



Title	潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索とケミカルジェネティクスによるその標的分子の解明
Author(s)	山野, 喜
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54708
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索と
ケミカルジェネティクスによるその標的分子の解明

2013年

山野 喜

潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索と
ケミカルジェネティクスによるその標的分子の解明

2013年

山野 喜

目次

略語

緒論.....	1
---------	---

本論

第一章 抗潜在性結核物質探索のためのスクリーニング法

第一節 低酸素培養法を用いた抗潜在性結核物質スクリーニング法.....	4
第二節 脂肪酸炭素源培地を用いた抗潜在性結核物質スクリーニング法.....	5

第二章 海綿 *Neamphius* sp.からの新規環状デプシペプチド neamphamide B の単離と構造解析

第一節 Neamphamide B の単離および抗菌活性.....	7
第二節 Neamphamide B の構造解析.....	8

第三章 海綿 *Agelas* sp.からの agelasine 類の単離と標的分子の解明

第一節 Agelasine 類の単離と抗菌活性.....	13
第二節 ゲノム DNA ライブラリーを用いた agelasine D の標的分子の解明.....	16
第三節 <i>BCG3185c</i> 高発現株の agelasine D 代謝速度の検討.....	20
第四節 BIACORE を用いた <i>BCG3185c</i> 翻訳産物と agelasine D との結合親和性の解析...	21

第四章 海綿 *Melophlus* sp.からの melophlin 類の単離と標的分子の解明

第一節 Melophlin 類の単離と抗菌活性.....	22
第二節 ゲノム DNA ライブラリーを用いた melophlin A の標的分子の解明.....	24

結論.....	28
---------	----

謝 辞	29
-----------	----

実験の部.....	30
-----------	----

引用文献.....	58
-----------	----

略語

Agdha	4-amino-7-guanidino-2,3-dihydroxyheptanoic acid
Arg	arginine
Asn	asparagine
BCG	bacilli de calmette et Guerin
CFU	colony forming unit
COSY	correlation spectroscopy
CHARm	chemistry at haryard macromolecular mechanics
CTAB	cetyltrimethylammonium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI-TOF-MS	electrospray ionization time of flight mass spectrometry
FDAA	<i>N</i> -(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)- <i>L</i> -alaninamide
GITC	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -glucopyranosylisothiocyanate
H	histidine
HIV	human immunodeficiency virus
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
Hpr	homoproline
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Htmha	3-hydroxy-2,4,6-trimethylheptanoic acid
IR	infrared absorption
K _D	dissociation constant
LB	luria-bertani
Leu	leucine
MDR	multidrug-resistant
MHz	megahertz
MIC	minimum inhibitory concentration
MTT	methylthiazolyltetrazolium chloride
NEB	new england biolabs japan
NMeGln	<i>N</i> -methylglutamine
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy

NTA	nitrilotriacetic acid
OADC	oleic acid, albumin, dextrose, catalase
OD	optical density
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Rt	retention time
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate poly-acrylamide gel electrophoresis
Thr	threonine
TLC	thin layer chromatography
TOCSY	totally correlated spectroscopy
UV	ultraviolet
XDR	extensively drug-resistant
β OMeTyr	β -methoxytyrosine
3,4-diMeGln	3,4-dimethylglutamine

緒論

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染により引き起こされる結核は、現在でも年間約 200 万人の死亡原因となっている感染症である¹⁾。結核菌は主に排菌患者の咳やくしゃみ、呼気などを吸い込むことで肺に感染するが、結核菌感染は他の細菌感染と異なり、多くの場合、宿主の免疫応答により結核の発症は回避される。しかし一部の菌は、免疫細胞により形成された granuloma (肉芽腫)内において、その代謝経路を変化させ潜在状態で数十年という長期に渡り生存し、老化、HIV 感染、抗がん剤治療や免疫抑制剤の使用などによる免疫力の低下を機に再び活性化し、結核を発症することが知られている²⁻⁴⁾。そして、このような潜在性の結核菌感染者は世界人口の 1/3 にもおよぶと推定されており、多くの人が潜在的に結核を発症するリスクを抱えている。

また、現在の結核治療は 4 種の抗結核薬 (isoniazid、rifampicin、pyrazinamide、ethambutol もしくは streptomycin) を最低 6 カ月という長期に渡り服用する必要がある、服薬管理や隔離が困難な発展途上国では、治療途中での服薬の中断と再発により、多剤耐性結核菌 (MDR-TB) や超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) の出現が問題となっている⁵⁾。そして、この治療の長期化は潜在性結核菌が既存の抗結核薬に対して低感受性であることが主因であると考えられている⁶⁾。これらのことから、潜在性結核菌にも効果的に作用する新しい医薬シーズの探索と結核に対する新規薬剤標的分子の開拓は重要な課題となっている。

一方、近年、医薬シーズの探索源として海綿などの海洋生物や海洋微生物が注目されており、すでに、Prialt (Ziconotide、疼痛治療薬)、Trabectedin (ET-743、抗がん剤) や Halaven (Eribulin、抗がん剤) といった海洋生物由来の活性天然物が基となった化合物が臨床応用されている。また筆者らの研究室でもこれまでに、海綿由来の大環状アルカロイドである halicyclamine 類⁷⁾(抗潜在性結核物質)、海綿由来の新規ステロイドアルカロイド cortistatin 類⁸⁾(血管新生阻害物質)、海洋性真菌由来の新規アミノリポペプチド trichoderin 類⁹⁾(抗潜在性結核物質) など、化学構造の多様性に富む数多くの化合物を見出しており (Figure 1)、海洋生物や海洋微生物の医薬シーズ探索源としての有用性は非常に高い。

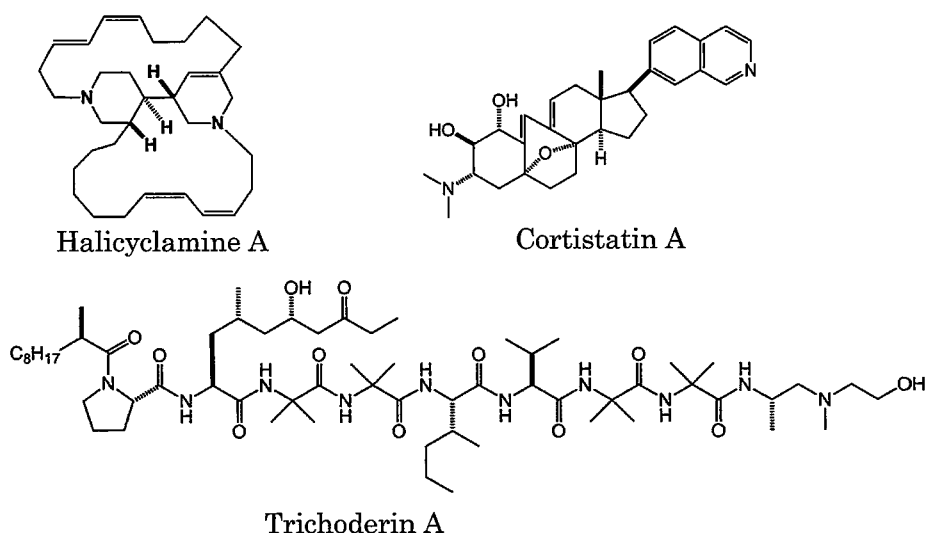


Figure 1 海洋薬物資源から見出した生物活性物質

このような背景のもと、筆者は、潜在状態の結核菌にも有効な新規抗結核薬のリード化合物の創製を目的に、*granuloma* 内の環境および *granuloma* 内での結核菌の代謝変化に着目した 2 つの評価系(低酸素培養条件下で抗菌活性を保持する化合物のスクリーニング、脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌物質のスクリーニング)を用いて、海綿を中心とする底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象とする探索研究を行った (第一章)。その結果、沖縄県産海綿 *Neamphius* sp. の MeOH 抽出エキスから、**neamphamide B (1)** と命名した新規環状デブシペプチドを見出し、その化学構造を明らかにした (第二章)。また、インドネシア産海綿 *Agelas* sp. の MeOH 抽出物からは、ジテルペンアルカロイド **agelasine B (2)**、**C (3)** および **D (4)** を単離した (第三章)。これらの化合物はいずれも、好気培養条件および潜在状態を誘導する低酸素培養条件の両条件下において、良好な抗菌活性を示した。さらに、脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌物質の探索では、インドネシア産海綿 *Melophlus* sp. の MeOH 抽出物から、**glucose** を炭素源とする培地と比較して、**propionate** を炭素源とする培地選択的に抗菌活性を示す化合物として、テトラミン酸誘導体 **melophlin A (5)**、**G (6)**、**H (7)** および **I (8)** を単離した (第四章) (Figure 2)。

一方、本研究において著者が使用した **Phenotypic Screening** は、これまで報告のない新規薬剤標的分子を阻害する抗菌物質の発見が期待できることから、その有用性は非常に高い。しかし、医薬品としての開発において重要な標的分子の解析に多くの時間を要するという問題があった。このような中、著者らは、簡便に抗菌物質の標的分子を明らかにする方法として、「抗菌物質の標的分子の高発現株は、その抗菌物質に対して耐性を示す」という考えを基本にしたゲノム DNA ライブラリーを利用する抗菌物質の標的分子

子解析法を確立している。そして、今回著者は、取得量が多く、強い抗菌活性を示した agelasine D (4) および melophlin A (5) に本方法を適用して、その標的分子解析を行った (第三章、第四章)。すなわち、*M. bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) 株由来のゲノムから作成したゲノム DNA ライブラリーで、*M. smegmatis* を形質転換し、ランダムに *M. bovis* BCG 株のゲノム断片を高発現する約 4,000 の形質転換株を作成した。そしてこの中から、化合物に耐性を示す形質転換株を取得後、そこに含まれるコスミドの配列を解析し、さらに分割した小さなゲノムを高発現する形質転換株の作成と化合物に対する耐性の有無を確認することにより、最終的に、化合物に対して耐性を付与する遺伝子を明らかにすることを試みた。その結果、agelasine D (4) については、*M. bovis* BCG の dioxygenase 機能を有すると予想される *BCG3185c* 遺伝子を高発現させた場合に、化合物 4 に対して耐性を示した。さらに *BCG3185c* 遺伝子を His-tag 融合タンパク質として発現させ、化合物 4 との結合親和性を表面プラズモン共鳴法により解析した。一方、melophlin A (5) についても同様な手法を適応して、化合物 5 に対して耐性を付与する遺伝子を探索した結果、*M. bovis* BCG の *BCG1083* 遺伝子 (possibly exopolyphosphatase) と *BCG1321c* 遺伝子 (hypothetical HIT-like protein) を高発現させた場合に、化合物 5 に対して耐性を示すことを明らかにした。

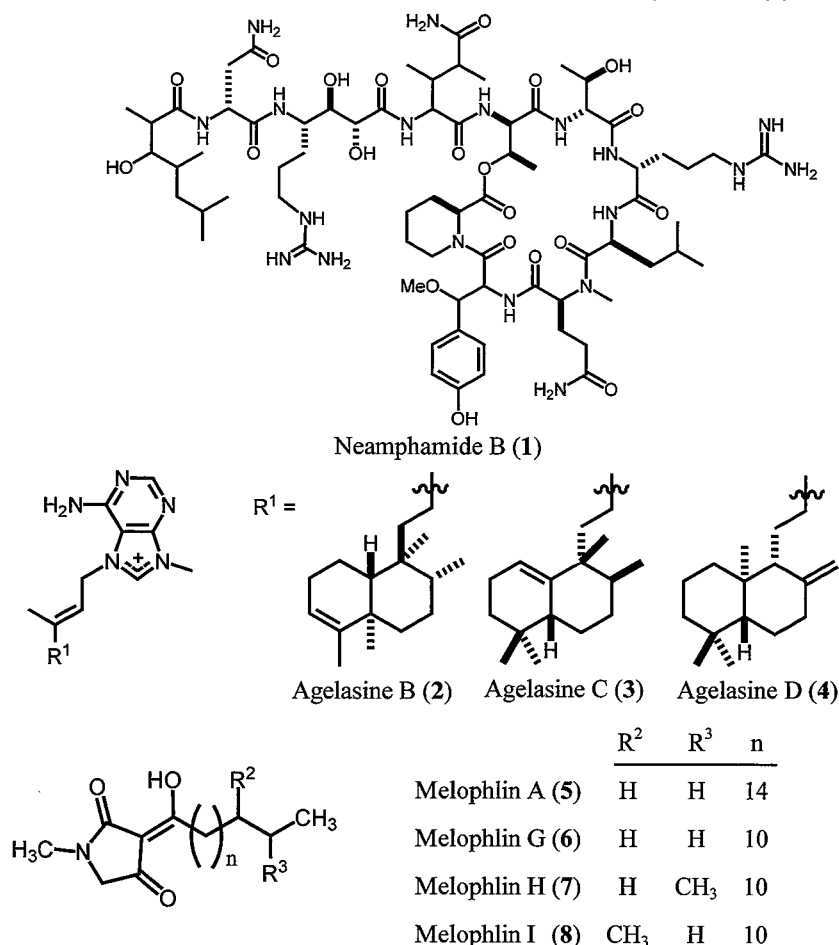


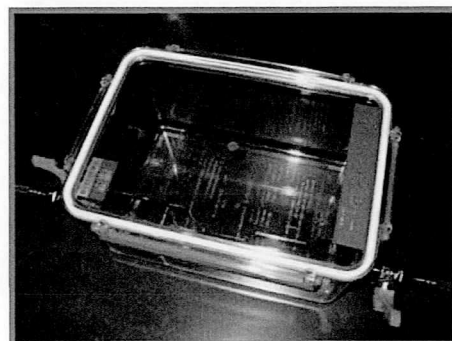
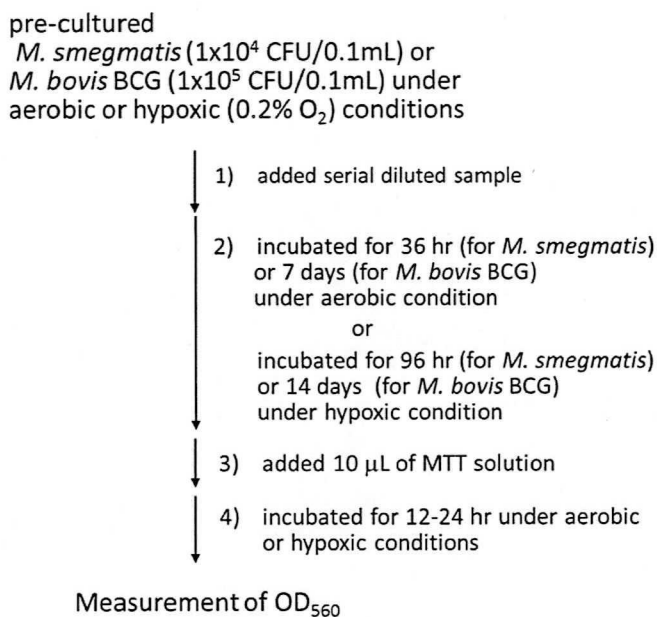
Figure 2 海綿より見出した抗潜在性結核物質

本論

第一章 抗潜在性結核物質探索のためのスクリーニング法

第一節 低酸素培養法を用いた抗潜在性結核物質スクリーニング法

Wayne らは、低酸素環境で培養した結核菌が潜在状態の結核菌と同様、既存の抗結核薬である isoniazid に抵抗性を示すことを報告しており、このことから低酸素環境は結核菌に潜在性を誘導する要因の一つであると考えられている¹⁰⁾。そこで我々は、低酸素環境で潜在性を誘導した菌に対する抗菌活性を指標に、抗潜在性結核物質のスクリーニング系を構築した。すなわち、検定菌として、非病原性で早生育型の *Mycobacterium* 属細菌である *M. smegmatis* と結核菌と同じ遅生育型のワクチン株である *M. bovis* BCG を使用し、それぞれを 0.2% の低酸素環境で培養することで潜在性を誘導し、それらに対する最小生育阻止濃度(minimum inhibitory concentration : MIC)を MTT 試薬を用いる比色定量法で算出した⁷⁾ (Figure 3)。



Picture of low O₂ chamber

Figure 3 低酸素培養法を用いる抗潜在性結核物質のスクリーニング法

初めに、本スクリーニング法で検定菌に潜在状態が誘導されているかを確認するため、潜在状態の結核菌は isoniazid に抵抗性を示すという報告¹⁰⁾を基に、本スクリーニング条件における isoniazid の MIC を測定した(Table 1)。その結果、通常培養条件下と比較して、低酸素環境で培養した検定菌では isoniazid に対し 10 倍以上の抵抗性を示した。このことから、低酸素環境で培養することで検定菌に潜在状態が誘導されたことが確認された。また、実際のスクリーニングでは、低酸素培養条件においても抗菌活性を示す化合物を探索した。

Table 1 好気条件および低酸素条件で培養した検定菌に対する isoniazid の MIC

Strains	MIC of isoniazid (μg/mL)	
	Aerobic	Hypoxic
<i>M. smegmatis</i>	2.5	25
<i>M. bovis</i> BCG	0.03	>100

第二節 脂肪酸炭素源培地を用いた抗潜在性結核物質スクリーニング法

低酸素培養法を用いた抗潜在性結核物質のスクリーニング系に加え、筆者は脂肪酸を炭素源とした抗潜在性結核物質のスクリーニング系を構築した。

潜在状態の結核菌では、糖代謝酵素の転写が抑制され、脂肪酸代謝酵素の転写が活性化されていることが報告されており、結核菌は潜在化の際に炭素源を糖から脂肪酸に変化させていると考えられている¹¹⁾。また、現在、結核菌の脂肪酸代謝回路はグリオキシル酸回路とメチルクエン酸回路の二つが知られているが、それぞれの回路に関わる酵素を欠損させた結核菌は、マクロファージやマウス感染モデルにおいて、感染力の低下が確認されている¹²⁾。これらの知見から、脂肪酸代謝は結核菌の潜在化と深い関連性を持つと考えられている。

さらに、propionate (C3)や palmitate (C16)を炭素源とする培地で培養した *Mycobacterium* 属細菌は、メチルクエン酸回路とグリオキシル酸回路の酵素の転写が活性化されるという報告¹³⁾もあることから、筆者は、炭素源を propionate や palmitate などの脂肪酸に限定した培地を使用し検定菌を培養することで、検定菌に潜在状態を誘導できると予想した。また、96 well plate でのスクリーニングのために、各培地での検定菌の植菌数、培養時間の最適化を行い、スクリーニング方法を Figure 4 のように決定した。

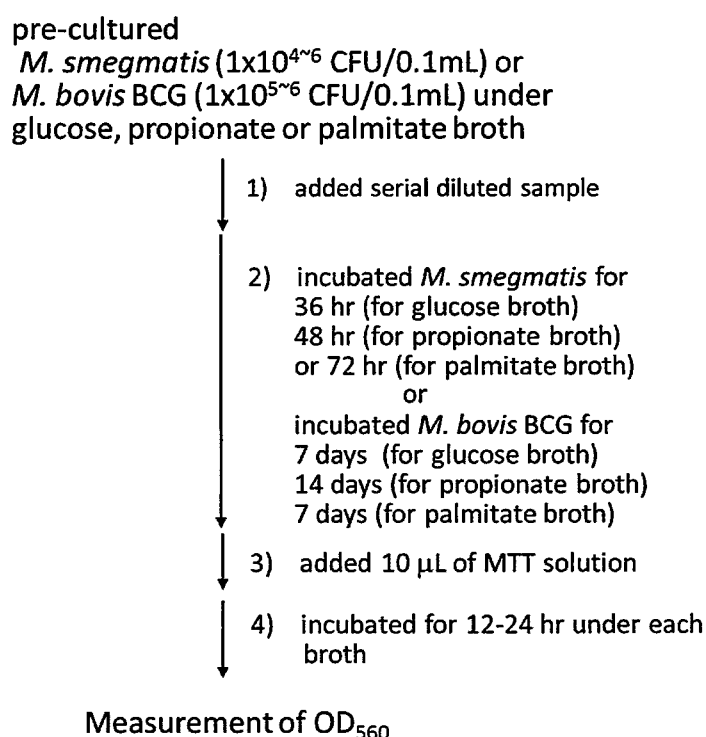


Figure 4 脂肪酸炭素源培地を用いた抗潜在性結核物質スクリーニング法

次に、本スクリーニング法で検定菌に潜在状態が誘導されているかを確認するため、潜在状態の結核菌は isoniazid に抵抗性を示すという報告を基に、本スクリーニング条件における isoniazid の MIC を測定した (Table 2)。その結果、脂肪酸(propionate または palmitate)を炭素源とする培地を用いた場合、glucose を炭素源とする培地と比較して、*M. smegmatis* の場合には 20 倍以上の抵抗性を示すようになり、*M. bovis* BCG を用いた場合にも、palmitate では 2 倍、propionate では 2,000 倍の抵抗性を示すようになった。これらの結果から、培地の炭素源を脂肪酸に代えることにより、潜在状態の結核菌と類似した代謝を誘導できることが確認できた。

また、実際のスクリーニングでは、脂肪酸 (propionate または palmitate)を炭素源とする培地選択的に抗菌活性を示す化合物を探索した。

Table 2 各種炭素源培地における isoniazid の MIC

Strains	MIC of isoniazid (µg/mL)		
	Glucose	Propionate	Palmitate
<i>M. smegmatis</i>	2.5	50	200
<i>M. bovis</i> BCG	0.025	50	0.05

第二章 海綿 *Neamphius* sp. からの新規環状デブシペプチド *neamphamide* B の単離と構造解析

第一節 *Neamphamide* B の単離および抗菌活性

1993 年に、沖縄県西表島で採取した海綿 *Neamphius* sp. (Figure 5) の MeOH 抽出エキスが、好気および低酸素の両培養条件下で *M. smegmatis* に対して抗菌活性を示すことを見出した。そこで、350 g の乾燥海綿から得られた MeOH 抽出エキス (37.2 g) を、活性試験の結果を指標に溶媒間分配、ODS オープンカラム、ODS HPLC で順次精製を行い、*neamphamide* B (1) と命名した新規環状デブシペプチド構造を有する抗菌性化合物 35 mg を単離した (Figure 6)。

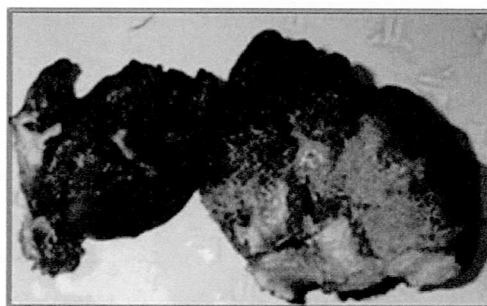


Figure 5 沖縄産海綿 *Neamphius* sp.

