

氏名(本籍)	竹 ^{たけ} 内 ^{うち} 道 ^{みち} 子 ^こ (東京都)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第754号		
学位授与年月日	平成4年3月25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	Studies on Helvecardins, Galacardins, Fosfonochlorin and Nitracidomycins with Spheroplast Forming Activity (スフェロプラスト形成能を有する新規抗生物質, ヘルベカルディン, ガラカルディン, フォスフォノクロリンおよびニトランドマイシンに関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	今川 弘
副査	筑波大学教授	農学博士	中原 忠篤
副査	筑波大学教授	農学博士	山口 彰
副査	筑波大学助教授	農学博士	小澤 哲夫

論 文 の 要 旨

フレミングによるペニシリンの発見以来、現在までにセファロスポリン、ストレプトマイシンなど数多くの抗生物質が発見され、医薬として使用されており、それらが動物の健康維持に果している役割は大きい。しかし、抗生物質の多用により、これらに対する耐性菌が出現し、その対策をたてることが重要な問題となっている。解決策として耐性菌に有効な新規抗生物質の発見が望まれている。本研究はこの問題の解決に寄与するために、多数の菌の培養液から新規抗生物質を探索し、得られた数種の物質について構造ならびに生物活性を明らかにしたものである。

細菌は真核細胞にはない特有の構造物である細胞壁ペプチドグリカン⁽¹⁾を有しており、細胞を浸透圧や外界の変化から保護する役目を果たしている。この生合成が阻害されると細菌は個々の形を維持できず、膨脹あるいは伸張し、ついには破裂して死に至る。従って、細菌細胞壁の生合成を阻害する薬剤は優れた選択毒性を持つと考えられる。現在、世界で最も広く用いられているペニシリンやセファロスポリン系の抗生物質は細菌細胞壁生合成の阻害剤である。このような作用を有する新規物質の発見が有用な抗生物質の開発につながると考えられるので、種々の微生物の培養濾液から活性物質のスクリーニングを行った。

まずスクリーニングの感度を高めるために、大腸菌の一株からニトロソグアニジン処理によりフォスホマイシン感受性変異株を取得した。この株(SANK 79885)に対するフォスホマイシンのMIC(最小生育阻止濃度)は3.12 μ g/mlで、親株(50 μ g/ml)と比較し感受性が16倍上昇した。

また、バンコマイシンに対しては感受性が32倍上昇していることが認められた。グリコペプチド系抗生物質のバンコマイシンはグラム陽性細菌に効力を示すが、グラム陰性細菌に対しては分子量が大きいと細胞壁が透過障害になって無効の場合が多い。大腸菌SANK 79885はグラム陰性細菌であるが、前途のようにバンコマイシンに対し感受性を示すことから、膜の透過性が良くなった変異株と考えられる。このように、この変異株は特異な薬剤感受性をもつことがわかり、有用であると考えられたので、これをスクリーニングに使用した。

スクリーニングにあたっては、この検定菌を被検液を加えた倍地で培養し、光学顕微鏡下における形態変化を観察して、スフェロプラスト (spheroplast) またはバルジ (bulge) を形成したものを有効とした。このSBFスクリーニングにより放射菌、カビ、バクテリアの約15,000の培養濾液を調べた結果、4種の新規物質ヘルベカルディン、ガラカルディン、フォスフォノクロリンおよびニトラシドマイシンを見出した。

ヘルベカルディンA, Bは*Pseudonocardia compacta* subsp. *helvetica* SANK 65185によって生産されるグリコペプチド系抗生物質である。本属の菌による抗生物質生産の報告は少なく、*P. azurea*により、同じグリコペプチド系抗生物質のアズレアマイシンが報告されているのみで、ヘルベカルディンは2番目の物質である。ヘルベカルディンは培養液から特異的吸着剤D-alanyl-D-alanineをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーおよび分取用高速液体クロマトグラフィーによって精製した。ヘルベカルディンAとBは分子量がそれぞれ1955と1793で、物理化学的性質からグリコペプチド系抗生物質に属し、その構造が β -アポパルシンに密接な関係があると推定された。構造は本体および種々の条件で得られた酸加水分解物の核磁気共鳴(NMR)スペクトル、マススペクトル(MS)などの分析結果から決定した。ヘルベカルディンAは β -アポパルシンとアグリコン部が一致し、構成糖の一つであるラムノースの2位の水酸基が0-メチル化されたものであり、ヘルベカルディンBはAの構成糖の一つであるマンノースが欠けたものであることが明らかになった。ヘルベカルディンA, Bは現在臨床上問題になっている、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を含むグラム陽性細菌に対して有効であった。 β -アポパルシンと*in vitro*のMIC値を比較すると、好気性および嫌気性グラム陽性細菌に対してほぼ同等であるが、*in vivo*の活性を感染防御値で比較すると、ヘルベカルディンAの方が優れた結果を示した。

