抗生物質 — 生合成手段を用いる構造決定と新規物質の創製

大 村 智*・中 川 彰**

Antibiotics — Structure Elucidation and Production of New Substances Using Biosynthetic Means.

Satoshi ŌMURA* and Akira NAKAGAWA**

Biosynthetic means using ^{13}C labeled precursors were applied to the structure elucidation of new polyketide antibiotics which have been discovered in our laboratory. It was demonstrated that intra- and intermolecular ^{13}C - ^{13}C couplings in ^{13}C NMR spectrum of antibiotics highly enriched with ^{13}C precursors afforded useful informations for structure elucidation. Microbial transformation of macrolide antibiotics under the presence of a polyketide biosynthetic inhibitor, cerulenin, led to the production of new "hybrid" macrolides. Further, production of the new hybrid antibiotic mederrhodins by a genetically engineered strain of *Streptomyces* is described.

1. はじめに

微生物は我々の想像をはるかに越えた多種多様でかつ興味ある骨格を有する物質を生産し、これ迄にその数は6,000種余とも云われている。それらの中には化学合成剤よりも優れた生物活性を有する物質も数多く含まれ、その活性に応じて医薬、農薬、動物薬として今日重要な地位を占めている。現在でも微生物第2次代謝産物由来の新規生物活性物質が相次いで発見されているが¹⁾これらの背景には土壌からの微生物の分離方法の改良、新しい探索系の考案に加えて微量成分の分離・精製技術ならびにNMR, Mass スペクトロスコピーの著しい進歩を挙げることが出来る。特に超伝導磁石NMRの登場と新しい2次元測定法のソフト面での急速な進歩は複雑な構造を有する物質の構造解析に微量で有用な情報をもたらすに至った²⁾。これに伴い、微生物第2次代謝産物の生合成研究もNMRと ^{13}C 標識化合物の併用により活発に行われるようになった。従来、天然物の構造決定と生合成研究は全く別個の感覚で行われてきた感があったが、筆者らは微生物が持っている生合成能力とその規則性に着目し、これらを効果的に組み合わせることにより第2次

代謝産物の構造決定に極めて有用な手段となりうることを指適してきた。以下に筆者らの研究室で発見された新規ポリケチド抗生物質の構造決定に ^{13}C 前駆体の取り込み様式がいかに効果的に適用されたかについて例を挙げ紹介する。併せて脂肪酸ならびにポリケチド生合成の特異的な阻害剤であるceruleninと微生物の生合成機能を巧妙に応用した研究例としてポリケチド抗生物質の立体化学の解析ならびに新規ハイブリッド抗生物質の創製について紹介する。さらに近年急速な発展をとげつつある遺伝子操作技術を駆使して得られた放線菌由来の新規抗生物質についても言及したい。

2. ^{13}C 標識前駆体の取り込み様式による構造決定

高純度の ^{13}C 標識前駆体の普及と生産菌株の改良に加え、 ^{13}C 標識体を効率良く取り込ませる発酵技術面での経験を生かし、放線菌および細菌の生産するポリケチド抗生物質の構造解析に適用出来たいくつかの例を紹介する。

2.1. エラスターゼ阻害剤 Elasnin(エラスニン) Elasnin(1) ($\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$)は新潟県北魚沼郡より採取した土壌より分離した一放線菌, *Streptomyces noboritoensis* KM-2753の培養液より単離された人の多核白血球由来のエラスターゼ阻害物質である³⁾。1はMassスペクトロメトリーおよび化学的分解生成物の構造から α -ピロン環にアルキル側鎖が置換した新規骨格を有することが決定された。これと併行して行われた ^{13}C 標識アセテートの取り込み実験から1は合計12分子のアセテートがポリ

* 北里研究所 ()

* The Kitasato Institute ()

** 北里大学薬学部 ()

** School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University ()

Fig. 1 Methylation of elasinin (1) and its biosynthetic building units.

