	4.39 (1H, s)
7	>CH-O	70.0	4.34 (1H, m)
8	-CH ₂ -	33.0	1.78 (1H, m), 1.87 (1H, m)
9	-CH ₂ N<	44.5	3.22 (1H, m), 3.43 (1H, m)
10	>C=O	170.6	
11	>CHNH-	52.7	4.49 (1H, m)
12	-CH ₂ O-	60.8	3.47 (1H, m), 3.63 (1H, m)
13	>C=O	171.1	
14	>CHNH-	58.0	4.42 (1H, m)
15	>CH-O	71.4	3.95 (1H, d, 2.0)
16	>C=O	173.6	
17	>C=O	171.8	
18	>CHNH-	52.3	4.57 (1H, m)
19	-CH ₂ -	29.2	1.56 (1H, m), 1.63 (1H, m)
20	-CH ₂ -	25.0	1.32 (2H, m)
21	-CH ₂ NH-	40.6	3.03 (2H, m)
22	-N=C(N-)N-	156.9	
23	>C=O	173.2	
24	>CH-N	60.4	4.77 (1H, m)
25	-CH ₂ -	32.2	2.06 (2H, m)
26	-CH ₂ -	23.0	1.70 (1H, m), 1.87 (1H, m)
27	-CH ₂ -N	47.5	3.31 (2H, m)
28	>C=O	172.2	
29	>CH-N	58.2	4.25 (1H, m)
30	-CH ₂ -	33.3	1.60 (2H, m)
31	-CH ₂ -	25.4	1.96 (2H, m)
32	-CH ₂ -N	47.7	3.65 (2H, m)
33	>C=O	168.7	
34	>CHNH-	56.3	4.67 (1H, d, 7.0)
35	>CH-O	67.2	3.87 (1H, m)
36	-CH ₃	18.8	0.94 (3H, d, 6.6)
37	>C=O	170.7	
38	-CH ₂ -	39.5	2.33 (1H, d, 12.0), 2.75 (1H, m)
39	>CH-O	73.4	4.91 (1H, m)
40	-CH ₂ -	33.3	1.60 (2H, m)
41	-CH ₂ -	24.0	1.20 (2H, m)
42	-CH ₂ -	29.1	1.20 (2H, m)
43	-CH ₂ -	29.1	1.20 (2H, m)
44	-CH ₂ -	29.1	1.20 (2H, m)
45	-CH ₂ -	29.1	1.20 (2H, m)
46	-CH ₂ -	29.1	1.20 (2H, m)
47	-CH ₂ -	27.2	1.20 (2H, m)
48	-CH ₂ -	38.9	1.09 (1H, m), 1.20 (1H, m)
49	>CH-	27.8	1.45 (1H, dq)
50	-CH ₃	22.5	0.79 (3H, d, 7.0)
51	-CH ₃	22.5	0.79 (3H, d, 7.0)

^a 125 MHz, chemical shift in ppm.

^b 500 MHz, chemical shift in ppm.

Table 2.4 NMR data of tripropeptins

position	δ C ^a (multiplicity)					
	TPPA	TPPB	TPPC	TPPD	TPPE	TPPZ
1	169.7 (s)	169.8 (s)	168.6 (s)	168.6 (s)	170.5(s)	170.2 (s)
2	53.0 (d)	54.9 (d)	54.8 (d)	54.8 (d)	57.6(d)	55.1 (d)
3	69.9 (d)	70.3 (d)	70.0 (d)	70.0 (d)	70.8(d)	70.6 (d)
4	172.7 (s)	172.6 (s)	171.8 (d)	171.9 (s)	172.9(d)	172.7 (d)
5	171.3 (s)	171.5 (s)	169.9 (s)	169.9 (s)	170.0(s)	171.5 (s)
6	66.4 (d)	67.2 (d)	68.8 (d)	68.8 (d)	67.0(d)	67.2 (d)
7	70.0 (d)	70.4 (d)	72.5 (d)	72.5 (d)	69.3(d)	70.8 (d)
8	32.4 (t)	31.8 (t)	32.3 (t)	32.3 (t)	32.6(t)	32.8 (t)
9	44.8 (t)	44.1 (t)	45.0 (t)	45.0 (t)	43.9(t)	44.1 (t)
10	168.8 (s)	168.4 (s)	167.9 (s)	167.9 (s)	170.2(s)	168.4 (s)
11	52.9 (d)	52.5 (d)	53.1 (d)	53.1 (d)	52.2(d)	52.5 (d)
12	60.5 (t)	60.1 (t)	61.3 (t)	61.3 (t)	60.6(t)	60.5 (t)
13	169.0 (s)	169.5 (s)	168.5 (s)	168.5 (s)	169.7(s)	169.9 (s)
14	56.1 (d)	57.3 (d)	56.3 (d)	56.3 (d)	54.9(d)	57.7 (d)
15	66.9 (d)	70.0 (d)	70.0 (d)	70.0 (d)	70.4(d)	69.4 (d)
16	172.9 (s)	174.3 (s)	172.9 (s)	172.9 (s)	174.0(s)	174.9 (s)
17	172.0 (s)	171.6 (s)	171.2 (s)	171.2 (s)	171.2(s)	170.2 (s)
18	51.8 (d)	52.1 (d)	51.7 (d)	51.7 (d)	52.0(d)	52.1 (d)
19	28.6 (t)	29.1 (t)	28.9 (t)	28.9 (t)	29.0(t)	29.0 (t)
20	24.6 (t)	25.2 (t)	24.7 (t)	24.7 (t)	24.7(t)	24.9 (t)
21	39.5 (t)	39.5 (t)	40.3 (t)	40.3 (t)	40.2(t)	40.4 (t)
22	156.7 (s)	156.6 (s)	156.9 (s)	156.9 (s)	156.8(s)	156.7 (s)
23	172.9 (s)	174.2 (s)	172.6 (s)	172.6 (s)	172.4(s)	174.3 (s)
24	58.0 (d)	59.9 (d)	60.6 (d)	60.6 (d)	59.8(d)	60.1 (d)
25	31.7 (t)	31.4 (t)	31.7 (t)	31.7 (t)	31.6(t)	31.9 (t)
26	22.3 (t)	22.2 (t)	22.2 (t)	22.2 (t)	22.7(t)	22.3 (t)
27	44.8 (t)	47.0 (t)	46.9 (t)	46.9 (t)	46.8(t)	47.1 (t)
28	172.2 (s)	172.9 (s)	172.0 (s)	172.0 (s)	171.3(s)	173.1 (s)
29	56.4 (d)	57.8 (d)	57.9 (d)	57.9 (d)	57.8(d)	57.9 (d)
30	27.5 (t)	28.8 (t)	29.0 (t)	28.4 (t)	32.9(t)	28.9 (t)
31	24.5 (t)	24.8 (t)	24.4 (t)	24.4 (t)	25.1(t)	24.7 (t)
32	47.0 (t)	47.3 (t)	47.3 (t)	47.3 (t)	47.2(t)	47.4 (t)
33	169.7 (s)	169.9 (s)	169.0 (s)	169.0 (s)	168.3(s)	170.4 (s)
34	54.8 (d)	56.0 (d)	56.0 (d)	56.0 (d)	55.9(d)	56.0 (d)
35	65.9 (d)	65.8 (d)	67.2 (d)	67.2 (d)	65.7(d)	65.9 (d)
36	18.9 (q)	18.6 (q)	19.0 (q)	19.0 (q)	18.6(q)	18.6 (q)
37	169.7 (s)	170.3 (s)	169.5 (s)	169.6 (s)	169.4(s)	170.5 (s)
38	38.6 (t)	38.1 (t)	40.1 (t)	39.5 (t)	39.0(t)	39.5 (t)
39	73.0 (d)	73.1 (d)	72.8 (d)	72.8 (d)	72.8(d)	73.1 (d)
40	33.6 (t)	33.0 (t)	33.7 (t)	33.7 (t)	32.9(t)	33.0 (t)
41	24.0 (t)	23.6 (t)	24.1 (t)	24.1 (t)	23.5(t)	23.4 (t)
42	29.0 (t)#	29.1 (t)#	29.1 (t)#	29.1 (t)#	28.7(t)#	29.2 (t)#
43	29.0 (t)#	29.2 (t)#	29.1 (t)#	29.1 (t)#	28.9(t)#	29.3 (t)#
44	29.1 (t)#	29.4 (t)#	29.1 (t)#	29.0 (t)#	28.9(t)#	26.8 (t)
45	24.7 (t)	29.2 (t)#	29.1 (t)#	28.7 (t)#	29.1(t)#	38.7 (t)
46	38.6 (t)	26.9 (t)	29.1 (t)#	29.2 (t)#	29.3(t)#	27.6 (d)
47	26.9 (d)	38.1 (t)	26.8 (t)	29.3 (t)#	29.0(t)#	22.7 (q)
48	22.6 (q)	27.5 (d)	38.5 (t)	26.8 (t)	29.0(t)#	22.7 (q)
49	22.6 (q)	22.7 (q)	27.4 (d)	38.5 (t)	26.8(t)	-
50	-	22.7 (q)	22.5 (q)	27.4 (d)	38.4(t)	-
51	-	-	22.5 (q)	22.5 (q)	27.4(d)	-
52	-	-	-	22.5 (q)	22.5(q)	-
53	-	-	-	-	22.5(q)	-

^a 125 MHz, chemical shift in ppm.

undistinguishable

2.3 構成アミノ酸の立体化学

構成アミノ酸の立体化学は、ヒドロキシプロリンを除き、マーフィー法で決定した⁴⁰⁾。すなわち、単離精製したトリプロペプチン C の構成アミノ酸および標品アミノ酸を塩基性条件下、マーフィー試薬 1-フロロ-2,4-ジニトロフェニル-5-L-アラニンアミド (L-FDAA) と縮合し、得られたアミノ酸誘導体ジアステレオマー群を HPLC で分析した。構成アミノ酸および標品の各アミノ酸誘導体の保持時間を比較した結果、構成アミノ酸は、L-アルギニン、L-セリン、D-アロスレオニン、L-プロリン、D-プロリン、スレオ- β -ヒドロキシ-L-アスパラギン酸、スレオ- β -ヒドロキシ-D-アスパラギン酸であることが判明した。

2.4 ヒドロキシプロリンの立体化学

3-ヒドロキシプロリンは 2 位および 3 位に不斉炭素があるため、4 種類の光学異性体が存在する。その 4 種類の標品がなかったため、3-ヒドロキシプロリンの立体化学をマーフィー法で決定することは不可能であった。そこで、トリプロペプチン C の酸加水分解物からヒドロキシプロリンを精製単離し、得られた 3-ヒドロキシプロリンの化学的特性の文献値比較により立体化学を明らかにすることにした。

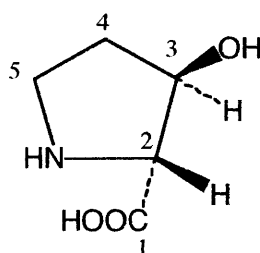
ヒドロキシプロリンの精製は、以下のように行った。すなわち、トリプロペプチン C の酸加水分解物 40 mg を、アンバーライト CG50I カラムクロマトグラフィーおよびセルロースカラムクロマトグラフィーにより精製し、1.3 mg のヒドロキシプロリンを得た。質量分析および ^1H NMR スペクトルからこれが 3-ヒドロキシプロリンであることを確認し、物性を文献値と比較した。

単離したヒドロキシプロリンの ^1H NMR スペクトルは、2 位および 3 位のプロトンの結合定数が 1.60 Hz であった。文献値によると 2 位および 3 位のプロトンの結合定数はトランス配置では $J_{2,3}=1.2$ Hz、一方シス配置 $J_{2,3}=4.2$ Hz であったことから、水酸基の立体がトランスであることがわかった (Table 2.5)。また CD スペクトルよりプラスのコットン効果が観測され、文献値と比較して L-トランス-3-ヒドロキシプロリンであると決定した [実測値 $[\theta]_{240} +80$, $[\theta]_{220} +1980$, $[\theta]_{210} +2980$ (c 0.033, 0.5M HCl)、文献値 $[\theta]_{240} 0$, $[\theta]_{220} +2880$, $[\theta]_{210} +5380$ (c 0.054, 0.5M HCl)] (Fig.2.8)⁴¹⁾。

Table 2.5 NMR data of hydroxyproline derived from tripropeptin C

position	δ C ^a	δ H ^b (multiplicity, <i>J</i> (Hz))
1	172.0	
2	69.3	4.14(1H, d, 1.60)
3	74.5	4.72(1H, m)
4	32.9	2.06(2H, m)
5	45.0	3.52(1H, m), 3.63(1H, m)

Fig.2.8 L-*Trans*-3-hydroxyproline



2.5 トリプロペプチン C の脂肪側鎖の立体化学

トリプロペプチン C の脂肪側鎖である 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸の立体化学の決定は、3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸をトリプロペプチン C の酸加水分解物から単離し、この比旋光度を文献値と比較することで決定した。

3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸は、以下のように精製した。すなわちトリプロペプチン C の酸加水分解物 40 mg を水と酢酸エチルにて分配し、酢酸エチル層を濃縮乾固後にシリカゲルカラムにかけて、4.0 mg の 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸を単離した。得られた脂肪酸の質量分析および ^1H NMR スペクトルから、これが 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸であることを確認し、物性を文献値と比較した。すなわち、得られた脂肪酸の比旋光度は、 $[\alpha]_D^{24} -7.7^\circ$ (C 0.13, CHCl_3) であり、文献値 $[\alpha]_D^{20} -12.7^\circ$ (C 0.14, CDCl_3) より、トリプロペプチン C より得られた脂肪酸は (3*R*)-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸であると決定した (Fig.2.9, Table 2.5) ^{42, 43)}。

Fig.2.9 Absolute structure of 13-Methyl-3-hydroxy-tetradecanoic acid

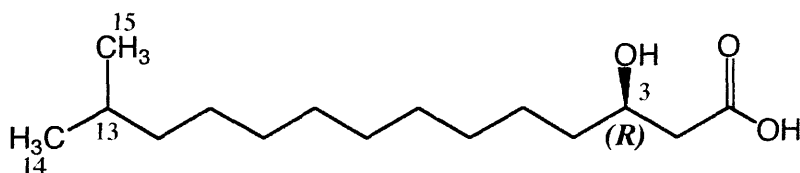


Table 2.5 NMR data of 13-Methyl-3-hydroxy-tetradecanoic acid in CDCl_3

δ H (multiplicity, <i>J</i> (Hz))
0.78 (6H, d, <i>J</i> =6.6 Hz)
1.04~1.52 (19H, m)
2.31 (1H, dd, <i>J</i> =16.6 and 9.1 Hz 2- <i>H_a</i>)
2.40 (1H, dd, <i>J</i> =16.6 and 3.2 Hz 2- <i>H_b</i>)
3.96 (1H, m, 3-H)

2.6 プロリンの立体化学

2.3 項で トリプロペプチン C の構成アミノ酸の絶対構造を明らかにし、2 分子ずつ存在するプロリンおよびヒドロキシアスパラギン酸は、D および L 体が 1 分子ずつであることが示された。トリプロペプチン C の立体化学を明らかにする上で、これらの識別が大きな課題となった。特にプロリンの識別は、立体の異なるプロリンがペプチド結合を介して隣接しているため、分光光学的手法での解析もしくは酸加水分解による適当な断片の取得が困難であった。そこで、液体アンモニア中でペプチド系化合物に金属ナトリウムを作用させることで、選択的にプロリンの N 末端を切断することが知られているバーチ還元^{44,45)}により適切な断片を取得し、その構成アミノ酸を分析することでプロリンの識別を試みた。トリプロペプチン C 37.0 mg (32.1 μ mol) をバーチ還元し、得られた残査をニンヒドリン呈色試験を指標に Dowex および HP-20 カラムクロマトグラフィーで精製し、目的の断片 2.17 mg (2.96 μ mol) を単離した (Fig.2.10 上)。

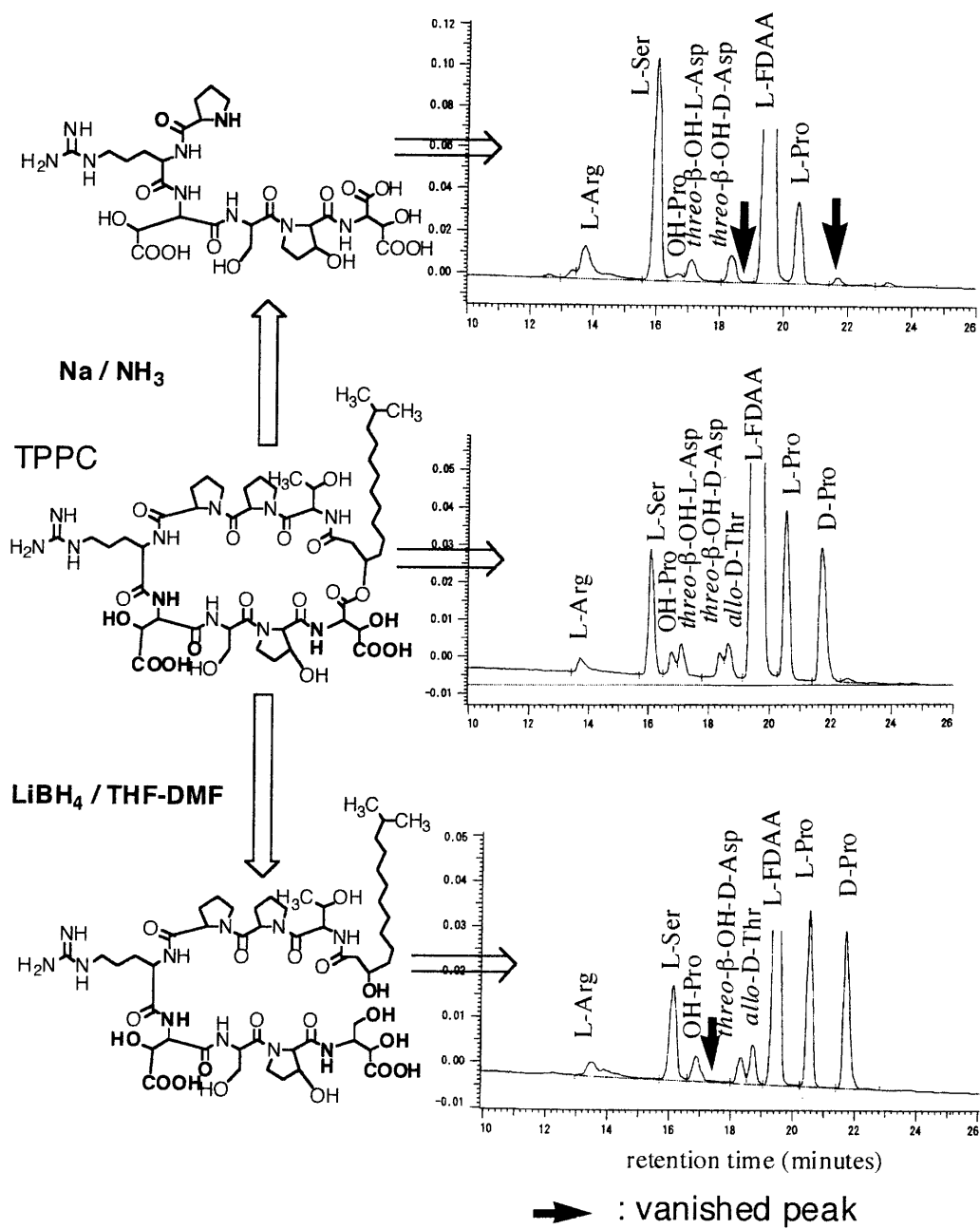
得られた断片をマーフィー法により分析したところ、本断片はトリプロペプチン C の分析結果と比較し、D-アロ-スレオニンおよび D-プロリンのピークが消失しており、このことからアルギニンとアミド結合しているプロリンが L-プロリンであることを明らかにした (Fig.2.10 上)。

2.7 ヒドロキシアスパラギン酸の立体化学

トリプロペプチン C に 2 分子含まれるヒドロキシアスパラギン酸は、プロリンのように隣接しておらず、一方のヒドロキシアスパラギン酸はラク톤を形成している。そのため、リチウムボロハイドライドによりラク톤を選択的に還元し、この誘導体の構成アミノ酸をマーフィー法で分析することで識別が可能であると考えた。

トリプロペプチン C 10 mg (8.67 μ mol) を溶解したジメチルホルムアミド-テトラヒドロフラン溶液に 2 mg のリチウムボロハイドライドを添加し、還流下 4 時間反応した。室温まで冷却し、塩酸にて得られた反応液を中和した後に減圧乾固した。得られた反応物を LH-20 カラムクロマトグラフィーおよび HPLC で精製し、7.1 mg (6.14 μ mol) のトリプロペプチン C のラク톤還元体を単離した (Fig.2.10 下)。この還元体をマーフィー法により分析したところ、構成アミノ酸にスレオ- β -ヒドロキシ-L-アスパラギン酸を含まないことが明らかとなり、このことからラク톤を形成するヒドロキシアスパラギン酸がスレオ- β -ヒドロキシ-L-アスパラギン酸であることが明らかとなった (Fig.2.10 下)。

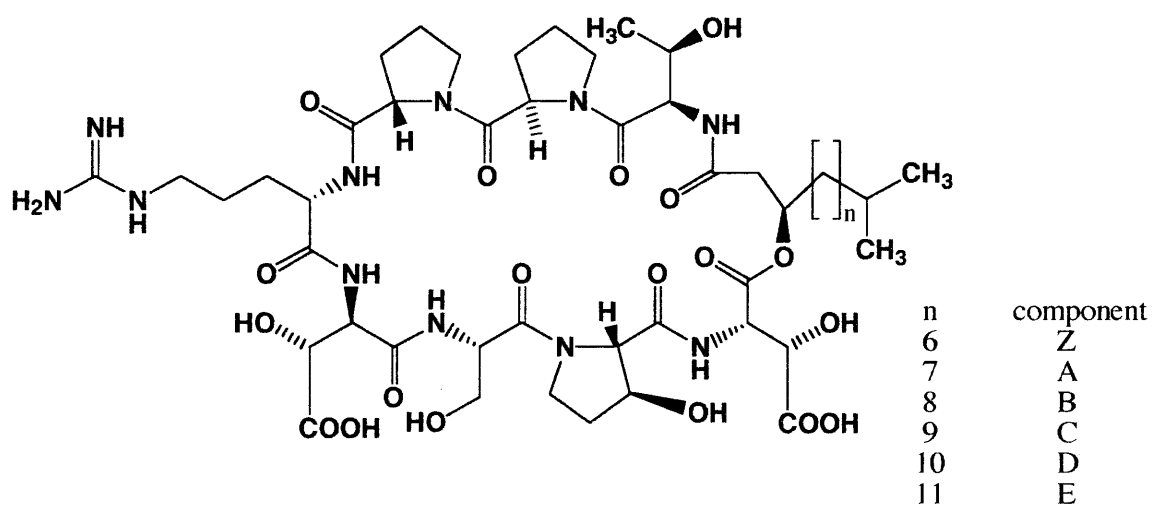
Fig.2.10 Amino acid analysis on tripropeptin C and its fragments



2.8 トリプロペプチン類の絶対構造

2.1 から 2.6 項までの結果より、トリプロペプチン C の絶対構造を決定した。トリプロペプチン A, B, D, E および Z の絶対構造はマーフィー法による構成アミノ酸の分析結果がトリプロペプチン C と一致しており、また NMR のケミカルシフトおよび比旋光度がトリプロペプチン C と近似値を示したことから、トリプロペプチン類の絶対構造は Fig.2.11 のようであると決定した。

Fig.2.11 Absolute structure of tripropeptins



2.9 要約および考察

第2章では、土壌細菌 *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 株の生産する抗菌物質トリプロペプチン A, B, C, D, E および Z の物理化学的特性および化学構造の決定について述べた。トリプロペプチン類は、各成分とも類似した物理化学的特性を示し、分子量が 14 マスユニット、分子式で $(\text{CH}_2)_n$ ずつ異なる化合物群であった。各成分の NMR スペクトルは類似しており、呈色試験では各成分ともライドンスミス試薬に陽性であることからペプチド系化合物であること、また坂口反応試験で陽性であったことからグアニジル基の存在が示唆された。IR スペクトルから、トリプロペプチン類の構造中にペプチド結合およびラク톤の存在が示唆された。これら情報をもとに、さらに各種 NMR スペクトル解析より、トリプロペプチン類の平面構造を明らかにした。トリプロペプチン類は共通した 8 アミノ酸残基よりなる環状ペプチド骨格を有し、いずれも末端の分岐した脂肪酸を構成要素としていた。成分間で異なるのは脂肪側鎖の長さのみであった。活性成分の平面構造を決定し、分子量および化学構造をもとに検索した結果、本化合物群が新規物質であることを確認した。本化合物群がペプチド系化合物であり、ヒドロキシプロリンを含めプロリンが 3 分子あることから、これらをトリプロペプチン類と命名した。

またトリプロペプチン類の絶対構造は以下のように決定した。すなわち、ヒドロキシプロリンを除く構成アミノ酸の絶対構造はマーフィー法により決定し、ヒドロキシプロリンおよび脂肪側鎖の立体化学は、それぞれの物性値の文献値比較により決定した。また、立体の異なる 2 分子のプロリンおよびヒドロキシアスパラギン酸の識別は、バーチ還元およびリチウムボロハイドライドによる選択的な還元法により、適当な断片および誘導体を合成し、それぞれマーフィー法で分析を行うことで識別を達成し、これらの結果からトリプロペプチン類の絶対構造が明らかとなった。

