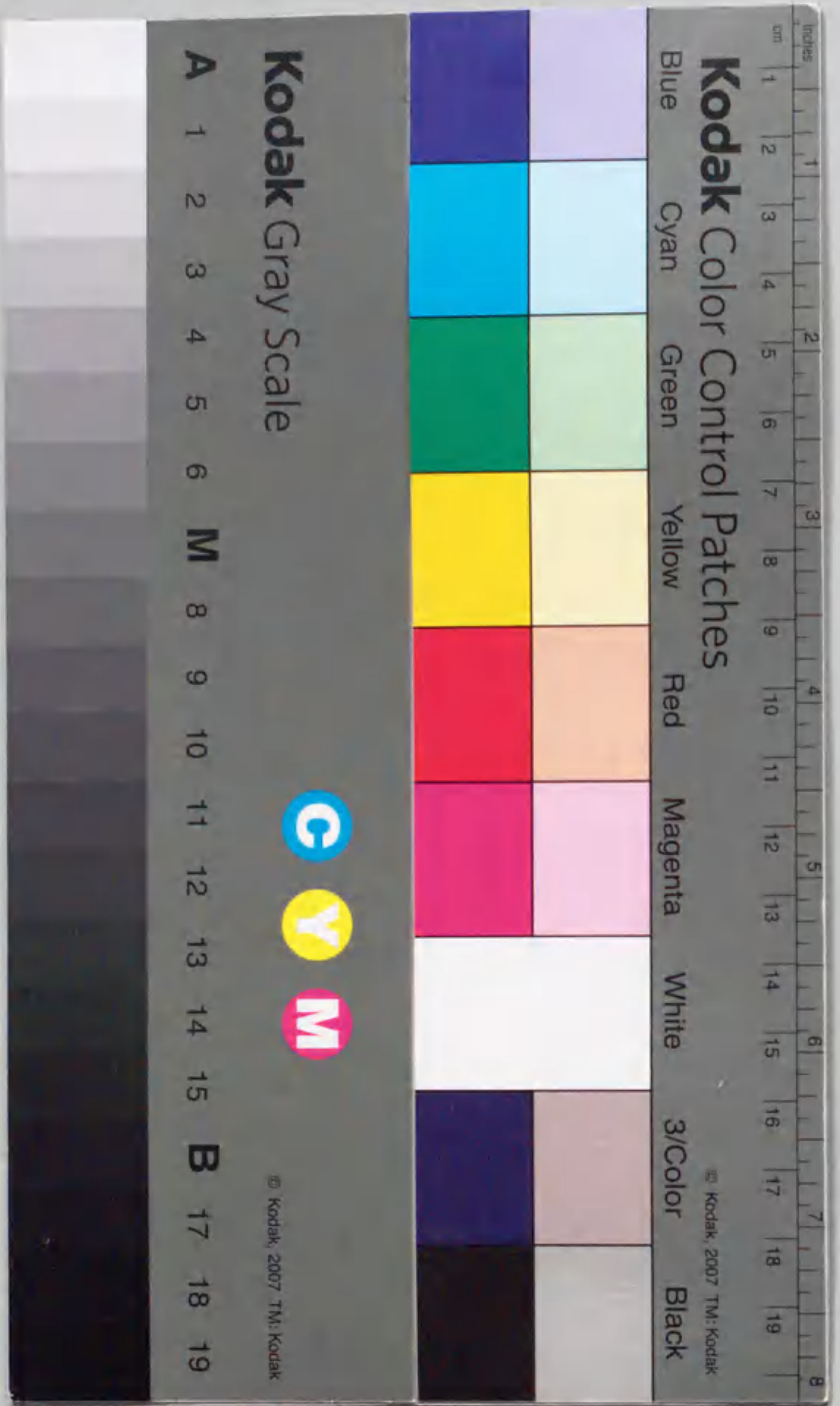


新ペプチド抗生物質アイベリンとその
ルーメン発酵改善作用に関する研究

熊澤茂則



報告番号 乙 第 4717 号

①

新ペプチド抗生物質アイベリンとその
ルーメン発酵改善作用に関する研究

1994年11月 熊澤 茂則

目 次

	ページ
第1章 序論	
1. 緒言	1
2. 抗生物質によるルーメン発酵調節作用	
2-1. 飼料添加剤としての抗生物質	2
2-2. ルーメン発酵の概要	5
2-3. ポリエーテル系抗生物質による飼料効率改善作用	11
3. 本研究の目的	14
第2章 アイベリンの単離精製とその理化学的性状	
1. 序	17
2. 結果及び考察	
2-1. アイベリン生産菌の同定	18
2-2. D1528株の培養とアイベリンの単離精製	20
2-3. アイベリンの理化学的性状	25
3. 要約	30
第3章 一次構造解析	
1. 序	31
2. 結果及び考察	
2-1. アミノ酸配列の決定	32
2-2. C末端成分の構造解析	41
2-3. 絶対構造の決定	45
3. 要約	50

第4章 NMRによる二次構造解析

- 1. 序.....51
- 2. 結果及び考察
 - 2-1. ^1H 及び ^{13}C -NMRシグナルの帰属.....54
 - 2-2. 二次構造の決定.....63
- 3. 要約.....71

第5章 *in vitro*におけるルーメン発酵に対する効果

- 1. 序.....72
- 2. 結果及び考察
 - 2-1. バッチ培養におけるアイベリンの効果.....74
 - 2-2. 連続培養におけるアイベリンの効果.....80
 - 2-3. バッチ培養におけるペプチド抗生物質の効果.....83
- 3. 要約.....88

第6章 *in vivo*におけるルーメン発酵に対する効果

- 1. 序.....89
- 2. 結果及び考察.....90
- 3. 要約.....100

第7章 モデル系を用いた脂質二重膜との相互作用

- 1. 序.....101
- 2. 結果及び考察.....103
- 3. 要約.....110

第8章 総括	111
実験の部	114
引用文献	124
謝辞	133
報文目録	134
参考論文目録	136

略号表

本論文中以下の略号を使用した。

- Aib: α -aminoisobutyric acid
- CD: circular dichroism
- COSY: correlation spectroscopy
- DM: dry matter
- DQF-COSY: double-quantum filtered COSY
- FAB: fast atom bombardment
- Fig.: figure
- HMBC: heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy
- HOHAHA: homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy
- HPLC: high performance liquid chromatography
- IR: infrared
- MP: melting point
- MS: mass spectrometry
- NDF: neutral detergent fiber
- NMR: nuclear magnetic resonance
- NOE: nuclear Overhauser effect
- NOESY: nuclear Overhauser effect spectroscopy
- PC: phosphatidylcholine
- Phaol: 2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol
- Phol: phenylalaninol
- TFA: trifluoroacetic acid
- TMS: tetramethylsilane
- UV: ultra violet
- VFA: volatile fatty acids

第1章 序論

1. 緒言

微生物によって生産され、微生物の発育を阻止する活性を持つ物質を抗生物質 (antibiotics) と称することを、Waksmanが1942年に提唱した。しかし、その後抗生物質は抗菌作用以外のさまざまな薬理作用が研究され、現在では、”抗生物質”とは微生物の生産する生物学的活性を示す物質の総称として用いられている。

抗生物質は現在までに多種類のものが多数報告されているが、最初の抗生物質の発見は1929年にFlemingによってなされた。彼は、19世紀末に知られていた微生物間の拮抗現象が微生物の生産物 (抗生物質) による事を示した。すなわち、青カビの一種が生産するペニシリン (penicillin) の発見である。ペニシリンは、ブドウ状球菌などのグラム陽性菌の発育を阻止した。その後、ペニシリンは、1940年にFloreyらが、Flemingの分離した青カビを用いてペニシリンを抽出し、それが臨床的に顕著な効果を有することを報告した。こうして、ペニシリンは抗生物質で最初の細菌感染症の治療薬となった。

ペニシリンの大量生産法の研究に従って、生産菌の改良法、培養法、力価検定法 (assay)、抽出法などの実験方法が開始された。ついで、ペニシリン以外の新抗生物質が、カビ、細菌、放線菌などの生産物について探索された。放線菌の生産する抗生物質としては、Waksmanが1941年にアクチノマイシン (actinomycin) を1943年にはストレプトマイシン (streptomycin) を報告した。それ以後、クロラムフェニコール (chloramphenicol)、テトラサイクリン (tetracycline) 系抗生物質、マクロライド (macrolide) 系抗生物質などが続々と発見され、細菌感染症に対する予防、治療体系が確立した。現在では、抗生物質の研究対象は、上記以外の分野、例えば農薬、動物薬、飼料添加剤及び酵素阻害剤にまで拡大した。そして、いろいろな生理活性を示す新しい抗生物質の探索が続けられている^{1~5)}。

本論文では、家畜用飼料添加剤としての抗生物質を研究対象としたので、以下その概説を試みる。

2. 抗生物質によるルーメン発酵調節作用

2-1. 飼料添加剤としての抗生物質

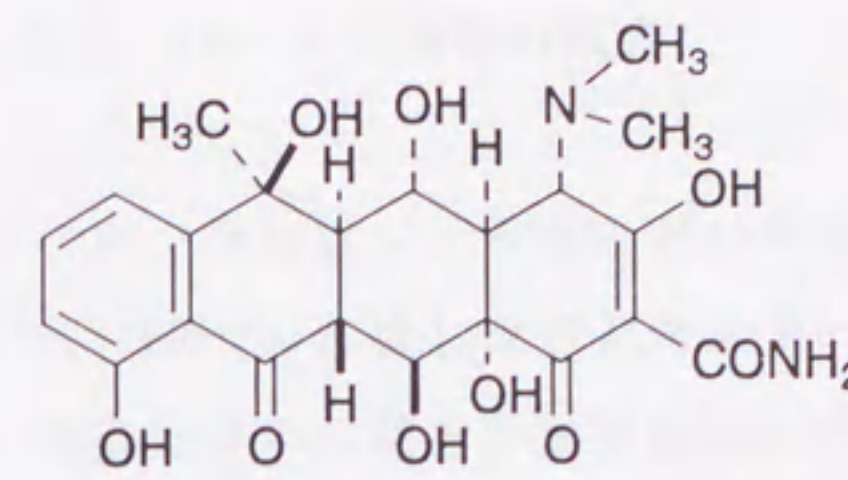
抗生物質は、人体だけでなく家畜の疾病の治療薬としても使用されているが、その抗生物質のほとんどは、本来人体用として開発されたものが動物用として転用されたものである。特に家畜には、多くの種類の体内寄生虫が知られており、その駆除のために多くの抗生物質が研究・開発されてきた。このような抗生物質としては、慢性的な呼吸器病を起こすマイコプラズマ症の治療薬としてのタイロシン (tylosin) やテトラサイクリン系化合物、線虫をはじめとする広い駆虫作用を持つアベルメクチン (ivermectin)、回虫症に有効なハイグロマイシン (hygromycin) などがあげられる。ところが、これらの抗生物質の中には、家畜の感染症を治療する効果だけでなく発育を促進させる効果、すなわち飼料効率改善効果を有するものも見出された。現在使われている動物用抗生物質は、こうした家畜の成長促進目的のために利用されているものがほとんどである^{3~9)}。

わが国においては、動物用抗生物質は飼料添加剤と動物用医薬品に明確に区別されている。すなわち、主に獣医師によって使用される注射剤、経口投与剤、挿入剤、注入剤などの動物用医薬品が動物の疾病の診断または治療の目的に用いられるのに対し、飼料添加剤は家畜の生産性向上と疾病の予防のために用いられるものである。家畜の成長促進目的のための抗生物質は飼料添加剤にあたる。飼料添加剤は、「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」(飼料安全法)のもとに、飼料添加物の一つとして規制されている⁹⁾。この法律では、飼料添加物とは、省令で定める用途に供することを目的として飼料に添加等の方法で用いるものと定義され、その用途とは以下のように定められている。

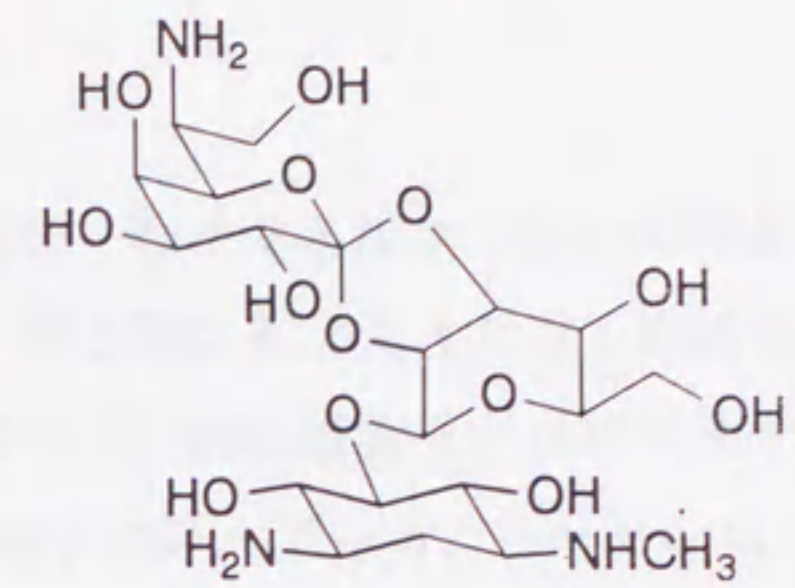
- ①飼料の品質の低下の防止
- ②飼料の栄養成分その他の有効成分の補給
- ③飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

このうち、家畜の成長促進目的のための抗生物質飼料添加剤は③に相当し、

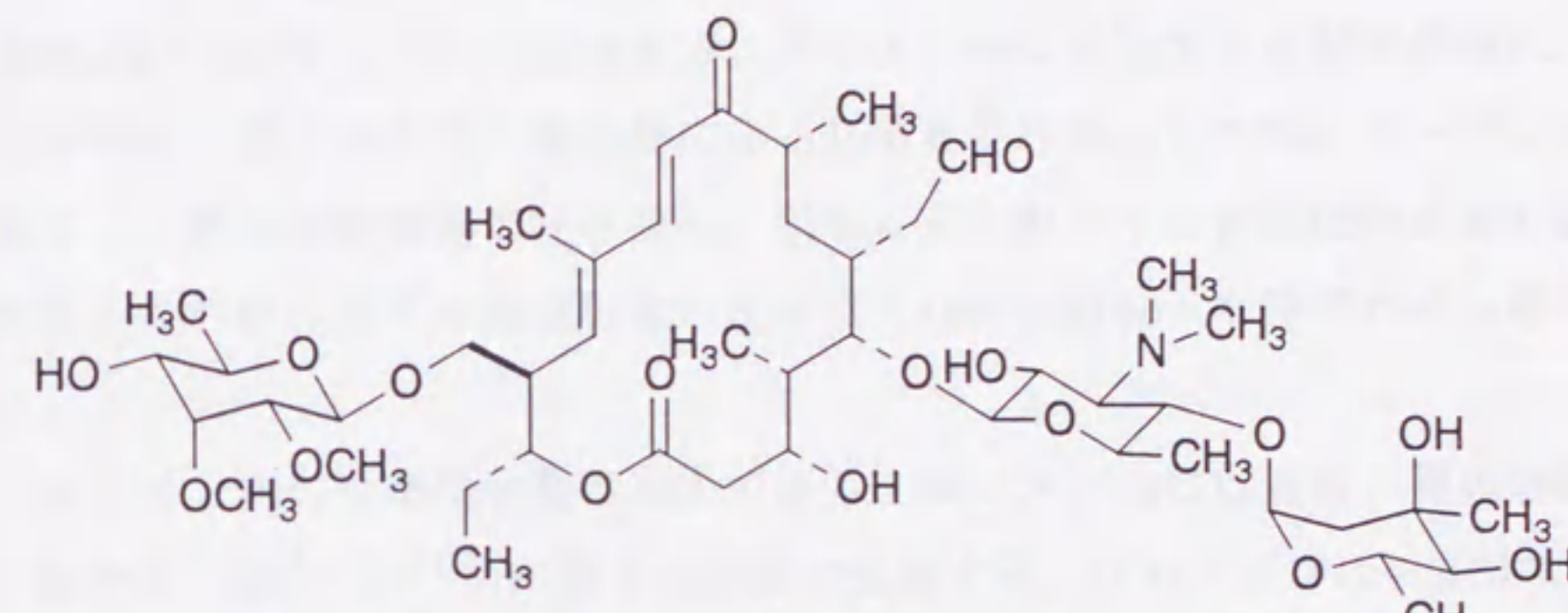
現在20種類以上の抗生物質が指定されている。その主な抗生物質をFig. 1に示したが、これらはブタやニワトリの生産性の向上に大きく貢献している。これらの抗生物質による動物の発育促進の作用機序は完全には解明されていないが、動物体内（主として消化管）に存在する有害微生物を減少させ、その結果微生物の毒性を除き、さらに微生物による栄養物の消費を抑制することにより、間接的に動物の成長を促進させると考えられている。以前は、ウシなどの反すう動物に対しては、第一胃内の有用微生物の正常な機能を妨害するので、抗生物質による発育促進効果は認められないとされていた¹⁰⁻¹²⁾。ところが、1976年に米国においてポリエーテル系抗生物質であるモネンシン（monensin）を肉牛用飼料に使用すると、発育促進、飼料効率の向上に非常に有効であることが判明した。その後、反すう動物に対するモネンシンの発育促進効果は、反すう動物の特徴であるルーメン発酵と密接な関係があることが明らかになり、多くの研究が行われるようになった¹³⁻¹⁶⁾。



