

氏名(本籍)	いわ 岩	い 井	ゆづる 譲
学位の種類	農	学	博 士
学位記番号	農	第	163号
学位授与年月日	昭和53年	3月	9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		

学位論文題目 数種の新抗生物質の発見並びにそれらの醗酵生産に関する研究

論文審査委員 (主査)

教授 志村 憲助 教授 高橋 甫

助教授 伊崎 和夫

論文内容要旨

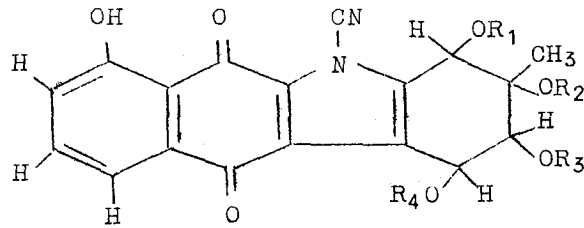
抗生物質の研究は微生物学、有機化学、生物化学、医学、薬学、農学など、抗生物質の関連する分野は広く、新しい抗生物質の発見は単にその抗菌活性に基づく医薬品等の利用にとどまらず様々な分野に貢献する。現在、微生物由来の新しい抗生物質などの探索には、新しい検定方法を設定するか、新しい菌株を数多く供給するかのいずれかの方策が少くとも必要である。

著者は新しい検定方法に基づくスクリーニングの立場をとり、各種検定方法を選定し、抗生物質の探索研究を行った。その結果、kinamycin、KA-107、O-2867、KM-214、OS-3256-B、asukamycinを発見した。また、これらの研究の過程で学んだ抗生物質研究の知識を応用し、脂質、ステロール生合成の選択的阻害剤として現在注目されている抗生物質 cerulenin の選択的生産に成功し、市場に供給することが出来た。

第 1 章 新抗生物質の発見

[1] 新抗生物質 Kinamycin

耐性菌に有効な抗生物質の探索を目的として、放線菌を供試菌株とし、耐性菌を試験菌とするスクリーニング法を新しく設定し、新抗生物質 kinamycin を発見した(1)(2)。本抗生物質は構造的に類似の A、B、C、D の 4 成分からなる quinone 系の抗生物質であり、耐性菌を含むグラム陽性菌に強い活性を示した。しかしながら、医薬品としての用途は毒性が強いことから断念した。その後、大村らにより kinamycin の構造が決定され(3)、次図に示す様に天然では珍しい N-CN を有する抗生物質であることがわかった。



Component	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	COCH ₃	COCH ₃	COCH ₃	H
B	H	COCH ₃	H	H
C	COCH ₃	H	COCH ₃	COCH ₃
D	COCH ₃	H	COCH ₃	H

(2) ペニシリナーゼ阻害物質 KA-107

ペニシリン (PC) の耐性機作が、主に耐性菌の産生するペニシリナーゼ (PCase) に基づくことに着目し、PCase 阻害物質の探索という新しい考えのもとに研究を進めた。先ずスクリーニング方法を確立し、放線菌、カビ、細菌の多数の培養液を検体として PCase 阻害活性を調べた。強い阻害活性を示す培養液はいずれも放線菌由来のものであり、その中の 1 菌株、*Streptomyces gedanensis* の産生する高分子の PCase 阻害物質、KA-107 を分離した。次いで、KA-107 と PC の併用効果をみるため、PC 耐性菌の黄色ブドウ球菌 FS-1277 を試験菌とし、両者の種々の濃度の組合せのもとで最小阻止濃度 (MIC) を測定した。KA-107 を添加すると顕著に MIC 値が低くなり、その併用効果を認めた(4)(5)(6)。

KA-107 は高分子物質であるため医薬品として用いることは難しいが、この物質が耐性菌対策として 1 つの方向を示したものと考えられる。最近、英国の Beecham 研究グループはその実用性が期待される低分子の PCase 阻害物質、clavulanic acid (7) を発見し、本スクリーニング方針の妥当性を確認した。