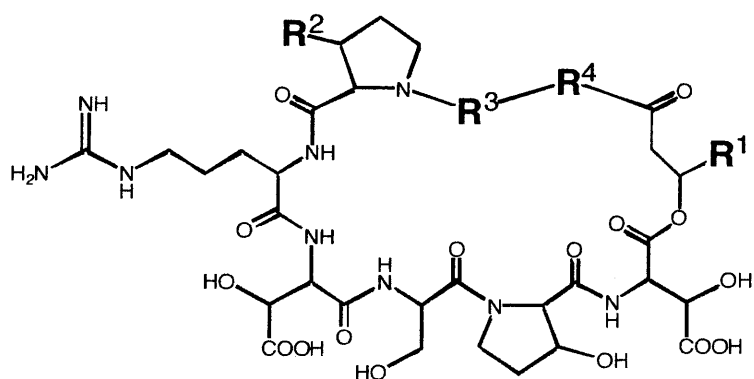
トリプロペプチン類の構造上の特徴は、グアニジル基と二つのカルボン酸を有する両性化合物であることと、異常アミノ酸および極性アミノ酸が非常に多いことである。異常アミノ酸を構成要素とするペプチドは、プロテアーゼなどに抵抗性を示し、興味深い生理活性を持つことが多い。さらにトリプロペプチン類の構造は既存の抗菌薬に類似したものがなく、その作用機序にも興味を持たれる。

なお、トリプロペプチン類に構造の類似したリポペプチド系化合物に、プラスバシン類^[46,47]とエンペドペプチン^[48,49]が知られている (Fig.2.12)。プラスバシン類は *Pseudomonas* 属細菌の代謝産物で、プロリンの水酸基の有無および脂肪側鎖の違いにより 8 成分からなる化合物群である。トリプロペプチン類との構造的な相違点は、環状ペプチド中の D-Pro-L-Pro の部分が D-Ala-L-Pro もしくは D-Ala-L-OHPro

となっている点、構成アミノ酸の立体が異なる点および脂肪側鎖の末端が分岐している成分と分岐していない成分がある点である。また、エンペドペプチンは *Empedobacter* 属細菌が生産する化合物で、構成アミノ酸はトリプロペプチン類と一つ違うのみであるが、アミノ酸の配置が大きく異なり、脂肪側鎖も直鎖である。トリプロペプチン類、プラスバシン類およびエンペドペプチンの構造上の共通点は、環状ペプチド骨格と脂肪側鎖を構成要素として含むことであり、特に構成アミノ酸にアルギニンおよび2分子のヒドロキシアスパラギン酸を含有していることが大きな特徴である。これらはいずれもグラム陽性細菌に強い抗菌力を示し、マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおいても優れた治療効果を示している。プラスバシン類は1992年に、エンペドペプチンは1984年に報告されており、当時は薬剤耐性黄色ブドウ球菌の治療薬としてバンコマイシンが不動の地位を占めていたため、抗MRSA薬として開発を断念した可能性がある。なお、プラスバシン類は1996年に塩野義製薬によって養殖ブリ等に溶血性連鎖球菌症を惹き起こす起因菌であるグラム陽性細菌 *Enterococcus seriolicida* に対する水産用抗菌剤として特許が出願されている⁵⁰⁾。またプラスバシン類は詳細な作用点は未だ不明であるが、細胞壁合成および脂質中間体生成を阻害し、バンコマイシンとは異なる作用機序であることが報告されている⁵¹⁾。

トリプロペプチン類、プラスバシン類およびエンペドペプチンは、これまでの抗菌薬にない骨格構造を有しており、作用機序および新薬リード化合物として興味を持たれる。

Fig.2.12 Structures of tripropeptins and their related compounds



TRIPROPEPTINS

A	$R^1 = (CH_2)_7CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
B	$R^1 = (CH_2)_8CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
C	$R^1 = (CH_2)_9CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
D	$R^1 = (CH_2)_{10}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
E	$R^1 = (CH_2)_{11}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
Z	$R^1 = (CH_2)_6CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$

PLUSBACINS

A ₁	$R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
A ₂	$R^1 = (CH_2)_9CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
A ₃	$R^1 = (CH_2)_{10}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
A ₄	$R^1 = (CH_2)_{12}CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₁	$R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₂	$R^1 = (CH_2)_9CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₃	$R^1 = (CH_2)_{10}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₄	$R^1 = (CH_2)_{12}CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$

EMPEDOPEPTIN

$R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ser$	$R^4 = Pro$
-------------------------	-----------	-------------	-------------

第3章 トリプロペプチン類の生物活性

本章では、新規リポペプチド系抗生物質トリプロペプチン類の抗菌活性、細胞毒性ならびに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について述べる。

3.1 トリプロペプチン類の抗菌活性および細胞毒性

トリプロペプチン類の各種細菌に対する抗菌力を Table 3.1 に示した。トリプロペプチン類はグラム陽性細菌に強い抗菌活性を示すが、グラム陰性細菌・抗酸菌・真菌には抗菌力を示さなかった。トリプロペプチン類は、構造上の唯一の相違点である脂肪側鎖の長さによって抗菌活性が大きく異なり、最も活性の強いものは脂肪側鎖の2番目に長い D 成分であった。脂肪側鎖の長い C, D および E 成分は現在問題となっている薬剤耐性菌である MRSA, VRE およびペニシリン耐性腸球菌 (PRSP) に対し強い抗菌力を示した (Table 3.1)。2002 年に臨床分離されたメチシリン感受性および耐性黄色ブドウ球菌各 10 株に対するトリプロペプチン C, D および E の抗菌力は、バンコマイシンを含む既存抗菌薬よりも優れていた (Table 3.2)。トリプロペプチン類は、MRSA に対し優れた抗菌力を示し、さらに VRSA と同じバンコマイシン耐性遺伝子群 *vanA* 群を持つ VRE に対しても感受性株と同様に抗菌活性を示し交差耐性が認められなかったことから、目的どおり VRSA にも有効であると考えられた。

また、トリプロペプチン類のマウス白血病細胞 L-1210 に対する細胞毒性 (IC_{50}) はすべて $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であり (Table 3.3)、トリプロペプチン類が選択毒性の優れた化合物群であることがわかった。

Table 3.1 Antimicrobial activity of tripropeptins

Test organisms	MIC (µg/ml)					
	TPPZ	TPPA	TPPB	TPPC	TPPD	TPPE
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	12.5	1.56	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>S. aureus</i> Smith	6.25	0.78	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>S. aureus</i> MS9610	25	6.25	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>S. aureus</i> No.5 (MRSA)	N.T.	N.T.	1.56	1.56	1.56	0.78
<i>S. aureus</i> No.17 (MRSA)	N.T.	N.T.	1.56	1.56	1.56	0.78
<i>S. aureus</i> MS16526 (MRSA)	25	3.13	0.78	0.78	1.56	0.78
<i>S. aureus</i> TY-04282 (MRSA)	25	6.25	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TY-5708 (PRSP)	25	6.25	1.56	0.78	0.78	0.78
<i>S. pneumoniae</i> TY-5745 (PRSP) ^b	12.5	3.13	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>S. pneumoniae</i> TY-5840 ^b	25	6.25	1.56	0.78	0.78	1.56
<i>S. pyogenes</i> TY-5727 ^b	>50	25	6.25	0.78	1.56	1.56
<i>S. pyogenes</i> TY-5740 ^b	3.13	1.56	0.78	0.78	0.39	0.78
<i>S. pyogenes</i> TY-5914 ^b	3.13	1.56	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>S. pyogenes</i> MH613 ^b	6.25	1.56	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>S. pyogenes</i> MH624 ^b	6.25	1.56	0.39	0.39	0.39	0.78
<i>S. pyogenes</i> MH630 ^b	6.25	1.56	0.39	0.39	0.39	0.39
<i>S. pyogenes</i> MH635 ^b	12.5	3.13	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>S. pyogenes</i> MH759 ^b	6.25	3.13	0.78	0.39	0.20	0.78
<i>S. pyogenes</i> MH771 ^b	3.13	1.56	0.39	0.39	<0.20	0.78
<i>S. pyogenes</i> Cook (MS-1) ^b	12.5	3.13	0.78	0.78	<0.20	0.78
<i>S. hemolyticus</i> group A St-92TC ^b	6.25	1.56	1.56	0.39	0.78	0.78
<i>S. hemolyticus</i> group A St-107TC ^b	3.13	1.56	0.78	0.39	0.39	0.78
<i>S. hemolyticus</i> group A St-108TC ^b	12.5	3.13	1.56	0.39	0.39	0.78
<i>S. hemolyticus</i> group A St-56.188SM ^b	3.13	0.78	0.39	0.39	<0.20	<0.20
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^b	100	50	25	6.25	3.13	3.13
<i>Enterococcus faecium</i> JCM 5804 ^b	>100	50	25	12.5	3.13	6.25
<i>E. faecalis</i> NCTC 12201 (VRE, vanA) ^b	100	50	12.5	3.13	1.56	1.56
<i>E. faecium</i> NCTC 12202 (VRE, vanA) ^b	>100	50	25	6.25	3.13	3.13
<i>E. faecalis</i> NCTC12203 (VRE, vanA) ^b	>100	50	50	6.25	1.56	3.13
<i>E. faecium</i> NCTC 12204 (VRE, vanA) ^b	>100	50	25	6.25	3.13	3.13
<i>Micrococcus luteus</i> IFO3333	<0.39	<0.39	<0.20	<0.20	<0.20	0.39
<i>Bacillus subtilis</i> PCI219	25	3.13	0.78	0.78	0.78	0.78
<i>B. cereus</i> ATCC10702	N.T.	N.T.	6.25	1.56	1.56	3.13
<i>Corynebacterium bovis</i> 1810	6.25	1.56	0.20	<0.20	0.20	<0.20
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	>50	>50	>100	>50	>50	>50
<i>Shigella dysenteriae</i> JS11910	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Salmonella enteritidis</i> 1891	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Serratia marcescens</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A3	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI602	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607 ^a	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Candida albicans</i> 3147	>50	>50	>100	>50	>50	>50

Mueller Hinton agar (Difco), 37. C 18 hours, except ^a and ^b.

^a: 37. C 42 hours.

^b: Mueller Hinton agar(Difco) + 5% Sheep blood, 37. C 18 hours

Table 3.2 Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*

test sample (Number of strains)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	MSSA (10)			MRSA (10)		
	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
tricropeptin B	0.78-3.13	1.56	3.13	0.39-3.13	3.13	3.13
tricropeptin C	0.39-0.78	0.78	0.78	0.39-1.56	0.78	1.56
tricropeptin D	0.39-0.78	0.78	0.78	0.39-0.78	0.78	0.78
tricropeptin E	0.39-0.78	0.78	0.78	0.39-1.56	0.78	1.56
vancomycin	0.78	0.78	0.78	0.39-1.56	1.56	1.56
teicoplanin	0.39-0.78	0.39	0.78	0.20-1.56	0.78	1.56
meropenem	0.05-0.10	0.10	0.10	6.25-50	12.5	50
levofloxacin	0.05-0.39	0.10	0.20	3.13->100	25	>100
ofloxacin	0.20-0.78	0.39	0.39	6.25->100	100	>100
ampicillin	0.10-3.13	0.78	3.13	6.25-50	25	50
arbekacin	0.20-0.78	0.39	0.78	0.20-0.39	0.39	0.39
erythromycin	0.10->100	0.20	12.5	>100	>100	>100
tetracycline	0.20	0.20	0.20	1.56-50	50	50
fosfomycin	3.13-50	6.25	25	>100	>100	>100

Mueller Hinton agar (Difco), 37°C, 18 hours

Table 3.3 Cytotoxicity of tripropeptins

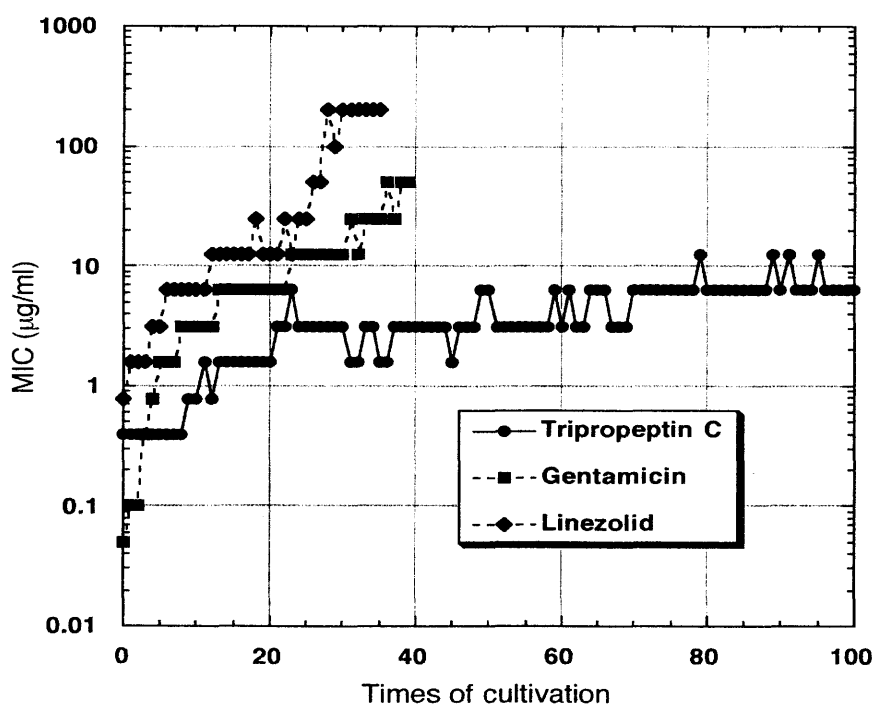
test cell	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)*					
	TPPA	TPPB	TPPC	TPPD	TPPE	TPPZ
L-1210	>100	>100	>100	>100	>100	>100

* RPMI medium, 37°C, 72 hours, MTT assay

3.2 トリプロペプチン C 耐性株の出現頻度試験

創薬という視点のもとで、化合物に対する耐性菌の出現率というのは重要な因子である。そこで黄色ブドウ球菌スミス株に対し、*in vitro* で液体希釈法を用いて化合物の暴露を繰り返して耐性菌の出現頻度を試験したところ、既存抗菌薬であるゲンタミシン⁵²⁾ およびリネゾリド⁵³⁾ は 40 回の暴露でそれぞれ 50 および 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 耐性株が得られたのに対し、トリプロペプチン C は 100 回暴露を行っても親株の 16 倍耐性の低感受性菌 (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 耐性) が得られたのみであった (Fig.3.1)。この結果からトリプロペプチン C 耐性株の出現頻度は、一般的な薬剤の出現頻度である 10^{-7} よりも低いことが示唆された。

Fig.3.1 Drug-resistance acquisition of *S. aureus* Smith



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

トリプロペプチン類は哺乳動物細胞に対して、細胞毒性を示さないことを 3.1 項で述べた。そこで、さらに高次の安全性試験としてトリプロペプチン類のマウスに対する急性毒性並びに亜急性毒性試験を行った。

急性毒性試験は、マウス（ICR 4 週齢、♀）に、トリプロペプチン A, C および D を、300～18.75 mg/kg の濃度で静脈内投与し、投与 14 日後まで経過を観察した。その結果、経過および投与 14 日後の解剖所見で異常が認められなかった。したがってトリプロペプチン A, C および D の致死量は 300 mg/kg 以上であった。

亜急性毒性試験はマウス（ICR 4 週齢、♀）に、0 日から 13 日まで計 14 日間、トリプロペプチン C を 100 mg/kg/day で静脈内投与し、対照群と投与群の体重変遷 (Fig.3.2 A)、血球数 (Fig.3.2 B, C, D) および臓器重量 (Fig.3.3) を測定した。その結果、体重変遷、血球数および臓器重量のいずれにも異常は認められなかった。

Fig.3.2 Effect of tripropeptin C on body weight and number of blood cells in mice

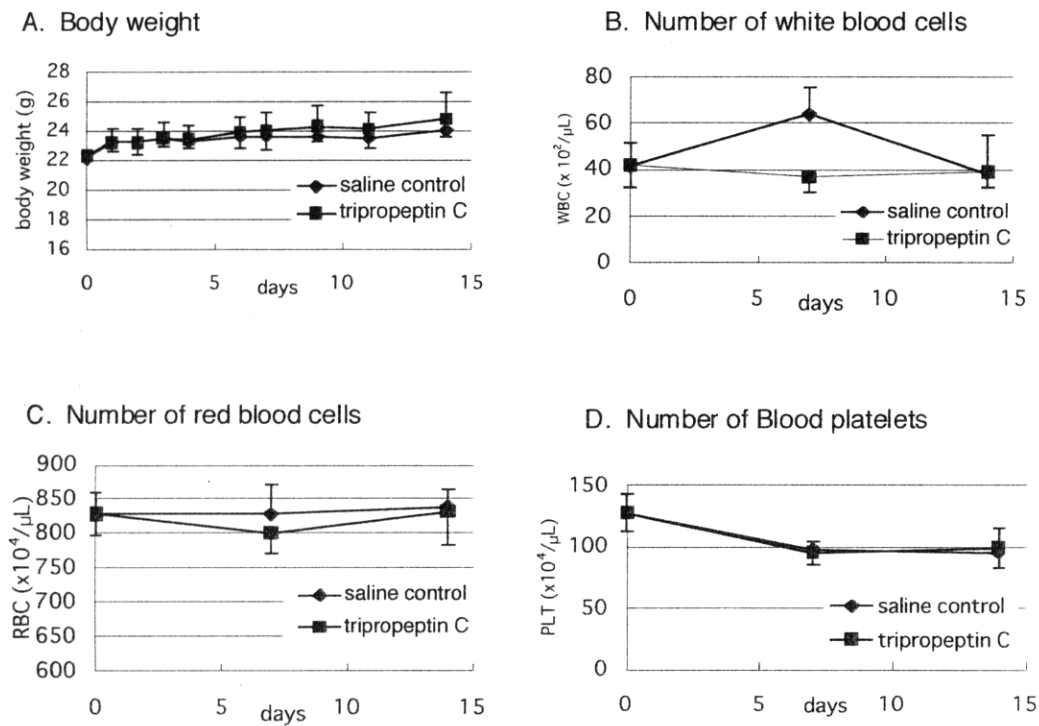
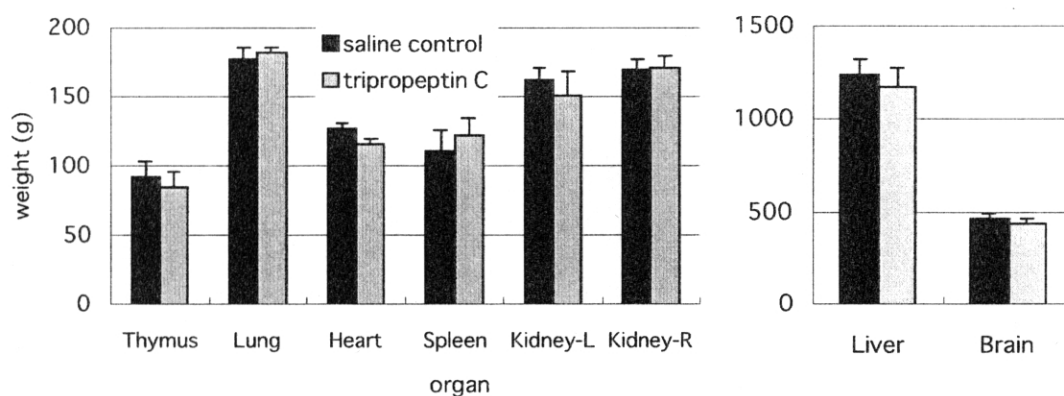


Fig.3.3 Effect of tripropeptin C on organ weight in mice



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

トリプロペプチン類は、グラム陽性菌に対し既存薬よりも強い抗菌活性を示し、さらにマウスに急性毒性および亜急性毒性を示さなかったことから、動物モデルにおいて優れた治療効果が期待された。そこでマウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおいてトリプロペプチン A, C および D の治療効果を検討したところ、トリプロペプチン A, C および D は、濃度依存的に優れた治療効果を示した (Fig.3.4)。トリプロペプチン類においては、抗菌力の弱いトリプロペプチン A が最も治療効果が高く、一方、抗菌力の弱いトリプロペプチン D が最も治療効果が弱く、抗菌力と治療効果が一致しなかった (Table 3.4)。

Fig.3.4 Therapeutic effect of tripropeptins in mice septicemia model

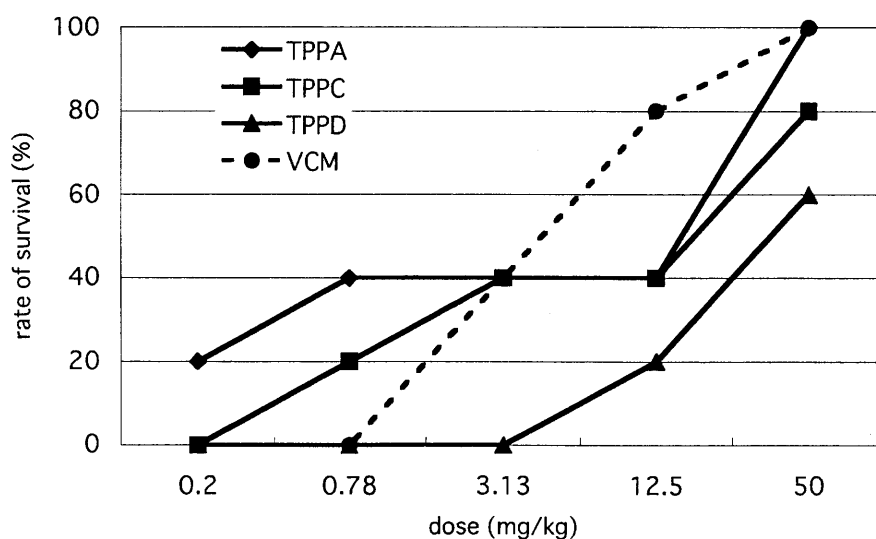


Table 3.4 Antimicrobial activity against infected pathogen and therapeutic effect of tripropeptins in mice septicemia model

	TPPA	TPPC	TPPD	VCM
MIC ($\mu\text{g/ml}$)	6.3	1.6	1.6	0.8
ED ₅₀ (mg/kg)	10.5	10.7	33.0	4.8

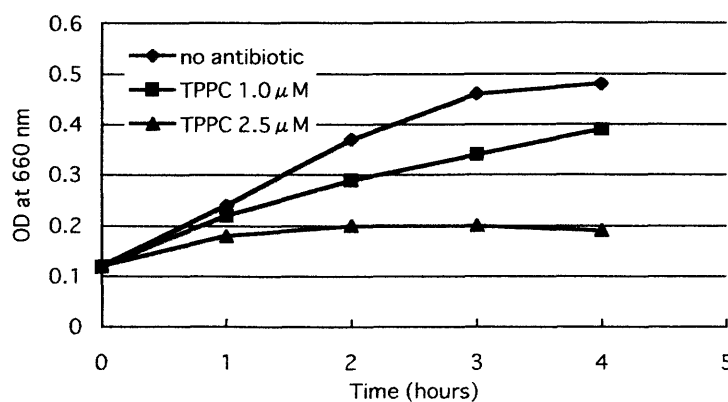
トリプロペプチン類の生物活性を評価する過程で、二つの興味深い知見を得た。すなわち、トリプロペプチン耐性菌の出現率が低いことおよびマウスの全身感染モデルでの治療効果と抗菌力が一致しなかった点である。前者は、トリプロペプチン類の作用機序に、後者はトリプロペプチン類の体内動態にその要因があると考えた。

まずトリプロペプチン耐性菌の出現率が低いことが、トリプロペプチン類の作用機序に起因するのではないかと考え、トリプロペプチンの作用機序の解析を行った。なお、Table 3.1 に示したように、トリプロペプチン類各成分の抗菌スペクトラムは平行していたため、作用機序は同一であると考え、作用機序は主成分であるトリプロペプチン C を用いて検討した。

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

トリプロペプチン C の作用機序解析をするにあたり、まずトリプロペプチン C の黄色ブドウ球菌に対する増殖におよぼす影響を検討した。すなわち 0, 1.0 および 2.5 μM のトリプロペプチン C を添加して、黄色ブドウ球菌スミス株を 37 $^{\circ}\text{C}$ で液体震盪培養し、経時的に濁度を測定したところ、黄色ブドウ球菌スミス株のダブリングタイムは約 1 時間で、2.5 μM のトリプロペプチン C により黄色ブドウ球菌スミス株の増殖はほぼ阻害された (Fig.3.5)。同様に、静菌的な作用が知られている蛋白合成阻害剤のクロラムフェニコールは 10 μM で黄色ブドウ球菌スミス株の増殖をほぼ阻害した (data not shown)。

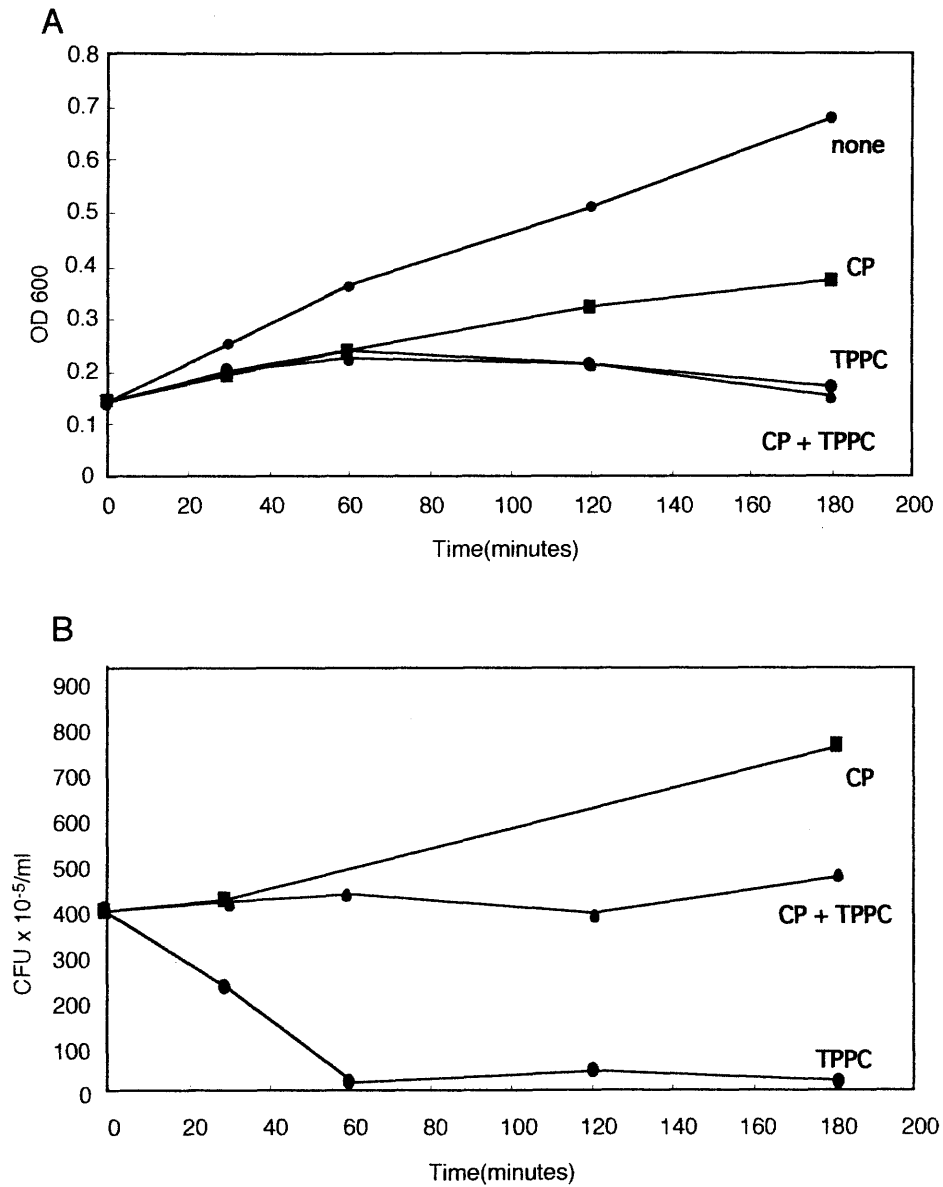
Fig.3.5 Effect of tripropeptin C on growth of *S. aureus* Smith



