

氏 名 (本 籍)	せり 芹	ぎわ 澤	のぶ 伸	き 記 (東京都)
学 位 の 種 類	農	学	博	士
学 位 記 番 号	博	乙	第	156 号
学 位 授 与 年 月 日	昭	和	58 年	10 月 31 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
審 査 研 究 科	農学研究科			
学 位 論 文 題 目	Microbial Transformation of beta-Lactum Antibiotics and Cholesterol-lowering Agents. ( $\beta$ -ラクタム抗生物質およびコレステロール低下剤の微生物変換)			
主 査	筑波大学教授	農学博士	田 淵	武 士
副 査	筑波大学教授	農学博士	須 賀 原	亮 三
副 査	筑波大学教授	農学博士	佐 藤	昭 二
副 査	筑波大学教授	農学博士	山 中	啓

## 論 文 の 要 旨

本論文は微生物を用いた抗生物質などの生理活生物質の変換および合成に関する研究をまとめたもので、第一編は、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の合成および変換、第二編は、新コレステロール低下剤 ML-236 B およびその関連物質の変換に関する研究で、ともにより有効な医薬品を創造することに成功している。

第一編  $\beta$ -ラクタム抗生物質の酵素的配合。

$\beta$ -ラクタム抗生物質群は幅ひろい抗菌性と低毒性のために臨床に最多用されている。これまで、Penicillin G を化学的・酵素的に切断して得られる 6-aminopenicillanic acid (6 APA) と、Cephalosporin C を化学的に切断して得られる 7-aminocephalosporanic acid (7 ACA) とを出発母核とした化学修飾法で合成されていた。その後、penicillin amidase のなかには、逆反応として 6 APA にある種の側鎖を結合させる acylase 活性のあることが発見されて以来、酵素法による  $\beta$ -ラクタム抗生物質の修飾に関する研究がはじめられた。

著者はまず、acylase を用いる  $\beta$ -ラクタム抗生物質の合成についてこれまで不明であったこの酵素の立体選択性を解明し、あわせて、acylase の新規利用法を見いだした。acylase の立体選択性が不明であったのは、これまで使用されてきた基質がすべて発酵法で作られた (5 R, 6 R)-6 APA か (6 R, 7 R)-7 ACA であったからである。そこで著者は、基質として全合成した DL-ラセミ

体・*di*-7-amino-3-trifluoro-methyl cephem-4-carboxylic acidを用いてacylaseの立体選択性を調べた。その結果、有機化合的なアシル化ではラセミ体が生成されたが、acylaseは立体選択的に天然型の基質にのみ作用し、抗菌活性も天然型にのみ認められることなどを明らかにした。

一方、Cephalosporin C、および最近見いだされたその7位にメトキシ基の導入されたCephameycin系抗生物質の側鎖を酵素的に切断して母核の化合物を得ようとする試みが世界的に行なわれた。しかし、Cephalosporin Cでは側鎖の $\alpha$ -aminoacid基が、penicillin(Isopenicillin N)とは逆にD-体であるために、そのままamidaseでは切断されぬため、これまでは7 ACAの化学的切断法が研究されてきた。そこで著者は、Cephameycin Cの側鎖を酵素的に切断できるかどうかを検討した結果、酵母*Trigonopsis variabilis*のD-amino acid oxidaseのみがCephameycin Cを脱アミノ化しうることを明らかにした。なお、この酵素は高濃度のCephameycin Cで基質阻害される現象も認められた。

第二編 コレステロール低下剤ML-236 Bおよびその関連物質の変換に関する研究。

新コレステロール低下剤ML-235 B(I)は、三共のグループ(1976)によって*penicillium citrinum*が生産するコレステロール生合成の律速酵素3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductaseの拮抗的阻害剤として発見された。Iはコレステロール生合成を*in vitro*のみならず、*in vivo*でも阻害することが認められている。また、Iの3位が水酸化された3-ヒドロキシ誘導体(II)のナトリウム塩は、Iを動物に投与すると微量に生成される代謝物として単離され、Iにくらべてはるかに強くコレステロールの生合成を阻害することも判明していた。薬剤は、生体内で活性が低下するのが普通であるが、Iの場合は実験動物体内で、活性が強い化合物(II)に変化した。したがって、Iの活性の生体内での本体ともいふべきIIをコレステロール低下剤として直接、投与できることが望ましい。しかし、実験動物系および純合成的方法ではIIの大量生産は困難である。そこで、著者は培養の容易な微生物の酵素を利用して、IIの生産のみでなく、これに関連してIおよびその3 $\alpha$ 位にメチル基が導入された関連物質MB-530 B(V)からの新規化合物の生成についても検討した。その結果、Iは*Mucor hiemalis*によって水酸化されることを見いだした。水酸化反応生成体を精製・結晶化し、これが3 $\beta$ -hydroxy-ML-236 B(II)であることを確認した。また、そのナトリウム塩が動物体内での代謝物と同一であることも明らかにした。なお、*Mucor hiemalis*はVの3 $\beta$ 位も水酸化しうることを認めた。Vの3 $\beta$ -水酸化体(III)の水酸基は第3級の水酸基であるため酸性条件下で容易に脱離し、6 $\alpha$ -hydroxy-iso-MB-530 B(III)に異性化した。

