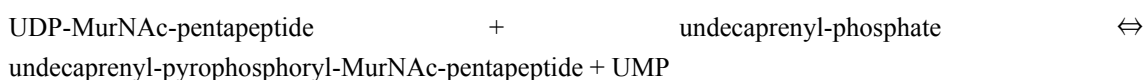


論文内容の要旨

論文題目 細菌トランスロケース I 阻害剤 A-500359 類に関する研究
Studies on Novel Bacterial Translocase I Inhibitors, A-500359s

氏名 村松 康範

細菌の細胞壁合成は UDP-GlcNAc を出発物質として多段階の反応を経て細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンとなる。トランスロケース I (EC 2.7.8.13) はリピッドサイクルに入る最初のステップを担う酵素で、下の式に示す反応を触媒し、細菌の生育に必須の酵素であることが知られている。



トランスロケース I 阻害剤として、これまでツニカマイシン、ムレイドマイシン、リポシドマイシンなどが知られているが、臨床開発された薬剤は未だない。しかし、ムレイドマイシンの研究などからトランスロケース I はヒトと細菌との間で選択性が期待できる、魅力的なターゲットであることが明らかとなっている。

本研究では、従来の抗生物質とは作用機作の異なる新規抗菌剤の取得を目指して本酵素に着目し、それに対する簡便・迅速なアッセイ系を構築し、微生物の二次代謝産物について阻害剤スクリーニングを行った。

土壌分離菌の培養上清について、トランスロケース I 阻害物質の探索を行った結果、放線菌 *Streptomyces griseus* より新規カプラマイシン類縁体である A-500359 類および放線菌 *Streptomyces* sp. より A-503083 類などの新規化合物を見出し、これらの化合物について構造解析、生物活性研究を行った。また、誘導體研究に供するための培養力価向上検討および誘導體展開による活性向上についても合わせて研究を行った。

第一章の要旨

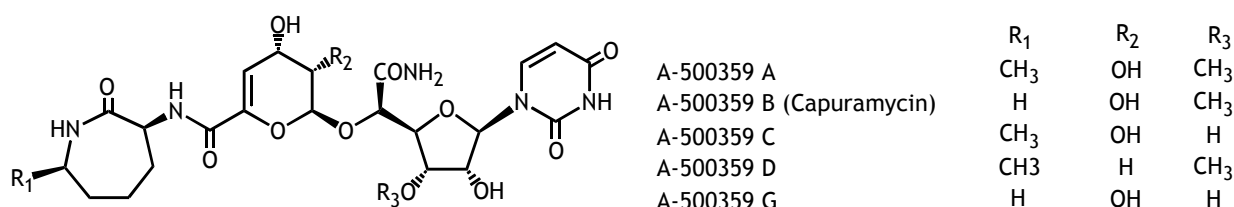
トランスロケース I の基質である UDP-MurNAc-pentapeptide を塩化ダンシルで蛍光標識し、

酵素反応の進行に伴い蛍光量が増大する簡便なアッセイ系を構築した。酵素は *MraY* 遺伝子をコードしたプラスミドで形質転換した大腸菌の培養菌体より調製し、スクリーニングに供した。

土壌分離菌約 10,000 株の培養上清についてトランスロケース I 阻害物質の探索を行った結果、A-500359 株および A-503083 株の培養上清に強い酵素阻害活性を見出した。

第二章の要旨

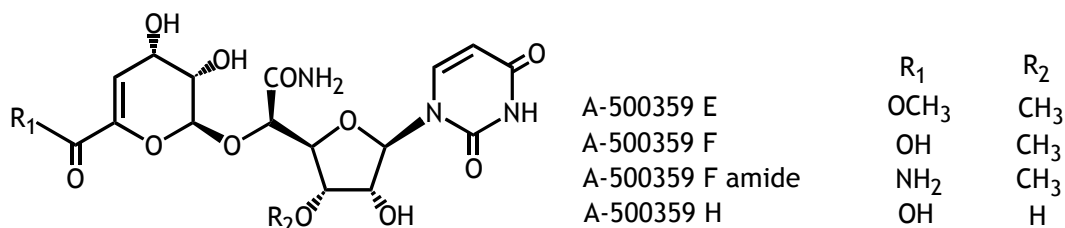
A-500359 株 (*Streptomyces griseus* SANK 60196) の培養液について各種クロマトグラフィーを行い、本菌培養上清の活性物質、A-500359 類の単離に成功した。これらの構造は NMR などの各種スペクトルデータを解析することにより決定した。結果、単離された化合物のうち一化合物が既知物質であるカプラマイシンで、他はカプラマイシン新規類縁体であった。カプラマイシンおよび A-500359 類化合物の酵素阻害活性は IC_{50} 値で 0.017~0.53 μM を示し、特に最も酵素阻害活性の強い A-500359 A やカプラマイシンは抗酸菌に対して特異的に抗菌活性を示した (MIC=2~16 $\mu\text{g/ml}$)。