次に、トリプロペプチン C が増殖の抑制されている黄色ブドウ球菌スミス株に対して殺菌力を示すか検討した。すなわち、10 μ M のクロラムフェニコールを事前に処理することで黄色ブドウ球菌スミス株の増殖を抑制し、10 分後に 2.5 μ M のトリプロペプチン C を添加して培養を行い、経時的に培養液の濁度および黄色ブドウ球菌スミス株の生菌数 (CFU) を測定した。

その結果、トリプロペプチン C もしくはクロラムフェニコールを単独に加えて培養すると、トリプロペプチン C の添加により濁度はやや低下し、またクロラムフェニコールの添加では濁度はわずかに上昇が見られ、いずれも無処理のものに比べて菌の増殖は抑制された。クロラムフェニコール処理の 10 分後にトリプロペプチン C を添加した培養液の濁度は、トリプロペプチン C を単独で処理したときと同様の経過を示した (Fig.3.6 A)。一方、このときの黄色ブドウ球菌スミス株の生菌数は以下のものであった。すなわち、クロラムフェニコールを処理して培養したとき黄色ブドウ球菌スミス株の生菌数は、180 分間で添加時の 2 倍に増殖したが、上述したように本菌のダブルリングタイムは約 60 分であるので、クロラムフェニコール処理により増殖が抑制された。またトリプロペプチン C を処理して培養した結果、60 分後に菌は死滅し、その後増殖は認められなかった。しかしながら、興味深いことにクロラムフェニコールを処理 10 分後にトリプロペプチン C を添加した培養液では生菌数は 180 分まではほぼ一定であった (Fig.3.6 B)。これはクロラムフェニコール処理により増殖の抑制されている黄色ブドウ球菌スミス株に対してトリプロペプチン C が殺菌力を発揮できないことを示しており、トリプロペプチン C は増殖している菌に作用することが示唆された。なお、図中の数値は 3 連の平均値を示した。

Fig.3.6 Effect of tripropeptin C and/or chloramphenicol on viability of *Staphylococcus aureus*



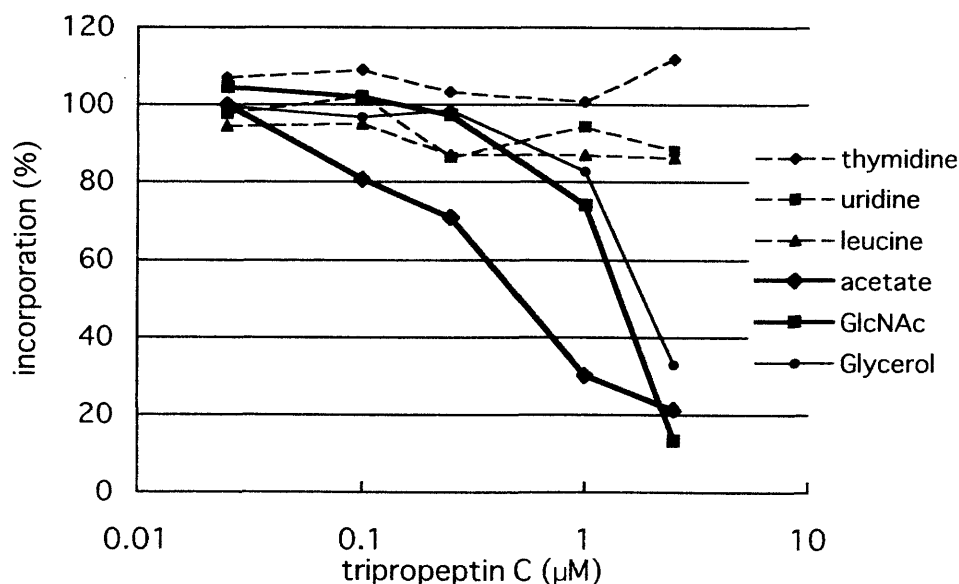
Chloramphenicol was added 10 minutes prior to tripropeptin C addition.
Concentrations of tripropeptin C and chloramphenicol are 2.5 μ M and 10 μ M, respectively..

Abbreviations: CP, chloramphenicol ; TPPC, tripropeptin C

3.6 トリプロペプチン C の高分子合成阻害様式

3.5 項でトリプロペプチン C は増殖中の菌に特異的に殺菌力を示すことを明らかにした。次にトリプロペプチン C の黄色ブドウ球菌スミス株に対する標的を明らかにするため、トリプロペプチン C の DNA, RNA, 蛋白、細胞壁および脂質合成に及ぼす影響を検討した。すなわち黄色ブドウ球菌スミス株の菌液にトリプロペプチン C を添加し、10 分後に放射ラベルした高分子の前駆体を添加して 37℃で 10 分間インキュベートし、酸不溶画分の放射活性を指標に高分子合成阻害様式を見たところ、トリプロペプチン C は、DNA, RNA および蛋白合成は阻害せず、脂質（細胞膜）および細胞壁合成を濃度依存的に阻害した。トリプロペプチン C 1 μM で脂質合成の指標である酢酸の取り込みを約 70% の阻害し、2.5 μM では脂質、細胞壁合成の指標である *N*-アセチルグルコサミンおよび細胞膜合成の指標であるグリセリンの取り込みを約 80% 阻害した(Fig.3.7)。この結果、トリプロペプチン C の標的は脂質（細胞膜）または細胞壁、もしくはその双方であることが示唆され、トリプロペプチン C が細胞分裂時に行われる脂質（細胞膜）または細胞壁合成を阻害することは、3.5 項の結果と一致していた。

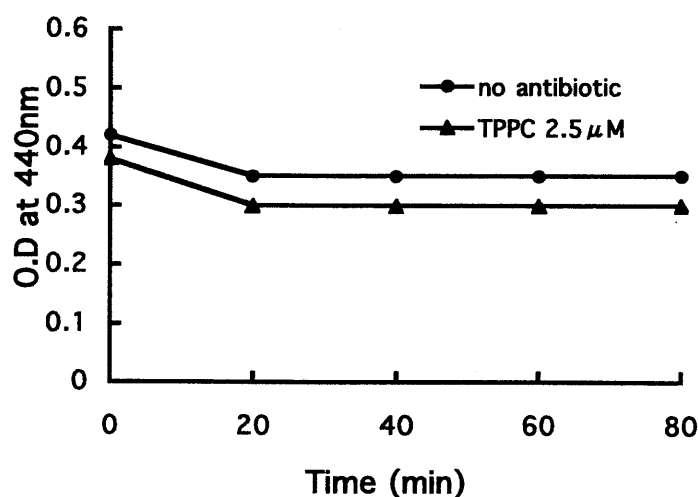
Fig.3.7 Effect of tripropeptin C on macromolecular syntheses



3.7 トリプロペプチン C の細胞膜障害作用の検討

3.6 項より、トリプロペプチン C が脂質（細胞膜）、細胞壁および細胞膜の前駆体である酢酸、*N*-アセチルグルコサミンおよびグリセリンの取り込みを阻害することがわかった。このトリプロペプチン C による細胞膜および細胞壁前駆体の取り込み阻害が、トリプロペプチン C による膜障害作用に起因する可能性が考えられた。そこでプロトプラスト化した黄色ブドウ球菌スミス株に対するトリプロペプチン C の影響をみることで、トリプロペプチン C の膜障害作用を検討した。すなわち、ライソスタフィン処理して黄色ブドウ球菌スミス株のプロトプラストを作成し、トリプロペプチン C 添加（終濃度 2.5 μ M）および無添加での吸光度を経時的に測定した。その結果、トリプロペプチン C 処理および無処理で差が認められなかったことから、トリプロペプチン C は膜障害を示さないことがわかった。(Fig.3.8)

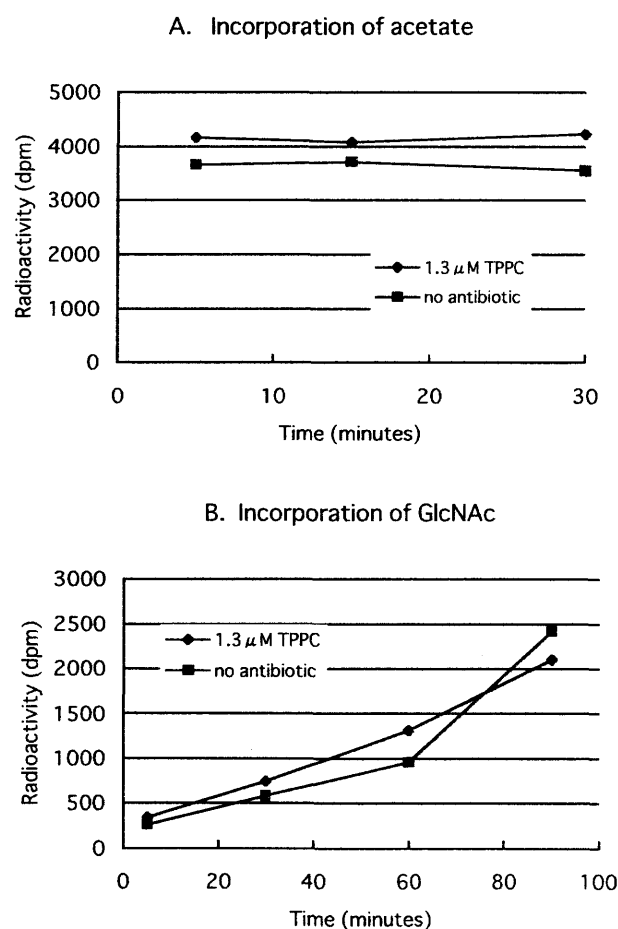
Fig.3.8 Effect of tripropeptin C on degradation of protoplast of *S. aureus* Smith



3.8 トリプロペプチン C の細胞膜透過性に与える影響

トリプロペプチン C による細胞膜および細胞壁前駆体の高分子画分への取り込み阻害がトリプロペプチン C による膜障害によるものでないことを 3.7 項のプロトプラストの実験で示した。その他の要因としてトリプロペプチン C による前駆体の高分子画分への取り込み阻害が、トリプロペプチン C による膜透過性の低下によることが考えられた。そこで黄色ブドウ球菌スミス株の菌液にトリプロペプチン C (終濃度 $1.3 \mu\text{M}$) を添加して 10 分後に酢酸および *N*-アセチルグルコサミンの放射ラベル体を添加し、菌体に取り込まれた放射活性を経時的に測定した。その結果、トリプロペプチン C は放射ラベル体の取り込み量に影響を与えず、高分子画分への前駆体の取り込み阻害がトリプロペプチン C による合成阻害によるものであることを明らかにした。(Fig.3.9)

Fig.3.9 Effect of tripropeptin C on membrane permeability

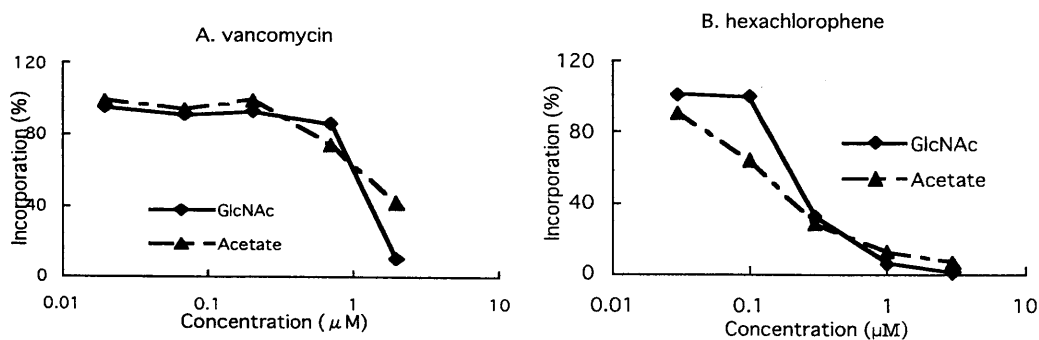


3.9 トリプロペプチン C、バンコマイシンおよびヘキサクロロフェンの高分子合成阻害様式の比較

3.8 項の結果よりトリプロペプチン C が脂質および細胞壁の合成を阻害することを示した。トリプロペプチン C による細胞壁合成および脂質合成阻害の関連を明らかにするため、脂質合成阻害剤ヘキサクロロフェン⁵⁴⁾ および細胞壁合成阻害剤バンコマイシンの阻害様式を比較検討することにした。すなわち黄色ブドウ球菌スミス株の菌液にこれら試薬を添加し、10 分後に放射ラベルした細胞壁、脂質の前駆体である N-アセチルグルコサミンおよび酢酸を添加して 37℃で 10 分間インキュベートし、酸不溶画分の放射活性を指標に高分子合成様式を検討した。

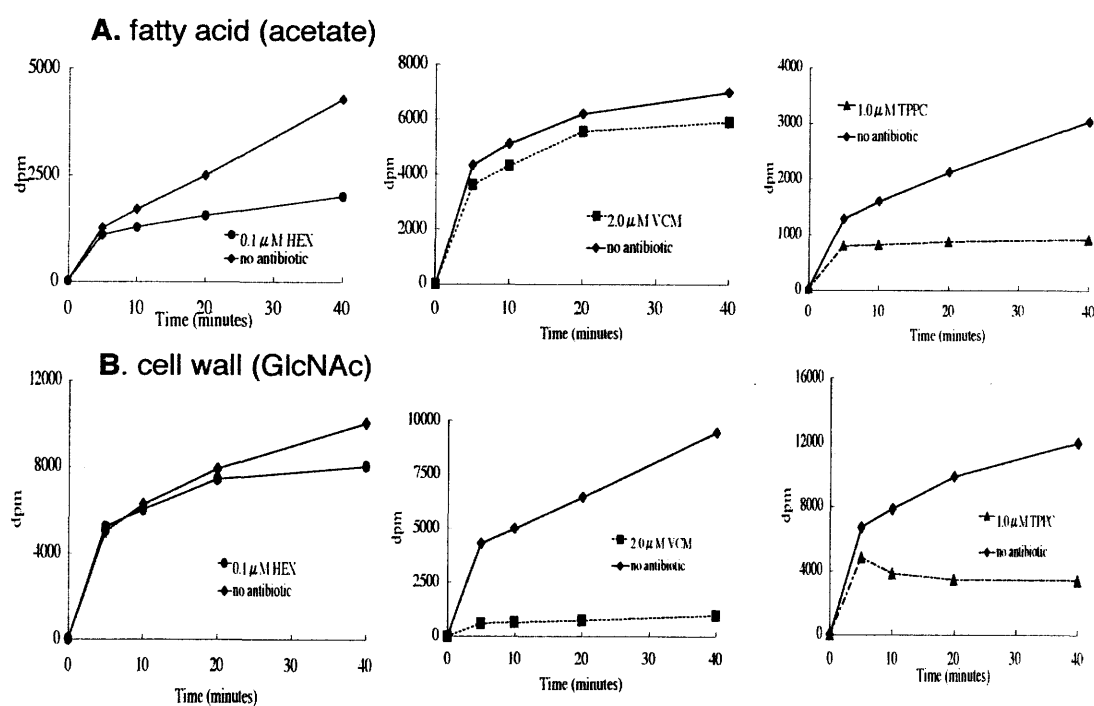
その結果、バンコマイシンは細胞壁および脂質合成をそれぞれ 1.1 および 1.6 μM の濃度で 50% 阻害し、2.0 μM で細胞壁合成を 80% および脂質合成を 60% 阻害した (Fig.3.10 A)。またヘキサクロロフェンは細胞壁および脂質合成をそれぞれ 0.14 および 0.21 μM の濃度で 50% 阻害し、細胞壁合成よりも脂質合成をより強く阻害した (Fig.3.10 B)。

Fig.3.10 Effect of vancomycin and hexachlorophene on macromolecular syntheses



次に黄色ブドウ球菌に対し、経時的にトリプロペプチン C の高分子合成阻害様式を脂質合成阻害剤ヘキサクロロフェンおよび細胞壁合成阻害剤バンコマイシンと比較したところ、ヘキサクロロフェンは 10 分後から脂質合成阻害が認められ、遅れて 40 分後に細胞壁合成阻害が認められた。またバンコマイシンは 5 分後から強い細胞壁合成阻害が認められたが、40 分後でも脂質合成阻害は認められなかった。トリプロペプチン C は 5 分後から脂質合成および細胞壁合成に阻害が見られ、同濃度および同時期で脂質および細胞壁合成を阻害した (Fig.3.11)。この結果、トリプロペプチン C は、脂質および細胞壁合成をともに標的とすることが示唆された。

Fig.3.11 Dual inhibition mode of tripropeptin C



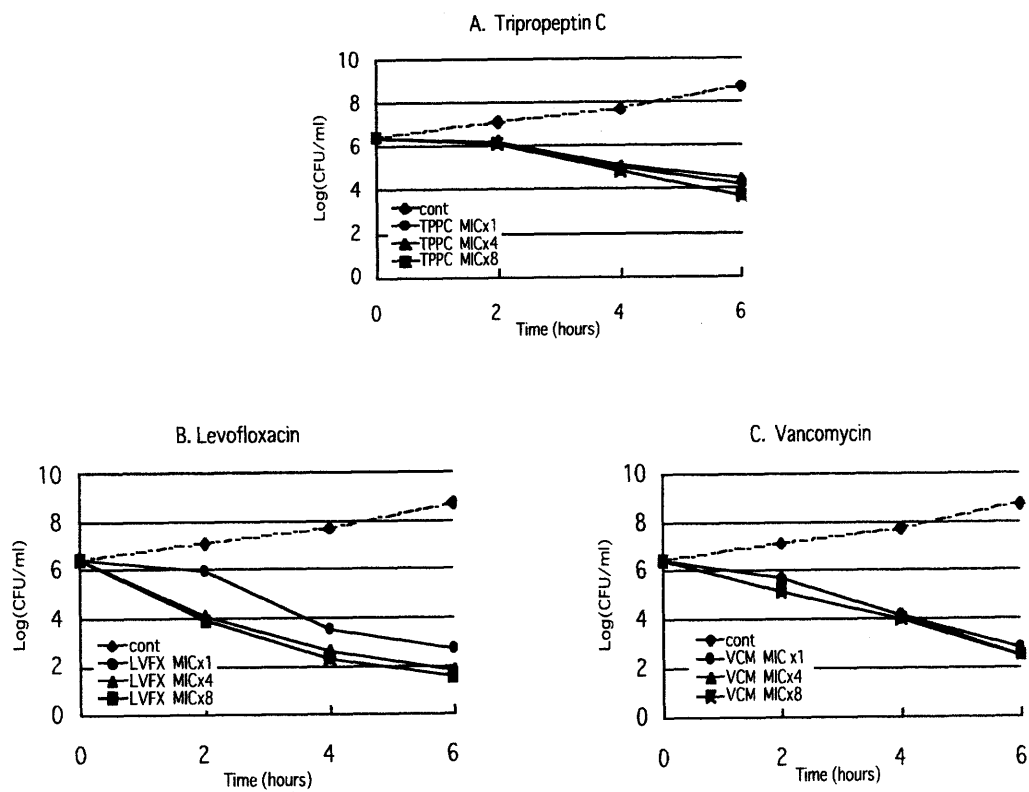
Abbreviations: HEX, hexachlorophene ; VCM, vancomycin ; TPPC, tripropeptin C

3.5 から 3.9 項の結果より、トリプロペプチン C に耐性を示す黄色ブドウ球菌の出現頻度が低い要因として、トリプロペプチン C が複数の標的を持つためであると示唆された。一方、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治療効果は、各成分の *in vitro* の抗菌力から予想されるものと乖離していた。これはトリプロペプチン類の成分間で体内動態等に差異があると考えられた。以下に解析結果を述べる。

3.10 黄色ブドウ球菌に対する経時殺菌曲線

抗菌薬は経時殺菌曲線から、治療効果に影響する因子が、最高血中濃度 (C_{max}) もしくは、MIC 値以上血中に化合物が貯留する時間 (TAM) のどちらであるか推測することができる⁵⁵⁾。既存抗菌薬の中で C_{max} が治療効果に影響するレボフロキサシンおよび TAM が治療効果に影響するバンコマイシンの黄色ブドウ球菌スミス株に対する経時殺菌曲線をトリプロペプチン C のそれと比較した。その結果、トリプロペプチン C の黄色ブドウ球菌スミス株に対する経時殺菌曲線は、バンコマイシンと類似し、シプロフロキサシン⁵⁶⁾に見られる MIC 値以上での殺菌力の濃度依存性が認められなかった。このことからトリプロペプチン C の治療効果には TAM が影響することが示唆された (Fig.3.12)。

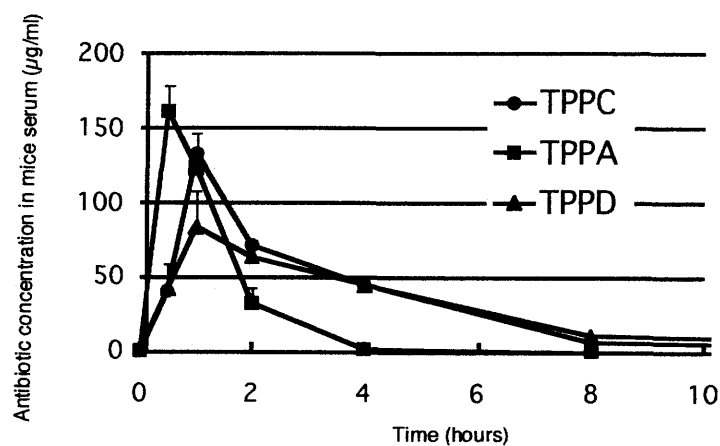
Fig.3.12 Time-killing curve of tripropeptin C, levofloxacin and vancomycin



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

薬力学的解析を行うにあたり、トリプロペプチン類のマウス体内での血中濃度を経時的に測定した。トリプロペプチン A, C および D をマウスに 100 mg/kg の濃度で皮下投与したときの血中濃度変遷は、トリプロペプチン A は血中濃度の最高値が最も早いが消長も短く、側鎖の長い トリプロペプチン D では最高値が低い貯留時間が長かった (Fig.3.13)。なお、図中の数値は3連の平均値を示した。

Fig.3.13 Antibiotic concentration in mice serum



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

トリプロペプチン各成分の TAM および MIC からトリプロペプチン D が最も治療効果が優れていることが予想される。しかしながらトリプロペプチン A, C および D のなかで TAM および MIC に対する血中濃度の最も小さいトリプロペプチン A が最も優れた治療効果を示した。そこでマウス体内と *in vitro* での環境の違いから、トリプロペプチン類の 50% マウス血清中での遊離型比率を測定したところ、トリプロペプチン A が 15.2%、トリプロペプチン C が 2.5%、トリプロペプチン D が 1.8%と、成分間で遊離型濃度に大きな違いがあることが明らかとなった。なお、試験したトリプロペプチン A, C および D は 50% マウス血清中で回収率がそれぞれ 98.6, 101.2 および 96.3% であったことから、50% マウス血清中で安定であることがわかった。

得られた遊離型比率をもとにマウスの血中での遊離型濃度を求め、MIC で除したものを示した (Fig.3.14)。ここから得られる遊離型濃度の TAM はトリプロペプチン A および C では、D に比べて3倍長く、これらの TAM と治療効果に相関性が認められた (Table 3.5)。したがって、トリプロペプチン類は構成要素である脂肪側鎖長の差異により生体内での挙動に大きな違いがあることがわかり、治療効果は血清中での遊離型比率の違いに起因すると結論付けた。

Fig.3.14 Free tripropeptin concentration compared with MIC

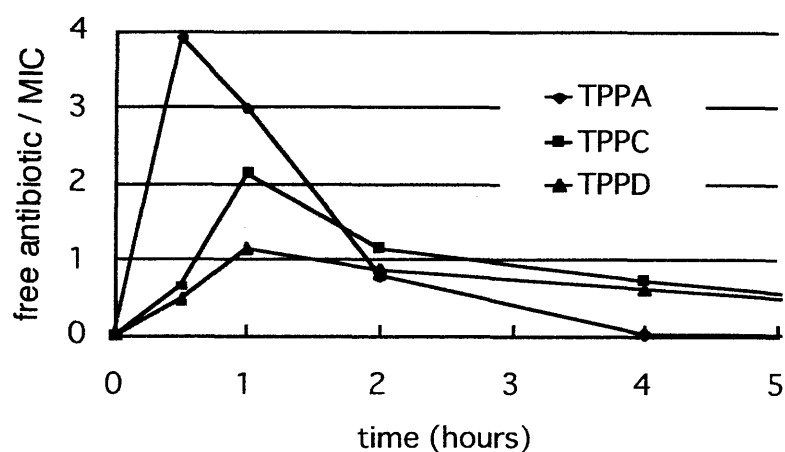


Table 3.5 Effect of mouse serum and biological properties of tripropeptins

	TPPA	TPPC	TPPD
free drug rate (%) in 50% mouse serum	15.2	2.5	1.8
[MIC in serum] / [MIC] (%)	12.5	0.8	0.8
time above MIC (hours)	1.8	1.8	0.6
ED ₅₀ (mg/kg)	10.5	10.7	33.0