[3] 新抗生物質 O-2867

本抗生物質は稲いもち病の病原菌 Piricularia oryzae に有効な物質のスクリーニングで発見された新抗生物質である。抗 P. oryzae 物質を追求するにあたり、ペーパーディスク法による迅速な定量法を先ず確立した。生産菌、Streptomyces No. O-2867 株の培養液より、下記の理化学的性状を有する O-2867- α 及び - β の 2 成分を単離した(8)。両成分とも P. oryzae 以外の試験菌にはほとんど無効な特異的な抗 P. oryzae 物質である。しかし、ポット試験での成績は不十分で実用化までには至らなかった。

Physical and chemical properties of antibiotic
O-2867- α & - β

	α	β
Appearance	white powder	colorless needles
Nature	amphoteric	amphoteric
Melting point	161-163.5°C	143-146°C
Optical rotation(H ₂ O)	$[\alpha]_D^{24} -43^\circ$ (c 1)	$[\alpha]_D^{24} -16^\circ$ (c 0.8)
Elemental analysis (%)	C: 43.59 H: 6.94 N: 11.72	C: 43.37 H: 6.03 N: 13.71
Molecular weight (Rast method)	380	313
Molecular formula	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₉	C ₁₀₋₁₁ H ₁₇₋₁₉ N ₃ O ₇
UV absorption	end	end

[4] 新抗生物質 KM-214

動物発育促進効果を有する quindoxin が強い抗 Clostridium 活性をもつという Hennessey らの報告に基づき、動物発育促進用抗生物質の探索を目的とし、Clostridium perfringens に有効な物質をスクリーニングを行った。その結果、Clostridium perfringens の産生する新抗生物質として KM-214 を発見した。

本物質は次に示す理化学的性状より新抗生物質であると判定された(9)。

抗生物質 KM-214 はグラム陽性菌及び種々の clostridium 菌に低濃度で有効であり、現在、動物発育促進効果を検討中である。

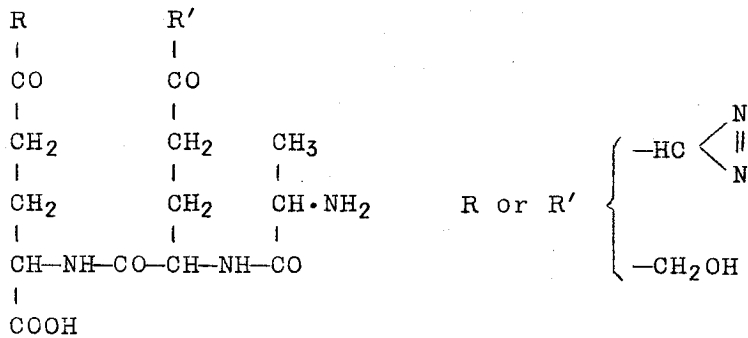
Physical and chemical properties of
antibiotic KM-214

Appearance	: yellow powder
Nature	: acidic
Melting point	: 139-140° C
Optical rotation	: $[\alpha]_D^{22} +126^\circ$ (c 1, MeOH)
Elemental analysis (%)	: C(68.00), H(8.16), N(0)
Molecular weight	: 618
Molecular formula	: $C_{35}H_{54}O_9$
UV λ_{max}^{MeOH} nm ($E_{1cm}^{1\%}$)	: 268(sh. 500), 278(630), 287(sh. 580), 320(230)

[5] 新抗ガン物質 OS-3256-B

抗ガン物質の探索には、その検定に動物癌を用いる方法が最もよいとされている。その中で実験腫瘍としてすぐれていると思われる mouse leukemia L-1210 を検定方法に選び、放線菌の培養液を検体としてスクリーニングを行った(10(11)。

その過程で発見した新抗生物質 OS-3256-B (12)は alazopeptin の 2 個の diazo 基のうち、いずれか一方が消失した次に示す構造をもつものと推定された。本物質の抗 L-1210 活性は強く、医薬品としての用途が期待されたが、性質が不安定であること、抗ガン活性の面で alazopeptin (13)よりすぐれた点は見出せないことより開発を断念した。