ケチドを経て生合成されることを明らかにした⁴⁾。この構造解析の過程で1を CH_3N_2 にてメチル化することにより α -ピロン環から γ -ピロン環への異性化が起り、 γ -ピロンがメチル化された化合物(2)を与える(図1)。この異性化の根拠は $[1,2-^{13}\text{C}]$ アセタートで標識された1および2の ^{13}C NMR スペクトル解析より得られた。即ち、 ^{13}C で標識された1および2において観測されるアセタートユニット分子内の ^{13}C - ^{13}C カップリング値の異性化に伴う変化から両者の構造が確認された訳で ^{13}C の取り込み様式が効果的に利用された例を示している。

2.2. 除草活性物質 Herbimycin (ハービマイシン)
Herbimycin A (3) ($\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_9$) はポット試験による除草活性物質の探索過程で兵庫県、城之崎町で採取した土壌より分離した一放線菌 *S. hygroscopicus* AM-3672 の培養液中より単離された物質である⁵⁾。近年, herbimycin が癌化した細胞を正常化させる作用を有するという報告⁶⁾がなされ注目されている。NMR 解析から3はベンゾキノン骨格を有するアンサマイシン群抗生物質であり、部分構造、A~Dが提出された。各部分構造の結合様式を決定するためにこれ迄に報告されているアンサマイシン群抗生物質の生合成様式に注目し、アンサ部に結合したメチル基がプロピオン酸に由来するという知見から、 $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオネートの取り込み実験を行った。その結果、 ^{13}C で標識された3の ^{13}C スペクトルはC-1, 7, 9, 13の4個の炭素に高い取り込みを示した(図2)。これら4個の炭素はいずれもプロピオン酸のカルボキシル基に由来することからその α 位の炭素上にはメチル基が存在していなければならない。以上の取り込み様式からA-B-C-Dの結合様式を明らかにし、3の構造を決定した⁷⁾。なお、3の炭素骨格の生合成由来については近縁物質である geldanamycin の生合成知見⁸⁾から3のベンゾキノン部はシキミ酸由来の“ C_7N ”ユニットから、またアンサ部については2分子のアセタート、4分子のプロ

Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of herbimycin A (3).

Fig. 3 Structure of herbimycin A (3) and its biosynthetic building units.

ピオネート、1分子のグリコレート(もしくはグリセレート)および4分子のメチオニンから生合成されるものと推定される(図3)。

2.3. 抗癌抗生物質 Vineomycin (ビネオマイシン)
 ^{13}C 標識前駆体を用いる生合成手段が構造解析に有用な情報を与える例について述べたが、ここでは vineomycins の NMR スペクトロメトリーによって提出された構造が同時に行われた ^{13}C 標識体の取り込みによる生合成様式と矛盾がないこと、またこの生合成様式が既知イソテトラセノン系抗生物質にうまく適用出来る点について述べる。

Vineomycin は新潟県高田市より分離した一放線菌 *S. matensis* subsp. *vineus* の生産する抗グラム陽性菌活性に加え、固型 Sarcoma 180 に対し抗腫瘍活性を有するアントラキノ系抗生物質で、成分 A_1 (4) ($\text{C}_{49}\text{H}_{58}\text{O}_{13}$) と B_2 (5) からなり、同一分子式を有する⁹⁾。両成分は NMR スペクトロメトリーを中心とする構造解析の結果、イソテトラセノン骨格を有する¹⁰⁾。構造決定と同時に生合成研究が行われ、クロモファー部はポリアセタートからなることを明らかにした。両成分のクロモファーの構造か

Fig. 4 Structures of vineomycins A₁ (4) and B₂ (5) and their biosynthetic pathways.

ら5は4の開環生成物と考えられ、まず、4が生合成され、次いでC-1とC-12b間でC-C開裂が起り、5が生合成される経路が考えられたが、ポリケチドの生成方向により経路(A)、(B)が考えられる(図4)。両経路のいずれが妥当であるかについては[1,2-¹³C₂]アセタートの取り込み様式から4ではC-1とC-12bの両炭素が同一分子内酢酸による¹³C-¹³Cカップリング($J_{CC}=36$ Hz)を有するサテライトシグナルを含むトリプレットとして観測されることからC-3とそれに結合するメチル基の両炭素がスターターとなり、ポリケチドが形成された後にC-2の末端で脱C₁が起こる経路を提出した。一方、5の¹³C NMRスペクトルでは側鎖上のC-3'とC-4'の両炭素がそれぞれシングレットとして観測されること、C-1を除く他の骨格炭素はいずれも分子内アセテートユニット由来の¹³C-¹³Cカップリングが観測されることから、成分5は4のC-1とC-12b間での開裂反応により、経路(A)から生合成されることを明らかにした¹¹⁾。

ところで、vineomycinと同一の基本骨格を有するイソテトラセノン抗生物質として aquayamycin, rabelomycin, tetrangomycin, yoronomycin, kerriamycin 等が知られている。