3.13 要約および考察

トリプロペプチン類は、グラム陽性菌に強い抗菌力を示し、グラム陰性菌、抗酸菌および真菌に対しては抗菌力を示さなかった。トリプロペプチン類は脂肪側鎖の長い成分がより強い抗菌力を示し、C, D および E 成分は MRSA に対し、バンコマイシンを含む既存抗菌薬より優れた抗菌力を示した。

In vitro で化合物の暴露を繰り返して、人工的に黄色ブドウ球菌スミス株の耐性菌出現頻度試験を行った結果、既存抗菌薬であるリネゾリドおよびゲンタミシンに比べ、トリプロペプチン C 耐性菌の出現率は低いことが示された。この結果よりトリプロペプチンの作用機序に興味を持たれ、放射ラベル体の取り込みを指標に黄色ブドウ球菌スミス株に対する高分子合成阻害様式を調べたところ、トリプロペプチン C は、脂質および細胞壁合成を濃度依存的に阻害した。トリプロペプチン C の高分子合成阻害様式を細胞壁合成阻害剤のバンコマイシンおよび脂質合成阻害剤のヘキサクロロフェンと経時的に比較検討したところ、トリプロペプチン C は、バンコマイシンおよびヘキサクロロフェンと異なり、脂質および細胞壁合成をともに阻害した。また、トリプロペプチン C 耐性菌の出現率が低かった一因として作用点が複数あることが考えられた。

一般に細菌において遺伝子の変異する確率、すなわち耐性を獲得した変異株の出現率は 1×10^{-7} 程度と言われる。作用点が二つあるものは、耐性菌の出現頻度が確率論的に 1×10^{-14} 程度となり、化合物の優れた特性となる。トリプロペプチン C は、これまでの実験より現在臨床で問題となっているグラム陽性薬剤耐性菌に優れた抗菌力を示し、*in vitro* で高度耐性菌が得られず、さらに作用標的が複数あることが示唆され、トリプロペプチン C が抗菌薬として優れた特性を備えていることを明らかにした。

また、トリプロペプチン類はマウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおいて優れた治療効果を示したが、それらの治療効果は抗菌力から推測されるものと異なっていた。解析の結果、トリプロペプチン類においては、成分間で血清中での遊離型比率が大きく異なり、これにより治療効果を説明できることがわかった。トリプロペプチン類の成分間における化学構造上の相違点は脂肪側鎖の長さのみであるが、そのわずかな違いによって生体内の挙動に大きな差異が認められた。親油性指標である $C \text{ Log } P_{ow}$ の観点からトリプロペプチン類の構造ならびに生物活性を考察すると、脂肪鎖が長く $C \text{ Log } P_{ow}$ の大きいトリプロペプチン D は抗菌力が強く、血清蛋白との相互作用が高い。一方で脂肪鎖が短く $C \text{ Log } P_{ow}$ の小さいトリプロペプチン A は抗菌力がトリプロペプチン D に比べて弱い、血清蛋白との相互作用が低い

め治療効果はトリプロペプチン D に比べて優れていた。これはトリプロペプチン類と構造的に類似したプラスバシン類⁴⁶⁾ およびエンペドペプチン⁴⁸⁾ においても C Log P_{ow} が小さいほど ED₅₀ / MIC の値が小さいという結果とも一致する (Table 3.6, Fig.3.14)。このことから、トリプロペプチン類ならびにその類縁化合物において C Log P_{ow} が大きいほど、細菌ならびに血清蛋白との相互作用が強いと考えられる。そこで抗菌力が強く、C Log P_{ow} が小さいトリプロペプチン誘導体はマウスの全身感染モデルで、さらに優れた治療効果を示すことが予測される。今後は、本研究で得られた知見をもとに、より体内動態の優れたトリプロペプチン誘導体を創製し、新しい抗菌薬として社会に貢献できるものと期待している。

Table 3.6 Relation between antimicrobial activity and lipophilicity index in tripropeptins and their related compounds

	tripropeptin A	tripropeptin C	tripropeptin D	empedopeptin	plusbacin-A2	plusbacin-A3
MIC (μg/mL)	6.3	1.6	1.6	1.6*	0.8*	0.4*
ED ₅₀ (mg/kg, in mice)	10.5	10.7	33	3.3*	2.04*	1.93*
route [#]	s.c.	s.c.	s.c.	i.m.	i.p.	i.p.
ED ₅₀ /MIC	1.67	6.69	20.63	2.06	2.55	4.83
C Log P _{ow}	-5.087	-4.029	-3.500	-4.844	-5.635	-5.106

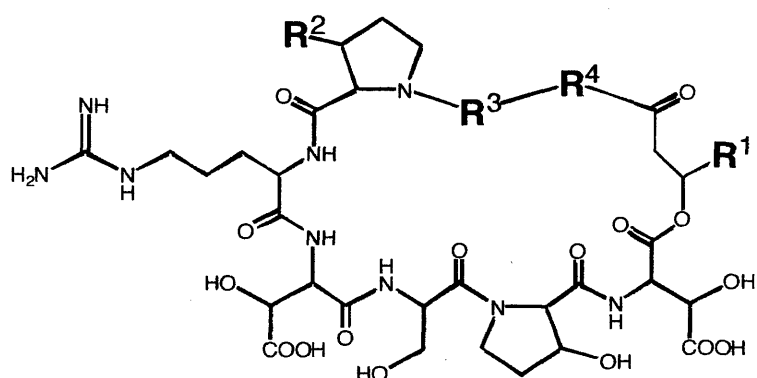
* in literature

[#] s.c., subcutaneous

i.m., intramuscular

i.p., intraperitoneal

Fig.3.14 Structure of tripropeptins and related compounds



TRIPROPEPTINS

A	$R^1 = (CH_2)_7CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
B	$R^1 = (CH_2)_8CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
C	$R^1 = (CH_2)_9CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
D	$R^1 = (CH_2)_{10}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
E	$R^1 = (CH_2)_{11}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$
Z	$R^1 = (CH_2)_6CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Pro$	$R^4 = Thr$

PLUSBACINS

A ₁	$R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
A ₂	$R^1 = (CH_2)_9CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
A ₃	$R^1 = (CH_2)_{10}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
A ₄	$R^1 = (CH_2)_{12}CH_3$	$R^2 = OH$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₁	$R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₂	$R^1 = (CH_2)_9CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₃	$R^1 = (CH_2)_{10}CH(CH_3)CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$
B ₄	$R^1 = (CH_2)_{12}CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ala$	$R^4 = Thr$

EMPEDOPEPTIN

$R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = Ser$	$R^4 = Pro$
-------------------------	-----------	-------------	-------------

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

1.1 培地

使用培地は以下のとおりである。全ての培地は調製後、121℃、15 分間高圧蒸気滅菌した。

肉エキス培地

ポリペプトン（和光）	1%
肉エキス（極東）	1%
塩化ナトリウム（和光）	0.2%
蒸留水	
pH 7.0	

肉エキス寒天培地

ポリペプトン（和光）	1%
肉エキス（極東）	1%
塩化ナトリウム（和光）	0.2%
寒天（和光）	1.4%
蒸留水	
pH 7.0	

マイシンアッセイ寒天培地

マイシンアッセイアガーアレイ（ミクニ化学産業）	2%
蒸留水	
pH 7.0	

BHI 培地

ブレイン・ハート・インフュージョン（ディフコ）	3.7%
蒸留水	
pH 7.4	

トリプロペプチン類生産培地

グリセリン (和光)	1.5%
コットン・シード・ミール (ファーマメディア)	1.5%
塩化ナトリウム (和光)	0.3%
L-グルタミン酸ナトリウム (和光)	0.5%
蒸留水	
pH 7.4	

トリプロペプチンE 生産培地

グリセリン (和光)	1.5%
コットン・シード・ミール (ファーマメディア)	1.5%
塩化ナトリウム (和光)	0.3%
L-グルタミン酸ナトリウム (和光)	0.5%
L-ロイシン (和光)	0.2%
蒸留水	
pH 7.4	

1.2 抗菌力試験

感受性黄色ブドウ球菌スミス株と多剤耐性黄色ブドウ球菌 MS 9610 株および MRSA No.5 株に対する抗菌力は、微量液体希釈法により肉エキス培地で 37℃、18 時間静置培養後に、肉眼にて生育を判定することにより行った。

1.3 細胞壁調製画分との拮抗試験

細胞壁調製画分は、以下のように調製した。肉エキス培地を 500 mL 容三角フラスコに 100 mL 入れ、オートクレーブにて滅菌した。これに寒天斜面培地で培養した黄色ブドウ球菌スミス株の一白金耳を接種し、37℃ で 18 時間震盪培養した。この培養液を 3000 rpm で 10 分間遠心処理により集菌し、得られた菌体に 20 mL の蒸留水および 20%トリクロロ酢酸水溶液を加えた。これを 20 分間煮沸した後、3000 rpm で 10 分間遠心処理を行い、得られた沈殿をトリプシン溶液 20 mL (2 mg/mL, 0.1M リン酸緩衝溶液 pH 7.0 に溶解) で懸濁し 37℃ で 2 時間インキュベートした。これを遠心処理後、上清をセカンテーションにより除去したのち、沈殿を滅菌水で 2 回洗浄し、この沈殿を細胞壁調製画分とした。

また、細胞壁調製画分との拮抗試験は以下のように行った。細胞壁調製画分を 1 mL の滅菌水に懸濁し、この懸濁液を最終濃度 1 % 添加および無添加の黄色ブドウ球菌スミス株含有肉エキス寒天平板および *Bacillus subtilis* PCI219 株含有マイシンアッセイ寒天平板を作成した。円筒拡散法にて上記寒天平板上での微生物培養液サンプルおよび陽性対照であるバンコマイシン溶液の 18 時間培養後の生育阻止円直径を指標に拮抗の有無を調べた。

1.4 細胞毒性試験

細胞毒性試験は以下のように行った。微生物培養サンプルを 96 穴マイクロプレートに 10 μ L/ウェルずつ撒いた。対数増殖期のマウス由来癌細胞 L-1210 leukemia を 1.0×10^5 cells/mL になるように 10 % ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地（ギブコ社製）中に浮遊させ、先ほどの 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつまき、5 % 二酸化炭素存在下 37℃ にて 48 時間培養を行った。培養終了後、5 mg/mL の 3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウム-2H-ブロミド (MTT ; 同仁科学研究所社製) 溶液を各ウェルに 10 μ L ずつ添加し、さらに二酸化炭素存在下 37℃ にて 4 時間培養した。培養終了後、0.04M 塩酸-イソプロパノールを 100 μ L 添加し、超音波処理により細胞を溶解し色素を抽出した。抽出された色素の 570 および 690 nm における吸光度をプレートリーダー (Labsystems multiscan MS、大日本製薬社製) で測定し、次式を用いて細胞毒性を算出した。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = [1 - (A - B) / (C - D)] \times 100$$

A=サンプル添加時の 570 nm における吸光度

B=サンプル添加時の 690 nm における吸光度

C=培養細胞のみの 570 nm における吸光度

D=培養細胞のみの 690 nm における吸光度

1.5 BMK333-48F3 株の分類・同定

BMK333-48F3 株の遺伝子解析による分類は以下のように行った。「放線菌の分類と同定」⁵⁸⁾に従って BMK333-48F3 株のゲノム DNA を調製し、16S rRNA 遺伝子の増幅および部分塩基配列の解読を行った。PCRは、MJ Research 社製の Minicycler を使用し、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列の解読は、アマシャムファルマシアバイオテック社製 Gene Rapid を使用した。

また、BMK333-48F3 株の各種培養性状および生理生化学性状試験は、「医学細菌同定の手引き 第2版」⁵⁷⁾に従って行った。さらに性状試験の結果を Bergey's Manual of Systematic Bacteriology の記載と比較することで、本株の属の同定を行った。

1.6 トリプロペプチン類の生産

トリプロペプチン類生産培地を 500 mL 容三角フラスコに 110 mL ずつ分注しオートクレーブで滅菌した。これに寒天斜面培地に培養した *Lysobacter* sp. BMK333-48F3株 (FERM P-17741) を接種し、27℃ で 18 時間振とう培養し種母培養液を得た。500 mL 容三角フラスコに 110 mL ずつ分注したトリプロペプチン類生産培地 (計 50 L) に上記の種母培養液 2% 量を接種し、27℃ で 2 日間振とう培養した。またトリプロペプチンE の発酵生産は、トリプロペプチンE 生産培地で同様に培養を行った。

1.7 トリプロペプチン類の単離精製

上記のようにして得られた培養液を遠心分離後、培養ろ液と菌体に分離した。菌体は 10 L のメタノールで抽出後、減圧下濃縮し、培養ろ液とあわせ、この混合溶液 50 L を、湿容量 6 L のダイアイオン HP-20 (三菱化学社製) カラムに吸着させ、蒸留水、50%メタノール水、65% アセトン水各々 18 L ずつ順次溶出した。活性画分である 65% アセトン水溶出画分を減圧下で濃縮してアセトンを除去し水溶液とし、トリプロペプチン類を含む抽出物 30 g を得た。得られたトリプロペプチン類を含む粗精製物をシリカゲル (Merck 社製) カラム (1500 mL) にのせ、クロロホルム：メタノール：水 (10:5:1, 4500 mL)、ブタノール：メタノール：水 (4:1:2, 4500 mL) で順次クロマトグラフィーを行った、活性画分を集めトリプロペプチン類を含む粗精製物 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 CHP20 P (三菱化学社製) カラム (250 mL) に吸着させ、20% アセトン水、30% アセトン水、35% アセトン水、40% アセトン水、45% アセトン水、50% アセトン水、5

5% アセトン水、60% アセトン水（各 750 mL）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%-50% アセトン水溶出画分よりトリプロペプチンB 210.6mg、45%-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。なお各活性成分の純度は HPLC にて確認した。

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 生産培地で 2 日間培養した培養液 15 L に等量のアセトンを加え、ミキサーにて十分に攪拌し、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 HP-20 レジン（三菱化学社製）を加え、さらに 4 時間攪拌した。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 にてトリプロペプチン類を溶出し、得られたアセトン溶出画分を減圧乾固し 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、この溶出液を減圧乾固して 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 塩酸にて pH を 2.6 に調整し、湿容量 250 mL の CHP20P レジン（三菱化学社製）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。溶出溶媒は各 750 mL のアセトン：水 = 12 : 28, 14 : 26, 16 : 24, 18 : 22, 20 : 20, 22 : 18, 23 : 17, 24 : 16, 25 : 15, 26 : 14, 27 : 13, 28 : 12 である。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 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 1 M 塩酸にて pH を 2.0 に調整し、湿容量 30 mL のダイアイオンCHP20Pレジン（三菱化学社製）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。溶出溶媒は各 100 mL のアセトニトリル：水=30 : 70, 31 : 69, 32 : 68, 33 : 67, 34 : 66, 35 : 65, 36 : 64, 37 : 63, 38 : 62, 39 : 61 および 40 : 60 である。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 を単離精製した。

第2章 トリプロペプチン類の構造解析

2.1 分析機器および各種スペクトル

比旋光度 $[\alpha_D]$: パーキンエルマー241 型旋光光度計を使用した。

紫外外部吸収スペクトル (UV) : 日立 557 分光光度計を使用した。

赤外吸収スペクトル (IR) : 堀場フーリエ変換赤外分光光度計 FT-210 を使用し、臭化カリウム錠剤法にて測定した。

質量スペクトル (MS) : 日立 M1200H LC/MS (APCI), 日本電子 JMS-SX102 (HRFAB) および日本電子 JMS-T100LC (HRESI) により測定を行った。

また、トリプロペプチンCの IR spectrum (Fig.e-1)、トリプロペプチン類の ^{13}C および ^1H NMR spectrum (Fig.e-2 ~ e-13), トリプロペプチンCの DEPT spectrum (Fig.e-14), HMQC spectrum (Fig.e-15), ^1H - ^1H COSY spectrum (Fig.e-16), HMBC spectrum (Fig.e-17), ^1H NMR spectrum [in $\text{DMSO}-d_6$: D_2O (10:1)+NaOH (pH 8.0), Fig.e-18] および ^{13}C NMR spectrum [in $\text{DMSO}-d_6$: D_2O (10:1)+NaOH (pH 8.0) , Fig.e-19] を以下に示した。

Fig.e-1 IR spectrum of tripropeptin C

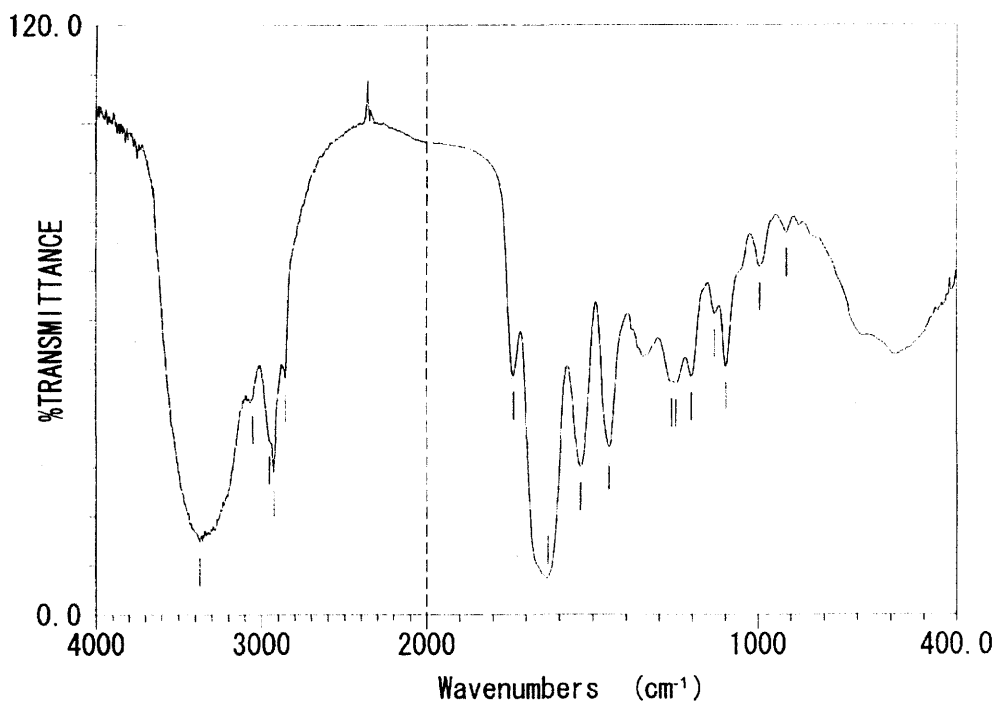


Fig.e-2 ^1H NMR spectrum of tripropeptin A in $\text{DMSO}-d_6$

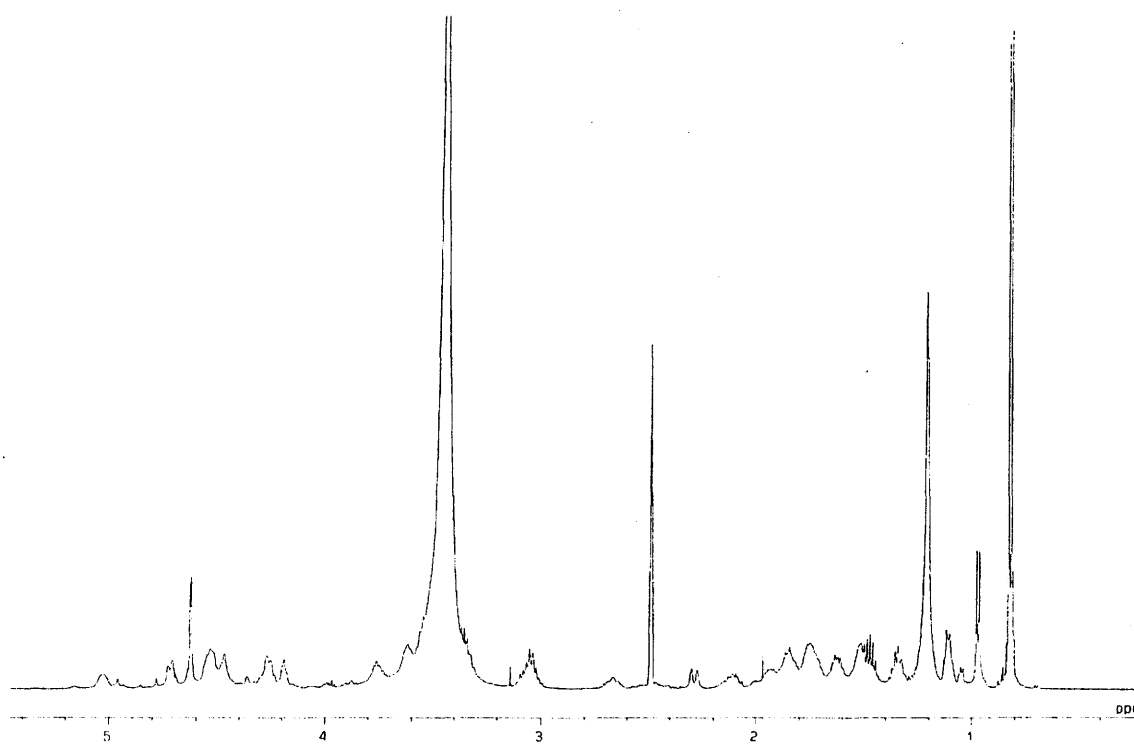


Fig.e-3 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin A in $\text{DMSO}-d_6$

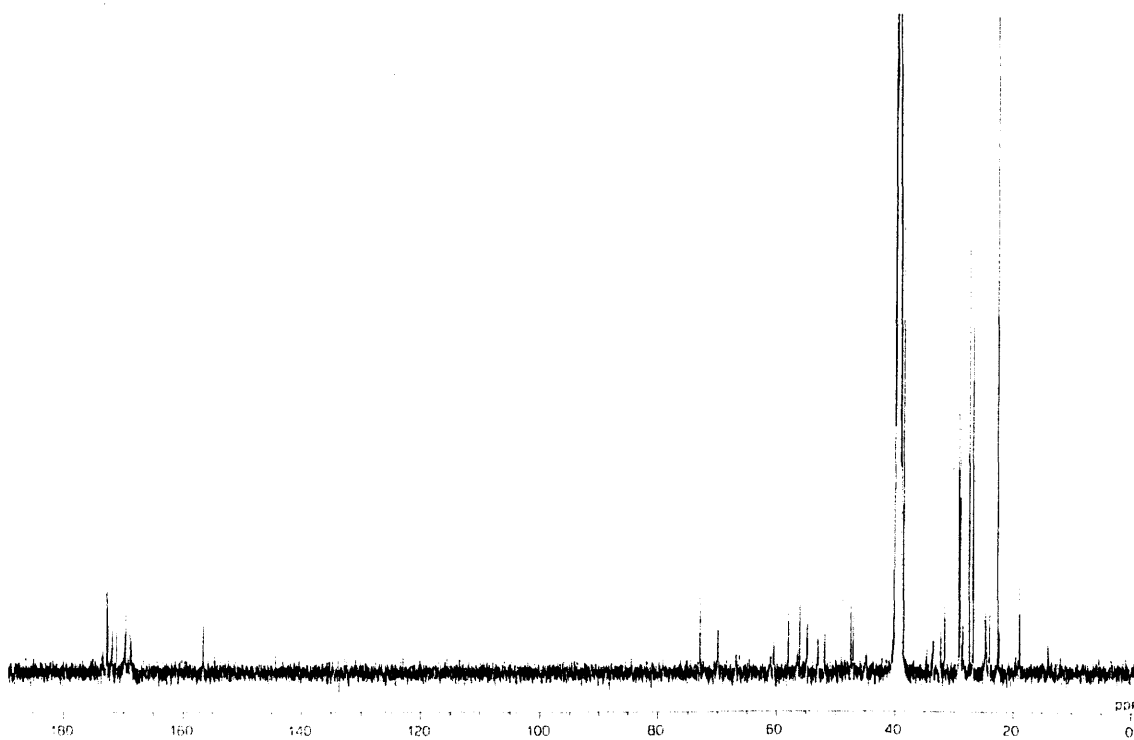


Fig.e-4 ^1H NMR spectrum of tripropeptin B in $\text{DMSO}-d_6$

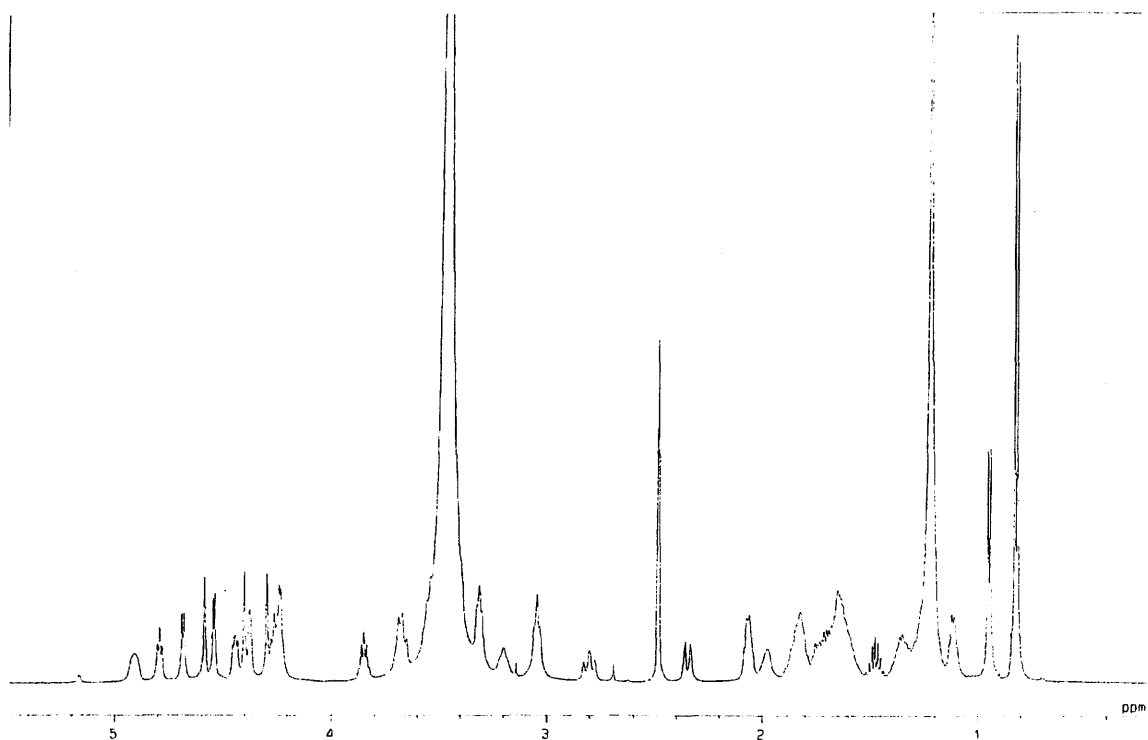


Fig.e-5 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin B in $\text{DMSO}-d_6$