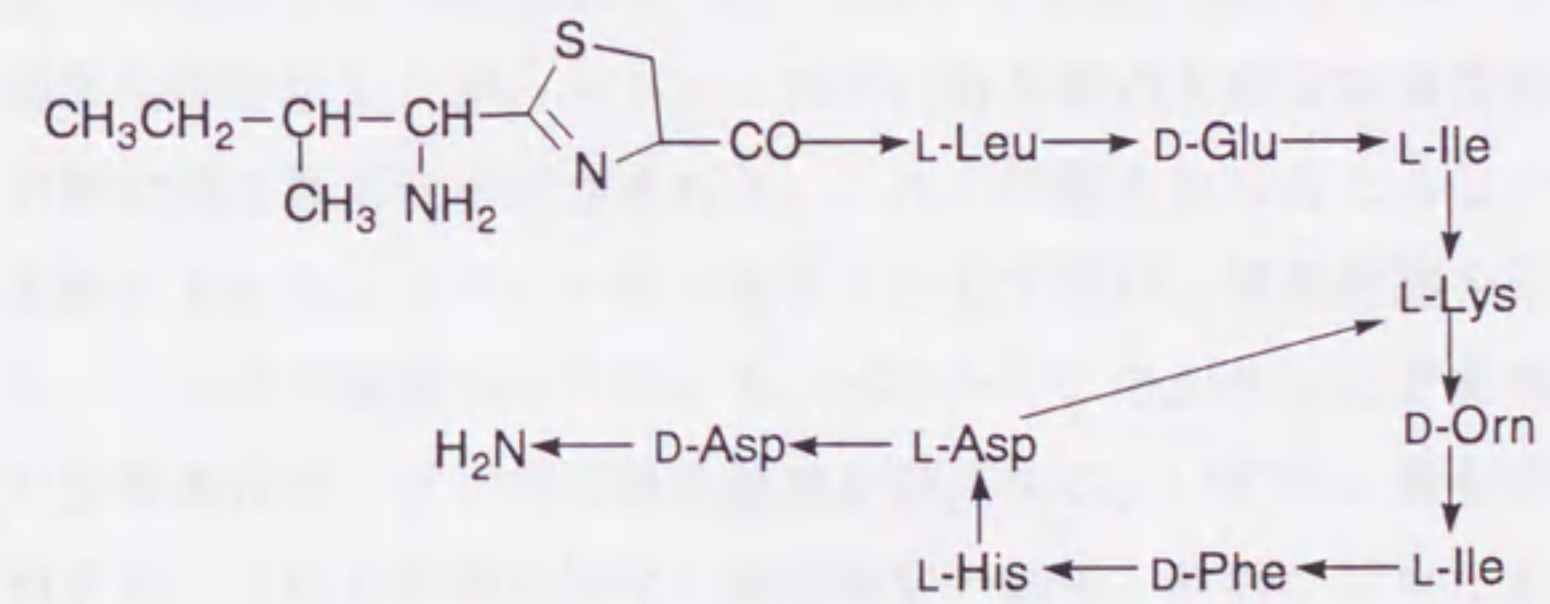
Oxytetracycline



Hygromycin



Tylosin



Bacitracin

Fig. 1. Structures of antibiotic feed additives.

2-2. ルーメン発酵の概要

ウシやヒツジ、ヤギなどの草食性哺乳類の一群である反すう動物の消化管は、四つの連続した胃を含んでいる。第一胃と第二胃は大きな穴で連結され、内容物はこの間をかなり自由に移動できるので、消化機能上からは区別せず、両者をあわせて反すう胃（ルーメン：rumen）と呼んでいる。ルーメンは、本質的には細菌類（bacteria）、原生動物（プロトゾア：protozoa）及び少数の真菌類（fungi）の詰まった大きな培養容器である。ウシではルーメンは容量約100～200リットルの袋である。ルーメン内に摂取された飼料食塊は、多量の唾液と混合されて、微生物による発酵を受ける。この際、ルーメン内食塊は、一定の時間間隔で吐き戻し、咀嚼、飲み下しが連続的に繰り返される。これが、反すう家畜特有の反すう（rumination）と呼ばれる行動である。

ルーメン内の全微生物数は莫大であり、ルーメン内には通常、胃内容物1 ml中に、 $10^9 \sim 10^{11}$ 個に達する細菌が生息する。プロトゾアは1 ml中に $10^5 \sim 10^6$ 個が生息する。プロトゾアは細菌に比べて個体数は少ないが、体形が大きいため、全体の体積としては細菌類に匹敵する。プロトゾアの内、反すう胃内に広く分布するのは繊毛虫類（ciliate）である。Table 1に、ルーメン内の主要微生物を示したが、ルーメン内常在微生物の大部分は偏性嫌気性菌であり少数の通性嫌気性菌が含まれる。これらの微生物のほとんどが飼料中の炭水化物を主たるエネルギー源（基質）として使い、嫌気発酵を行う。例えば、セルロース分解菌はセルロース、ペクチン、キシランなどを利用し、デンプン分解菌はデンプンや可溶性糖類を利用する。いずれの菌もグルコースを利用する。これらの微生物は、嫌気発酵の結果、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの揮発性脂肪酸（VFA: volatile fatty acids）を生産する¹⁷⁻²²⁾。一方、メタン生産菌はギ酸あるいは水素を基質としてメタンを発生し、硝酸や硫酸を還元する菌もある。

ルーメン微生物に関する研究は、培養法の進歩に伴い発展してきたが²³⁻²⁷⁾、これらの多数の異なる微生物による生化学的活性は、まだ詳細には解明されていない部分も多い。しかし、ルーメン全体としての機能は次のよう

にまとめることができる。すなわち、摂取された粗飼料中のセルロースなどの繊維成分は、セルロース分解性の細菌による分解を受け、セロビオースなどの二糖類や、グルコースなどの単糖類を経て中間代謝産物としてのピルビン酸から最終的には酢酸や酪酸などのVFA、及びコハク酸などの有機酸に変換される (Fig. 2)。濃厚飼料中のデンプンのような炭水化物も、基本的には同様の発酵によりVFAや有機酸に変換される。また、糖類、コハク酸、乳酸などからプロピオン酸生成菌によりプロピオン酸が生成する。VFAの生成割合は飼料条件によっても変動するが、一般的な飼養形態では酢酸が大きな割合を占め (50~70%)、次いでプロピオン酸 (15~25%)、酪酸 (10~15%) の順となる。ルーメン内で生成されるこれらのVFAの大部分はルーメン粘膜から吸収され、反すう動物の主要なエネルギー源となる。ルーメン内で増殖した微生物細胞は未消化の植物片とともに後部の消化管に送られる。ルーメン内では反すう動物からの消化酵素は分泌されないが、第四胃以降の消化管においてプロテアーゼやその他の消化酵素が分泌され、ルーメンから流下する微生物細胞を分解し消化する。その結果できるアミノ酸やその他の微生物細胞成分は動物体内に吸収される。ルーメン細菌は、大部分の哺乳類の排泄物であるアンモニアや尿素などのような非タンパク態窒素化合物で生育でき、したがって反すう動物は、単胃動物におけるような必須アミノ酸の供給がなくても生きられる。このように、ルーメン微生物はVFAの生成だけでなく、宿主動物へのアミノ酸の供給にも大きく寄与している^{19~22)}。

Fig. 3にルーメン内で生成したVFAの主な代謝経路を示した。酢酸は、大部分が門脈から肝臓を経て各組織に運ばれるが、アセチルCoAシンターゼの作用によりアセチルCoAに変換され、さらにTCA回路に入り酸化されてATP生成というエネルギー供給に働く。酪酸は相当部分がルーメン粘膜でケトン体の一つである β -ヒドロキシ酪酸に変換され、各組織内でアセト酢酸、アセトアセチルCoAを経てTCA回路に入る。一方、プロピオン酸は吸収直後に一部がルーメン粘膜で代謝されて乳酸を生成するが、大部分は門脈から肝臓に入る。ここでプロピオン酸はサクシニルCoAに変わり、TCA回路に入る。一方、かなりの部分がオキザロ酢酸、ホスホエノールピルビン酸を経てグルコースに変換される。このように、プロピオン酸は糖新生 (glyconeogenesis) に用いられ

る糖原性物質 (glucogenic substance) なので、グルコースという形での吸収が少ない反すう動物においては、栄養・生理学上きわめて重要である。また、プロピオン酸は還元反応によって生成されるエネルギー含量の高い化合物なので、ルーメンにおけるエネルギー転換効率という点でも大きな意味を持つ。すなわち、ルーメン内で炭水化物の発酵の結果生じたメタンは、げっぶとして体外に放出されるが、プロピオン酸の生成はメタンの生成によるエネルギー損失を少なくすることになる (Fig.2)。要するに、飼料エネルギーがプロピオン酸に行くことが非常に重要である。したがって、何らかの手段でルーメン内のプロピオン酸の産生比を高めることができれば、飼料の利用性が向上する^{13, 14, 28)}。すなわち、動物自身の肥育促進効果にもつながると考えられる。

Table 1. Rumen microorganisms.

Bacteria	<i>Streptococcus bovis</i>
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
	<i>Eubacterium ruminantium</i>
	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>
	<i>Prevotella ruminicola</i>
	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>
	<i>Succinimonas amylolytica</i>
	<i>Lachnospira multiparus</i>
	<i>Selenomonas ruminantium</i>
	<i>Ruminococcus albus</i>
	<i>Megasphaera elsdenii</i>
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	
Protozoa	<i>Entodinium</i>
	<i>Diplodinium</i>
	<i>Epidinium</i>
	<i>Polyplastron</i>
	<i>Eudiplodinium</i>
	<i>Ophyoscolex</i>
	<i>Dasytricha</i>
<i>Isotricha</i>	
Fungi	<i>Neocallimastix</i>
	<i>Piromyces</i>
	<i>Orpinomyces</i>
	<i>Sphaeromonas</i>

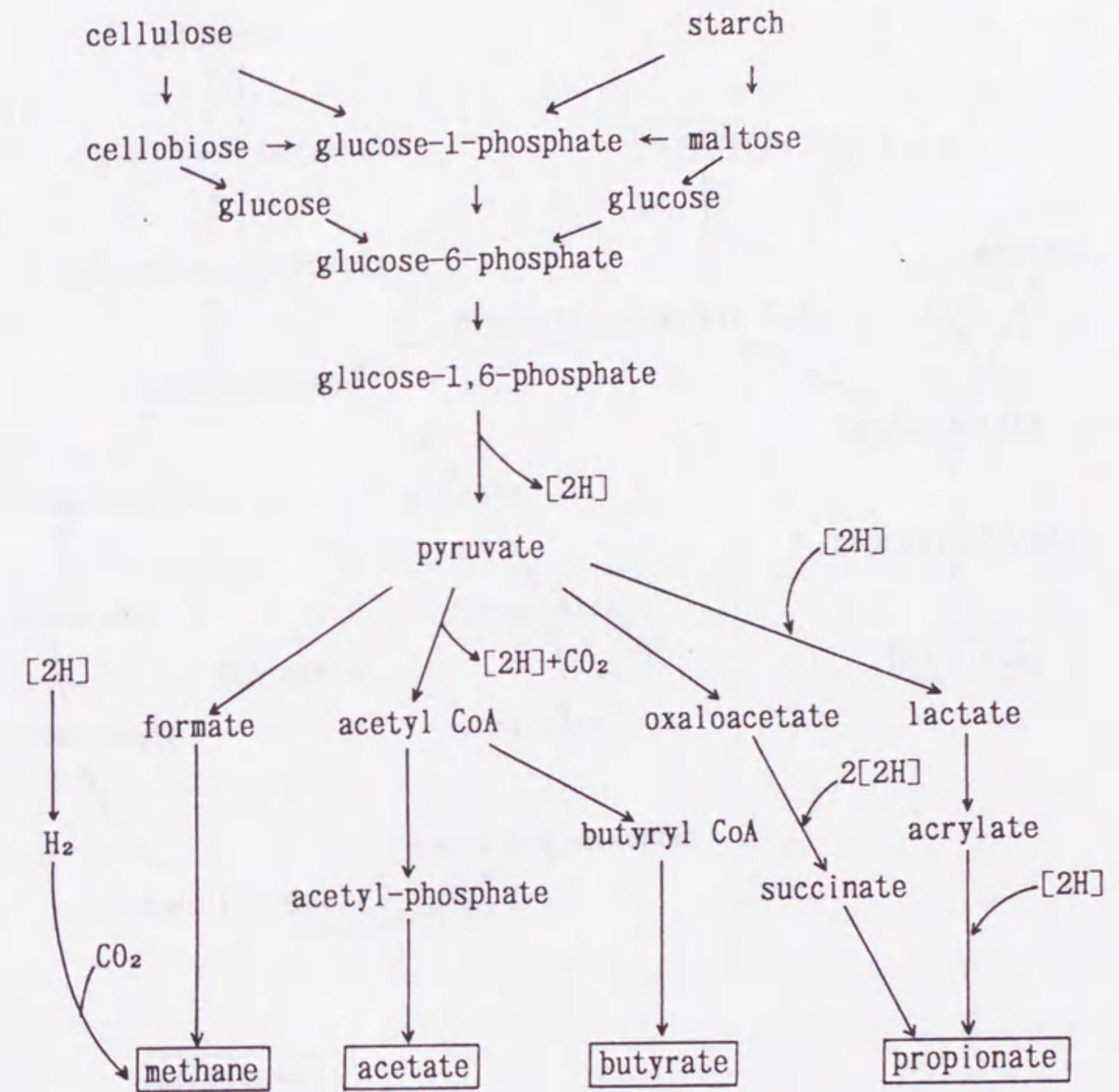


Fig. 2. Fermentation pathways of carbohydrate in the rumen.

$$[2H] = 2H^+ + 2e^-$$

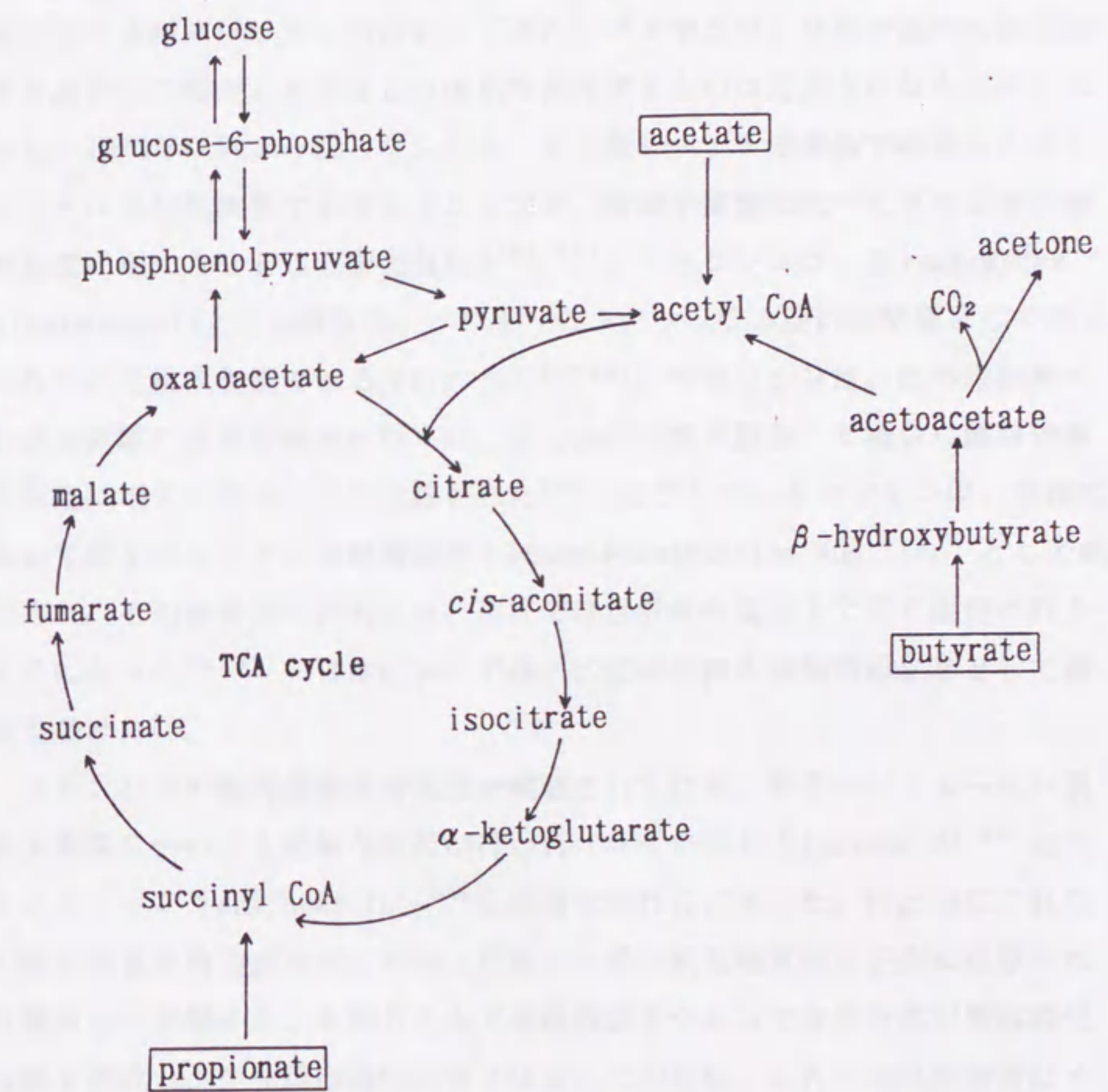


Fig. 3. Metabolic pathways of VFA in ruminants.

