

新規抗真菌抗生物質 Bacillopeptins 及び Fusaricidins について

金田 幸,^{*,a} 梶村芳雄^{b,1)}

New Antifungal Antibiotics, Bacillopeptins and Fusaricidins

Miyuki KANEDA^{*,a} and Yoshio KAJIMURA^{b,1)}

Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University,^a 1-2-3 Kasumi, Minami-ku,
Hiroshima 734-8551, Japan and Central Research Laboratories, Wakunaga
Pharmaceutical Co., Ltd.,^b 1624 Shimokotachi, Koda-cho,
Takata-gun, Hiroshima 739-1195, Japan

(Received March 25, 2002; Accepted June 24, 2002)

We isolated four strains of bacteria producing antifungal antibiotics from the rhizosphere of garlic with basal rot caused by the plant pathogenic fungal strain *Fusarium oxysporum*. Among them, *Bacillus subtilis* FR-2 was found to produce new antifungal antibiotics, named bacillopeptins A, B, and C. Their structures have been determined by 1D and 2D NMR and MS experiments, and amino acid analysis coupled with chiral HPLC, to be cyclic lipopeptides each containing a long-chain β -amino acid. Another bacterial strain, *Bacillus polymyxa* KT-8, was shown to produce new antifungal antibiotics named fusaricidins A, B, C, and D which are more potent than bacillopeptins in their antimicrobial activity. The structures of the fusaricidins have been elucidated similarly as bacillopeptins to be cyclic hexadepsipeptides all containing 15-guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid as a side chain. Fusaricidins strongly inhibit the growth of various kinds of fungi and moreover surprisingly show strong inhibitory activity against Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* or *Micrococcus luteus*.

Key words—antifungal antibiotics; bacillopeptins; fusaricidins; *Bacillus subtilis* FR-2; *Bacillus polymyxa* KT-8; cyclic hexadepsipeptides

はじめに

医療の現場では、真菌感染症の化学療法は細菌感染症に比べていまだ立ち遅れており、特に深在性真菌症（内臓真菌症）の患者数は年々増加していると言われている。わが国における深在性真菌症の代表的なものはカンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症などであるが、これらは近年の広域抗細菌抗生物質、ステロイドホルモン、免疫抑制剤、制がん剤などの使用による医原的誘因、あるいはエイズ、白血病、腎移植などの基礎疾患素因、などにより免疫学的に又は生理学的に感染抵抗性の低下した患者、すなわち易感染性宿主が感染する日和見感

染型真菌症であり、その発生率は著しく上昇しているといわれる。^{2,3)}

現在わが国で深在性真菌症に使用されている抗真菌薬はポリエンマクロライド系抗生物質アムホテリシン B、フロロピリミジン系のフルシトシン、及びアゾール系のミコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾールである。^{4,5)} アムホテリシン B は深在性真菌症の主要な治療薬として 40 年にわたって使用され続けているが、⁶⁾ 腎障害を引き起こすという強い副作用がある。^{7,8)} 一方その他の薬剤はそれぞれが、毒性が強い、抗菌活性が低い、作用が静菌的である、耐性を獲得しやすいなどの問題を有している。⁹⁻¹¹⁾ これら既存の抗真菌剤の欠点を克服する懸命の努力がなされており、これに備えるためにも、ポリエン系でもアゾール系でもなく、しかも効力が強くかつ副作用の少ない新しい抗真菌剤の開発が以前にも増して切望されている。

一方、農業の分野においては、10 年以上にわた

^{a)} 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3), ^{b)} 湧永製薬株式会社中央研究所 (〒739-1195 広島県高田郡甲田町下甲立 1624)

*e-mail: mikan@hiroshima-u.ac.jp

*本総合論文は著者 (梶村) の学位 [薬学博士] 取得を機に執筆したものである。

って同一作物を栽培し続けた不健全な圃場が多数存在している。こういった産地化した圃場では、「連作障害」という、主に真菌によって引き起こされる「植物病害」に悩まされている。このような圃場では、連作物の根が分泌する栄養物質を好む植物病原菌の菌密度が高まった結果、微生物相の片寄りや単純化が起り、発病の可能性が上昇する。例えば、ニンニク圃場では、ニンニク根が分泌するニンニク特有のアミノ酸、糖類、その他の微量成分を好む真菌 *Fusarium oxysporum* が多く生息し、その結果ニンニク乾腐病を引き起こす。*Fusarium oxysporum* は寄生と腐生の両面で増殖し、増殖を終了した菌糸及び分生胞子が厚膜胞子状態で、数年間死滅しないで土壤中に蓄積していく。¹²⁾ ここでは単純な菌相でしかも真菌の密度が高いので、病原性真菌との競争による自然淘汰圧の環境を潜り抜けた強力な細菌のみが生息しており、その細菌は同時に、強力な抗真

菌抗生物質を生産している可能性があると考えられる。そこで我々は今回、ニンニクの根圏土壌及び根面より、*Fusarium oxysporum* に対する拮抗細菌のスクリーニングを行った。その結果、抗真菌物質を分泌する4種の細菌を分離した。¹³⁾ そのうちの *Bacillus* 属2株からポリエン系でもアゾール系でもない、ペプチド系の新規抗真菌抗生物質、すなわち bacillopeptins¹⁴⁾ 及び fusaricidins^{15,16)} と命名した新活性物質を得たので、それらについて以下に述べる。

I. 新規抗真菌抗生物質 Bacillopeptins に関する研究¹⁴⁾

1. 抗生物質生産菌の分離と同定 ニンニク圃場において、ニンニク乾腐病を発病したニンニクの近傍の健全ニンニクの根面及び根圏を中心に、細菌を多く含有すると推測される土壌を採取した。この土壌の滅菌水懸濁液を、あらかじめニンニク乾腐病の原因菌 *Fusarium oxysporum* の胞子を寒天

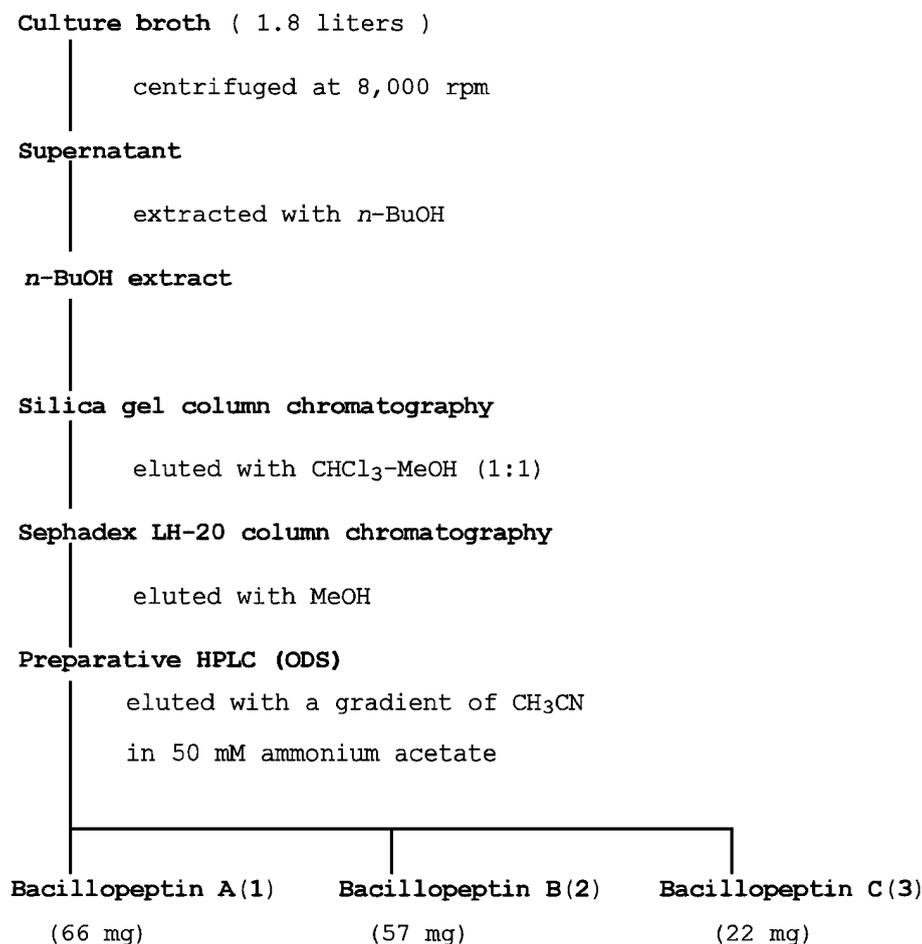


Fig. 1. Isolation Procedure for Bacillopeptins A(1), B(2) and C(3)

(PDA 培地) に混合して調製したシャーレ表面に塗布し、室温数日間の培養を行った。フザリウム菌に対する阻止円を形成したコロニーより、細菌を爪楊枝で採取した。

この菌は、グラム染色陽性の桿菌で、好気性、運動性のある有胞性細菌であることから *Bacillus* 属と推定された。本菌の形態学的及び生理学的特徴に基づき、Bergey's manual of systematic bacteriology¹⁷⁾ に従ってタクソノミーを行った結果、この株を *Bacillus subtilis* と同定し、*Bacillus subtilis* FR-2 と命名した。

2. 培養, 抽出, 精製 普通寒天培地で2日間25°Cで培養した菌体を、125 mlの培地(サッカロース4.0%, S-III ミート(味の素株式会社)2.5%, 食塩0.25%, 炭酸カルシウム0.32%を含む)を入れた坂口フラスコに接種して、1分間110ストローク、25°C、4日間振盪培養した。抗生物質の生産を *Fusarium oxysporum* HF8801¹⁸⁾ に対する抗菌作用によりモニターしたところ、培養開始後48時間で最大値に達した。

活性物質の抽出・精製は *F. oxysporum* HF8801 に対する抗菌作用を指標にして Fig. 1 に示す方法で行った。すなわち培養液1.8リットルを遠心分離した上清を *n*-BuOH で抽出し、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(40×400 mm, CHCl₃-MeOH(3:1)で洗浄後、CHCl₃-MeOH(1:1)で溶出)で分離した。活性画分を Sephadex LH-20 カラム(40×400 mm)にかけて MeOH で溶出して得た活性無色粉末を逆相 HPLC により分離精製した。カラムは Capcell pak C18 SG-120, 4.6×250 mm(資生堂)を使用し、1%の CH₃CN を含む 50 mM 酢酸アンモニウム溶液(A液)と80%の CH₃CN を含む 50 mM 酢酸アンモニウム溶液(B液)を用いて、最初の10分間はB液を45%から55%に変化させるグラジエントで、次いでB液55%で10分間溶出させた。流速は1 ml/min、検出は UV230 nm で行った。これらの条件で3個の主ピーク A(保持時間7.0分)、B(9.2分)、C(12.6分)を Fig. 2 のように分離することができた。これらのピークから得られた化合物を、生産菌の名称にちなんでそれぞれ bacillopeptin A(1)、B(2)及びC(3)と命名した。分取を繰り返し、1を66 mg、2を57 mg、3を22 mg、それぞれ無色粉末として得