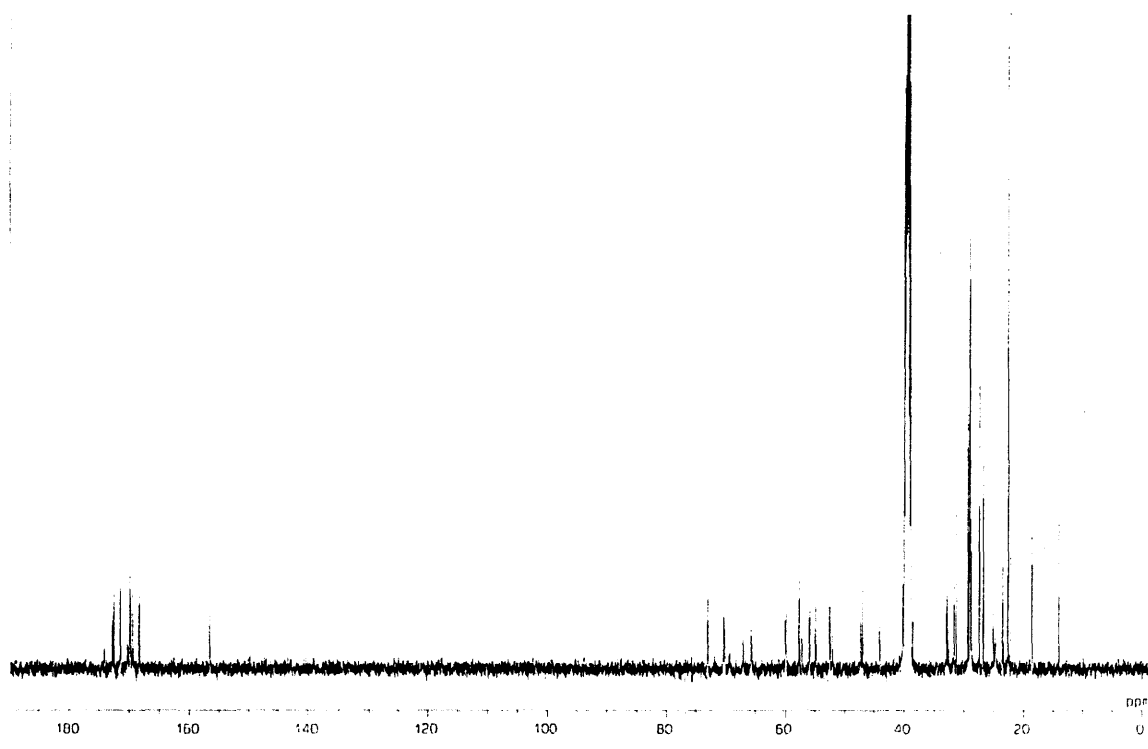


Fig.e-6 ^1H NMR spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$

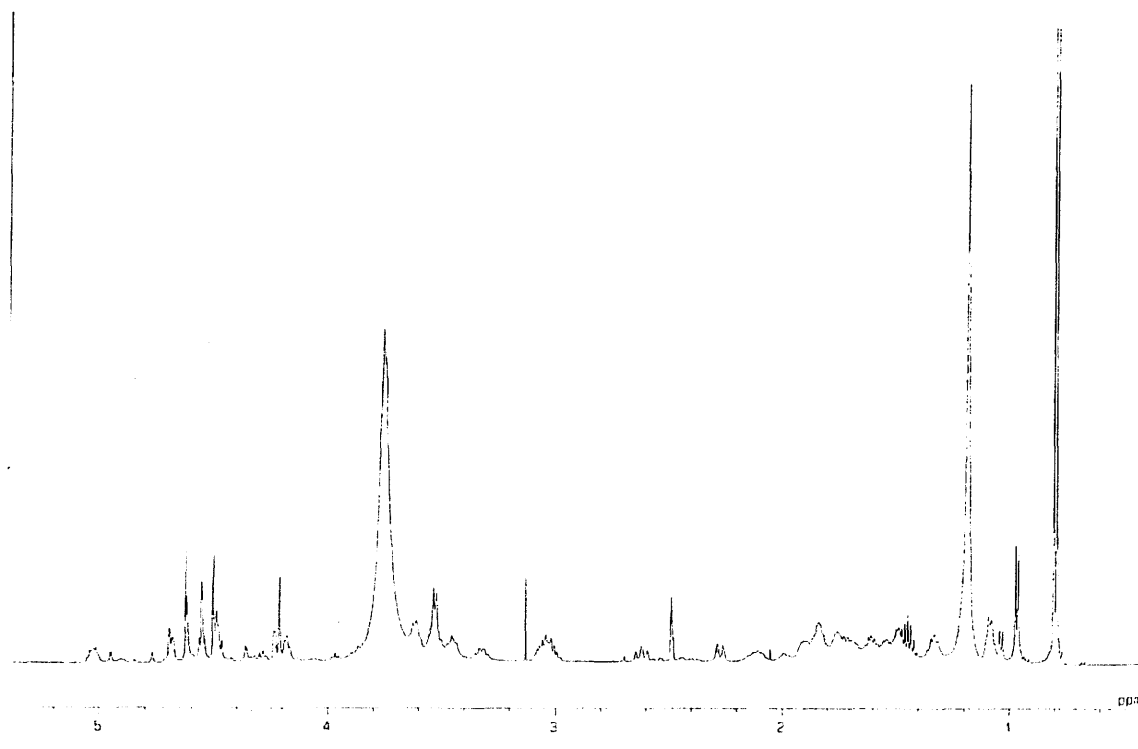


Fig.e-7 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$

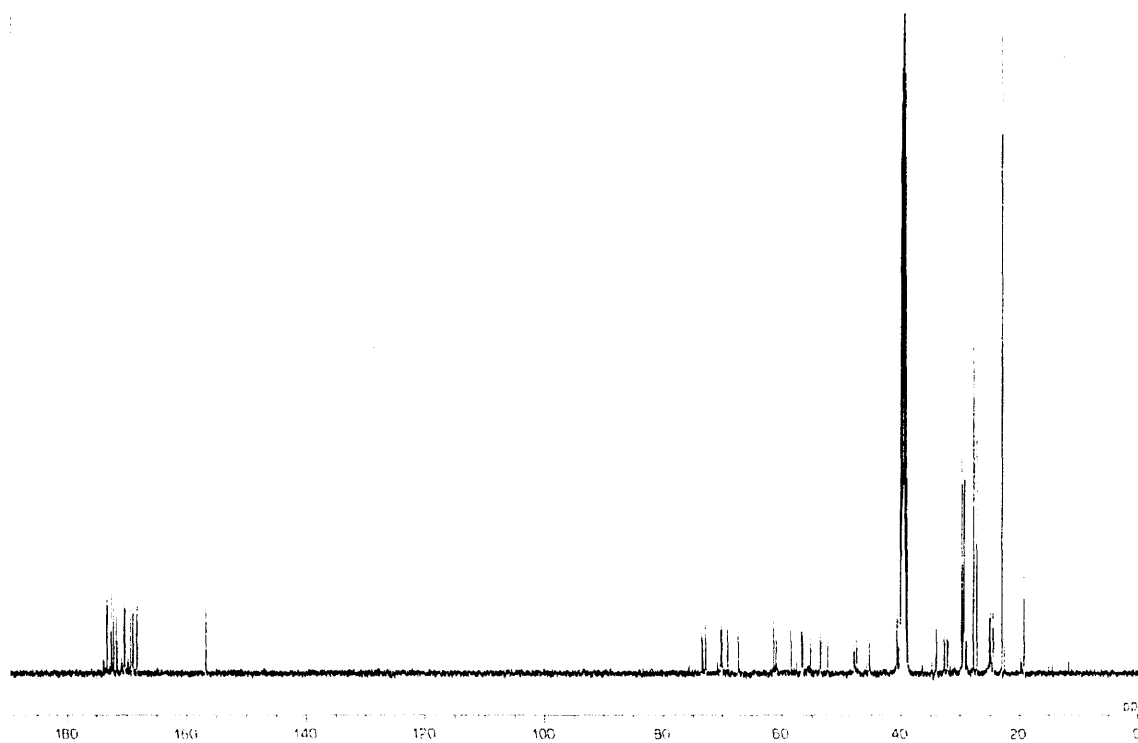


Fig.e-8 ^1H NMR spectrum of tripropeptin D in $\text{DMSO}-d_6$

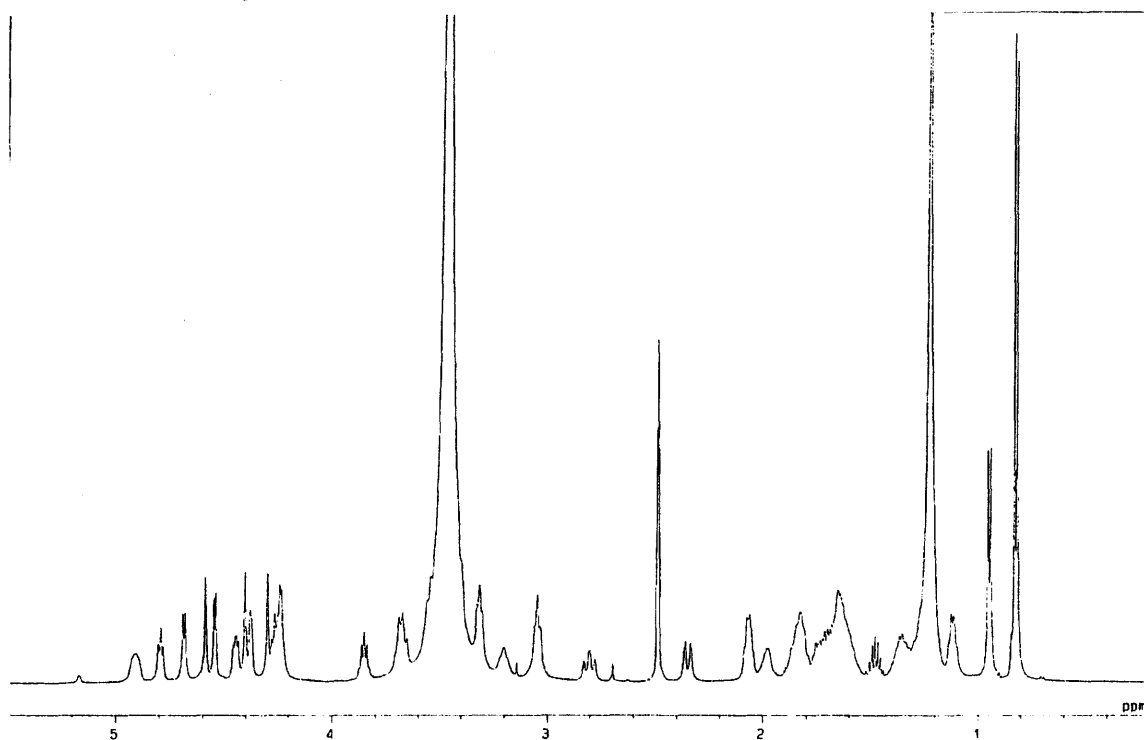


Fig.e-9 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin D in $\text{DMSO}-d_6$

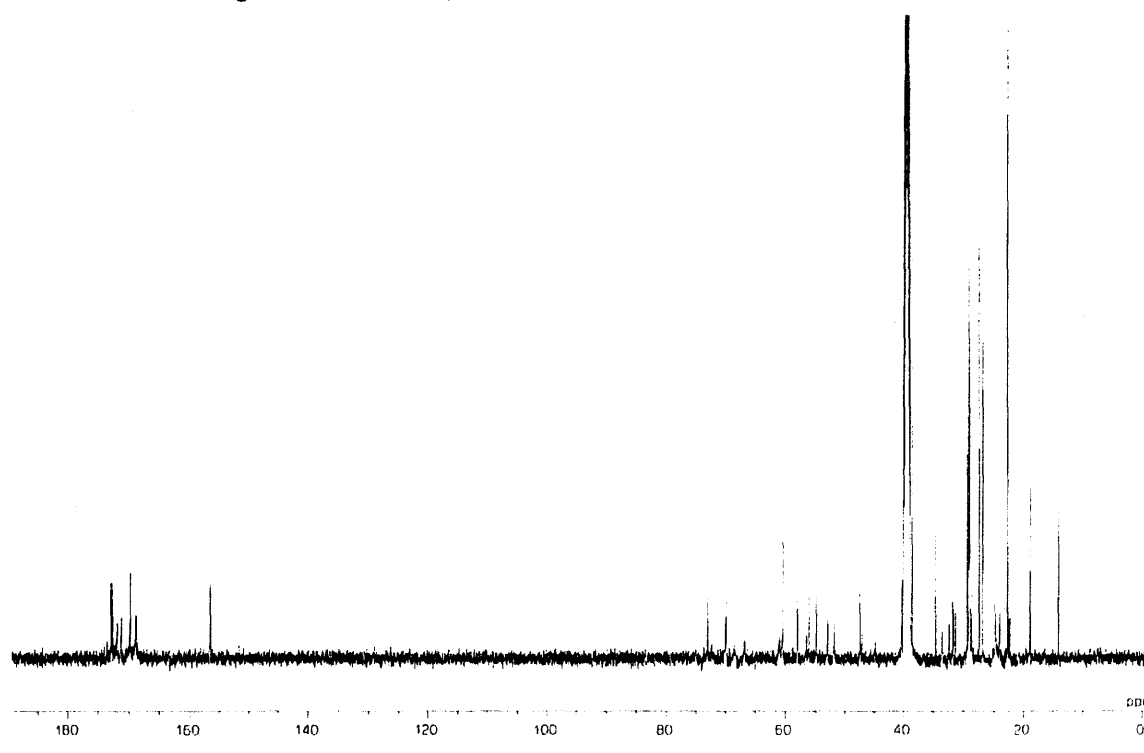


Fig.e-10 ^1H NMR spectrum of tripropeptin E in $\text{DMSO}-d_6$

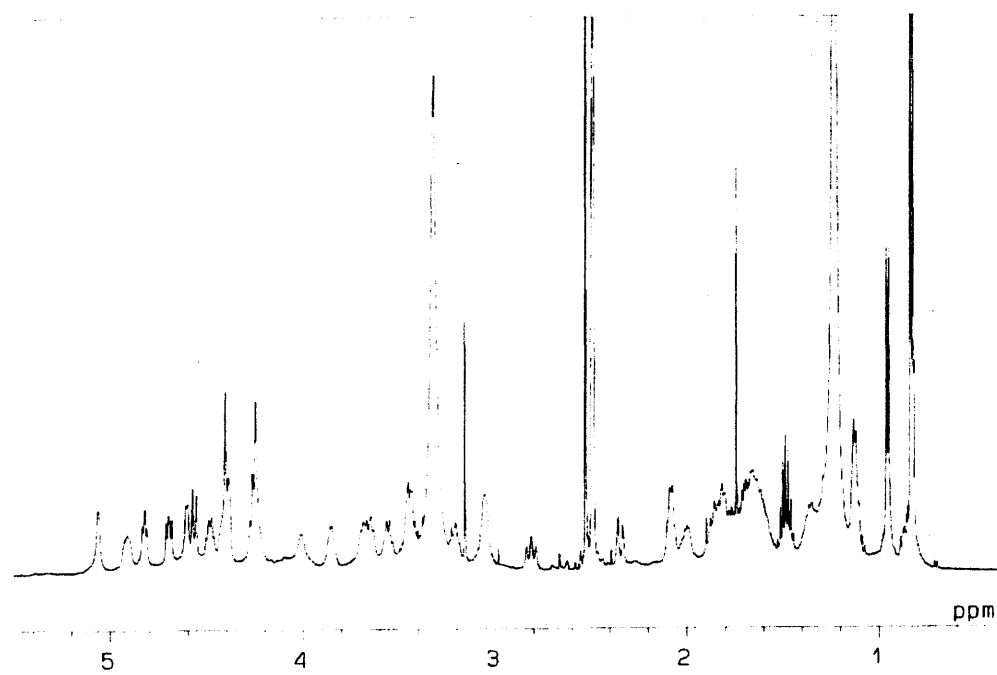


Fig.e-11 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin E in $\text{DMSO}-d_6$

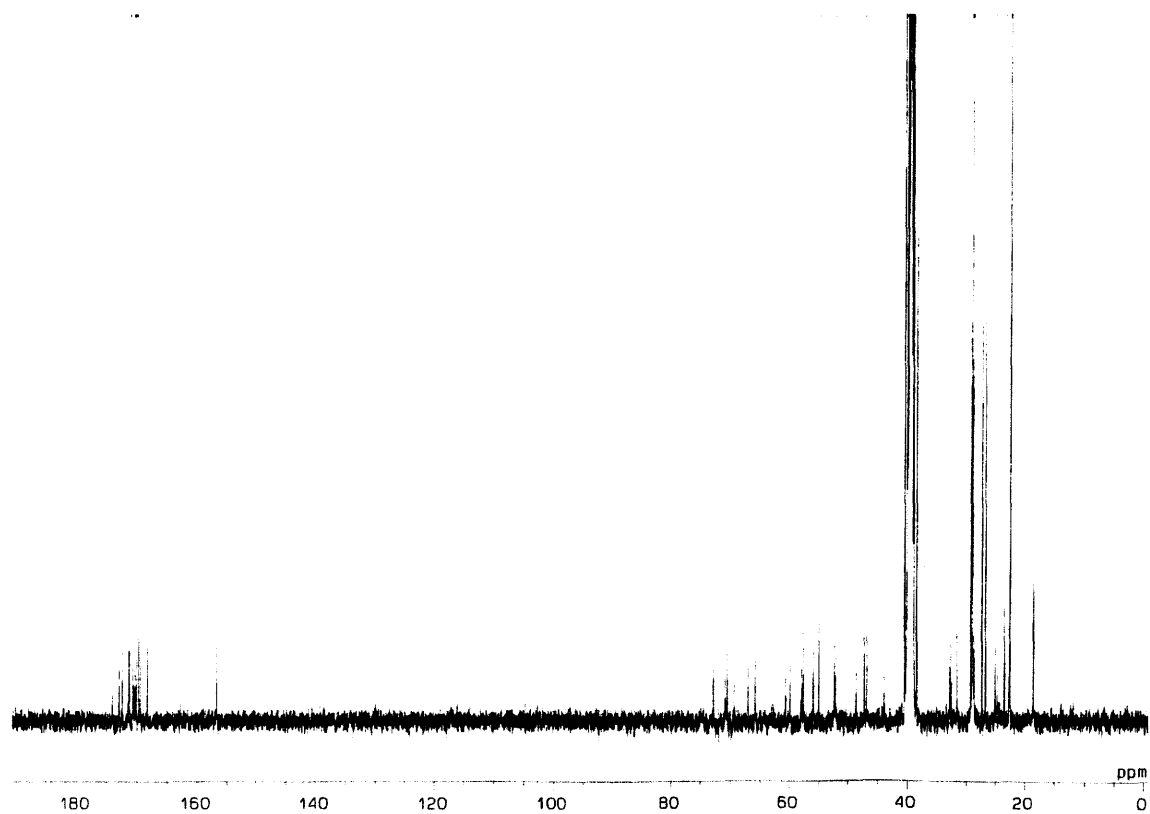


Fig.e-12 ^1H NMR spectrum of tripropeptin Z in $\text{DMSO}-d_6$

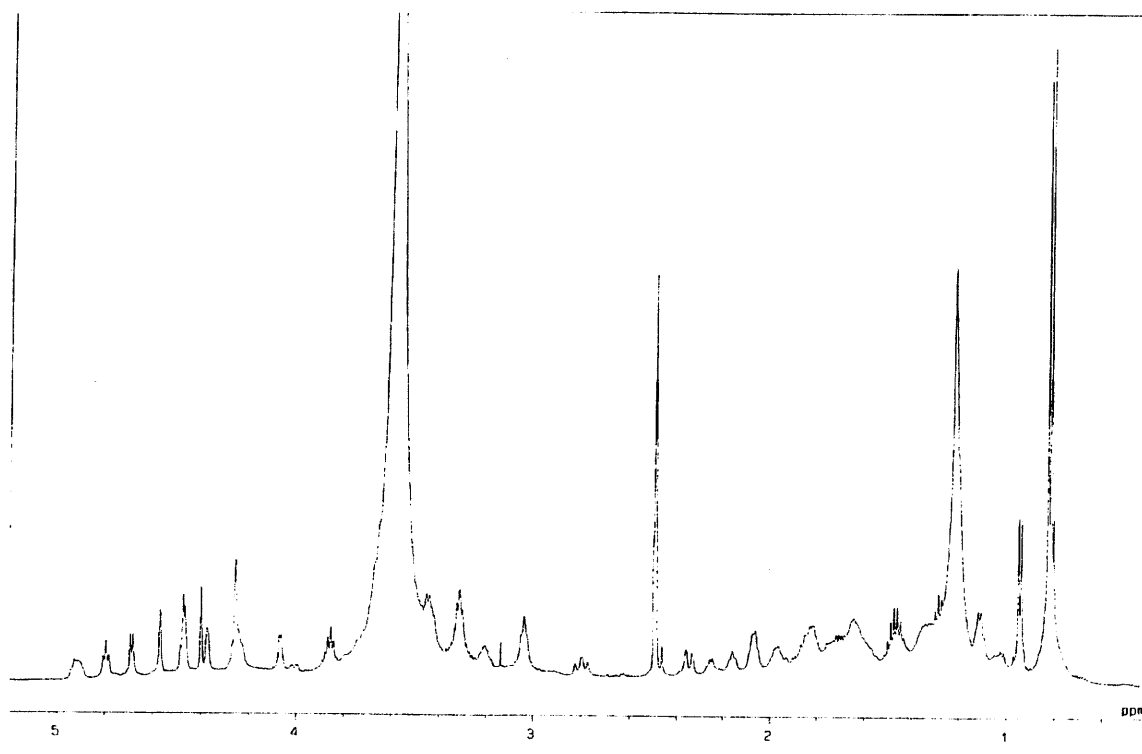


Fig.e-13 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin Z in $\text{DMSO}-d_6$

