The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	糸状菌 Stachybotrys 属由来のセスキテルペン複合体の研究
Author(s)	皆川, 和之
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44514
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

【4】

氏　　名	皆川和之（みながわかずゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　17316　号
学位授与年月日	平成14年10月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**糸状菌 *Stachybotrys* 属由来のセスキテルペン複合体の研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　小林　資正 （副査） 教　授　田中　徹明　　教　授　今西　　武　　教　授　宮本　和之

論文内容の要旨

微生物が産生する二次代謝産物は、ペニシリンを始め、古くから抗生物質として医療に用いられ、多くの人々の生命を救ってきた。また、免疫抑制剤のシクロスポリン、タクロリムス、高脂血症治療薬メバロチンなど微生物由来の化合物は、医薬品またはそのリード化合物として重要な位置を占めている。微生物は地球上に数億種類存在しているものの、人類に発見されているのは10%に満たないと言われており、今後も医薬品開発を目標とした生物活性物質の探索において重要な資源になると考えられる。

これら微生物から二次代謝産物を得るための培養法としては、大きく分けて液体培養と固体培養の２つが存在する。液体培養は、微生物全般について古くから行われている培養法で、実験室レベルはもとより、大量生産レベルにも適応している。一方で固体培養には、酒、味噌や醤油の醸造に見られる麹培養があり、その起源は非常に古い。しかしながら、生物活性物質の探索においては、寒天培地などが用いられていたものの、玄米やおから、大麦などの多様な培地を用いて広く行われるようになったのは、ここ数年来のことである。

微生物培養では、主に培地成分を変化させることによって、特定の化合物の生産量を増減させる試みが、これまでに多くなされてきた。しかしながら、同一菌株を用いた液体培養と固体培養の間での二次代謝産物の違いについての考察は、著者の知る限り報告例が無い。

本研究において著者は、微生物代謝産物を起源とした生物活性物質探索研究の一環として、天然から分離した各種微生物の液体培養や固体培養を行い、得られた発酵生産物を種々の生物試験（スクリーニング）に付してきた。その過程で *Stachybotrys* 属の糸状菌が、液体培養では抗真菌剤を目指したスクワレン合成酵素阻害物質を産生し、固体培養では抗インフルエンザＡウイルス作用物質を産生することを見出し、それら活性試験の結果を指標として培養物を分離精製して活性成分を単離した。そして、それら活性成分がそれぞれ異なる新規骨格のセスキテルペン構造を有することを明らかにした。

抗真菌剤を目指した、酵母のエルゴステロール生合成制御酵素の一つであるスクワレン合成酵素の阻害物質の探索において、糸状菌 *Stachybotrys* sp. RF-7260 株及び *Stachybotrys ruwenzoriensis* RF-6853 株の液体培養抽出エキスが強い酵素阻害活性を示すことを見出した。そして、*Stachybotrys* sp. RF-7260 株のエキスから bisabosqual A と命名した活性成分を単離し、２次元 NMR データを中心とする物理化学データの詳細な解析により、bisabosqual A がビサボラン型セスキテルペン炭素骨格を有する新規化合物であることを明らかにした。また、グルコースを炭素源として *Stachybotrys ruwenzoriensis* RF-6853 株の液体培養を行い、bisabosqual B を得た。さらに、生産物の多様

性を得る目的で、炭素源をしょ糖に変えて液体培養を行い、bisabosquals C 及び D を得た。種々の物理化学データの解析及び合成化学的手法による bisabosqual A との比較から、bisabosqual B が bisabosqual A の 8' 位還元体であること、bisabosqual C が bisabosqual A の 5 位水酸化体、bisabosqual D が bisabosqual A の 10、11 位水酸化体であることを明らかにした。

一方で、bisabosqual A 産生菌である *Stachybotrys* sp. RF-7260 株を、液体培養から玄米を培地とした固体培養に変えて培養して得た培養抽出エキスが、インフルエンザ A ウイルスに対して抗ウイルス活性を有することを見出した。活性成分を精査し、acetylstachyflin 及び stachyflin と命名した新規化合物を単離した。2 次元 NMR データを中心とした物理化学データの詳細な解析及び合成化学的手法により、これらが液体培養で得られた bisabosqual 類とは異なり、橋頭位の酸化されたシスデカリン環構造を有する新規セスキテルペン化合物であることを明らかにした。Stachyflin はインフルエンザ A ウイルスに対して非常に強い抗ウイルス活性を示した。また、基礎的な構造活性相関研究を展開し、3 位水酸基及び 6' 位水酸基が活性発現に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、優れた活性を有する stachyflin 関連物質を探索する目的で、培養条件検討の一環として、アミノ酸添加培養を行い、アミノ酸の取り込まれた化合物 SQ-02-S-L1、SQ-02-S-L2 及び SQ-02-S-V1 や、アミジン構造を有するユニークな新規化合物 SQ-02-S-V2 を産生することを見出した。その中で、deacetyl SQ-02-S-V2 が stachyflin に匹敵する強い抗ウイルス活性を有することを見出した。