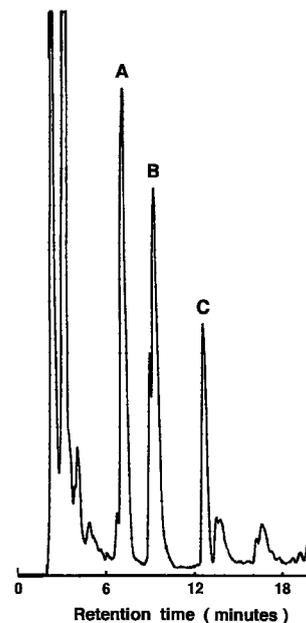


Fig. 2. HPLC Profile of Bacillopeptins A, B and C

た。これらはいずれもビュレット反応陽性、ニンヒドリン反応陰性であった。この呈色反応と¹H及び¹³C NMR データから、これらの物質をペプチドであると推定した。

3. Bacillopeptin A(1)の構造 分子式は、negative HRFAB-MS(測定値 *m/z* 1019.5146, 計算値 *m/z* 1019.5054)と¹³C NMR データから C₄₆H₇₂N₁₀O₁₆と決定された。1の完全加水分解を行い、CHCl₃で抽出した。水層はアミノ酸分析の結果、Asx(2モル)、Ser(2)、Glx(1)、Thr(1)、Tyr(1)の存在を示した。CHCl₃層にはニンヒドリン陽性物質が存在し、FAB-MSによって、*m/z* 244(M+H)⁺を与えた。1はニンヒドリン反応陰性で、その positive 及び negative FAB-MS は、強い (M+H)⁺、(M-H)⁻イオンピークをそれぞれ *m/z* 1021 及び 1019 に与えた。これらの結果から、1は上記の7個のアミノ酸残基と1個の長鎖脂溶性アミノ酸残基を構成成分とする環状リポペプチドと推定された。¹H NMR (Fig. 3) から、12個のアミドプロトンが観測でき、そのうち8個は8個のアミノ酸残基のα-あるいはβ-アミドプロトンとして同定できた。残り4個の singlet アミドプロトンは二次元 NMR の解析によって2個の Asn の末端アミド(CONH₂)プロトンとして帰属できたので、分子式を考慮して Glx は Glu と決定された。¹H NMR

における 2 個のメチルシグナルのうち, doublet メチルは Thr のメチルであり, triplet メチルは長鎖アミノ酸に由来しており, この長鎖アミノ酸は枝のない直鎖状と考えられた. **1** の ^{13}C NMR スペクトル (Fig. 4) で, δ_{C} 40.5 (メチレン) と δ_{C} 46.1 (メチン) のシグナルは長い側鎖を持つ β -アミノ酸に特徴的¹⁹⁾であり, それぞれ CH_2 (C-34) と CH (C-33, NH の隣り) と帰属された. 一次元及び二次元 NMR スペクトルの詳細な解析によって **1** の各アミノ酸残基のすべての ^1H 及び ^{13}C シグナルの帰属に成功した (Table 1). 脂溶性長鎖 β -アミノ酸はその分子式 ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_2$) と上記の FAB-MS 及び NMR データより 3-aminotetradecanoic acid と決定された. このような β -アミノ酸は iturin グループ抗生物質によく見受けられ,^{20,21)} また藍藻が産生する環状ペプチド類²²⁾にも存在している.

8 個のアミノ酸残基の配列は **1** の NOESY スペクトルから得られる NOE 相関 (Fig. 5) の解析によって決定した. すなわち, 1 つのアミノ酸残基の α -プロトンと隣りのアミノ酸残基の NH-プロトンとの相関を分析して決定した. これらアミノ酸残基の配列は HMBC の解析からも支持された (Fig. 5). 後で述べるアミノ酸の絶対配置も考慮して, bacillopeptin A (**1**) の構造を cyclic (L-Asn1 \rightarrow D-Tyr \rightarrow D-Asn2 \rightarrow L-Ser1 \rightarrow L-Glu \rightarrow D-Ser2 \rightarrow L-Thr \rightarrow β -AA) と決定した. β アミノ酸残基 (β -AA) は 3-aminotetradecanoic acid であった (Fig. 7).

4. Bacillopeptin B (2) の構造 分子式は **1** と同様にして $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ と決定されたが, これは **1** よりも CH_2 だけ大きい. 酸加水分解物の CHCl_3 抽出後の水層のアミノ酸分析は **1** と同一の組成を与えた. CHCl_3 抽出物中の脂溶性物質はニンヒドリン発色陽性で, FAB-MS によって, $(\text{M}+\text{H})^+$, m/z 258 を与えた. これは **1** の β -アミノ酸より 14 質量単位大きい. ゆえに, **2** と **1** の分子量の差異は β -アミノ酸残基の差異に相当する. **2** の ^1H NMR (Fig. 3) は **1** のそれとよく類似するが, メチルシグナルが 1 個多く, 計 3 個である. ^1H 及び ^{13}C NMR のデータから, そのうち 1 個は Thr のメチル基, 2 個は β -アミノ酸末端に存在するイソプロピル基 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ に帰属された. 一次元及び二次元 NMR の詳細な解析によって **2** のそれぞれのアミノ酸残基のすべての ^1H 及び ^{13}C シグナルの帰属に

成功した (Table 1).

2 の 8 個のアミノ酸残基の配列決定は **1** と同様に NOESY スペクトルの解析で行ったが, 結果は **1** と一致した. 以上のデータ及び各アミノ酸の絶対配置 (後述) を考慮して, **2** の構造を cyclic (L-Asn1 \rightarrow D-Tyr \rightarrow D-Asn2 \rightarrow L-Ser1 \rightarrow L-Glu \rightarrow D-Ser2 \rightarrow L-Thr \rightarrow β -AA) と決定した. **2** の β -アミノ酸残基は 3-amino-13-methyltetradecanoic acid であった (Fig. 7).

5. Bacillopeptin C (3) の構造 分子式は同様にして $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ と決定され, **2** よりもさらに CH_2 だけ大きい. アミノ酸分析の結果は **1** 及び **2** と同様の 7 個の α -アミノ酸の存在を示した. 脂溶性アミノ酸は **2** の β -アミノ酸よりも 14 質量単位だけ大きい. ^1H NMR で **2** と同様の $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ 構造が示され (Fig. 3), **3** の β -アミノ酸は 3-amino-14-methylpentadecanoic acid と決定された. 各種一次元及び二次元 NMR の解析によって各アミノ酸残基のすべてのプロトン及び炭素の帰属に成功した (Table 1). 8 個のアミノ酸残基の配列も **2** と同様に NOESY スペクトルで決定できた. これらの結果から bacillopeptin C の構造を cyclic (L-Asn1 \rightarrow D-Tyr \rightarrow D-Asn2 \rightarrow L-Ser1 \rightarrow L-Glu \rightarrow D-Ser2 \rightarrow L-Thr \rightarrow β -AA) と決定した. **3** の β -アミノ酸残基は 3-amino-14-methylpentadecanoic acid であった (Fig. 7).

6. アミノ酸の絶対配置 Bacillopeptin A (**1**) の完全加水分解で得た各 α -アミノ酸の絶対配置の決定及び分子内での配列位置の決定は, Fig. 6 に図示した方法で行った. すなわちアミノ酸混合物を 2 次元のシリカゲル TLC で展開した. TLC 上のアミノ酸の位置は, 希釈したフルオレスカミンを噴霧して UV ランプ下での蛍光発色で確認し, アミノ酸のスポットを掻きとり水で抽出した. 各アミノ酸の絶対配置はキラル HPLC のクロマトグラムを標品のキラルアミノ酸のそれと比較することによって決定した. カラムは SUMICHIRAL OA 5000 (4.6×150 mm), 移動相は Ala, Ser 及び Val には 1.0 mM CuSO_4 , Thr 及び *allo*-Thr には 0.5 mM $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Asp, Glu 及び Tyr には $\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ (85 : 15) の溶液中 2.0 mM CuSO_4 , 検出は UV254 nm を用いた.

キラル HPLC により各 α -アミノ酸の絶対配置は, L-Asp, D-Asp, L-Ser, D-Ser, L-Glu, L-Thr 及び D-Tyr と決定され, Asp 及び Ser は D 体と L 体の両方が存在した. D 体と L 体の分子内での位置は次のよ

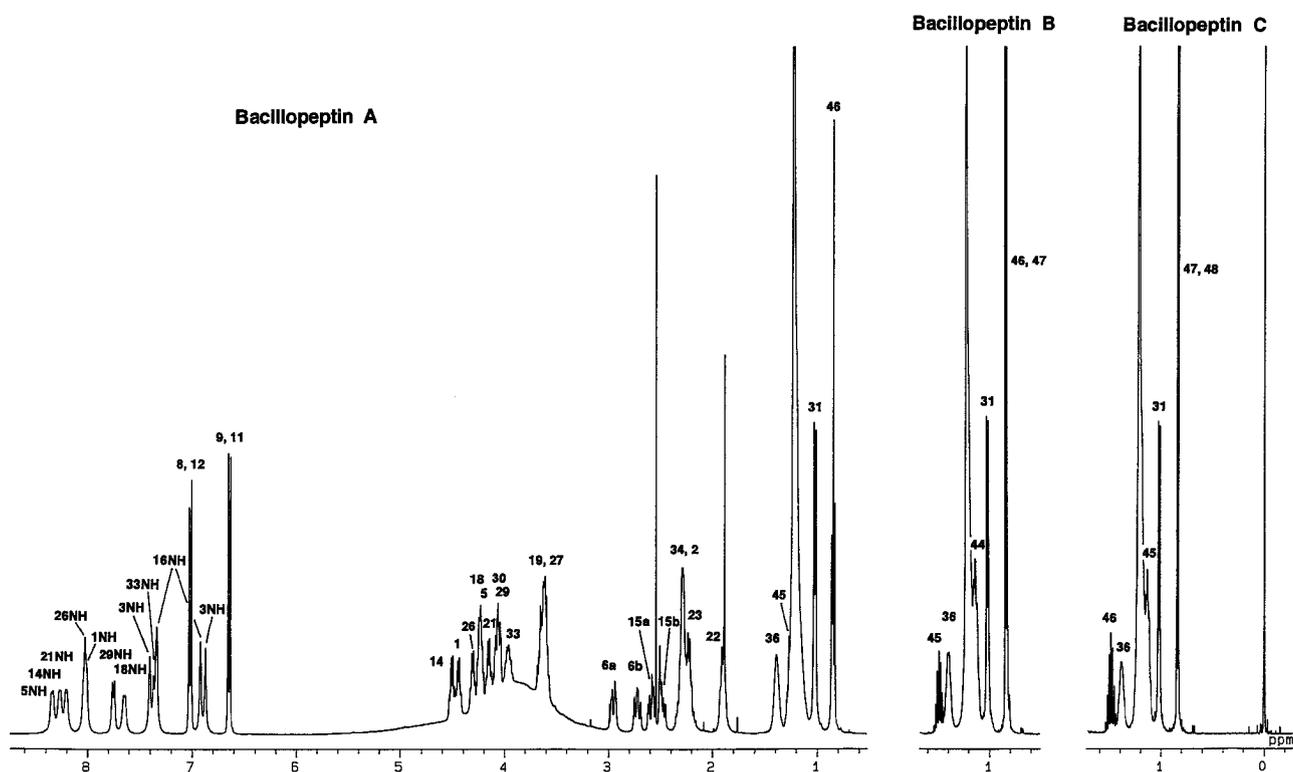


Fig. 3. ¹H NMR Spectra of Bacillopeptins A (1), B (2) and C (3) (400 MHz, DMSO-d₆)

