

学 位 論 文 題 名

『抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に生産する
生物活性化合物に関する研究』

学位論文内容の要旨

微生物を探索源とした、抗腫瘍物質のスクリーニングの過程において、Pluramycin 関連化合物生産株である *Streptomyces* sp. HP530 株、さらに Lavendamycin 生産株である *Streptomyces* sp. G324 株を得た。これらの菌株の生産する化合物は、*in vivo* 抗腫瘍活性試験において、強い延命効果或は、腫瘍の増殖抑制効果を示した。HP530 株は既知の Pluramycin 群の化合物に比べ極性の低い部分に強い細胞障害活性を示す同じ UV スペクトルを持つ微量成分が存在すること、また、G324 株は Lavendamycin よりも高い極性の部分に Lavendamycin 類似の UV スペクトルを示す複数の微量細胞障害活性物質の存在が認められた。抗腫瘍スペクトルは、Adriamycin と Daunomycin、或は Vinblastine と Vincristine にも見られるように、構造上のわずかな違いにより大きく変化することが知られている。一方、抗腫瘍抗生物質の多くは、抗菌活性も合わせ持つことより、微生物は自身に対する影響の上からも活性の強い二次代謝産物の生産は極力抑えられている可能性が強いことから、既知抗腫瘍物質生産株が微量に生産する活性化合物は、より強い活性、異なった特徴の活性を示す可能性がある。また、主生産物との生合成の面からの関連性からも、前駆体、制御因子、分岐による生産物などの可能性も考えられ、有用な化合物であると考えられることから、その検討を行った。

第1部では *Streptomyces* sp. HP530 株の生産する Pluramycin 関連化合物の検討を行った。HPLC 分析において既知の Pluramycin 群化合物とほぼ同じ挙

動を示す2種の主生産物と、糖の結合していないタイプと思われる3種の化合物を単離した。このうち1種は既知化合物(β -Indomycinone)と同定されたが、他の4種化合物は、2位の側鎖のみの違いではあるが、すべて新規化合物であった(Saptomycin A, C₁, C₂, F)。さらに、HPLC による分析はこれら2グループの中間の極性を示す微量活性物質の存在を示唆した。そのうちの1種化合物を単離し、構造解析を行った結果、Saptomycin C₁ の6' 位立体配置異性体である Saptomycin B を構造決定した。Saptomycin B と同じ程度の極性を示す化合物を比較的多量に生産する株を得るため、単孢子分離した株を培養し、HPLC により生産物の分析を行ったところ、目的の極性付近の化合物のみを主生産物とする、自然変異によると思われる変異株を分離した。この変異株を大量に培養し、親株では微量にしか生産されない化合物の単離、構造決定を試みた。各種クロマトグラフィーを繰り返し用い、4種の化合物を得た。これらの化合物の各種機器分析を用いた構造解析の結果、これら4種化合物は、モノアミノグリコシドの新規化合物であることが判明した。これらの化合物の構造を決定し、Saptomycin D、E、G、H と命名した。これらの化合物に関しては、さらに、DeacetylsaptomycinD、E を誘導し、アミノ糖部分(N,N-dimethylvancosamine)の3' 位の置換基効果及び6' 位の立体配置の違いによる立体配座の変化についての構造的知見を得た。その結果、3' 位がフリーの水酸基の場合は、boat form に近い twist form をとり、Acetyl 基などによりエステル化されると chair form の立体配座をとることが明かとなった。また、6' 位の立体配置の変化した、Saptomycin B 及び H においては、3' 位の置換基の有無によらず、Deacetylsaptomycin D、E とは違うタイプの chair form をとることを示した。以上の知見をもとに、Saptomycin A~H の相対配置を決定した。