これらはいずれもC-3位にメチル基を有し、C-1, -7, -8および-12位には酸素官能基を含んでおり、これらは生合成的にアセテート酸素に由来したものと推定され、vineomycinsの生合成様式がイソテトラセノン抗生物質の構造に有用な情報を与えることを示している。最近、筆者らは放線菌の培養液から血小板凝集抑制物質 OM-4842 (aggreitcin と命名、6) を単離した。6は vineomycin の生合成知見に加えて類縁物質である ke-

Fig. 5 Structure of OM-4842 (aggreitcin).

rriamycins との NMR による比較解析から容易にその構造を提出することが出来た¹²⁾(図5)。

2.4. 抗真菌抗生物質 Irumamycin (イルママイシン)
¹³C 二重標識前駆体の高い取り込みは、標識された炭素間の分子内のみならず分子間の¹³C-¹³Cカップリングの観測から炭素間の結合様式を明らかにする上で重要な要素になってくる。この条件を出来るだけ満たすためには添加された¹³C標識体が培養経過時で希釈されることを避ける必要があり、次の2点、(i)炭素源となる培地(例えば、グルコース、ショ糖、グリセロール等)の組成を少なくすること、(ii)生産菌の生育速度が最大となり、しかも抗生物質生産が始まる時点で¹³C標識体を添加すること、を考慮する必要がある。以上の取り込みが最大限に活用された例として irumamycin の構造決定を挙げることが出来る。

Irumamycin (7) (C₄₁H₆₅NO₁₂) は埼玉県入間市より採取した土壌より分離した一放線菌 *S. subflavaus* subsp. *irumaensis* の培養液中から単離された植物性病原菌、特にブドウ、イチゴ等の灰色カビ病に有効な物質である¹³⁾。7はその¹³C NMRスペクトル解析から大環状ラクトンに糖がグリコシド結合した構造を有することが推定された。7の酸メタノリシスにより糖の構造を methyl 3-O-carbamoyl-2-deoxy- α -D-rhamnoside (8) と決定した。7のアグリコン部はポリケチド骨格を有すると推定されたので、その構造決定に当り、[1-¹³C], [1,2-¹³C₂]アセテートならびに[1-¹³C], [1,2-¹³C₂]プロピオネートの取り込み実験を行った。[1-¹³C]アセテートおよび[1-¹³C]プロピオネートの取り込み実験では夫々、5個および8個の炭素に高い取り込みが観測されたことからアグリコン部はアセテートおよびプロピオネートユニットから生合成される。[1,2-¹³C₂]アセテートおよび[1,2-¹³C₂]プロピオネートで標識された7の各¹³C NMRスペクトル(100 MHz)では各炭素シグナルに¹³C-¹³Cカップリングに由来するサテライトピークが観測された。¹³C-¹³Cデカップリング実験から各炭素の帰属と結合順序を明らかにすることにより、アグリコン部はそれぞれアセテートユニット2分子と3分子から成る部分構造(I)および(II)を、

微生物の第2次代謝産物の中にあつて 3-ulose の存在は極めて稀であり、本構成糖は新規である。

15 のアグリコン部 (14 に相当する) の構造決定に際して行われた ^{13}C 標識前駆体の取り込み実験の具体例を示す。生産菌 *Bacillus aurantinus* の 24 時間種培養液を生産培地 (glycerol 1.0%, starch 1.0, soybean meal 2.0, dry yeast 0.3, NaCl 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, K_2HPO_4 0.1, CaCO_3 0.3, pH 7.0) に植菌し、6 時間培養後、各種 99% ^{13}C 標識前駆体 [$1\text{-}^{13}\text{C}$], [$2\text{-}^{13}\text{C}$] および [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] アセテート, [$1\text{-}^{13}\text{C}$] プロピオネート, [^{13}C -メチル] L-メチオニン (この添加の場合にはアミノ酸を含む soybean meal の組成を 2.0% から 1.8% に減少させた培地を使用) を各 0.2% (W/V) の割合いで添加した。Aurantinin の生産が最大となる 42 時間目で培養を中止し、各培養液 (1~2 l) から各種 ^{13}C 標識 aurantinin B (2~4 mg) を単離し、 ^{13}C NMR (100 MHz, 重アセトン) を測定した。その結果、[$1\text{-}^{13}\text{C}$] アセテート添加では 16 個の炭素に、また [$2\text{-}^{13}\text{C}$] アセテートの添加では 17 個の炭素に高い取り込みが認められたが、[$1\text{-}^{13}\text{C}$] プロピオネートでは全く取り込みが認められなかった (図 9)。 ^{13}C NMR スペクトルの図中、矢印で示したシグナルは ^{13}C 標識アセテートが全く取り込まれていない炭素を示した。さらに [^{13}C -メチル] L-メチオニンの取り込み実験では合計 5 個のメチル炭素に高い取り込みが観測された。このことは 15 のアグリコン部は合計 15 分子のアセテートユニットとアセテート由来の 3 個の C_4 (2 個のメチル炭素と 1 個のカルボキシ炭素) さらにメチオニン由来の 5 個のメチル炭素から生合成されることを意味している。そこで、C-C 間の結合様式を明らかにするため、[$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] アセテートで標識された 15 の 2 D-INADEQUATE (測定条件: 試量 2.5 mg, $J_{\text{CC}} = 60$ Hz, Acquisition Time 122 時間, 測定溶媒 重アセトン) を測定した (図 10)。その結果、アセテート