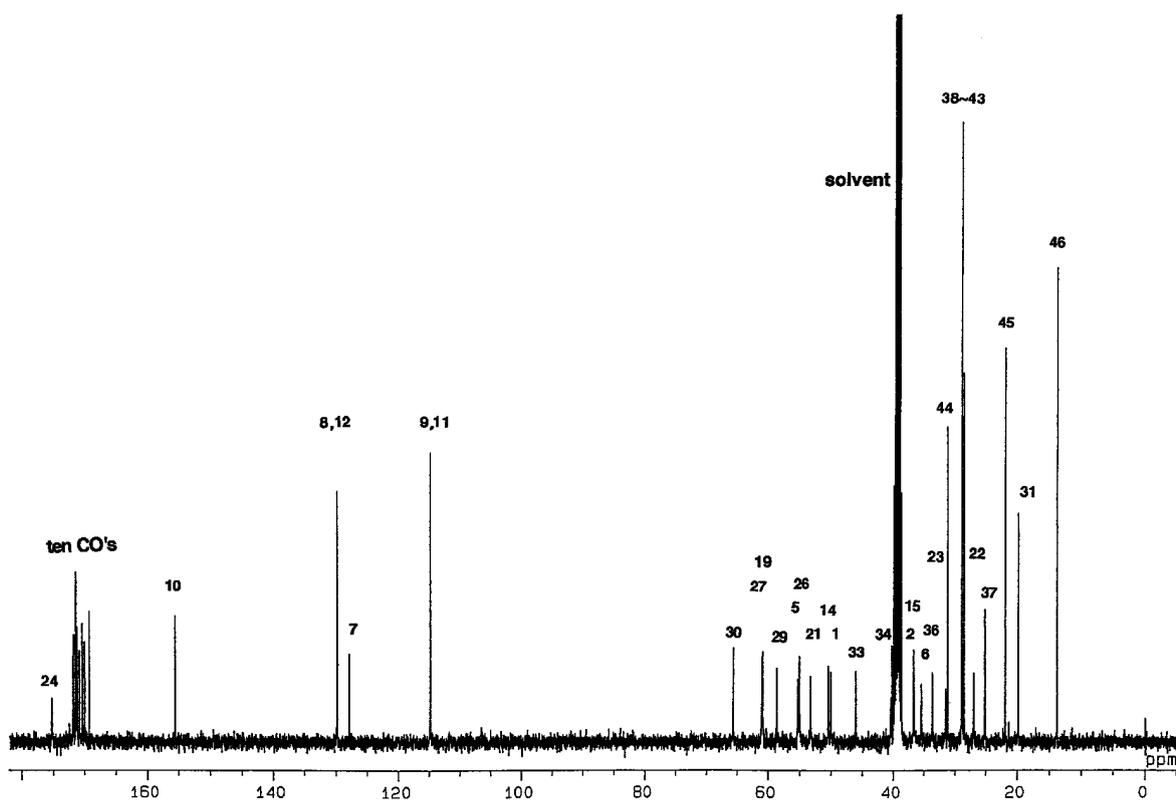


Fig. 4. ¹³C NMR Spectrum of Bacillopeptin A (1) (100 MHz, DMSO-d₆)

Table 1. ¹H and ¹³C NMR Chemical Shifts of Bacillopeptins A(1), B(2) and C(3) in DMSO-*d*₆

Moiety	Bacillopeptin A			Bacillopeptin B			Bacillopeptin C			
	Position	δ_C	δ_H (J in Hz)	Position	δ_C	δ_H (J in Hz)	Position	δ_C	δ_H (J in Hz)	
L-Asn 1	1	50.1	4.45 dd(7.0, 13.2)	1	50.1	4.48 dd(6.9, 13.4)	1	50.1	4.48 dd(7.0, 13.2)	
	2	36.7	2.28 m	2	37.1	2.27 m	2	37.0	2.28 m	
	3	171.5		3	171.6		3	171.5 ^{a)}		
	4	171.8		4	172.0		4	171.7		
	1-NH		8.02 br d	1-NH		8.13 d(6.8)	1-NH		8.07 d(7.1)	
	3-NH ₂		7.41 s 6.88 s	3-NH ₂		7.54 s, 6.80 s	3-NH ₂		7.49 s, 6.82 s	
D-Tyr	5	55.4	4.23 m	5	55.3	4.22 m	5	55.2 ^{b)}	4.24 m	
	6	35.5	2.95 dd(4.6, 13.9), 2.72 dd(10.1, 13.9)	6	35.6	2.93 dd(4.6, 13.7), 2.74 dd(9.8, 13.7)	6	35.5	2.94 dd(4.5, 14.0), 2.73 dd(9.9, 14.0)	
	7	128.0		7	128.1		7	128.1		
	8, 12	129.9	7.02 d(8.5)	8, 12	130.0	7.02 d(8.3)	8, 12	129.9	7.02 d(8.5)	
	9, 11	114.9	6.65 d(8.5)	9, 11	114.9	6.64 d(8.3)	9, 11	114.9	6.65 d(8.3)	
	10	155.6		10	155.7		10	155.6		
	13	171.3		13	171.4		13	171.4		
	5-NH		8.34 d(6.1)	5-NH		8.41 br s	5-NH		8.42 br s	
D-Asn 2	14	50.6	4.51 dd(7.2, 13.4)	14	50.5	4.52 dd(7.0, 14.0)	14	50.4	4.52 dd(7.1, 13.4)	
	15	36.7	2.60 dd(5.5, 15.4), 2.48 dd(7.8, 15.4)	15	36.8	2.60 dd(5.8, 15.3), 2.45 dd(7.7, 15.3)	15	36.8	2.61 dd(5.8, 15.3), 2.46 dd(7.8, 15.4)	
	16	171.5		16	171.6		16	171.6 ^{a)}		
	17	171.3		17	171.4		17	171.3		
		14-NH		8.27 d(4.6)	14-NH		8.52 br s	14-NH		8.43 br s
	16-NH ₂		7.34 s, 6.92 s	16-NH ₂		7.37 s, 6.90 s	16-NH ₂		7.34 s, 6.91 s	
L-Ser 1	18	55.1 ^{a)}	4.24 m	18	55.3	4.21 m	18	55.3 ^{b)}	4.22 m	
	19	61.0	3.57~3.68 m	19	61.0	3.56~3.69 m	19	60.9	3.57~3.69 m	
	20	170.1		20	170.1		20	170.0		
	18-NH		7.65 d(6.3)	18-NH		7.76 br s	18-NH		7.67 d(6.3)	
L-Glu	21	53.3	4.16 dd(6.6, 13.2)	21	53.8	4.11 m	21	53.5	4.14 dd(6.5, 13.0)	
	22	27.0	1.90 m	22	27.2	1.92 m	22	26.9	1.91 m	
	23	31.5	2.23 m	23	32.8	2.17 brt(7.2)	23	31.9	2.21 br t(7.4)	
	24	175.3		24	176.0		24	175.4		
	25	171.9		25	172.7		25	171.8		
	21-NH		8.21 br s	21-NH		8.41 br s	21-NH		8.30 br s	
D-Ser 2	26	55.2 ^{a)}	4.31 dd(6.4, 12.2)	26	55.3	4.26 dd(6.8, 12.7)	26	55.2 ^{b)}	4.29 dd(6.6, 12.7)	
	27	61.1	3.57~3.68 m	27	61.0	3.56~3.69 m	27	60.9	3.57~3.69 m	
	28	170.5		28	170.5		28	170.5		
	26-NH		8.03 br s	26-NH		7.96 br s	26-NH		7.94 d(7.1)	
L-Thr	29	58.7	4.06 m	29	58.9	4.03 dd(3.8, 7.9)	29	58.8	4.05 m	
	30	65.7	4.08 m	30	65.6	4.08 m	30	65.7	4.09 m	
	31	19.9	1.03 d(6.3)	31	20.0	1.02 d(6.1)	31	19.9	1.02 d(6.4)	
	32	169.3		32	169.3		32	169.3		
	29-NH		7.75 d(7.8)	29-NH		7.86 d(8.1)	29-NH		7.80 d(8.5)	
β -Amino acid	33	46.1	3.97 m	33	46.0	3.95 m	33	46.0	3.95 m	
	34	40.5	2.29 m	34	40.3	2.29 m	34	40.4	2.30 m	
	35	170.9		35	170.8		35	170.8		
		33-NH		7.36 d(9.0)	33-NH		7.40 d(9.0)	33-NH		7.39 d(9.0)
	36	33.8	1.39 br s	36	33.7	1.40 br d(4.6)	36	33.7	1.39 br s	
	37	25.2		37	25.3		37	25.2		
	38~43	28.6		38~42	28.6		38~43	28.6		
		28.6			28.9			28.9		
		28.9	~1.23 br s		29.0	~1.22 br s		29.0	~1.22 br s	
		29.0			29.0			29.2		
	44	31.2			29.3		44	26.7		
45	22.0	1.26 m	43	26.7		45	38.4	1.14 br t(6.5)		
46	13.9	0.85 t(6.8)	44	38.4	1.14 br t(6.5)	46	27.3	1.49 heptet(6.6)		
			45	27.3	1.49 heptet(6.6)	47	22.4	0.84 d(6.6)		
			46	22.4	0.84 d(6.6)	48	22.4	0.84 d(6.6)		
			47	22.4	0.82 d(6.6)					

^{a), b)} Assignments may be interchanged in each column.

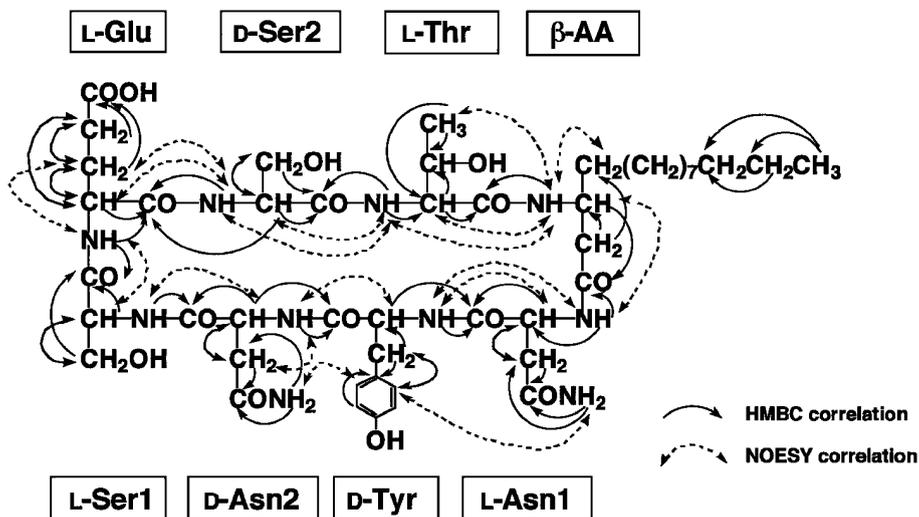


Fig. 5. HMBC and NOESY Correlations for Bacillopeptin A (1)