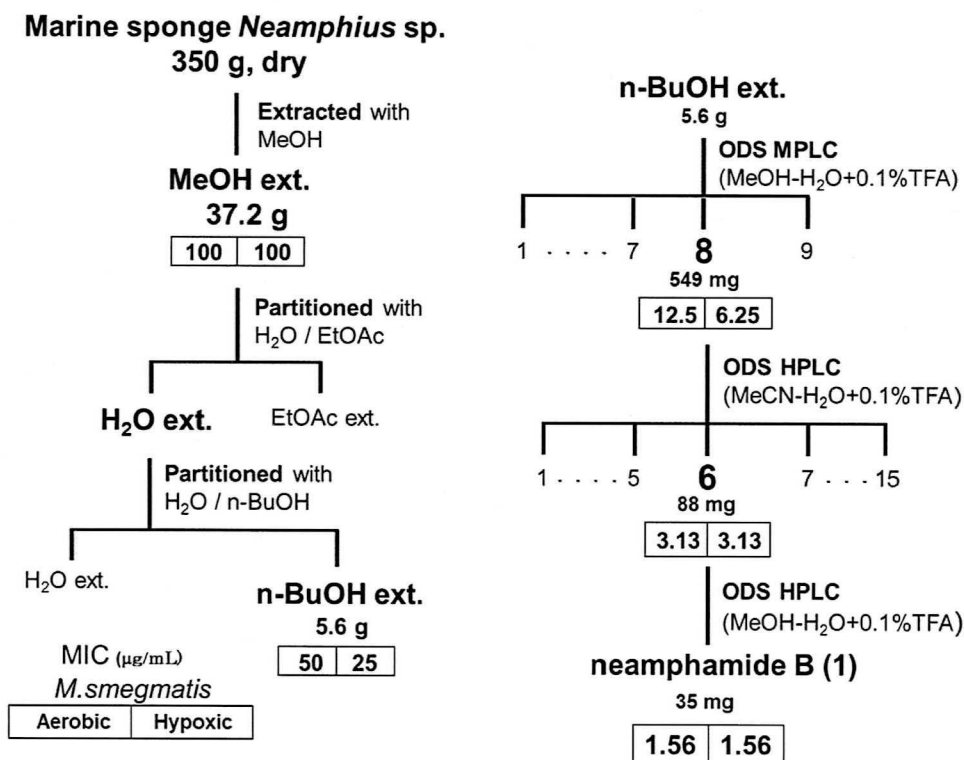


Figure 6 海綿 *Neamphius* sp. からの活性化合物の単離

Neamphamide B (1)の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する抗菌活性を、好気および潜在状態を誘導する低酸素培養条件下で測定した結果を Table 3 に示す。Neamphamide B (1)は好気および低酸素の両培養条件下で、*M. smegmatis* に対して 1.56 $\mu\text{g/mL}$ の MIC を示し、*M. bovis* BCG に対しては、好気培養条件で 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 、低酸素培養条件で 12.5 $\mu\text{g/mL}$ の MIC を示した。

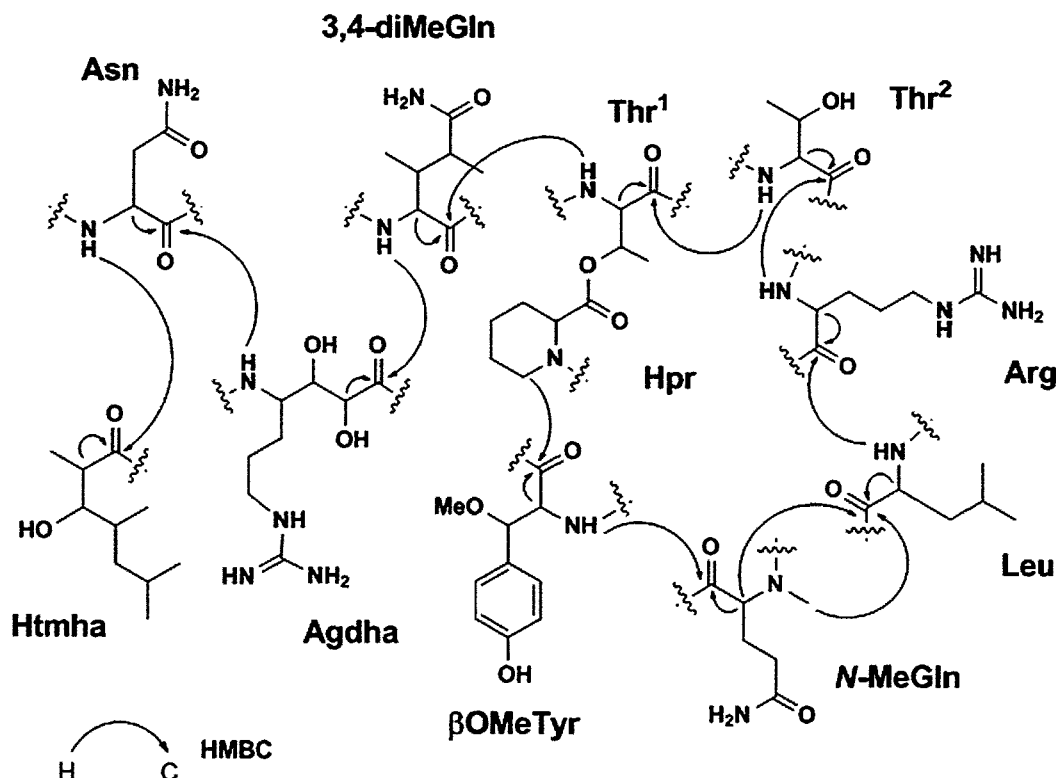
Table 3 Neamphamide B (1)の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する MIC

Strains		
	Aerobic	Hypoxic
<i>M. smegmatis</i>	1.56	1.56
<i>M. bovis</i> BCG	6.25	12.5

第二節 Neamphamide B の構造解析

Neamphamide B (1)は無色固体として得られた。ESI-TOF-MS 測定の結果、2 価のイオンピークとして $m/z = 787.9$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ が得られ、さらに高分解能 ESI-TOF-MS 測定の結果から組成式が $\text{C}_{71}\text{H}_{119}\text{N}_{19}\text{O}_{21}$ であることが明らかとなった。IR 測定では 3274 cm^{-1} および 1672 cm^{-1} に特徴的な吸収が観測され、1 がヒドロキシル基、アミノ基およびカルボニル基を有することが示唆された。

また、重 DMSO および CD_3OD を溶媒として NMR 測定を行ったところ、 ^{13}C NMR 測定では、170-182 ppm の間に多数のアミドカルボニル由来と思われるシグナルが観測され、 ^1H NMR では、6.5-9.5 ppm の間にアミドプロトン由来と予想される多数のシグナルが観測された。これらのことから、1 はペプチド構造を有する化合物と推定された。しかし、これらの溶媒条件下では、一部シグナルのブロード化やアミドプロトン由来のシグナルの重水素化により構造解析に適したスペクトルデータは得られなかった。そこで溶媒条件の検討を行った。その結果、 CD_3OH を溶媒に使い、微量の TFA を添加することによってすべてのアミドプロトン由来のシグナルが検出できることを見出し、さらに溶媒由来のシグナルを presaturation 法により減弱させることにより、構造解析に適したスペクトルを得ることに成功した。そこで、本条件を用いて COSY、TOCSY、HSQC、HMBC および NOESY 測定を行い、そのスペクトルデータを解析した。その結果、Figure 7 に示す Htmha を除く 1 の 10 個の部分構造が明らかとなった。また、Htmha 部位に関しては CD_3OH 中での測定ではシグナルの重なりがひどく解析が困難であったため、 D_2O 中での測定データを併用することでその構造を導出した。



Htmha ; 3-hydroxy-2,4,6-trimethylheptanoic acid, **Asn** ; asparagine, **Agdha** ; 4-amino-7-guanidino-2,3-dihydroxyheptanoic acid, **3,4-diMeGln** ; 3,4-dimethylglutamine, **Thr** ; threonine **Arg** ; arginine, **Leu** ; leucine, **N-MeGln** ; *N*-methylglutamine, **βOMeTyr** ; β-methoxytyrosine, **Hpr** ; homoproline,

Figure 7 Neamphamide B (1) の平面構造の導出

次に、各部分構造のつながりを HMBC 測定データをもとに解析した。その結果、1 の平面構造は、3-hydroxy-2,4,6-trimethylheptanoic acid (Htmha)-asparagine (Asn)-4-amino-7-guanidino-2,3-dihydroxyheptanoic acid (Agdha)-3,4-dimethylglutamine (3,4-diMeGln)-*cycle* (threonine (Thr¹)-threonine (Thr²)-arginine (Arg)-leucine (Leu)-*N*-methylglutamine (N-MeGln)-β-methoxytyrosine (βOMeTyr)-homoproline (Hpr))構造を有する新規環状デプシペプチドであることが明らかとなった。

化合物 1 を構成する各アミノ酸の絶対立体構造は、1 の加水分解物を *N*-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-*L*-alaninamide (FDAA)¹⁴⁾ または 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-glucopyranosylisothiocyanate (GITC)¹⁵⁾ で誘導体化し、標品の *D* および *L* アミノ酸誘導体と HPLC での retention time (Rt) を比較することにより決定した。その結果 Asn、Hpr、Arg、Leu および 2 つの Thr の絶対立体構造はそれぞれ *D*-Asn、*L*-Hpr、*D*-Arg、*L*-Leu および *D*-*allo*-Thr であることが明らかとなった。

さらに Agdha の 2, 3, 4 位の立体化学に関しては、neamphamide B (1) 同様に Agdha 構造を有する類縁化合物 callipeltin A¹⁶⁾ (Figure 8) の構造解析を参考に推定した。すなわち callipeltin A では、Figure 9 に示すように、Agdha の 2 位、3 位プロトン間の結合定数が 9.1 Hz と大きいことから 1 位カルボニルと 3 位水酸基の間の水素結合によって 2 位、3 位が偽ジアキシャル構造をとっていると考え、3*R*、2*R* もしくは 3*S*、2*S* 配置であると推定している。また、callipeltin A を過ヨウ素酸分解し、酸化的後処理後、その加水分解物から *D*Arg が得られたことから、4 位は *S* 配置と決定している。そして、それぞれの組み合わせの最小エネルギーコンフォメーション (CHARm) から算出された結合定数を実測値と比較することで 2, 3, 4 位の立体配置を 4*S*、3*R*、2*R* と推定している。一方、neamphamide B (1) の NMR スペクトル解析の結果、Agdha の対応するプロトン間の結合定数は callipeltin A と同値であった。これらの結果から、1 の Agdha 部位の相対立体化学を 4*S*^{*}、3*R*^{*}、2*R*^{*} と推定した。

一方、3,4-diMeGln、 β OMeTyr および Htmha の立体配置に関しては、単離された化合物量が少ないこと、対応する標品が得られないことから、解析には至らなかった。以上の結果から、neamphamide B (1) は Figure 10 に示す化学構造であると決定した。

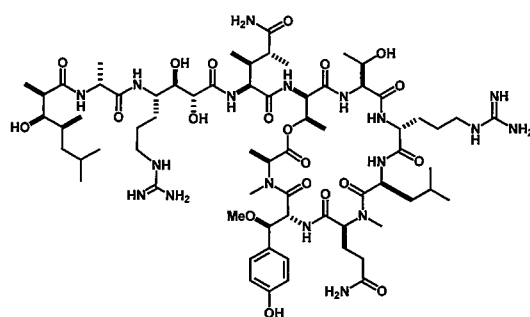


Figure 8 Callipeltin A の化学構造

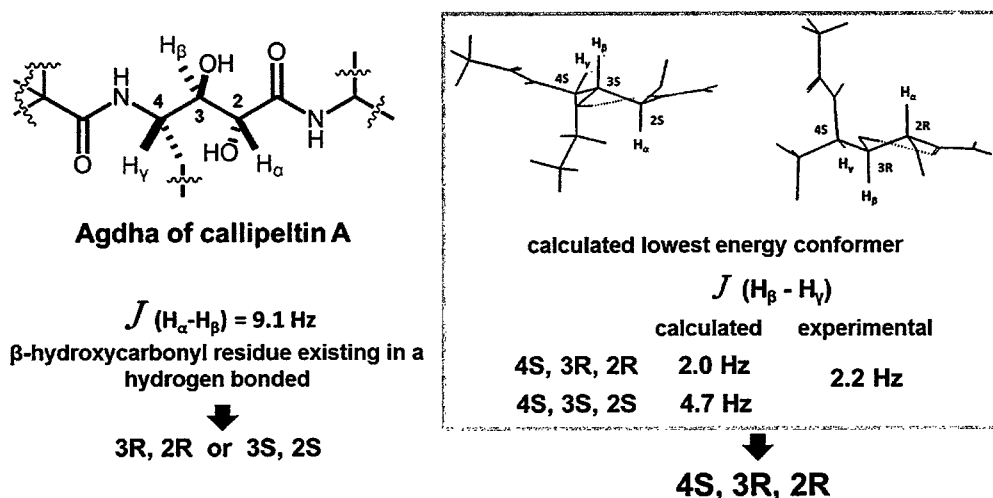


Figure 9 Callipeltin A における Agdha 部位の相対立体化学の推定

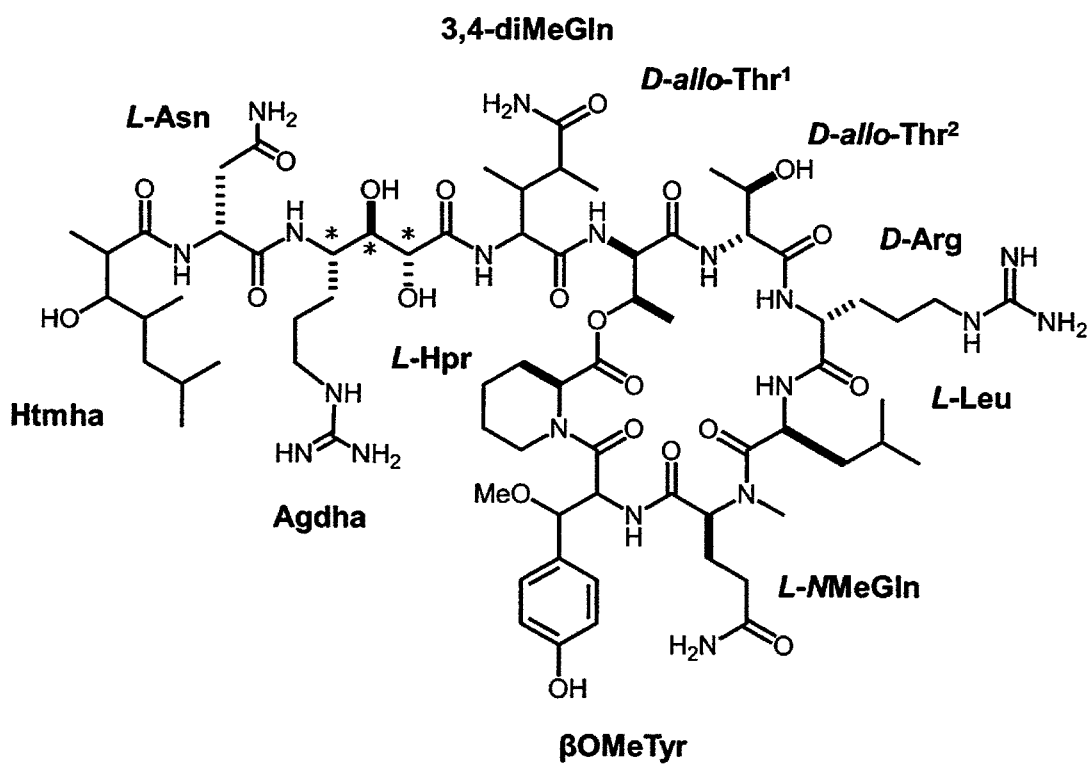


Figure 10 Neamphamide B (1)の化学構造

Table 4 ¹H and ¹³C NMR data for neamphamide B (1)

position	δ_C^a	$\delta_H^{b,c}$	Position	δ_C^a	$\delta_H^{b,c}$	δ_C^d	$\delta_H^{e,c}$
Leu			Arg				
1	174.5		1	174.0			
2	50.9	4.58 (t, 7.4)	2	53.2	4.40		
3	39.6	1.27, 1.76	3	28.2	1.60, 1.94		
4	26.1	1.73	4	25.4	1.58, 1.62		
4-CH ₃	21.1	0.91	5	42.0	3.15		
5	23.5	0.95	5-NH		7.35		
NH		7.20	6-CO	158.6			
NMeGln			NH		7.83 (d, 6.8)		
1	171.2		guan		7.45, 6.99 ^f		
2	56.5	4.81 (t, 7.1)	3,4-diMeGln				
3	26.0	1.58, 1.65	1	173.9			
4	32.2	1.63, 1.78	2	59.0	4.21 (dd, 4.3, 9.7)		
5-CO	177.4		3	37.5	2.39		
5-NH ₂		6.60, 7.10	3-CH ₃	15.3	1.19		
N-CH ₃	30.5	2.98	4	43.0	2.77		
βOMeTyr			4-CH ₃	20.1	1.27		
1	171.4		5-CO	180.6			
2	53.1	5.01 (t, 9.3)	5-NH ₂		6.98, 7.58		
3	84.1	4.46 (t, 9.3)	NH		9.33 (d, 4.3)		
3-OCH ₃	56.8	3.11	Agdha				
4	129.3		1	176.6			
5/9	130.7	7.21 (d, 8.1)	2	72.8	3.92 (d, 9.1)		
6/8	116.1	6.78 (d, 8.1)	3	75.3	3.60 (dd, 2.2, 9.1)		
7	158.9		4	51.0	4.20		
NH		8.32	5	30.0	1.73, 1.58		
Hpr			6	26.4	1.64, 1.60		
1	170.9		7	42.2	3.20, 3.15		
2	53.3	5.24 (d, 3.9)	7-NH ₂		7.43 (br)		
3	21.2	1.45, 1.67	8	158.7			
4	26.2	1.45, 1.60	NH		7.59		
5	26.4	1.58, 2.12	guan		7.32, 6.81 ^f		
6	44.5	2.87, 3.82 (d, 11.7)	Asn				
aThr¹			1	173.9			
1	173.1		2	52.0	4.70 (dd, 5.8, 6.3)		
2	56.5	5.35 (dd, 1.6, 8.8)	3	37.7	2.73, 2.84 (dd, 6.3, 15.1)		
3	72.1	5.59 (dq, 1.6, 6.8)	4	175.0			
4	14.5	1.19 (d, 6.8)	4-NH ₂		7.10, 7.66		
NH		8.94 (d, 8.8)	NH		8.31		
aThr²			Htmha				
1	172.1		1	178.8		178.5	
2	63.8	3.82 (br)	2	44.8	2.58 (qui, 6.8)	43.4	2.54
3	67.0	4.34	2-CH ₃	14.7	1.09 (d, 6.8)	14.0	1.00
4	14.9	1.27	3	79.2	3.47	77.6	3.48
NH		8.35	4	34.0	1.69	32.0	1.63
			4-CH ₃	17.2	0.93	16.0	0.83
			5			38.1	1.00
			6			24.3	1.53
			6-CH ₃			20.1	0.73
			7			23.4	0.80

^a ¹³C NMR: δ_C (ppm), (150 MHz, CD₃OH containing trace amounts of TFA)^b ¹H NMR: δ_H (ppm, J in Hz), (600 MHz, CD₃OH containing trace amounts of TFA)^c Multiplicity was not reported because of overlapping resonances^d ¹³C NMR: δ_C (ppm), (150 MHz, D₂O containing trace amounts of TFA)^e ¹H NMR: δ_H (ppm, J in Hz), (600 MHz, D₂O containing trace amounts of TFA)^f Assignment based on ROESY cross-peaks ; δ 7.32/6.81, δ 7.45/6.99

第三章 海綿 *Agelas* sp.からの agelasine 類の単離と標的分子の解明

第一節 Agelasine 類の単離と抗菌活性

2010年に、インドネシアのビアック島で採取した海綿 *Agelas* sp. (Figure 11) の MeOH 抽出エキスを、好気および低酸素の両培養条件下で *M. smegmatis* に対して抗菌活性が見られた。そこで、MeOH 抽出エキス (5.4 g) を出発材料に溶媒間分配を行い、活性試験の結果を指標に、SiO₂ オープンカラム、ODS HPLC で順次精製を行った (Figure 12)。その結果、活性物質として、agelasine B (2, 8.3 mg)、agelasine C (3, 6.6 mg) および agelasine D (4, 52 mg)¹⁷⁾ を単離した (Figure 13)。各化合物は NMR スペクトルデータおよび ESI-TOF-MS より得られた分子量を文献値と比較することによりそれぞれ同定した。



Figure 11
インドネシア産海綿 *Agelas* sp.