ユニット分子内 ^{13}C - ^{13}C カップリングに加え、一部観測される分子間の ^{13}C - ^{13}C カップリング様式から 3 つの標識体の取り込み様式 A, B, C を提出した。ここで明らかにされた各炭素の ^{13}C ケミカルシフト値の帰属のもとに、 $^1\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 相関 2 D-スペクトルならびに LSPD データを考慮し、A~C に対応する部分構造 (I), (II), (III) を提出した (図 11)。部分構造 (I) はトリエンを含み、アセテート由来の末端カルボキシル基を有するアルキル鎖からなり、C-5 および C-7 位に結合するメチル基がアセテートユニットの脱炭酸により生成する等の生合成的に興味ある構造を有している。シクロヘキサン環を含む部分構造 (II) および 5 員環を含む構造 (III) の結合様式については 15 の化学変換によって明らかにした。即ち、15 の NaBH_4 還元により得られるジヒドロ体 (16) において 15 で観測された酸無水物カルボニル炭素に由来する δ 174.5 のシグナルが消失し、新たに δ 92.9 にヘミアセタール炭素が観測されること、さらに 5% NaOH にて加水分解後、 CH_2N_2 にてメチル化することによりメチルエステル体 (17) を与える。このことは部分構造 (II) と (III) は酸無水物構造を介して結合していることを意味する (図 12)。さらに (I)~(III) 間の結合様式は LSPD に加えて、[^{13}C -メチル] L-メチオニンで標識された 15 の ^{13}C NMR 解析より明らかにした。メチオニン由来の 5 個のメチル炭素 (δ 119.2 $\times$ 2, δ 18.6, δ 18.2, δ 22.3) が極めて高い取り込み率 (メチル基以外の天然の炭素シグナルとのピークの高さから換算して約 95 倍) を示したことから、これらが結合する各炭素 (δ 46.1, δ 118.5, δ 39.2, δ 40.7, δ 133.0) はダブルットとして観測される。さらにスペクトルの測定感度をあげることによって ^{13}C で標識されたメチル炭素と 2~3 結合内の天然の炭素間で ^{13}C - ^{13}C カップリングが観測される (図 13)。炭素間のカップリングに基づく各シグナルの分裂

Fig. 9 ^{13}C NMR spectra of ^{13}C acetate labeled aurantinin B.

Fig. 10 2D-INADEQUATE of [1,2- $^{13}\text{C}_2$] acetate labeled auranitin B.

Fig. 11 Partial structures of auranitin B (15) proposed by biosynthetic means.

Fig. 12 Chemical transformation of auranitin B (15).

様式と前述の部分構造(I)~(III)を考慮することによって15に対し、5, 6, 7, 8員環を含む4環性の新規構造を提出した²⁰⁾(図14)。以上述べた[^{13}C -メチル]L-メチオニンの15への高い取り込みは生合成知見のみならず、構造決定への重要な手段となり得ることを示すものである。15はその分子中に8員環内に酸無水物構造を含み、新規糖 6-deoxy- β -ribohexopyranos-3-ulose を有する等の点でこれまでの微生物の第2次代謝産物にはみられない骨格を有している。そのアグリコン部は11分子のマロネート、メチオニン由来の3個のメチル、アセテート由来の2個のメチルと1個のカルボキシル炭素からなる長鎖ポリケチドと恐らくコハク酸をスターユニット(2分子のマロネートユニットに相当)とし、これに2分子のマロネートとメチオニン由来のメチルからなる短鎖ポリケチドから生合成されるものと考えられる(図14)。ポリケチド炭素に結合するメチル基の生合成由来は放線菌の場合ではプロピオネートメチルが、カビの場合ではメチオニンからが一般的である。細菌由来の auranitin では C-5, C-7 位に結合するメチル基がアセテート由来である点で特長的であり細菌由来のポリケチドで2~3

Fig. 13 ^{13}C NMR spectrum and ^{13}C - ^{13}C coupling pattern of $[^{13}\text{C}\text{-CH}_3]$ L-methionine labeled auranitin B (15).