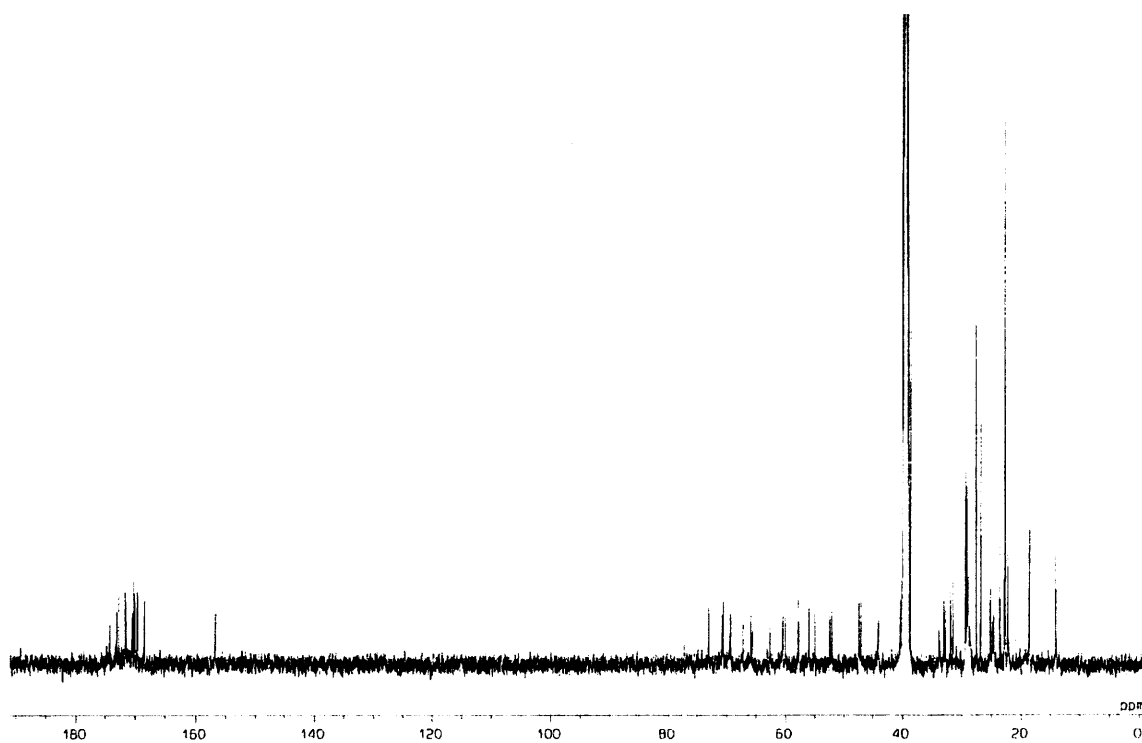


Fig.e-14 DEPT spectrum of tripropeptin C in DMSO- d_6

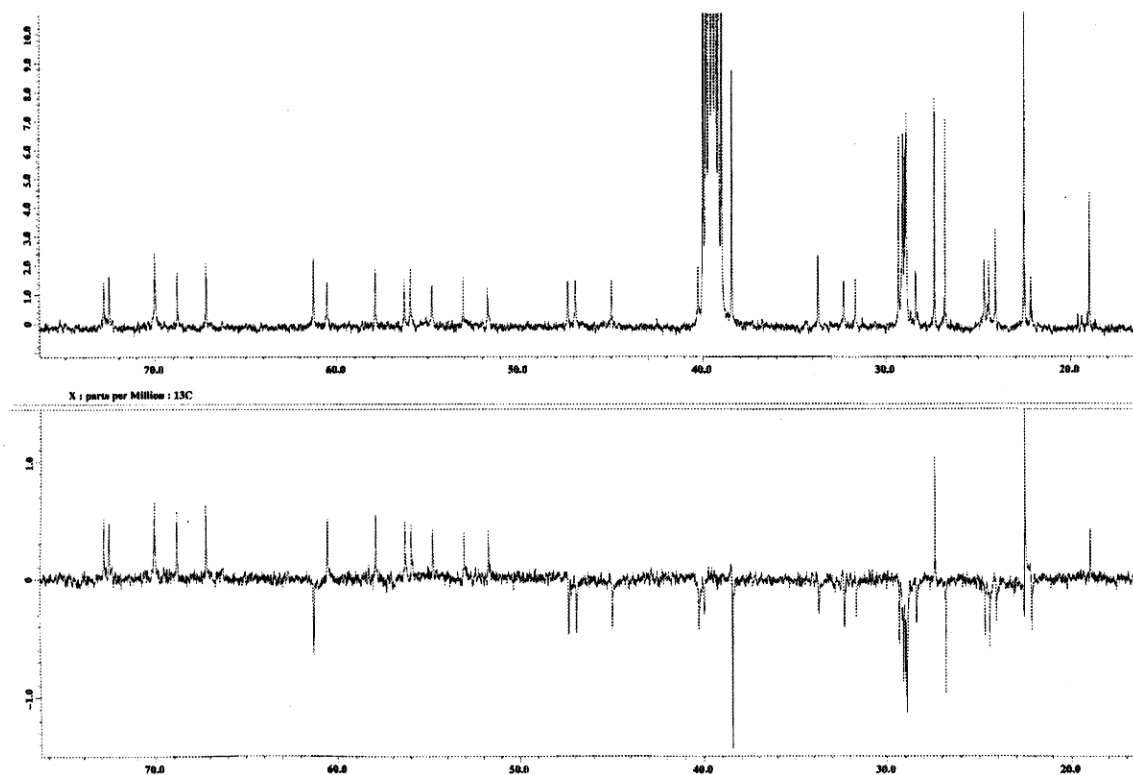


Fig.e-15 HMQC spectrum of tripropeptin C in DMSO- d_6

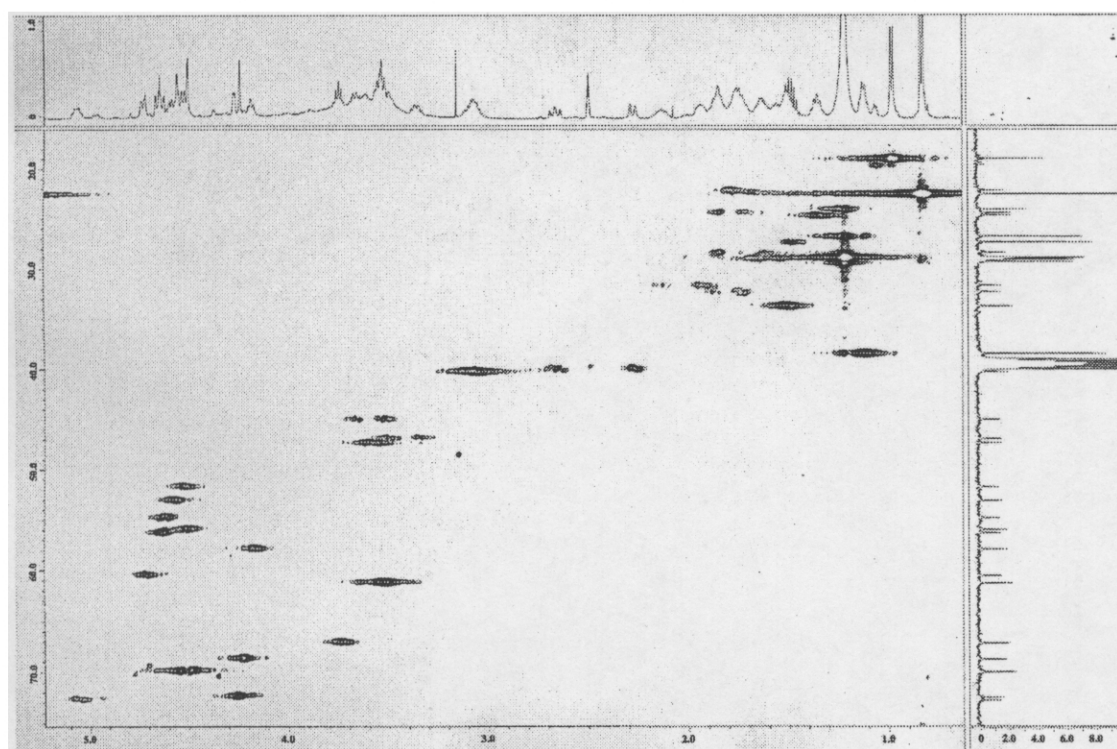


Fig.e-16 ^1H - ^1H COSY spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$

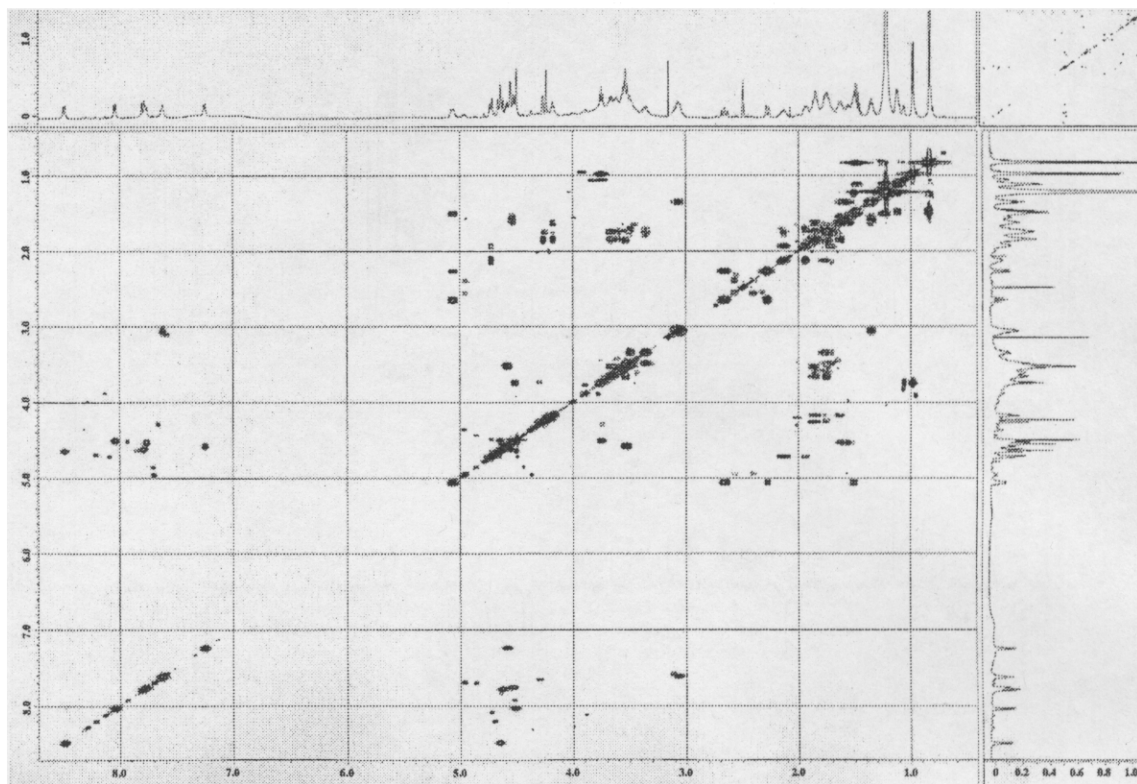


Fig.e-17 HMBC spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$

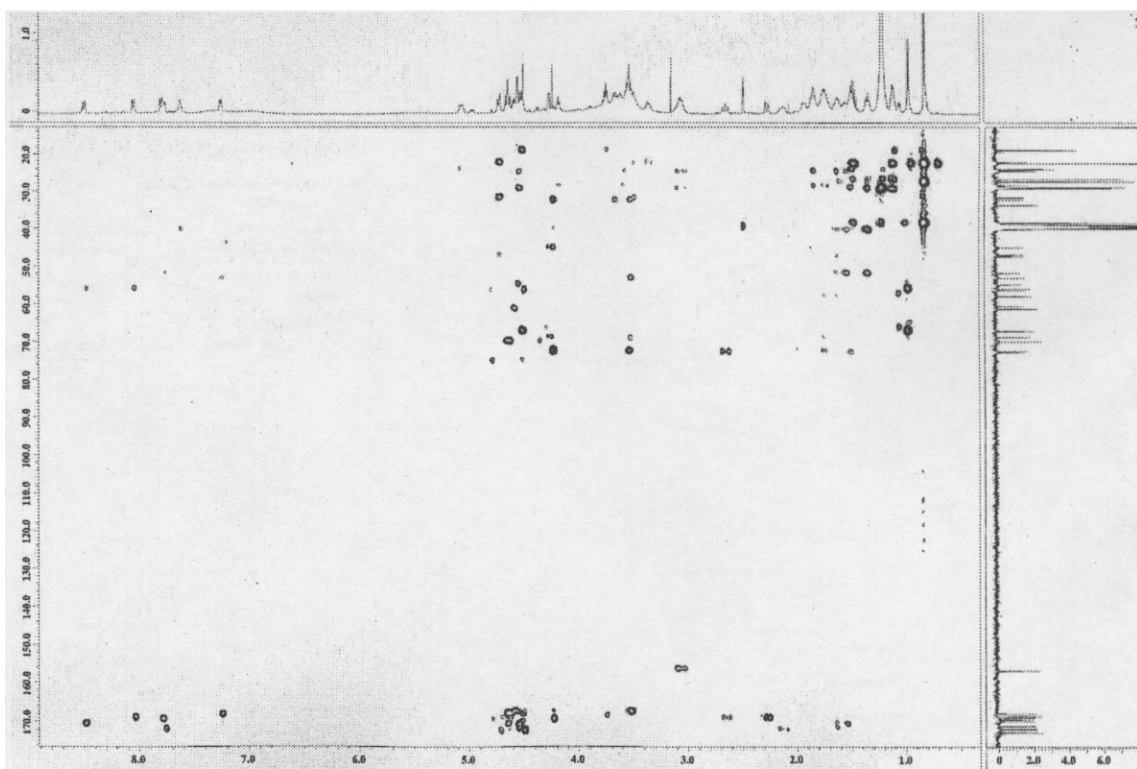


Fig.e-18 ^1H NMR spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$: D_2O (10:1)+NaOH (pH 8.0)

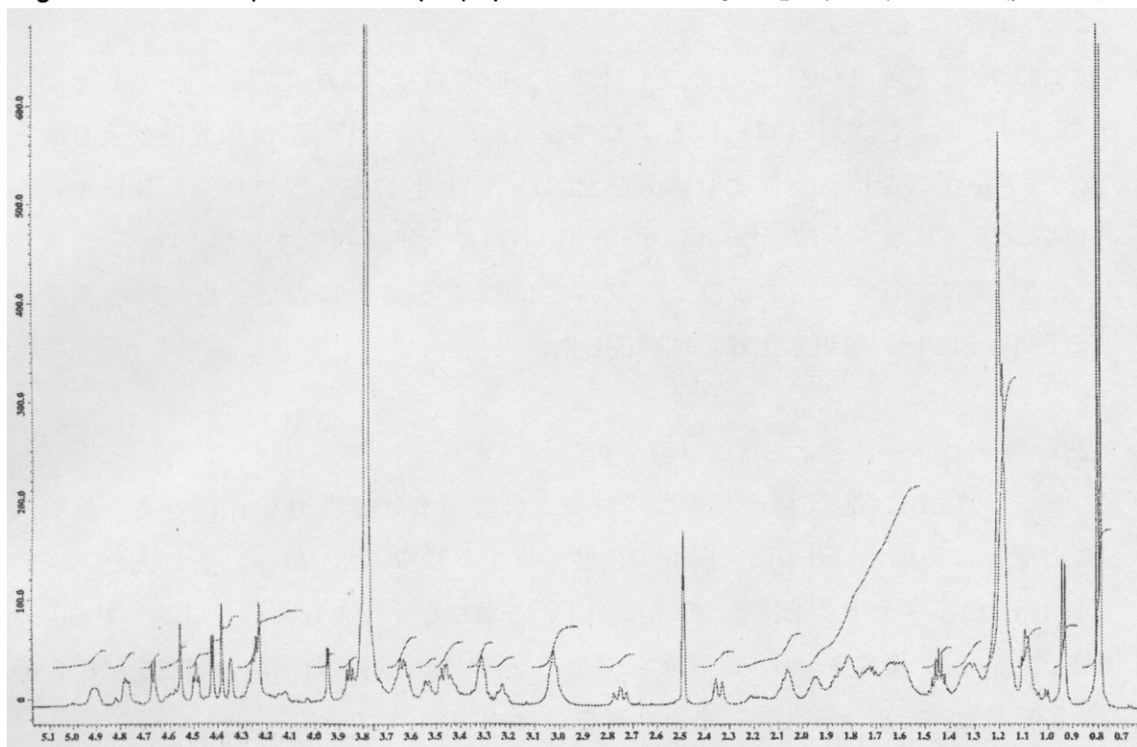
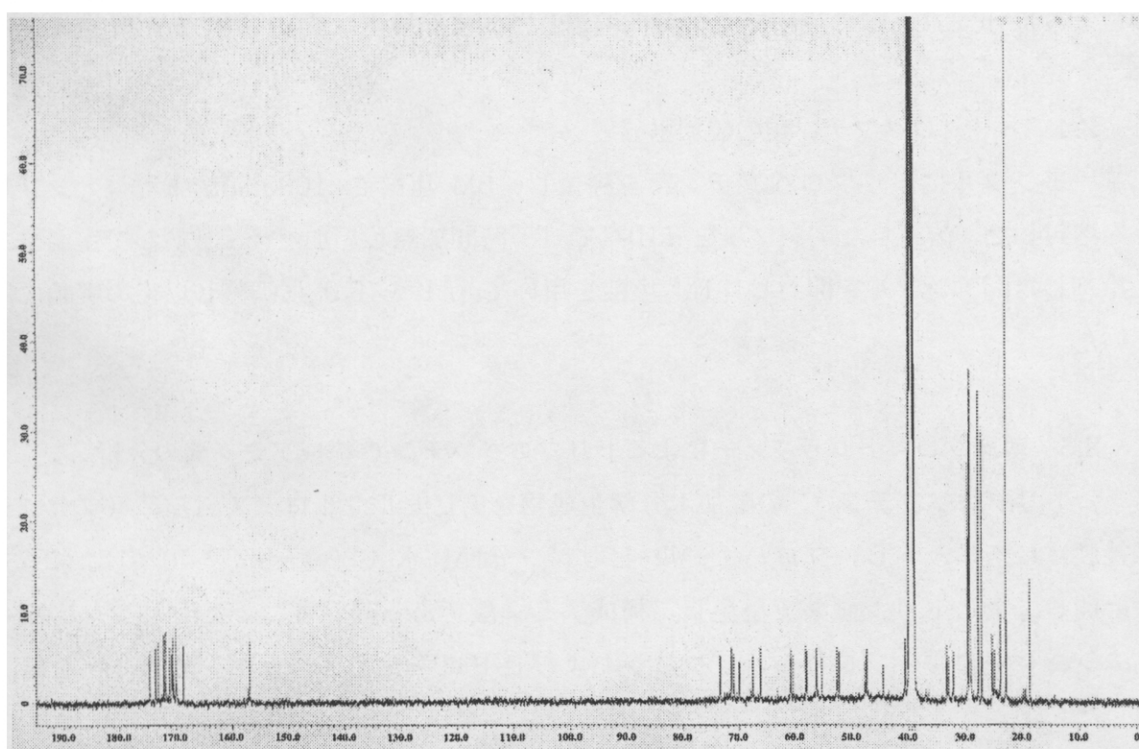


Fig.e-19 ^{13}C NMR spectrum of tripropeptin C in $\text{DMSO}-d_6$: D_2O (10:1) +NaOH (pH8.0)



2.2 試薬

L-アルギニン、L-セリン、L-スレオニン、L-プロリン、D-セリン、D-スレオニン、D-プロリンおよびエリスロ- β -ヒドロキシ-L-アスパラギン酸は和光純薬より購入した。D-アルギニンはシグマより購入した。L-3-ヒドロキシプロリン、スレオ- β -ヒドロキシアスパラギン酸、D-スレオ- β -ヒドロキシアスパラギン酸、DL-アロスレオニン、L-アロスレオニンおよび 1-フルオロ-2,4-ジニトロフェニル-5-L-アラニンアミド (L-FDAA) は東京化成より購入した。

2.3 マーフィー法によるアミノ酸分析

アミノ酸標品もしくはトリプロペプチンの酸加水分解物 0.5 mg をマイクロチューブに秤量し、蒸留水 50 μ L、1 M の炭酸水素ナトリウム水 20 μ L を加えた。さらに 1 % L-FDAA アセトン溶液を 20 μ L 加え、これにキャップを締めて 37°C で 60 分間加熱した。1 M 塩酸を 20 μ L 添加して反応を停止し、得られた混合溶液を減圧乾固した。得られたマーフィー化物である残査を 1 mL のメタノールで溶解し、各 10 μ L を HPLC 分析に使用した。

分析は資生堂社製 ODS カラム (Capcell Pak, UG120, 5 μ m, 150 x 4.6 mm i.d.) を用いて、10~40 % アセトニトリル-0.01M トリフルオロ酢酸の直線的濃度勾配法により毎分 2.0 mL の流速で 30 分間溶出した。また検出は波長 340 nm で行った。

2.4 トリプロペプチン類の酸加水分解

アンプルにトリプロペプチン類を秤量し、6M 塩酸を 1000 μ L 加え、アンプルを溶封した。溶封したアンプルを 110°C で 18 時間加熱し、加熱後、放置して室温まで冷却した。アンプルを開封し、1M 塩酸を用いて pH を 5.0 に調整し以後の実験に用いた。

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

トリプロペプチン C の酸加水分解生成物をアビセルセルロース TLC (フナコシ社製) にスポットし、プロパノール-ピリジン-酢酸-水 (v/v) = 60 : 40 : 12 : 48 で展開しニンヒドリン試薬で呈色し、構成アミノ酸であるスレオニン、セリン、アルギニン、ヒドロキシプロリン、プロリンおよびヒドロキシアスパラギン酸の存在を確認した。

2.6 トリプロペプチンの構成アミノ酸の精製

トリプロペプチン C の酸加水分解物 40 mg (34.7 μ mol) に蒸留水 1 mL を加え、さらに等量の酢酸エチルを加えた。酢酸エチル層は減圧乾固して脂肪酸の分析に用いた。水層は減圧乾固した後、湿容量 8 mL のアンバーライト CG50I (ローム&ハース社製、NH₄ 型) カラムにかけ、25 mL の蒸留水および 1 M アンモニア水で順次溶出した。蒸留水で溶出された画分から、溶出順にヒドロキシアスパラギン酸およびスレオニンの混合物 3.8 mg、セリン 2.4 mg、スレオニン、ヒドロキシプロリンおよびプロリンの混合物 3.0 mg、プロリン 4.0 mg が、またアンモニア水で溶出された画分からアルギニン 1.1 mg が得られた。ヒドロキシアスパラギン酸およびスレオニンの混合物はさらに湿容量 20 mL のアンバーライト CG50I (NH₄ 型) カラムにかけ、蒸留水で溶出してフラクションコレクターにて分画し、溶出順に 2.1 mg のヒドロキシアスパラギン酸と 0.8 mg のスレオニンを単離した。またスレオニン、ヒドロキシプロリンおよびプロリンの混合物は、湿容量 20 mL 微結晶セルロース (フナコシ社製) カラムにかけ、60 mL の 80%、75%、70% および 65% アセトン水で順次溶出した。75% アセトン水溶出画分をさらに湿容量 15 mL 微結晶セルロースカラムにかけ、88% および 85% アセトニトリル水で順次溶出し、85% アセトニトリル水で溶出された画分から 1.3 mg のヒドロキシプロリンを得た。

2.7 ヒドロキシプロリンの立体化学

ヒドロキシプロリンは無色粉末として得られ、分子量、CD スペクトルおよび NMR スペクトルデータは以下のとおりであった。分子量 (FAB-MS) ; m/z 132.09 (M+H)⁺, CD スペクトル; $[\theta]_{240} +80$, $[\theta]_{220} +1980$, $[\theta]_{210} +2980$ (c 0.033, 0.5M HCl). ¹H NMR (重水中、10°C, Fig.e-20); δ 2.06 (m, 2H, H-4), 3.52 (m, 1H, H-5), 3.63 (m, 1H, H-5), 4.14 (d, $J=1.60$ Hz, 1H, H-2), 4.72 (m, 1H, H-3). ¹³C NMR (重水中、10°C, Fig.e-21); δ 32.9 (C-4), 45.0 (C-5), 69.3 (C-2), 74.5 (C-3), 172.0 (C-1).

Fig.e-20 ^1H NMR spectrum of hydroxyproline from tripropeptin C

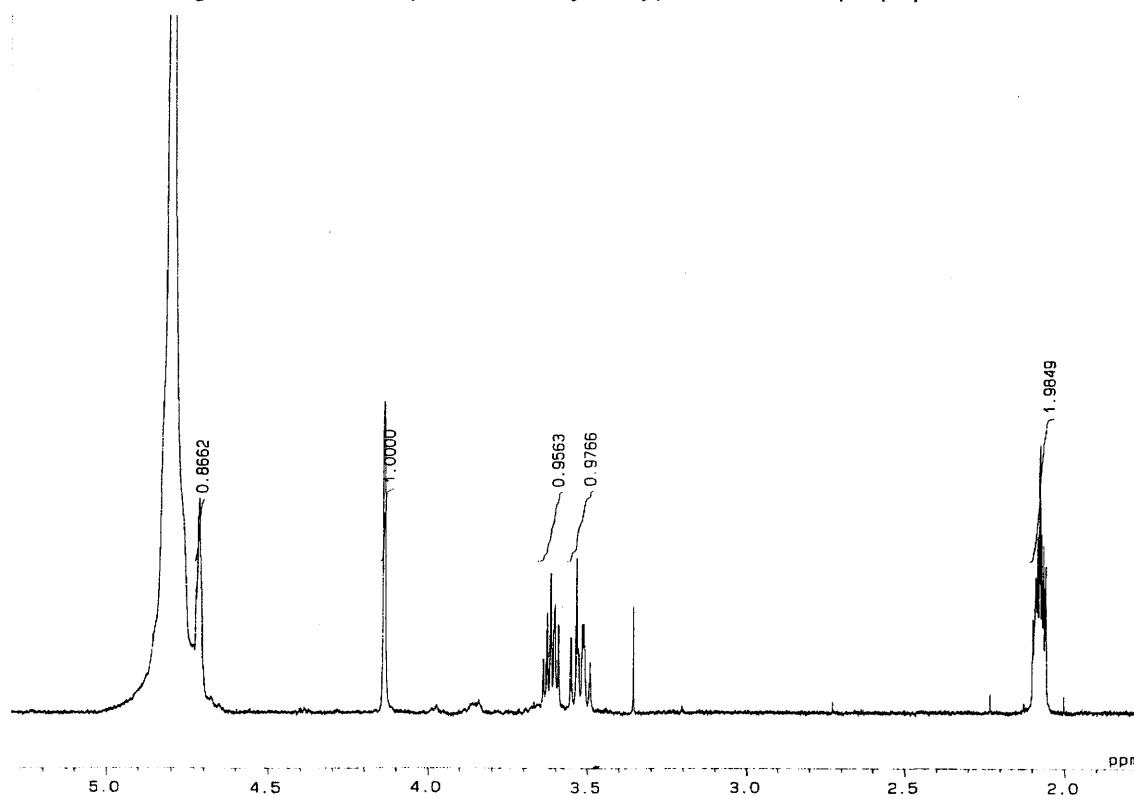
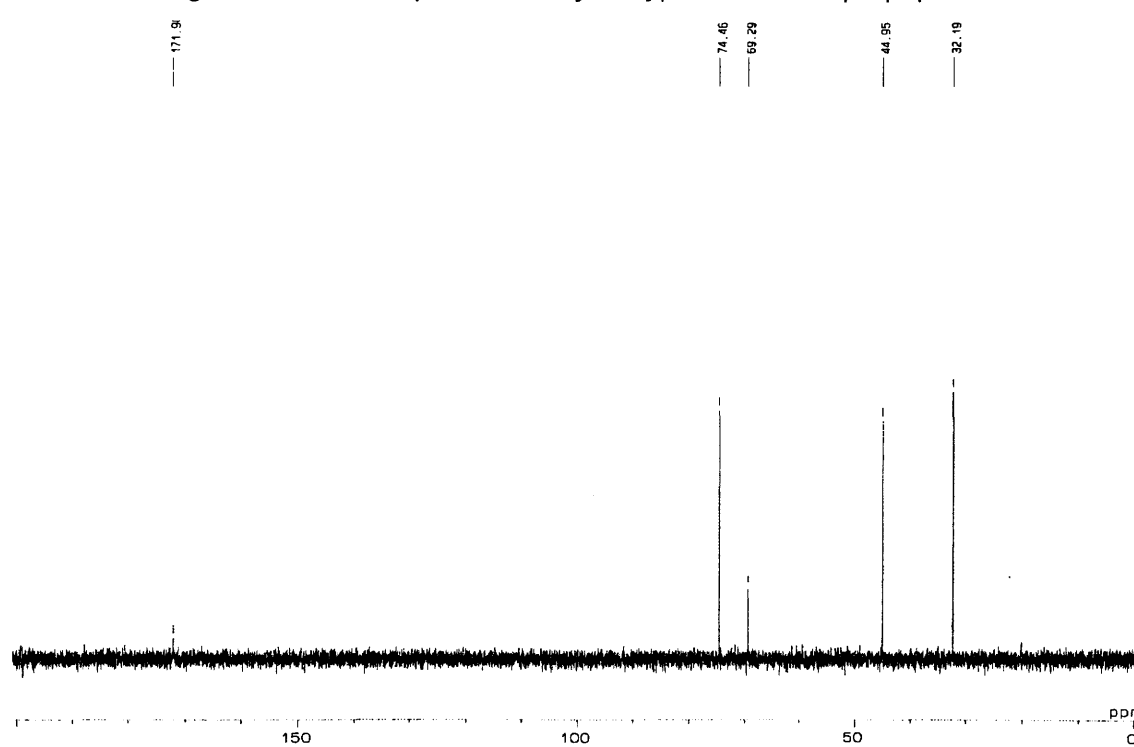