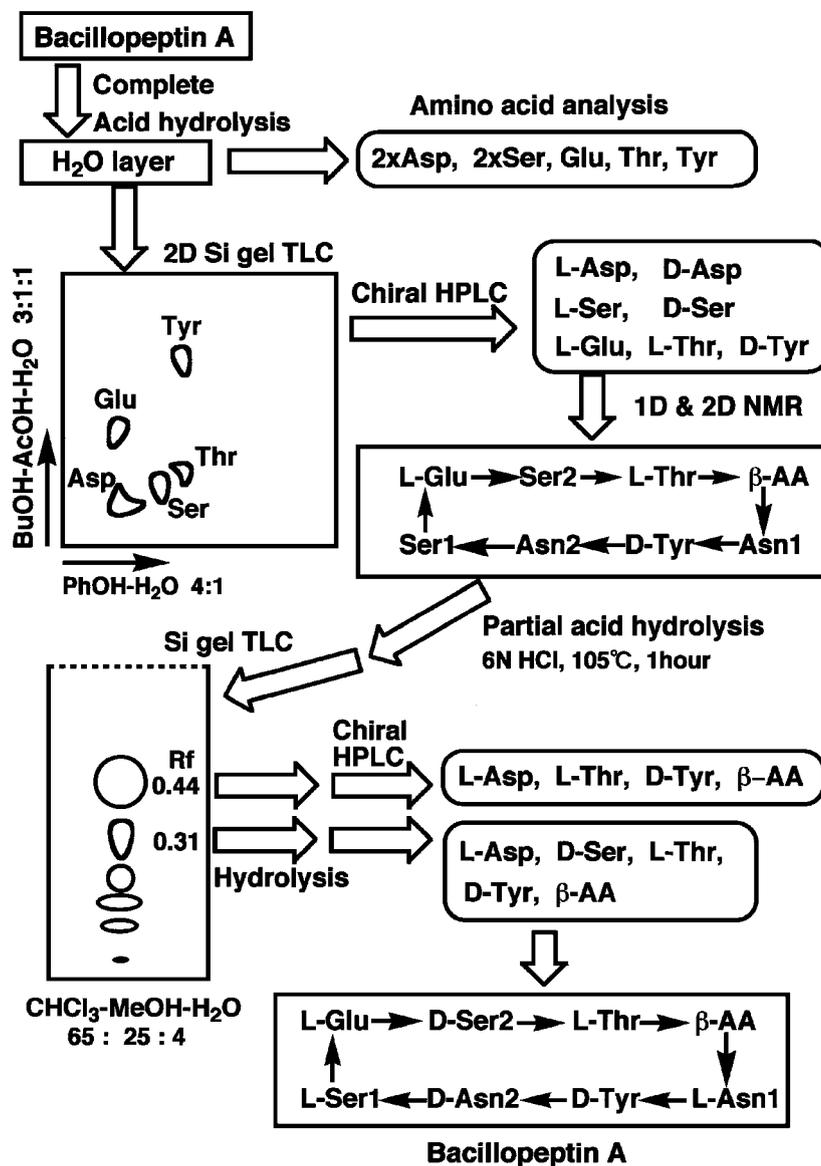


Fig. 6. Amino Acid Sequence of Bacillopeptin A

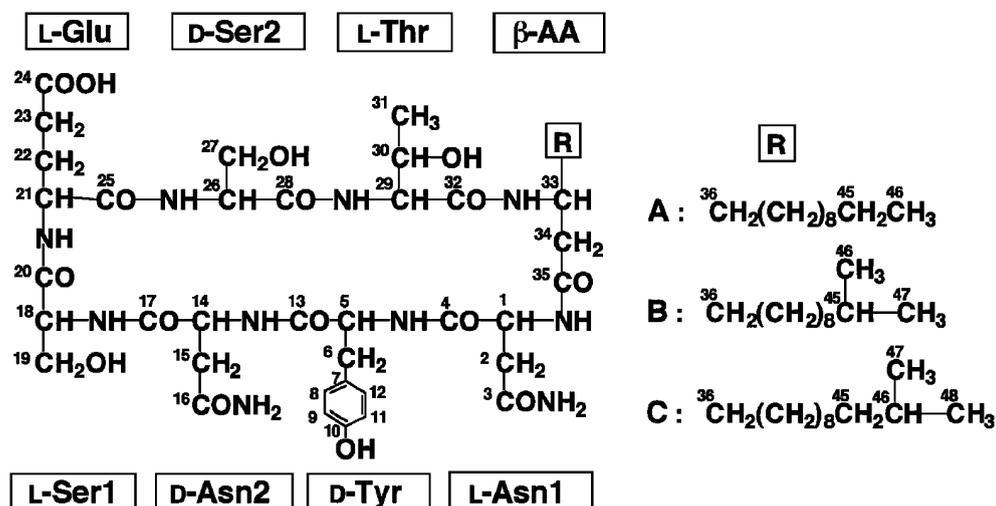


Fig. 7. Structures of Bacillopeptins A (1), B (2) and C (3)

うに決定された。すなわち **1** の部分加水分解を行い、その分解物の TLC において、 R_f 値の大きい (0.44 及び 0.31) 2 個のペプチドスポットをそれぞれ集めて完全加水分解を行った。その分解物をキラル HPLC で分析した結果、 R_f 値 0.44 のペプチドは L-Asp, L-Thr, D-Tyr 及び β -アミノ酸を、 R_f 値 0.31 のペプチドは L-Asp, D-Ser, L-Thr, D-Tyr 及び β -アミノ酸を含んでいた。この結果から分子内の Asp 及び Ser の D 体と L 体の配列位置を Fig. 7 のように決定した。 β -アミノ酸の絶対配置は未決定である。

7. 生物活性 Bacillopeptins の抗細菌及び抗真菌活性試験は、寒天希釈平板法で行った。培地として細菌には Mueller-Hinton 培地、糸状菌及び酵母には Sabouraud 培地を使用した。結果を Table 2 に示す。Bacillopeptin C (**3**) は、試験した糸状菌及び酵母に中程度の活性を示したが、Bacillopeptin A (**1**) と B (**2**) は 100 $\mu\text{g/ml}$ でも、試験した細菌、糸状菌及び酵母のいずれにも活性を示さなかった。**1** 及び **2** の活性をペーパーディスク法で測定すると、**2** は高濃度の場合 (1000 $\mu\text{g/ml}$) に、酵母、糸状菌に活性を示したが、**1** はこの濃度においても、いずれにも活性を示さなかった。

II. 新規抗真菌抗生物質 Fusaricidins に関する研究^{15,16)}

1. 生産菌の分離と同定 I. で述べた bacillopeptins よりもさらに強力な抗真菌抗生物質を求めて、ニンニク根圏の土壌よりスクリーニングを行

Table 2. Antimicrobial Activities of Bacillopeptins A, B and C

Test organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	A	B	C
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	> 100	> 100	> 100
<i>S. aureus</i> Smith	> 100	> 100	> 100
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 3333	> 100	> 100	> 100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 100	> 100	> 100
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	> 100	> 100	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	> 100	> 100	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	> 100	> 100	> 100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	> 100	> 100	> 100
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	> 100	> 100	50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HUT 7099	> 100	> 100	25
<i>Fusarium oxysporum</i> HF 8801 (pathogenic to garlic)	> 100	> 100	25
<i>F. oxysporum</i> HF 8835 (nonpathogenic to garlic)	> 100	> 100	12.5
<i>Aspergillus niger</i> HUT 2016	> 100	> 100	6.25
<i>A. oryzae</i> IFO 4214	> 100	> 100	12.5
<i>Penicillium thomii</i>	> 100	> 100	12.5

った結果、強い抗真菌活性物質を産生する細菌を分離することができた。本菌はグラム染色不定の桿菌で、好気性で運動性の有胞子細菌であることから、*Bacillus* 属に属すると考えられた。本菌の形態学的及び生理学的特徴に基づいて、Bergey's manual of systematic bacteriology¹⁷⁾ によるタクソノミーを行った結果、この菌を *Bacillus polymyxa* と同定し、*Bacillus polymyxa* KT-8 と命名した。

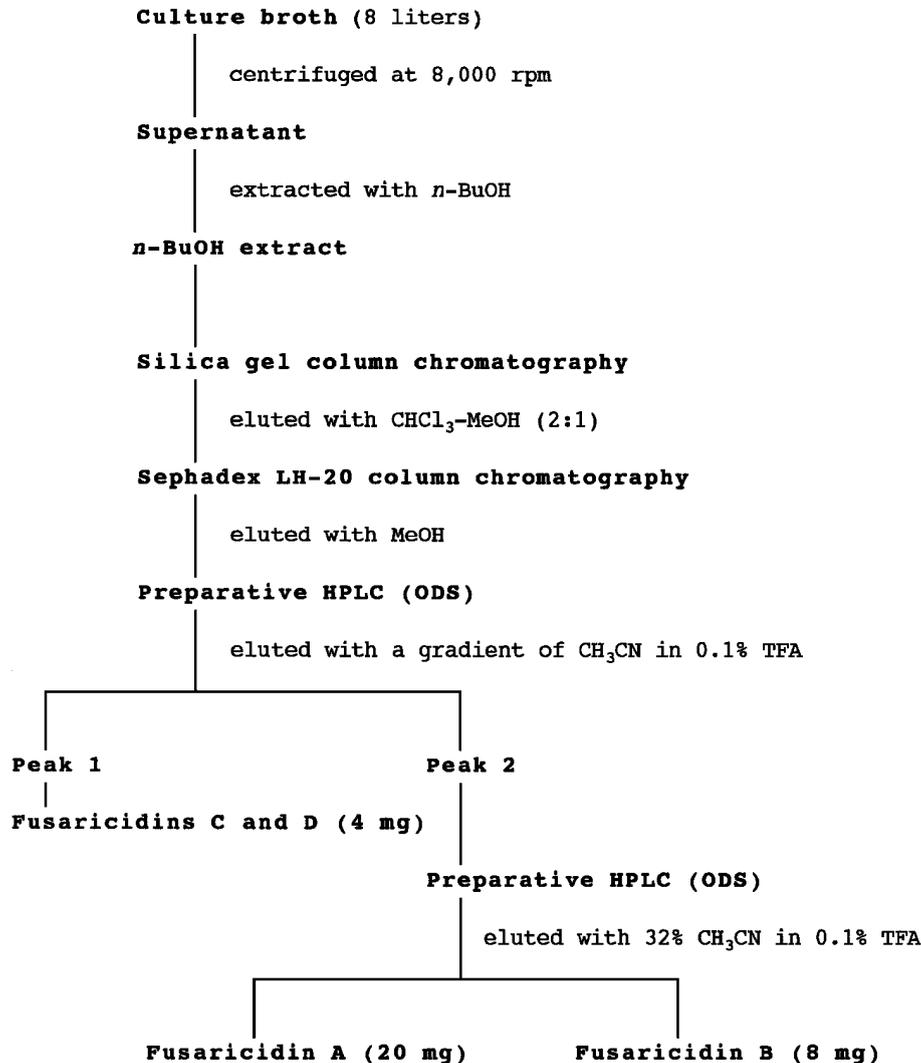


Fig. 8. Isolation Procedure for Fusaricidins A (4), B (5), C (6) and D (7)

2. 培養・抽出・精製 普通寒天培地で2日間25°Cで培養した菌体を、培地125 ml (組成: グルコース15 g, キョーレオピン (湧永製薬株式会社) 100 ml, ジャガイモ抽出液1000 ml) に接種して、坂口フラスコで110ストローク/分, 25°C, 3日間培養した。抗生物質の生産は培養開始後72時間で最大値に達した。

抗生物質の抽出・精製は, *Fusarium oxysporum* HF 8801 に対する抗菌活性を指標にして Fig. 8 に示す手順で行った。培養液8リットルを遠心分離し, その上清の BuOH 抽出液を濃縮して, シリカゲルカラム (40×400 mm) にかけて, CHCl₃-MeOH (4:1) で洗浄後 CHCl₃-MeOH (2:1) で溶出, その活性画分を Sephadex LH-20 カラム (40×400 mm) にかけて MeOH で溶出した。得られた活性無色粉

末を逆相 HPLC により分離精製した。カラムは bacillopeptins の場合と同様に Capcell pak C18 SG-120, 4.6×250 mm (資生堂) を使用し, 1%の CH₃CN を含む 0.1% TFA 溶液 (A 液) と 80% の CH₃CN を含む 0.1% TFA 溶液 (B 液) を用いて, 10分間で B 液を 30% から 70% に変化させるグラジエントをかけて, 保持時間 8.8 分のピーク 1 及び 9.7 分のピーク 2 の 2 つの生物活性ピークを得た。流速は 1 ml/min であった。ピーク 2 は, 2 成分の混合物であり, 同じカラムを使用してイソクラティック条件 (32% CH₃CN in 0.1% TFA) で分離を繰り返して, fusaricidin A (4) を 20 mg, fusaricidin B (5) を 8 mg 得た。ピーク 1 も 2 成分を含むことが判明したので, さまざまな条件で分離を試みたが不成功であった。ピーク 1 の混合物 (4 mg) は, 2 成

分が 4 : 1 の割合で含まれていて、それぞれを Fusaricidin C (6) 及び Fusaricidin D (7) と命名した。Fusaricidins の命名は *Fusarium oxysporum* に対する抗真菌活性に因って行った。

Fusaricidins はいずれも無色の粉末であり、ビュレット及び坂口反応は陽性、ニンヒドリン反応は陰性であった。これらの呈色反応と NMR データによって、fusaricidins はグアニジノ基を有するペプチドであると推定した。

3. Fusaricidin A (4) の構造 Fusaricidin A (4) の分子式は、HRFAB-MS (測定値 m/z 883.5598 ($M+H$)⁺, 計算値 m/z 883.5617) 及び ¹³C NMR のデータから、C₄₁H₇₄N₁₀O₁₁ と決定された。4 の完全加水分解を行い、CHCl₃ で抽出した。水層のアミノ酸分析は、2 モルの Thr と Val, 1 モルの Ala と Asp の存在を示した。アミノ酸の絶対配置をキラル HPLC (カラム及び条件は上述と同様) で解析した結果、L-Val, D-Val, L-Thr, D-*allo*-Thr, D-Ala, D-Asp と決定された (Fig. 12)。CHCl₃ 層は脂溶性物質 [FAB-MS (($M+H$)⁺, m/z 298), TLC (CHCl₃-MeOH, 3 : 1; R_f 0.52)] を含んでおり、この物質はニンヒドリン反応陰性、坂口反応陽性であり、グアニジノ基の存在が示された。Fusaricidin A (4) 自身はニンヒドリン反応陰性でジアゾメタンとも反応しない。分子式及びこれらの実験データより、4 は 6 個のアミノ酸残基、及びグアニジノ基を有する脂溶性物質から構成されている環状ペプチドであることが示唆された。