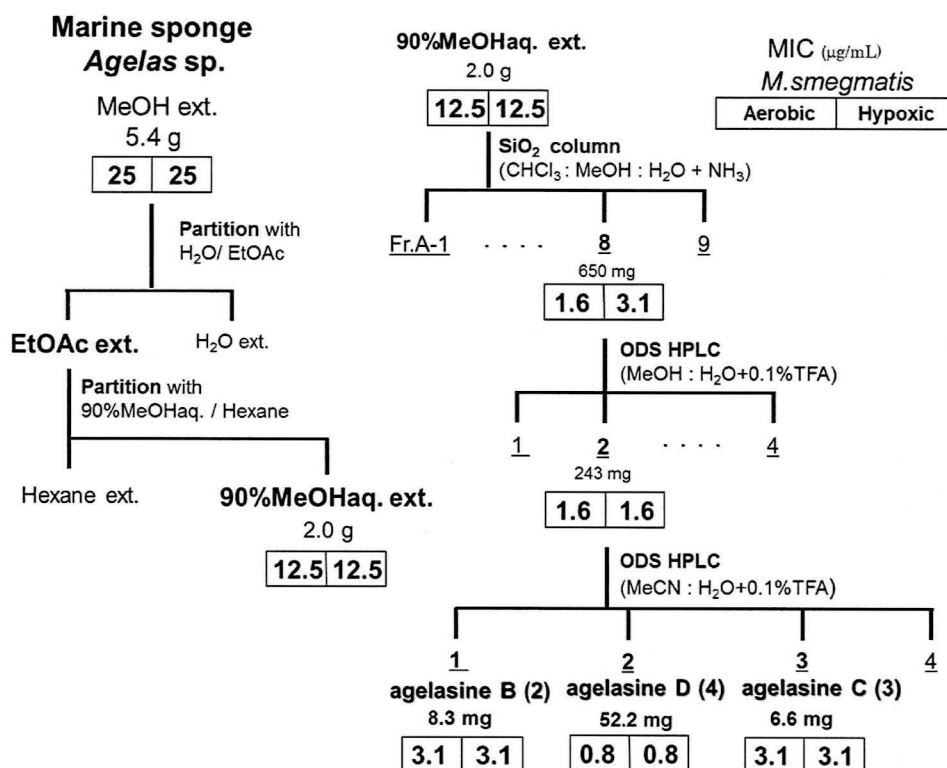


Figure 12 海綿 *Agelas* sp.からの活性物質の単離

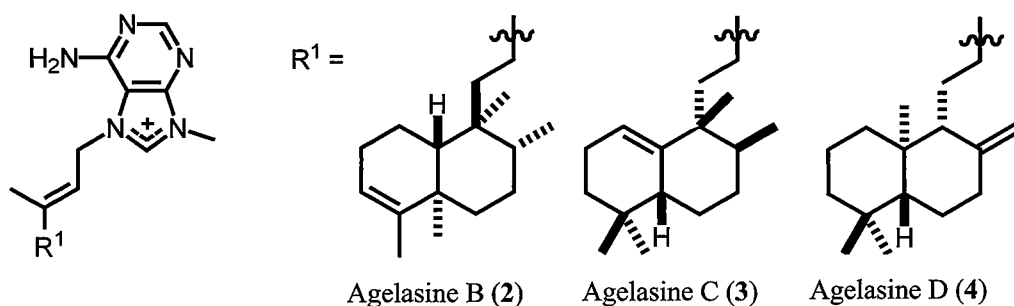


Figure 13 Agelasine B (2), C (3)および D (4)の化学構造

Agelasine 類の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する抗菌活性を、好気および低酸素培養条件下で測定した結果を Table 5 に示す。Agelasine 類は好気および低酸素培養条件下で、*M. smegmatis* に対して 0.8-3.13 $\mu\text{g/mL}$ の MIC を示し、*M. bovis* BCG に対しては 1.56-12.5 $\mu\text{g/mL}$ の MIC を示した。また agelasine D (4) が最も強い活性を有していた。

Table 5 Agelasine B (2), C (3), D (4)の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する MIC

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	Agelasine B (2)		Agelasine C (3)		Agelasine D (4)	
	Aerobic	Hypoxic	Aerobic	Hypoxic	Aerobic	Hypoxic
<i>M. smegmatis</i>	3.13	3.13	3.13	3.13	0.8	0.8
<i>M. bovis</i> BCG	6.25	12.5	6.25	12.5	1.56	3.13

次に、最も強い活性を示した agelasine D (4) の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する抗菌活性の作用様式を明らかにするため、好気および低酸素の両培養条件下で agelasine D (4) を添加した際の経時的な colony forming unit (CFU) の変化を観測した。その結果、Figure 14,15 に示すように、好気および低酸素の両培養条件下において 4 存在下で CFU の経時的な減少が観察され、*M. smegmatis* においては両培養条件下で 36 時間以降コロニーが観測されなくなり、*M. bovis* BCG においてもそれぞれ 12 日目以降、14 日目以降コロニーが観測されなくなった。これらの結果から、4 は好気および低酸素の両培養条件下で、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対して殺菌的に作用することが明らかとなった。

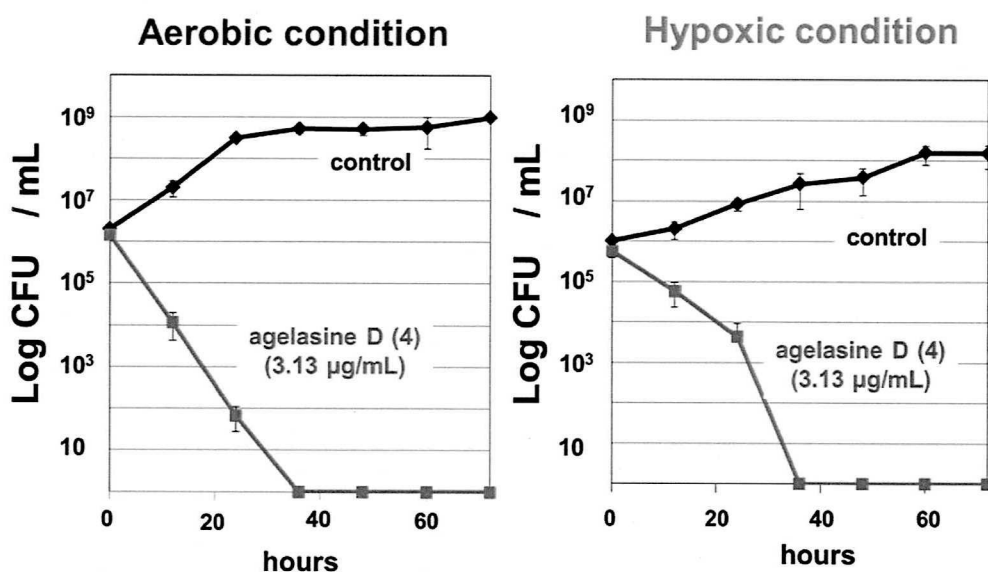


Figure 14 Agelasine D (4)存在下における *M. smegmatis* の経時的菌数変化

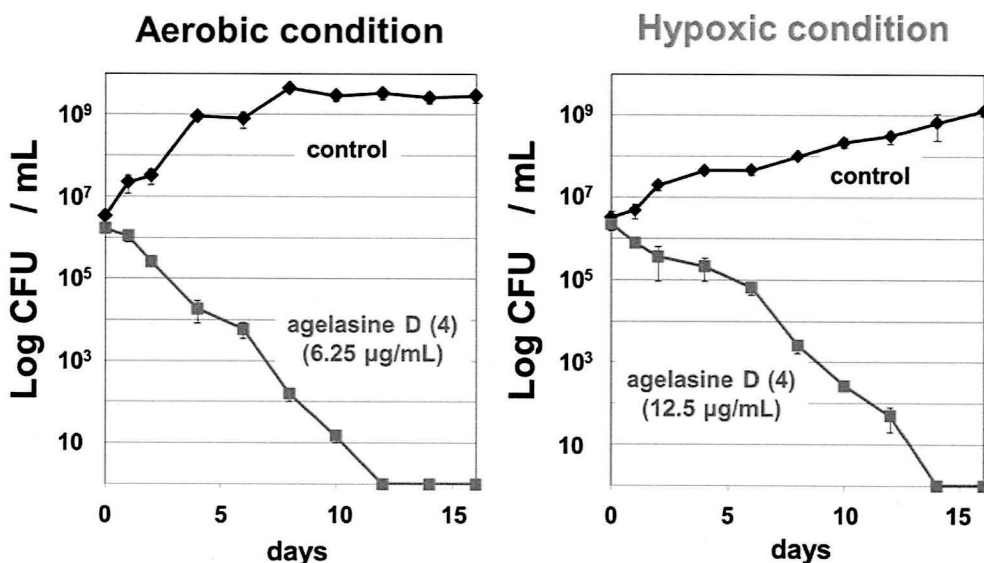


Figure 15 Agelasine D (4)存在下における *M. bovis* BCG の経時的菌数変化

第二節 ゲノム DNA ライブラリーを用いた agelasine D (4) の標的分子の解明

細菌の薬剤耐性株には、その標的分子を高発現させることにより耐性化するものが多く存在する。また、Jacobs らは isoniazid の標的タンパク質(InhA)を高発現する *M. smegmatis* の形質転換株が、isoniazid に対して耐性を獲得することを報告しており¹⁸⁾、筆者らの研究室においても同様に InhA を高発現する形質転換株を作成したところ、それらが isoniazid に耐性を示すことを確認した (Figure 16)。

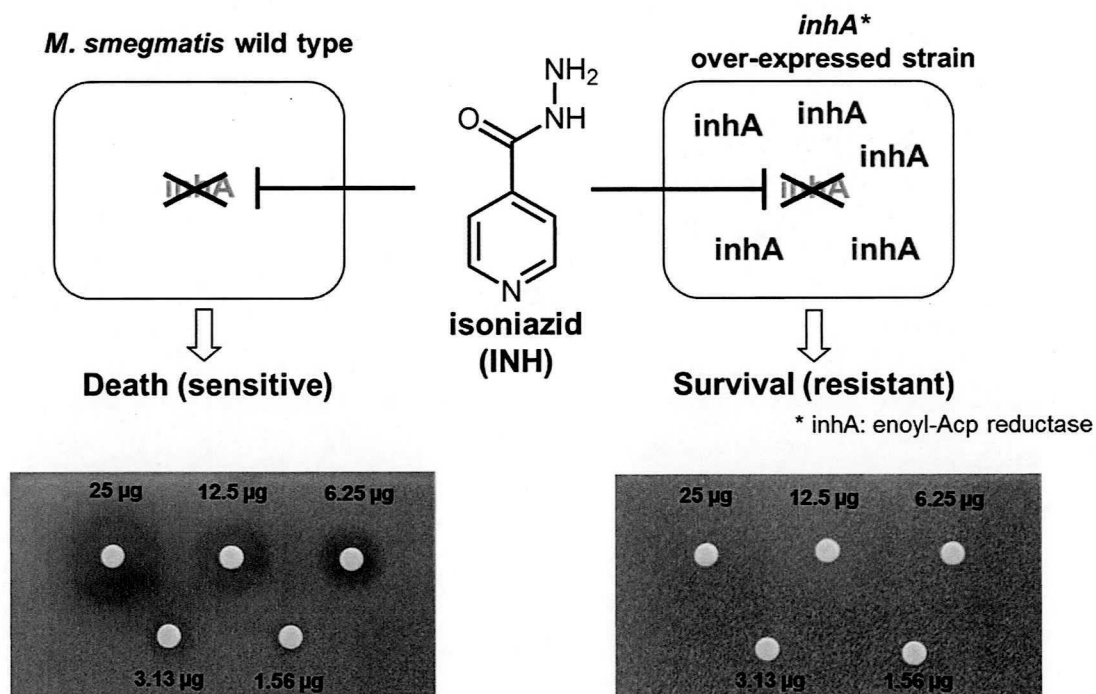


Figure 16 *M. smegmatis* の InhA 高発現による isoniazid に対する耐性化

筆者らは、この「抗菌物質の標的分子の高発現株は、その抗菌物質に対して耐性を示す」という考えを基本とし、*M. bovis* BCG 株のゲノム DNA ライブラリーを利用し、ケミカルジェネティクスの手法を用いた抗菌物質の標的分子の解明に着手した。すなわち、Figure 17 に示すように、*M. bovis* BCG 株より抽出したゲノムを制限酵素処理により 20~40 kb に切断し、それらをコスミドベクター pYUB415 へ組み込むことで、*M. bovis* BCG 由来のゲノム DNA ライブラリーを作成した。そして、それらを用いて *M. smegmatis* を形質転換することで、ランダムに *M. bovis* BCG 株のゲノム断片を高発現する形質転換株を作成した。次に、これら形質転換株を抗菌物質でスクリーニングし、耐性を示す形質転換株を見出し、そこに含まれるコスミドの遺伝子配列を解析することで、抗菌物質に耐性を付与する遺伝子領域を明らかにした。そして、この領域を分割し

た小さなゲノムを高発現する形質転換株を作成し、その中から耐性を示す株を確認する作業を繰り返すことで、最終的に耐性を付与する遺伝子を明らかにすることを試みた。

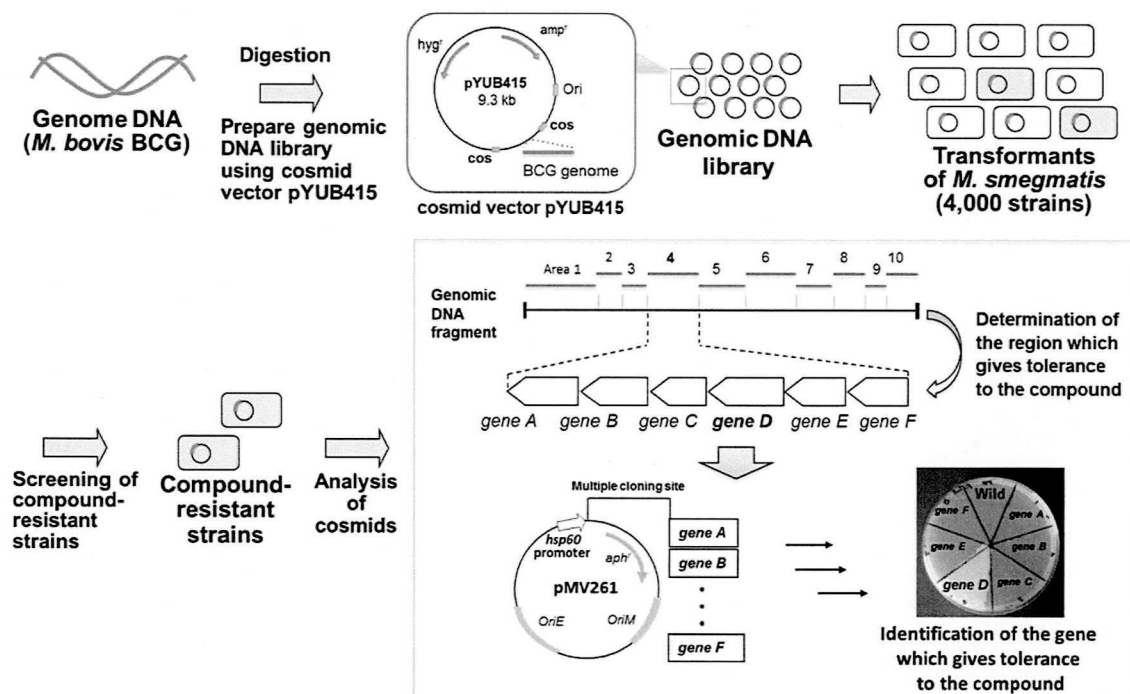


Figure 17 ゲノム DNA ライブラリーを用いる標的分子解析法

前述の方法に従い、*M. bovis* BCG 遺伝子をランダムに高発現する *M. smegmatis* 形質転換株から、4 に耐性を示す形質転換株をスクリーニングした。その結果、8 株の形質転換株 (Strain 1~8) が、1.6 $\mu\text{g/mL}$ ($2 \times \text{MIC}$) の 4 を含む培地においても増殖し、耐性を示すことが明らかとなった (Figure 18)。

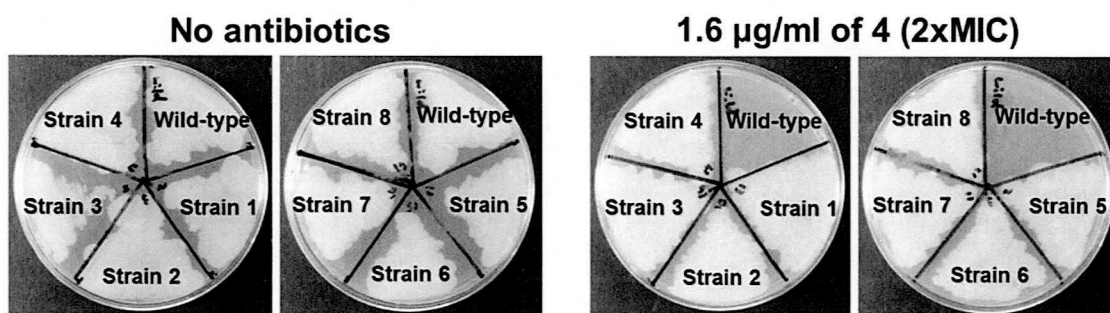


Figure 18 Agelasine D (4)含有培地での化合物 4 耐性形質転換株 (Strain 1~8)の生育

そこで次に、strain 1~8 からコスミドを抽出し、それらに含まれる *M. bovis* BCG ゲノムの遺伝子配列を解析した。その結果、strain 1、2、5 および 7 には、*M. bovis* BCG ゲノムの 3467.1~3502.9 kb の領域が含まれ、strain 4 には 3472.2~3503.8 kb が、Strain 8 には 3475.0~3507.4 kb の領域が含まれていた(Figure 19)。また今回、strain 3 および 6 に含まれていたコスミドの遺伝子配列は、明瞭な波形データが得られず特定できなかった。以上の結果から、4 に対して耐性を付与する遺伝子は、検出した各領域の重複領域である、*M. bovis* BCG ゲノムの 3475.0 kb~3502.9 kb の 27.9 kb 内に存在すると予想された。

