

氏名	坂田 一樹		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	工第180号		
学位授与の日付	平成22年3月23日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Suppression of SOS-inducing activity of chemical mutagens by metabolites from microbial transformation of polycyclic sesquiterpenoids with a longifolene skeleton (Longifolene 骨格を有するセスキテルペノイドの微生物変換と抗変異原性に関する研究)		
論文審査委員(主査)	教授	宮澤	三雄
(副主査)	教授	松原	凱男
(副主査)	准教授	石船	学

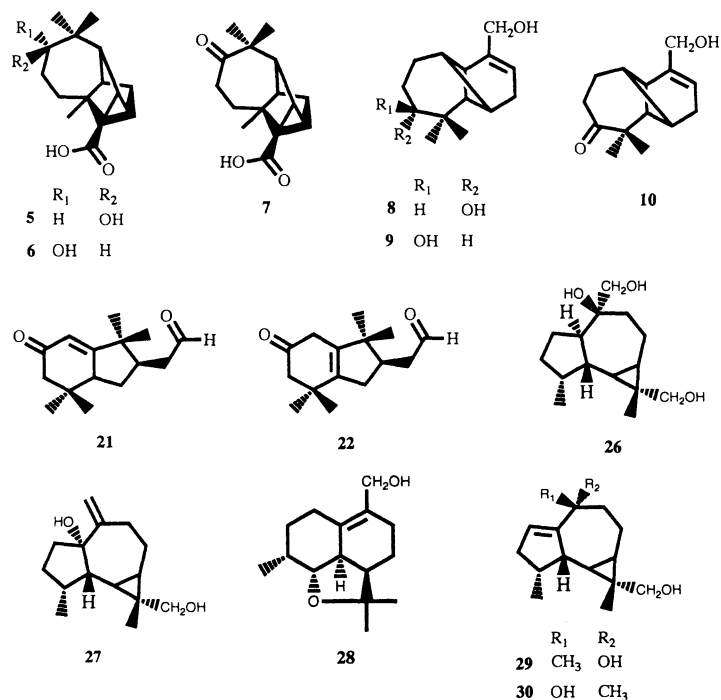
本研究は、新規天然型物質生産方法として微生物を用いた生物変換反応を行い、その反応特性を明らかにすると共に、がん発生のイニシエーション過程を抑制する有用な天然型抗変異原物質の探索、生産を目的に以下の二章からなる研究を行っている。第一章では、aromadendraneおよび、longifolene 骨格を有するセスキテルペノイドの微生物を用いた生物変換による有用物質の産出、変換反応の特異性について検討を行っている。また、第二章では、第一章で単離精製したlongifolene骨格を有する変換物の抗変異原性試験の結果について明らかにし、強い活性が見出された抗変異原物質の作用機序についても検討を加えている。

第一章では、生体触媒としてコウジカビの一種である *Aspergillus niger* を用いた変換反応について検討を行っている。基質は、(+)-longifolene (1), (+)-longicyclene (2), (+)- α -longipinene (3)の3種であり、化合物1を基質とした変換反応においては、単一の化合物 3-oxoisolongifolol (4)へと変換されることを明らかにしている。また、化合物2および3からは、それぞれ3種の新規天然型物質の生産に成功しており、その構造は、(-)-(10R)-10-hydroxy-longicyclic acid (5), (+)-(10S)-10-hydroxy-longicyclic acid (6), (+)-10-oxo-longicyclic acid (7), (+)-(5S)-5,12-dihydroxy- α -longipinene (8), (-)-(5R)-5,12-dihydroxy- α -longipinene (9), (+)-12-hydroxy- α -longipinene-5-one (10)であると決定している。*A. niger*を生体触媒として用いた変換反応は7員環geminal dimethylの α 位、末端メチルへの酸化反応が *A. niger*における位置特異的酸化部位であることを明らかにしている。