一方、*Syncephalastrum*属菌がIを特異的に3 $\alpha$ -水酸化して3 $\alpha$ -hydroxy-ML-236 B(III)を生産することを見いだした。Iの3-ヒドロキシ体(II、III)のナトリウム塩は、Iよりもコレステロール合成の阻害活性が強いから、これらの方法はIの関連物質の合成法として有用である。しかし、活性の強いIIの微生物を用いた大量生産に初めて道が開かれたが、前述の微生物はすべて真菌類に属していた。コレステロール合成阻害剤であるから、Iは真菌類に対して抗カビ作用を示し、基質濃度が0.1%以上に増すと、生育を阻害した。そこで、著者は、IをIIに変換する酵素源をステロール合成系が存在しないと考えられる原核生物に求めた。この場合の検索系では、Iの基質濃度

を0.2%に増して実施した。

その結果、オーストラリアの土壌から分離した3種の放線菌に、IからIIへの3 $\beta$ -水酸化能が見いだされた。また、これらの放線菌を、*Nocardia autotrophica*, *N. autotrophica* subsp. *canberrica* subsp. nov.および*N. autotrophica* subsp. *amethystina* subsp. nov.と同定した。そこで、その他の*Nocardia*属菌についてIの3 $\beta$ -水酸化能を検索したところ、数種の*Nocardia*属菌にも変換能を検出しえた。*Nocardia autotrophica* subsp. *amethystina* subsp. nov.を用いた場合に、IIへの変換率はIの0.2%ナトリウム塩の仕込量で30%以上にも及んだ。菌株の改良により、IIの大量生産が可能なことが判明した。

以上の結果から、Iの3位を水酸化する能力を持つ微生物は二群に分類された。(i)IIを生成するもの：カビ類では*Mucor hiemalis*など主として接合菌類に局在；原核生物では、*Nocardia*属菌。(ii)IIIを生成するもの：*Syncephalastrum*属菌に局在。

この研究に関連して、さらにつぎの二つの研究成果も得られた。(a)*Absidia coerulea*はIからIIを生成すると同時に、6 $\alpha$ -hydroxy-iso-ML-236 (iv)をも生成した。この菌には、IIをIVに異性化する酵素があると考えられる。(b)Iの生産菌をはじめ、数種のカビ類に、Iの側鎖 $\alpha$ -methylbutyryl基を切断して、ML-236 A(v)を生成する能力が認められた。VIIIはIよりもコレステロール合成阻害作用が弱いので、側鎖はコレステロール合成阻害作用の発現に重要な役割を持つものと推定された。したがって、今後、VIIIを基本骨格にして、3位の水酸化、および側鎖に各種の誘導体導入により、新たに有用なコレステロール低下剤が開発できる可能性がある。

以上、著者は微生物の酵素を用いて抗生物質とコレステロール低下剤とをより有用な化合物に特異的に合成、変換できることを示した。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、微生物の酵素作用により、現在医薬品として最も多量に使われている $\beta$ -ラクタム抗生物質（第一編）、およびコレステロール低下剤（第二編）のより有効な医薬への変換に関する優れた研究である。

まず、第一編について特記すべきは、 $\beta$ -ラクタム抗生物質変換で重要な酵素・アシラーゼの不明であった立体選択反応型式を著者は初めて開明し、この成果はすでに関係の総説・成書には必ずらず引用されるまでにいたっている。

第二編では、コレステロール合成の律速酵素の阻害剤として発見されていた新コレステロール低下剤の薬効増大の探索結果が記されている。変換物質として多数の新規化合物が分離同定されており、この成果のみでも学術的に高く評価できるが、薬効の著しく改良された目的物質への変換法をも開明していることはさらに有意義である。すなわち、バイオテクノロジーの一重要部門に大きな貢献をなしている。また、多数の微生物の検索結果から、ステロイド低下剤の微生物による

酸化様式についての知見が整理され、この観点から生体内解毒酵素の酵素学的研究への今後の発展が示唆されるにいたり、本研究には今後ともより大きな展開が期待できる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。