The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Enterobacter cloacaeの産生する新抗生物質2'-Amino-2'-deoxyguanosineの研究
Author(s)	中西, 俊秀
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32328
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【3】

氏名・(本籍)	中西俊秀（なかにしとしひで）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 4316 号
学位授与の日付	昭和53年4月11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	**Enterobacter cloacaeの産生する新抗生物質2′-Amino-2′-deoxyguanosineの研究**
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 池原 森男 教授 岩田平太郎

論文内容の要旨

第一編 緒 論

核酸系抗生物質は既に50種類以上知られており，その大部分がヌクレオシド抗生物質である。ヌクレオシドは生体内で重要かつ多様な役割を果しており，したがってヌクレオシド抗生物質も様々な作用機構によりその抗菌活性を発揮している。これらの抗生物質のいくつかはpuromycinに代表されるように“Biochemical tool”としてまたは核酸化学のモデルとして利用されてきた。更に実用的な面では医薬・農薬への応用についても種々検討され，特に抗ガン剤・抗ウィルス剤として注目されている。

著者は抗生物質の探索の過程で土壌から分離した細菌の一株が新規なグアノシンアナログを生産することを見出し，その化学構造・作用機構および誘導体について検討した。

第二編 本 論

第一章 新抗生物質の化学構造および生物活性

土壌から分離した細菌（KY3071）がE. coliに対して抗菌活性を示す物質を培養沪液中に産生していることを見出し，陽イオン交換樹脂等のカラムクロマトにより精製・単離し，熱水から白色板状晶を得た。

本物質の抗菌活性はE. coliにのみ認められ他の細菌では認められなかった。しかし動物細胞のHeLa細胞の増殖をin vitroで抑制し，かつin vivoでマウスのSarcoma 180に対し抗腫瘍活性が認められた。

本物質のＵＶ吸収スペクトルはグアノシンのそれと一致し，かつ本物質およびそのアセチル化物の

プロトンまたはカーボン13核磁気共鳴の解析から2-amino-2-deoxypentoseが含まれていることが確認できた（Table Ⅰ）。酸加水分解により得た糖部分の塩酸塩結晶は各種2-amino-2-deoxypentoseと融点，旋光度を比較して，2-amino-2-deoxy-D-riboseとよく一致し，IRスペクトルもよく一致した。糖とグアニンの結合はPMRにおけるアノマープロトンの化学シフトおよび旋光度からβ-結合であることが確認できた。

以上の結果から本物質の構造は9-（2′-amino-2-deoxy-β-D-ribofuranosyl）guanine（Fig. 1）

Table Ⅰ. PMR Chemical Shifts and Coupling Constants for Sugar Moieties in 2AG Related Compounds.

Position	Guanosine[a] (ppm) J(Hz)	2AG[a] (ppm) J(Hz)	N-Ac-2AG[a] (ppm) J(Hz)	Tetra-Ac-2AG[b] (ppm) J(Hz)
1′	5.88	5.72	5.91	5.94
	$J_{1'2'}=7$	$J_{1'2'}=8$	$J_{1'2'}=8.5$	$J_{1'2'}=8$
2′	—	3.98	5.01	5.68
	$J_{2'3'}=6$	$J_{2'3'}=6$	$J_{2'3'}=5.5$	$J_{2'2'}=5.8$
3′	4.39	4.2—4.4	4.48	5.32
	$J_{3'4'}=3.5$	—	$J_{3'4'}=2$	$J_{3'4'}=2$
4′	4.19	4.2—4.4	4.32	
	$J_{4'5'}=4$	—	$J_{4'5'}=3.7$	4.40
5′	3.76	3.98	3.91	brs
		$J_{4'5'}=4$		

a) 100MHz, in D_2O
b) 100MHz, in $CDCl_3-CD_3OD$

すなわち2′-amino-2′-deoxyguanosine（2AGと略す）であることが確認された。2-amino-2-deoxypentoseが天然界から見出されたのは本物質が最初である。本物質の化学的合成は池原ら（1976）およびHobbsら（1977）によって報告されている。

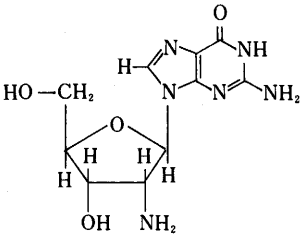

Fig. 1 2′-Amino-2′-deoxyguanosine（2AG）

第二章　生産菌の同定と生産条件の検討

2AGの生産菌KY3071株は分類学的研究の結果 Bergey's Manual（第8版）に従ってEnterobacter cloacaeと同定された。既知の核酸系抗生物質は放線菌または真菌によって産生され，本菌のような腸内細菌群による産生の例はない。