Fig. 14 Structures of auranitins A (14) and B (15) and their biosynthetic building units.

報告されていることから、本合成経路が細菌特有のものであることも考えられ、興味を持たれる。

3. 微生物変換による絶対構造の決定と新規ハイブリッド抗生物質の創製

天然物の絶対構造の決定には合成的手段や NMR, CD および X 線結晶構造解析の手段が普遍的に使用されているが、筆者らは微生物が立体特異的に変換反応を行う能力に注目し、これを効果的に利用することにより、マクロライド抗生物質の絶対構造を決定することを試みた。

また、この微生物変換能とポリケチド生合成阻害剤を併用することにより、新規ハイブリッド抗生物質の創製に成功した例を紹介する。

3.1. 16 員環マクロライド, Tylosin(タイロシン)および関連物質の絶対構造 Tylosin(18)は *S. fradiae* の生産する 16 員環マクロライド抗生物質で、現在、動物薬特に発育促進を目的とした飼料添加剤、養鶏業界で問題となっているマイコプラズマ感染症に用いられている。筆者らによるマクロライド抗生物質の化学と生物活性に関する一連の研究過程^{21,22)}で 18 の構造を明らかにしてきたが²³⁾、その絶対構造については未定であった。筆者らはすでに X 線結晶解析によって絶対構造が明らかにされている同じ 16 員環マクロライドである leucomycin A₃ (19) と 18 ならびにそれぞれに対応する化学変換物の NMR および CD による比較解析より、ラクトン上 C-3, C-4, C-5, C-6 および C-8 位の立体配置を 3*R*, 4*S*, 5*S*, 6*R*, 8*R* と決定したが、残る C-14 および C-15 の立体配置については決定することが出来なかった。一方、tylosin 生産菌 *S. fradiae* KA-427 株を NTG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) 処理して得られる一変異株が 18 の生合成中間体であると考えられる protylonolide (20) を生産することを見出し、これを単離し、X 線結晶解析によりその立体配置を明らかにした²⁴⁾。18 のアグリコン部の骨格炭素の生合成由来については ^{13}C 標識前駆体の取り込みから 2 分子のアセテート、5 分子のプロピオネート、それに 1 分子の酪酸から生合成されることを明らかにし、また酪酸の代謝経路についても明らかにしてきた²⁵⁾。このラクトン (20) が直接 18 の前駆

体となりうるものであり、しかも 20 の立体配置がそのまま保持されて 18 に微生物変換されるならば、18 の絶対構造は明らかにされるはずである。そこで tylosin 生産菌の培養液にポリケチド生合成阻害剤である cerulenin (13) を添加し、18 のアグリコン部の生成を阻害した条件下で培養 2 日目に 20 を添加し、さらに 2 日間培養を行った。その結果、20 は殆んど定量的に 18 に微生物変換された。またこの変換の過程で 20 の立体配置がそのまま 18 に保持されていることを確認するため、微生物変換物 18 から酸加水分解、還元反応などによって得られた 5-O-mycaminosyl protylonolide (21) と前駆体である 20 の CD 解析を行った。その結果、両化合物は同一の立体配置を有していることが明らかにされ、従って 18 のアグリコン部の立体配置は 3 *R*, 4 *S*, 5 *S*, 6 *R*, 8 *R*, 14 *S*, 15 *R* と決定した²⁶⁾ (図 15)。絶対構造が明

らになった 18 について竜田ら²⁷⁾は D-glucose を出発原料として全合成に成功した。W.D. Celmer は erythromycin, oleandomycin の 14 員環マクロライドの絶対構造に基づいて“Configurational Model” (いわゆる Celmer モデル) を提唱し²⁸⁾、これを 16 員環マクロライド、18, 19 および magnamycin B に適用した。Celmer により提出された 18 の C-14 位の立体配置 *R* は今回の実験結果から *S* 配置に訂正され、Celmer モデルが 16 員環マクロライドには一部適用できないことを明らかにした。その後、同 C-14 位が不斉炭素である 16 員環マクロライド、rosaramicin, acumycin, mycinamicin の立体構造が X 線結晶解析により明らかにされたが、いずれも 18 と同一の立体配置を有している (図 16)。