DMSO-*d*₆ 中で測定した 4 の ¹H 及び ¹³C NMR のスペクトルをそれぞれ Fig. 9 及び 10 に示す。DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC, ROESY, HMBC スペクトルもまた DMSO-*d*₆ 中で測定し、注意深く解析した。4 の ¹³C NMR では、8 個のカルボニル炭素が示され、 δ_c 156.7 にグアニジノ炭素が示されたが、芳香族炭素は存在しない。分子式の不飽和度 10 から 4 は分子中に 1 個の環を有する。4 の ¹H NMR の低磁場領域に現われる 9 個のプロトンシグナルのうち 6 個は、6 個のアミノ酸残基の α アミドプロトンに帰属でき、2 個の singlet プロトンは、ROESY と HMBC データより Asn の末端アミド (CONH₂) プロトンに帰属できたので、酸加水分解物中の Asp は Asn 残基に由来する。残りの δ_H 7.60 の triplet 様シグナルは、グアニジノプロトン (NHC(=NH)

NH₂) に帰属できた。4 の ¹H NMR における 7 個のメチルシグナルは、上記の 2D NMR データに基づいて、一方の Val 残基 (Val (1) と命名) の 2 個、もう一方の Val 残基 (Val (2)) の 2 個、Thr (2) と名づけた Thr (あるいは *allo*-Thr) 残基のメチル、Ala 残基のメチル、Thr (1) と名づけたもう 1 つの Thr (あるいは *allo*-Thr) 残基のメチルの合計 7 個に帰属できた。このようにして 4 の 6 個のアミノ酸残基のすべてのプロトンと炭素のシグナルは、Table 3 に示すように帰属できた。

4 の 6 個のアミノ酸の配列順序は、ROESY と HMBC のデータより決定した。Figure 11 に示したように、ROESY の相関は、Thr (1) の α プロトンと Val (1) の NH の間で、Val (1) の α プロトンと Val (2) の NH の間で、Val (2) の α プロトンと Thr (2) の NH の間で、Thr (2) の α プロトンと Asn の NH の間で、Asn の α プロトンと Ala の NH の間でそれぞれ観察できた。さらに、HMBC の相関が、Thr (1) の β プロトンと Ala のカルボニル炭素との間で観察できた (Fig. 11)。このデータより Thr (1) の水酸基と Ala のカルボニル基の間にエステル結合が存在し、結果として、デブシペプチド環を形成している。この結合の存在は、Thr (1) の炭素の化学シフトからも支持される。すなわち β -CH 炭素 (C-2) の δ_c 70.2 への低磁場シフト、 α -CH (C-1) 及び γ -CH₃ (C-3) の、それぞれ δ_c 56.8 及び 16.2 への高磁場シフトはこのアシル化によるものである。これらのシグナルの低磁場及び高磁場シフトは、bacillopeptins (本論文で上述、文献¹⁴)、pneumocandins,²² thioxamycin²³) のような通常のペプチド結合に関与する Thr 残基の、相当する炭素シグナルと比較することによりその値の大きさが確認できる。同様な低磁場及び高磁場シフトは、Thr が β -CHOH を介してエステル結合をしている protactin,²⁴ micropeptins,²⁵ WS9326A,²⁶ aselacins²⁷) のような既知のデブシペプチドにおいても報告されている。このような状況にある Thr 残基の炭素シグナルの特徴的なシフトを「スレオニン・シフト (Threonine Shifts)」と命名することを我々は提案した。¹⁵ 上記の知見に基づいて、4 のデブシペプチド環のアミノ酸配列は、cyclic [Thr (1) → Val (1) → Val (2) → Thr (2) → D-Asn → D-Ala] であると決定した。

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Fusaricidins A (4) and B (5) in $\text{DMSO-}d_6$

Fusaricidin A				Fusaricidin B					
Moiety	Position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	Moiety	Position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)		
L-Thr (1)	1	56.8 ^{a)}	4.40 dd (8.6, 2.3)	L-Thr (1)	1	56.7	4.43 br d (8.5)		
	2	70.2	5.32 dq (6.2, 2.3)		2	70.1	5.34 m		
	3	16.2	1.15 d (6.8)		3	16.4	1.16 d (5.6)		
	4	168.3			4	168.1			
	1-NH		8.24 d (8.3)		1-NH		7.50 d (8.5)		
D-Val (1)	5	56.9 ^{a)}	4.42 dd (9.5, 8.3)	D-Val (1)	5	56.7	4.45 m		
	6	31.4	1.83 m		6	31.5	1.85 m		
	7	18.2	0.76 d (6.6)		7	17.9	0.75 d (6.4)		
	8	19.0	0.82 d (6.8)		8	19.0	0.81 d (6.4)		
	9	170.8			9	171.0			
	5-NH		7.26 d (9.0)		5-NH		7.30 d (9.5)		
L-Val (2)	10	57.8	4.23 dd (7.2, 7.2)	L-Val (2)	10	58.4	4.12 dd (7.2, 7.2)		
	11	30.0	1.99 m		11	29.5	2.00 m		
	12	18.0	0.87 d (6.1)		12	18.2	0.86 d (7.1)		
	13	19.2	0.85 d (6.1)		13	19.2	0.88 d (7.1)		
	14	172.9			14	172.2			
	10-NH		8.37 d (7.6)		10-NH		8.40 d (7.1)		
D-allo-Thr (2)	15	60.2	3.92 br s	D-allo-Thr (2)	15	59.7	3.94 dd (7.0, 7.0)		
	16	65.6	3.93 br s		16	65.6	3.96 m		
	17	19.5	1.10 d (5.8)		17	19.6	1.10 d (6.1)		
	18	170.2			18	170.3			
		15-NH			8.43 d (4.6)		15-NH		8.36 d (7.1)
	16-OH		4.97 br s		16-OH		5.01 br s		
D-Asn	19	50.3	4.28 dd (13.9, 6.6)	D-Gln	19	52.7	3.92 m		
	20	36.5	2.56 dd (15.1, 6.6)		20	26.1	1.99 m		
			2.77 dd (15.0, 6.5)				2.13 m		
	21	172.4			21	31.8	2.09~2.25 m		
	22	169.6			22	174.2			
	19-NH		8.07 br s		23	170.4			
	21-NH ₂		7.03 s		19-NH		7.87 d (8.1)		
			7.45 s		22-NH ₂		6.84 s, 7.28 s		
D-Ala	23	47.7	4.01 m	D-Ala	24	47.8	4.07 dd (7.3, 7.3)		
	24	17.2	1.15 d (6.8)		25	17.1	1.21 d (7.3)		
	25	170.5			26	170.5			
	23-NH		7.23 d (8.3)		24-NH		7.39 d (7.3)		
GHPD	26	171.8		GHPD	27	171.9			
	27	43.0	2.36 dd (13.5, 6.8) 2.45 dd (13.5, 5.0)		28	43.2	2.38 m		
	28	67.5	3.82 br s		29	67.4	3.80 br s		
	29	36.7	1.38 br s		30	36.7	1.38 br s		
	30	25.2			31	25.2			
	31~37	28.5	~1.24 br		32~37	28.9	~1.24 br		
		28.9						28.9	
		29.0						28.5	
		26.0						25.9	
		38	28.3		1.45 m	40	28.3	1.45 t-like	
		39	28.3		3.07 dd (12.8, 6.7)	41	40.6	3.07 dd (12.6, 6.3)	
		40	40.6			42	156.6		
		41	156.7						
	40-NH		7.60 t-like	41-NH		7.48 t-like			
	28-OH		4.99 br s	29-OH		4.89 br s			

GHPD: 15-guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid.

^{a)}: Assignments may be interchanged.

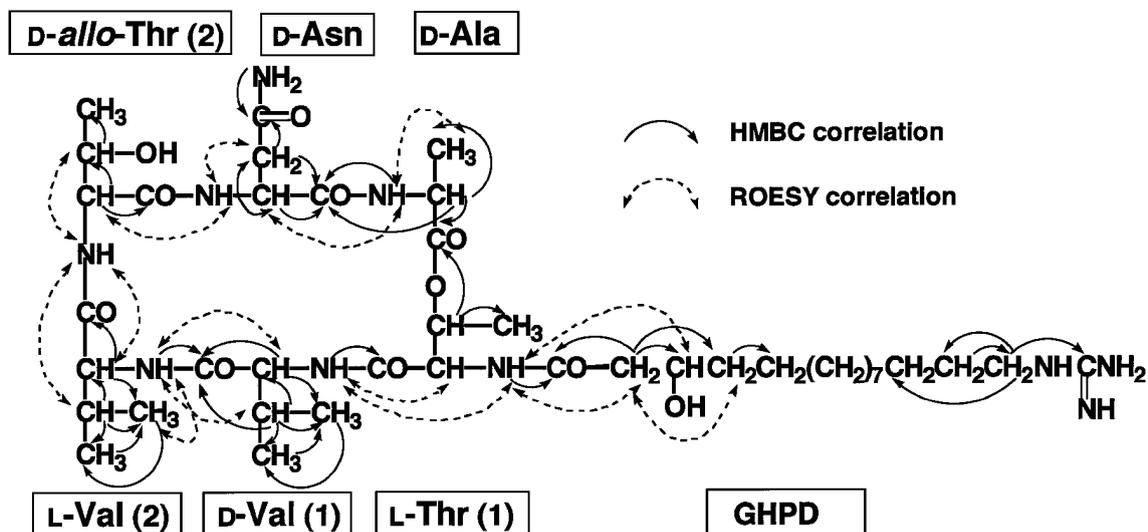


Fig. 11. HMBC and ROESY Correlations for Fusaricidin A (4)

残る問題は, Thr(1), Thr(2), Val(1), Val(2) 残基の立体配置であるが, この決定の概略を Fig. 12 に示す. すなわち 4 の部分酸加水分解を, 6N HCl を含む密封ガラス管の中で, 105°C で 6 時間反応させて行った. その加水分解産物は, 2次元 TLC 上で 1 個のペプチドスポットと 4 個のアミノ酸スポットを与えた. そのペプチドスポットを TLC プレートからかきとって溶出し, それを酸加水分解した産物は, キラル HPLC で分析した結果, L-Thr (*D-allo*-Thr ではない) と D-Val であった. 一方, このペプチドをダンシル化後, 加水分解したところ, DNS-Thr が得られた. この結果, ジペプチドの N 末端は, L-Thr であり, このジペプチドは, L-Thr → D-Val であった. ゆえに, Thr(1) は L-Thr, Val(1) は D-Val, Val(2) は L-Val, Thr(2) は *D-allo*-Thr である. このようにして, 4 のすべてのアミノ酸残基の絶対配置と配列位置を Fig. 12 のように決定した.

最後に脂溶性物質であるが, 6 個のアミノ酸残基で原子集団 $C_{25}H_{42}N_7O_9$ が形成されるので, 4 の分子式 $C_{41}H_{74}N_{10}O_{11}$ を考慮すると, 原子集団 $C_{16}H_{32}N_3O_2$ を脂溶性物質に分配できる. その内訳は, 1 個のカルボニル, 酸素が結合した 1 個のメチン, 13 個のメチレン, 1 個のグアニジノ基を含む. さらに, HMBC と ROESY より, $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$ 及び $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$ の部分構造が示されたので, 脂溶性物質は, 脂肪酸 15-

guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid (GHPD と省略) と決定された. 上述したように, 4 の酸加水分解で得られた脂肪酸は FAB-MS で $(\text{M}+\text{H})^+$, m/z 298 を与えたが, これは GHPD よりも 18 質量単位だけ小さい. 4 の完全酸加水分解中に, GHPD は脱水によって α, β -不飽和脂肪酸に変換したものと推定される. この脂肪酸側鎖は, 4 の HMBC と ROESY スペクトル (Fig. 11) の解析により, L-Thr 残基とアミド結合を形成していることが証明された.

上記の結果に基づいて, fusaricidin A (4) の全構造を Fig. 13 のように決定した. GHPD の C-3 (C-28)の絶対配置は決定できていない.