2AGの産生条件としては庶糖，酵母エキス，硫酸アンモニウムを主成分として24時間の培養で生育と平行して蓄積される。更にプリンヌクレオチドの培地への添加は全般的に2AG産生を促進し，中でもXMPが最も有効であった（Table Ⅱ）。逆にプリンヌクレオシドの添加はグアノシンを含めて阻害的に作用した。これらの結果はXMPから2AGへの生合成経路を示唆するものである。

Table Ⅱ. Effecet of Purine Derivartives on 2AG Production

Experiments were carried out in 300 ml Erlenmyer flasks containing 20 ml of F-medium. All purine derivartives were filtrated with Milipore filter (HAWP, 0.45 μ) and were added at 0 time of incubation. Assay of 2AG production was performed after 24hr of incubation.

Supplements	2AG production (mg/liter)			
	0.1	0.5	1.0	2.0g/liter
AMP	50	105	165	72
GMP	31	63	78	130
IMP	52	88	105	140
XMP	87	135	240	180
Adenosine	32	35	20	15
Guanosine	55	32	18	±
Inosine	49	55	50	48
Xanthosine	54	51	45	30
Adenine	60	66	68	65
Guanine	55	50	41	47
Hypoxanthine	50	31	44	50
Xanthine	68	61	64	55
None	53			

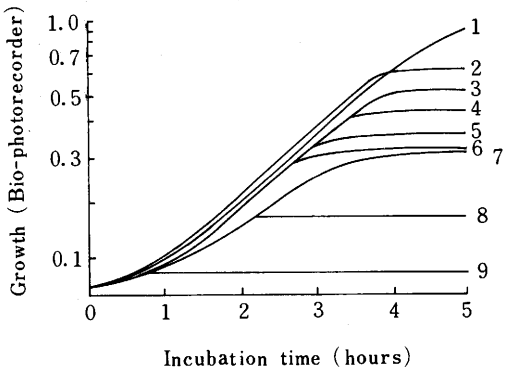

Fig. 2. Reversal of antibacterial activity of 2AG by purine related compounds

Incubation of *E. coli* KY 3591 was performed in the Bio-photorecorder. In the presence of 2AG (0.035mM), purine related compounds were added at 0.35 mM. 1), without 2AG; 2), guanosine; 3), adenosine; 4), inosine; 5), deoxyguanosine; 6), deoxyadenosine; 7), 5′-adenylic acid; 8), 5′-guanylic acid; 9), none, guanine hypoxanthine, xanthine, xanthosine, 5′-inosinic acid or 5′-xanthylic acid.

２ＡＧの培地中での蓄積量はXMP 1g/ℓ添加して24時間の培養で0.4g/ℓに達した。

第三章　２ＡＧの抗菌活性とグアノシンによる阻害

２ＡＧに感受性の*E. coli*（KY3591）を実験に用いた。２ＡＧは本菌に対して殺菌的に作用するが，耐性株も容易に出現した２ＡＧの抗菌作用に対してキサントシン以外のプリンヌクレオシドの添加はその抗菌作用の発現を遅くし，AMP，GMPも弱いながらも同様な作用を示した（Fig. 2)。しかしプリン塩基類やピリミジン関連物質等ではそのような効果は認められなかった。

グアノシンは２ＡＧの抗菌作用の阻害に最も有効であり，その添加量によって生育速度は影響されず，最終的な生育量だけが規定された。２ＡＧ添加後，グアノシンの添加が遅れるとその遅れに比例して生育の回復に要する時間が長くなる。菌体の洗浄処理もグアノシンの添加と同じ現象が観察された。一方，グアノシン添加後に２ＡＧを加えると２ＡＧの添加時期に関係なく，グアノシン添加一定時間後に生育が阻止された（Fig. 3)。これらの結果は他の代謝拮抗剤で観察される現象と著しく異っ