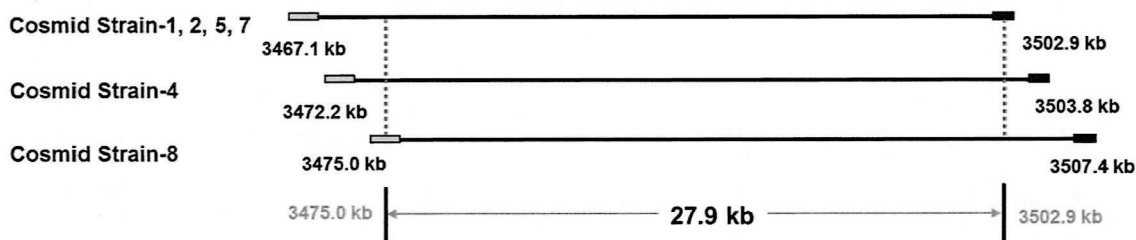


Figure 19 Agelasine D (4)耐性形質転換株に含まれる *M. bovis* BCG ゲノムの遺伝子領域

また、ゲノムデータベースを検索したところ、この 27.9 kb の領域には 26 個の open reading frame (ORF)が含まれていることが確認された (Figure 20)。そこで次に、4 に耐性を付与する遺伝子領域を絞り込むため、この領域を Figure 20 および 21 に示すように 8 個の領域と 2 つの ORF に分割し、それぞれをプラスミド pMV206 および pMV261 を用いてクローニングした。そして、それらを用いて *M. smegmatis* を形質転換することで、それぞれの遺伝子領域を高発現する形質転換株 (Strain 9~18) を作成した (Figure 20)。

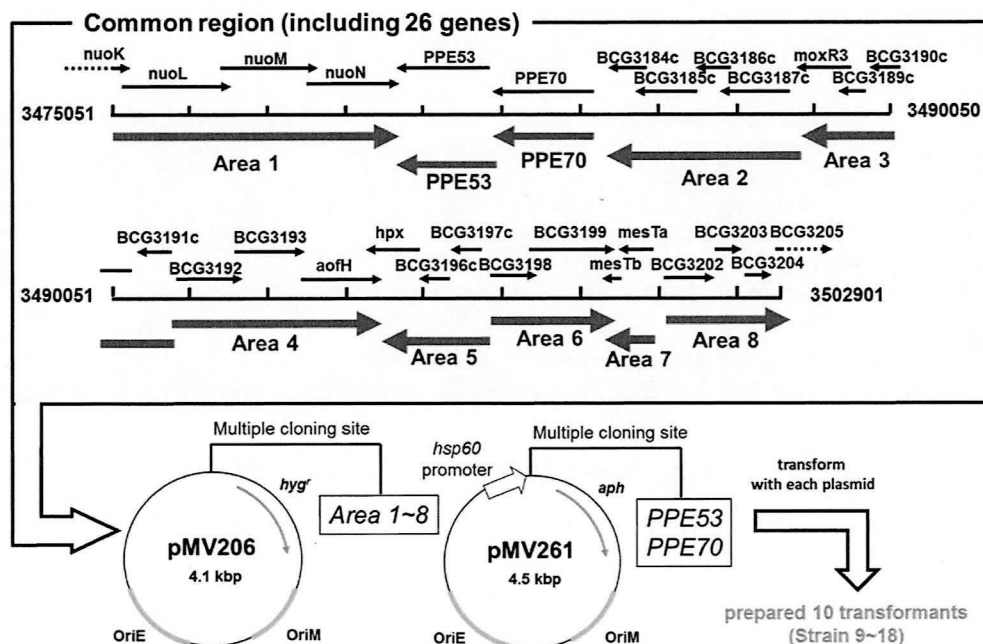


Figure 20 Agelasine D (4)に耐性を付与する遺伝子候補領域に含まれる遺伝子群

次に、作成した各形質転換株 (Strain 9~18) の 4 に対する耐性の有無を確認した。その結果、エリア 2 を高発現する strain 12 のみが 4 に対して耐性を示した (Figure 21)。

1.6 $\mu\text{g/ml}$ of 4 (2xMIC)

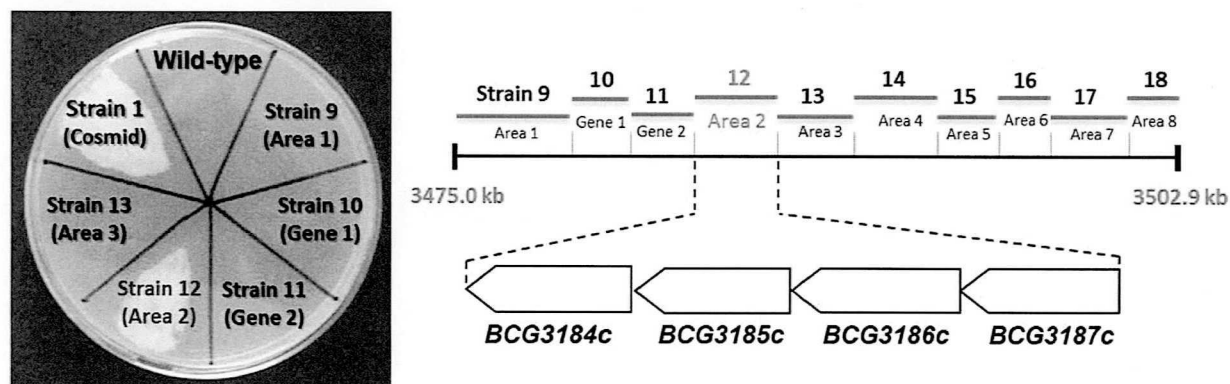


Figure 21 Agelasine D (4) 含有培地における strain 9~13 の生育と、*M. bovis* BCG 遺伝子領域のサブクローニング

エリア 2 は *BCG3184c*、*BCG3185c*、*BCG3186c*、*BCG3187c* の 4 遺伝子が含まれる領域であった。そこで、これら 4 つの遺伝子をそれぞれ高発現する形質転換株 (Strain 19~22) を作成後、agelasine D (4) に対する耐性の有無を確認した。その結果、*BCG3185c* 遺伝子の高発現株 (Strain 20) が agelasine D (4) に耐性を示すことが明らかとなった (Figure 22)。また本遺伝子は *M. bovis* BCG ゲノムデータベースにおいて、dioxygenase 機能を有すると予想されていた。

以上の結果から、agelasine D (4) の標的分子は、dioxygenase 機能を有すると予想される *BCG3185c* 遺伝子の翻訳産物であることが強く示唆された。

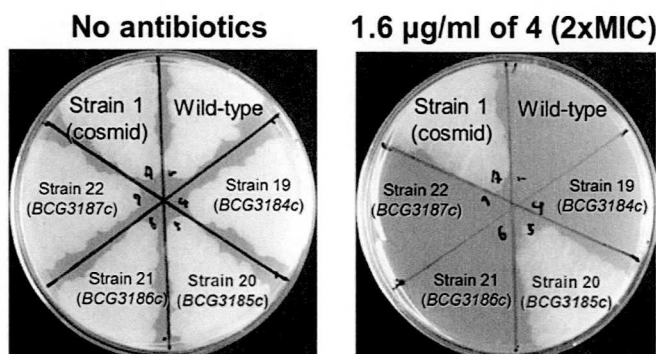


Figure 22 *BCG3184c*~*BCG3187c* 高発現株の agelasine D (4) 存在下での生育

第三節 *BCG3185c* 高発現株の agelasine D (4)代謝速度の検討

前節の実験の結果、*BCG3185c* 遺伝子の高発現株 (Strain 20)が agelasine D (4)に耐性を示したことから、*BCG3185c* 遺伝子の翻訳産物が agelasine D (4)の標的分子であることが強く示唆された。しかし、*BCG3185c* 遺伝子の翻訳産物が dioxygenase 機能を有すると考えられることから、agelasine D (4)の代謝を促進することにより、見かけ上 4 に耐性を示している可能性が考えられた。そこで、野生株と strain 20 における 4 の代謝量を比較検討した。

野生株および strain 20 それぞれに、終濃度 0.4 µg/mL (0.5 x MIC)で 4 を添加し、経時的に菌体を分取した。PBS により菌体を洗浄後、有機溶媒を用いた抽出を行い、HPLC を用いて 4 の含有量を測定した。また抗結核薬の rifampicin (9)を内部標準として用い、HPLC での rifampicin (9)のピークの面積と 4 のピークの面積の比から菌体内の 4 の量を測定した (Figure 23)。その結果、Table 6 に示すように、0~24 時間の培養時間では、両菌株間で agelasine D (4)の代謝量に差は観察されなかった。このことから strain 20 の 4 への耐性化は 4 の代謝の促進の結果ではないことが明らかとなった。

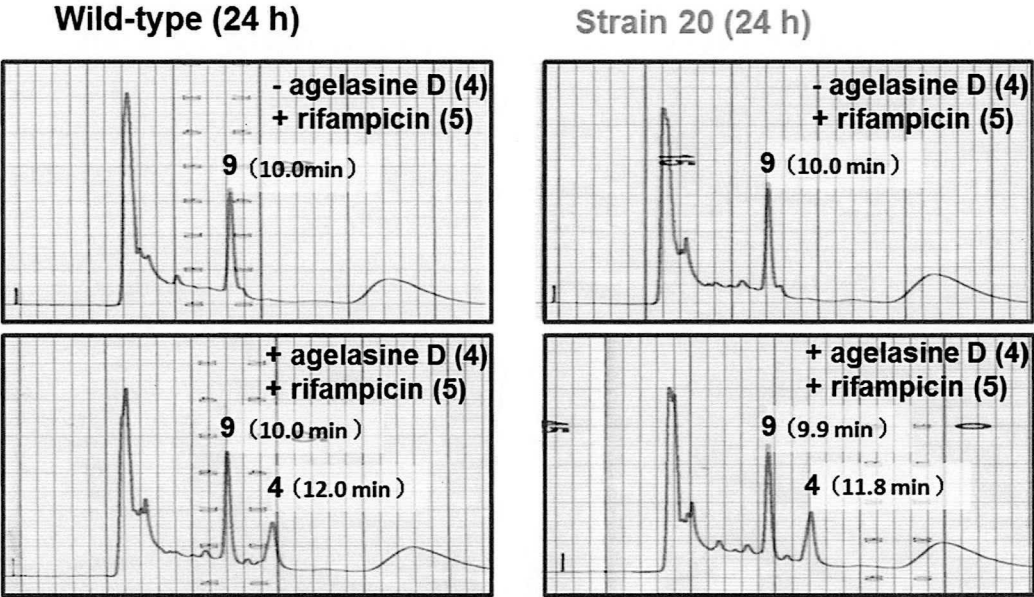


Figure 23 *BCG3185c* 高発現株 (Strain 20)と野生株における化合物 4 抽出サンプルの HPLC チャート

Table 6 *BCG3185c* 高発現株 (Strain 20)と野生株との agelasine D (4)代謝量の比較

Incubation time	Ratio [peak area of agelasin D (4) / peak area of internal standard (rifampicin (9))]	
	Wild-type	strain 20
0 h	0.28	0.26
6 h	0.37	0.37
12 h	0.39	0.40
24 h	0.41	0.44

第四節 表面プラズモン共鳴法を用いた *BCG3185c* 翻訳産物と agelasine D (4) との結合親和性の解析

これまでの検討の結果、dioxygenase 機能を有すると考えられる *BCG3185c* 遺伝子の翻訳産物が 4 の標的分子であることが強く示唆された。そこで、*BCG3185c* 遺伝子の翻訳産物と 4 との結合親和性を表面プラズモン共鳴法を利用して解析した。

BCG3185c 遺伝子の翻訳産物は His-tag 融合タンパク質として *Escherichia coli* で発現させ、その菌体破碎液からコバルトキレートカラムを用いて精製した (Figure 24)。そして、His-tag 融合タンパク質を固定化できる NTA (nitrilotriacetic acid) センサーチップに、調製した *BCG3185c* 遺伝子翻訳タンパク質を固定化し、4 との結合親和性を算出した。

その結果、4 と *BCG3185c* 遺伝子翻訳産物との解離定数 (K_D) は $2.42 \mu\text{M}$ と算出された (Figure 25)。一方、ネガティブコントロールとして用いた streptomycin (23S rRNA に結合することが知られている) の解離定数は 1.47 mM と算出された。このことから、4 は、*BCG3185c* 遺伝子翻訳産物と直接結合することが明らかとなった。

以上の結果から、agelasine D (4) は、*Mycobacterium* 属細菌の dioxygenase 機能を有すると予想されるタンパク質 (*BCG3185c* 遺伝子翻訳産物) に結合し、その機能を阻害することにより抗菌活性を示していることが強く示唆された。

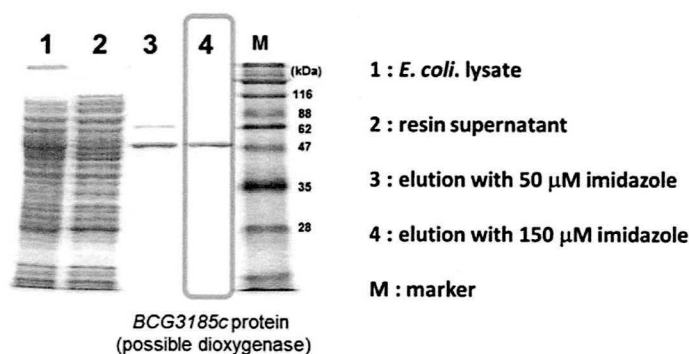


Figure 24 *E. coli* lysate からの His-tag 融合 BCG3185c 翻訳産物の精製

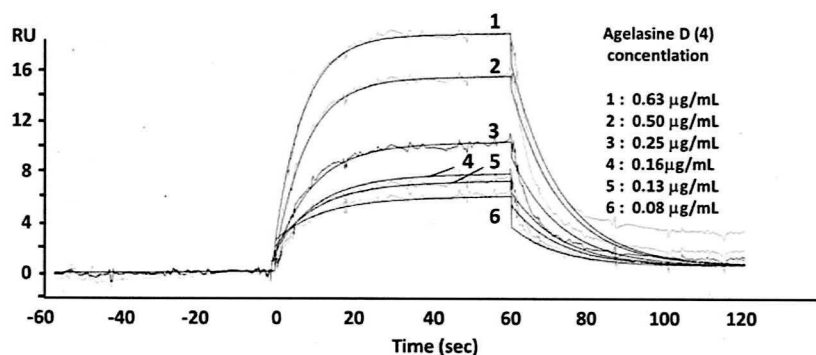


Figure 25 表面プラズモン共鳴法を用いて測定した His-tag 融合 BCG3185c 翻訳産物と agelasine D (4) との結合

第四章 海綿 *Melophlus* sp.からの melophlin 類の単離と標的分子の解明

第一節 Melophlin 類の単離と抗菌活性

2010 年、インドネシアのビアック島で採取した海綿 *Melophlus* sp.(Figure 26)の MeOH 抽出エキスを、*M. smegmatis* に対して脂肪酸 (propionate)を炭素源とする培地選択的な抗菌活性を見出した。そこで、MeOH 抽出エキス(52 g)を出発材料に溶媒間分配を行い、活性試験の結果を指標に、SiO₂ オープンカラム、ODS HPLC で順次精製を行った(Figure 27)。その結果、活性物質として、melophlin A (5)、G (6)、H (7) および I (8)¹⁹⁾をそれぞれ 42 mg、7 mg、

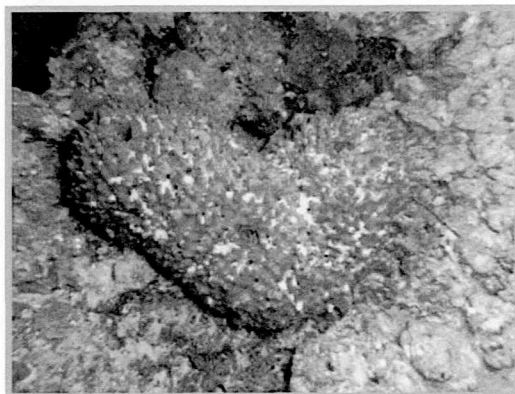


Figure 26 インドネシア産海綿 *Melophlus* sp.

23 mg および 18 mg 単離した(Figure 28)。各化合物は NMR スペクトルデータおよび ESI-TOF-MS の解析により、melophlin 類と推定され、フィジカルデータを文献値と比較することによりそれぞれの化合物を同定した。Melophlin A (5)は 2000 年に、当研究室において *ras* 遺伝子の異常活性化に伴う NIH3T3 細胞の形態変化を還元する活性を示す新規化合物として単離された化合物であったが^{19a)}、本研究で新たに、脂肪酸炭素源培地選択的な抗菌活性を示すことが明らかとなった。

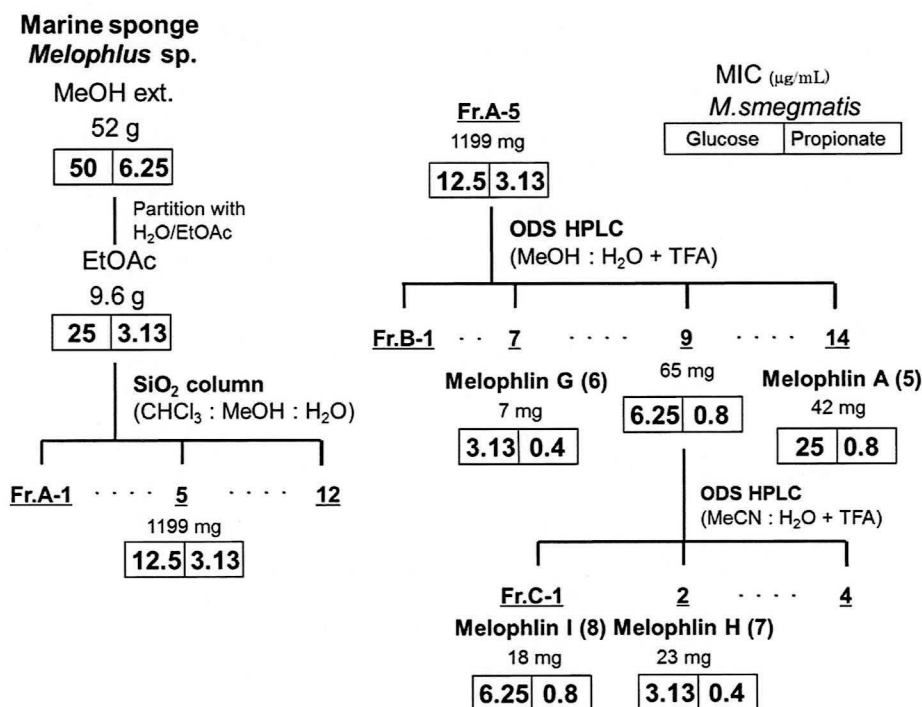


Figure 27 海綿 *Melophlus* sp.からの活性物質の単離

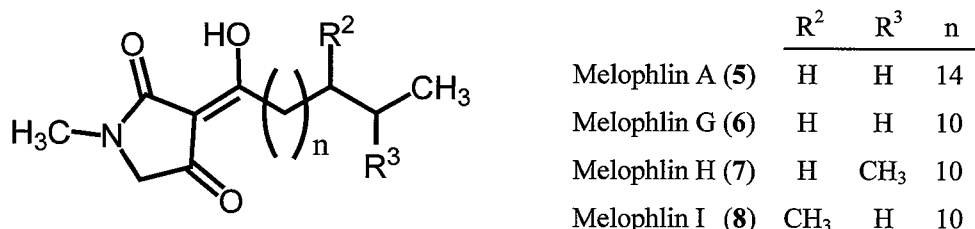


Figure 28 Melophlin A (5)、G (6)、H (7)および I (8)の化学構造

Melophlin 類の炭素源の異なる 3 種類の培地 (glucose、propionate または palmitate)における抗菌活性を測定した結果を Table 7 に示す。Melophlin 類は、*M. smegmatis* に対して、glucose または palmitate を炭素源とする培地では 3.13~25 $\mu\text{g/mL}$ の MIC を示すのに対して、propionate を炭素源とする培地では MIC 0.4~0.8 $\mu\text{g/mL}$ と 4 倍以上の選択的な抗菌活性を示した。また、*M. bovis* BCG に対しても同様に、4 倍以上の propionate 含有培地選択的な抗菌活性を示した。

特に melophlin A (5)は、*M. smegmatis* で 32 倍、*M. bovis* BCG で 8 倍と、他の melophlin 類と比較して高い propionate 培地選択性を示すことから、メチレン鎖の長さが melophlin 類の propionate 培地選択性に関与することが示唆された。一方、側鎖の長さが同じで、側鎖上のメチル基の有無と位置が異なる melophlin G、H および I では、その活性や選択性に顕著な差が見られないことから、側鎖上のメチル基は活性や選択性に影響を及ぼさないことが示唆された。