さらに、本研究で単離したユニークな化学構造の化合物の生合成について考察し、stachyflin 類、bisabosqual 類を含めた *Stachybotrys* 属の二次代謝産物の生合成経路を推定した。これらは、共通の生合成中間体として grifolic acid を経由し、その後、側鎖部分の環化様式の違いにより、様々な化合物へと生合成されると推定した。また、stachyflin 類の生合成前駆体としてフタルジアルデヒド構造を有する化合物を想定し、それを裏付ける為の試みとして、フタルジアルデヒド構造を有する bisabosqual A とアミンやアミノ酸を反応させた。その結果、イソインドリノン環を有する bisabosqual A 類縁体や、アミノ酸の取り込まれた類縁体が産生することを確認した。

本研究において著者は、糸状菌 *Stachybotrys* sp. RF-7260 株が、培養法によって骨格の大きく異なった化合物を産生するという興味深い結果を得た。近年、糸状菌の遺伝子発現解析研究が進み、麹菌（*Aspergillus oryzae*）で液体培養には無く固体培養特異的に発現する酵素群の存在が明らかにされた。このことから、液体培養と固体培養で異なる代謝系が働けば、異なる二次代謝産物が生産される可能性が高いと考えられる。二次代謝産物の産生においては、培地成分は非常に重要であるものの、それ以外の条件も培養に大きく影響を与えると考えられ、通常の液体培養だけでなく、固体培養を行うことにより、固体培養特異的な二次代謝産物生合成酵素の発現が誘導され、新規な二次代謝産物を産生する可能性が十分にある。従って、今回、著者が示した液体培養と固体培養という異なる培養法の組み合わせによる生物活性物質の探索は、微生物に多様な二次代謝産物を産生させるうえで有効な方法の一つになると考えている。

論文審査の結果の要旨

微生物から抗生物質など二次代謝産物を得るための培養法として、一般的に液体培養が用いられてきた。一方で固体培養には、酒、味噌や醤油の醸造に見られる麹培養があり、その起源は非常に古いが、生物活性物質の探索研究に用いられるようになったのは、ここ数年来のことである。

微生物培養では、主に培地成分を変化させることによって、特定の化合物の生産量を増減させる試みが、これまでに多くなされてきた。しかしながら、同一菌株を用いた液体培養と固体培養の間での二次代謝産物の違いについての検討はほとんどなかった。著者は、天然から分離した各種微生物の液体培養や固体培養を行い、得られた発酵生産物から種々の生物活性試験により活性物質を探索した。

抗真菌剤を目指したスクワレン合成酵素の阻害物質の探索を行い、*Stachybotrys* sp. RF-7260 株のエキスから bisabosqual A と命名したビサボラン型セスキテルペン炭素骨格を有する新規化合物を見出した。また、グルコースを炭素源として *Stachybotrys ruwenzoriensis* RF-6853 株の液体培養を行い、bisabosqual B を、さらに、炭素源を

しょ糖に変えて液体培養を行い、bjsabosquals C 及び D を得た。

一方で、*Stachybotrys* sp. RF-7260 株を、玄米を培地とした固体培養で得た抽出エキスから、抗インフルエンザ A ウイルス活性を有する acetylstachyflin 及び stachyflin と命名した橋頭位の酸化されたシスデカリン環構造を有する新規セスキテルペンを見出した。さらに、基礎的な構造活性相関研究の他、アミノ酸添加培養を行い、アミノ酸の取り込まれた種々のユニークな新規化合物を見出した。

本研究で単離したユニークな化学構造を有する stachyflin 類、bisabosqual 類を含めた *Stachybotrys* 属の二次代謝産物の生合成経路を検討し、共通の生合成中間体として grifolic acid を経由するが、培養条件の違いにより側鎖部分の環化様式に違いが起こり、種々の化合物が生合成されたことを明らかにした。

このように著者は、糸状菌の液体培養と固体培養によって骨格の大きく異なった化合物が得られるという興味深い結果を得た。これは、固体培養を行うことにより、固体培養特異的な二次代謝産物生合成酵素の発現が誘導され、新規な二次代謝産物を産生したと考えられる。著者が見出した知見をもとに、今後、液体培養と固体培養という異なる培養法の組み合わせによる生物活性物質の探索研究が、微生物に多様な二次代謝産物を産生させる有効な方法の一つになると考えられる。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。