第 2 章 新抗生物質 Asukamycin の発見及び開発研究

鶏のコクシジウム症は養鶏産業上、重要な問題となっている。現在、合成剤を中心とする抗コクシジウム剤は耐生菌の出現等の問題があり、新たな抗コクシジウム剤の出現が望まれている。

この背景をもとに、抗コクシジウム剤を目的とし、グラム陽性菌に有効な抗生物質をスクリーニングし、新しく抗生物質 asukamycin を発見した。生産菌はその菌学的所見より、Streptomyces nodosus の一亜種とし、Sm. nodosus subspecies asukaensis と命名した。また、asukamycin は次に示す理化学的性状より、抗コクシジウム剤として最近注目されている polyether 系抗生物質とは明らかに異なる新抗生物質と判定された(14)。asukamycin を抗コクシジウム剤として知られている唯一の抗生物質である monensin と比較すると、Eimeria tenella を試験菌とする抗コクシジウム活性は同等であるが毒性が低いこと、monensin の様な polyether 抗生物質でない点が特に注目され、さらに本物質の多量蓄積を目的に生産菌の改良を行った。紫外線処理と agar disk 法の組合せ、NTG 処理と asukamycin 耐性株の分離の組合せの 2 つの方法で有効株を濃縮し、次いで試験管で培養試験を行い、asukamycin 高生産株を分離した。当初、100~150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の生産量が現段階では 1500~2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高生産株を得ることができた。

Physical and Chemical properties of Asukamycin

Appearance	:	pale yellowish needles
Mp	:	darking at 188°C (decomp.)
$[\alpha]_D^{28}$:	+225° (c0.5, CHCl ₃)
Anal. Found	:	C67.12, H6.19, N5.11%
Mol. Formula	:	C ₃₀₋₃₁ H ₃₄ N ₂ O ₇₋₈
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(E ₁ ^{1%} _{1cm})	:	315(930) in MeOH 320(1033) in 0.1N HCl-90% MeOH 305(1050) in 0.1N NaOH-90% MeOH
IR(KBr)	:	3340-3330, 1660, 1600, 1365
Color reaction	:	(+) Ehrlich, Dragendorff (-) Rydon-Smith, Ninhydrin
solubility	:	sol.; DMSO, DMF slightly sol.; CHCl ₃ , Benzene, MeOH insol.; n-Hexane, Pet. ether, H ₂ O