Table 7 Melophlin A (5)、G (6)、H (7)および I (8)の *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する各種培地での抗菌活性

Carbon source	MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
	Melophlin A (5)		Melophlin G (6)		Melophlin H (7)		Melophlin I (8)	
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
glucose	25	25	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25	25
propionate	0.8	3.13	0.4	3.13	0.4	3.13	0.8	6.25
palmitate	12.5	25	3.13	12.5	6.25	12.5	3.13	25

第二節 ゲノム DNA ライブラリーを用いた melophlin A (5) の標的分子の解明

次に、最も培地選択性が高い抗菌活性を示した melophlin A (5) を使用して、agelasine D (4) と同様に、ゲノム DNA ライブラリーを用いた標的分子の解析を行った。

まず、*M. bovis* BCG 由来のゲノム DNA ライブラリーで形質転換した *M. smegmatis* 株の中から、5 に耐性を示す形質転換株をスクリーニングした。その結果、5 株の形質転換株 (Strain 23~27) が 0.8 $\mu\text{g/mL}$ (MIC) の 5 を含む propionate 寒天培地においても増殖し、耐性を示すことが確認された (Figure 29)。

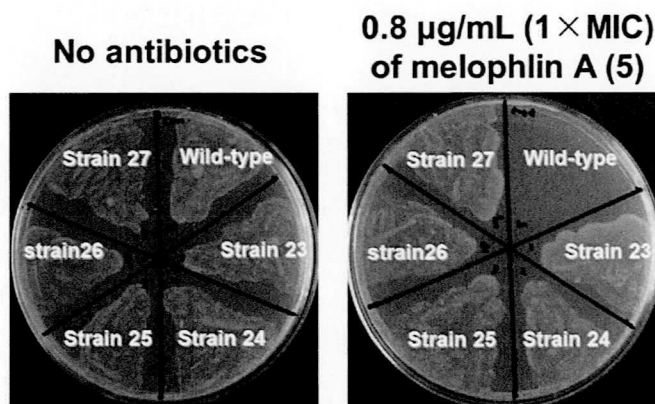


Figure 29 Melophlin A (5) 含有培地での化合物 5 耐性形質転換株 (Strain 23~27) の生育

次に、各形質転換株のコスミドを抽出し、そのコスミド内の *M. bovis* BCG 由来の遺伝子配列を解析した。その結果、strain 23~25 に含まれていた遺伝子領域と strain 26 および 27 に含まれていた遺伝子領域とは、それぞれ別の領域であることが明らかとなった (Figure 30)。また、5 に耐性を付与する遺伝子が存在する遺伝子領域は、*M. bovis* BCG ゲノムの 1422.3 kb から 1448.7 kb (26.4 kb、領域 1) と 1169.4 kb から 1183.8 kb (14.4 kb、領域 2) と予想された。

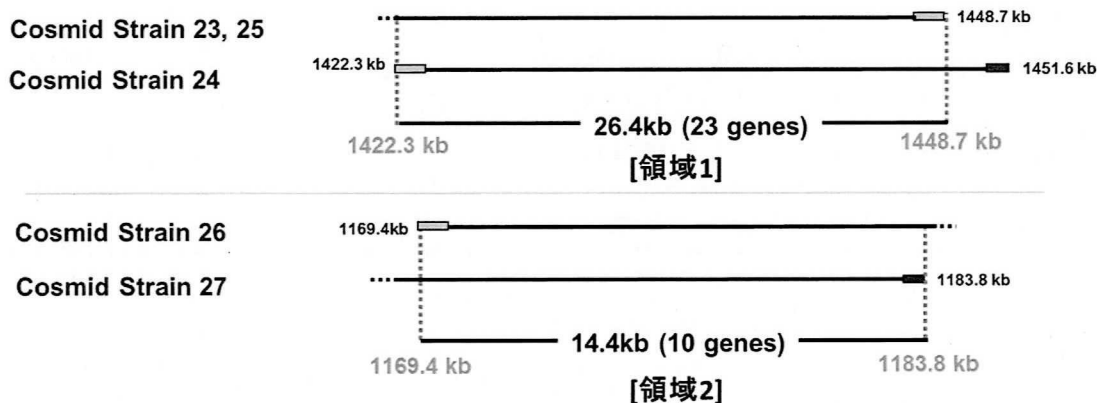


Figure 30 Melophlin A (5) 耐性形質転換株から得られた *M. bovis* BCG ゲノムの遺伝子配列

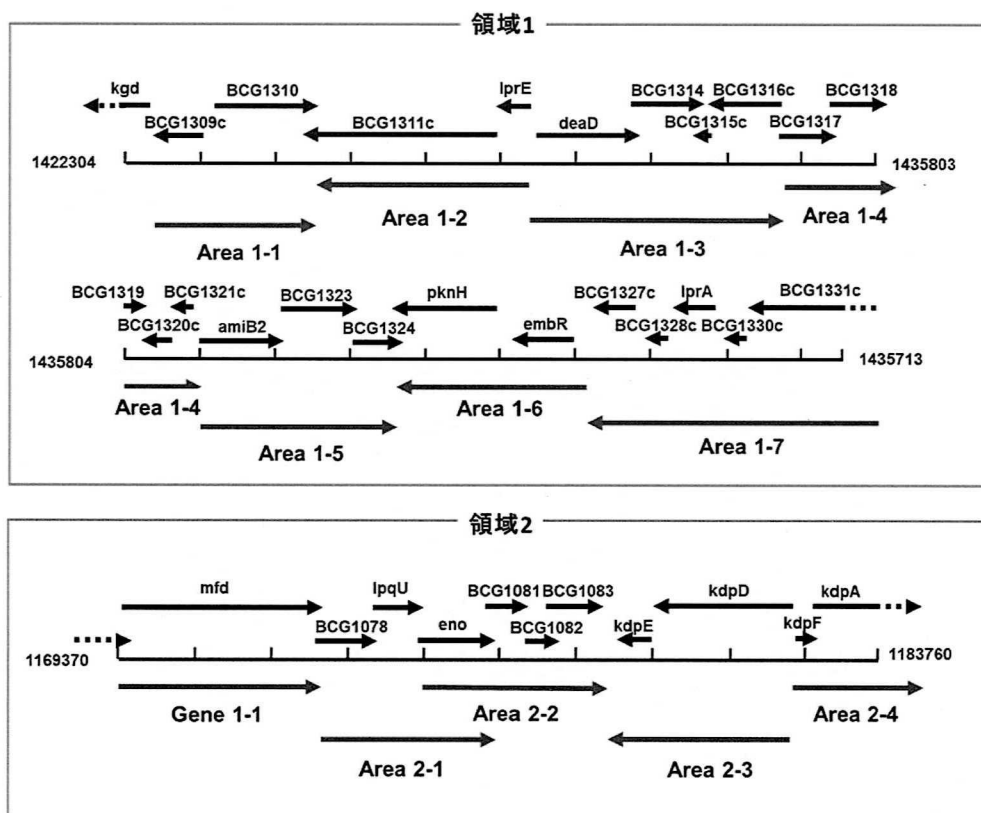


Figure 31 Melophlin A (5)耐性形株から得られた領域1および2に含まれる遺伝子

ゲノムデータベースでの解析により、Figure 31に示す ORF が領域1および2に含まれることが確認された。そこで次に、領域1および領域2それぞれの遺伝子を、Figure 31に示す通りそれぞれ7つおよび5つの領域に分割し、それぞれの領域のゲノムを高発現する *M. smegmatis* 形質転換株を作成した (Strain 28~39)。

そして、各形質転換株の5に対する耐性の有無を確認した。その結果、領域1内の遺伝子では、area 1-4を高発現する strain 31が、領域2内の遺伝子では area 2-2を高発現する strain 37が5に耐性を示した (Figure 32)。

0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1 \times \text{MIC}$) of melophlin A (5)

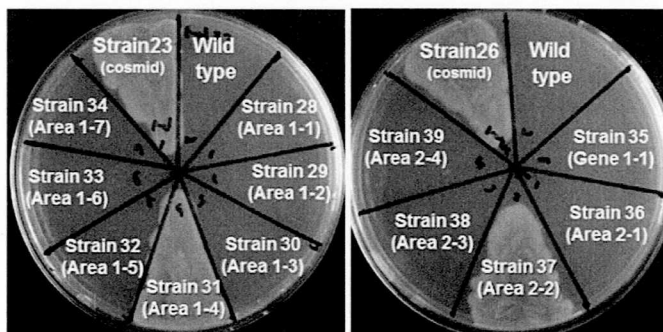


Figure 32 Strain 28~39の melophlin A (5)含有培地での生育

Figure 31 に示した通り、area 1-4 には 5 種の ORF が存在し、area 2-2 には 3 種の ORF が存在している。そこで次に、これら 8 つの ORF を高発現する形質転換株を作成し (Strain 40~47)、5 に対する耐性の有無を確認した。その結果、Area 1-4 では HIT (Histidin triad)-like protein をコードすると予想される *BCG1321c* 遺伝子の高発現株 (Strain 44) が耐性を示し、Area 2-2 では exopolyphosphatase をコードすると予想される *BCG1083* 遺伝子の高発現株 (Strain 47) が耐性を示した (Figure 33)。

0.8 µg/mL (1 × MIC) of melophlin A (5)

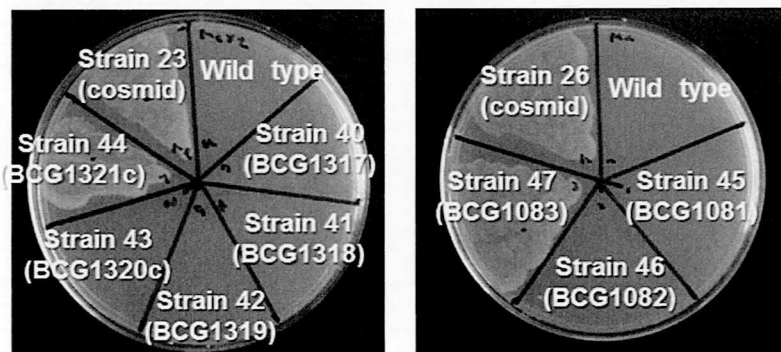


Figure 33 *BCG1317~21c*, *BCG1081~3* 高発現株の melophlin A (5) 含有培地での生育

以上の結果から、melophlin A (5) の propionate 含有培地選択的な抗菌活性の発現には、*BCG1321c* 遺伝子の翻訳産物 (HIT-like protein) と *BCG1083* 遺伝子の翻訳産物 (exopolyphosphatase) が関与していることが強く示唆された。

Exopolyphosphatase は、ATP 等の高エネルギーリン酸結合に利用されるリン酸の貯蔵源である polyphosphate の加水分解酵素と考えられている。また exopolyphosphate は緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) やサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) など、多くの病原性細菌にその存在が報告されており²⁰⁾、結核菌では、*Rv1026* 遺伝子にも本酵素がコードされている。一方、HIT protein 群は、C-末端付近に HXHXHXX (H: Histidine X: 疎水性アミノ酸) のモチーフ配列を有するタンパク質であり、細菌からヒトまで幅広くその存在が知られている。また HIT protein は、その機能と構造の違いにより、5'-monophosphoramidase を有する Hint ファミリー、diadenosine polyphosphate hydrolase を有する Fhit ファミリー、diadenosine tetraphosphate phosphorylase を有する GalT ファミリーの3つに分類されている。その中で *BCG1321c* は、Hint ファミリーに属する酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 遺伝子 *Hnt1* と相同性が高く、*Hnt1* の翻訳産物には 5'-monophosphoramidase 活性が報告されていることから²¹⁾、*BCG1321c* の翻訳産物も同様の活性を有する可能性が高いと予想される。

これらの知見から、melophlin A (5) の標的分子と予想される *BCG1083* および *BCG1321c* の翻訳産物はいずれもリン酸部位の加水分解に関わる機能をもつと予想された。さらに melophlin A (5) については、哺乳類細胞の GTPase である dynamin と結合することも報告されていることから²²⁾、melophlin A (5) はリン酸部位の加水分解作用に関わる化合物であると推定される (Figure 34)。しかしながら、melophlin A (5) が propionate 培地選択的な抗菌活性を示すことと、これら標的分子への影響を関連付ける明確な知見はないことから、今後この点についてさらに検討する必要がある。

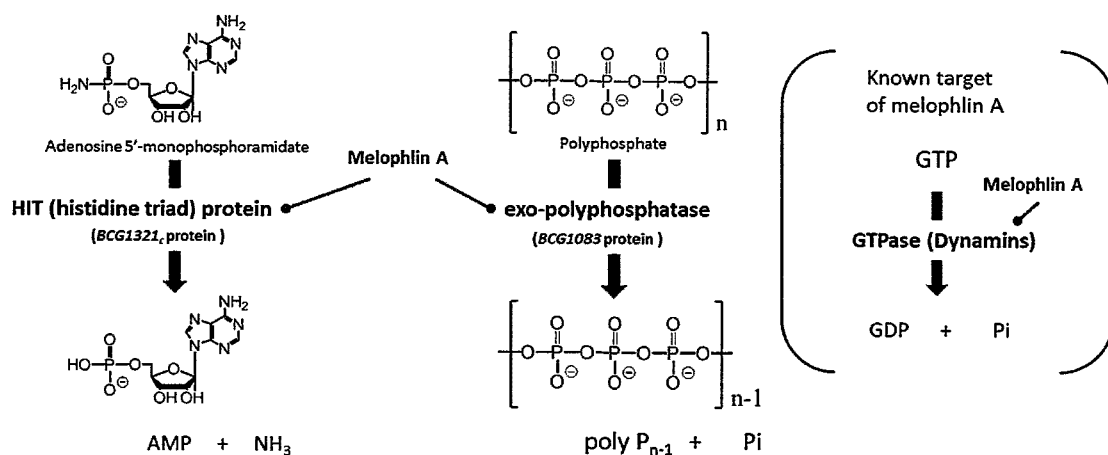


Figure 34 Melophlin A (5) の推定される phosphate 阻害作用

結論

- 1) 沖縄産海綿 *Neamphius* sp. の MeOH 抽出エキスをから抗菌性環状デブシペプチド neamphamide B (1) を単離し、その化学構造を明らかにした。また neamphamide B (1) は、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対して好気培養および潜在状態を誘導する低酸素培養の両条件下で抗菌活性を示すことを明らかにした。
- 2) インドネシア産海綿 *Agelas* sp. の MeOH 抽出エキスをから、好気および低酸素の両培養条件下で抗菌活性を示す抗菌物質として、agelasine B (2)、C (3) および D (4) を単離した。特に agelasine D (4) は、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対し好気および低酸素の両培養条件下で 0.8 ~ 6.25 $\mu\text{g/mL}$ と強い抗菌活性を示し、その作用は殺菌的であることを明らかにした。
- 3) Agelasine D (4) の標的分子解析の結果、agelasine D (4) は、*Mycobacterium* 属細菌の dioxygenase と予想されるタンパク質 (*BCG3185c* 遺伝子翻訳産物) に結合し、その機能を阻害することにより抗菌活性を示すことを強く示唆する知見を得た。
- 4) Granuloma 内の結核菌の代謝変化に着目して、脂肪酸を炭素源とする培地選択的に抗菌活性を示す化合物を探索する評価系を構築した。またスクリーニングの結果、インドネシア産海綿 *Melophlus* sp. の MeOH 抽出エキスを propionate 含有培地選択的な抗菌活性を見出し、活性成分を精査した結果、melophlin A (5)、G (6)、H (7) および I (8) を単離した。
- 5) Melophlin A (5) の標的分子解析の結果、melophlin A (5) の propionate 含有培地選択的な抗菌活性の発現には、*BCG1321c* の翻訳産物 (HIT-like protein) と *BCG1083* の翻訳産物 (exopolyphosphatase) が関与していることを示唆する知見を得た。

謝辞

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野 恩師 小林 資正 教授に心から感謝致します。

実験を行うに際し、数々の有益なご助言とご指導を頂きました、荒井 雅吉 准教授に心から感謝致します。また数々の有用なご助言を頂きました古徳 直之 助教、田村 理 特任助教 (現 東北大学 講師)に深く感謝いたします。

海綿の採取にご協力いただきました琉球大学理学部海洋自然科学科 田中 淳一 教授に感謝の意を表します。

実験の際にご助力、ご助言いただきました本薬学研究科天然物化学分野 林 亜紗実 博士、Patamaporn Pruksakorn 博士、石田 俊介 博士、河内 崇志 修士、藤田 真由美 修士、中村 友香 修士、劉 柳 修士、Ahmed Mohamed Mohamed 修士、韓 智秀 修士 佐藤 陽紀 学士、塩村 昌 学士、龍田 啓生 学士、付 炎 学士、戸田 和成 学士の他、大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野の皆様感謝いたします。

質量分析の測定をしていただきました本薬学研究科 質量分析室の千原 容子 氏、藤原 久美子 氏に感謝致します。

最後に、学生生活を支えていただいた家族、友人に心から感謝致します。

実験の部

エレクトロスプレーイオン化法飛行時間型質量分析 (ESI-TOF MS)は、Waters 製 Q-Tof Ultima を用いて測定し、溶媒として MeOH を用いた。核磁気共鳴スペクトル(^1H -NMR および ^{13}C -NMR)は、バリアン テクノロジーズ ジャパン リミテッド製 Varian unity inova 600 (^1H : 600 MHz および ^{13}C : 150 MHz) を用いて測定し、 CDCl_3 、 CD_3OH もしくは D_2O を内部標準とし、chemical shift は δ (ppm)、結合定数は J = (Hz)で表示した。また、 ^1H -NMR における分裂様式は、singlet、doublet、triplet、doubledoublet、doubletriplet、multiplet をそれぞれ s、d、t、dd、dt、m に、broad は br と略して記載した。

赤外吸収スペクトル (IR spectrum)は日本分光製フーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-5300、紫外可視吸収スペクトル (UV-vis spectrum)は島津製作所製 UV-2425、比旋光度 (specific rotation)は日本分光製デジタル型旋光度計 (L = 50 mm) DIP-370 を用いて測定した。

吸光マイクロプレートリーダーは、Molecular Devices 製 SpectraMax 190 を使用し、オペレーションソフトウェアは Soft Max Pro を用いた。遠心エバポレーターには、EYELA 製 CVE-200D を使用した。

カラムクロマトグラフィーの担体は、関東化学株式会社製 Silica Gel 60N (63-210 mm)および Nacalai tesque 製 Cosmosil 75C₁₈-OPN を使用した。また、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)には、日立製作所製 L-2130 (UV-detector: L-2400H)を使用した。逆相カラムは Nacalai tesque 製 Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10 mm i.d. × 250 mm)、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10 mm i.d. × 250 mm)、Cosmosil 5CN-MS (10 mm i.d. × 250 mm) および資生堂製 CAPCELL PAK C8 (4.6 mm i.d. × 250 mm)を使用した。

薄相クロマトグラフィー(TLC)は、Merck 製 TLC Silica gel 60 F₂₅₄および HPTLC Silica gel 60 RP-18 WF₂₅₄S を使用し、スポットの検出は UV 照射下 (254 nm および 365 nm)における発色の有無を確認した後、5% 12-Molybdo (VI)phosphoric acid, *n*-hydrate EtOH reagent および *p*-Methoxybenzaldehyde (anisaldehyde) ·sulfuric acid reagent を噴霧し、加熱により発色を確認した。

高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)は平山製作所株式会社製 HA-240M を使用した。*Mycobacterium* 属細菌の液体培養は TAITEC 製 BR-23FP、寒天培養には三洋電機株式会社製 MIR-262 を使用した。実験における pH の調製には堀場製作所製 D-12 を使用した。高純度精製水は Milipore 製 Direct-Q UV を使用した。P2 実験室の安全キャビネットは日本医化器機製作所製 VH-1300 BH-2A を使用した。多本架冷却遠心機はトミー精工製 LX-120、高速遠心機はトミー精工製 RX-200 を使用した。超低温フリーザは三洋電機株式会社製 MDF-U537 および MDF-U33V を使用した。電気泳動で使用した泳動槽は ADVANCE 製 Mupid-2plus を使用した。低酸素実験用培養チャンバーには三菱社製 アネ

ロパック角型ジャーを使用した。PCR には PERKIN ELMER 製 Gene Amp PCR System 2400 を使用した。エレクトロポレーションには BIORAD 製 Gene Pulser X cell total system を使用した。大腸菌の破碎には SONICS 社製 VC750 にテーパーマイクロチップ 1/4 インチ (6 mm) を接続したものを使用した。分子間相互作用解析装置には GE Healthcare 社製 BIACORE T200 を使用した。