4. Fusaricidin B (5) の構造 分子式は, HRFAB-MS (測定値 m/z 897.5774 $(\text{M}+\text{H})^+$, 計算値 m/z 897.5712) と ^{13}C NMR データから $C_{42}H_{76}N_{10}O_{11}$ と決定された. この値は, fusaricidin A (4) より CH_2 単位大きい. 5 の完全酸加水分解を行って CHCl_3 で抽出した. この CHCl_3 層に含まれる脂溶性物質は, 4 から得られた GHPD の脱水生成物質と同一であった. 加水分解物の水層のアミノ酸分析より, 2 モルの Thr と Val, 1 モルの Ala と Glu の存在が示された. すなわち, 4 と比較して, Asp の代わりに Glu の存在が示された. アミノ酸の絶対配置は, 4 と同様にして, キラル HPLC (SUMICHIRAL OA-5000) により, L-Val, D-Val, L-Thr, *D-allo*-Thr, D-Glu, D-Ala と決定された. Fusaricidin B (5) 自身

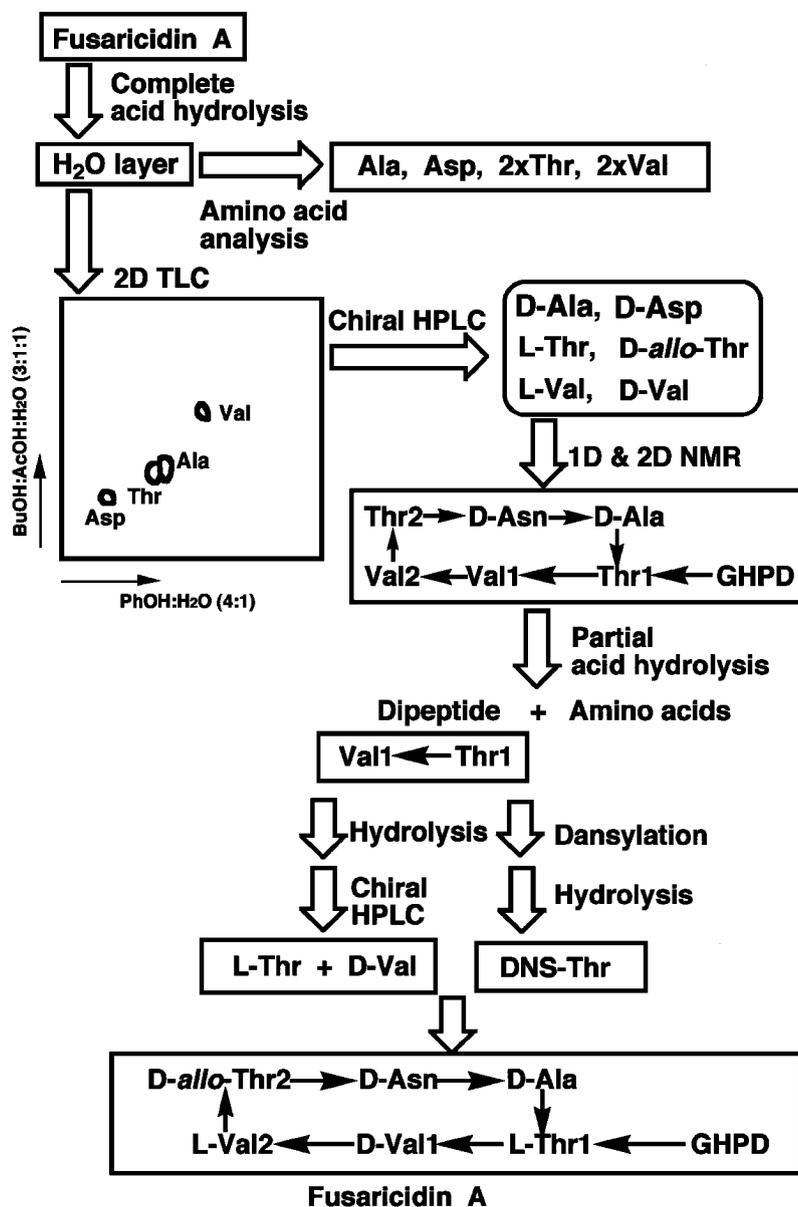


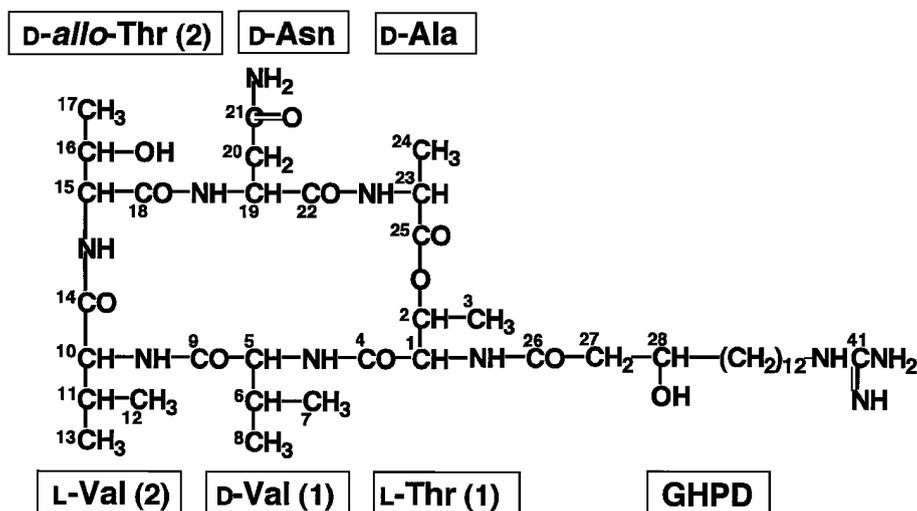
Fig. 12. Amino Acid Sequence of Fusaricidin A

は、ニンヒドリン反応陰性でジアゾメタンとも反応しない。これらの結果から、**5**は6個のアミノ酸残基とGHPD残基で構成され、不飽和度から、**4**に類似した環状の脂溶性ペプチドであると推定された。

5の¹H及び¹³C NMRスペクトルは、**4**のそれらと非常に類似していた。**5**の¹H NMRの低磁場領域にGln残基の末端アミド(CONH₂)プロトンに帰属できるsingletプロトンを確認した。このことから加水分解物水層のGluは、Gln残基から派生したことが判明した。**5**の6個のアミノ酸残基とGHPD残基のすべてのプロトン及び炭素のシグナ

ルの帰属は、Table 3のように決定された。

5における6個のアミノ酸残基の配列順序は、**4**と同様にして、NOESYとHMBCスペクトルから決定できた(Fig. 14)。**4**と同様にThr(1)の水酸基とAlaのカルボニル基との間でエステル結合が存在し、デブシペプチド環を形成している。Thr(1)の水酸基のアシル化の結果として、Thr(1)のβ-CH炭素(C-2)は低磁場にシフトし、α-CH(C-1)とγ-CH₃(C-3)は、高磁場にシフトして、先に提唱した「スレオニン・シフト」を呈している(上述)¹⁵⁾以上の結果より、**5**のアミノ酸配列は、



GHPD : 15-guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid

Fig. 13. Structure of Fusaricidin A (4)

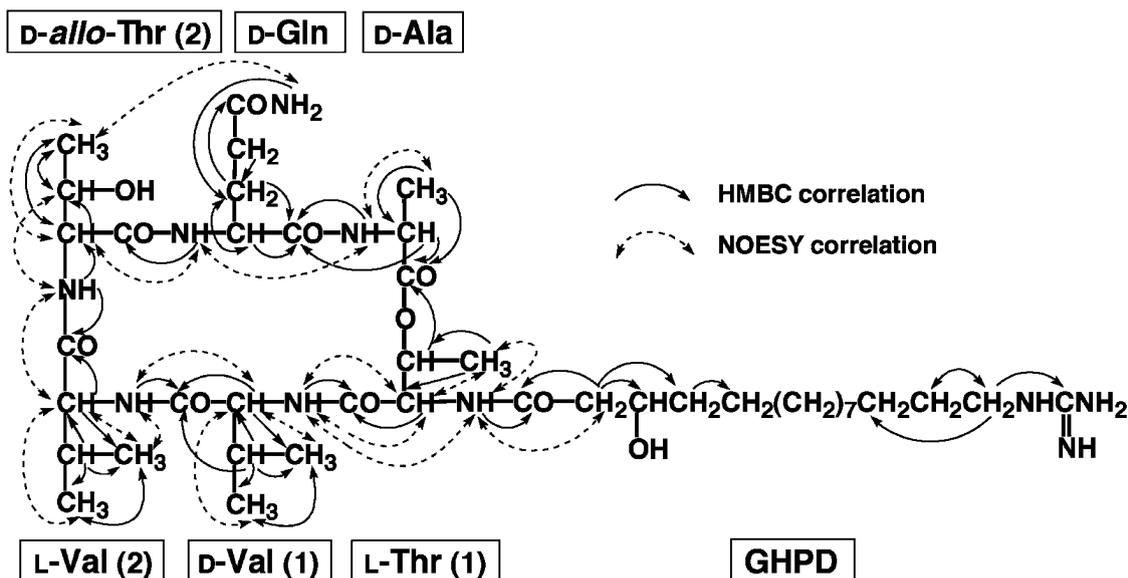


Fig. 14. Structure and HMBC and NOESY Correlations for Fusaricidin B (5)

Thr (1) と D-Ala との間でエステル結合した cyclic [Thr (1) → Val (1) → Val (2) → Thr (2) → D-Gln → D-Ala] と決定された。

GHPD は、4 と同様に、5 の HMBC と NOESY スペクトルの解析によって、アミド結合で L-Thr (1) 残基に結合していると決定された (Fig. 14)。

Thr(1), Thr(2), Val(1), Val(2) 残基の絶対配置は、4 と同様に 5 の部分酸加水分解を行うことによ

り、Thr(1) は L-Thr, Val(1) は D-Val, Val(2) は L-Val, Thr(2) は D-*allo*-Thr と決定された。以上の結果に基づいて、fusaricidin B (5) の構造を、fusaricidin A (4) の D-Asn が D-Gln に置換したヘキサデプシペプチドと決定した (Fig. 14)。

5. Fusaricidin C(6) 及び Fusaricidin D(7) の構造 前述したように、6 と 7 の分離は非常に困難で、純品としてではなく、おおよそ 4 : 1 の混合物

として得られた。この混合物の FAB-MS で強度が約 4 : 1 の 2 個の強いピーク (m/z 947 及び m/z 961) をそれぞれ **6** と **7** の偽分子イオン ($(M+H)^+$) として観測することができた。これらのイオンピークの HRFAB-MS と、 1H 及び ^{13}C NMR データから **6** の分子式を $C_{45}H_{74}N_{10}O_{12}$ 、**7** を $C_{46}H_{76}N_{10}O_{12}$ と決定した。**6** と **7** の混合物の完全酸加水分解を行い、 $CHCl_3$ で抽出した。水層のアミノ酸分析は、Thr (2.37 モル)、Ala (1.24 モル)、Val (1.21 モル)、Tyr (1.16 モル)、Asp (1.00 モル)、Glu (0.25 モル) を与えた。一方、 $CHCl_3$ 層の脂溶性物質は **4** 及び **5** の場合と同様に、加水分解中に GHPD から派生した脂溶性物質と同定された。これらのデータと、**4** 及び **5** のデータとの比較によって、**6** の組成は、Thr, Val, Tyr, *Allo*-Thr, Asn, Ala 及び GHPD であり、**7** の組成は、Thr, Val, Tyr, *Allo*-Thr, Gln, Ala 及び GHPD であると推定できた。**6** と **7** の混合物の 1H と ^{13}C NMR のスペクトルは、**6** に由来するシグナルの近傍に **7** の小さなシグナル (高さ約 4 分の 1) が伴っているか、あるいは両者が重なりあっていた。また、この混合物の DEPT, 1H - 1H COSY, HSQC, NOESY, HMBC, HOHAHA スペクトルを $DMSO-d_6$ 中で測定し、注意深く解析した結果、**6**、**7** それぞれの 6 個のアミノ酸及び GHPD のすべてのプロトンと炭素のシグナルを Table 4 のように帰属することができた。**6** と **7** の 1H NMR スペクトルで際立った特徴は、Val 残基のそれぞれのメチルシグナルが大きく高磁場シフト (それぞれ、 δ_H 0.57 と δ_H 0.39, 及び δ_H 0.57 と δ_H 0.44) していることであった。これらの著しい遮蔽は、Val 残基に隣接する Tyr 残基のベンゼン環の π 電流による磁気異方性に起因していると考えられる。

