



Title	Enterobacter cloacaeの产生する新抗生物質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

氏名・(本籍) 中 西 俊 秀
 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 の產生する新抗生物質 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液中に产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) <i>J</i> (Hz)	2AG ^a (ppm) <i>J</i> (Hz)	N-Ac-2AG ^a (ppm) <i>J</i> (Hz)	Tetra-Ac-2AG ^b (ppm) <i>J</i> (Hz)
1'	5.88 <i>J</i> _{1'2'} =7	5.72 <i>J</i> _{1'2'} =8	5.91 <i>J</i> _{1'2'} =8.5	5.94 <i>J</i> _{1'2'} =8
2'	— <i>J</i> _{2'3'} =6	3.98 <i>J</i> _{2'3'} =6	5.01 <i>J</i> _{2'3'} =5.5	5.68 <i>J</i> _{2'2'} =5.8
3'	4.39 <i>J</i> _{3'4'} =3.5	4.2-4.4 —	4.48 <i>J</i> _{3'4'} =2	5.32 <i>J</i> _{3'4'} =2
4'	4.19 <i>J</i> _{4'5'} =4	4.2-4.4 —	4.32 <i>J</i> _{4'5'} =3.7	4.40
5'	3.76 <i>J</i> _{4'5'} =4	3.98	3.91	brs

a) 100MHz, in D₂O

b) 100MHz, in CDCl₃-CD₃OD

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。

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產生され、本菌のような腸内細菌群による產生の例はない。

2AGの产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产生を促進し、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。

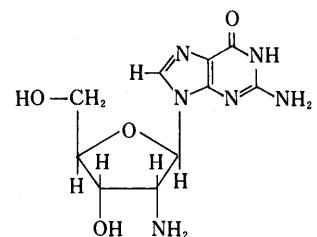


Fig. 1 2'-Amino-2'-deoxyguanosine (2AG)

Table II. Effect of Purine Derivatives on 2AG Production

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

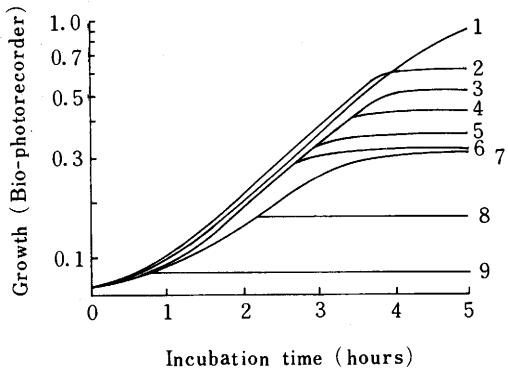


Fig. 2. Reversal of antibacterial activity of 2AG by purine related compounds

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'-xanthyllic 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つ

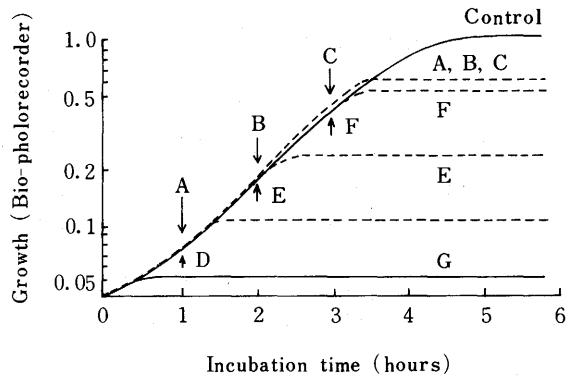


Fig. 3 The inhibitory action of 2AG on the growth of *E. coli* KY 3591 in the presence and absence of guanosine

In the presence of guanosine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 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.

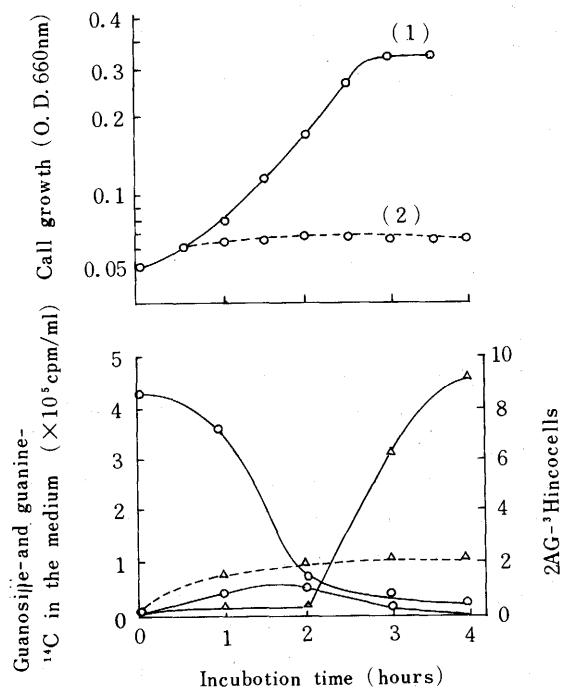


Fig. 4 The incorporation of 2AG-8- ^3H and guanosine-U- ^{14}C into *E. coli* KY 3591 cells. Guanosine and 2AG were added giving $0.04\mu\text{Ci}/50\mu\text{g}/\text{ml}$ and $0.022\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}/\text{ml}$ at 0 hour, respectively.