2-3. ポリエーテル系抗生物質による飼料効率改善作用

濃厚飼料を与えることなどにより、反すう動物のルーメン発酵による揮発性脂肪酸 (VFA) 中のプロピオン酸の比率を増加させて動物の肥育効果を高めようとする試みは以前から行われてきた。ブタやニワトリ用の種々の抗生物質も用いられたが、めざましい効果を発揮するものは見出されなかった。しかし、1976年にRaunらは、ウシのルーメン液をバッチ培養法で培養し、ポリエーテル系抗生物質であるモネンシンが、酢酸や酪酸に比べてプロピオン酸を有意に増大させることを発見した^{29, 30)}。モネンシンは、*Streptomyces cinnamonensis*より単離され、ニワトリのコクシジウム症の治療薬として用いられていた抗生物質である (Fig. 4)³¹⁻³⁴⁾。モネンシンは、成牛用飼料への添加試験により好結果が得られ、30 ppmの濃度で投与した場合に飼料効率を有意に増大させることが立証された³⁵⁾。こうして、モネンシンは、米国において成牛のルーメン発酵調節剤 (Rumen Fermentation Modifier) として承認され、その後各国で許可され、現在では世界40か国以上で広く使用されるようになった^{36, 37)}。日本においては、1985年に肉牛用飼料添加剤として指定を受けた⁹⁾。

モネンシンの飼料効率改善効果が確認されて以来、同系のポリエーテル系抗生物質についても同様な検討が行われ、ラサロシド (lasalocid)³⁸⁾とサリノマイシン (salinomycin)³⁹⁾も実用化されるに至った。Fig. 4にこれらの抗生物質の構造式を示したが、これら一連の抗生物質は分子内に配置された酸素原子が陽イオンを取り込んで環状構造をつくって分子全体が脂溶性化合物を形成し、生体膜透過性担体となる。このため、これらの抗生物質はイオノフォアと呼ばれるが、陽イオンとの結合選択性は薬剤の種類によって異なり、モネンシン、サリノマイシンは1価の陽イオン、ラサロシドは2価の陽イオンを取り込む。しかし、ルーメン発酵におけるプロピオン酸産生の増加の効果はほぼ同じである⁴⁰⁻⁴³⁾。

ポリエーテル系抗生物質の使用によるプロピオン酸増加以外の作用としては、ルーメン内におけるタンパク分解やアミノ酸の脱アミノ反応を抑制する作用⁴⁴⁾、乳酸産生を減少させる作用⁴⁰⁾、メタン産生を減少させる作用⁴⁵⁾。

⁴⁶⁾などが確かめられている。そして、これらのさまざまな作用は、ポリエーテル系抗生物質の特徴である生体膜におけるイオン透過性を変える働きによるものであり、その結果微生物の生理機能に何らかの影響を及ぼしているためと考えられている。主として、細胞内における Na^+ 、 K^+ 、 H^+ (pH)濃度あるいは細胞膜内外の濃度差を変えることにより、膜における物質の輸送や細胞内における代謝などが影響を受けると考えられるが、詳細なメカニズムは解明されていない。いずれにしても、このような作用を受けやすい微生物と受けにくい微生物があり、その結果特定の微生物が選抜され、全体的な影響として、上述のような現象が現れると考えられている^{14, 47)}。

このように飼料添加剤（発育促進剤）として世界中で使用されているポリエーテル系抗生物質であるが、いくつかの問題を含んでいることも事実である。最も大きな問題は、これらの抗生物質の毒性がきわめて強いということである（マウス経口投与、 $\text{LD}_{50}=43.8 \text{ mg/kg}$ ）⁴⁸⁾。そのため、フィールドでの使用はかなり限定されたものになる。また、ルーメン内のプロトゾアやセルロース分解菌の活動を抑制するという報告もされている^{49, 50)}。さらに、ポリエーテル系抗生物質は動物体内にそのまま分解されずに吸収されて、肉やミルクに移行するということがいわれている⁵¹⁾。このようなことから、現在ポリエーテル系抗生物質に代わりうるより有効で安全な薬剤（飼料効率改善剤）の開発が望まれている。また、近年、家畜の生産するメタンガスは地球温暖化の原因の一つともいわれている^{52~55)}。その点においても、有効な飼料効率改善剤の使用は家畜の糞尿の量を少なくすると同時に、家畜がげっふによって排出するメタンガスの産生量を減少させるので、環境汚染防止にも役立つことが期待される。

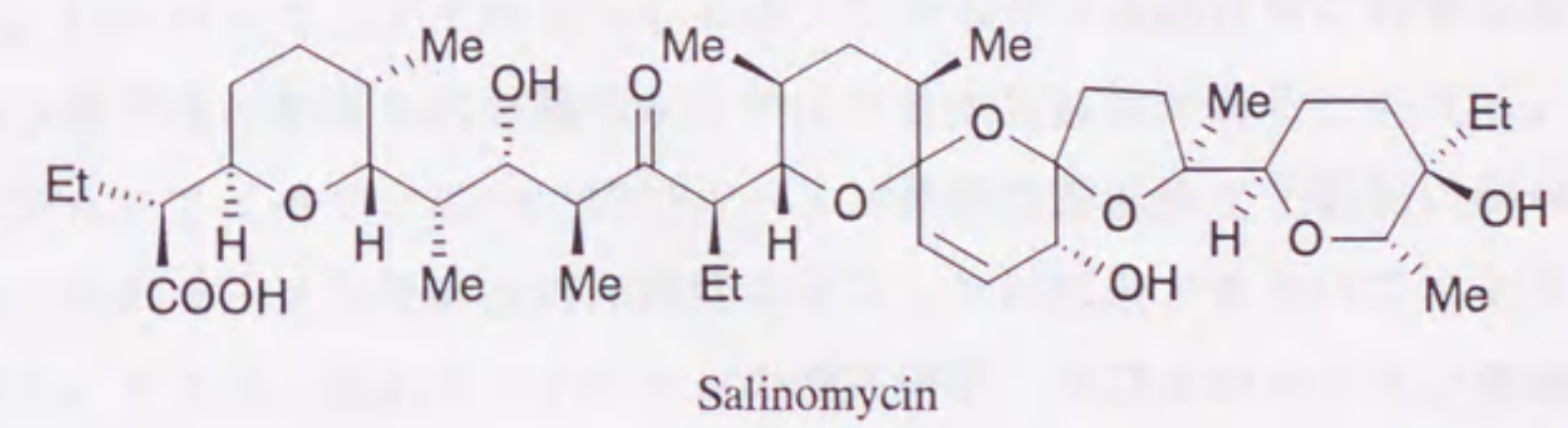
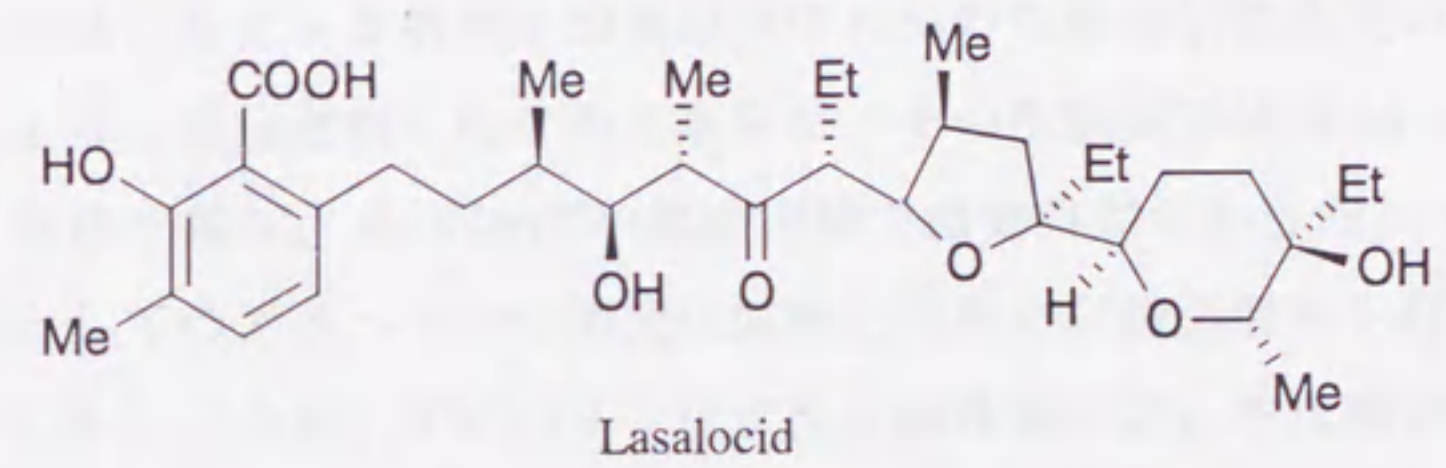
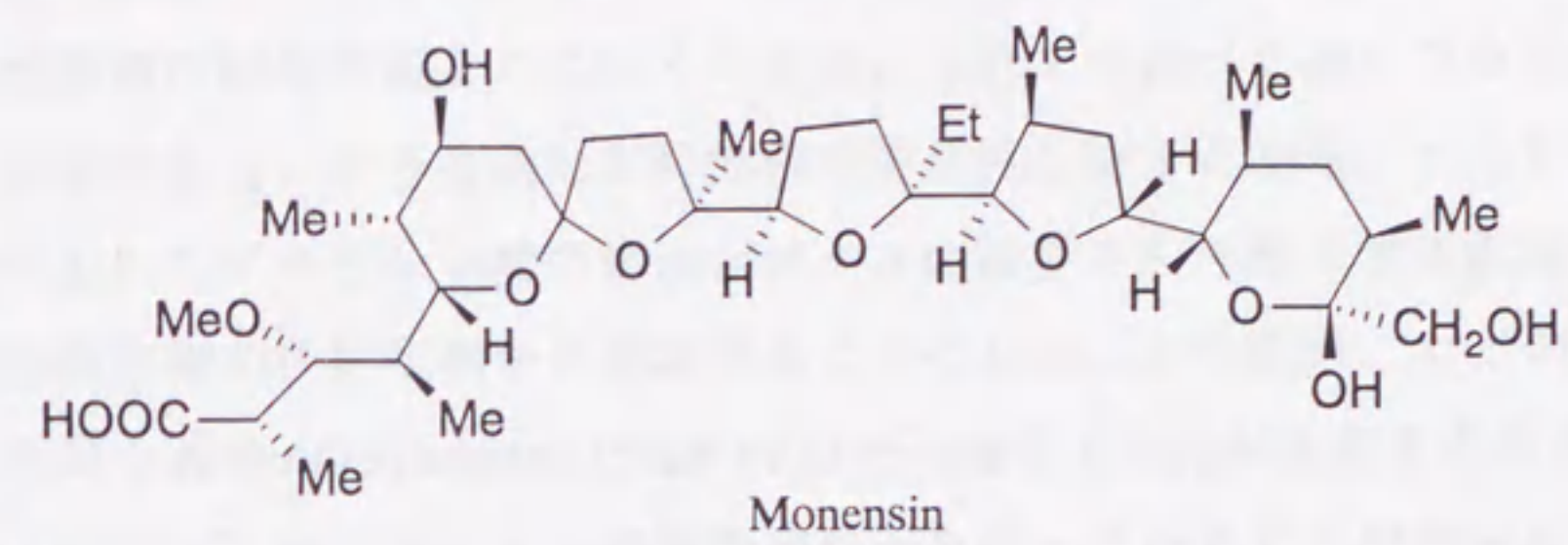


Fig. 4. Structures of polyether antibiotics for feed additives.

3. 本研究の目的

現在、モネンシンなどのポリエーテル系抗生物質に代わりうる新しい飼料効率改善剤の開発が望まれていることは、これまで述べた通りである。このような背景から、より有効な飼料効率改善活性を有する物質、すなわちルーメンにおいてプロピオン酸の増加とメタンの減少を引き起こす活性を有する物質を微生物の代謝産物から探索することにした。その結果、カビの一種である不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株が生産する抗生物質“アイベリン”が、ルーメン発酵改善作用を持っていることが明らかとなった。

アイベリンは、もともと抗寄生虫薬開発のための抗線虫活性物質のスクリーニングによって見出された化合物であるが、その抗線虫活性は *in vitro* で認められただけであり、*in vivo* での動物実験では効果がなかった。そのため、抗寄生虫薬としてのアイベリンの開発は困難と判断し、構造解析も行っていなかった。しかしその後、アイベリンはグラム陽性菌に対して抗菌活性を有していることが判明した。現在飼料効率改善剤として使われているモネンシンも、最初はグラム陽性菌に対する抗菌活性物質として見つめられたものである。したがって、アイベリンもモネンシンもグラム陽性菌に対する抗菌性という点では、かなり広い範ちゅうではあるが共通性があるといえる。このことから、アイベリンについてのルーメン発酵改善活性を予備的に調べたところ、そのルーメン発酵改善作用はモネンシンに匹敵するものであると予想された。そこで、改めてアイベリンの構造解析、及びそのルーメン発酵改善作用の詳細な検討を行うことにした。本研究の目的は、この新たな飼料効率改善剤としての可能性を持つ抗生物質アイベリンの構造を決定し、そのルーメン発酵改善活性を明らかにすることにある。具体的には以下のような検討を行った。

(1) アイベリンの単離精製と理化学的性状

アイベリンをカビの一種である *Verticimonosporium ellipticum* D1528株の培養液から単離精製し、その理化学的性状を調べた。この単離精製操作につ

いては、土壌自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* に対する抗線虫活性試験を指標にした。また、単離したアイベリンの抗菌活性についても調べた。

(2) 構造解析 (一次構造解析)

アイベリンの全構造を絶対構造も含めて決定した。アイベリンは20残基より成るペプチドであったが、N末端がアセチル基でブロックされ、異常アミノ酸である α -アミノイソ酪酸 (Aib) を多く (9個) 含んでいたため、その構造解析には主にFAB-MSを用いた。また、C末端には新規なアミノアルコールを有しており、このC末端アミノアルコールは、実際に標品を化学合成することによりその構造を決定した。構成アミノ酸及びアミノアルコールの絶対構造の決定は、アイベリンの完全加水分解物を光学分割HPLCカラムで分析することにより行った。

(2) NMRによる二次構造解析

アイベリンの溶液中における二次構造をNMRを用いて決定した。まず、各種二次元NMRを用いて、アイベリンの全アミノ酸及びC末端アミノアルコールの ^1H 及び ^{13}C -NMRシグナルの帰属を行った。このNMRシグナルの帰属結果に基づいて、主にNOESYスペクトルによる二次構造の詳細な解析を行った。

(3) *in vitro*におけるルーメン発酵に対する効果

*in vitro*におけるアイベリンのルーメン発酵改善効果を詳細に検討した。この活性試験方法は、ヤギのルーメンより採取したルーメン微生物をアイベリンを添加した培地で嫌氣的に培養し、プロピオン酸を含むVFAやメタンの生成量を調べるものである。また、プロトゾアやセルロース消化率に対する影響についても調べた。対照薬剤としてモネンシンを用いて活性の比較をした。

(4) *in vivo*におけるルーメン発酵に対する効果

*in vivo*におけるアイベリンのルーメン発酵改善効果を詳細に検討した。この活性試験は、アイベリンを摂取させたヤギのルーメンより採取したルーメン液中のプロピオン酸の増減を分析するものである。*in vitro*試験時と同様に、プロトゾアやセルロース消化率に対する影響についても調べ、対照薬剤としてモネンシンを用いた。

(4) モデル系を用いた脂質二重膜との相互作用の検討

アイベリンと生体膜との相互作用を、脂質二重膜のモデル系を用いて検討

第2章 アイベリンの単離精製とその理化学的性状

1. 序

第1章で既に述べたように、ウシなどの反すう動物は、飼料として摂取したセルロースやデンプンを第一胃（ルーメン）内に棲息している多種多様な微生物の発酵作用により、酢酸、酪酸、プロピオン酸などの揮発性低級脂肪酸（VFA）に変換している。そして、これらのVFAの中でもプロピオン酸の生成が重要な意味を持つ。プロピオン酸産生比率を高めて反すう動物の肥育効果を上げることを目的に、現在モネンシンやサリノマイシンなどのポリエーテル抗生物質が飼料添加剤として使用されている。しかし、これらの化合物は毒性が強いため、毒性の低い安全な薬剤の開発が望まれている。

今回、*in vitro*におけるルーメン発酵のアッセイ系を利用して、現在飼料添加剤として使用されているポリエーテル抗生物質に代わりうる有用な化合物を、微生物の代謝産物より探索することにした。このアッセイ系は第5章で詳細に述べるが、ヤギのルーメンより採取したルーメン微生物混液にテストサンプルを加えて嫌気性下で培養し、プロピオン酸の増加を活性の指標とするものである。その結果、カビの一種である不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株が生産する抗生物質アイベリンが、ルーメン発酵改善活性を有していることが判明した。

アイベリンは、もともと *Caenorhabditis elegans* に対する抗線虫活性物質として見出した化合物であるが、実用性価値がないと判断されたために、その構造決定もなされていなかった。しかし、アイベリンは、現在飼料効率改善剤として使われているモネンシンと同様にグラム陽性菌に対する抗菌活性を有していた。このことから、アイベリンのルーメン発酵改善作用を調べることを考えたわけである。

本章では、アイベリン生産菌であるD1528株の同定と培養、及びアイベリンの単離精製とその理化学的性状について述べる。

2. 結果及び考察

2-1. アイベリン生産菌の同定

Fig. 5にアイベリン生産菌D1528株の顕微鏡写真を示した。この菌株は、能登半島で落葉落枝より分離されたカビの一種である。Matsushimaのモノグラフ^{56, 57)}及びCarmichaelらの文献⁵⁸⁾に記載されている方法に従って、このD1528株の同定を行った。

D1528株の形態的性状は次の通りであった。コロニーはPDA培地上、2週間で直径3.5 cmに至り、表面は白色、裏面は黄味白色を呈する。コロニー外観はピロード状である。基底菌糸と気菌糸は良く発達して分岐し、隔壁を有する。分生子柄は気菌糸より生じ、長さ100~200 μm 、幅1.5~3.0 μm で隔壁を有し、隔壁形式部位で分節して脱落する。分生子形成細胞は主軸より3~7本輪生して生じ、楕円形で、大きさは(6~8.3) \times (3~4) μm に至る。以上の特徴よりこの菌は、不完全菌 *Verticimonosporium* 属に分類されることがわかった。*Verticimonosporium* 属は、1971年にMatsushimaによって設定された新属で、*V. ellipticum*と*V. diffractum*の2種が知られている^{56, 57)}。前者は楕円形の分生子を持ち、後者は球形の分生子を有するのが特徴である。D1528株は楕円形の分生子を有することから、*Verticimonosporium ellipticum*と同定した。



Fig. 5. Scanning electron micrograph of *Verticimonosporium ellipticum* D1528.