第 3 章 抗生物質 Cerulenin の選択的生産

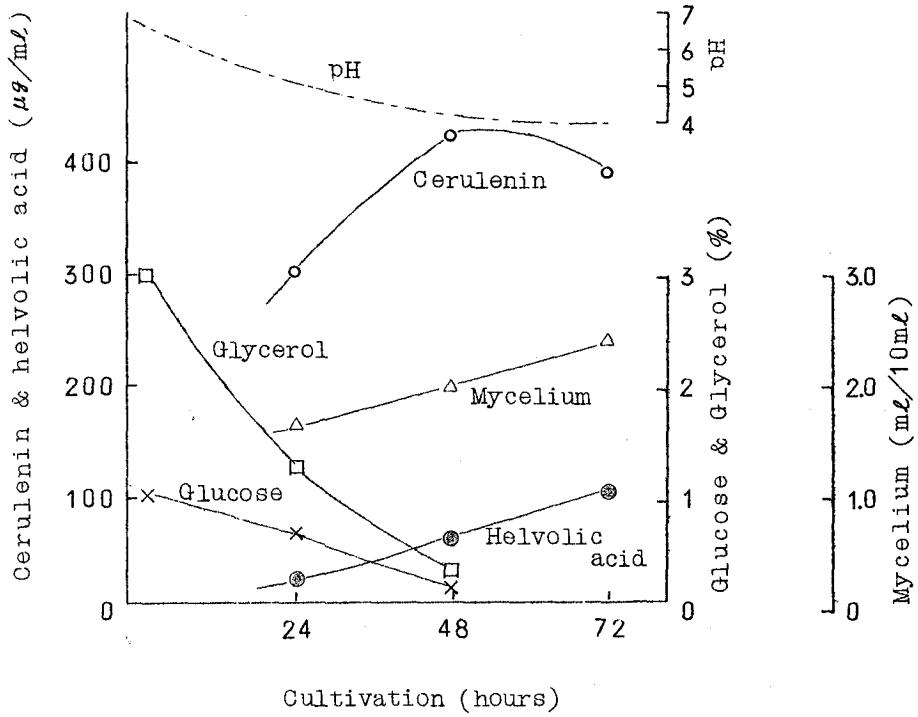
Cerulenin は (CER) は 1960 年、Cephalosporium caerulens の生産する抗カビ抗生物質として、著者らの研究室で発見された。CER は脂肪酸とステロール生合成経路を選択的に阻害するこれまで全く報告のない特異な抗生物質であり、その試薬としての様々な用途が期待されている。しかしながら、当初、目的とする CER の蓄積量が低い上、CER と化学的性状のよく類似するステロール抗生物質の Helvolic acid (HA) が主要生成物として多量蓄積し、CER の分取がむずかしく、CER を特異的試薬として市場に出すことは勿論、その作用機作の研究のための試料の供給すら困難であった。この背景から、CER の多量分取のため、CER の生産を高め、HA の生産を抑える CER の選択的生産を目的に研究

を進めた。

先ず、CERとHAのペーパーディスク法による分別定量法を確立した。その定量法を用い、培地検討を行い、CERの選択的生産培地として、グリセロール3%、グルコース1%、ペプトン0.5%、食塩0.2%の培地を選定した(15)。また、CER生産の醸酵管理上、培地の主炭素源であるグリセロールの消費を定量的にとらえる必要がある。著者はグリセロールと共に、炭素源として加えてあるグルコース存在下でも定量出来るグリセロールの比色定量法を確立した(16)。

次図はCERの選択的生産培地を用い、30ℓ培養基でCERの生産を行い、前述の定量法を応用して得た醸酵経過である。CER 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の蓄積に対し、HAは30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と低く、目的としたCERの選択的生産が行なわれていることを示す。グリセリンのほとんど消費されたときの培養液より溶媒抽出、シリカゲルクロマトグラフィーの操作を経、容易に多量のCERを分取することができた。

なお、CERはこの醸酵法で供給され、昭和51年よりイスラエルのMakor社より市販されている。



Fermentation pattern on cerulenin production medium

文 献

- 1) S. Itō, S. Ōmura, M. Otani, A. Nakagawa, H. Takeshima, Y. Iwai, M. Ohtani & T. Hata: J. Antibiotics, 23, 315 (1970)
- 2) T. Hata, S. Ōmura, Y. Iwai, A. Nakagawa & M. Otani: J. Antibiotics, 24, 353 (1971)
- 3) S. Ōmura, A. Nakagawa, H. Yamada, T. Hata, A. Furusaki & T. Watanabe: Chem. Pharm. Bull., 21, 931 (1973)
- 4) T. Hata, S. Ōmura, Y. Iwai, H. Ohno, H. Takeshima & N. Yamaguchi: J. Antibiotics, 25, 473 (1972)
- 5) Y. Iwai, H. Ohno, H. Takeshima, N. Yamaguchi, S. Ōmura & T. Hata: Antimicrob. Agents & Chemoth., 4, 222 (1973)
- 6) H. Ohno, A. Matsumae, Y. Iwai, M. Nakae, S. Ōmura & T. Hata: Antimicrob. Agents & Chemoth., 4, 226 (1973)
- 7) A. G. Brown, D. Butterworth, M. Cole, G. Hanscomb, J. D. Hood & C. Reading: J. Antibiotics, 29, 668 (1976)
- 8) T. Sato, K. Yamaguchi, M. Katagiri, J. Awaya, Y. Iwai, S. Ōmura & T. Hata: J. Antibiotics, 24, 774 (1971)
- 9) S. Ōmura, T. Nishikiori, R. Ōiwa, Y. Iwai, R. Masuma & M. Katagiri: J. Antibiotics, 29, 477 (1976)
- 10) Y. Iwai, K. Komiyama, R. Ōiwa, J. Awaya, I. Umezawa, S. Ōmura & T. Hata: Kitasato Arch. Exp. Med., 44, 95 (1971)
- 11) Y. Iwai, K. Komiyama, R. Ōiwa, J. Awaya, I. Umezawa, S. Ōmura & T. Hata: Kitasato Arch. Exp. Med., 44, 205 (1971)
- 12) K. Satoh, K. Komiyama, C. Kitao, Y. Iwai, K. Atsumi, R. Ōiwa, M. Katagiri, I. Umezawa, S. Ōmura & T. Hata: J. Antibiotics, 27, 620 (1974)