3.2. ハイブリッド生合成による Chimeramycin (キメラマイシン) および関連物質の創製 Cerulenin (13) は *Cephalosporium caerulens* の培養液中から抗カビ抗生物質として単離されたが、かぶれによる副作用のため医薬品としての開発は断念された。その後の作用機序による研究から本抗生物質は脂肪酸の生合成を特異的に阻害すること、さらに生産菌の生育を阻害しない条件下でポリケチド抗生物質の生合成を阻害することを見出した²⁹⁾。本抗生物質は現在、生化学試薬として、脂質、生合成研究領域において広く利用 (市販) されている^{17, 30)}。筆者らは酵素阻害剤 13 の特性を 16 員環マクロライド生産菌の微生物変換に適用し、新規ハイブリッド抗生物質の創製を試みた。

Spiramycin 生産菌 *S. ambofaciens* KA-448 株の培養液

Fig. 15 Microbial transformation of protylonolide (20) to tylosin (18).

Fig. 16 Celmer model of 16-membered macrolides.

中に13を添加し, spiramycin I (22) のアグリコン部の生合成を阻害した条件下, 24時間培養後に前述の protylonolide (20) を添加し, さらに42時間培養を行った。Ceruleinin 非存在下では *S. ambofaciens* KA-448 は22を生産するが, cerulenin 存在下 ($40 \mu\text{g/ml/day}$) では22のアグリコン部の生合成は完全に阻害されており, 培養液中には22の構成糖である mycaminose, mycarose, forosamine の生産が認められる。この条件下で22のアグリコンの構造類似体である20 ($100 \mu\text{g/ml}$) を培養液に添加し, 培養することにより, spiramycin 生産菌は20を取り込み, これに22の構成糖がグリコシド結合した新規マクロライド, chimeramycin A (23) および B (24) の生産を見出した³¹⁾ (図17)。本物質は22のアグリコン部が18のそれとそっくり置換された構造を有し, その抗菌活性に興味を持たれた。chimeramycins は18, 22と同等か若干高い抗菌活性を有し, ラクトン上3位が水酸基である24の方が同位がアセチル基である23と比較し高い活性を示した。また, 24を酸加水分解して得られる demycarosyl 体では24より高い抗菌活性を示した。D. Gottlieb らは1969年, McCromic の cosynthesis 法を發展させ, 抗生物質生産菌の生合成欠損変異株を用い, 構造類似体をその培養液に添加し, 微生物変換させることにより新規物質を得る方法, Mutational Biosynthesis (Mutasynthesis) を開発した。本法はアミノ配糖体抗生

Fig. 17 Hybrid biosynthesis of chimeramycins by a spiramycin-producing strain, *S. ambofaciens* KA-448 in the presence of cerulenin (13).

物質に適用され新規抗菌物質 hybrimycins や mutamicins の創製をもたらした³²⁾。筆者らの方法は上記の変異株を用いる mutational biosynthesis とは酵素阻害剤を用いる点で基本的に異なっており, 本法を Hybrid Biosynthesis と呼ぶことを提唱した。本法はさらに14員環マクロライド, picromycin (25) のアグリコン部を16員環マクロライド (20) で置換させる微生物変換に適用した。即ち, picromycin 生産菌の培養液に13の存在下, 20を添加し, 培養することにより, 20のC-5位に25の構成糖である desosamine がグリコシド結合した抗菌物質 5-O-desosaminyl protylonolide (26) を得た³³⁾。本物質は古米らによって得られ, 絶対構造が不明であったマクロライド M-4365 G₁ と同一物質であった。絶対構造が明らかにされている20が前述のように立体配置が保持されたまま, 26に変換されることから, M-4365 G₁ (26) の絶対構造を決定することが出来た (図18)。以上のように Hybrid Biosynthesis 法は今後ポリケチド骨格に糖やアミノ酸, さらには生合成的にシキミ酸由来の構造が結合した微生物第2次代謝産物に対し広く適用出来るものと考えられる。

Fig. 18 Hybrid biosynthesis of 5-O-desosaminyl-protylonolide (26) using a picromycin producing strain, *Streptomyces* sp. AM-4900 in the presence of cerulenin (13).