2-2. D1528株の培養とアイペリンの単離精製

D1528株培養のための培地組成をTable 2に示した。

Table 2. Composition of medium.

Starch	2%
Glucose	0.5%
Soybean oil	5%
Pharmamedia	2%
Soybean protein	2%
Staminol	0.2%
CaCO ₃	1%

この培地 (pH 6.0) を80 mlずつ500 mlの三角フラスコ100本に分注し、これにD1528株を1白金耳ずつ植菌し、27°Cにおいて7日間、210回転にて振とう培養を行った。この培養液より、*in vitro*における*Caenorhabditis elegans*に対する抗線虫活性を指標に活性物質の単離精製を行った。

Fig. 6に活性物質の単離精製スキームを示した。D1528株の培養液 (8リットル) に、メタノールを8リットル加えて攪拌した後遠心分離して培養上清液を得た。この上清液 (計16リットル) を8リットルまで濃縮し、4リットルの酢酸エチルで2回分配し、水層をさらに4リットルの*n*-ブタノールで2回抽出した。*n*-ブタノール抽出物を減圧下で濃縮することにより、褐色粉末を約3 g得た。この粉末を、0.1%トリフルオロ酢酸を含む50%メタノールを溶出溶媒とする中圧の逆相ODSカラムクロマトグラフィーに付して分画を行った。抗線虫活性を有するフラクションを集め、さらに0.1%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリルを溶出溶媒とするHPLC (ODSカラム) により、活性物質の精製を行った。Fig. 7にそのHPLCクロマトグラムを示すが、活性は斜線の区分に認められた。この区分を集めて再度同じHPLC条件で精製し、抗線虫活性物質アイ

ペリンを1.3 g得た。

アイペリンは、*C. elegans*に対して12.5 ppmで顕著な抗線虫活性を示した⁵⁹⁾。これは、市販の動物用抗寄生虫薬であるアベルメクチンと同程度の活性であった。しかし、アイペリンは *in vitro*での抗線虫活性が認められたのみであって、*in vivo*ではまったく活性が認められなかった。このことから、アイペリンの抗寄生虫薬としての実用化は困難と判断し、構造解析は行わなかった。しかし、アイペリンの抗微生物活性を調べたところ、Table 3に示したように *Bacillus subtilis*や *Micrococcus luteus*などのグラム陽性細菌に対して特に強い抗菌活性があることが判明した⁵⁹⁾。このことから、既に述べたように、ルーメン発酵改善作用を検討することを考えたわけである。その予備検討の結果、アイペリンは既存の飼料効率改善剤であるモネンシンと同等のルーメン発酵改善作用を有していることが予想された。次節ではアイペリンの理化学的性状について述べる。

Table 3. Antimicrobial activity of aibellin.¹

Test organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Bacillus subtilis</i>	6.2
<i>Micrococcus luteus</i>	6.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5
<i>Bacteroides fragilis</i>	25
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
<i>Serratia marcescens</i>	50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
<i>Candida albicans</i>	100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	25
<i>Trychophyton mentagrophytes</i>	>100

¹MIC was determined by the agar dilution method.

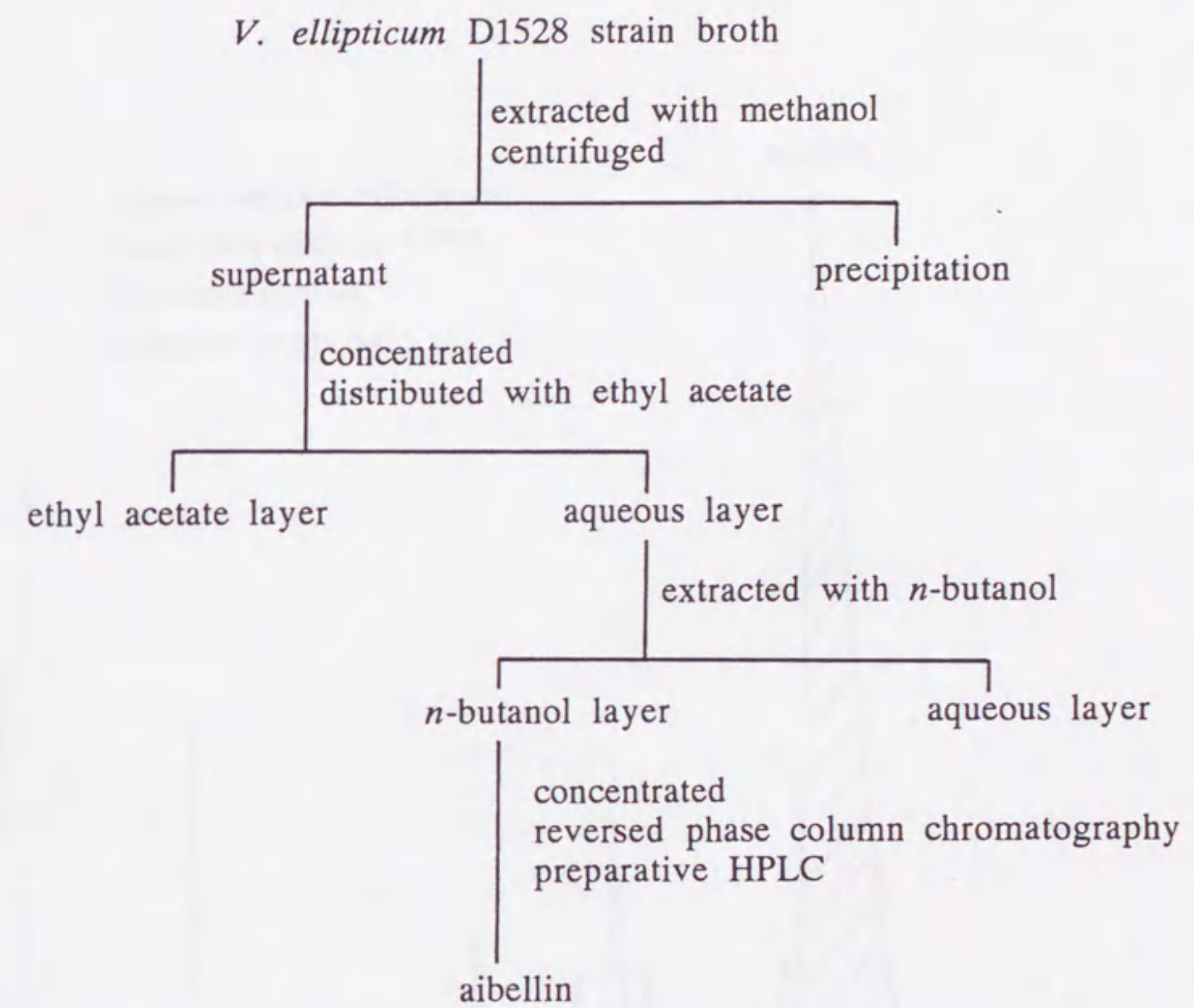


Fig. 6. Isolation procedure of aibellin.

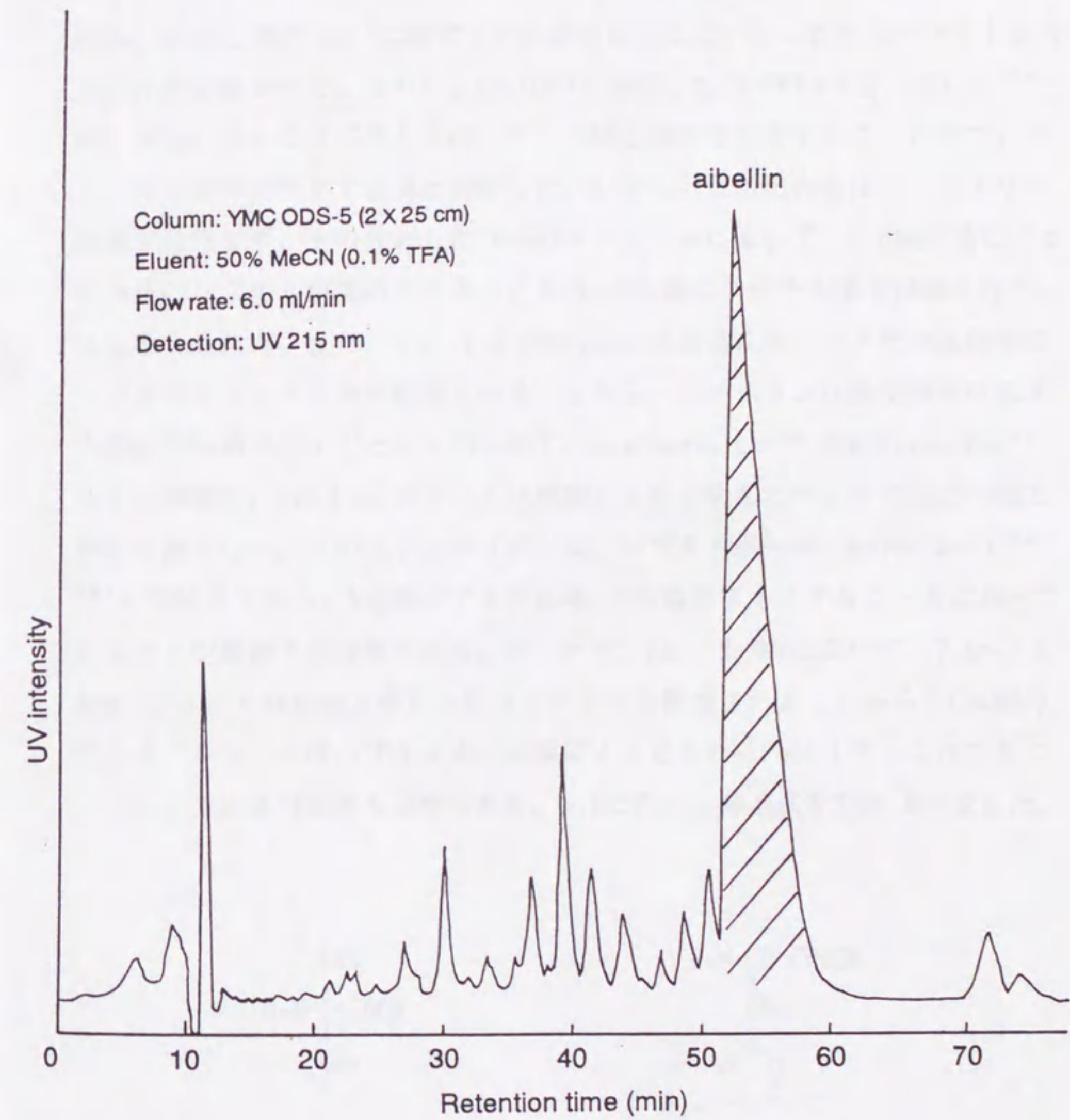
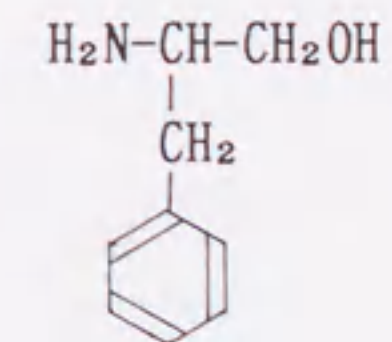
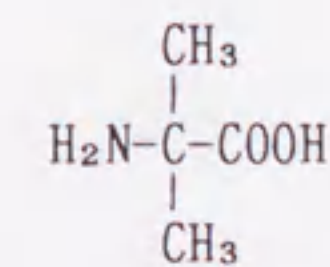


Fig. 7. Preparative HPLC chromatogram of aibellin.

2-3. アイベリンの理化学的性状

Table 4に、アイベリンの理化学的性状をまとめた。Fig. 9に示したIRスペクトルにおいて、 3300 cm^{-1} の水酸基、 2980 と 2930 cm^{-1} のアルキル基の吸収の他、 1660 と 1540 cm^{-1} に酸アミドの吸収を示していたことからペプチド結合の存在が示唆された。さらに、 CD_3OH 中で測定した $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 10) と $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 11) のスペクトルは、アミドNHとCOの存在を示していたので、アイベリンはペプチドであると判断した。しかし、この化合物はニンヒドリン試薬で呈色せず、その代わりに $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、 2 ppm 付近にアセチル基のシグナルが認められることから、N末端はアセチル基で保護されていると考えられた。また、 $1.3\sim 1.6\text{ ppm}$ 付近には非常に多くのメチル基由来のシングレットシグナルが観測されることから、アイベリンは微生物が生産する直鎖の抗菌ペプチドとして知られているalamethicin⁶⁰⁾やantiamoebin⁶¹⁾などと同様に、Aib (α -アミノイソ酪酸) を多く含んだペプチド類の一種であると推定した。このようなペプチドは、ペプタイポール (peptaibol)^{62~79)}と呼ばれており、N末端がアセチル基、C末端がアミノアルコールになっていることが構造上の特徴である。アイベリンは、 $^1\text{H-NMR}$ において、 $7.1\sim 7.4\text{ ppm}$ にフェニル基由来と考えられるシグナルも観測されることから、C末端のアミノアルコールはペプタイポール類によく見られるPhol (フェニルアラニノール) である可能性も示唆された。AibとPholの構造式をFig. 8に示した。



Aib (α -aminoisobutyric acid)

Phol (phenylalaninol)

Fig. 8. Structures of Aib and Phol.

Table 4. Physico-chemical properties of aibellin.

Appearance	pale brown powder
MP	192~194°C
$[\alpha]_D^{25}$	-20.4° (c 0.5, MeOH)
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ)	220 (12,000), 252 (340), 258 (330), 264 (280)
IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1}	3300, 2980, 2930, 1660, 1540, 1460, 1390, 1360, 1300, 1200, 1180, 1130
FAB-MS m/z	2001 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 2023 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
Molecular formula	$\text{C}_{94}\text{H}_{148}\text{N}_{22}\text{O}_{26}$

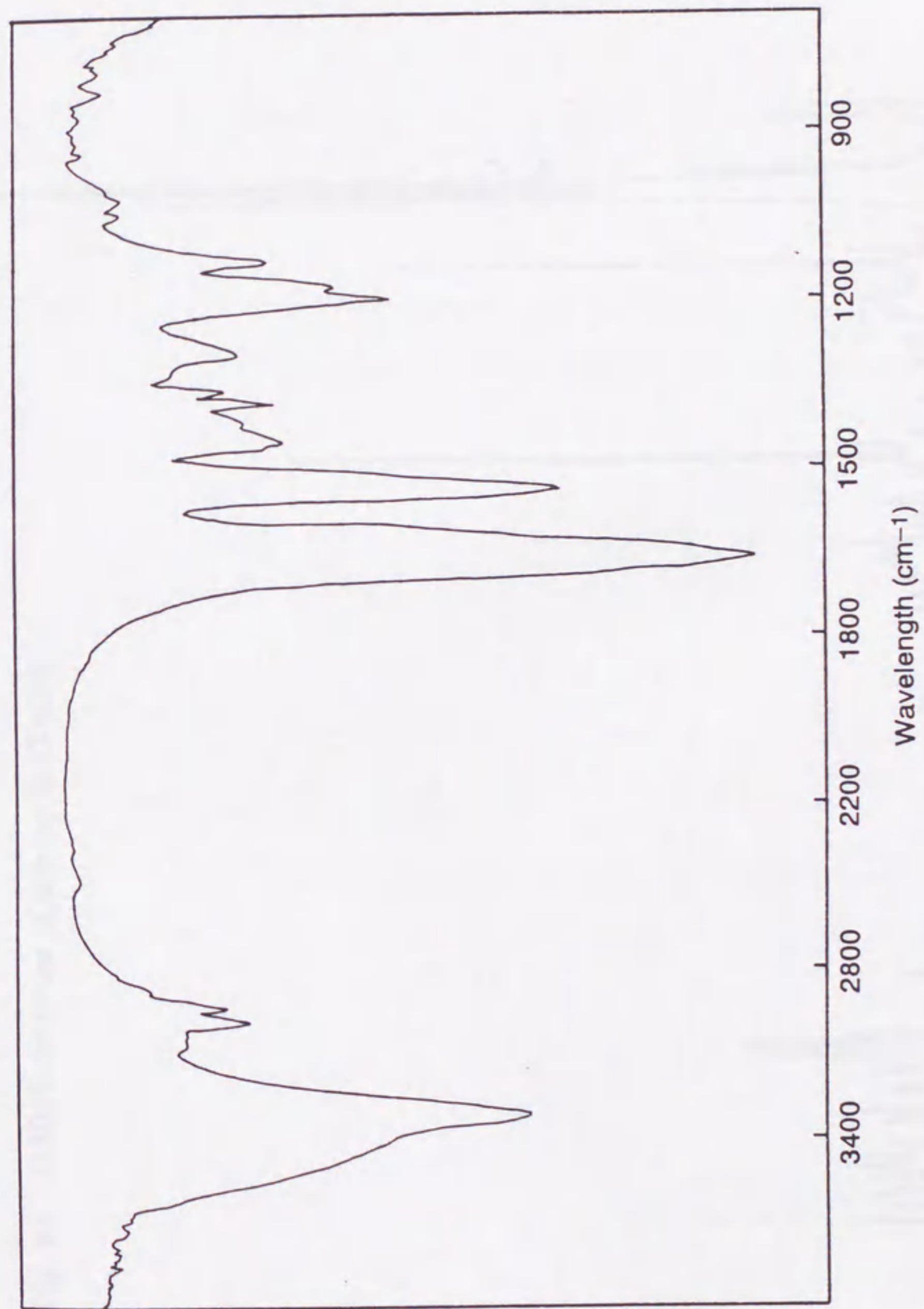


Fig. 9. IR spectrum of aibelin.