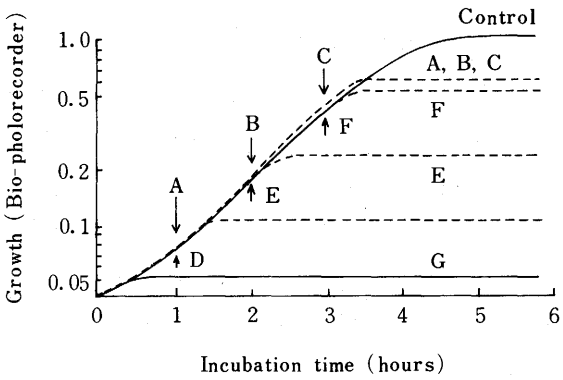

Fig. 3 The inhibitory action of 2AG on the growth of *E. coli* KY 3591 in the presence and absence of guanosine

In the presence of guanosine (100 μg/ml), 2AG was added at 1, 2 and 3 hours as indicated by arrows A, B and C, respectively. In the absence of guanosine, 2AG was added at the time of arrows D, E and F. Curve G shows the experiment in which 2AG was added at 0 time without guanosine. The growth was automatically recorded with the Bio-photorecorder.

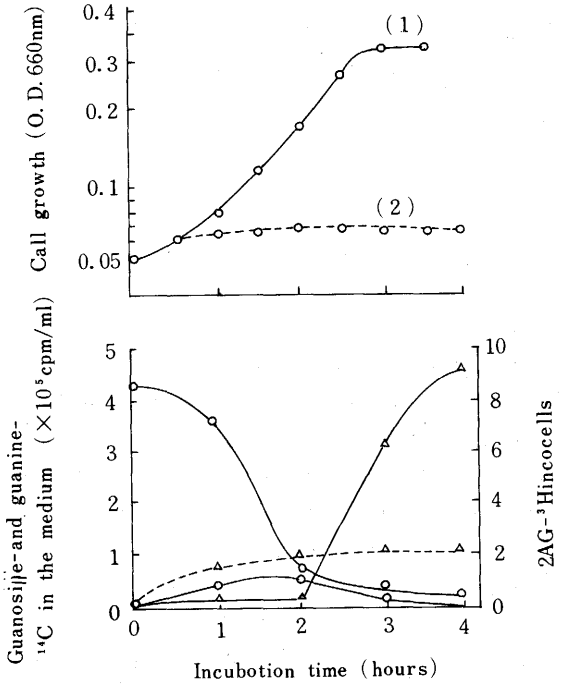

Fig. 4 The incorporation of 2AG-8-^{3}H and guanosine-U-^{14}C into *E. coli* KY3591 cells. Guanosine and 2AG were added giving 0.04μCi/50μg/ml and 0.022μCi/10μg/ml at 0 hour, respectively.

The measurement of 2AG-^{3}H incorporation was described in Materials and Methods. The amount of guanosine-U-^{14}C and guanine-U-^{14}C in the supernatant of the medium was determined after separation by paper chromatography. The growth was measured with Tokyo Koden Colorimeter. (1), cell growth in the presence of guanosine. (2), cell growth in the absence of guanosine, (3), guanosine-U-^{14}C in the supernatant of the medium. (4), guaninc-U-^{14}C in the supernatant (the specific activity of guanine is equal to a half of guanosine in radioactivity because the guanine was uniformly labeled), (5), 2AG-8-^{3}H incorporated into cells in the presence of guanosine. (6), 2AG-8-^{3}H incorporated into cells in the absence of guanosine.

ており，２ＡＧの細胞内への取り込み段階でのグアノシンとの拮抗が示唆された。

第四章　*E. coli* 細胞内への２ＡＧ取り込み機構

２ＡＧの菌体内への取り込み機構を研究するため２AG-8-^{3}Hを調製して用いた。グアノシンを添加した時グアノシンはグアニンに分解して取り込まれ培地中から急激に減少した。２ＡＧは，培地中のグアノシンが一定濃度以下になった時初めて取り込まれた。つまり２ＡＧの細胞内への取り込み段階をグアノシンが阻害していることが明らかになった（Fig. 4)。しかも，グアノシンによる阻害は非拮抗的阻害であり，かつ２ＡＧが取り込まれる際にはグアニンに分解されないのでプリンヌクレオシドホスホリラーゼを介して取り込まれるグアノシンとは別の機構で取り込まれるものと考えられる。２ＡＧ非感受性株や耐性株は２ＡＧ取り込み能において感受性株との差が認められなかった。