4. 遺伝子操作による新規抗生物質 Mederrhodin (メデロージン) の創製

抗生物質生産菌の育種に関する遺伝子操作技術の導入は抗生物質の安定な発酵生産と生産性の向上, さらには新規物質の創製と生合成に関する制御系の解明等への寄

与を挙げることが出来る。しかし、現在では抗生物質の大半を生産する放線菌の育種技術が確立され、高生産株が取得されていること、さらに第2次代謝産物の生産には数多くの生合成遺伝子が関与していることもあり、抗生物質領域への応用は今後の遺伝生化学的研究に負うところが多い。筆者らは前述の酵素阻害剤や変異株を利用する新規ハイブリッド抗生物質の創製をさらに遺伝子操作レベルにまで発展させ、Hopwood らとの協同研究により新規抗生物質の創製を試みた。その結果、以下に述べる遺伝子操作による最初の新規ハイブリッド抗生物質 mederrhodins の取得に成功した^{34,35)}。

DNA 断片上での各生合成遺伝子の位置が明らかにされ、それぞれ単離されている actinorhodin (27) の生産菌、*S. coelicolor* A₃(2) に着目し、この生合成遺伝子(あるいはその部分断片)を 27 と構造の類似する抗生物質、medermycin (28) の生産菌、*Streptomyces* sp. AM-7161 に導入した。即ち、本生産菌を宿主とし、これに *S. coelicolor* から actinorhodin 生合成遺伝子、act V (actinorhodin 生合成欠損変異株 V を相補する断片)を単離し、ベクタープラスミッドとライゲーションさせて得られた組み換えプラスミッド、pIJ 2301, 2315, 2316 を導入した。このようにして得られた形質転換株の培養液中に新規ハイブリッド、mederrhodin A (29), B (30) の生産を認めた(図 19)。なお、actinorhodin 生合成全遺伝子を含んだ組み換えプラスミッドを導入した株からは mederrhodin の生産は認められなかった。pIJ 2301, 2315, 2316 を導入した形質転換株の中では pIJ 2315 転換株で mederrhodin の生産能が最も良好であったことから、pIJ 2315 が酸化酵素発現遺伝子としての最少単位と考えられる。即ち、新転換株にあっては宿主からは medermycin 生合成酵素より 28 が生合成され、組み換え

プラスミッド pIJ 2315 からは酸化酵素が生合成され、その結果、28 のベンゾキノン上が水酸化された mederrhodins が生成されるものと考えられる。なお、mederrhodin の抗菌活性は 29 において、28 と同程度の活性が保持されていた。形質転換株の mederrhodin の生産が安定であること、かつ蓄積量も高いことから、遺伝子操作による本新規ハイブリッド抗生物質の取得の成功が今後の抗生物質領域での発展に大きく貢献するものと期待される。

5. おわりに

以上、¹³C 標識前駆体の利用、ポリケチド生合成阻害剤 cerulenin を併用する微生物変換など、微生物の生合成能力への効果的なアプローチが種々の抗生物質の構造決定、新規ハイブリッド抗生物質の創製に有用な手段となることを示した。また遺伝子組換え技術の適用が新規ハイブリッド抗生物質 mederrhodin の創製につながった例を述べた。天然に存在する微生物の有効利用は未だ 10% 位だとも云われており、新生物活性物質の発見は勿論のことであるが、上述の生合成手段に加え、さらに微生物の有している潜在能力を引き出す新しい手段を利用することにより有用な生物活性物質の創製がますます盛んになると思われる。

(昭和 62 年 12 月 23 日受理)

文 献

- 1) 大野雅二, 大村智編「抗生物質研究の最先端」現代化学-増刊 9 (東京化学同人)
- 2) 瀬戸治男, 有合化, 45, 729 (1987)
- 3) S. Ōmura, H. Ohno, T. Saeki, M. Yoshida, A. Nakagawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 704 (1978)
- 4) A. Nakagawa, H. Ohno, K. Miyano, S. Ōmura, *J. Org. Chem.*, 45, 3268 (1980)
- 5) S. Ōmura, Y. Iwai, Y. Takahashi, N. Sadakane, A. Nakagawa, H. Ōiwa, Y. Hasegawa, T. Ikai, *J. Antibiot.*, 32, 255 (1979)
- 6) Y. Uehara, M. Fori, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Jpn. J. Cancer Res. (癌)*, 76, 672 (1985)
- 7) S. Ōmura, A. Nakagawa, N. Sadakane, *Tetrahedron Lett.*, 1979, 4323
- 8) A. Haber, D. Johnson, K.L. Rinehart Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 3541 (1977)
- 9) S. Ōmura, H. Tanaka, R. Ōiwa, J. Awaya, R. Masuma, K. Tanaka, *J. Antibiot.*, 30, 908 (1977)
- 10) N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Ōmura *ibid.*, 34, 1517 (1981)
- 11) N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H.