Fig. 10. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of aibellin in CD_3OH .

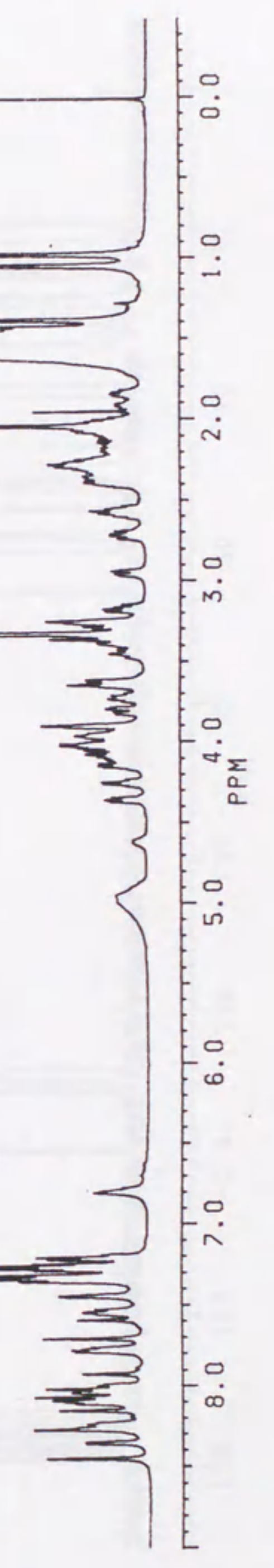
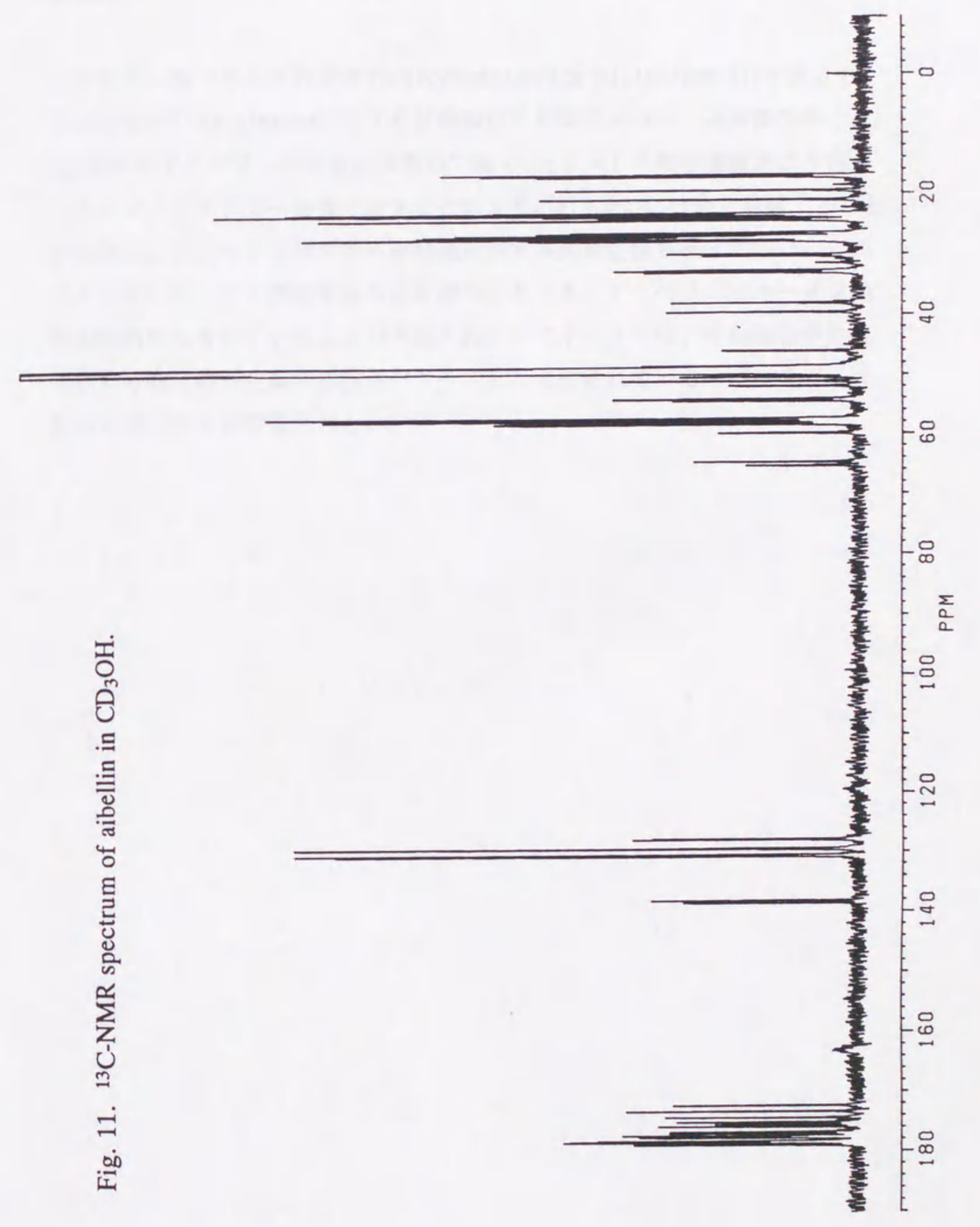




Fig. 11. ^{13}C -NMR spectrum of aibelin in CD_3OH .



3. 要約

カビの一種である不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株より、*Caenorhabditis elegans*に対する抗線虫活性物質アイベリンを単離精製した。D1528株のアイベリンの生産性は極めて高く、8リットルの培養濾液より種々のクロマトグラフィーを繰り返すことにより、1.3 gの化合物を単離することができた。アイベリンはグラム陽性菌に対する抗菌活性も持っていた。このことより、ルーメン発酵改善作用を調べたところ、アイベリンはルーメン発酵改善活性も有していることが予想された。アイベリンは、その理化学的性状から、微生物が生産する抗菌ペプチドとして知られているペプタイポール類の一種であると推定された。

第3章 一次構造解析

1. 序

第2章で述べたように、カビの一種である不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株よりルーメン発酵改善作用を有する抗生物質アイベリンを見出すことができた。この物質は、その理化学的性状より alamethicin⁶⁰⁾ や anti amoebin⁶¹⁾ などと同様、微生物が生産する抗菌ペプチドとして知られているペプタイポール類^{62~79)} に属するものであると予想された。ペプタイポールは、N末端、C末端ともブロックされていることが構造上の特徴である。そのため、その構造解析は、N末端から順次アミノ酸配列を決定していくエドマン分解などを用いることができない。過去に構造が報告されているペプタイポールの構造解析は、MSスペクトルを主体とした有機化学的手法を用いて行われてきた。今回、アイベリンについても、FAB-MS解析を中心とした有機化学的手法による一次構造解析を行うことにした。

2. 結果及び考察

2-1. アミノ酸配列の決定

まず、アイベリンのアミノ酸組成の解明を行った。アイベリンを完全加水分解 (6 N HCl, 110°C, 24 h) した後、アミノ酸分析を行った。この結果より、Table 5に示したようなアミノ酸組成が明らかとなった。ただし、Aibに関してはニンヒドリンの呈色率が低いためアミノ酸分析ではその個数を正確に決定することができなかった。実際には、 ^{13}C -NMRにおいて、Aibの C_α 炭素に相当する4級炭素シグナルが57~58 ppmに9本観測されることから、Aibの個数は9個と判明している (第4章)。また、Glnは加水分解によってGluとして検出されるため、GlnとGluの区別はできていない。以上のアミノ酸分析の結果より、アイベリンは18~20個のアミノ酸より成るペプチドであると考えられた。

Table 5. Amino acid composition of aibellin.

amino acid	
Aib	8~10
Ala	3
Glx (Gln or Glu)	3
Gly	1
Phe	1
Pro	1
Val	1

アイベリンは、N末端がアセチル基で保護されているため、そのままではN末端から順次アミノ酸配列を決定していくペプチドシーケンサーが適用で

きない。アシルアミノ酸脱離酵素⁸⁰⁾によるN末端のアセチルアミノ酸の遊離も試みたが、原料回収に終わった。そこで、主にFAB-MSスペクトルのフラグメンテーション解析によるアミノ酸配列決定を行うことにした。

Fig. 14にアイベリンのFAB-MSスペクトルを示した。 m/z 2001と m/z 2023に $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ と考えられる分子イオンピークが見られた。このことよりアイベリンの分子量は2000であると推定された。さらに、このスペクトルを解析すると、2つの特徴的なフラグメントイオンピーク m/z 1183と m/z 818が観測された。今までの研究によると、ペプチド類に共通して見られるアミノ酸配列であるAib-Proのアミド結合は非常に不安定で、FAB-MSにおいて優先的に解裂することが報告されている⁷⁰⁻⁷⁹⁾。今回観測された m/z 1183と m/z 818のフラグメントイオンピークは、それぞれのmass numberを加えるとアイベリンの予想分子量にほぼ等しくなるため、アイベリン分子内のAib-Pro間のアミド結合で解裂して生じたものであると推定された。その他のフラグメントピークとしては、 m/z 956、724、511、440、355、284、199、128などが観測されたが、全アミノ酸配列を決定することはできなかった。そこで、さらに確実な情報を得るため、部分加水分解を行い分解物を解析することにした。

アイベリン1 mgを、6 N HCl, 37°C, 12 hの条件で加水分解した。この加水分解物をHPLCで分析したところ、2つのフラグメントP-1、P-2の生成が認められた (Fig. 15)。それぞれのフラグメントを分取して精製し、P-1とP-2をそれぞれ200 μ gと400 μ g得ることができた。得られたP-1とP-2を完全加水分解 (6 N HCl, 110°C, 24 h) してアミノ酸分析を行ったところ、P-1のアミノ酸組成はAla(3), Gly(1), Phe(1), Glu(1), Aib(6~8)、P-2については Val(1), Glu(2), Pro(1), Aib(2~3)であった。また、FAB-MSを測定したところP-1の分子量は1200、P-2の分子量は818であった (Fig. 16, 17)。これらのことより、P-1とP-2は、アイベリンのAib-Pro間で結合が解裂したフラグメントペプチドであると考えられた。これらの2つのフラグメントペプチドのFAB-MSのフラグメントイオンを解析することにより、P-1の全アミノ酸配列と、P-2については一部のアミノ酸配列が決定できた。さらに、P-2はニンヒドリンで発色することも確認された。すなわち、P-2のN末端にはフリーのアミノ

基が存在することが考えられたため、ペプチドシーケンサーによるアミノ酸配列の解析も試みた。その結果、ProからGluまでの6個のアミノ酸配列を決定することができた。こうして、P-1とP-2の全アミノ酸配列を決定することができた (Fig. 12)。P-1はアイベリンの1-13のフラグメントペプチド、P-2は14-20のフラグメントペプチドであった。しかし、P-2のC末端には未知の成分Xが含まれていると考えられ、この段階ではその構造を明らかにすることができなかった。次節で述べるが、Xはフェニルアラニノールに類似した構造のアミノアルコールであった。また、P-2に含まれる2個のGlu (Glu-18, 19) は、加水分解操作によってGlnより生じた可能性も否定できないため、誘導体化による確認を行った。

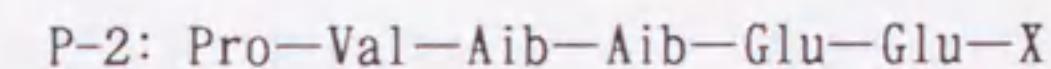
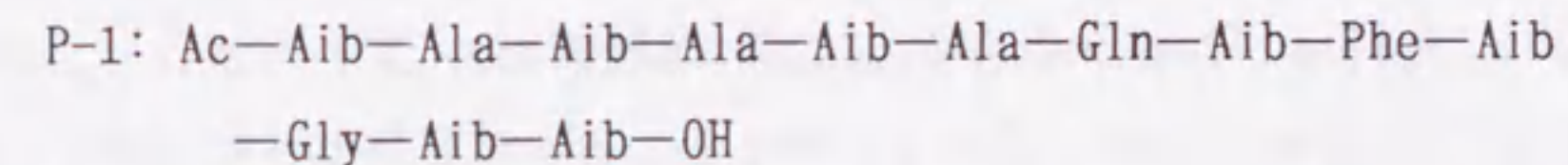


Fig. 12. Two fragment peptides of aibellin.

X: unknown compound.

アイベリンのGlnとGlu (Gln-7, Glu-18, 19)を確認するため、メチルエステル化による検討を行うことにした。メチルエステル化にはトリメチルシリルジアゾメタン⁸¹⁾を用いた。この試薬は、カルボキシル基などの酸性基をメチルエステルにするため、もしGluが存在すればそのカルボキシル基がメチル化されるためGlnとGluの区別ができると考えた。なお、アイベリンより単離したC末端成分Xは、この試薬で反応しなかったため、Xには酸性基は含まれていないと判断した (次節)。アイベリンをトリメチルシリルジアゾメタンで処理すると、HPLC上で挙動が異なるピークが生じた。このピークを分取してFAB-MSを測定したところ、 m/z 2029に分子イオンピークが観測された (Fig. 18)。この分子イオンピークを $[M+H]^+$ と考えると、メチル化したアイベリン (Me-アイベリン) の分子量は2028になる。もとのアイベリンの分子量は200

0であるため、2個のメチル基が導入されたことが明らかになった。すなわち、アイベリン分子中には2個のGluが存在すると考えられた。次に、GlnとGluの位置決定を行った。これまでの検討から、アイベリンはAib¹³-Pro¹⁴の位置でFAB-MSによる解裂が起こることが確認されている。そこで、このMe-アイベリンのFAB-MSのフラグメンテーションを解析することによりGluの位置を決定することを考えた。アイベリンのFAB-MSは、Aib¹³-Pro¹⁴の解裂でN末端側のフラグメントが m/z 1183、C末端側は m/z 818が観測されることがわかっている (Fig. 14)。Me-アイベリンのフラグメントピークを見ると、もとのアイベリンのFAB-MSで観測された m/z 818のピークが消失し、新たに m/z 846にピークが観測された。 m/z 1183のピーク位置は変化がなかった (Fig. 18)。すなわち、C末端側のフラグメントが28 m.u. (mass units) 増加したことが確認された。したがって、C末端側に2個のGluが存在することが判明し、Glnが7番目、Gluが18と19番目であることが明らかになった。こうして、C末端成分Xの構造が未決定ではあるが、アイベリンのすべてのアミノ酸配列を決定することができた (Fig. 13)。

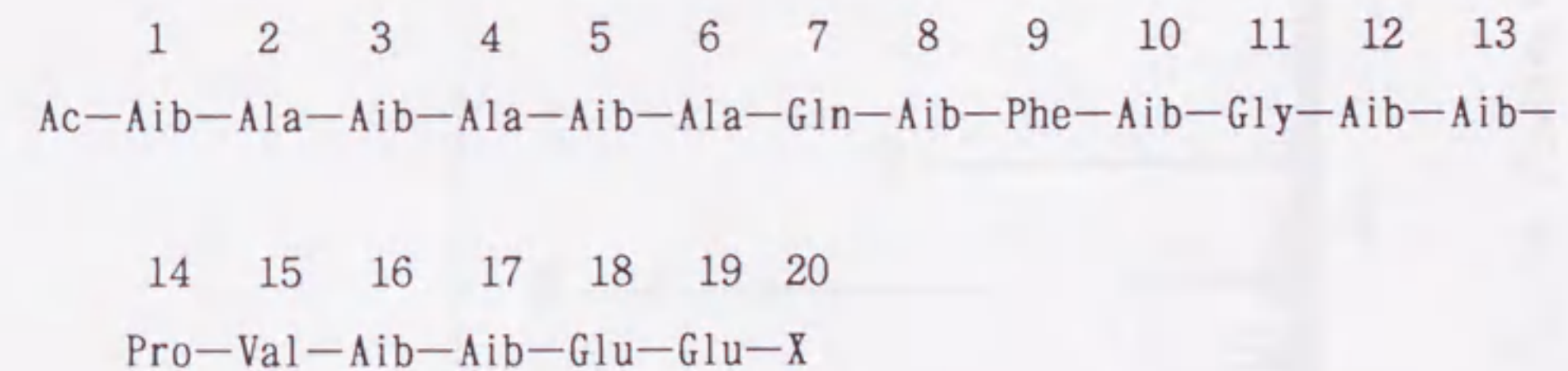


Fig. 13. Proposed amino acid sequence of aibellin.
X: unknown compound.