6 と **7** の 6 個のアミノ酸と GHPD の配列は、**4** 及び **5** の場合と同様に、NOESY と HMBC の相関によって決定された (Figs. 15 and 16)。

それぞれのアミノ酸残基の絶対配置は、サンプルが少量のため決定できなかつた。しかし、**4**、**5**、**6**、**7** はすべて生合成的に相関していると考えられるので、Thr と *Allo*-Thr の配列位置やアミノ酸の絶対配置はすべて同一であると考えられる。**4** と **5** 及び **6** と **7** の間の分離が困難だったことも、この考えを支持している。

上記の結果に基づいて、Fusaricidin C (**6**) と

Fusaricidin D (**7**) の構造を、それぞれ Fig. 15 及び Fig. 16 のように提出した。**6** は **4** の L-Val が Tyr に、**7** は **5** の L-Val が Tyr に置換した構造である。

6. 生物活性 Fusaricidin A (**4**)、B (**5**)、C (**6**) 及び D (**7**) の抗菌活性試験の結果を Table 5 に示す。予期されたように、**4**、**5**、**6** 及び **7** は、いずれも広い範囲の糸状菌に対し強い活性を示した。さらに、驚いたことに、これら抗生物質は *Staphylococcus aureus*、*Micrococcus luteus* のようなグラム陽性細菌に対しても極めて強い活性を示した。一方、**5** は、*Candida albicans* IFO1594 及び *Saccharomyces cerevisiae* HUT7099 のような酵母に対しても中程度の活性を示した。

考察

この研究において、ニンニク乾腐病の圃場より分離・同定した細菌 *Bacillus subtilis* FR-2 の培養液から、新規抗真菌抗生物質 Bacillopeptin A (**1**)、B (**2**)、C (**3**) を単離し、その構造が長鎖の β -アミノ酸を含む環状のリポペプチドであることを明らかにした。これまでに、これに類似した抗真菌物質としては iturin グループの bacillomycin L^{20,21)} が報告されているが、bacillomycin L の場合には、 β -アミノ酸残基部分が Fig. 17 に示すように 5 種類の炭素骨格の側鎖を持つ混合物として得られており、今回我々が初めて、長さの異なる個々の β -アミノ酸に対応する純粋な環状抗生物質 bacillopeptins A、B 及び C を単離することに成功した。 α -アミノ酸部分としては bacillopeptins の L-Asn と L-Glu に対し、bacillomycin L ではそれらがそれぞれ L-Asp と L-Gln であった (Fig. 17)。

本研究で初めて、 β -アミノ酸の側鎖の違いによる分離を完全に行うことができたので、この側鎖の異なる bacillopeptin A (**1**)、B (**2**) 及び C (**3**) の抗菌活性を測定したところ、活性強度に差があることが明らかになった。すなわち、活性は側鎖の長さ、あるいは末端の枝分かれに関係しており、側鎖が長く、末端が枝分かれしている場合に活性が高い傾向にあった。つまり、Bacillopeptin C (**3**) は、酵母とカビに中程度の活性を示したが (Table 2)、bacillopeptin A (**1**) と B (**2**) は $100 \mu g/ml$ においても活性を示さなかつた。Iturin 類の研究で、培地に適当なアミノ酸を添加することによって側鎖の長さを変えることができると報告されている。^{28,29)} これを応

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR Chemical Shifts of Fusaricidins C (6) and D (7) in $\text{DMSO}-d_6$

Fusaricidin C (6)				Fusaricidin D (7)				
Moiety	Position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	Moiety	Position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	
Thr	1	56.8	4.40 dd (8.8, 2.0)	Thr	1	56.6	4.42 dd (8.8, 2.0)	
	2	70.1	5.31 dd (6.6, 2.0)		2	70.0	5.33 dd (6.6, 2.0)	
	3	16.3	1.14 d (6.3)		3	16.5	1.15 d (5.9)	
	4	168.4			4	168.2		
	1-NH		8.13 d (8.5)		1-NH			7.59 d (8.3)
Val	5	57.3	4.13 dd (8.5, 8.5)	Val	5	57.2	4.16 m	
	6	30.9	1.60		6	30.9	1.62 m	
	7	18.1	0.57 d (6.8)		7	17.9	0.57 d (6.8)	
	8	18.5	0.39 d (6.6)		8	18.6	0.44 d (6.8)	
	9	170.1			9	170.2		
Tyr	5-NH		7.27 d (8.9)	Tyr	5-NH		7.33 d (8.8)	
	10	54.0	4.60 m		10	54.4	4.52 m	
	11	36.9	2.63 dd (13.5, 11.1)		11	36.9	2.65 m	
			2.86 dd (13.4, 3.9)				2.86 m	
	12	127.5			12	127.5		
13, 17	130.0	7.07 d (8.5)	13, 17	130.0	7.06 d (8.3)			
14, 16	114.6	6.60 d (8.5)	14, 16	114.6	6.60 d (8.5)			
allo-Thr	15	155.7		allo-Thr	15	155.9		
	18	172.9			18	172.9		
	10-NH		8.44 d (8.1)		10-NH			8.49 d (7.6)
	15-OH		9.11 s		15-OH			9.11 s
	19	60.3	3.86 m		19	59.7	3.94 dd (7.0, 7.0)	
Asn	20	65.7	3.86 m	20	65.7	3.89 m		
	21	19.7	1.09 d (5.9)	21	19.9	1.07 d (6.0)		
	22	170.4		22	170.4			
	19-NH		8.45 br s	19-NH			8.41 d (6.8)	
	20-OH		4.91 br s	20-OH			5.01 br s	
Ala	23	50.4	4.23 dd (13.6, 6.6)	Gln	23	52.9	3.87 m	
	24	36.1	2.55 dd (15.6, 6.6)		24	25.9	1.98 m	
			2.79 dd (15.4, 6.1)				2.11 m	
	25	172.4			25	31.7	2.07~2.23 m	
	26	169.5			26	174.2		
23-NH		8.20 br s	27	172.3				
GHPD	25-NH ₂		6.99 s	23-NH			8.01 d (7.1)	
	27	47.6	4.11 m	26-NH ₂			6.83 s	
			1.14 d (7.5)				7.25 s	
	28	17.5		Ala	28	47.7	4.18 m	
	29	170.3		29	17.5	1.19 d (7.3)		
27-NH		7.23 d (7.8)	30	170.4				
GHPD	30	171.8		GHPD	28-NH		7.34 d (7.9)	
	31	43.0	2.38 d (5.6)		31	171.8		
	32	67.4	3.81 br s		32	43.1	2.36 d (6.1)	
	33	36.7	1.36 br s		33	67.4	3.81 br s	
	34	25.1			34	36.7	1.36 br s	
	35~40	28.9	~1.24 br		35	25.1		
					36~41	28.9	~1.24 br	
	41	28.5			42	28.9		
	42	25.9			43	25.9		
	43	28.3	1.45 t-like		44	28.3	1.45 t-like	
44	40.6	3.07 dd (12.8, 6.7)	45	40.6	3.07 dd (12.8, 6.7)			
45	156.5		46	156.5				
44-NH		7.43 t-like	45-NH			7.43 t-like		
32-OH		4.91 br s	33-OH			4.85 br s		

GHPD: 15-guanidino-3-hydroxypentadecanoic acid.

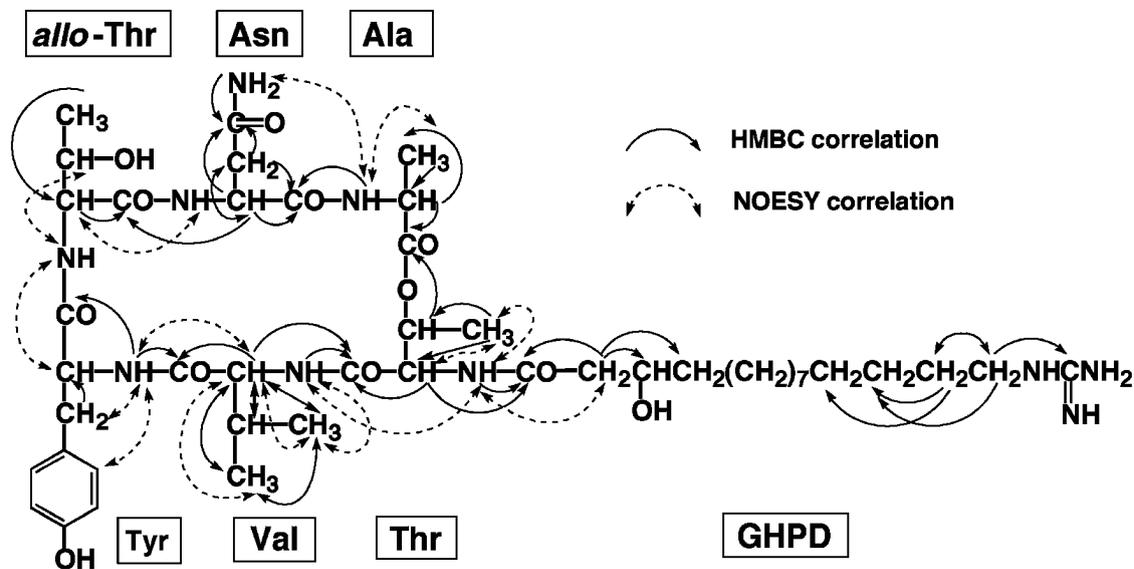


Fig. 15. Structure and HMBC and NOESY Correlations for Fusaricidin C (6)

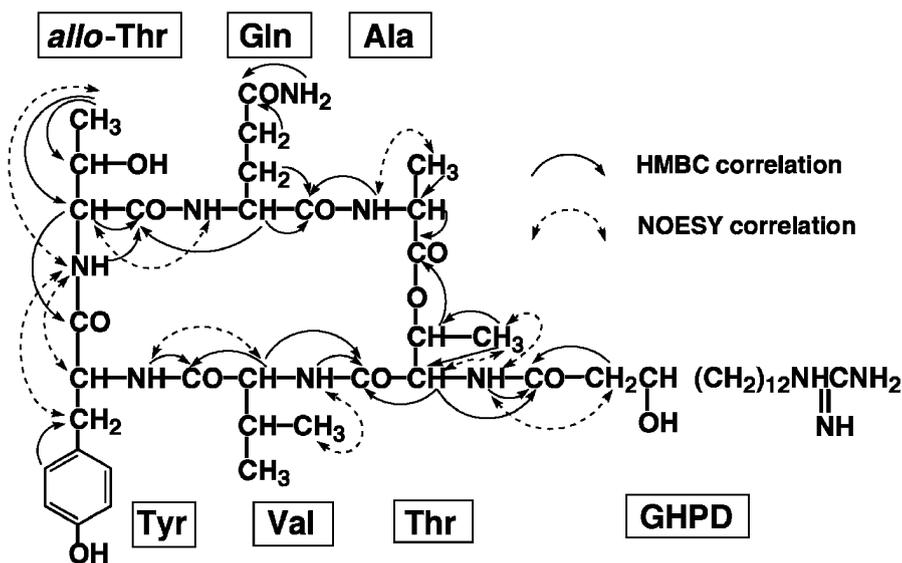


Fig. 16. Structure and HMBC and NOESY Correlations for Fusaricidin D (7)

用すれば bacillopeptins の活性をさらに高めることができるであろう。

また我々は同様に、ニンニク乾腐病の圃場より細菌 *Bacillus polymyxa* KT-8 を分離・同定し、その培養液から新規の抗真菌及び抗細菌抗生物質 fusaricidin A (4), B (5), C (6) 及び D (7) を単離して、その構造を、長鎖グアニジノ脂肪酸を含む脂溶性環状デプシペプチドと決定した。Fusaricidins は、真菌のみならず、*Staphylococcus aureus* FDA 209P