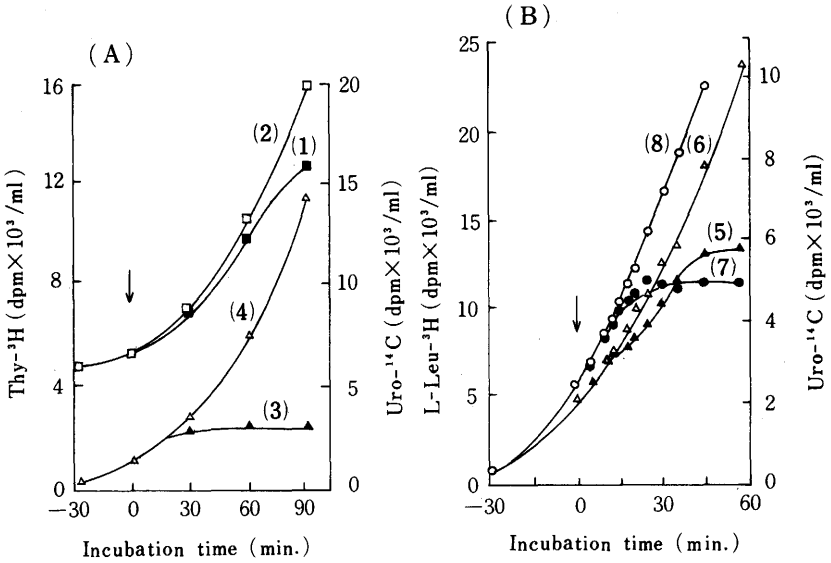

Fig. 5 Effects of 2AG on macromolecular syntheses in *E. coli* KY 3591

(A) Incorporation of thymine-^{3}H and uracil-^{14}C into the acid-insoluble fraction. When the cell density of *E. coli* KY 3591 in medium N reached OD_{660nm}=0.1, thymine (methyl-^{3}H) (1 μCi/ml) and uracil-2-^{14}C (0.2 μCi/ml) were added. After incubation for 30 minutes, it was divided into 2 portions and 2AG (10 μg/ml) was added to one. After the addition of radioactive precursors, 0.5ml samples were removed at intervals and treated as described in Materials and Methods.

Incorporation of thymine-^{3}H in the presece (1) or absence of 2AG (2). Incorporation of uracil-^{14}C in the presence (3) or absence of 2AG (4).

(B) Incorporation of uracil-^{14}C and L-leucine-^{3}H into acid-insoluble fraction. Experimental procedures were the same as those described in (A) except that medium P and L-leucine-4, 5-^{3}H were used instead of medium N and thymine-^{3}H.

Incorporation of uracil-^{14}C in the presence (5) or absence of 2AG (6). Incorporation of L-leucine-^{3}H in the presence (7) or absence of 2AG (8).

The arrows indicate the time of 2AG addition.

第五章　抗菌活性の作用機構

２ＡＧの添加による高分子合成への影響は添加15分後にまず蛋白合成が阻害され，ＲＮＡ合成は約40分で阻害されたが，ＤＮＡ合成は約60分間影響されなかった（Fig. 5)。２ＡＧは直ちに細胞内に取り込まれ酸可溶画分に２AG・MP, -DP, -TPとして存在していた。酸不溶画分ではＲＮＡ画分にのみ取り込まれた（Table Ⅲ)。ただしRNAに取り込まれた２ＡＧは大部分がグアノシンに変化していた。耐性株ではリン酸化能が低下しており，その結果菌体量当りのＲＮＡへの２ＡＧの取り込み量が減少していた（Table Ⅳ)。これが耐性の原因と考えられる。

Table Ⅲ. Distribution of 2AG-8-^{3}H incorporated into *E. coli* cells

The incubation of *E. coli* KY 3591 was performed using a 300ml baffled Erlenmeyer flask containing 40ml of medium B. The culture was grown to $OD_{660\,nm}$=0.2 (*ca*5×10^8cells/ml), 2AG-8-^{3}H was added as 1.0μCi/10μg/ml and incubation was continued for 45minutes, The bacterial cells were collected by centrifugation (0℃, 5,000×g, 5minutes) and were fractionated by a modified Schmidt-Thannhauser-Schneider method as described in Materials and Methods.

Fractions	Total counts(cpm)	Percent
Cells	1.01×10^6	
Acid-soluble	8.70×10^5	86
Acid-insoluble	1.43×10^5	14
DNA	4.30×10^3	3.0
RNA	1.35×10^5	94.5
Protein	1.60×10^3	1.1
Lipid	1.90×10^3	1.3

Table Ⅳ. Specific incorporation of 2AG-8-^{3}H into acid-insoluble fraction of various strains

Incubation was performed using large test tubes containing 5ml of medium B. Exponentially growing cultures of *E. coli* KY3591, KY 3591 2AG^r and K-12 were adjusted to $OD_{660\,nm}$=0.05 with fresh medium and 2AG-8-^{3}H (0.18μCi/10μg/ml) was added. After one hour incubation, 0.1ml sample was removed and was poured into 0.5ml of ice-cold 5% TCA and placed for one hour in the ice bath. Samples were then filtered as described in Materials and Methods. Strain K-12 is naturally resistant to 2AG.