The measurement of 2AG- ^3H 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), guanine-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- ^3H incorporated into cells in the presence of guanosine. (6), 2AG-8- ^3H 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- ^3H 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。

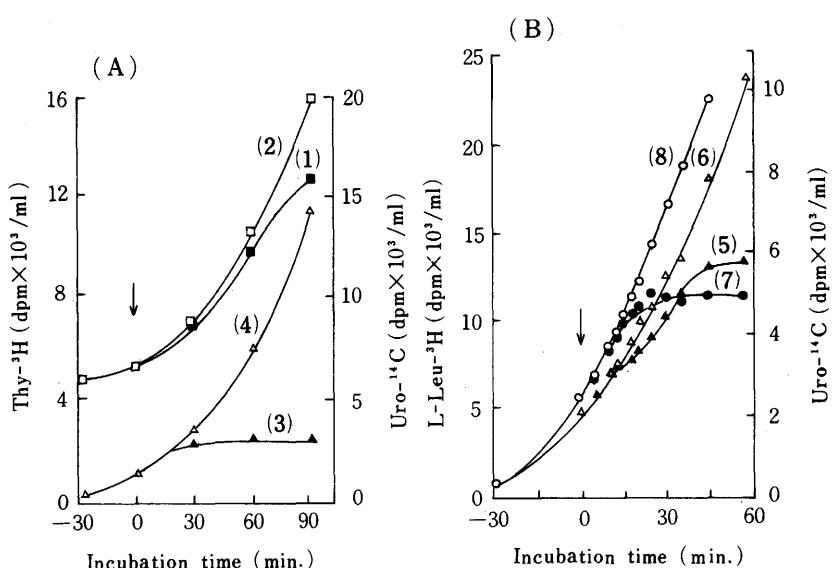


Fig. 5 Effects of 2AG on macromolecular syntheses in *E. coli* KY 3591

(A) Incorporation of thymine- ^3H and uracil- ^{14}C into the acid-insoluble fraction.

When the cell density of *E. coli* KY 3591 in medium N reached $\text{OD}_{660\text{nm}}=0.1$, thymine (methyl- ^3H) ($1\mu\text{Ci}/\text{ml}$) and uracil- $2-^{14}\text{C}$ ($0.2\mu\text{Ci}/\text{ml}$) were added. After incubation for 30 minutes, it was divided into 2 portions and 2AG ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 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- ^3H in the presence (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- ^3H into acid-insoluble fraction.

Experimental procedures were the same as those described in (A) except that medium P and L-leucine- $4,5-^{3}\text{H}$ were used instead of medium N and thymine- ^3H .

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

2 AG の添加による高分子合成への影響は添加15分後には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)。2 AG は直ちに細胞内に取り込まれ酸可溶画分に 2 AG · 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 2 AG 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 2 AG 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- ^{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 $\text{OD}_{660\text{nm}}=0.2$ ($\text{ca}5\times 10^8$ cells/ml), 2AG- ^{3}H was added as $1.0\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubation was continued for 45 minutes. The bacterial cells were collected by centrifugation (0°C , $5,000\times g$, 5 minutes) 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- ^{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 $\text{OD}_{660\text{nm}}=0.05$ with fresh medium and 2AG- ^{3}H ($0.18\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}/\text{ml}$) 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	$\text{OD}_{660\text{nm}}$		cpm/ml	$\frac{\text{cpm/ml}}{\Delta \text{OD}=0.1}$
	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

2 AG の蛋白質合成阻害の機構としては、2 AG-TP がリボソーム上で 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、2 AG 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、2 AG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

2 AGの抗ガン活性を強化する目的で2 AG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2 AG-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2 AGと同等であった。

2 AG-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2 AG-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2 AG-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を含む物質が自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。

2 AG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、2 AG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2 AG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2 AG添加後15分でまず蛋白合成を阻害した。この作用は2 AG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。2 AGに対する耐性は、2 AGの細胞内への取り込み段階におけるものではなく、2 AG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、2 AG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。