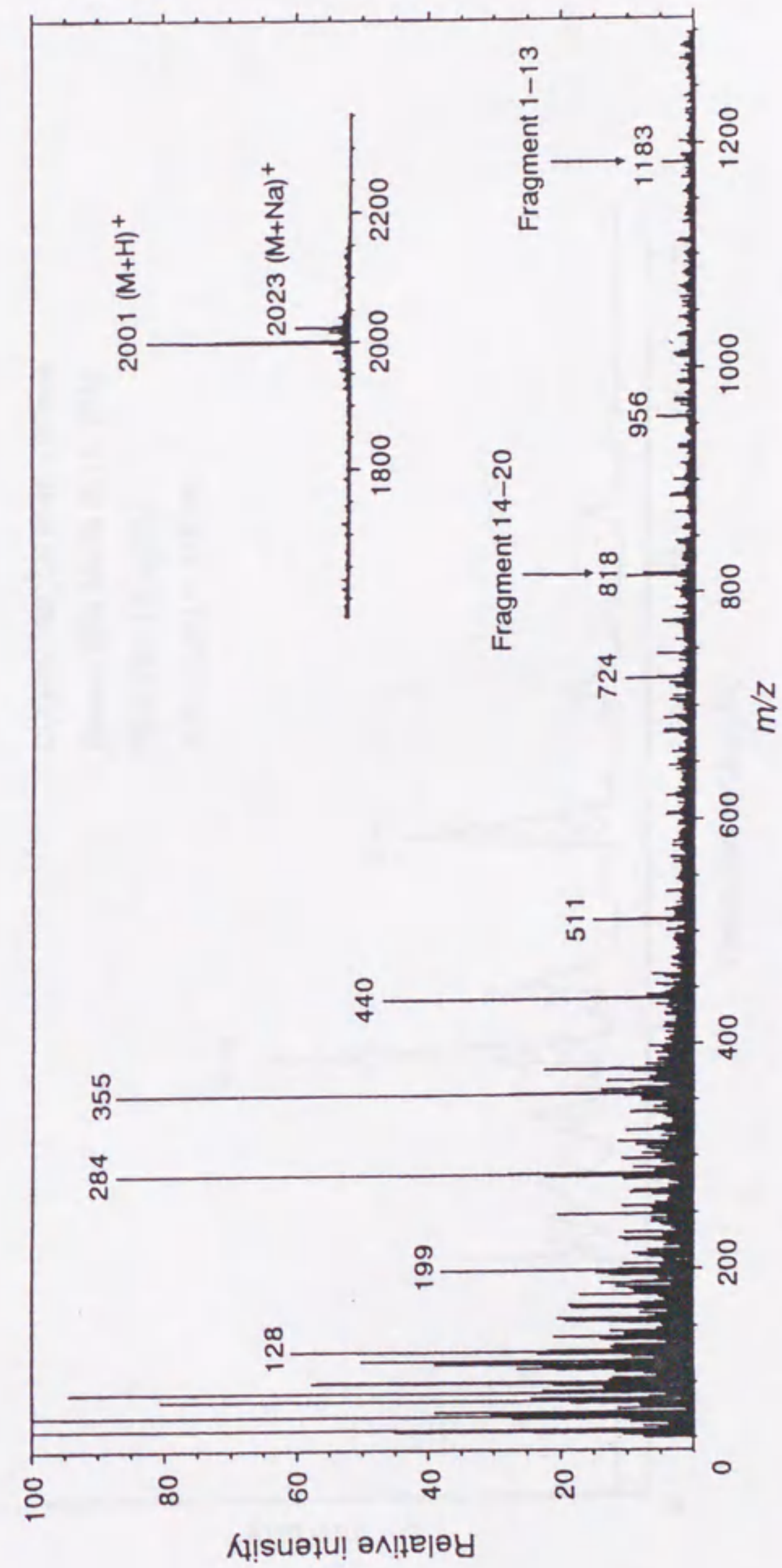


Fig. 14. Positive FAB mass spectrum of aibellin.

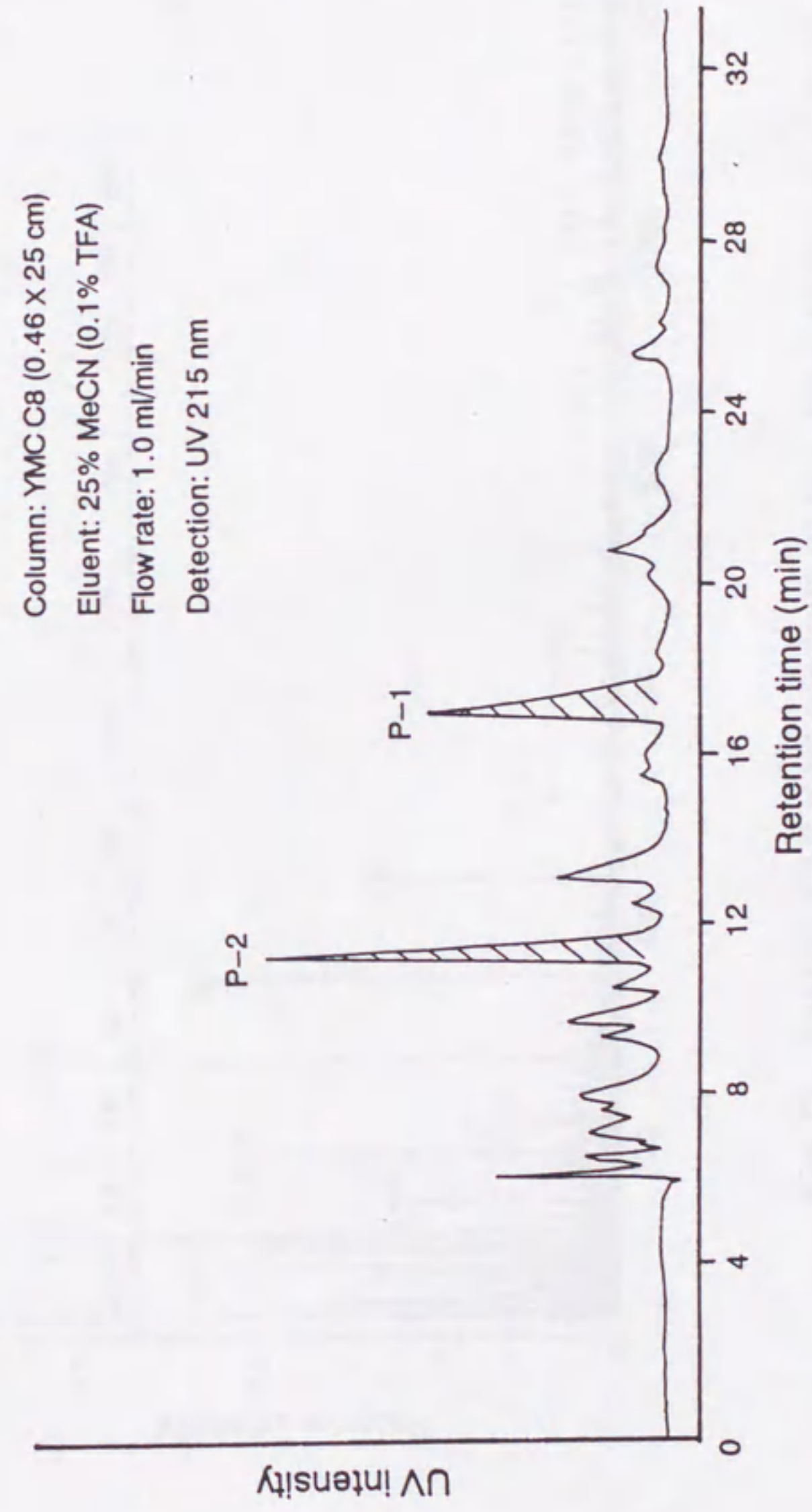


Fig. 15. Analytical HPLC chromatogram of two fragment peptides of aibellin.

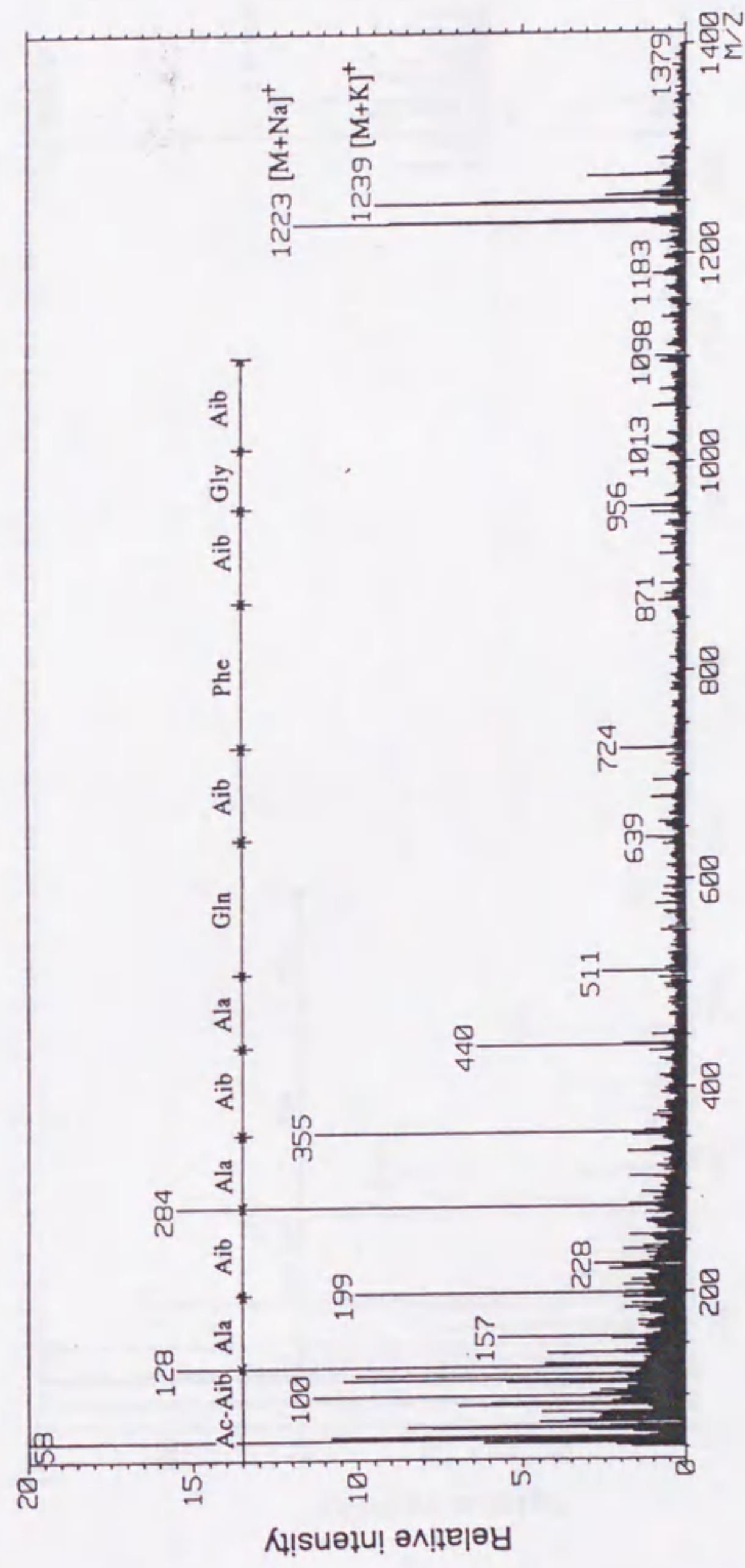


Fig. 16. Positive FAB mass spectrum of P-1, the fragment peptide of aibellin.

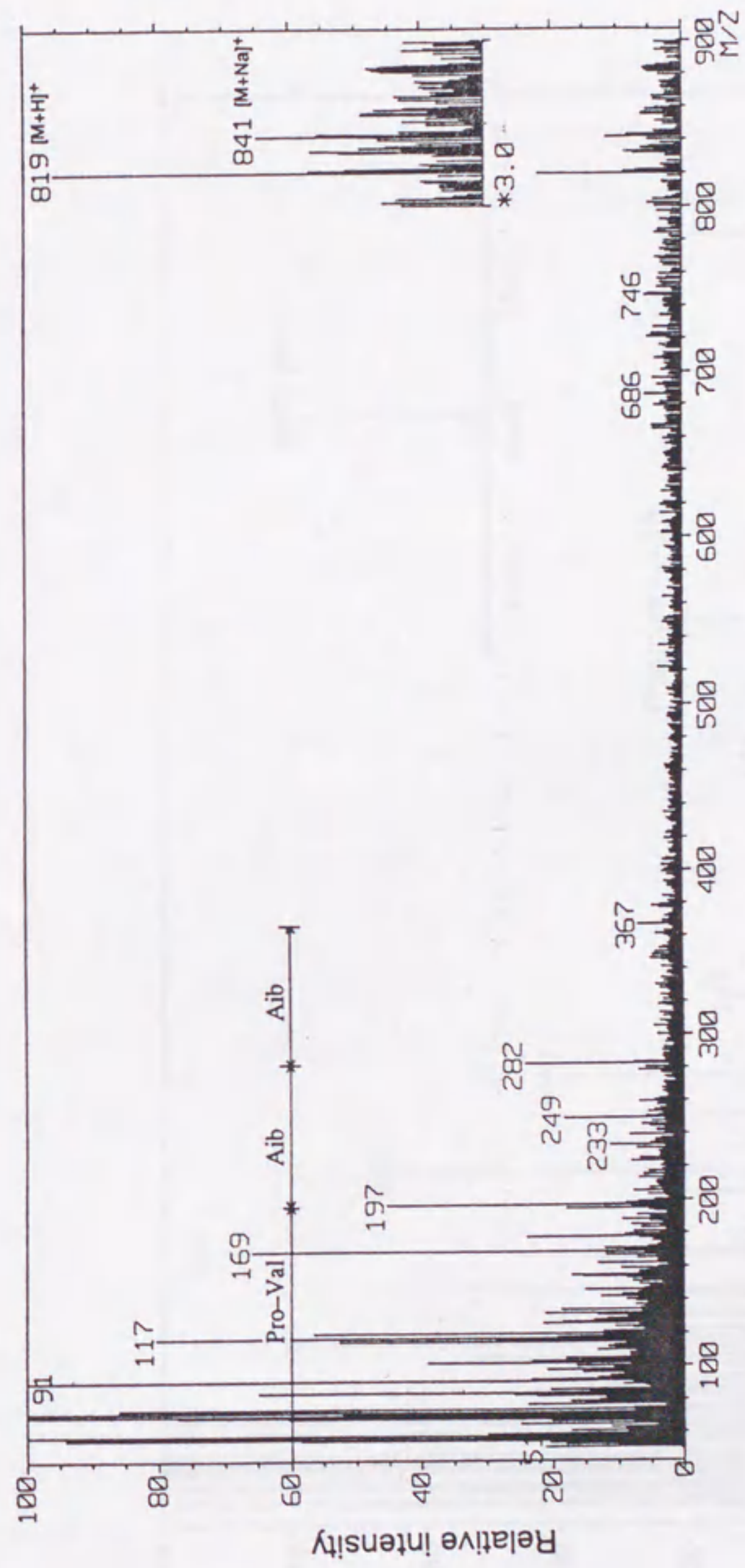


Fig. 17. Positive FAB mass spectrum of P-2, the fragment peptide of aibellin.

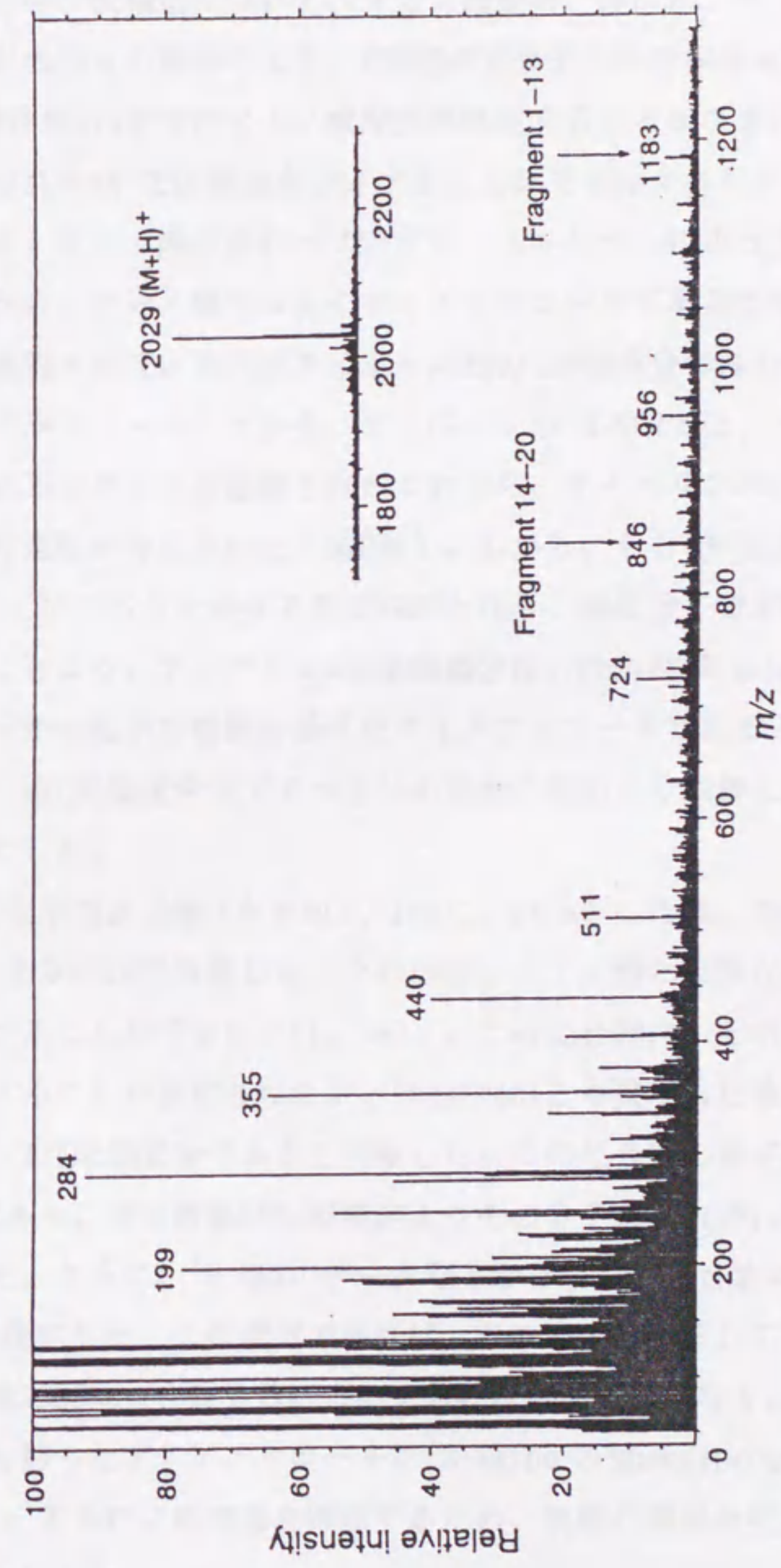


Fig. 18. Positive FAB mass spectrum of Me-aibellin.