第一章の実験

・ 使用菌株

Mycobacterium smegmatis mc²155 および *Mycobacterium bovis* Bacille de Calmette et Guerin (BCG) Pasteur は Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr. 博士より分与して頂いた。また、*M. smegmatis* および *M. bovis* BCG は Cryo Tube™ Vials (nunc) 中で最終濃度が 25% となるように glycerol と混和し、超低温フリーザ (-80℃) で保存した。

Mycobacterium 属細菌保存用培地 50%glycerol aq. の調製

Glycerol (SIGMA) の最終濃度が 50% となるように高純度精製水に溶解させ、polystyrene sterile filter (Corning) を用いて濾過滅菌を行った。

・ 菌株培養用培地の調製

1) *Mycobacterium* 属細菌培養用培地

a) *M. smegmatis* 用 Middlebrook 7H9 液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 1 L に溶解させ 121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。室温に冷却後、B を添加し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Difco™ Middlebrook 7H9 Broth	4.7	g	BD
	Glycerol	2.0	mL	SIGMA
B:	20% NaCl aq.	2.0	mL	Nacalai tesque
	20% Glucose aq.	10.0	mL	Nacalai tesque
	20% Tween 80 aq.	2.5	mL	SIGMA

試薬 B で使用した 20% NaCl aq., 20% glucose aq. および 20% Tween 80 aq. は各試薬を高純度精製水に溶解し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌することにより調製した。以下これらの試薬を使用する場合には、同様に調製したものを用いた。

b) *M. smegmatis* 用の脂肪酸炭素源液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 995.5 mL に溶解させ 121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。室温に冷却後、B を添加したのち、C①を加えたものを Glucose 培地、C②を加えたものを Propionate 培地、C③を加えたものを Palmitate 培地とし、それぞれ 6N HCl もしくは 3N NaOH によって pH 6.6 に調整後、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Sodium citrate · 2H ₂ O	0.1	g	Nacalai tesque
	Pyridoxine	1.0	mg	Wako
	Biotin	0.5	mg	Nacalai tesque
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.3	g	SIGMA
	KH ₂ PO ₄	1.0	g	SIGMA
	Ferric ammonium citrate	40.0	mg	Wako
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	g	Nacalai tesque
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.7	mg	Wako
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.8	mg	Wako
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.0	mg	Nacalai tesque
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	g	Wako
B:	20% Tyloxapole aq.	2.5	mL	SIGMA
	20% NaCl aq.	2.0	mL	Nacalai tesque
C:	① Glucose	2.0	g	Nacalai tesque
	② Propionic acid	2.0	g	Wako
	③ Palmitate	100	mg	関東化学

c) *M. bovis* BCG 用 Middlebrook 7H9 液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 900 mL に溶解させ、121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅菌を行った。室温に冷却後 B を添加した後、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Difco™ Middlebrook 7H9 Broth	4.7	g	BD
	Glycerol	2.0	mL	SIGMA
B:	Difco™ Middlebrook OADC Enrichment	100	mL	BD
	20% Tween 80 aq.	2.5	mL	SIGMA

d) *M. bovis* BCG 用の脂肪酸炭素源液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 995.5 mL に溶解後 121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間高圧蒸気滅菌を行った。室温に冷却後、B を添加したのち、C①を加えたものを Glucose 培地、C②を加えたものを Propionate 培地、C③を加えたものを Palmitate 培地とし、それぞれ 6N HCl もしくは 3N NaOH によって pH 6.6 に調整後、D を添加し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Sodium citrate · 2H ₂ O	0.1	g	Nacalai tesque
	Pyridoxine	1.0	mg	Wako
	Biotin	0.5	mg	Nacalai tesque
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.3	g	SIGMA
	KH ₂ PO ₄	1.0	g	SIGMA
	Ferric ammonium citrate	40.0	mg	Wako
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	g	Nacalai tesque
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.7	mg	Wako
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.8	mg	Wako
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.0	mg	Nacalai tesque
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	g	Wako
B:	20% Tyloxapole	2.5	mL	SIGMA
	20% NaCl	2.0	mL	Nacalai tesque
C:	① Glucose	2.0	g	Nacalai tesque
	② Propionic acid	2.0	g	Wako
	③ Palmitate	100	mg	関東化学
D:	Bovine Serum Albumin fraction V	50	g	Merck

2) *Mycobacterium* 属細菌培養用寒天培地

a) *M. smegmatis* 用 Middlebrook 7H10 寒天培地の調製

試薬 A を高純度精製水 1 L に溶解後 121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。約 50°C に冷却後、シャーレに 35 mL 流し入れ、室温で放置することにより固化させた。また、必要に応じ、50 mg/mL に高純度精製水で溶解し、濾過滅菌した kanamycin (SIGMA) または hygromycin B (invitrogen) をそれぞれ終濃度 20 µg/mL または 50 µg/mL になるよう添加し使用した。

A:	Middlebrook 7H10 Agar	19 g	BD
	Glycerol	5 mL	SIGMA

b) *M. bovis* BCG 用 Middlebrook 7H10 寒天培地の調製

試薬 A を高純度精製水 900 mL に溶解後 121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間、高圧蒸気滅菌した。約 50°C に冷却後、B を添加し、シャーレに 35 mL 流し入れ、室温で放置することにより固化させた。

A:	Middlebrook 7H10 Agar	19 g	BD
	Glycerol	5.0 mL	SIGMA
B:	Middlebrook OADC Enrichment	100 mL	BD

・ 抗菌活性測定用試薬と細菌数の計測数

1) MTT solution の調製

Thiazolyl blue tetrazolium bromide (SIGMA) を滅菌精製水に 5.0 mg/mL になるよう溶解して用いた。

2) 細菌数の計測

M. smegmatis および *M. bovis* BCG の菌数の計測は、分光光度計用石英セル(三和理研株式会社)を用いて、UV 検出器により 600 nm での吸光度を測定することにより行った。そして、吸光度 1.0 を 1×10⁸ CFU/ mL とみなして菌数を算出した。

・ *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG に対する抗菌活性の評価法

1) *M. smegmatis* に対する抗菌活性の評価法

9 mL の Middlebrook 7H9 液体培地を含む square media bottle に、-80℃で凍結保存した *M. smegmatis* 1 mL を植菌し、37℃で 24 時間振盪培養(95 rpm)を行った。次に菌液を 7H9 液体培地で 10 倍希釈し、UV 検出器を用いて菌数を算出した後、 1×10^5 CFU/mL に希釈し、これを 100 μ L ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した(1×10^4 CFU/ 100 μ L/ well)。被検薬物を添加し、37℃で 24 時間培養した。培養後 MTT solution 10 μ L を加え、さらに 12 時間培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌数を算出し、最小生育阻止濃度(MIC)を求めた。

2) *M. smegmatis* に対する低酸素条件下での抗菌活性の評価法

Middlebrook 7H9 液体培地で培養した菌液を 9 mL の Middlebrook 7H9 液体培地を含む square media bottle に 1 mL 植菌したのち、蓋をゆるめた状態で低酸素培養チャンバーに入れ、チャンバー内を窒素で 15 分間置換後、0.2%濃度になるよう酸素を注入し、37℃で 72 時間振盪培養した。こうして低酸素条件下で前培養した菌液を 10 倍希釈し、UV 検出器を用いて菌数を算出した後、 1×10^6 CFU/ mL に希釈し、これを 100 μ L ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した(1×10^5 CFU/ 100 μ L/ well)。次に被検薬物を添加し、マルチウェルプレートを低酸素培養チャンバーに入れ、低酸素条件下、37℃で 96 時間培養した。培養後 MTT solution 10 μ L を加え、さらに 12 時間低酸素条件下で培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌数を算出し、最小生育阻止濃度(MIC)を求めた。

3) *M. smegmatis* に対する脂肪酸炭素源培地での抗菌活性の評価法

Middlebrook 7H9 液体培地により培養した菌液 1 mL を 3000 rpm、10 min で遠心処理後、炭素源を限定した液体培地 (Glucose 培地、Propionate 培地または Palmitate 培地)で置換した。次に 9 mL の各培地を含む square media bottle に 1 mL 植菌し、37℃で OD₆₀₀ が 0.8~1.0 になるまで振盪培養(95 rpm)した。培養した菌液は対応する各培地で 10 倍希釈後、UV 検出器を用いてその菌数を算出した。そして、各菌液を 1×10^5 CFU/ mL (Glucose 培地)もしくは 1×10^6 CFU/ mL (Propionate 培地、Palmitate 培地)に調製し、これを 100 μ L ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した。次に被検薬物を添加し、37℃で Glucose 培地では 36 時間、Propionate 培地では 48 時間、Palmitate 培地では 72 時間培養した。培養後 MTT solution 10 μ L を加え、さらに 24 時間培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌数を算出し、最小生育阻止濃度 (MIC)を求めた。

4) *M. bovis* BCG に対する抗菌活性の評価法

9 mL の *M. bovis* BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地を含む square media bottle に、 -80°C で凍結保存した *M. bovis* BCG 1 mL を植菌し、 37°C で 1 週間振盪培養 (95 rpm) を行った。次に菌液を 10 倍希釈した後、UV 検出器で 600 nm の吸光度を測定し、菌数を算出し、 1×10^6 CFU/mL に希釈後、100 μL ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した (1×10^5 CFU/100 μL /well)。その後被検薬を添加し、 37°C で 1 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μL を加え、さらに 24 時間培養後生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度から生存菌数を算出し、最小生育阻止濃度(MIC)を求めた。

5) *M. bovis* BCG に対する低酸素条件化での抗菌活性の評価法

M. bovis BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地により培養した菌液を 9 mL の *M. bovis* BCG 用 Middlebrook7H9 液体培地を含む square media bottle に 1 mL 植菌したのち、ふたを緩めた状態で低酸素培養チャンバーに入れ、チャンバー内を窒素で 15 分間置換後、0.2%濃度になるよう酸素を注入し、 37°C で 1 週間振盪培養した。こうして前培養した菌液を 10 倍希釈し、UV 検出器を用いて菌数を算出した後、 1×10^6 CFU/mL に希釈し、これを 100 μL ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した (1×10^5 CFU/100 μL /well)。次に被検薬物を添加し、マルチウェルプレートを低酸素培養チャンバーに入れ、低酸素条件下、 37°C で 2 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μL を加え、さらに 24 時間低酸素条件下で培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌数を算出し、最小生育阻止濃度(MIC)を求めた。

6) *M. bovis* BCG に対する脂肪酸炭素源培地での抗菌活性の評価法

Middlebrook7H9 液体培地により培養した菌液 1 mL を 3000 rpm、10 min で遠心処理後、炭素源を限定した液体培地 (Glucose 培地、Propionate 培地または Palmitate 培地) で置換した。次に 9 mL の各培地を含む square media bottle に 1 mL 植菌し、 37°C で OD_{600} が 0.8~1.0 になるまで振盪培養(95 rpm)した。培養した菌液は対応する各培地で 10 倍希釈後、UV 検出器を用いてその菌数を算出した。そして、 1×10^6 CFU/mL に調製し、これを 100 μL ずつ 96 穴のマルチウェルプレートに分注した。次に、被検薬物を添加し、 37°C で Glucose 培地では 1 週間、Propionate 培地では 2 週間、Palmitate 培地では 1 週間培養した。培養後 MTT solution 10 μL を加え、さらに 2 日間培養後、生成した formazan が吸収を示す 560 nm の吸光度を測定することで生存菌数を算出し、最小生育阻止濃度 (MIC) を求めた。

第二章の実験

・ 海綿 *Neamphius* sp.からの新規環状デプシペプチド neamphamide B (1)の単離

1997 年、沖縄県西表島で採集した海綿 *Neamphius* sp.の乾燥サンプル(350 g)を、MeOH で3回冷侵し、得られた MeOH 抽出液をあわせて減圧下濃縮し、MeOH 抽出エキス (37.2 g)を得た。次に、MeOH 抽出エキスを酢酸エチルと水で分配し、次に水層を n-BuOH と分配することにより、n-BuOH 画分 (5.6 g)を得た。*M. smegmatis*に対して抗菌活性が認められた n-BuOH 画分を ODS MPLC (H₂O : MeOH (+0.1% TFA) = 100 : 0 → 70 : 30 → 40 : 60 → 0 : 100)で Fr. A-1~Fr. A-9 に分離した。さらに、活性が認められた Fr. A-8 (549 mg) を、HPLC (Cosmosil MS- II, 10 mm i.d. ×250 mm, 36%MeCN aq.+0.1%TFA)により Fr.B-1~Fr.B-15 に分離し、続いて Fr. B-6 を HPLC (Cosmosil AR- II, 10 mm i.d. ×250 mm, 65%MeOH aq.+0.1%TFA)により精製し、neamphamide B (35 mg)を単離した。

Neamphamide B (1): Colorless amorphous solid. $[\alpha]_D -5.1$ ($c = 0.33$, MeOH). IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3274, 1672, 1534, 1449. UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ) : 272 (1800). ESI-TOF MS m/z : 787.9 $[M+2H]^+$. 高分解能 ESI-TOF-MS : Calcd for C₇₁H₁₁₉N₁₉O₂₁ m/z : 787.9487 Found 787.9493

¹H NMR(600 MHz, δ_H), ¹³C NMR(150 MHz, δ_C)スペクトルデータ: 本論 Table 2-2 に記載。

第二章 第一節の実験

・ Neamphamide B (1)の抗菌活性試験

M. smegmatis および *M. bovis* BCG に対する neamphamide B (1) の活性評価は、第一章 第一節と同様にして行った。

第二章 第二節の実験

・ Neamphamide B (1)の加水分解

Neamphamide B (1) (0.5 mg)を 0.2 mL の 6N HCl aq.に溶解させ、封管した後、110℃ で 11 時間加熱した。反応後、窒素雰囲気下で乾燥させ、neamphamide B (1)の加水分解物を得た。

・ FDAA によるアミノ酸の絶対立体構造の解析

前述の方法により得られた neamphamide B (1)の加水分解物 (100 μ g)を 0.1M NaHCO₃ 水溶液に溶解させた後、*N*-(5-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-*L*-alaninamide (*L*-FDAA, Marfey's

reagent, 1 mg/mL)を含む acetone 溶液を 50 μ L 添加し、70°C で 1 時間反応させた。反応後、0.2 N HCl を 50 μ L 加え減圧乾燥させた。そして反応物を 5%酢酸を含む 50%CH₃CN 水溶液 200 μ L に溶解させ、これを分析に用いた。

Arg、Asp、Thr、*allo* Thr、Hpr および Leu の *D*、*L* 体の標品についても同様に FDAA 化した。そして、下記に示す HPLC 条件を用いて、標品アミノ酸の FDAA 誘導体の Rt と neamphamide B (1)加水分解物のそれとを比較することで、neamphamide B (1)に含まれるアミノ酸の絶対立体構造を決定した。

HPLC 条件： CAPCELL PAK C8, (Shiseido Co., Ltd, 4.6 mm i.d. \times 250 mm) UV = 340 nm、Flow rate = 1 mL/ min

0%CH₃CN aq.+5% acetic acid, 5 min \rightarrow linear gradient, 25 min \rightarrow 50%CH₃CN aq.+5% acetic acid, 25 min \rightarrow linear gradient, 5 min \rightarrow CH₃CN +5% acetic acid, 15 min.

標品アミノ酸 Rt (min)

L-Arg (22.2)、*D*-Arg (21.6)、*L*-Asp (22.2)、*D*-Asp (36.8)、*L*-Thr (33.5)、*D*-Thr (35.9)、*L*-*allo* Thr (34.4)、*D*-*allo* Thr (35.2)、*L*-Hpr (39.2)、*D*-Hpr (38.8)、*L*-Leu (40.9)、*D*-Leu (42.3)

・ GITC によるアミノ酸の絶対立体構造の解析

前述の方法により調製した neamphamide B (1)の加水分解物 (100 μ g)を

2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-glucopyranosylisothiocyanate (GITC, 3.9 mg/mL)を含む

CH₃CN 溶液 100 μ L に溶解させた後、triethylamine 20 μ L を添加し、室温で 30 分反応させた。反応後、50%CH₃CN aq.80 μ L を加え、これを分析用に用いた。Arg、Asp、Thr、*allo* Thr、Hpr、Leu および NMeGln の *D*、*L* 体の標品についても同様に GITC 標識した。

そして、下記に示す HPLC 条件を用いて、標品アミノ酸の GITC 誘導体の Rt と neamphamide B (1)加水分解物のそれとを比較することで、neamphamide B (1)に含まれるアミノ酸の絶対立体構造を決定した。

HPLC 条件： CAPCELL PAK C8, (Shiseido Co., Ltd, 4.6 mm i.d. \times 250 mm) UV = 254 nm、Flow rate = 1 mL/ min

20%CH₃CN aq.+5% acetic acid \rightarrow linear gradient, 30min \rightarrow CH₃CN +5% acetic acid.

標品アミノ酸 Rt (min)

L-NMeGlu (12.4)、*D*-NMeGlu (13.2)、*L*-Arg (6.1)、*D*-Arg (6.1)、*L*-Asp (12.7)、*D*-Asp (12.7)、*L*-Hpr (16.8)、*D*-Hpr (17.3)、*L*-Leu (19.2)、*D*-Leu (19.6)

L-Thr、*D*-Thr、*L*-*allo* Thr および *D*-*allo* Thr に関しては、本条件下において誘導体のピークは得られなかった。

第三章の実験

- ・ 試薬、菌株等

Mycobacterium 用発現ベクターpMV206、pMV261 および *M. bovis* BCG のゲノム DNA ライブラリーは Albert Einstein College of Medicine の William R. Jacobs, Jr. 博士より分与して頂いたものを使用した。*Escherichia coli* DH5αのコンピテントセルは、TOYOBO より購入した。

- ・ 菌株培養用培地

M. smegmatis および *M. bovis* BCG の培養に用いた培地および培養条件は、第一章と同様に行った。

1) Luria-Bertani (LB)液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 1 L に溶解させ、121℃、2 気圧の条件下で 20 分高圧蒸気滅菌して用いた。

A:	Tryptone	10.0 g	Nacalai tesque
	Extract Yeast dried	5.0 g	Nacalai tesque
	Sodium chloride	10.0 g	Nacalai tesque

M. smegmatis の形質転換を行う場合には、これに Tween 80 (SIGMA) を終濃度 0.05% になるよう添加し、濾過滅菌したものを使用した。また、必要に応じ、高純度精製水で溶解し、濾過滅菌した kanamycin (SIGMA)もしくは ampicillin (nacalai tesque)を、*M. smegmatis* に対しては終濃度 20 µg/mL もしくは 50 µg/ mL、*Eshcherichia coli* に対しては 40 µg/mL もしくは 100 µg/ mL になるよう添加し使用した。

2) Luria-Bertani (LB)寒天培地の調製

LB 液体培地 1 L の組成に Agar (nacalai tesque) 20 g を加え、121 °C、2 気圧の条件下で 20 分間高圧蒸気滅菌した。約 50℃に冷却後、シャーレに 35 mL づつ流し入れ、室温で放置することにより固化させた。また必要に応じ、高純度精製水で溶解し、濾過滅菌した kanamycin (SIGMA)もしくは ampicillin (nacalai tesque) を *M. smegmatis* に対しては終濃度 20 µg/ mL もしくは 50 µg/ mL、*E. coli* に対しては 40 µg/ mL もしくは 100 µg/ mL になるようシャーレに流し入れる前に添加し使用した。

3) SOB 液体培地の調製

試薬 A を高純度精製水 1 L に溶解させ、121℃、2 気圧の条件下で 20 分高圧蒸気滅菌したのち、室温まで冷却し、試薬 B を加え polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Bacto tryptone	20.0	g	BD
	Extract Yeast dried	5.0	g	Nacalai tesque
	Sodium chloride	590	mg	Nacalai tesque
	KCl	186	mg	Wako
B:	2M Mg solution (1M MgSO ₄ · 7H ₂ O+1M MgCl ₂ · 6H ₂ O)	10.0	mL	Nacalai tesque

・ 電気泳動

ゲルの作成には Agarose (cambrex)を用い、0.8% (w/v)となるように泳動液と混合後溶解して用いた。泳動液には 50×TAE buffer (nacalai tesque)を高純度精製水により 50 倍希釈したものをを用いた。泳動槽は ADVANCE 製 Mupid-2plus を使用した。DNA の検出は EtBr (nacalai tesque)により染色し行った。