ガラカルディンA, Bは*Saccharothrix* sp. SANK 64289という珍しい放線菌によって生産されるグリコペプチド系抗生物質である。ガラカルディンの分離精製はヘルベカルディンの場合と同様に種々のクロマトグラフィーによって行った。得られたガラカルディンAとBは分子量がそれぞれ2265と2103で、ヘルベカルディンとよく似た物理化学的性質を示した。本体および酸加水分解物の機器分析により、ガラカルディンAは β -アポパルシンにガラクトースが2モル、ガラカルディンBはガラクトースが1モル結合したものであることが明らかになった。ガラカルディンAを α -ガラクトシダーゼで処理すると、ガラカルディンBを経て β -アポパルシンを生ずることを認めた。ガラカルディンA, Bは β -ガラクトシダーゼでは加水分解されないため、ガラクトースとの結合は α -グリコシド結合であることが明らかである。ガラクトースの結合位置を含むガラカルディンの全構

造は二次元NMRの詳細な解析により決定した。ガラカルディンA, Bはグラム陽性細菌に対し、ヘルベカルディンと同程度の抗菌力を示した。

フォスフォノクロリンは4種のカビ, *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *Talaromyces flavus*によって生産される物質で, 主にイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。フォスフォノクロリンは酸性の水溶性物質で, 分子式は $C_2H_4O_4PCl$ であり, 分子内に塩素とリン酸を含むユニークな構造を有している。構造は主としてトリメチルシリル誘導体のNMRとMSの解析により決定した。生物活性としては, グラム陰性細菌に対して中程度の抗菌力を示した。

ニトラシドマイシンA, Bは*Streptomyces viridochromogenes* SANK 60784の生産する抗生物質で, 培養液からカラムクロマトグラフィーによって精製した。構造は誘導体および分解物のNMRとMSによる解析から決定した。ニトラシドマイシンAはニترون酸と4-amino-3-hydroxy-2,5-dimethylhexanoic acidから成るペプチド化合物で, ニトラシドマイシンBは5位のメチルがエチルに置換された化合物であった。ニトラシドマイシンAはグラム陽性および陰性細菌に対し中程度のMIC値を示した。

審 査 の 要 旨

本研究では細菌細胞壁の生合成阻害作用を有する新規抗生物質を探索するため, まず大腸菌を用いてフォスフォマイシンに対して感受性の高い変異株を取得し, これをスクリーニングに使用している。本菌はフォスフォマイシンはもちろんのこと, グラム陽性細菌にしか抗菌力を示さないグリコペプチド系抗生物質にも高い感受性を有しており, 広い範囲の抗生物質を調べるのに有用であると判断される。本菌を用いて, SBFスクリーニング法により, 放線菌およびカビの培養濾液から活性の高い2種のグリコペプチド系抗生物質とフォスフォノクロリンおよびニトラシドマイシンを得ている。この結果はスクリーニングにおける本菌の有用性を示すものである。

本研究で得られたグリコペプチド系抗生物質ヘルベカルディンとガラカルディンは主として機器分析による構造解析の結果, β -アボパルシンと同じアグリコンで, 糖部分を異にする物質であることが決定された。*In vivo*の活性はヘルベカルディンの方が β -アボパルシンよりすぐれていることが認められた点興味深い。糖は体内における移行性や物質の溶解性に寄与するといわれているが, よりすぐれたグリコペプチド系抗生物質を開発する上で, 本研究で得られた知見は役立つものと期待できる。

よって, 著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。