A-500359 A, B (capuramycin), C, D, and G

第三章の要旨

第二章で述べた A-500359 類の脱アミノカプロラクタム体を得る目的で、リジン-ジアミノピメリン酸合成経路のアスパルトキナーゼを阻害する S-(2-aminoethyl)-L-cysteine (AEC) を添加して A-500359 株の培養を行った。結果、予想通り目的物質である脱アミノカプロラクタム体が得られ、A-500359 E、F および H 物質と命名した。興味深いことに、末端がメチルエステル体である A-500359 E の酵素阻害活性は A-500359 A に対して約 3 倍弱いだけだが、抗菌活性はほぼ消失していた。脱アミノカプロラクタム体は概して抗菌活性が弱く、末端官能基の置換により抗菌活性が向上する可能性が示唆された。



A-500359 E, F, F amide and H

第四章の要旨

A-500359 類化合物の生産力価を向上させるため、菌株の改良と培地の改変を行った。炭素源をマルトースに、窒素源を肉エキスとポリペプトンにし、培養温度を 28℃ から 23℃ とした結果、菌株のシングルコロニー分離検討と合わせ、カプラマイシンの生産力価は 5 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ に向上した。また、その培地に塩化コバルトとイーストエキスを加えることにより A-500359 A

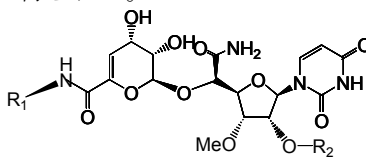
の生産力価は 1 µg/ml から 600 µg/ml に向上した。

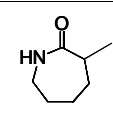
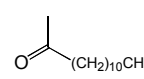
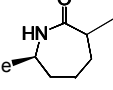
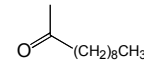
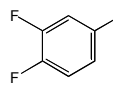
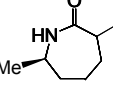
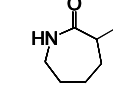
A-500359 E の生産性向上を目指し AEC の添加に代わる培地組成を検討した結果、炭素源をグルコースに、窒素源をポリペプトン、肉エキス、コーンステープリカーおよび生イーストとし、さらにグルコースを培養途中でフィードすることにより A-500359 E の生産力価は当初 1 µg/ml 以下であったものが 340 µg/ml に向上した。

第五章の要旨

抗菌活性の向上を目指し、A-500359 A、カプラマイシンあるいは A-500359 E をリードとして誘導体展開を行った。A-500359 A およびカプラマイシンにおけるリボースの 2'位に様々な長さのアシル側鎖を付加し、抗菌活性の強さを比較した結果、カプラマイシンには炭素数 12 のドデカノイル基が、A-500359 A には炭素数 10 のデカノイル基の付加が最も良好であった。これらの化合物（化合物 **7**、**20**）は 4 種類の抗酸菌に対し 0.063~3.13 µg/ml の MIC を示し、A-500359 A の MIC（4~16 µg/ml）と比較して、4~60 倍程度抗菌活性が向上した。

一方、アミノカプロラクタム環の置換化合物は A-500359 E を元に合成した。結果、フェニルタイプの置換基を有する化合物が高活性を示し、A-500359 A と比較して 2~8 倍程度抗菌活性が向上した化合物（化合物 **65**）が得られた。



Compound	R1	R2	IC ₅₀ (µg/ml)
7			N.D
20			0.55
65		H	0.009
A-500359A		H	0.01
A-500359B (Capuramycin)		H	0.01