第三章 第一節の実験

・ 海綿 *Agelas* sp.からの agelasine 類の単離

2010 年、インドネシア ビアック島で採集した海綿 *Agelas* sp.の MeOH 抽出エキス(5.4 g)を酢酸エチルと水で分配した後、酢酸エチル層を 90%MeOH aq.と Hexane で分配することで 90%MeOH aq. 画分 (2.0 g)を得た。*M. smegmatis* に対して抗菌活性が認められた 90%MeOH aq.画分を SiO₂ open column chromatography (CHCl₃ : MeOH : H₂O (+1% NH₃ aq., lower phase) = 65 : 3 : 1 → 10 : 3 : 1 → 7 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1 → MeOH)で Fr. A-1~A-9 に分画し、続いて Fr. A-8 (650 mg)を HPLC (Cosmosil 5C₁₈ MS- II (10 mm i.d. ×250 mm, 85%MeOH aq. +0.1% TFA , UV = 220 nm, Flow rate 3 mL / min)で Fr. B-1~B-4 に分画した。さらに Fr. B-1(243 mg)を HPLC (Cosmosil 5C₁₈ AR- II (10 mm i.d.×250 mm, 58%MeCN aq. +0.1% TFA, UV = 220 nm, Flow rate 3 mL / min)で精製することにより、agelasine B (2) (8.3 mg), agelasine C (3) (6.6 mg), agelasine D (4) (52.2 mg)を得た。

Agelasine B (2) : Colorless amorphous solid. $[\alpha]_D -21.5$ ($c = 1.1$, MeOH). ESI-TOF-MS
 m/z : 422 $[M]^+$

1H NMR($CDCl_3$) : δ 10.89 (1H, s), 8.50 (1H, s), 6.84 (2H, s), 5.71 (2H, d, $J = 6.5$ Hz), 5.41 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), 5.17 (1H, s), 4.10 (3H, s), 2.2-0.7 (14H, m), 1.86 (3H, s), 1.57 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.76 (3H, d, $J = 5.2$ Hz), 0.70 (3H, s)

Agelasine C (3) : Colorless amorphous solid. $[\alpha]_D -50.1$ ($c = 1.2$, MeOH). ESI-TOF-MS
 m/z : 422 $[M]^+$

1H NMR($CDCl_3$) : δ 10.88 (1H, s), 8.50 (1H, s), 6.84 (2H, s), 5.70 (2H, d, $J = 6.5$ Hz), 5.41 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), 5.31 (1H, brt, $J = 3.2$ Hz), 4.10 (3H, s), 2.2-0.7 (14H, m), 1.84 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.84 (3H, s), 0.82 (3H, s), 0.79 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)

Agelasine D (4) : Colorless amorphous solid. $[\alpha]_D -15.1$ ($c = 1.2$, MeOH). ESI-TOF-MS
 m/z : 422 $[M]^+$

1H NMR($CDCl_3$) : δ 10.94 (1H, s), 8.50 (1H, s), 6.76 (2H, s), 5.72 (2H, d, $J = 6.5$ Hz), 5.41 (1H, t, $J = 6.5$ Hz), 4.81 (1H, s), 4.43 (1H, s), 4.10 (3H, s), 2.4-0.6 (16H, m), 1.86 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.79 (3H, s), 0.65 (3H, s)

・ Agelasine D (4)による *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG の経時的菌数変化

Middlebrook 7H9 培地で 1.0×10^6 CFU/ mL に調整した *M. smegmatis* および *M. bovis* BCG の菌液を square media bottle に 10 mL 入れ、最終濃度が MIC の 4 倍量になるように agelasine D (4) を添加した。次に、好気および低酸素条件下で、37°C で振盪培養を行った。そして経時的に菌液を採取し、適宜希釈後、一定量を Middlebrook 7H10 培地に塗布した。そして 37°C で *M. smegmatis* は 5 日間、*M. bovis* BCG は 4 週間培養後に観察されるコロニー数を計測し、CFU を算出した。

ゲノム DNA ライブラリーを用いた agelasine D (4) の標的遺伝子候補領域の解析

・ *M. bovis* BCG ゲノム DNA ライブラリーによる *M. smegmatis* の形質転換

Wild-type の *M. smegmatis* を Middlebrook 7H10 培地で培養することで得られた single colony を Middlebrook 7H9 培地で OD₆₀₀ が 0.8~1.0 程度になるまで振盪培養した。続いてその菌液 2 mL を 100 mL の 0.05% Tween 80 を含む LB 培地に添加し再び OD₆₀₀ が 0.8~1.0 程度になるまで 37°C で振盪培養した。

培養後、菌体を 3000 rpm で 20 分遠心処理し、得られたペレットを 0.05%の Tween 80 を含む 10% Glycerol 溶液で 3 回洗浄したのち、全菌体を 5 mL の 10% Glycerol 溶液に懸濁させた。こうして得られた菌液を 350 μ L とり、氷上で冷やしておいた Gene Pulser® Cuvette (0.2 cm electrode gap, BIO-RAD)に移した。そして 1.5 μ L の *M. bovis* BCG ゲノム DNA ライブラリーを添加し、2500 V, 25 μ F, 1000 Ω の条件でエレクトロポレーション後、ただちに氷中で 3 分間冷却した。続いて、800 μ L の Middlebrook 7H9 培地を加え、37°C で 4 時間振盪培養した。培養後、hygromycin B を 50 μ g/ mL 含む Middlebrook 7H10 培地で 5 日間培養することで、約 4000 の形質転換株を得た。

10%Glycerol+Tween 80 溶液の調製

試薬 A に高純度精製水を加えて 1 L になるよう混和し、polystyrene sterile filter を用いて濾過滅菌を行った。

A:	Glycerol	100.0	mL	SIGMA
	20% Tween 80 aq.	2.5	mL	SIGMA

・ ゲノム DNA ライブラリー形質転換株からの agelasine D (4) 耐性株の選択

前述の方法により得られた約 4000 の形質転換株を、1 株ずつ hygromycin B 50 μ g/mL を含む寒天培地および agelasine D (4) 0.8 μ g/mL を含む寒天培地に分離、塗布し、両プレート上で生育する形質転換株をスクリーニングした。選択した形質転換株については、再度 hygromycin B プレートより agelasine D (4) プレートに塗布し、耐性を示すことを確認した。また、得られた耐性株は hygromycin B を含む Middlebrook 7H9 培地で培養後、-80°C で保存した。

・ agelasine D (4) 耐性形質転換株からのコスミド DNA の分離

前述した agelasine D (4) 耐性株を hygromycin B を含む Middlebrook 7H9 培地 10 mL 中で OD₆₀₀ が 0.8~1.0 程度になるまで 37°C で震盪培養したのち、それらを 190 mL の Middlebrook 7H9 培地に添加し、さらに 48 時間振盪培養を行うことでコスミド抽出用の菌液とした。コスミド DNA の分離には QIAGEN プラスミド抽出キット(QiAfilter Plasmid Maxi kit 10)を使用し、そのプロトコールに従いコスミドを抽出した。最終的にカラムより溶出させたコスミド DNA を含む溶出液 15 mL を 10.5 mL の 2-propanol (Nacalai tesque) で沈殿させ、70% EtOH 25 mL で洗浄し、風乾させた後、250 μ L の 0.5 \times TE buffer (Wako) に溶解した。

・ コスミド DNA のシーケンス解析

コスミド DNA のシーケンス解析は、primer として pYUB145_F (5'-GTACGCCACCGCCTGGTTC-3')および pYUB145_R (5'-GTGCCACCTGACGTCTAAG-3')を使用し、コスミドベクター pYUB145 に含まれるゲノム DNA の両末端の配列解析を行った。またシーケンシングは Macrogen Inc. (korea) に委託した。得られたシーケンス結果は、GenoList Genome Browser のゲノムデータベース (<http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>) 上で blast 検索を行い導入されていた *M. bovis* BCG ゲノムの領域を決定した。

標的遺伝子候補領域から標的遺伝子の特定

・ *M. bovis* BCG ゲノム DNA の調製

M. bovis BCG の培養液(10 mL)を、3000 rpm で 10 分間遠心分離後、10 mg/ mL の lysozyme (SIGMA)を含む buffer P1 (QIAGEN) 1 mL に懸濁し、37 °Cで一晩加温した。翌日 10% SDS 200 μL および 10 mg/ mL の proteinase K (SIGMA) 100 μL を加え、55°C で 40 分間加温した。次に 65°Cに温めた 5 M NaCl 400 μL および 65°Cに温めた Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB、SIGMA) 320 μL を添加し、さらに 65°Cで 10 分間加温した。次に CHCl₃: iso-amylalcohol = 24:1 に調製した溶液 1.5 mL を加え、転倒混和した後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。水相を分取し、その水相に、2-propanol 1.5 mL を加えて転倒混和後、析出したゲノム DNA を先を丸めたパスツールピペットですくい取り、70% EtOH で洗浄した。得られたゲノム DNA を 0.5×TE buffer 50 μL に溶解し、4°C で一晩放置し、その後、-20°Cで保存した。PCR にはこれを滅菌精製水で 100 倍希釈したものを Template として用いた。

ゲノム高発現株の作成

・ プライマーの設計

PCR には、以下のプライマーを用いた。またプライマーの合成は北海道システム・サイエンス社に委託した。

・ 耐性株のコスミドから得られた agelasine D (4)の標的遺伝子候補領域の分割ゲノム (PPE53,70 は pMV261、その他 Area は pMV206 に導入)

Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR condition
Ag_Area1_F	<u>TCTAGAGT</u> GC GTCGAGCTCATGC	5.35 kbp	A,B
	Xba I		(Buffer A)
Ag_Area1_R	<u>AAGCTTT</u> CAGCGCAGCAACTGG		
	HindIII		

B_PPE53_F_BamH I	<u>GGATCCA</u> ACGCCTGTGTCATCGG BamH I	1.83 kbp	C,D KOD pol
B_PPE53_R_Cla I	<u>ATCGATT</u> GCTGCGCTGAATCCG Cla I		
B_PPE70_F_HindIII	<u>AAGCTT</u> GTCATTGGCCGGGACG HindIII	1.96 kbp	E,F LA taq pol
B_PPE70_R_Cla I	<u>ATCGATA</u> CGTCGGGCTCGGTAG Cla I		
Ag_Area3_F (本論: Area 2)	<u>TCTAGA</u> CGCGCTCTGTTGCTCG Xba I	3.77 kbp	A,B (Buffer A)
Ag_Area3_R (本論: Area 2)	<u>AAGCTT</u> CGGCCACCTCGTTTGC HindIII		
Ag_Area4_R (本論: Area 3)	<u>TCTAGA</u> ACGACATGCCGGTGGAG Xba I	3.32 kbp	A,B (Buffer A)
Ag_Area4_R (本論: Area 3)	<u>AAGCTT</u> TCCAGCCAACCCGCTAC HindIII		
Ag_Area5_F (本論: Area 4)	<u>TCTAGA</u> ACCGCCGGTACAACGC Xba I	3.95 kbp	A,B
Ag_Area5_R (本論: Area 4)	<u>AAGCTT</u> ACCGGCGGATCAGCTC HindIII		
Ag_Area6_F (本論: Area 5)	<u>TCTAGA</u> GCGGGTAGCGGCATAGAC Xba I	2.40 kbp	A,B (Buffer A)
Ag_Area6_R (本論: Area 5)	<u>AAGCTT</u> CGCCGCCCTGCTATGAG HindIII		
Ag_Area7_F (本論: Area 6)	<u>TCTAGA</u> CCGGTGGCGTTGATGC Xba I	2.41 kbp	A,B (Buffer A)
Ag_Area7_R (本論: Area 6)	<u>AAGCTT</u> GCTCGCCGAGGTTATTGC HindIII		
Ag_Area8_F (本論: Area 7)	<u>GATATC</u> ATGTCGCCGGCCTGTC EcoRV	1.16 kbp	A,B (Buffer A)
Ag_Area8_R (本論: Area 7)	<u>TCTAGA</u> TAGAGTTCGCCGCCCTG Xba I		
Ag_Area9_F (本論: Area 8)	<u>TCTAGA</u> CGTAGCCCACCCTCTCC Xba I	2.08 kbp	A,B (Buffer A)
Ag_Area9_R (本論: Area 8)	<u>AAGCTT</u> GCGGTTGGGTGGACATC HindIII		

・ Area 3 に含まれる遺伝子群 (すべて pMV261 に導入)

Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR condition
B3184c_F_Cla I	<u>ATCGAT</u> GCTGGTTGGCGACCAC Cla I	0.69 kbp	A,B (Buffer A)
B3184c_R_Hpa I	<u>GTTAAC</u> TTTGC GCACGCCTAGAG Hpa I		
B3185c_F_HindIII	<u>AAGCTT</u> GCGCTGTTGACAATCGG HindIII	1.17 kbp	A,B (Buffer A)
B3185c_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> CCGGCAAGGCTAGCTG Cla I		
B3186c_F_HindIII	<u>AAGCTT</u> GCGAGGCTGCCATGAC HindIII	0.64 kbp	A,B (Buffer A)
B3186c_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> CTGCCACAGCTCCGATG Cla I		
B3187c_F_HindIII	<u>AAGCTT</u> TACGGCGCGATGTGATCC HindIII	1.30 kbp	A,B (Buffer A)
B3187c_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> GGGTGCGCAAACGAGG Cla I		

・ *BCG3185c* の histidine tag 融合翻訳産物作成用 (pRSET B に導入)

Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR condition
BCG3185_F_Kpn I	<u>GGTACCC</u> GCGCTGTTGACAATCG Kpn I	1.17 kbp	A,B
BCG3185_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> CCGGCAAGGCTAGCTG HindIII		

・PCR

PCR には、Roche の Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System, dNTPack を主に用いた。また PCR のテンプレートには *M. bovis* BCG より調製したゲノム DNA を用いた。PCR は A の条件で試薬を分注し、B の温度設定で行った。また必要に応じて Buffer を PCR Optimizer TM Kit (invitrogen) のものに代えて行った。

A :		B :		
primer_forward	1.0 μL	Temperature	time	cycle
primer_reverse	1.0 μL	94 °C	2 min	1
Template	1.0 μL	94 °C	15 sec	
5×buffer	10.0 μL	57 °C	30 sec	30
dNTPs	1.5 μL	68 °C	1~ 5.5 min*	
DMSO	5.0 μL	68 °C	10 min	1
Polymerase	0.5 μL	*増幅させる DNA の長さが 1 kb 未満の場合は 1 min、1kb では 1.5 min とし、それ以上の長さの場合は 0.5 kb 長くなる ごとに 0.5 min 増幅させた。		
H ₂ O	30.0 μL			
Total	50 μL/ tube			
		(ex. Ag_area3 DNA length 3.77 kb : 4.0 min)		

PPE53 遺伝子の PCR には TOYOBO の KOD^{Plus} を用いた。C の条件で試薬を分注し、D の温度設定で行った。

C :		D :		
primer_forward	1.0 μL	temperature	Time	cycle
primer_reverse	1.0 μL	94 °C	2 min	1
Template	1.0 μL	94 °C	15 sec	
PCR Buffer for KOD plus	5.0 μL	58 °C	30 sec	30
2mM dNTPs	5.0 μL	68 °C	2 min	
DMSO	5.0 μL	70 °C	10 min	1
KOD Polymerase	1.0 μL			
25mM MgSO ₄	2.0 μL			
H ₂ O	29.0 μL			
Total	50 μL/ tube			

PPE70 遺伝子の PCR には TAKARA の *LA Taq*®を用いた。E の条件で試薬を分注し、F の温度設定で行った。

E :		F :		
primer_forward	1.0 μ L	temperature	time	cycle
primer_reverse	1.0 μ L	94 $^{\circ}$ C	2 min	1
Template	1.0 μ L	98 $^{\circ}$ C	15 sec	
Buffer II (Mg^{2+} , free)	5.0 μ L	58 $^{\circ}$ C	30 sec	30
2.5mM dNTP mix	8.0 μ L	68 $^{\circ}$ C	2 min	
DMSO	4.0 μ L	70 $^{\circ}$ C	10 min	1
LA Taq polymerase	0.5 μ L			
25mM $MgCl_2$	5.0 μ L			
H ₂ O	24.5 μ L			
Total	50 μ L/ tube			

・ クローニング

1) PCR 産物の精製

PCR の反応液をそれぞれ電気泳動し、各 PCR 産物を agarose ゲルより切り出した。切り出したゲルブロックは、QIAquick Gel Extraction Kit により、以下の手順でゲルから溶出し、精製した。まずゲルブロックを 15 mL の遠沈管に移し、Buffer QC 600 μ L を添加後、50 $^{\circ}$ C で 10 分間加温することによりゲルブロックを溶解した。次に 2-propanol 200 μ L を添加し転倒混和した後、QIAquick カラムに共し、12000 rpm で 1 分間遠心することによりカラムに PCR 産物を吸着させた。次に Buffer QC 600 μ L を添加して 12000 rpm で 1 min 遠心分離した。さらに Buffer PE 750 μ L を添加後 3~4 分間室温放置し、12000 rpm で 1 分間の遠心分離を 2 回行うことにより PCR 産物を洗浄した。最後に 20~50 μ L の滅菌蒸留水を加えて 5 分間室温放置し、12000 rpm で 1 分間遠心分離することにより目的の PCR 産物を精製した。

2) PCR 産物のシーケンシングベクターへのクローニング

得られた PCR 産物は、TA クローニング (TOYOBO TArget Clone™ -Plus-kit)を行った。ライゲーションは A の組成でライゲーション液を調製し、室温で 30 分反応させた。

A:	PCR 産物	3 μ L
	2x Ligation Buffer	5 μ L
	pTA2 Vector (50 ng/ μ l)	1 μ L
	T4 DNA Ligase	1 μ L

次に、ライゲーション反応液を *E. coli* DH5 α コンピテントセル (TOYOBO) 100 μ L に添加し、30 分間氷冷した。42°C で 45 秒間加温することで形質転換後、直ちに 3 分間氷冷した。次に LB 培地 800 μ L を加え、37°C で 1 時間震盪培養後、50 μ L の X-gal (40 mg/mL, invitrogen) を塗布した 100 μ g/mL の ampicillin を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。生育した白色コロニーを、ampicillin 100 μ g/mL を含む LB 培地 5 mL に植菌し、37°C で一晩培養した。

3) *E. coli* DH5 α からのプラスミドの抽出

培養した *E. coli* DH5 α の形質転換株 5 mL を、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) のプロトコールに従い、菌体を buffer P1 250 μ L に懸濁後、あらかじめ 250 μ L の buffer P2 を分注しておいたエッペンドルフチューブに移し入れ、5 分間室温放置することによりアルカリ溶菌させた。次に buffer P3 350 μ L を加え中和し、15000 rpm で 10 分間遠心分離することによりたんぱく質画分およびゲノム DNA を沈殿させた。得られた上清に等量の 2-propanol を加え、12000 rpm で 30 分間遠心分離した。得られたペレットを 70% EtOH aq. で洗浄し、10 分間風乾させたのち、50 μ L の 滅菌蒸留水を加えることでプラスミド溶液を得た。

4) シーケンシング

シーケンス解析は北海道システム・サイエンスに委託した。

シーケンス Primer には M13F (5'- GTAAAACGACGGCCAGT -3') および M13R (5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3') を用いた。シーケンス結果は、GenoList Genome Browser のゲノムデータベース (<http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>) により、変異の有無を確認した

5) *Mycobacterium* 用発現ベクターへのサブクローニングと形質転換株の作成

前述 4) において変異が認められなかったプラスミドを、プライマー内に設計した制限酵素 (NEB) で処理した。次に、反応液を 1) と同様に電気泳動し、遺伝子断片を抽出、精製し

た。また *Mycobacterium* 用発現ベクター pMV261 または pMV206 についても同様に制限酵素処理後、抽出、精製した。

ライゲーションには T4 DNA ligase (TaKaRa) を用いた。調製した pMV261 または pMV206 および各 DNA 断片を下の条件で混和し、室温で 30 分反応させた。

制限酵素処理した DNA 断片	16 μ L
制限酵素処理した pMV261 or pMV206	1 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
10 \times T4 ligase buffer	2 μ L
Total	20 μ L

続いて、反応液 10 μ L を使用し、*E.coli* DH5 α を形質転換した。pMV261 へ ligation したサンプルは kanamycin (40 μ g/mL)、pMV206 へ ligation したサンプルは hygromycin B (100 μ g/mL) を含む LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C、24 時間培養することにより形質転換株を得た。次に各形質転換株を kanamycin (20 μ g/mL) または hygromycin B (100 μ g/mL) を含む LB 培地 5 mL で培養し、プラスミドを抽出した。このプラスミドを用いて、エレクトロポレーション法により *M. smegmatis* を形質転換することで、各ゲノムを高発現する形質転換株を作成した。