Fig. 19 Production of mederrhodins by gene engineering.

- Tanaka, S. Ōmura, *ibid.*, 35, 602 (1982)
- 12) S. Ōmura, A. Nakagawa, N. Fukamachi, S. Miura, Y. Takahashi, K. Komiyama, B. Kobayashi, *ibid.*, in press (1988)
- 13) S. Ōmura, Y. Tanaka, A. Nakagawa, Y. Iwai, M. Inoue, H. Tanaka, *ibid.*, 35, 256 (1982)
- 14) S. Ōmura, A. Nakagawa, Y. Tanaka, *J. Org. Chem.*, 47, 5413 (1982)
- 15) 大村智, 中川彰, *ファルマシア*, 20, 1226 (1984)
- 16) N. Sadakane, Y. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, 36, 931 (1983)
- 17) S. Ōmura, *Method in Enzymology*, 72, 520, Academic Press, New York (1981)
- 18) S. Ōmura, T. Nishikiori, R. Ōiwa, Y. Iwai, R. Masuma, M. Katagiri, *J. Antibiot.*, 29, 477 (1976)
- 19) Y. Konda, A. Nakagawa, Y. Harigaya, M. Onda, R. Masuma, S. Ōmura, *ibid.*, 41, 268 (1988)
- 20) 中川彰, 根田八重子, 波多野朗子, 恩田政行, 大村智, 第29回天然有機化合物討論会講演要旨集, p.279 (1987)
- 21) S. Ōmura (ed.) *Macrolide Antibiotics-Chemistry, Biology and Practice*, Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo (1984)
- 22) 大村智, *薬学雑誌*, 106, 729 (1986)
- 23) S. Ōmura, A. Nakagawa, A. Neszmelyi, S.D. Gero, A.M. Sepulchre, F. Piriou, G. Lukacs, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 4001 (1975)
- 24) S. Ōmura, S. Kitao, H. Matsubara, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 1963 (1980)
- 25) S. Ōmura, A. Nakagawa, *Antibiotics IV Biosynthesis* (J.W. Corcoran ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. New York, p.175 (1981)
- 26) S. Ōmura, N. Sadakane, H. Matsubara, *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 223 (1982)
- 27) K. Tatsuta, Y. Amemiya, Y. Kanemura, H. Takahashi, M. Kinoshita, *Tetrahedron Lett.*, 23, 3375 (1982)
- 28) W.D. Celmer, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1799 (1965)
- 29) S. Ōmura, H. Takeshima *J. Biochem.*, 75, 193 (1974)
- 30) S. Ōmura, *Bacterial Rev.*, 40, 681 (1976)
- 31) S. Ōmura, N. Sadakane, Y. Tanaka, H. Matsubara, *J. Antibiot.*, 36, 927 (1983)
- 32) K.L. Rinehart, Jr. *Pure and Appl. Chem.*, 49, 1361 (1977)
- 33) S. Ōmura, H. Ikeda, H. Matsubara, N. Sadakane, *J. Antibiot.*, 33, 1570 (1980)
- 34) D.A. Hopwood, F. Malphartida, H.M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, A.M. Rudd, H.G. Floss, S. Ōmura, *Nature*, 314, 642 (1985)
- 35) S. Ōmura, H. Ikeda, F. Malpartida, H.M. Kieser, D.A. Hopwood, *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 29, 13 (1986)

協会誌バックナンバー在庫表

下記のバックナンバーが在庫しておりますので、ご希望の方は代金(現金書留)を添えてお申し込み下さい。

(昭和63年5月現在)

巻数	年号	在庫月号	定価	送料
第43巻	昭60年'85	— — — — — 7 8 — — 11 —	1,200 円/冊	(送料共)
44	61 '86	————— (全て欠本) —————	〃	〃
45	62 '87	— — 3 — 5 6 — 8 — — 11 12	〃	〃
46	63 '88	1 2 — — 5 — — — — — — —	〃	〃

特	43 — 11 「有機化学はバイオサイエンスにどこまで関わり合えるか」	2,500 円/冊	(送料共)
集	45 — 6 「ヘテロ原子と機能性物質」	〃	〃
号	11 「コンピュータと有機化学」	〃	〃
	46 — 5 「動的天然物化学」	〃	〃