Saptomycin 類の生物活性は、抗菌活性、細胞障害活性(*in vitro*)、抗腫瘍活

性(*in vivo*)について検討した。抗菌活性は菌によって多少のばらつきは認められるものの、全般的には Saptomycin D において最も強い活性が認められた。また、細胞障害活性試験においては、Deacetylsaptomycin D、E に強い活性を認めた。抗腫瘍活性試験では、マウス腫瘍系 Meth A について Saptomycin C₁、C₂、D に有効な活性が認められたものの、他の腫瘍系に対しては顕著な活性は示さなかった。以上の結果をまとめると、Saptomycin 類はその母核にキノン部分を持つことから、この官能基において活性が発現されることが予想されるが、一方、各種生物活性試験の結果は、2位の側鎖、8位の angolosamine、10位の *N,N*-dimethylvancosamine の3カ所の構造が相互に関連しあって、それぞれの生物活性に対する特異性、有効性、選択性などに影響を与えているものと考えられる。さらに、3' 位、11位に長さの異なる Acyl 基を導入し5種の誘導体を調製し、細胞障害活性、抗腫瘍活性の改善を試みたものの有効な結果は得られなかった。Saptomycin 類において、微量生産物と考えられる Saptomycin D、E さらにそこから誘導した Deacetylsaptomycin D、E は、腫瘍細胞に対する細胞障害活性において、従来より知られているタイプの主生産物である化合物に比べ、10~100倍もの強い活性を示すことから、本研究において一つの目的としていた、主生産物よりも非常に活性の強い微量生産物の発見に値する化合物であった。

第2部においては、*Streptomyces* sp. G324 株の生産する Lavendamycin 類似の UV スペクトルを示す、複数の微量細胞障害活性物質の検討を行った。主生産物として Lavendamycin が同定された。Lavendamycin はその構造上の特徴から、Streptonigrin との生合成的な関連が指摘されている。本菌株の生産する化合物の分析、並びに細胞障害活性試験の詳細な検討を行ったところ、Lavendamycin よりも極性の高い画分に、Lavendamycin、Streptonigrin の UV

スペクトルと類似のスペクトルを持った、複数の微量生産物の存在が認められた。そこでこれらの化合物の精製・単離を試みた。各種クロマトグラフィーを用いて単離した5種の化合物について、各種機器分析により構造解析を行ったところ、これらの化合物は、 β -carboline を基本骨格に持ち、1位にC₃ユニットを共通に持つ新規な化合物群であることが明かとなった。さらに、このうち3種の化合物は、1位の側鎖に L-(+)-rhamnose をグリコシル結合している構造であることが示された。すべての化合物の構造を決定し Oxopropaline A、B、D、E、G と命名した。in vitro での細胞障害活性試験の結果は、特異性のある強い活性は認められなかった。しかし、Oxopropaline 類は、構造上の特徴、並びに培養過程における存在量の変化等、Lavendamycin の生合成を考える上で、非常に重要な知見を与える化合物群であると考えられる。また、Oxopropaline 類が弱いながらも細胞障害活性を示すことから、他の β -carboline 化合物が多様な生理活性を示すこととも考え合わせ、Oxopropaline 類も何らかの重要な生理活性をもつ可能性が強いと思われる。

以上、『抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に生産する生物活性化合物に関する研究』として、2種の菌株について検討を行ってきた。Saptomycin においては、今後の展開如何によっては、更なる成果も期待できると思われる。また、Oxopropaline においては、主生産物である Lavendamycin の生合成を考える上で、重要な知見を与えるものと思われ、また、他の活性が期待できる面からも今後検討を残すものであると思われる。本研究において得られた結果は、方向性として本テーマのめざすものが、臨床上有効な制癌剤の発見に貢献可能なことを示した。従って、今後さらに本研究を進めることにより、最終目的である、臨床で有効な制癌剤の開発に対し合致した化合物を提供できると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 原 耿 民

副 査 教 授 水 谷 純 也

副 査 教 授 富 田 房 男

学 位 論 文 題 名

抗腫瘍抗生物質生産菌株が微量に生産する
生物活性化合物に関する研究

本論文は緒論と2部、4章で構成され、表22、図21、チャート130および引用文献107を含む総頁数191の和文論文である。別に参考論文7編が添えられている。

現在死因の第1位を占めるに至った悪性腫瘍（癌）はさまざまな治療法の開発にも拘らず増加傾向にあり癌化学療法の重要性が高まっている。このような状況のなかで、動植物、微生物由来の効果的な薬剤の発見及び開発が望まれている。本論文は2種の *Streptomyces* 属菌の生産物の検索を行い、腫瘍細胞に対し高い生物活性を示す新規化合物を見出し、構造研究、生理活性に新知見を加えたものである。