炭疽病原菌 *Glomerella cingulata*を用いた変換反応においては、基質として (+)-cycloisolongifolol (11), (-)-isolongifolol (12), (-)-isolongifolene (13)の3種類について検討しており、化合物11においては、*G. cingulata*の変換反応では珍しい脱水反応が進行し、3日間で70%をこえる高変換率で(+)-dehydrocycloisolongifolene (14)を特異的に生成する事を明らかにしている。化合物12における変換反応では、3位、9位にそれぞれ位置及び立体選択的な水酸化を受けた(-)-(3R)-3-hydroxy-isolongifolol (15), (-)-(9R)-9-hydroxy-isolongifolol (16) が生成することを明らかにしている。化合物13の変換反応においては、3種の変換物が生成していることを明らかにし、化学構造については(-)-isolongifolen-9-one (17), (-)-(2S)-13-hydroxy-isolongifolen-9-one (18), (-)-(4R)-4-hydroxy-isolongifolen-9-one (19)であると決定している。さらに、化合物17について *G. cingulata*による変換反応を行っており、5種の変換生成物へと変換されることを明らかにしている。これらの化学構造は、13を基質としたときと同様の変換物である18および19さらに、化合物18の立体異性体である(-)-(2R)-12-hydroxyisolongifolene-9-one (20) さらに開環反応が進行した2種の新規天然型化合物、(-)-(2R,3aR)-2-(2-oxoethyl)-3a,4,5,6-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethyl-indan-6-one (21), (+)-(2R)-2-(2-oxoethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethyl-indan-6-one (22) の生成に成功しており、*G. cingulata*における変換反応では、一般的な酸化反応だけでなく、還元や開環といった様々な反応を触媒する事を明らかにしている。

また、*A. wentii*を生体触媒とした微生物変換について検討を行っている。基質としては(+)-aromadendrene (23), (-)-alloaromadendrene (24), (+)-ledene (25)の3種のaromadendrane型セスキテルペノイドを用い、変換反応により5種の新規天然型物質の生産に成功している。

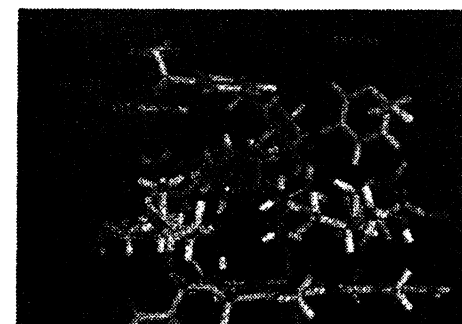
化合物23, からは(-)-(10S, 11S)-10, 13, 14-trihydroxy-aromadendrane (26)、24における変換では、(+)-(1S, 11S)-1, 13-dihydroxy-aromadendrene (27)、(-)-5, 11-epoxycadin-1(10)-en-14-ol (28)、25からは24と同様の変換物である28および、エピマー体である、(+)-(10R, 11S)-10, 13-dihydroxy-aromadendr-1-ene (29)、(+)-(10S, 11S)-10, 13-dihydroxy-aromadendr-1-ene (30)を生成することを明らかにしている。



第二章では、第一章で得られたlongifolene骨格を有する変換生成物の抗変異原性についてumuテストを応用した抗変異原性アッセイを用いて変異原物質アフラトキシンB1におけるSOS誘導抑制効果検討を行っている。アッセイはlongifolene骨格を有する化合物14種、1-7, 10, 11, 13, 14, 17-19を用いて検討を行い、最も抑制効果が強い化合物17は0.50 mMで50%の抑制効果を有していることを明らかにしている。