Fig.e-21 ^{13}C NMR spectrum of hydroxyproline from tripropeptin C



2.8 マーフィー法によるアミノ酸分析結果

分析は、2.3 項で示した方法で行った。アミノ酸標品のマーフィー化サンプルの保持時間は以下のとおりであった。

L-アルギニン	13.89 分
D-アルギニン	14.37 分
L-セリン	16.10 分
D-セリン	16.91 分
L-スレオニン	17.01 分
D-スレオニン	19.89 分
L-アロスレオニン	16.75 分
D-アロスレオニン	18.51 分
スレオ- β -L-ヒドロキシアスパラギン酸	17.20 分
スレオ- β -D-ヒドロキシアスパラギン酸	18.46 分
エリスロ- β -L-ヒドロキシアスパラギン酸	18.02 分
エリスロ- β -D-ヒドロキシアスパラギン酸	18.86 分
L-プロリン	20.53 分
D-プロリン	21.60 分

また、トリプロペプチン C の酸加水分解物由来アミノ酸の分析結果は以下のとおりであった。

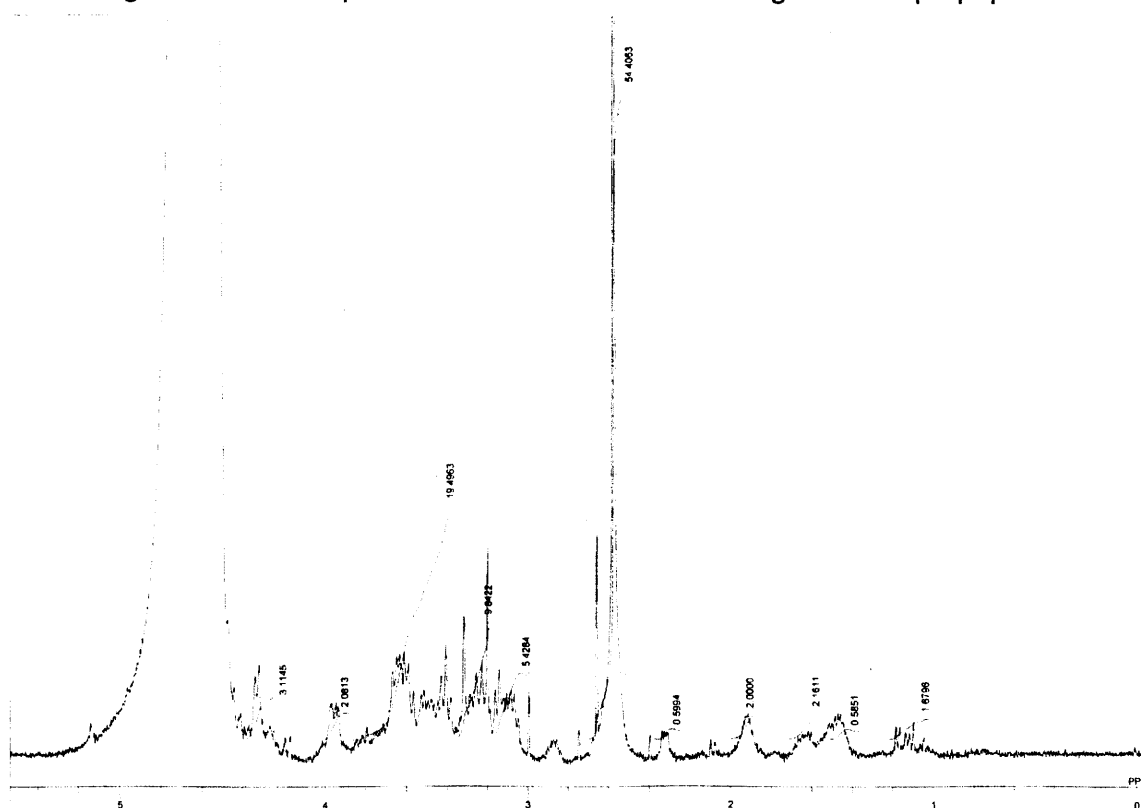
アルギニン	13.89 分
セリン	16.08 分
スレオニン	18.51 分
ヒドロキシアスパラギン酸	17.12、18.40 分
プロリン	20.48、21.63 分

この結果、トリプロペプチン C の構成アミノ酸は、L-アルギニン、L-セリン、D-アロスレオニン、スレオ- β -L-ヒドロキシアスパラギン酸、スレオ- β -D-ヒドロキシアスパラギン酸、L-プロリン、D-プロリンであることがわかった。

2.9 トリプロペプチン C のバーチ還元

液体アンモニアに溶解したトリプロペプチン C 37.0 mg (32.1 μmol) に金属ナトリウム 450 mg を添加し、 -30°C で 5 分間反応させた後、2.5 g の酢酸アンモニアを添加することで反応を停止した。残渣を減圧乾固後に 30 mL の蒸留水に溶解し、湿容量 80 mL の Dowex (50w x 2, H 型、ダウ・ケミカル社製) カラムにのせ、240 mL の蒸留水で洗浄した後、240 mL の 1 M アンモニア水で溶出した。溶出液を減圧乾固し、少量の蒸留水で溶解してダイアイオン HP-20 カラムにのせ 30 mL の蒸留水、50% メタノール水およびアセトンで順次溶出し、蒸留水で溶出される画分から 2.17 mg (2.96 μmol 、収率 9.22%) の還元された断片を得た。質量分析の実測値は HRESI-MS m/z 732.2844 ($\text{M}-\text{H}^-$) であり、計算値は 732.2800 for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_9\text{O}_{15}$ であった。なお、目的の化合物の追跡は、ライドンスミスおよびニンヒドリン呈色試験を指標に行った。また、得られた断片の ^1H NMR スペクトルを Fig.e-22 に示した。

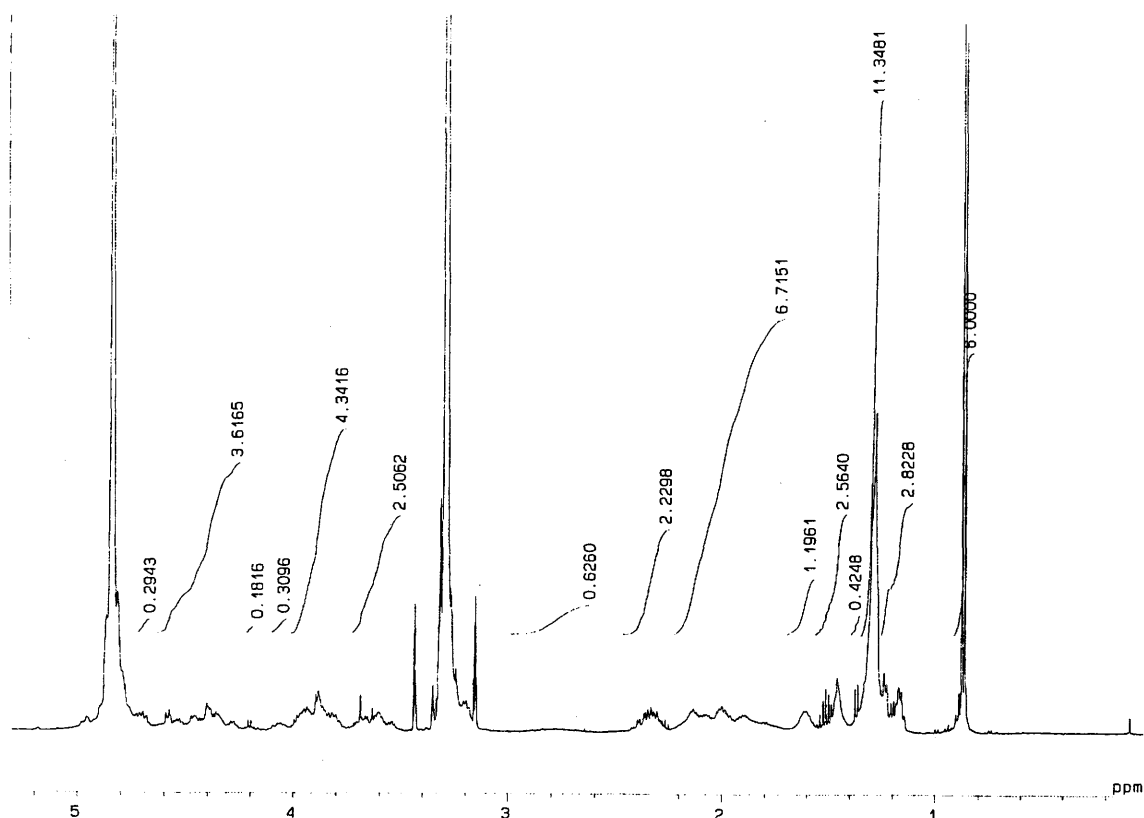
Fig.e-22 ^1H NMR spectrum of the Birch-reduction fragment of tripropeptin C



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

50 μL のジメチルホルムアミドおよび 10 μL のテトラヒドロフランに溶解したトリプロペプチンC 10 mg (8.67 mol) に 2 mg のリチウムボロハイドライドを添加し、還流下 4 時間反応を行った。反応液を室温まで冷却した後、1 M 塩酸にて反応液を中和し、減圧乾固した。残査を少量のメタノールに溶解し、質容量 20 mL のセファデクス LH-20 (ファルマシア社製) カラムにのせ、メタノールで溶出した。ライドンスミス呈色反応で陽性な画分をさらに、資生堂社製 ODS カラム (Capcell Pak, UG120, 5 μm , 150 x 4.6 mm i.d.) に吸着させ、35% アセトニトリル水により毎分 2.0 mL の流速で溶出し、無色粉末 7.1 mg (6.14 mol, 収率 70.82%) のトリプロペプチンC誘導体を得た。物理化学データはつぎのとおりであった。実測値 HRESI-MS m/z 1158.6422 ($M+H$)⁺ (計算値 1158.6362 for $C_{51}H_{87}N_{11}O_{19}$)。赤外吸収 (KBr 錠剤法); 3438, 2927, 1677, 1635, 1384, 1207, 1182, 1133 cm^{-1} 。得られたトリプロペプチンC還元体の ^1H NMR スペクトルを Fig.e-23 に示した。

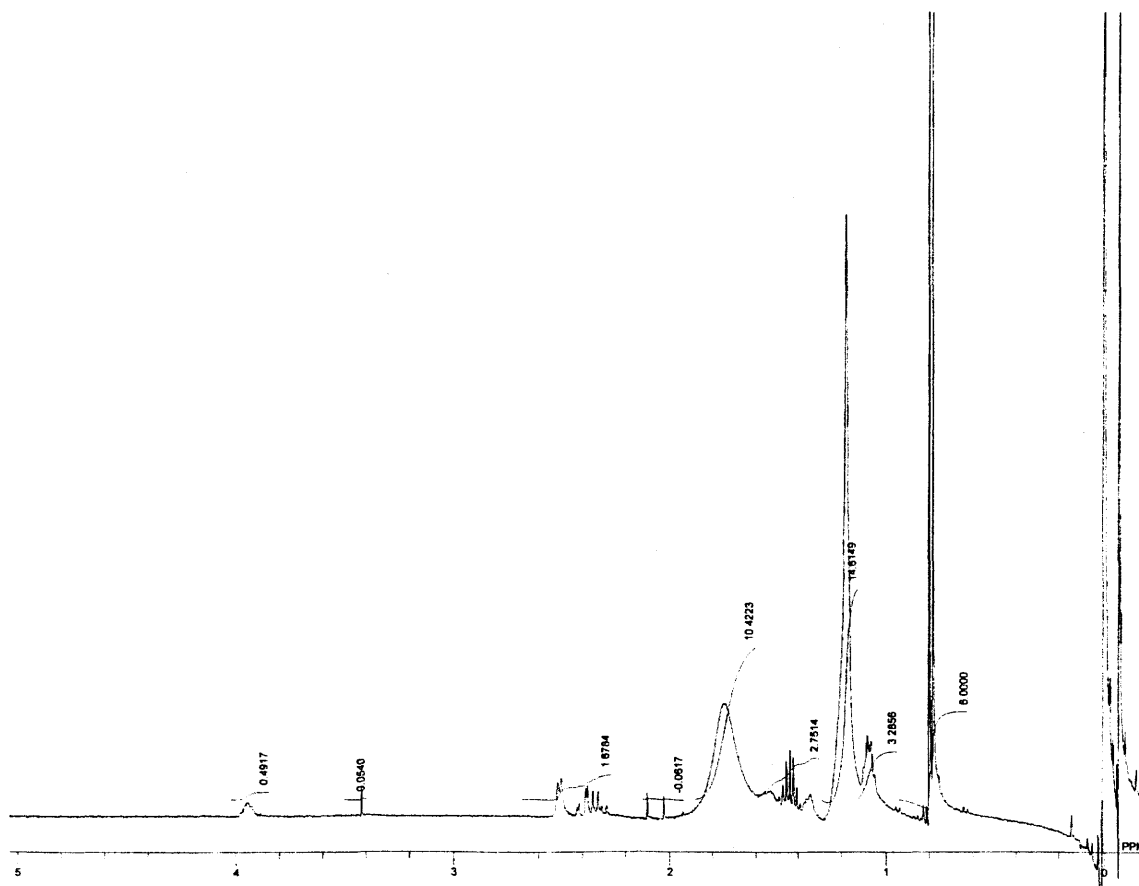
Fig.e-23 ^1H NMR spectrum of the LiBH_4 -reduction derivative of tripropeptin C in CD_3OD



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

2.4 項で得られた酢酸エチル抽出物を減圧乾固後、ヘキサンに溶解して湿容量 10 mL のシリカゲルカラムにのせ、各 30 mL のヘキサン-酢酸エチル = 3 : 1、2 : 1、1 : 1 および 1 : 2 の混合液で溶出し、ヘキサン-酢酸エチル = 1 : 2 の溶出画分を集めて減圧乾固し、4.0 mg の 3-ヒドロキシ-13-メチルテトラデカン酸を得た。物理化学的データは次のとおりであった。比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -7.7^\circ$ (c 0.13, CHCl_3)。分子量 APCI-MS; m/z 257 (M-H) $^-$ 。 ^1H NMR (重クロロホルム中, Fig.e-24); δ 0.78 (6H, d, $J=6.6\text{Hz}$), 1.04~1.52 (19H, m), 2.31 (1H, dd, $J=16.6$ and 9.0Hz 2-H $_a$), 2.40 (1H, dd, $J=16.6$ and 3.2Hz 2-H $_b$) and 3.96 (1H, m 3-H)。

Fig.e-24 ^1H NMR spectrum 3-hydroxy-13-methyltetradecanoic acid from tripropeptin C



第3章 トリプロペプチン類の生物活性

3.1 培地および試薬の調製

全ての培地は調製後、121℃、15 分間高圧蒸気滅菌した。

ミュラー・ヒントン寒天培地

ミュラー・ヒントン・アガー (ディフコ) 3.8%

蒸留水

pH 7.3

NB 培地

NUTRIENT BROTH (ディフコ) 0.8%

蒸留水

pH 7.4

NB 寒天培地

ポリペプトン (和光) 1.0%

肉エキス (極東) 1.0%

塩化ナトリウム (日本薬局方) 0.2%

寒天 (和光) 1.4%

蒸留水

pH 7.0

NB + 20% シュクロース培地はシュクロース (和光) 40 gを NB 培地にて溶解して全量 200 mLとした。

また薬剤の調製および保管は以下のように行った。

トリプロペプチン C は、精製品を DMSO (シグマ) に溶解し 10 mg/mL とし、-20℃ で保存した。用時融解し蒸留水または DMSO で希釈した。

バンコマイシンは、バンコマイシン塩酸塩 (シグマ) を滅菌蒸留水に溶解し 10 mg/mL とし、-20℃ で保存した。用時融解し滅菌蒸留水で希釈した。

ヘキサクロロフェンは、ヘキサクロロフェン (シグマ) を DMSO に溶解し 10 mg/mL とし、-20℃ で保存した。用時融解し滅菌蒸留水または DMSO で希釈した。

リネゾリドは、リネゾリド（ファルマシアアップジョン社製）を滅菌蒸留水に溶解し10 mg/mLとし、-20℃ で保存した。用時融解し滅菌蒸留水で希釈した。

クロラムフェニコールは、クロラムフェニコール（山ノ内製）をDMSO（シグマ）に溶解し10 mg/mLとし、-20℃ で保存した。用時融解し蒸留水または DMSO で希釈した。

3.2 溶液の調製

10 倍リン酸緩衝溶液 (10 x PBS) は、リン酸水素二ナトリウム 12 水塩 (和光) 2.9 g、リン酸二水素カリウム (和光) 0.204 g、塩化ナトリウム (和光) 8.19 g および塩化カリウム (国産化学) 0.224 g を蒸留水に溶解して全量 100 mL とし、この溶液を 121℃、15 分高圧蒸気滅菌後、4℃ で保存した。

40% シュクロース溶液は、シュクロース 4 g を蒸留水で全量 10 mL とし、この溶液を 121℃、15 分高圧蒸気滅菌後、4℃で保存した。

1M トリス塩酸 (pH 7.6) は、トリズマ・ベース (シグマ) 12.11 g を蒸留水で全量 100 mL とし、pH 7.6 に調製し、この溶液を 121℃、15 分高圧蒸気滅菌後、室温で保存した。

Digestion buffer (pH 7.6) は、0.05M トリス塩酸と 0.145M 塩化ナトリウムおよび 20% シュクロースの混液とした。

ライソスタフィン溶液は、ライソスタフィン (シグマ) 1 g を滅菌水に溶解し 680 µg/mL とし、50 µL ずつ分注して -20℃ で保存した。ライソスタフィン混合液は 34 µg/mL ライソスタフィン溶液と 0.7 U/mL の DNase I の混液とした。

3.3 RI 標識化合物および放射活性測定用試薬の調製

[U-¹⁴C]-グリセロール (アマシャム: 5.25 GBq/mmol : 1.85 MBq/mL : 50 µCi/mL), [³H]-チミジン溶液 ([³H]-TdR) (アマシャム: 925 GBq/mmol, 37 MBq/mL), L-[4,5-³H]-ロイシン溶液 ([³H]-Leu) (アマシャム: 2.07 TBq/mmol, 37 GBq/mmol) および [1(2)-¹⁴C] 酢酸ナトリウム溶液 ([¹⁴C]-AcONa) (アマシャム: 2.11 GBq/mmol, 7.40 MBq/mL) は用時蒸留水で希釈した。

[³H]-ウリジン溶液 ([³H]-UR) は [5-³H]-ウリジン (アマシャム: 999 Gbq/mmol, 37 MBq/mL) 250 µL にエタノール (シグマ、特級) 250 µL を加え 18.5 MBq/mL (50% エタノール) 溶液を調製し、用時蒸留水で希釈した。

N-アセチル-D-[1-³H] グルコサミン ([³H]-GlcNAc) 溶液は N-アセチル-D-[1-³H]グルコサミン (アマシャム: 307 GBq/mmol, 37 MBq/mL) 250 µL にエタノール

250 μ L を加え 18.5 MBq/mL (50% エタノール) 溶液を調製し、用時蒸留水で希釈した。

5% トリクロロ酢酸溶液 (5% TCA 溶液) は、トリクロロ酢酸 (岩井化学薬品) 50 g を蒸留水に溶解し、全量を 1000 mL とした。

液体シンチレーターは、ULTIMA GOLD F (パッカード) および AQUASOL-2 (パッカード) を用いた。

3.4 抗菌活性の測定

抗菌活性は、日本化学療法学会標準法にしたがい寒天平板希釈法で行った。エンテロコッカス、ストレプトコッカスを除く細菌に対する抗菌活性は、ミュラー・ヒントンス天培地を用いて 37℃ で 18 時間 (*Mycobacterium smegmatis* ATCC607 のみ 42 時間) 培養して測定した。エンテロコッカス、ストレプトコッカスに対する抗菌活性は、5% 羊血清添加ミュラー・ヒントンス天培地を用いて 37℃ で 18 時間培養して測定した。

3.5 トリプロペプチン C 耐性株の出現頻度試験

液体希釈法に従い、2 倍希釈系列のトリプロペプチン C、ゲンタミシンもしくはリネゾリドの溶解した肉エキス培地に黄色ブドウ球菌スミス株の種母培養液を 0.1% 接種し、18 時間 37℃ で培養した。培養後に菌の生育の認められた最高試薬濃度の菌液を新たな種母菌液として、さらに 2 倍希釈系列のトリプロペプチン C、ゲンタミシンもしくはリネゾリドの溶解した肉エキス培地に接種し、18 時間 37℃ で培養した。これを繰り返すことで黄色ブドウ球菌スミス株の感受性の変化を測定し、変化の度合いを指標に耐性菌の出現頻度を調べた。

3.6 急性毒性試験

界面活性剤トウイーン 80 を少量加えた 10% DMSO 水溶液にトリプロペプチン A, C および D を溶解し、300 mg/kg の濃度から 2 倍希釈系列で ICR マウス 雌・4 週齢 (約 20 g、日本チャールズリバー) に静脈内に投与し、14 日間観察した。その後、生存したマウスを解剖し、各臓器を肉眼で観察して判定を行った。

3.7 亜急性毒性試験

亜急性毒性は主成分であるトリプロペプチン C を用いて行った。トリプロペプチン C を界面活性剤トウイーン 80 を少量加えた 10% DMSO 水溶液に溶解し、100 mg/kg の濃度で一群 5 匹の ICR マウス ♀・5 週齢（日本チャールズリバー）に 0 日から 13 日目まで 14 日間静脈内に連続投与し、経時的に体重および血球数を測定した。また 14 日後の各臓器重量を測定した。血球数は Sysmex（東亜医用電子株式会社製）自動血球計数装置 MICRO CELL COUNTER F-800 を用いて測定した。

3.8 マウス全身感染モデルにおける治療試験

マウスは ICR・♀・4 週齢（約 20 g、日本チャールズリバー）を使用し、1 群 5 匹で試験をした。10% スキムミルク中で凍結保存（-80℃）した黄色ブドウ球菌スミス株を、トリプト・ソーヤ・プロス（ニッスイ社製）液体培地で 37℃、18 時間培養し、この菌液を滅菌生理食塩水で希釈後、ガストリック・ムシン（ディフコ社製）と等量混合し、0.5 mL/mouse 量腹腔内投与した。菌液接種の 2 時間後に、滅菌生理食塩水で希釈したサンプルを 0.25 mL/mouse 量皮下投与し、以降 5 日間のマウスの生存を確認した。なおサンプルは、少量のトウイーン 80 を加えた 10% DMSO 水溶液に溶解し、生理食塩水を用い 4 倍希釈系列で希釈したものを投与液として用いた。

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及ぼす影響

L 字型試験管 3 本に NB 培地 9.5 mL と黄色ブドウ球菌スミス株の種母培養液 0.5 mL をそれぞれ加え、各種濃度のクロラムフェニコール、トリプロペプチン C 単独もしくは併用または DMSO を加え 37℃ で震盪培養し、波長 660 nm で経時的に吸光度を測定した。クロラムフェニコール、トリプロペプチン C 併用実験は、10 μ M のクロラムフェニコール添加 10 分後に 2.5 μ M のトリプロペプチン C を添加し、37℃ で震盪培養し、波長 660 nm で経時的に吸光度を測定した。

また生菌数の測定は以下のように行った。培養開始から 0、2、4、6 時間後に L 字型試験管から培養液を 100 μ L ずつ無菌的に採取し、生理食塩水にて 10 倍希釈系列を調製した。調製した 10 倍希釈系列の培養液をそれぞれ 3 枚の NB 寒天培地に 100 μ L 滴下し、菌液をコンラージ棒で均一になるよう広げた。菌液を塗抹した寒天平板は、37℃ で 18 時間静置培養後、生菌数を測定した。

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

L 字型試験管 3 本に NB 培地 9.5 mL と黄色ブドウ球菌スミス株の種母培養液 0.5 mL をそれぞれ加え震盪培養し、波長 660 nm における吸光度が 0.1 に達した菌液を 1.5 mL アシストチューブに 150 μ L ずつ分注した。種々の濃度のトリプロペプチン C を 2 μ L を加え、室温で 10 分間静置した後、 $[^3\text{H}]$ -GlcNAc、 $[^{14}\text{C}]$ -Glycerol、 $[^{14}\text{C}]$ -AcONa、 $[^3\text{H}]$ -TdR、 $[^3\text{H}]$ -UR または $[^3\text{H}]$ -Leu を終濃度がそれぞれ 2.5 Bq/ μ L, 1.82 Bq/ μ L, 53.7 Bq/ μ L, 2.5 Bq/ μ L, 4.9 Bq/ μ L および 22.2 Bq/ μ L となるように加えた。37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分インキュベートした後、それぞれのチューブの菌液を 100 μ L ずつ円形濾紙（ワットマン 3 mm）に染み込ませた。この濾紙を冷 5 % TCA に浸し 0 $^{\circ}\text{C}$ で 40 分静置した後、5 % TCA で 3 回洗浄し、酸可溶画分を除去した。TCA 除去後、濾紙をエタノールに浸し 0 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間静置し、さらにエタノールで 2 回洗浄した。120 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間乾燥し、ULTIMA GOLD F 5 ml 中に沈め、液体シンチレーションカウンター（Alola, LIQUID SCINTILLATION COUNTER LSC-5100）で酸不溶画分の放射活性を測定した。なお実験は 3 連で行った。