第1部では *Streptomyces* 属 HP530株の生産する Pluramycin 関連化合物の検索を行っている。HPLC（高速クロマトグラフィー）分析において既知の Pluramycin とほぼ同じ挙動を示す2種の主生産物のほか、極性の高い3種の化合物を単離した。このうち1種は既知化合物で β -Indomycinone と同定されたが、他の4種の化合物はすべて新規化合物であり、Saptomycin A、C₁、C₂、F と命名している。さらに HPLC 分析で中間の極性も持つ微量成分

の存在が示されたので、単離、精製を試み、Saptomycin C₁の立体異性体であるSaptomycin Bを得ている。さらに親株の変異株をHPLCで精査したところ、新株にはみられない、中間の極性を示す成分を主生産物とすることを認めたので、この近傍の微量生産物の単離、精製を行い、4種のアミノグリコシドである新規化合物を得て、Saptomycin D、E、G、Hと命名した。これらのなかでSaptomycin D、Eの3'位アセチル基を水酸基に変えた化合物Deacetylsaptomycin D、Eに立体配座が大きく変化することを見出している。即ち3'の水酸基の場合は舟形に近いねじれ形を取り、アセチル化され元に戻すと椅子形の立体配座をとることを明らかにした。つぎにSaptomycin類の抗菌活性、細胞障害活性、抗腫瘍活性につき検討を加えた。抗菌活性は菌により多少のばらつきが認められるものの、全般的にはSaptomycin Dに最も高い活性が認められた。また、細胞障害活性試験においてはDeacetylsapmtomycin D、Eに高い活性を、抗腫瘍活性試験ではマウス腫瘍に対しSaptomycin C₁、C₂、Dが有効であった。以上の結果をまとめるとSaptomycin類はその母核にキノン部分をもつことから、この官能基において活性が発現されると予想されるが、各種生物活性試験の結果は2位の側鎖、8位のangolosamine、10位のN,N-dimethylvancosamineの3箇所の構造が相互に関連して、それぞれの生物活性に対する特異性、有効性、選択性などに影響を与えているものと考えられる。微量生産物であるSaptomycin D、Eおよびこのヒドロキシ誘導体に高い細胞障害活性が認められたことは探索研究における微量成分の重要性を示したものだといえる。

第2部ではStreptomyces属G324株の生産するLavendamycinに類似の紫外線吸収スペクトルを示す複数の微量細胞障害活性物質の検討を行っている。その結果主産物としてLavendamycinを同定したほか、5種の新規化合物、Oxopropaline A、B、D、E、Gを

単離した。構造解析により、これらはすべて β -carboline を基本骨格とし、1 位に C_3 単位の側鎖を持つ化合物群であることを示した。さらに、このうち 3 種の化合物は 1 位の側鎖にグリコシル結合している L-(+)-rhamnose を保持していることを明らかにした。これらの細胞障害活性試験の結果は特異性のある高い活性は認められなかったものの、構造上の特徴ならびに培養過程における存在量の変化などから、Lavendamycin の生合成を考えるうえで貴重な知見を与えるものである。また、Oxopropaline 類が弱いながらも細胞障害活性を示すことから、 β -carboline 化合物が多様な生理活性を示すことを考え合せ、将来全く異なる生理活性を、Oxopropaline 類に見い出すことも可能であろう。

以上 Streptomyces 属の 2 種の菌株について行った新規生理活性物質の単離、構造、生物活性試験は新しい抗腫瘍活性物質の発見につながったばかりでなく、臨床上有効な制癌剤の開発に基礎的知見を加えたものであり高く評価できる。よって審査員一同は別に行った学力認定試験の結果と合せて、本論文の提出者 阿部尚樹 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。