また、化合物4, 7および11においては1.0 mMの濃度でそれぞれ53%, 51%, 56%の抑制効果を示し、そのIC₅₀値は0.96 mM, 0.76 mM, 0.52mMであると明らかにしている。化合物2, 5, 6は先の4つよりは抑制効果が弱いものの、1.0 mMの濃度でそれぞれ約40%程度の抑制率を有することを明らかにしている。また、AFB1は人肝臓内に存在する異物代謝酵素であるcytochrom P450 3A4 (CYP3A4)によりAFB1-8, 9-exo-epoxideへと代謝され、グアニンのN7位にAFB1-DNA付加体を形成することで発ガン性を示すとされていることからこれらlongifolene誘導体はCYP3A4の阻害を行い、AFB1の活性化を抑制しているものと考え、一番抑制効果が強かった化合物17において阻害機構について検討している。その結果、Lineweaver-Burkプロット法による阻害形式の検討を行い、17は酵素とも酵素-基質複合体とも可逆的に結合する非競争阻害であることを明らかにしている。また、化合物17とCYP3A4におけるドッキングシミュレーションをMOE2008. 10、ASEDock法を用いて検討を行い、CYP3A4の活性中心であるヘム鉄に17のカルボニル基が配向しており、その周りの疎水性場とシクロヘキサン環が疎水性相互作用した形であると考察している。また、この結果と化合物18, 19の抑制効果が著しく低下していることからシクロヘキサン環がフリーの状態がCYP3A4阻害に関して重要であるとしている。

以上、本研究は生体触媒として3種の微生物を用いて植物界に広く存在するセスキテルペンから代謝産物としての新規天然型抗変異原物質の生産法について検討したものであり、*A. niger*から6種、*G. cingulata*から2種、*A. wentii*からは5種の新規天然型物質の生産に成功している。また、これら代謝産物は発がん性物質であるAFB1に対する抗変異原性を見出しており、これらの知見は、積極的に香り物質を体内に取り入れることにより、がん化反応の初期段階であるイニシエーション過程を抑制することを明らかにしたものであり、発がん予防に関わるセルフメディケーションに貢献できるものと考えられる。



図(-)-Isolongifolen-9-oneにおけるCYP3A4ドッキングモデル

論文審査結果の要旨

本研究は、新規天然型物質生産方法として微生物を用いた生物変換反応を行い、その反応特性を明らかにすると共に、がん発生のイニシエーション過程を抑制する有用な天然型抗変異原物質の探索、生産を目的に以下の二章からなる研究を行っている。第一章では、aromadendraneおよび、longifolene骨格を有するセスキテルペノイドの微生物を用いた生物変換による有用物質の産出、変換反応の特異性について検討を行っている。また、第二章では、第一章で単離精製したlongifolene骨格を有する変換物の抗変異原性試験の結果について明らかにし、強い活性が見出された抗変異原物質の作用機序についても検討を加えている。

第一章では、生体触媒としてコウジカビの一種である*Aspergillus niger*を用いた変換反応について検討を行っている。基質は、(+)-longifolene (1), (+)-longicyclene (2), (+)- α -longipinene (3)の3種であり、化合物1を基質とした変換反応においては、単一の化合物 3-oxoisolongifolol (4)へと変換されることを明らかにし、化合物2および3からは、それぞれ3種の新規天然型物質の生産に成功している。これらの化学構造は、(-)-(10*R*)-10-hydroxy-longicyclic acid (5), (+)-(10*S*)-10-hydroxy-longicyclic acid (6), (+)-10-oxo-longicyclic acid (7), (+)-(5*S*)-5,12-dihydroxy- α -longipinene (8), (-)-(5*R*)-5,12-dihydroxy- α -longipinene (9), (+)-12-hydroxy- α -longipinene-5-one (10)であると決定し、*A. niger*を生体触媒として用いた変換反応において6種の新規天然型物質の生産に成功している。また、これら変換反応は7員環geminal dimethylの α 位、末端メチルへの位置特異的酸化反応であることを明らかにしている。

