

氏名	はしもとせいじ 橋本正治
学位の種類	農学博士
学位記番号	論農博第1679号
学位授与の日付	平成3年5月23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	Studies on New Dehydropeptidase Inhibitors from <i>Streptomyces</i> (放線菌の生産する新規デヒドロペプチダーゼ阻害物質に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 駒野 徹 教授 藤田 稔夫 教授 谷 吉樹

論文内容の要旨

ペニシリン、セファロスポリンに継ぐ第3の β -ラクタム抗生物質であるカルバペネムは、幅広い抗菌スペクトル、強い抗菌力、 β -ラクタマーゼに対する強い抵抗性などを有しているため、新薬作出を目指した多くの研究がなされてきた。しかし、動物由来の酵素デヒドロペプチダーゼ-I (DHP) による分解を受けやすいことが本薬剤開発の妨げとなっていた。これを解決する方策の1つは、DHP阻害剤と併用することである。本研究は、微生物の培養液から新規DHP阻害剤を単離することを目的として行った研究成果をとりまとめたものである。

著者は日本各地の土壌より分離したカビ約5000株、放線菌約16000株の培養液をスクリーニングした結果、栃木市の土壌から分離した放線菌の培養液中に強いDHP阻害活性物質が生産されることを見いだした。生産菌は、形態学的観察、生理学的性質、炭素源資化能及び細胞壁構成成分の分析などから、*Streptomyces parvulus* subsp. *tochigiensis* No. 1358 と同定された。生産される阻害物質はA1、B1の2成分であった。阻害活性が強いA1は、培養液中に約 $3\mu\text{g/ml}$ しか生産されないため夾雑物との分離は困難であったが、酸性及びアルカリ性で容易に可逆的化学変換を起こす性質を利用して単離・精製に成功した。

次に著者はこれらの物質について化学構造の解析を行っている。A1及びB1は塩化鉄呈色反応陽性であったことからヒドロキサム酸の存在が示唆された。ヒドロキサム酸のカルボニル炭素は、通例 ^{13}C NMRスペクトルにおいて、対応するカルボン酸のカルボニル炭素より高磁場に現れることを考慮し、B1の ^{13}C NMRスペクトルの結果からB1の平面構造を2-hydroxy-2-hydroxyaminocarbonylglutaric acid と推定した。この推定構造式はアクリル酸メチルとマロン酸ジメチルのMichael縮合物を過酸化ベンゾイルで酸化したのち、ヒドロキシルアミンで処理して得られた合成ラセミ体との比較により確認することができた。A1の構造はB1との比較から2-hydroxy-2-hydroxyaminocarbonyl-3-methylglutaric acid と推定した。この物質もB1と同様に合成ラセミ体との比較により確認することができた。またA1の光学異性体の全合成の結果天然物の3位はR配位であることが確認された。

得られたA1及びB1の種々の動物由来のDHP粗酵素に対する合成ペプチドを基質としたときの IC_{50}

は、それぞれ0.003~0.04及び0.6~2.7 μ Mであった。A1, B1はDHP以外の亜鉛金属酵素であるカルボキシペプチダーゼAとロイシンアミノペプチダーゼに対しては100 μ Mの濃度でも阻害しなかった。A1存在下に精製DHPを合成基質及びイミペネム(IPM)に作用させたときの反応速度の解析から、阻害様式は拮抗型阻害であり、 K_i 値はそれぞれ 2×10^{-9} , 1.6×10^{-7} Mであった。マウスにIPMをA1と併用投与すると、IPM尿中回収率は上昇し、黄色ブドウ球菌感染治療実験でED₅₀は10分の1以下まで下がった。これはA1が生体内でもDHPを阻害し、IPMの分解を防ぐことにより、黄色ブドウ球菌殺菌に十分なIPMの血中、組織内濃度が維持されるためと考えられる。

A1は酸性ではプチロラクトン型のA2とN-ヒドロキシグルタールイミド型のA3の3つの構造をとる。アルカリ性ではA3は加水分解によりA1に変換され、A2はA3を経由してA1になる。A3からの変換で生成する物質はほぼA1のみであるため、化学的に合成が容易なA3から高収率でA1ラセミ体を工業的に生産することが可能となった。

論文審査の結果の要旨

抗生物質の作用は種々の要因で効力が低下するが、この原因を解明して効力を持続させることは重要である。本論文において、著者はカルバペネム系抗生物質が動物由来の酵素デヒドロペプチダーゼ-I(DHP)で容易に分解されて効力を失うことから、DHP阻害剤を微生物の培養液から単離し、その構造を明らかにするとともに、実際の治療において効果のあることについて述べている。その内容を要約すれば次のとおりである。

1. DHP阻害物質の生産菌は形態学的観察、生理学的性質、炭素源資化能及び細胞壁構成成分の分析などから、*Streptomyces parvulus* subsp. *tochiensis* No.1358と同定された。本菌による培養液中への阻害物質の生産量は低く、培地成分との分離は通常の方法では困難であったが、阻害物質の可逆的変換を起こす性質を利用して単離・精製に成功した。

2. 阻害物質にはA1及びB1の2種類が存在し、化学構造はそれぞれ2-hydroxy-2-hydroxyamino-carbonyl-3-methylglutaric acid及び2-hydroxy-2-hydroxyaminocarbonylglutaric acidと同定された。また光学異性体の全合成にも成功した。本研究で見いだされたこれらの物質は、低分子であるにもかかわらず多くの官能基をもつことを特徴とする新規化合物であった。

3. A1及びB1はDHP以外の亜鉛金属酵素であるカルボキシペプチダーゼAやロイシンアミノペプチダーゼなどを阻害しなかったことから、DHPに特異的な阻害剤であり、また高度に精製したDHPを用いた酵素学的研究により、これらの物質の阻害様式は拮抗型阻害であることを明らかにした。これらの物質はマウスの体内でもDHPを阻害したことから、カルバペネム系抗生物質の酵素による分解を防ぐことにより、感染治療効果を高めることを実証した。

4. A1は酸あるいはアルカリ処理で可逆的に化学変換を起こすことが明らかとなった。この化学変換を利用することにより著者はラセミ体の工業的合成に成功した。

以上のように本論文は、カルバペネム系抗生物質を分解するDHPの阻害剤について構造を明らかにするとともに、生体内における効果についても解明し、さらに工業的全合成を可能にしたもので、微生物生

化学，生物有機化学の発展に寄与するところが大きい。

よって，本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお，平成3年3月23日，論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果，農学博士の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。