などのグラム陽性細菌に対しても強い活性を示したので (Table 5), メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対しても活性を示す可能性があることが示唆される。

Fusaricidins A 及び C に類似する物質としては、三菱油化株式会社が公開特許公報³⁰⁾に掲載しているペプチド物質で、*Bacillus* sp. KB-291 から得た KT-6291A (Fig. 18) 及び KT-6291B (Fig. 19) という化合物が存在するが、KT-6291A, B においては、

Table 5. Antimicrobial Activities of Fusaricidins A, B, C and D

Test organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	A	B	C and D (mixture)
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	<0.78	1.56	<0.78
<i>S. aureus</i> Smith	<0.78	1.56	<0.78
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 3333	<0.78	1.56	<0.78
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3.12	6.25	3.12
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	>100	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KC-1	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445	>100	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>100	>100	>100
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	>100	12.5	>100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HUT 7099	>100	12.5	>100
<i>Fusarium oxysporum</i> HF 8801 (pathogenic to garlic)	1.56	1.56	1.56
<i>F. oxysporum</i> HF 8835 (nonpathogenic to garlic)	1.56	1.56	1.56
<i>Aspergillus niger</i> HUT 2016	3.12	3.12	3.12
<i>A. oryzae</i> IFO 4214	3.12	3.12	3.12
<i>Penicillium thomii</i>	3.12	3.12	3.12

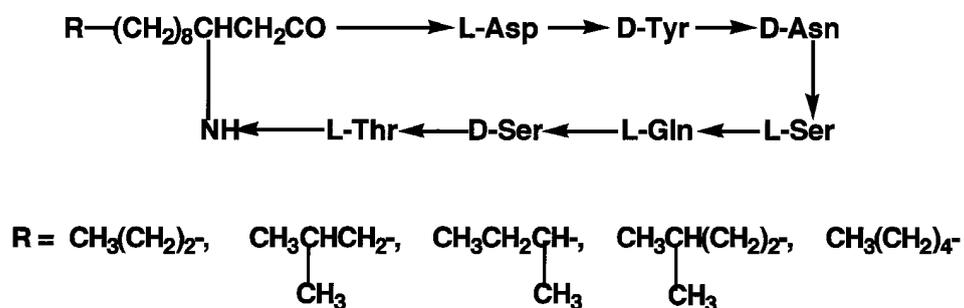
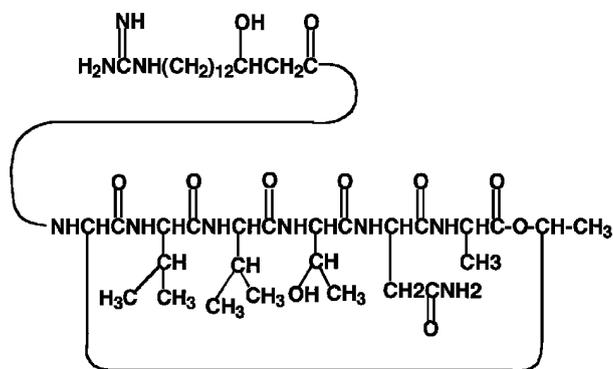
Fig. 17. Structure of Bacillomycin L Reported by F. Peypoux *et al.*

Fig. 18. Structure of KT-6291A

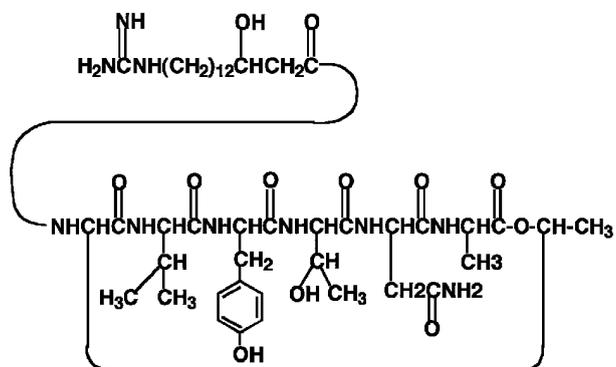


Fig. 19. Structure of KT-6291B

Thr と *allo*-Thr の配列位置が決定されておらず、また各アミノ酸残基の絶対配置も報告されていない。生物活性の面では、Fusaricidin A (4) 及び C (6) は、フザリウム菌 *Fusarium oxysporum* HF8801 及び *F. oxysporum* HF8835 に対して強い活性を示した (1.56 µg/ml) が、KT-6291A 及び KT-6291B は、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* に対して、100 µg/ml でも活性を示さなかった。以上のデータより、今回我々が発見した Fusaricidin A 及び C は、三菱油化の KT-6291A 及び KT-6291B とは異なる、新しい物質である可能性が高い。

これまでのペプチド抗生物質は、グラム陽性菌に有効なもの、グラム陰性菌に効果があるもの、真菌に作用するもの、制がん性や抗ウイルス作用を示すもの、免疫抑制作用を有するものなどその生物活性は多種多様であり、それはひとえにペプチド抗生物質の化学構造が、D-アミノ酸などの異常アミノ酸を含み、環状構造を持つことが多く、複雑な立体構造を有するものが多いなど非常に多岐多様にわたっていることが原因と考えられる。ここに得られた fusaricidins についても、その構造が非常に特異であり、その生物活性も、上述のごとく真菌と同時に細菌にも高い活性を示したことから、この物質の構造と生物活性の関係をさらに研究していくことは、ポリエン系でもアゾール系でもない新しいタイプの抗真菌抗細菌抗生物質の開発につながるものとして大いに期待できる。また、fusaricidins は、特異な長鎖グアニジノ脂肪酸及び D-アミノ酸を含む環状デプシペプチドであることから、その生合成経路の解明にも大いに興味を持たれる。

一方、本研究を通じて上記のような特異な新規抗生物質を発見できたことから、スクリーニングのために土壌を採取するとき、連作障害発病圃場のような、菌相が偏っている特殊な土壌を1つの候補として加えてみるのも価値があると考えられる。

また、目を転じて農業の分野では、生産性向上のために化学合成農薬の大量使用を続けた結果、土壌生態系の破壊、人間や家畜への毒性、残留農薬による環境汚染等の重大な問題を引き起こすまでに至っており、そのため人々の農業に対する考え方も変化して、生産効率の追求のみではなく、環境や安全性をも考慮した農業が求められるようになってきた。このような時代の要請の中で、化学農薬の代わり

に、環境にやさしい微生物の拮抗及び抗生等を利用して防除する、いわゆる「生物農薬」の試みが行われるようになってきた。^{18,31-33} 例えば、ある研究グループは、病害抑制活性のあるコンポスト中には iturin を分泌している *Bacillus subtilis* が生息していることを明らかにした。^{34,35} またこの属の細菌は、Dutch elm disease (*Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf) の生物学的防除に効果があり、その細菌も iturin 抗生物質を分泌していた。³⁶ 本研究で分離した細菌 *Bacillus subtilis* FR-2 あるいは *Bacillus polymyxa* KT-8 についても、こういった「生物農薬」への応用が可能と考えられる。

REFERENCES

- 1) Present Address: Healthcare Institute, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., 1624 Shimokotachi, Koda-cho, Takata-gun, Hiroshima 739-1195, Japan
- 2) Georgopapadakou N. H., Walsh T. J., *Science*, **264**, 371-373 (1994).
- 3) Andriole V. T., *J. Antimicrob. Chemother.*, **44**, 151-162 (1999).
- 4) Ito A., *Yakuji*, **41**, 101-105 (1999).
- 5) Yamaguchi H., *Rinsho to Biseibutsu*, **28**, 51-58 (2001).
- 6) Sugar A. M., "The Polyene Macrolide Antifungal Drugs, Antimicrobial Agents Annual 1, vol. 1," ed. by Peterson P. K., Verhoef J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1996, pp. 229-244.
- 7) Holeman C. W., Einstein H., *California Med.*, **99**, 90-93 (1963).
- 8) Sabra R., Branch R., *Drug Safety*, **5**, 94-108 (1990).
- 9) Dupont B., *Clinician*, **11**, 19-22 (1993).
- 10) Tumbarello M., Caldarola G., Tacconelli E., Morace G., Posteraro B., Cauda R., Ortona L., *J. Antimicrob. Chemother.*, **38**, 691-699 (1996).
- 11) White T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1482-1487 (1997).
- 12) Matsuo T., Komada W., Matsuda A., "Sakumotsu no Fuzariumu Byou," Zenkoku Nouson Kyōiku Kyōkai, 1980, p. 91.
- 13) Furutani H., Sato H., Suzuki A., Tsukamoto M., Kajimura Y., *Jpn. Kokai* 253827 ('94), September 13 (1994).

- 14) Kajimura Y., Sugiyama M., Kaneda M., *J. Antibiotics*, **48**, 1095–1103 (1995).
- 15) Kajimura Y., Kaneda M., *J. Antibiotics*, **49**, 129–135 (1996).
- 16) Kajimura Y., Kaneda M., *J. Antibiotics*, **50**, 220–228 (1997).
- 17) Sneath P. H. A., “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Section 13, Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci,” ed. by Sneath P. H. A., et al., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1986, pp.1104–1138.
- 18) Yoo S. J., Kobayashi K., Ogoshi A., Sugimoto H., Kajimura Y., *Phytopath. Soc. Japan*, **57**, 123–124 (1991).
- 19) Frankmölle W. P., Knübel G., Moore R. E., Patterson G. M. L., *J. Antibiotics*, **45**, 1458–1466 (1992).
- 20) Besson F., Peypoux F., Michel G., Delcambe L., *Eur. J. Biochem.*, **77**, 61–67 (1977).
- 21) Peypoux F., Pommier M. T., Das B. C., Besson F., Delcambe L., Michel G., *J. Antibiotics*, **37**, 1600–1604 (1984).
- 22) Hensens O. D., Liesch J. M., Zink D. L., Smith J. L., Wichman C. F., Schwartz R. E., *J. Antibiotics*, **45**, 1875–1885 (1992).
- 23) Yun B.S., Hidaka T., Furihata K., Seto H., *J. Antibiotics*, **47**, 1541–1543 (1994).
- 24) Hanada M., Sugawara K., Nishiyama Y., Kamei H., Hatori M., Konish M., *J. Antibiotics*, **45**, 20–28 (1992).
- 25) Okino T., Murakami M., Haraguchi R., Munekata H., Matsuda H., Yamaguchi K., *Tetrahedron Letters*, **34**, 8131–8134 (1993).
- 26) Shigematsu N., Hayashi K., Kayakiri N., Takase S., Hashimoto M., Tanaka H., *J. Org. Chem.*, **58**, 170–175 (1993).
- 27) Hochlowski J. E., Hill P., Whittern D. N., Scherr M. H., Rasmussen R. R., Dorwin S. A., McAlpine J. B., *J. Antibiotics*, **47**, 528–535 (1994).
- 28) Besson F., Hourdou M. -L., *J. Antibiotics*, **40**, 221–223 (1987).
- 29) Hourdou M. L., Besson F., Tenoux I., Michel G., *Lipids*, **24**, 940–944 (1989).
- 30) Takayama Y., Yamada S. (Mitsubishi Yuka Co., Ltd.), *Jpn. Kokai* 275898 ('90), Nov. 9, 1990.
- 31) Weller D. M., *Annual Review of Phytopathology*, **26**, 379–407 (1988).
- 32) Park C., Paulitz T., Baker R., *Phytopathology*, **78**, 190–194 (1988).
- 33) Homma Y., Suzui T., *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **55**, 643–652 (1989).
- 34) Phae C. G., Shoda M., Kubota H., *J. Fermentation and Bioengineering*, **69**, 1–7 (1990).
- 35) Phae C. G., Shoda M., *J. Fermentation and Bioengineering*, **70**, 409–414 (1990).
- 36) Schreiber L. R., Gregory G. F., Krause C. R., Ichida J. M., *Can. J. Bot.*, **66**, 2338–2346 (1988).