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

L 字型試験管 5 本（各 10 mL）で黄色ブドウ球菌スミス株の菌液を震盪培養し、波長 660 nm における吸光度が 0.3 に達した菌液を遠心して菌体を得た。この菌体を 1 x PBS で洗浄した後、Digestion buffer 940 μ L に懸濁し、ライソスタフィン溶液 60 μ L を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一時間静置して細胞壁を削除したプロトプラストを作成した。プロトプラストの形成は波長 660 nm における吸光度の減少により確認した。次に、プロトプラストに及ぼすトリプロペプチン C の影響を測定した。小試験管 2 本に NB + 20 % シュクロース溶液 200 μ L、40 % シュクロース溶液 400 μ L および蒸留水 400 μ L 加え混合液を調製し、一方の試験管に終濃度 2.5 μ M となるようトリプロペプチン C を、もう一方にはコントロールとして DMSO を加えた。両試験管にプロトプラスト溶液を 50 μ L 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で静置して経時的に波長 420 nm における吸光度を測定した^{59,60)}。

3.12 トリプロペプチン C の膜透過性に対する影響

L 字型試験管 5 本で黄色ブドウ球菌スミス株の菌液を震盪培養し、波長 660 nm における吸光度が 0.1 に達した菌液を遠心して菌体を得た。この菌体を NB 培地 3.5 mL に懸濁し 2 x 10⁷ cells/mL とした後、さらにこの菌液を 600 μ L ずつ分注し、トリプロペプチン C 終濃度 1.3 μ M となるようを加えて室温で 10 分間静置した。この菌

液に $[^{14}\text{C}]\text{-AcONa}$ または $[^3\text{H}]\text{-GlcNAc}$ を終濃度および比活性がそれぞれ 1.68 Bq/ μL , 37 MBq/mmol および 1.2 Bq/ μL , 307 Bq/mmol となるよう加え 5~90 秒間後に非放射性的の 17.5 mM の AcONa 溶液または 1 mM の GlcNAc 溶液を 400 μL 加えて標識前駆体の菌体への取り込みを停止させた。この溶液 900 μL を シリコンオイルとパラフィンオイル (22:3) の混合オイル 150 μL に重層して 15,000 rpm、4℃ で 1 分間遠心し、チューブの底に菌体を沈めた。上層の水層を吸引除去しオイル層表面およびチューブ内壁を 900 μL の蒸留水で 2 回洗浄後、オイル層を吸引除去した。ライソスタフィン溶液 50 μL に菌体を溶解し菌体内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。この時、菌液 600 μL に $[^{14}\text{C}]\text{-AcONa}$ (157 Bq/ μL , 736 Bq/mmol) または $[^3\text{H}]\text{-GlcNAc}$ (1.8 Bq/ μL , 1.85 MBq/mmol) 400 μL を加え、同様の操作により菌体内の放射活性を測定したものをバックグラウンドとした。また、実験は 3 連で行った。

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

L 字型試験管で黄色ブドウ球菌スミス株の菌液を震盪培養し、波長 660 nm における吸光度が 0.1 に達した菌液を 3.5 mL チューブ 2 本に 2 mL ずつ分注した。一方のチューブにトリプロペプチンC、ヘキサクロロフェンまたはバンコマイシンを加え 10 分間インキュベート後、 $[^3\text{H}]\text{-GlcNAc}$ または $[^{14}\text{C}]\text{-AcONa}$ を終濃度がそれぞれ 4.1 Bq/ μL および 44.4 Bq/ μL となるよう加えた。37℃ でインキュベートし、各チューブから経時的に菌液を 100 μL ずつ円形濾紙に染み込ませた。この濾紙を冷 5 % TCA に浸し 0℃ で 40 分間静置した後、5 % TCA およびエタノールで洗浄後、酸不溶画分の放射活性を測定した。

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

液体希釈法におけるトリプロペプチンC、バンコマイシンおよびレボフロキサシンの最小阻害濃度を求め、それぞれ 1.0、1.0 および 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。L 字型試験管で黄色ブドウ球菌スミス株の菌液を震盪培養し、波長 660 nm における吸光度が 0.1 に達した菌液を 24 本用意した。そこにトリプロペプチンC、ヘキサクロロフェンまたはバンコマイシンを最終濃度が最小阻害濃度の 0、1、4、8 倍濃度となるよう添加し、0、2、4、6 時間後に CFU (colony forming unit) を測定した。実験は 3 連で行った。

3.15 血中濃度の測定

界面活性剤トウイーン 80 を少量加えた 10% DMSO 水溶液にトリプロペプチン A, C および D を溶解し、一群 3 匹の ICR マウス ♀・5 週齢（日本チャールズリバー）に 100 mg/kg の濃度で皮下投与し、経時的に採血した。採決後、速やかに室温にて 10,000 rpm の速度で 10 分間遠心分離し上清を回収した。さらに遠心分離処理を 2 回繰り返す、得られた上清を HPLC にて血中濃度の分析を行った。トリプロペプチン類の分析は昭和電工社製カラム (Shodex RSpak, DS-413, 5 μ m, 150 x 4.6 mm i.d.) を用いて、10~70% アセトニトリル-0.01M トリフルオロ酢酸の直線的濃度勾配法により毎分 2.0 mL の流速で 20 分間溶出した。また検出は波長 205 nm で行った。

3.16 血清中での遊離型濃度測定

トリプロペプチン A, C および D の血清中での遊離型割合は以下のように解析した。トリプロペプチン A, C および D を 1.5 mL 容のエッペンドルフチューブに秤量し、最終濃度 2% となるよう DMSO を添加して溶解した。これに滅菌蒸留水を加え 1000 μ g/mL となるよう調製した。得られた化合物溶液 100 μ L に等量のマウス血清を添加し、10 分間 37℃ でインキュベートした。この溶液 100 μ L をミリポア社製遠心フィルター（分子量 5000）にのせ、10℃、13,000 rpm で 45 分間遠心処理し、通過液を HPLC にて分析した。血清無添加で同様の操作をしたものを対照として遊離型の比率を求めた。

また、血清中における化合物の安定性に関しては以下のように検討した。先に調製した化合物溶液 100 μ L と等量のマウス血清を混合し 10 分間 37℃ でインキュベート後、混合液の 4 倍量のメタノールを添加して化合物を抽出し、10℃、13,000 rpm で 45 分間遠心処理後の上清を HPLC にて分析した。血清無添加で同様の操作をしたものを対照として回収率を求め、血清中での化合物の化学的安定性を検討した。

総括

20 世紀最大の発見といわれる抗生物質により、感染症の脅威は著しく低下し、先進国において平均寿命は飛躍的に伸びた。その一方で、医療の進歩および高齢化社会の到来により易感染性宿主が増加し、日和見感染菌が問題となっている。さらに、抗生物質の汎用により薬剤耐性菌が蔓延し、院内感染における薬剤耐性菌は大きな社会問題となっている。薬剤耐性菌の中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、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し、有効な薬剤がほとんどないことから、最も重要な常在菌として認知されている。MRSA に対する切り札的抗菌薬であるバンコマイシンに対して耐性を獲得した MRSA (VRSA) が臨床から分離されるようになり、VRSA を含む MRSA に有効な新薬の開発は急務となった。

そこで次世代の VRSA を含む MRSA に有効な化合物を微生物培養液中から探索した。探索源として利用した微生物代謝産物、いわゆる天然有機化合物は生理活性物質の宝庫と言われ、ペニシリンを始め数多くの薬剤が実用化されており、また、有機合成的手法では合成の困難な化合物や人知を超越した新規な骨格構造を得るという長所がある。新規骨格化合物は既存薬と作用機序が異なる可能性が高く、耐性菌克服の観点から微生物代謝産物は薬剤耐性菌に有効な新規化合物の探索源として相応しい。探索の結果、沖縄県の土壌より分離したライソバクター属細菌 BMK333-48F3 株の生産する 6 種の新規リポペプチド系化合物トリプロペプチン類を発見し、トリプロペプチン類の構造解析ならびに抗菌活性に関する検討を行った。

第 1 章では、次世代の新規抗 MRSA 薬の創製を目指し、VRSA を含む MRSA に有効な化合物を微生物培養液中から探索した。その結果、土壌細菌 BMK333-48F3 株の培養液中に 6 種の活性成分を見だし、トリプロペプチン A, B, C, D, E および Z と命名した。生産菌である BMK333-48F3 株は、16S rRNA の部分塩基配列、培養性状ならびに生理生化学性状よりライソバクター属細菌であることを明らかにした。本菌の培養液より、溶剤抽出、HP-20、シリカゲルカラムおよび CHP20P カラムクロマトグラフィーを用いて活性成分を精製し、6 種のトリプロペプチン類を単離した。

第 2 章では、トリプロペプチン類の物理化学的性状ならびに構造解析に関して述べた。トリプロペプチン類は呈色反応、IR, 各種 NMR スペクトラムから、グアニジル基とエステル結合を有するペプチド系化合物であることが示唆された。さらに各種 NMR スペクトルの解析によりトリプロペプチン類の構造解析を行い、平面構造を決定した。また絶対構造の決定は、以下のように行った。すなわち構成アミノ酸の絶対

構造をマーフィー法により明らかにし、ヒドロキシプロリンおよび脂肪側鎖の立体は、酸加水分解物の解析により決定した。トリプロペプチン分子中に2分子ずつ存在する立体の異なるプロリンおよびヒドロキシアスパラギン酸の識別は、有機化学的に適切な断片へと変換し、得られた断片を解析することで明らかにした。

第3章ではトリプロペプチン類の生物活性に関して検討した。抗菌試験の結果、トリプロペプチン類はグラム陽性細菌に強い抗菌力を示し、一方、グラム陰性菌、抗酸菌および真菌には抗菌力を示さなかった。トリプロペプチン類では、脂肪側鎖の短い Z および A 成分は弱い抗菌力を示し、脂肪側鎖の長い B, C, D および E 成分では薬剤耐性菌を含むグラム陽性細菌に強い抗菌力を示した。また人工的にトリプロペプチン耐性菌の作成を行ったところ、既存薬に比べ耐性菌の出現率が低いことが示された。さらにトリプロペプチン類は哺乳動物細胞に細胞毒性を示さず、マウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおいて優れた治療効果を示したが、トリプロペプチン類の治療効果は抗菌力から推測されるそれらと一致しなかった。

このようにトリプロペプチン類の生物活性を評価する過程で、2つの興味深い知見が得られた。すなわち、トリプロペプチン耐性菌の出現率が低いこと、ならびにマウスの黄色ブドウ球菌全身感染モデルにおいて抗菌力と治療効果が一致していなかったことである。

解析の結果、前者はトリプロペプチン C が脂質および細胞壁合成という2つの合成系を標的としているため、耐性菌の出現率が低いと考えられた。また後者は、トリプロペプチン類の成分間での構造上の差異である脂肪側鎖の長さの違いによって血清中での挙動が大きく異なり、治療効果に影響を与えることを明らかにした。

以上のように、新規抗 MRSA 薬創製を目指し、微生物培養液より MRSA・VRSA に有効な化合物を探索した結果、新規リボペプチド系化合物群トリプロペプチン類を発見した。トリプロペプチン類は、薬剤耐性菌を含むグラム陽性細菌に強い抗菌活性を示し、動物実験で有効性が確認され、さらに複数の作用標的を持つことから新薬候補化合物として、またリード化合物として今後の創薬に向けた展開が期待される。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇切なる御指導、御高配を賜りました東京大学薬学部 教授 関水 和久 博士に深く感謝致します。また本論文の御校閲と御教示を賜りました東京大学薬学部 教授 福山 透 博士、同助教授 徳山 英利 博士、同助教授 藤井 勲 博士ならびに同助教授 折原 裕 博士に心より感謝致します。

本研究をまとめるに際し、御指導、御鞭撻を賜りました財団法人微生物化学研究会 理事長 野々村 禎昭 博士ならびに微生物化学研究センター センター長 赤松 穰 博士に深く感謝の意を表します。

また本研究の遂行にあたり、貴重な御助言、御指導を賜りました元微生物化学研究所 所長 竹内 富雄 博士に深く感謝致します。

本研究にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました微生物化学研究センター 副センター長 西村 吉雄 博士ならびに元微生物化学研究所 部長 浜田 雅 博士に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり御指導、御助言を賜りました元微生物化学研究所 長縄 博 博士、微生物化学研究センター ユニット長 安達 勇光 博士、同ユニット長 五十嵐 雅之 博士に深謝致します。本研究において、探索や精製をはじめ多岐にわたり御指導を頂きました元微生物化学研究所 池田 孝子氏に深く感謝致します。

本研究において、生産菌の同定については微生物化学研究センター 服部 聖子氏、木下 直子氏に、機器分析については同センター 高橋 良和 博士、澤 竜一 博士、久保田 由美子氏に、構造解析については日吉創薬化学研究所 廣沢 世平 博士、沼津創薬医科学研究所 池田 大四郎 博士ならびに微生物化学研究会 村岡 靖彦 博士に、生物活性の評価については昭和薬科大学名誉教授 堀 誠 博士、同教授 土屋 香誉子 博士、同講師 池野 聡一 博士、沼津創薬医科学研究所 増田 徹氏、大庭 俊一氏、川田 学 博士、井上 裕幸氏、微生物化学研究センター 細川 信夫 博士、野坂 千里氏に多大なる御協力を頂きました。心より感謝致します。

最後に、微生物化学研究所 旧菌学、微生物化学研究センター、沼津創薬医科学研究所ならびに日吉創薬化学研究所の皆様にも大変お世話になりました。深く感謝致します。

参考文献

- 1) E. P. Abraham, E. Chain, C. M. Fletcher, A. D. Gardner, N. G. Heatly, M. A. Jennings & H. W. Floorey: Further observations on penicillin. *Lancet*, **241**: 177-188, 1941
- 2) G. Wallmark: The production of penicillinase in *Staphylococcus aureus pyogenes* and its relation to penicillin resistance. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **34**: 182-190, 1954
- 3) 平松啓一: MRSA と VRSA. 医学のあゆみ, **209**: 510-515, 2004
- 4) O. Melter, M. A. de Sousa, P. Urbaskova, V. Jakubu, H. Zemlickova & H. de Lencastre: Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.*, **41**: 4995-5005, 2003
- 5) P. J. Petersen, N. V. Jacobus, W. J. Weiss, P. E. Sum & R. T. Testa: *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of a novel glycycline, the 9-*t*-butylglycyclamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**: 738-744, 1999
- 6) T. Hori, Y. Suzuki, A. Monji, M. Morita, H. Muramatsu, Y. Kondo, M. Doi, A. Takeshita, T. Kanno & M. Maekawa: Detection of mutations in quinolone resistance-determining regions in levofloxacin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: effects of the mutations on fluoroquinolone MICs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **46**: 139-145, 2003
- 7) 平松啓一: 薬剤が生む新型菌との闘い, 日経サイエンス, 12月号: 30-35, 2000
- 8) C. Y. Chi, W. W. Wong, C. P. Fung, K. W. Yu & C. Y. Liu: Epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **37**: 16-23, 2004
- 9) S. C. Buckingham, L. K. McDougal, L. D. Cathey, K. Comeaux, A. S. Craig, S. K. Fridkin & F. C. Tenover: Emergence of community-associated methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee children's hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**: 619–624, 2004
- 10) E. S. Pan, B. A. Diep, H. A. Carleton, E. D. Charlebois, G. F. Sensabaugh, B. L. Haller & F. Perdreau-Remington: Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in California jails. *Clin. Infect. Dis.*, **37**: 1384–1388, 2003
 - 11) Y. Tomita, K. Morifuji, N. Masumi, S. Nakamura, Y. Takesue & T. Santou: Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolate to various antimicrobial agents. II. Isolation of arbekacin resistant strain. *J. Med. Sci.*, **41**: 79–85, 1992
 - 12) J. Shiotani & K. Takehana: Sensitivity of MRSA isolated in our hospital to various antibacterial agents; changes over 5 years. *Jpn. J. Antibiot.*, **57**: 196–203, 2004
 - 13) T. Takeuchi, T. Hikiji, K. Nitta, S. Yamazaki, S. Abe, H. Takayama & H. Umezawa: Biological studies on kanamycin. *J. Antibiot.*, **10**: 107–114, 1957
 - 14) H. Ogawa, T. Ito, S. Kondo & S. Inoue: Chemistry of kanamycin. V the structure of kanamycin. *J. Antibiot.*, **11**: 169–170, 1958
 - 15) H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi & Y. Okami: New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot. Ser. A*, **19**: 200–209, 1966
 - 16) T. Osono, Y. Oka, S. Watanabe, Y. Numazaki, K. Moriyama, H. Ishida, K. Suzuki, Y. Okami & H. Umezawa: A new antibiotic, josamycin. I isolation and physico-chemical characteristics. *J. Antibiot. Ser. A*, **20**: 174–180, 1967
 - 17) H. Umezawa, Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada & T. Takeuchi: A new antibiotic, kasugamycin. *J. Antibiot. Ser. A*, **18**: 101–103, 1965
 - 18) B. Goldrich: First report case of VRSA in the United States. *Am. J. Nurs.*, **102**: 17,

2002

- 19) F. C. Tenover, L. M. Weigel, P. C. Appelbaum, L. K. McDougal, J. Chaitram, S. McAllister, N. Clark, G. Killgore, C. M. O'Hara, L. Jevitt, J. B. Patel & B. Bozdogan: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**: 275–280, 2004
- 20) C. Scott, D. J. Bopp, N. B. Dumas, G. Johnson, D. J. Kohlerschmidt, P. Kurpiel, R. J. Limberger, K. A. Musser, B. Wallace & P. Smith: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004. *CDC M.M.W.R.*, **53**: 322–323, 2004
- 21) H. Hashizume, M. Igarashi, S. Hattori, M. Hori, M. Hamada & T. Takeuchi: Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. I. Taxonomy, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, **54**: 1054–1059, 2001
- 22) H. Hashizume, S. Hattori, M. Igarashi & Y. Akamatsu: Tripropeptin E, a new tripropeptin group antibiotic produced by *Lysobacter* sp. BMK333–48F3. *J. Antibiot.*, **57**: 394–399, 2004
- 23) H. Hashizume, S. Hirose, R. Sawa, Y. Muraoka, D. Ikeda, H. Naganawa & M. Igarashi: Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.*, **57**: 52–58, 2004
- 24) J. O'Sullivan, J. E. McCullough, A. A. Tymiak, D. R. Kirsch, W. H. Trejo & P. A. Principe: Lysobactin, a novel antibacterial agent produced by *Lysobacter* sp. *J. Antibiot.*, **41**: 1740–1744, 1988
- 25) P. Christensen & F. D. Cook: *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 367–393, 1978
- 26) P. Christensen: Genus I. *Lysobacter* Christensen and Cook 1978, 372. *Bergey's Manu. Syst. Bacteriol.* 3. Edited by L. T. Staley: 2083–2089, 1989

- 27) H. Reichenbach & M. Dworkin: Section C The gliding bacteria. *The prokaryotes*: 313-421, 1981
- 28) K. B. G. Torsell 著、野副重男、三川 潮 訳: 天然物化学 -生合成反応機構-: 118-121、1984
- 29) 日本生化学会編、代謝マップ -経路と調節-: 134, 1980
- 30) L. D. Boeck & R. W. Wetzel: A54145, a new lipopeptide antibiotic complex: factor control through precursor directed biosynthesis. *J. Antibiot.*, **43**: 607-615, 1990
- 31) H. C. Beck, A. M. Hansen & F. R. Lauritsen: Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **220**: 67-73, 2003
- 32) B. Fabrizio, S. Joveetic, M. Feroggio, L. Gastaldo, E. Selva & F. Marinelli: Valine influence production and complex composition of glycopeptide antibiotic A40926 in fermentations of *Nonomuraea* sp. ATCC 39727. *J. Antibiot.*, **57**: 37-44, 2004
- 33) H. Ono, Y. Nozaki, N. Katayama & H. Okazaki: Cephacins, new cephem antibiotics of bacterial origin I. Discovery and taxonomy of the producing organisms and fermentation. *J. Antibiot.*, **37**: 1528-1535, 1984
- 34) S. Harada, S. Tsubotani, H. Ono & H. Okazaki: Cephacins, new cephem antibiotics of bacterial origin II. Isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **37**: 1536-1545, 1984
- 35) Y. Nozaki, K. Okonogi, N. Katayama, H. Ono, S. Harada, M. Kondo & H. Okazaki: Cephacins, new cephem antibiotics of bacterial origin IV. Antibacterial activities, stability to beta-lactamases and mode of action. *J. Antibiot.*, **37**: 1555-1565, 1984
- 36) A. Kato, S. Nakaya, N. Kokubo, Y. Aiba, Y. Ohashi & H. Hirata: A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A I. Taxonomy, isolation and biological activities. *J.*

- Antibiot.*, **51**: 929–935, 1998
- 37) J. Shoji, H. Hinoo, K. Matsumoto, T. Hattori, T. Yoshida, S. Matsuura & E. Kondo: Isolation and characterization of katanosins A and B. *J. Antibiot.*, **41**: 713–718, 1988
- 38) S. Harada, S. Tsubotani, T. Hida, K. Koyama, M. Kondo & H. Ono: Chemistry of a new antibiotic: lactivicin. *Tetrahedron*, **44**: 6589–6606, 1988
- 39) K. Furihata & H. Seto: Decoupled HMBC (D-HMBC), an improved technique of HMBC. *Tetrahedron Lett.*, **36**: 2817–2820, 1995
- 40) M. Murakami, Y. Itou, K. Ishida & H. J. Shin: Prenylagaramides A and B, new cyclic peptides from two strains of *Oscillatoria agardhii*. *J. Natl. Prod.*, **62**: 752–755, 1999
- 41) J. S. Wolfe, J. D. Ogle & M. A. Logan: Studies on 3-methoxyproline and 3-hydroxyproline. *J. Biol. Chem.*, **241**: 1300–1307, 1966
- 42) M. Ubukata, K. Kimura, K. Isono, C. C. Nelson, J. M. Gregson & J. A. McCloskey: Structure elucidation of liposidomycins, a class of complex lipid nucleoside antibiotics. *J. Org. Chem.*, **57**: 6392–6403, 1992
- 43) T. Nishikiori, H. Naganawa, Y. Muraoka, T. Aoyagi & H. Umezawa: Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A₂, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. II. Structure of fatty acid residue and amino acid sequence. *J. Antibiot.*, **39**: 745–754, 1986
- 44) W. F. Benisek, M. A. Raftery & R. D. Cole: Reductive cleavage of acylproline peptide bonds. *Biochemistry* **6**: 3780–3790, 1967
- 45) 液体アンモニアにおけるタンパク質の化学修飾。タンパク質核酸酵素, **18**: 151–152, 1973
- 46) J. Shoji, H. Hinoo, T. Katayama, K. Matsumoto, T. Tanimoto, T. Hattori, I. Higashiyama, H. Miwa, K. Motokawa & T. Yoshida: Isolation and characterization of

- new peptide antibiotics, plusbacin A₁~A₄ and B₁~B₄. *J. Antibiot.*, **45**: 817-823, 1992
- 47) J. Shoji, H. Hinoo, T. Katayama, Y. Nakagawa, Y. Ikenishi, K. Iwatani & T. Yoshida: Structures of new peptide antibiotics, plusbacin A₁~A₄ and B₁~B₄. *J. Antibiot.*, **45**: 824-831, 1992
- 48) M. Konishi, K. Sugawara, M. Hanada, K. Tomita, K. Tomatsu, T. Miyake, H. Kawaguchi, R. E. Buck, C. More & V. Z. Rossomano: Empedopeptin (BMY-28117), a new depsipeptide antibiotic. I. Production, isolation and properties. *J. Antibiot.*, **37**: 949-957, 1984
- 49) K. Sugawara, K. Numata, K. Konishi & H. Kawaguchi: : Empedopeptin (BMY-28117), a new depsipeptide antibiotic. II. Structure determination. *J. Antibiot.*, **37**: 958-964, 1984
- 50) 日本国特許、特開平 9-255587、水産用抗菌剤、塩野義製薬株式会社
- 51) H. Maki, K. Miura & Y. Yamano: Katanosin B and plusbacin A₃, inhibitors of peptidoglycan synthesis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **45**: 1823-1827, 2001
- 52) S. Yoshizawa, D. Fourmy & J. D. Puglisi: Structural Origins of gentamicin antibiotic action. *EMBO. J.*, **17**: 6437-6448, 1998
- 53) S. M. Swaney, H. Aoki, M. C. Ganoza & D. L. Shinabarger: The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**: 3251-3255, 1998
- 54) R. J. Heath, J. Li, G. E. Roland & C. O. Rock: Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *J. Biol. Chem.*, **275**: 4654-4659, 2000
- 55) G. L. Drusano: Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'BUG AND

DRUG'. *Nat. Rev.*, **2**: 289-300, 2004

- 56) K. Drlica & X. Zhao: DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 377-392, 1997
- 57) 坂崎俊一訳: 医学細菌同定の手引き 第2版、近代出版、原著; Manual for the Identification of Medicinal Bacteria, revised by S. T. Cowan, Cambridge University Press, 1974
- 58) 宮道慎二ら 著: 放線菌の分類と同定、日本学会事務センター、2004
- 59) N. W. Coles & R. Gross: Preparation of metabolically active *Staphylococcus aureus* protoplasts by use of *Aeromonas hydrophila* lytic enzyme. *J. Bacteriol.*, **115**: 746-751, 1973
- 60) S. P. Koo, M. R. Yeaman, C. C. Nast & A. S. Bayer: The cytoplasmic membrane is a primary target for the staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein. *Infect. Immun.*, **65**: 4795-4800, 1997