・ ゲノム高発現株のスクリーニング

作成した各ゲノムの高発現株を抗生物質を含む Middlebrook 7H9 培地で培養後、 1.0×10^6 CFU/mL の菌液を作成し、agelasine D (4) を含む Middlebrook 7H10 寒天培地に 10 μ L 塗布した。そして、37 $^{\circ}$ C で 5 日間培養し生育の有無を確認した。

・ BCG3185c 高発現株の agelasine D (4) 代謝速度の検討

Wild-type の *M. smegmatis* および BCG3185c 高発現株 (Strain 20) をそれぞれ Middlebrook 7H9 培地で 1.0×10^8 CFU/mL に調整した。次に agelasine D (4) を MIC の半分量 (0.4 μ g/mL) 加え、37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。経時的にそれぞれ菌液を採取し OD₆₀₀ を測定した。そして、内部標準として rifampicin を終濃度 500 μ g/mL となるよう加え、その後 3000 rpm で 20 分遠心分離を行った。得られた菌体を PBS で洗浄後、10 mL の MeOH に懸濁した。次に懸濁液を 15 分間超音波処理し、3000 rpm で 20 分遠心分離後、上清を回収し、沈殿は再度 10 mL の acetone に懸濁した。これを 15 分間超音波処理し、遠心分離したのち、上清を回収した。得られた MeOH 抽出液と acetone 抽出液を混合し、減圧乾固後、200 μ L の MeOH に溶解させ HPLC 分析用のサンプルとした。菌体に含まれる agelasine D

(4)量は HPLC チャートから得られた agelasine D (4)のピークの面積と rifampicin のピークの面積の比から算出した。

・ 表面プラズモン共鳴法を用いた *BCG3185c* 翻訳産物と agelasine D (4)との親和性の検討

1) Histidine tag 融合タンパク質発現用ベクターへの *BCG3185c* 遺伝子のクローニング

M. bovis BCG ゲノムをテンプレートとして、前述のプライマーBCG3185_F_Kpn I および BCG3185_R_HindIIIを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物は TA クローニングを行ったのち、その配列を確認した。次に、目的遺伝子をクローニングしたプラスミドを制限酵素 Kpn I (NEB)および HindIII(NEB)で処理し、酵素反応液を電気泳動し、遺伝子断片を抽出、精製した。また Histidine tag 融合タンパク質発現用ベクターpRSET B (invitrogen)についても同様に制限酵素処理後、抽出、精製した。

ライゲーションには T4 DNA ligase (Takara)を用いた。調製した pRSET B および DNA 断片を下の条件で混和し、室温で 30 分反応させた。

制限酵素処理した DNA 断片	16 μ L
制限酵素処理した pRSET B	1 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
10×T4 ligase buffer	2 μ L
Total	20 μ L

次に反応液 10 μ L を使用し、*E.coli* DH5 α をヒートショック法で形質転換した後、ampicillin (100 μ g/mL)を含む LB 寒天培地に塗布し、37°C で 24 時間培養することにより形質転換株を得た。次に形質転換株を ampicillin (100 μ g/mL)を含む LB 培地 5 mL で培養し、プラスミドを抽出した。このプラスミドを用いて、タンパク質発現用 Lemo 21(DE3) competent *E. coli*をヒートショック法で形質転換することで、*BCG3185c* の histidine tag 融合翻訳産物を産生する形質転換株を作成した。この形質転換株は chloramphenicol (30 μ g/ mL)と ampicillin (100 μ g/ mL)を含む LB 培地で培養したものを glycerol と混和し-80°C で保存した。

2) *BCG3185c* 遺伝子の histidine tag 融合翻訳産物の精製

1)で作成した形質転換株を 5 mL の SOB 培地を含む Falcon™ ラウンドチューブ(BD)に 1 μ L 植菌し、37°C で 16 時間振盪培養した。次に、50 mL の SOB 培地を含むマイヤーに培

養液を 1 mL 植菌し、*L*-rhamnose を 750 μ M となるよう添加し、20℃で 6 時間振盪培養した(OD₆₀₀ ~0.4)。続いて IPTG を 400 μ M となるよう添加し、48 時間培養することで *BCG3185c* 遺伝子の histidine tag 融合翻訳産物を産生させた。培養後、3500 rpm で 5 分間遠心分離し、ペレットを 10 μ M の (AcO)₂Mg を加えた HBS solution (GE) に懸濁させ、SONICS 社製 VC-750 にテーパーマイクロチップ 1/4 インチ(6 mm)を接続し、40%の出力で 5 秒×3 回超音波処理することで細胞を破砕した。続いて 15000 rpm で 5 分遠心分離し、上清をタンパク質溶液として回収した。

次に、タンパク質溶液に 5 mM になるよう imidazole を添加したのち、コバルトキレート樹脂である Clontech 社製 TALON® Metal affinity resin をタンパク質溶液に 500 μ L 加え、シェーカーを用いて 4℃で 1 時間混和した。続いて 5 mM imidazole (HBS) solution 500 μ L で樹脂を 2 度洗浄し、50 mM と 150 mM の imidazole(HBS) solution により樹脂から histidine tag 融合タンパク質を溶出させた。SDS-PAGE を用いてタンパク質の純度を確認し、150 mM imidazole の溶出画分を表面プラズモン共鳴法での検討に用いた。また、Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (Thermo)を用いた透析法によりタンパク質溶液から塩類を除去した。このタンパク質溶液のタンパク質濃度を Bio-Rad Protein Assay reagent を用いて測定したところ、60 μ g / mL であった。

・ 表面プラズモン共鳴法を用いた結合親和性の算出

センサーチップには Series S Sensor chip NTA (GE)を使用し、HBS-P with 50 μ M EDTA を buffer として用いた。まず、マニュアル操作にて NTA reagent kit (GE)に付属する 350 mM EDTA 溶液を Flow rate 30 μ L / min、contact time 1 min で流し、続いて 500 μ M NiCl₂ solution を 10 μ L / min、1 min 流してチップに Ni をキレートさせた。次に、調整したタンパク質溶液 (60 μ g / mL)を 10 μ L / min、3 min 流すことで Histidine tag 融合タンパク質をチップにキレートさせた (RU \approx 3000)。そして、チップ表面が安定化するまで 2 時間 stand by 状態で buffer を流し続けた。安定化後、ウィザードモードにおいて agelasine D (4)もしくは streptomycin (それぞれ 0.63 μ g/mL から 0.08 μ g / mL の濃度域で 6 点測定)を流し、*BCG3185c* 遺伝子の Histidine tag 融合翻訳産物との結合親和性を算出した。

第四章の実験

第四章 第一節の実験

・海綿 *Melophlus* sp.からの melophlin 類の単離

2010 年、インドネシア ビアック島で採集した海綿 *Melophlus* sp.の MeOH 抽出エキス (52 g)を酢酸エチルと水で分配した後、酢酸エチル層 (9.6g)を SiO₂ open column chromatography (CHCl₃ : MeOH : H₂O, lower phase = 100 : 3 : 1 → 40 : 3 : 1 → 10 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1 → MeOH)で Fr. A-1~A-12 に分画し、続いて Fr. A-5 (1.2 g)を HPLC (Cosmosil 5C₁₈ MS-II (10 mm i.d. × 250 mm, 92%MeOH aq. + 0.1% TFA, UV = 280 nm, Flow rate 3 mL / min)で Fr. B-1~15 に分画することで Fr. B-7 として melophlin G (6) (6.6 mg)を、Fr. B-14 として Melophlin A (5) (42 mg)を単離した。続いて Fr. B-9 を HPLC (Cosmosil Cholesterol (10 mm i.d. × 250 mm, 78%MeCN aq. + 0.1% TFA, UV = 220 nm, Flow rate 3 mL / min)で精製することにより、melophlin I (8) (18 mg), melophlin H (7) (6.6 mg)をそれぞれ単離した。

Melophlin A (5) : ESI-TOF-MS m/z : 374 [M+Na]⁺

¹H NMR(CDCl₃) : δ 3.69 (2H, s), 3.00 (3H, s), 2.79 (2H, t, J = 7.3 Hz), 1.65 (2H, m), 1.25 (2H, m), 1.20-1.35 (20H, m), 0.85 (3H, t, J = 6.7 Hz)

Melophlin G (6) : ESI-TOF-MS m/z : 346 [M+Na]⁺

¹H NMR(CDCl₃) : δ 3.71 (2H, s), 3.01 (3H, s), 2.81 (2H, t, J = 7.6 Hz), 1.64 (2H, m), 1.20-1.38 (20H, m), 0.87 (3H, t, J = 6.9 Hz)

Melophlin H (7) : ESI-TOF-MS m/z : 360 [M+Na]⁺

¹H NMR(CDCl₃) : δ 3.71 (2H, s), 3.01 (3H, s), 2.81 (2H, t, J = 7.6 Hz), 1.64 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.20-1.39 (18H, m), 0.86 (6H, t, J = 6.6 Hz)

Melophlin I (8) : ESI-TOF-MS m/z : 360 [M+Na]⁺

¹H NMR(CDCl₃) : δ 3.71 (2H, s), 3.01 (3H, s), 2.81 (2H, t, J = 7.6 Hz), 1.65 (2H, m), 1.12-1.39 (19H, m), 0.85 (3H, t, J = 7.3 Hz), 0.83 (3H, d, J = 6.3 Hz)

ゲノム DNA ライブラリーを用いた melophlin A (5) の標的遺伝子候補領域の解明

・ ゲノム DNA ライブラリー形質転換株からの melophlin A (5) 耐性株の選択

第三章 第二節と同様の手順で、約 4000 の形質転換株を、1 クローンずつ hygromycin B 50 µg/mL を含む寒天培地および melophlin A (5) 0.8 µg/mL を含む寒天培地に分離、塗布し、両プレート上で生育するクローンをスクリーニングした。ただし、melophlin A (5) を含む寒天培地には propionate 培地に 2% の agar (Nacalai tesque) を加え、固化させたものを使用した。得られた耐性株は hygromycin B を含む Middlebrook 7H9 培地で培養後、-80℃ で保存した。また、耐性株からのコスミド DNA の分離とシーケンス解析は第三章 第二節と同様の手順で行った。

ゲノム高発現株の作成

・ プライマーの設計

PCR には、以下のプライマーを用いた。またプライマーの合成は北海道システム・サイエンス社に委託した。

・ 耐性株のコスミドから得られた melophlin A (5) の標的遺伝子候補領域の分割ゲノム(mfd は pMV261、その他 Area は pMV206 に導入)

Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR condition
mfd_F_HindIII	<u>AAGCTT</u> ATGCGCCGATCATGACC HindIII	3.91 kbp	A,B
mfd_R_Cla I	<u>ATCGATT</u> GCGCCGAACGAGC Cla I		
2MELarea1_F_Xba I	<u>TCTAGAT</u> GCGGAAGGCTTGGTG Xba I	3.40 kbp	A,B (Buffer B)
2MELarea1_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> AACCGCGCTCGCTG HindIII		
2MELarea2_F_Xba I	<u>TCTAGA</u> ATGCGGCGGGTCATC Xba I	3.55 kbp	A,B (BufferC)
2MELarea2_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> ACGCGTGTGGCAGATG HindIII		
2MELarea3_F_Xba I	<u>TCTAGAC</u> CCGGCAAAGGCCATC Xba I	3.43 kbp	A,B
2MELarea3_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> AGCGGAAACGCCTGTGHi HindIII		

2MELarea4_F_Xba I	<u>TCTAGAC</u> GGGCTTTGCCTGCTC Xba I	1.99 kbp	A,B
2MELarea4_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> AGCGAGCGCTTGGC HindIII		
8MELarea1_F_Xba I	<u>TCTAGAC</u> CGCGCTAGCTGGCATC Xba I	2.75 kbp	A,B (Buffer A)
8MELarea1_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> TGGTCAGTCGGGCACAG HindIII		
8MELarea2_F_Xba I	<u>TCTAGAC</u> GATCGCCCGCAAGAC Xba I	4.46 kbp	A,B (Buffer C)
8MELarea2_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> TGGCGGTCAGCTGGTC HindIII		
8MELarea3_F_Kpn I	<u>GGTACCA</u> ACCGCAACCGGTCAAC Kpn I	4.63 kbp	A,B (Buffer D)
8MELarea3_R_Xba I	<u>TCTAGAG</u> GCCGGTCTTCGGATG Xba I		
8MELarea4_F_Xba I	<u>TCTAGAT</u> CGCGCTGCAACACC Xba I	3.25 kbp	A,B (Buffer A)
8MELarea4_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> ATCCGCGCCTGTGC HindIII		
8MELarea5_F_EcoRV	<u>GATATCA</u> ACGGGCGGATGTCG EcoRV	3.72 kbp	A,B
8MELarea5_R_Xba I	<u>TCTAGAT</u> CGCCGCCAAGATCG Xba I		
8MELarea6_F_EcoRV	<u>GATATCG</u> CGTGCCGAGATCCTG EcoRV	3.42 kbp	A,B
8MELarea6_R_Xba I	<u>TCTAGA</u> ACCGCCGAATGCGTC Xba I		
8MELarea7_F_Xba I	<u>TCTAGAG</u> GGCACCCACGAAACG Xba I	4.75 kbp	A,B (Buffer A)
8MELarea7_R_HindIII	<u>AAGCTT</u> AGCGCGGTTTCAGGTG HindIII		

・ 8MEL-area4 および 2MEL-area2 に含まれる遺伝子群 (pMV261 に導入)

Primer name	Sequences (5'-3')	Gene length	PCR condition
BCG1317_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CCCGCGGTTGCTGTTTCTC EcoR I	0.90 kbp	A,B
BCG1317_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> CACTGGCGCCGGAAC Cla I		
BCG1318_F_EcoR I	<u>GAATT</u> TCTGGCCGGGATTGAGTGAC EcoR I	0.83 kbp	A,B
BCG1318_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> CAACGAGCGCTACCCTG Cla I		
BCG1319_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CGCAGCGCACCGGATTTC EcoR I	0.31 kbp	A,B
BCG1319_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> AGCGCCATCCTGGCTG Cla I		
BCG1320_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CCTGCGCAAGACTGACCC EcoR I	0.45 kbp	A,B
BCG1320_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> CTCGACGCGCAGAAGC Cla I		
BCG1321c_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CATGCCCTGCGTGTTCTG EcoR I	0.44 kbp	A,B
BCG1321c_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> GCGCTCAAGCCATCGG Cla I		
BCG1081_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CATGCCCCGAAGCGAAACG EcoR I	0.69 kbp	A,B
BCG1081_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> GAGTTGCCGCGTGACC Cla I		
BCG1082_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CGTGGTACGCGGCAAC EcoR I	0.47 kbp	A,B
BCG1082_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> GGGTTAGCGCCACTGC Cla I		
BCG1083_F_EcoR I	<u>GAATT</u> CGCAGTGGCGCTAACCC EcoR I	0.96 kbp	A,B
BCG1083_R_Cla I	<u>ATCGAT</u> ACGCGTGTGGCAGATG Cla I		

・ PCR

PCR には、Roche の Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System, dNTPack を用いた。また PCR のテンプレートには *M. bovis* BCG より調製したゲノム DNA を用いた。PCR は A の条件で試薬を分注し、B の温度設定で行った。また Buffer を PCR OptimizerTM Kit (invitrogen) のものに代えた場合、PCR condition にそれを示した。

A :		B :		
primer_forward	1.0 μL	temperature	time	cycle
primer_reverse	1.0 μL	94 °C	2 min	1
Template	1.0 μL	94 °C	15 sec	
5×buffer	10.0 μL	57 °C	30 sec	30
dNTPs	1.5 μL	68 °C	1~ 5.5 min*	
DMSO	5.0 μL	68 °C	10 min	1
Polymerase	0.5 μL			
H ₂ O	30.0 μL			
Total	50 μL/ tube			

*増幅させる DNA の長さが 1 kb 未満の場合は 1 min、1 kb 以上 1.5 kb 未満の場合は 1.5 min とし、それ以上の長さの場合は 0.5 kb 長くなるごとに 0.5 min 増幅させた。
(ex. Ag_area3 DNA length 3.77 kb : 4.0 min)

・ クローニング

PCR 産物の精製、シーケンシング、*Mycobacterium* 用発現ベクターへのサブクローニングと形質転換株の作成は、すべて第三章 第二節と同様の手順で行った。

・ ゲノム高発現株のスクリーニング

作成した各ゲノムの高発現株を抗生物質を含む Middlebrook 7H9 培地で培養後、1.0×10⁶ CFU /mL の菌液を作成し、melophlin A (5)を含む propionate 寒天培地に 10 μL 塗布した。そして、37℃で 3 日間培養し生育の有無を確認した。

引用文献

- 1) World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2009.
- 2) Saunders, B. M.; Britton, W. J. *Immunol. Cell. Biol.* **2007**, *85*, 103.
- 3) Manabe, Y. C.; Bishai, W. R. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1327.
- 4) Corbett, E. L.; Watt, C. J.; Walker, N.; Maher, D.; Williams, B. G.; Raviglione, M. C.; Dye, C. *Arch. Intern. Med.* **2003**, *163*, 1009.
- 5) Marwar, A.; Shaker, A. I.; Palawan, H.; Nanadal.; Ranjith, M. S.; Gokulshankar. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* **2011**, *2*, 27.
- 6) Wayne, L. G.; Sohaskey, C. D. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 139.
- 7) Arai, M.; Soubou, M.; Vilcheze, C.; Baughn, A.; Hashizume, H.; Pruksakorn, P.; Ishida, S.; Matsumoto, M.; Jacobs Jr, W. R.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6732.
- 8) Aoki, S.; Watanabe, Y.; Sanagawa, M.; Setiawan, A.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3148.
- 9) Pruksakorn, P.; Arai, M.; Kotoku, N.; Vilcheze, C.; Baughn, A. D.; Moodley, P.; Jacobs Jr, W. R. ; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. ChemLett.* **2010**, *20*, 3658.
- 10) Wayne, L. G.; Hayes, L. G. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 2062.
- 11) Sassetti, C. M.; Rubin, E, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12989.
- 12) a) Munoz-Elias, E. J.; Upton, A. M.; Cherian, J.; McKinney, J. D. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 1109.
b) McKinney, J. D.; Bentrup, K. H.; Munoz-Elias, E. J.; Miczak, A.; Chen, B.; Chan, W. T.; Swenson, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs Jr, W. R.; Russel, D. G. *Nature* **2000**, *406*, 735.
- 13) (a) Masiewicz, P.; Brzostek, A.; Wolanski, M.; Dziadek, J.; Czerwinska, J. Z. *PLOS ONE*, **2012**, *7*, e43651. (b) Bentrup, K. H.; Miczak, A.; Swenson, D. L.; Russell, D. G. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 7161.
- 14) Bruckner, H.; Keller-Hoehl, C. *Chromatographia* **1990**, *30*, 621.
- 15) Kinoshita, T.; Kasahara, Y.; Nimura, N. *J. Chromatogr.* **1981**, *210*, 77.
- 16) Zampella, A.; D'Auria, M. V.; Gomez-Paloma, L.; Casapullo, A.; Minale, L.; Debitus, C.; Henin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6202.

- 17) a) Nakamura, H.; Wu, H.; Ohizumi, Y.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2989. b) Hertiani, T.; Edrada-Ebel, R.; Ortlepp, S.; Soest, R. W. M.; Voogd, N. J.; Wray, V.; Hentschel, U.; Kzytska, S.; Muller, W. E. G.; Proksch, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1297.
- 18) Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Sun-Um K.; Wilson T.; Collins D.; Lisle, G.; Jacobs Jr, W. R. *Science*, **1994**, *263*, 227.
- 19) (a) Aoki, S.; Higuchi, K.; Ye, Y.; Satari, R.; Kobayashi, M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1833. (b) Wang, C. Y.; Wang, B. G.; Wiryowidagdo, S.; Wray, V.; Soest, R.; Steube, K. G.; Guan, H. S.; Proksch, P.; Ebel, R. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 51.
- 20) (a) Miyake, T.; Shiba, T.; Kameda, A.; Ihara, Y.; Munekata, M.; Ishige, K.; Noguchi, T. *DNA res.* **1999**, *6*, 103. (b) Kim, K. S.; Rao, N. N.; Fraley, C. D.; Kornberg, A. *PNAS* **2002**, *99*, 7675.
- 21) Bieganowski, P.; Garrison, P. N.; Hodawadekar, S. C.; Faye, G.; Barnes, L. D.; Brenner, C. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10852.
- 22) Knoth, T.; Warburg, K.; Katzka, C.; Rai, A.; Wolf, A.; Brockmeyer, A.; Janning, P.; Reubold T. F.; Eschenburg, S.; Manstein, D. J.; Hubel, K.; Kaiser, M.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7240.