Strains	$OD_{660\,nm}$		cpm/ml	cpm/ml / ΔOD=0.1
	0 hour	1 hour		
KY3591	0.050	0.065	32,100	214,000
KY3591 2AG^r	0.050	0.105	46,400	84,400
K-12	0.050	0.115	47,200	72,600

２AGの蛋白質合成阻害の機構としては，２AG-TPがリボゾーム上でGTPのアナログとしてペプチド合成の開始段階または伸長段階に作用することも考えられるが，２ＡＧ添加後作用の発現に15分も要すること，2-amino-2-deoxyriboseを含むポリヌクオチドが異常な物理化学的性質を示し，ポリヌクレアーゼに対して安定であること，toyocamycinが動物細胞のr-RNAに取り込まれ r-RNA

のプロセシングを阻害することが知られていることから，２AGの作用機構として，RNAに取り込まれRNAの機能の発現が何らかのかたちで阻害されその結果として蛋白質合成が阻害されたと考えられる。

第六章　誘導体の合成

２ＡＧの抗ガン活性を強化する目的で２ＡＧの水溶解性を高めるべく，保護基を用いずにリン酸トリエチルを溶媒としてオキシ塩化リンで直接的かつ選択的に5′-リン酸化を行ない，32%の最終収率で２AG-5-phosphateを得た。その生物活性としては抗菌活性が認められず抗HeLa細胞活性も著しく低下していたがin vivoでの抗sarcoma活性は２AGと同等であった。

２AG-5′-Pよりもホスファターゼに抵抗性があり，かつ膜透過性も優れていることが予想された5′-メチル亜リン酸化物を，DMFを溶媒に用いてDCCとメチル亜リン酸によって直接的かつ選択的に合成し，55%の収率で２AG-5′-methylphosphonateを得た。本物質の毒性は若干強くなっていたが，抗菌活性，抗HeLa活性，抗Sarcoma活性は２AG-5′-Pと同様であった。

第三編　総　　括

抗生物質の検索の過程で土壌から分離したEnterobacter cloacaeが*E. coli*に対して抗菌活性を示し，かつ抗腫瘍活性を有する新規なグアノシンアナログを生産することを見出し，精製・単離した。本物質およびその加水分解物またはそのアセチル化物の各種機器分析から，本物質が9-（2′-amino-2′-deoxy-β-D-ribofuranosyl)guanineすなわち2′-amino-2′-deoxyguanosine（2AG）であることが確認できた。これは2-amino-2-deoxypentoseを含む物質が天然界より見出された最初の例である。本物質の産生はＸＭＰ等の添加で促進され培養液中に0.4g/lの蓄積が認められた。

２AGは*E. coli*の感受性株に対して殺菌的に作用するが，その作用はグアノシン等によって阻害された。グアノシンによる阻害作用は他の代謝拮抗剤にみられる拮抗とは異なり，２ＡＧの菌体内への取込み段階における阻害であり，その取り込み機構はグアノシンとは異なることが明らかになった。細胞内に取り込まれた２ＡＧはリン酸化されてＲＮＡに取り込まれた。高分子合成については２ＡＧ添加後15分でまず蛋白合成を阻害した。この作用は２ＡＧを取り込んだＲＮＡが正常な機能を発揮できない結果によるものと考えられる。２ＡＧに対する耐性は，２ＡＧの細胞内への取り込み段階におけるものではなく，２ＡＧのリン酸化およびＲＮＡへの取り込み能の差に起因するものであった。

更に，２ＡＧの抗腫瘍活性の増強を図る目的で5′-リン酸化およびその改良型としての5′-メチル亜リン酸化を行なったが効力の改善は認められなかった。

論文の審査結果の要旨

新潟県の土壌から分離したEnterobacter cloacaeが*E. coli*に対して抗菌活性を示し，かつ抗腫瘍活性を有する新規なグアノシンアナログを生産することを見出し，精製・単離・構造決定し，更にこのものの作用につき種々の新知見を得たので学位論文として価値あるものと認めた。