- 13) T. Hata, I. Umezawa, Y. Iwai, M. Katagiri, J. Awaya, K. Komiyama, R. Ōiwa & K. Atsumi: J. Antibiotics: 26, 181 (1973)
- 14) S. Ōmura, C. Kitao, H. Tanaka, R. Ōiwa, Y. Takahashi, A. Nakagawa, M. Shimada & Y. Iwai: J. Antibiotics, 29, 876 (1976)
- 15) Y. Iwai, J. Awaya, T. Kesado, H. Yamada, S. Ōmura & T. Hata: J. Ferment. Technol., 51, 575 (1973)
- 16) Y. Iwai, S. Ōmura & T. Hata: J. Ferment. Technol., 49, 842 (1971)

審査結果の要旨

新しい抗生物質の検索は、現在もお広く行われているが、従来のスクリーニング法によっては新抗生物質を発見することは次第に難かしくなりつつある。この点を打開するために、本論文では、スクリーニングに新しい検定方法をそれぞれ考案し、それを使用して抗生物質の探索を行った結果、数種の新抗生物質を発見することができた。

耐性菌に有効な抗生物質の探索に、耐性菌を試験菌とするスクリーニング法を設定し、Kinamycin を発見した。グラム陽性菌に強い活性を示すキノン系化合物でN-CN基を含む点の特徴である。また、ペニシリンの耐性菌対策の1つとして、ペニシリナーゼ阻害物質KA-107を放線菌培養液から発見することもできた。また、稲いもち病菌に対する抗生物質の新しいスクリーニング法を確立した後、有効物質を検索し、新しく抗生物質O-2867を単離した、本化合物は、分子量約300の含窒素化合物である。

鶏のコクシジウム症は産業上重要な問題となっているが、本研究により抗コクシジウム剤askamycinが発見された。生産菌はStreptomyces nodosusの一亜種で、この菌の改良により、oskamycin高生産株の分離にも成功し、現在1,500~2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の蓄積が可能となった。本有効成分は淡黄色針状結晶の化合物で $\text{C}_{30-31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{7-8}$ の分子式を有し、今後の実用化が期待される新抗生物質である。

著者の属する研究室で先に抗カビ抗生物質としてCeruleninを発見していたが、その工業的生産が困難であった。著者は新たに本抗生物質の生産菌Cephalosporium caerulensの生産培養条件を詳細に検討し、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の蓄積にまで高めることに成功し、さらに培養液からのCeruleninの大量分別操作法を確立し、この新抗生物質を市場に供給することを可能とした。本物質は脂肪酸とステロール生合成を選択的に阻害することが明らかになり、現在は研究上の試薬として役立っているが、今後その用途の拡大が期待されるものである。

以上著者は、独創的なスクリーニング法を用いて新しい数種の抗生物質を発見し、その中の少くも2種は実用的にも価値が高いものであることを示した。本論文は、著者に農学博士の学位を授与するに充分の価値あるものと判定する。