2-2. C末端成分の構造解析

これまでアイベリンの一次構造について、アミノ酸分析、FAB-MS、ペプチドシーケンサーなどの種々の解析により、N末端がアセチル基で保護されたAibから始まる19番目のGluまでのアミノ酸配列を決定することができた。しかし、20番目の成分Xについては構造を決定することができなかった。この20番目の構成成分は、アミノ酸分析やペプチドシーケンサーによって検出されなかったことから、アミノ酸ではなくアミノアルコールであると考えられた。これまでに報告されているペプチド類のC末端成分のほとんどはPhol (フェニルアラニノール) である。アイベリンの¹H-NMRでは、フェニル基由来と考えられるシグナルが観測されたことから、アイベリンのC末端成分もPholである可能性が考えられた(第2章)。しかし、もしC末端成分XがPholであるならば、アイベリンの分子量は1957となり、推定分子量2000に43足りない。このことより、アイベリンのC末端成分は、Pholが43 m.u. (mass units)分の何らかの化学的修飾を受けたアミノアルコールであると考えられた。そこで、このC末端成分をアイベリンの加水分解物より単離して構造解析を行うことにした。

アイベリン30 mgを完全加水分解(6 N HCl, 110°C, 24 h)した後、加水分解物をODSカラムによるHPLCで分離した。その結果、アミノ酸とは異なる化合物を1.2 mg単離することができた(Fig. 20)。この化合物は、そのUV吸収より芳香環を有することが推定されたが、PheやPholとも異なるため、目的とするアイベリンのC末端成分であると判断した。この化合物の分子量は、FAB-MSより194であり、高分解能FAB-MS測定よりその分子式はC₁₁H₁₆N₂Oであることが判明した。さらに、¹H-NMRのデータなどから、この化合物の構造をFig. 19のように推定した。この構造であれば、FAB-MSより予想していたアイベリンの分子量2000にも合致する。この化合物はPholとは異なり、アミノエタノール構造を持ったアミノアルコール2-(2-amino-3-phenylpropyl amino)ethanolである。さらにこの構造を確認するため、実際に標品を化学合成して比較することにした。

Fig. 21にC末端成分の合成スキームを示した。Z(カルボベンゾキシ)-L-

フェニルアラニンとエタノールアミンをDCC-HOBt（ジシクロヘキシルカルボジイミド-ヒドロキシベンゾトリアゾール）により縮合させ、H₂/Pdを用いる接触還元によってZ基を脱保護した。次いで、BH₃（ジボラン）によりアミドカルボニルを還元し、目的とするアミノアルコールを得た。こうして合成した標品は、FAB-MS、NMR、HPLCのリテンションタイムなどが天然物から単離した化合物と一致することが確認された。こうして、アイベリンのC末端成分の構造を決定することができた。このC末端成分について文献検索をしたところ、ペプチド合成の中間体としての報告はあったもの⁸²⁾、天然物の構成成分として発見されたのは今回が初めてであり、極めて興味深い物質であることが明らかとなった。

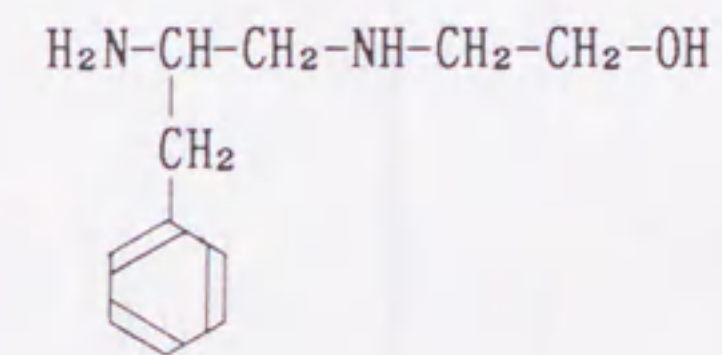


Fig. 19. Structure of the C-terminal component of aibellin.

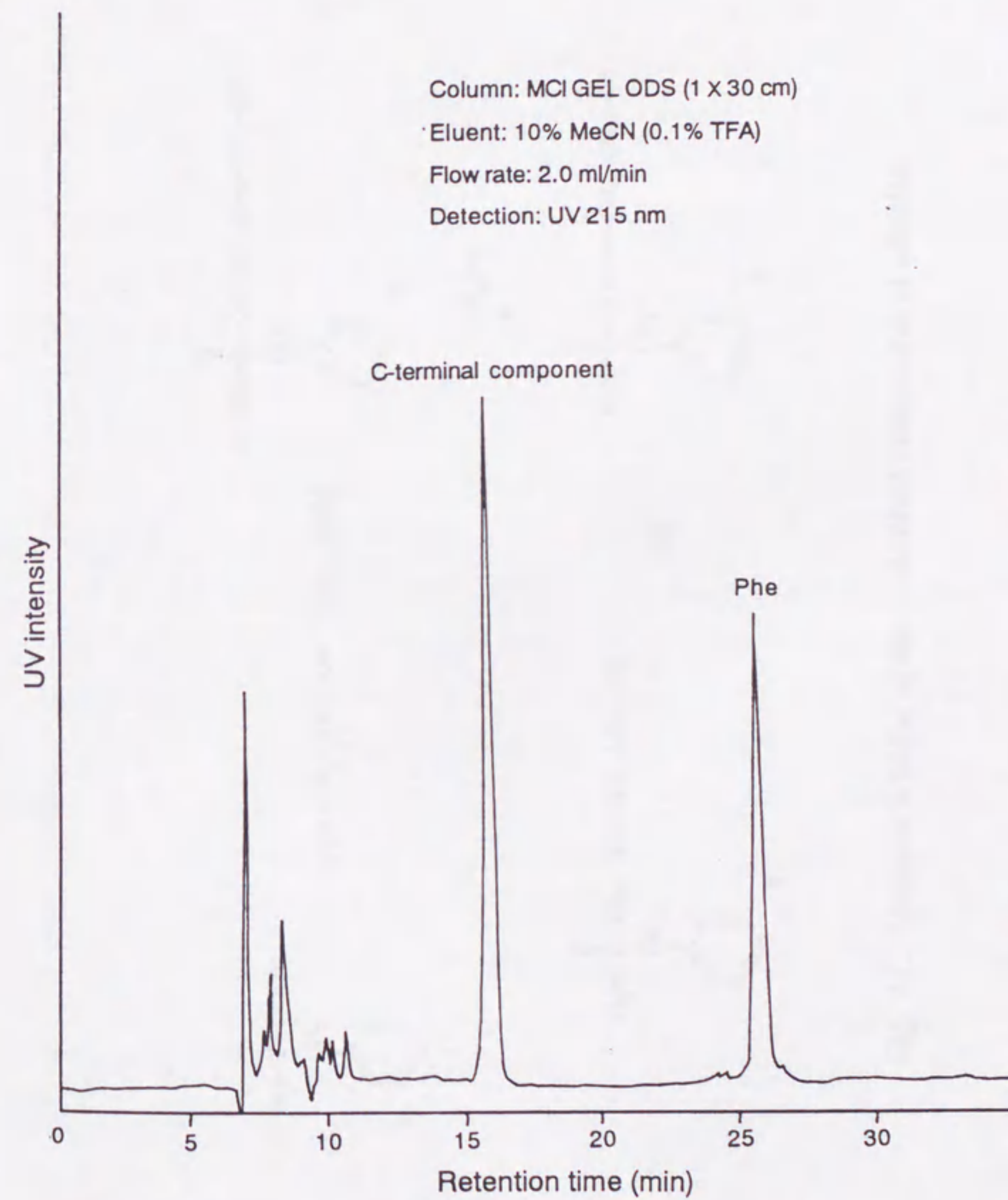


Fig. 20. Analytical HPLC chromatogram of the hydrolysate of aibellin.

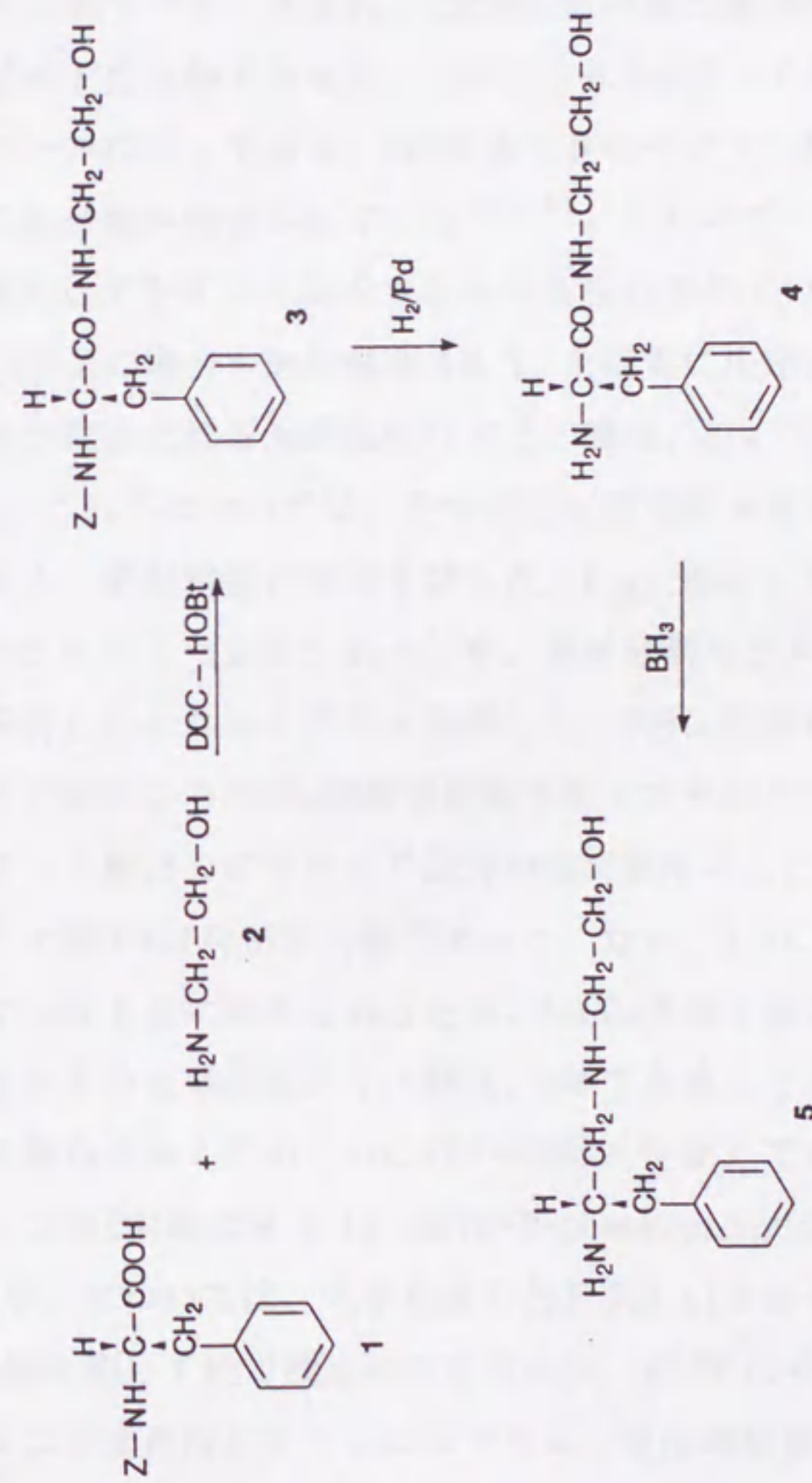


Fig. 21. Synthesis scheme of the C-terminal component of aibelin.

2-3. 絶対構造の決定

前節で述べたように、アミノ酸分析、FAB-MS、ペプチドシーケンサー、化学合成によってアイベリンの一次構造（平面構造）を決定することができた。アイベリンは、異常アミノ酸Aib（ α -アミノイソ酪酸）を多く含み、N末端はアセチル基でブロックされ、C末端には特異な構造のアミノアルコールを有するペプチド化合物であった。このようにN末端がアセチル基、C末端がアミノアルコールになっており、Aibを多く含むペプチド類は、アイベリン以外にも多くの化合物が報告されている⁶²⁻⁷⁹。これらのペプチドの中には、構成アミノ酸としてD-アミノ酸を含むものも報告されている^{74, 76, 78}。そのため、アイベリンの場合も絶対構造（D,L）を確実に決定する必要があった。

アイベリンに含まれる光学活性なアミノ酸は、Ala, Gln, Glu, Phe, Pro, Valである。これらについては、光学活性な固定相を有するHPLCカラムを用いることにより、絶対構造の決定を試みた。Fig. 23に、アイベリンの完全酸加水分解物（6 N HCl, 110°C, 24 h）を、光学分割カラムMCI GEL CRS-10W⁸³によって分析したクロマトグラムを示した。CuSO₄溶液を移動相に用い、目的とするアミノ酸によりCuSO₄濃度や流速を変えて分析を行った。アイベリンに含まれるアミノ酸はこのカラムで保持時間が重なることはなく、すべての光学活性アミノ酸のD,L分析が可能であった。なお、Alaについては他のアミノ酸に比べてかなり前に溶出されるため、CuSO₄濃度を低くして分析をした。その結果、すべての光学活性アミノ酸は、L体であることが判明した。ただし、加水分解の際のラセミ化のために若干のD体も生成していることも確認された。

アイベリンのC末端成分 2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol（以下Phaolとする）については、化学合成した*R, S*(D,L)それぞれの光学活性なPhaolの標品を用いて絶対構造決定を行った。*R, S*それぞれのPhaolは、Z-L-フェニルアラニンまたはZ-D-フェニルアラニンを出発物質としてFig. 21のスキームで合成することにより得た。合成した*R, S*体は、アミノ酸のD,L決定を行ったMCI GEL CRS-10Wカラムにより光学分離を試みたが、分離はできなかった。しかし、別の光学分割カラムSUMICHIRAL OA-5000で良好な分離を示すことが判明した。そこで、このカラムを用いて天然物（アイベリン）から単離した

Phaolを標品と比較したところ、PhaolはS配置(L体)を有していることが判明した(Fig. 24)。

こうして絶対構造も含めたアイベリンの一次構造を決定することができた(Fig. 22)。アイベリンも含めて類似の構造を持つペプチドはペプタイポールと呼ばれ、抗菌、抗カビ活性を有する抗生物質として他にもいくつかの化合物が報告されている。Fig. 25に主な類似ペプチドの一次構造を示したが、アイベリンはこれらのペプチドと比較すると、alamethicin⁶⁰⁾, paracelsin⁶⁷⁾, trichosporin⁷²⁾にアミノ酸配列が似ている。しかし、アミノ酸配列の中央(9番目)にPheを有し、C末端(18, 19番目)に2個の酸性アミノ酸(Glu)を持ったペプチドはこれまでに報告例がなく、非常に珍しいアミノ酸配列であると思われる。また、C末端成分についても、今までに同じ構造を持つ化合物は天然物からは報告されておらず、その点でもアイベリンは興味深い構造を持った化合物であると考えられた。

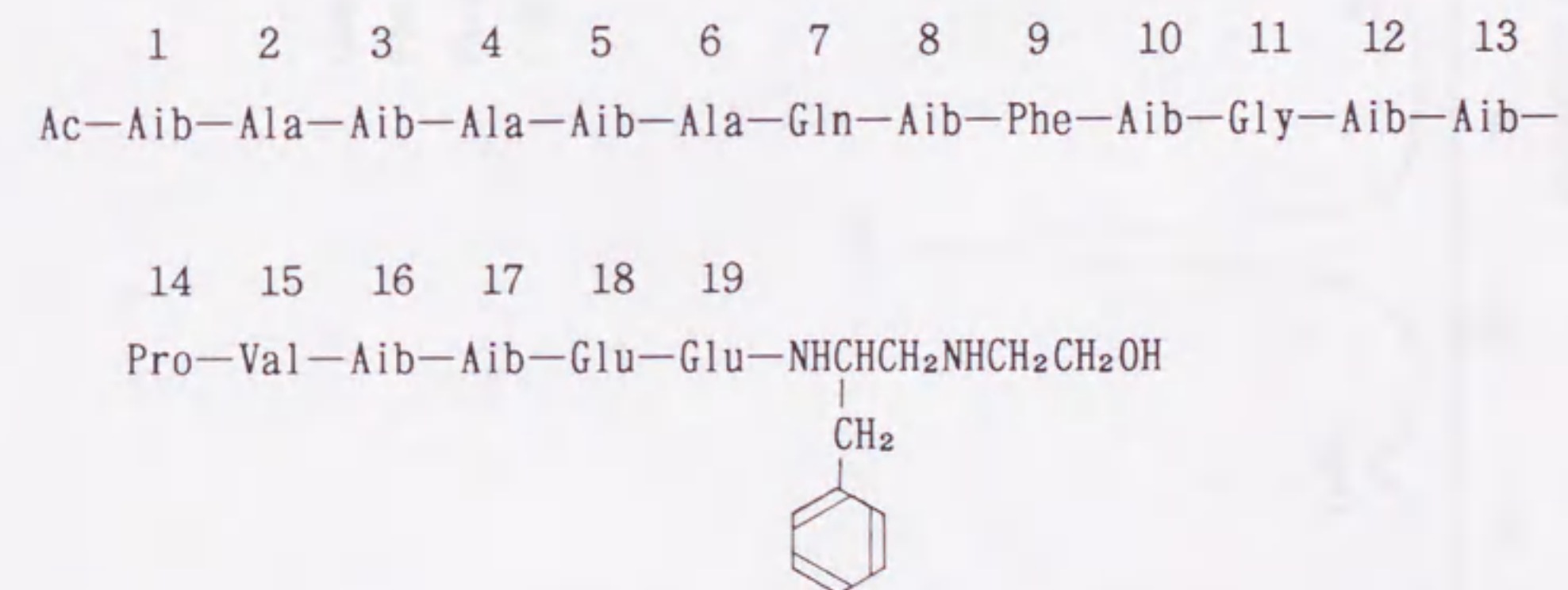


Fig. 22. Primary structure of aibellin.