第六章の要旨

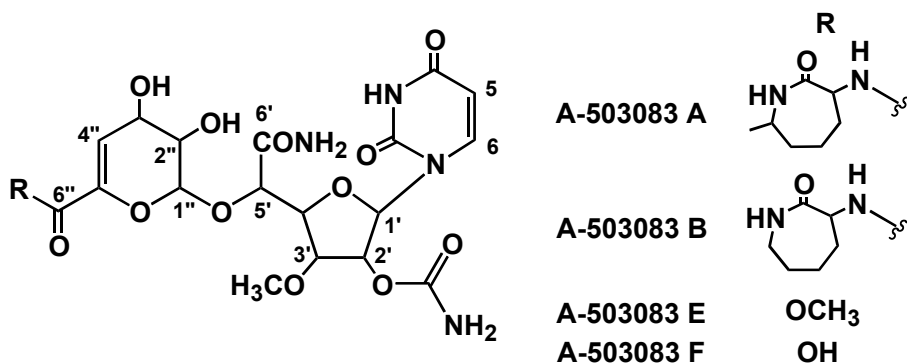
化合物 **20**、**65** および A-500359 A について多剤耐性結核菌に対する抗菌活性を測定したところ、対照薬のリファンピシンの MIC が >32 µg/ml であったのに対し化合物 **20** の MIC は 0.5 µg/ml、化合物 **65** の MIC は 4 µg/ml、A-500359 A の MIC は 16 µg/ml を示し、非耐性菌の MIC とほぼ同等の抗菌活性を示した。

また、これらの化合物について *in vivo* 肺感染治療実験による活性を測定した。化合物 **65** および A-500359 A を 0.1 mg あるいは 1 mg/mouse/day で 12 日間経鼻投与した結果、結核菌感染モデルで両化合物は有意な生菌数減少効果を示した。また、化合物 **20**、**65** および A-500359 A を 0.1

mg/mouse/day で 21 日間経鼻投与した結果、非定型抗酸菌感染モデルにおいて有意な生菌数減少効果を示した。A-500359 A およびこれらの誘導体は非耐性結核のみならず多剤耐性結核や非定型抗酸菌症などに対し、新規治療薬としての可能性を有することが示唆された。

第七章の要旨

第一章で述べたスクリーニングの結果、A-503083 株の培養上清に阻害活性が見出された。ここで各種クロマトグラフィーを行い、本菌培養上清の活性物質、A-503083 A、B、E および F の単離に成功した。これらの化合物は A-500359 類の 2' 位が *O*-カルバモイル基で置換された新規化合物であったが、いずれも酵素阻害活性および抗菌活性は A-500359 A には及ばなかった。ただし、本生産株は A-500359 類生産株である *S. griseus* とは明らかに異なる菌種であり、カプラマイシン生合成遺伝子の伝播の観点から興味深い。



A- 503083 A, B, E and F

カプラマイシンは 1986 年 *S. griseus* が産生するヌクレオシド系抗菌物質として報告された。しかし、当時はその分子標的が何であるかは明らかにされなかった。今回トランスロケース I 阻害剤の探索で見出されたことでカプラマイシンのターゲットはトランスロケース I であることが初めて明らかとなり、同時にカプラマイシンの類縁体である新規物質 A-500359 類も見出され、いずれも強力なトランスロケース I 阻害剤であることが明らかとなった。カプラマイシン類縁体の中では A-500359 A とカプラマイシンの阻害活性が最も強く、本酵素に対する IC₅₀ 値としてそれぞれ 0.017 および 0.018 μM を示した。また、これらの化合物は *in vitro* のペプチドグリカン合成を阻害し、その阻害活性は酵素阻害活性と非常に良く相関した。A-500359 類は抗酸菌に対して抗菌活性を示し、その強弱もペプチドグリカン合成阻害活性や酵素阻害活性とほぼ相関することから、抗菌活性の発現はトランスロケース I 阻害に起因すると考えられる。

ムレイドマイシンやパシダマイシンなどペプチド性ヌクレオシド系トランスロケース I 阻害剤は抗緑膿菌活性を有することが報告されているが、A-500359 類は緑膿菌に対する抗菌活性が全く見られないことから、同じトランスロケース I 阻害剤であっても、化合物の系統により抗菌スペクトルが大きく異なることが明らかとなった。化合物の構造の違いにより菌に対する透過性などが異なるため抗菌スペクトルに差異が生じると思われるが、それらを明らかにするためには今後さらに細菌における薬剤排出系などの詳細な検討が必要である。

A-500359 類およびその誘導体は抗酸菌に対して特異的な抗菌活性を有し、その中の代表的な化合物は実際に *in vivo* における結核菌や非定型抗酸菌感染実験で生菌数を減少させる効果が見られたことから、A-500359 類は新たな作用メカニズムを有する抗結核薬あるいは抗非定型抗酸菌症薬として有用であると考えられる。