炭疽病原菌*Glomerella cingulata*を用いた変換反応においては基質として、(+)-cycloisolongifolol (11), (-)-isolongifolol (12), (-)-isolongifolene (13)の3種類について検討しており、化合物11においては、*G. cingulata*の変換反応では珍しい脱水反応が進行し、3日間で70%をこえる高変換率で(+)-dehydrocycloisolongifolene (14)を特異的に生成する事を明らかにしている。化合物12における変換反応では、3位、9位にそれぞれ位置及び立体選択的な水酸化を受けた(-)-(3*R*)-3-hydroxy-isolongifolol (15), (-)-(9*R*)-9-hydroxy-isolongifolol (16)が生成することを明らかにしている。化合物13の変換反応においては、3種の変換物が生成していることを明らかにし、化学構造については(-)-isolongifolen-9-one (17), (-)-(2*S*)-13-hydroxy-isolongifolen-9-one (18), (-)-(4*R*)-4-hydroxy-isolongifolen-9-one (19)であると決定している。さらに、化合物17について*G. cingulata*による変換反応を行っており、5種の変換生成物へと変換されることを明らかにしている。これらの化学構造は、13を基質としたときと同様の変換物である18および19、化合物18の立体異性体である(-)-(2*R*)-12-hydroxyisolongifolene-9-one (20)さらに開環反応が進行した2種の新規天然型化合物、(-)-(2*R*,3*aR*)-2-(2-oxoethyl)-3*a*,4,5,6-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethyl-indan-6-one (21), (+)-(2*R*)-2-(2-oxoethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1,1,4,4-tetramethyl-indan-6-one (22)の生産に成功しており、*G. cingulata*における変換反応では、一般的な酸化反応だけでなく、還元や開環といった様々な反応を触媒する事を明らかにしている。

また、*A. wentii*を生体触媒とした微生物変換について検討を行っている。基質としては(+)-aromadendrene (23), (-)-alloaromadendrene (24), (+)-ledene (25)の3種のaromadendrane型セスキテルペノイドを用い、変換反応により5種の新規天然型物質の生産に成功している。化合物23からは(-)-(10*S*,11*S*)-10,13,14-trihydroxy-aromadendrane (26)、24における変換では、(+)-(1*S*,11*S*)-1,13-dihydroxy-aromadendrene (27)、(-)-5,11-epoxycadin-1(10)-en-14-ol (28)、25からは24と同様の変換物である28および、エピマー体である、(+)-(10*R*,11*S*)-10,13-dihydroxy-aromadendr-1-ene (29), (+)-(10*S*,11*S*)-10,13-dihydroxy-aromadendr-1-ene (30)を生成することを明らかにしている。

第二章では、第一章で得られたlongifolene骨格を有する変換生成物の抗変異原性についてumuテストを応用した抗変異原性アッセイを用いて変異原物質アフラトキシンB1におけるSOS誘導抑制効果検討を行っている。アッセイはlongifolene骨格を有する化合物14種、1-7, 10, 11, 13, 14, 17-19を用いて検討を行い、その結果、本研究において最も抑制効果が強かったのは化合物17でその活性値は0.50 mMで50%の抑制効果を有していることを明らかにしている。また、化合物4, 7および11において1.0 mMの濃度でそれぞれ53%, 51%, 56%の抑制効果を示し、そのIC50値は0.96 mM, 0.76 mM, 0.52mMであると明らかにしている。化合物2, 5, 6においては先の4つよりは抑制効果が弱いものの、1.0 mMの濃度でそれぞれ約40%程度の抑制率を有することを明らかにしている。また、AFB1は人肝臓内に存在する異物代謝酵素であるcytochrom P450 3A4 (CYP3A4)によりAFB1-8,9-exo-epoxideへと代謝され、グアニンのN7位にAFB1-DNA付加体を形成することで発ガン性を示すとされていることからこれらlongifolene誘導体はCYP3A4の阻害を行い、AFB1の活性化を抑制しているのもであると推測し、一番抑制効果が強かった化合物17において阻害機構について検討している。その結果、Linewearver-Burkプロット法による阻害形式の検討を行い、17は酵素とも酵素-基質複合体とも可逆的に結合する非競争阻害であることを明らかにしている。また、化合物17とCYP3A4におけるドッキングシミュレーションをMOE2008.10、ASEDock法を用いて検討を行い、CYP3A4の活性中心であるヘム鉄に17のカルボニル基が配向しており、その周りの疎水性場とシクロヘキサン環が疎水性相互作用した形であると考察している。また、この結果と化合物18, 19の抑制効果が著しく低下していることからシクロヘキサン環がフリーの状態がCYP3A4阻害に関して重要であると考察している。

以上、本論文で述べられた知見は、多数の独創性と優れた結果を含み、学術的、工業的、実用的にも重要であり、博士(工学)を授与するのに十分価値あるものと判断した。