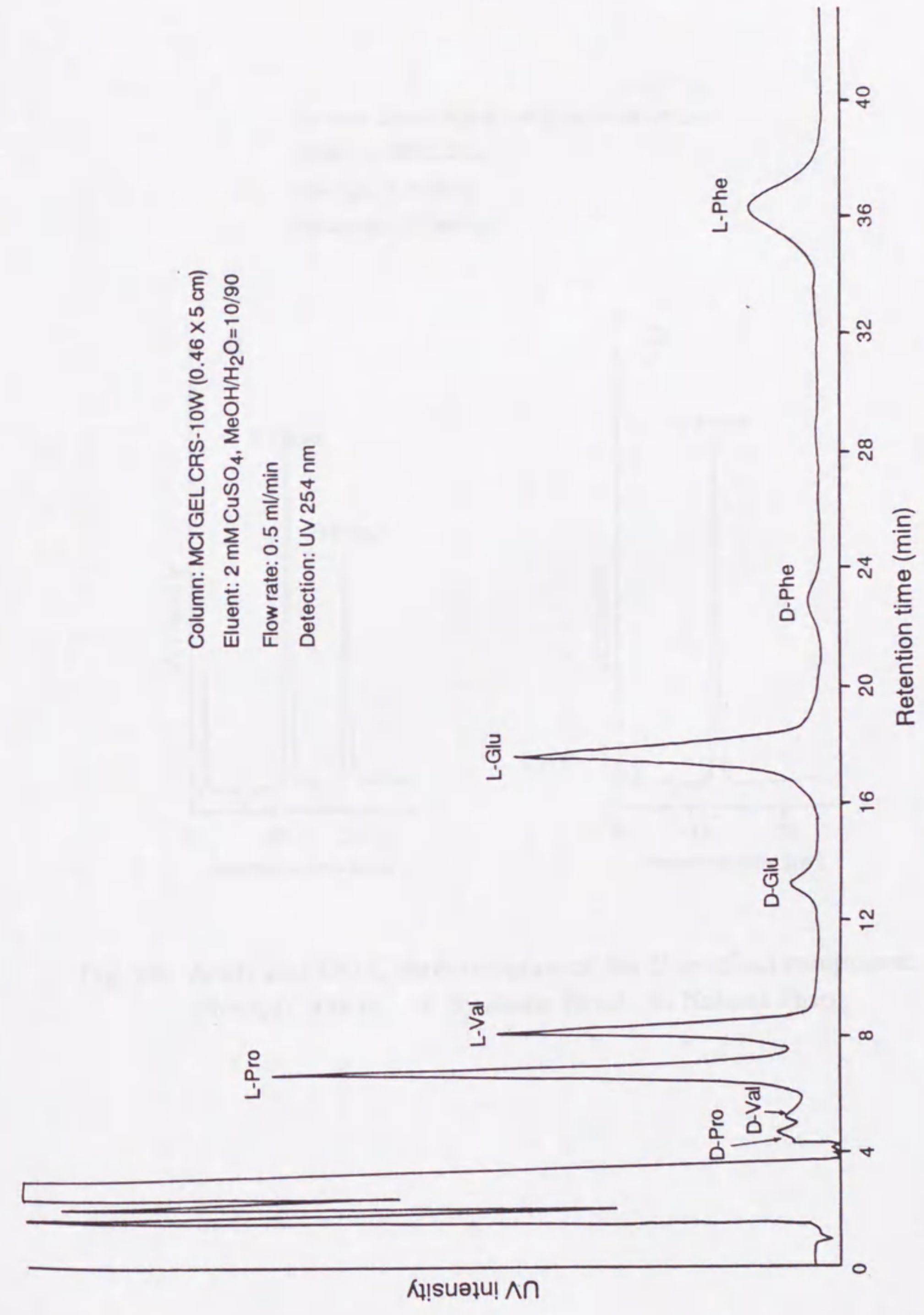


Fig. 23. Analytical HPLC chromatogram of the amino acids of aibellin.

Column: SUMICHIRAL OA-5000 (0.46 X 5 cm)

Eluent: 2 mM CuSO₄

Flow rate: 1.0 ml/min

Detection: UV 254 nm

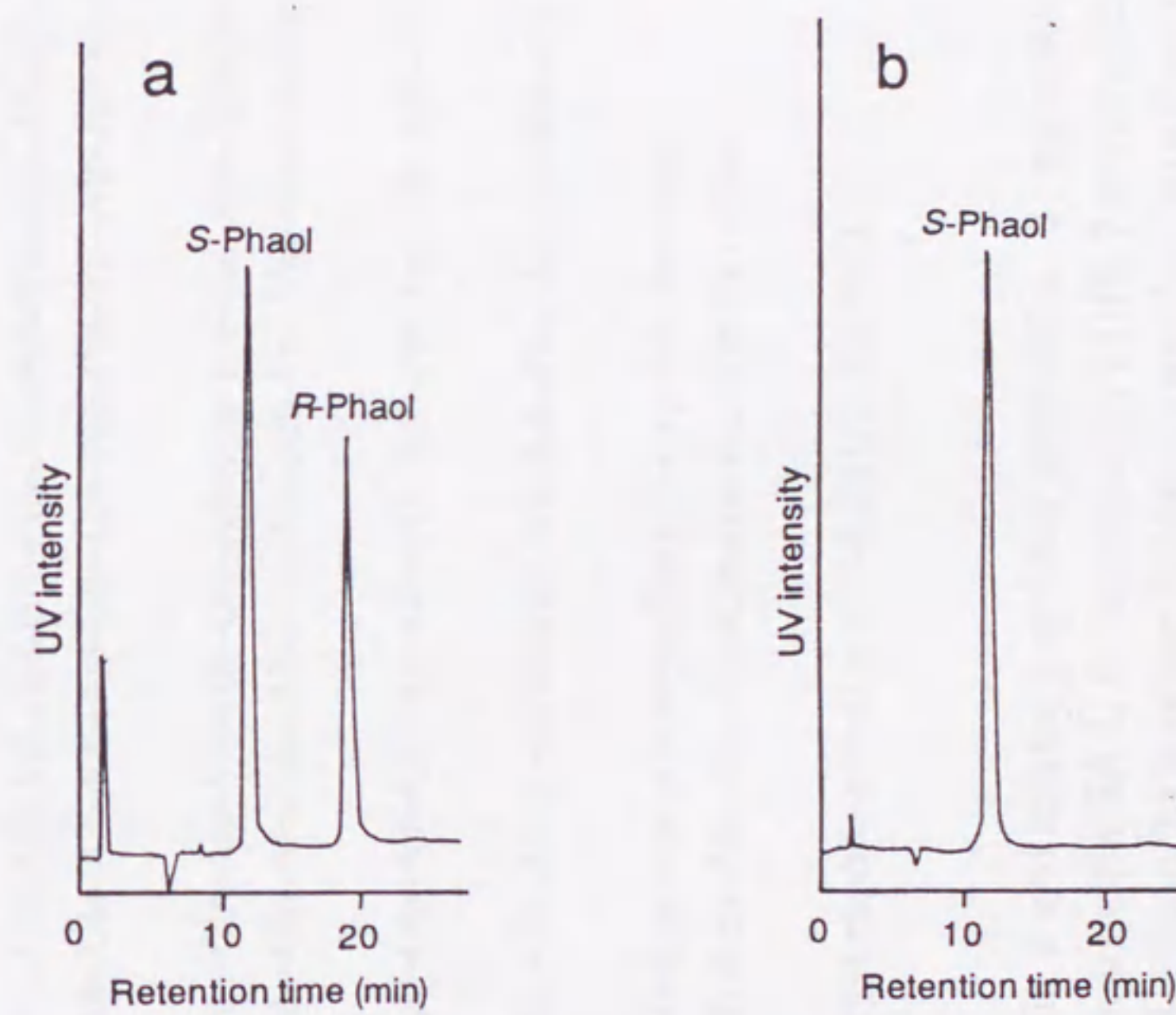


Fig. 24. Analytical HPLC chromatogram of the C-terminal component, PhaoI, of aibellin. a: Synthetic PhaoI. b: Natural PhaoI.

- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 1 | Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Phe-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Glu-Phaol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | (I) Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (II) Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | (A) Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (B) Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Ac-Aib-Ala-Ser-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Leu-Aib-Gly-Aib-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | (I) Ac-Phe-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Aib-Pro-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (II) Ac-Phe-Aib-Aib-Iva-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Iva-Pro-Aib-Pro-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | Ac-Phe-Aib-Aib-Aib-Val-Gly-Leu-Aib-Aib-Hyp-Gln-Iva-Hyp-Ala-Phol | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Fig. 25. Primary structures of aibellin **1** and related heptaol antibiotics. **2**: alamethicin I(II); **3**: paracelsin A (B); **4**: trichosporin-B Ia; **5**: saturnisporin SA I; **6**: antiameobin I (II); **7**: emerimicin.

Aib: α -aminoisobutyric acid, Phaol: 2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanol, Phol: phenylalaninol.

3. 要約

不完全菌 *Verticimonosporium ellipticum* D1528株が生産する、ルーメン発酵改善作用を有するペプチド抗生物質アイベリンの一次構造を絶対構造も含めて決定した。構造解析には、アミノ酸分析、FAB-MS、ペプチドシーケンサー、化学合成などの手段を用いた。アイベリンは、N末端がアセチル基でブロックされ、異常アミノ酸である α -アミノイソ酪酸 (Aib) を多く (9個) 含む20残基より成るペプチドであった。また、C末端には新規なアミノアルコール2-(2-amino-3-phenylpropylamino)ethanolを有していることも判明した。このC末端アミノアルコールは、実際に標品を化学合成することでその構造を決定した。構成アミノ酸及びアミノアルコールの絶対構造については、アイベリンの完全酸加水分解物を光学分割HPLCカラムで分析することにより、すべてL体であると決定した。アイベリンも含めて類似の構造を持つペプチドはペプタイポールと呼ばれ、抗菌、抗カビ活性を有する抗生物質として多くの化合物が報告されているが、アイベリンは他のペプタイポール類にはない以下のような構造上の特徴を持っていた。

- (1) アミノ酸配列の中央 (9番目) にPheを有している。
- (2) C末端に2個の酸性アミノ酸 (Glu-18, 19) を有している。
- (3) C末端に新規なアミノアルコールを有している。

第4章 NMRによる二次構造解析

1. 序

1945年にBlochとPurcellによって核磁気共鳴 (NMR) の現象が発見されて以来、NMRは低分子から高分子までさまざまな系に適用されている。特に1980年代以降NMRは感度や分解能が著しく向上したことや、二次元NMRなどの新しい測定方法が開発されたことから、ペプチドやタンパク質の立体構造 (高次構造) をNMRを用いて決定することが可能となってきた⁸⁴⁻⁸⁸⁾。NMRは結晶化を必要としないこと、実際に機能を果たしている溶液中のタンパク質の立体構造を解明できる点で、X線結晶構造解析にない大きな特徴を持っている。現在のNMR解析技術では分子量10,000程度までのタンパク質ならば、原子レベルでの三次元構造の詳細な検討が可能となった。最近では、タンパク質を¹³Cと¹⁵Nで同位体標識し、多次元NMR (三、四次元) を駆使してより分子量の大きなタンパク質の高次構造解析も盛んに行われている⁸⁹⁻⁹³⁾。

NMRによるペプチドやタンパク質の立体構造決定は、Wüthrichらにより確立されている⁸⁵⁾。これは、¹H-NMRシグナルの帰属に基づくものであり、以下のような流れで行われる。

(1) アミノ酸タイプの同定

二次元NMRの手法であるDQF-COSY⁹⁴⁾とHOHAHA⁹⁵⁾を用いてスピン系の解析を行い、アミノ酸の種類を同定する。

(2) 連鎖帰属 (sequential assignment)

同定したアミノ酸残基を、二次元NMRの手法の一つであるNOESY⁹⁶⁾から得られるNOE情報を用いて、一次構造に沿って並べていく。これは、スピン系がペプチド結合を介してつながらないため、スピン結合による磁化移動を利用したDQF-COSYやHOHAHAでは隣り合ったアミノ酸同士をつなげていくことはできないからである。ポリペプチド鎖に沿って連続的に帰属がついていくので、この手法は連鎖帰属 (sequential assignment) と呼ばれている^{97, 98)}。

(3) 二次構造決定

ポリペプチド鎖がヘリックスや β シートなどの規則的二次構造をとる場合、NH、 C_α H、 C_β H間の距離がほぼ決まっているため、距離に応じたNOEが現れる。すなわち、NOEの大きさは二次元NMRのNOESYの交差シグナルの強度より求めることができる。例えば、ヘリックス構造では、隣接する残基間のアミドプロトン同士 [$d_{NN}(i, i+1)$ と表す] に強いNOEが出る。その他、3残基離れたアミノ酸同士の C_α プロトンとアミドプロトン間 [$d_{\alpha N}(i, i+3)$ と表す] などでNOEが観測される。これらの残基間のNOEは、隣接残基間NOE (sequential NOE) 及び中位のNOE (medium-range NOE) と呼ばれている (Fig. 26)^{97, 98)}。このようなNOEを解析することにより、二次構造を推定することができる⁹⁹⁾。なお、アミドプロトンと C_α プロトンとのスピン結合定数 ($^3J_{HN\alpha}$) や、アミドプロトンのH-D交換速度も二次構造を決定するための重要な情報となる¹⁰⁰⁾。

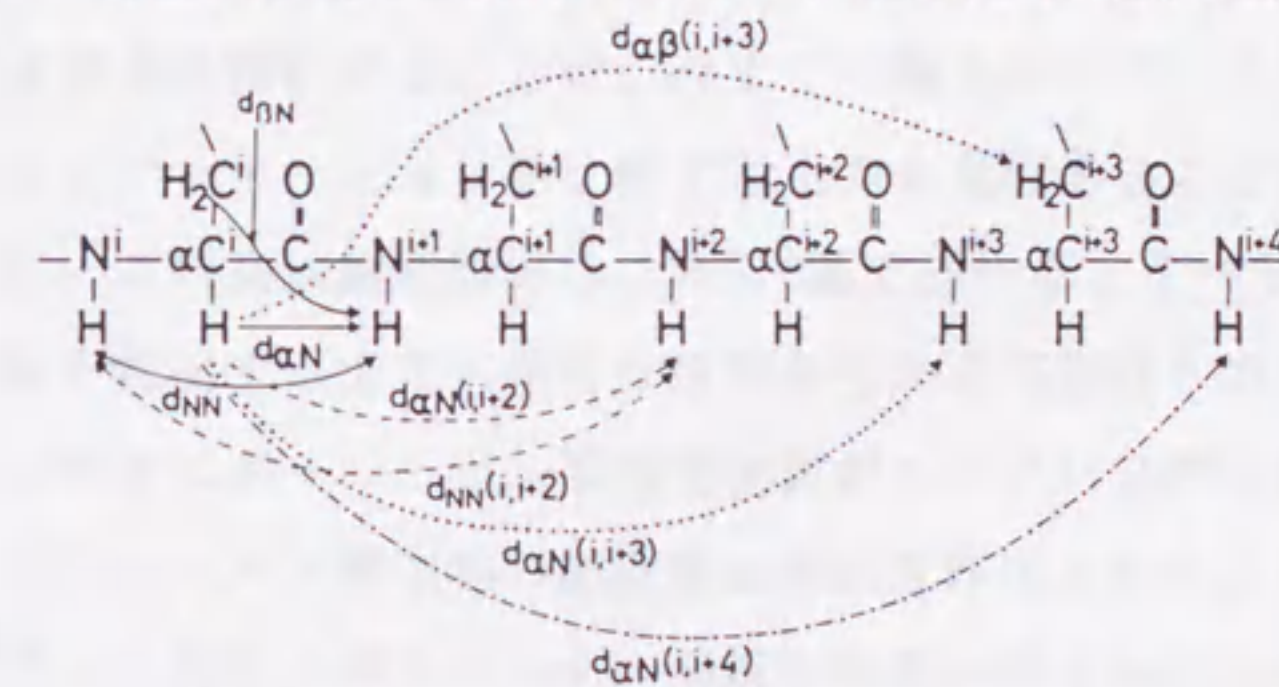


Fig. 26. Selected sequential and medium-range 1H - 1H distances in polypeptide chains.

(4) 三次元構造決定

NMRから求められたNOE情報などに基づいて、計算化学的に三次元構造の決定が可能である。一般には、NMRの制約条件 (NOE, 二面角など) と一次構造からの立体化学的制約から、ディスタンスジオメトリー法により三次元構造を求めることができる^{101~103)}。しかし、制約条件が少ない場合、すなわち十分な数のNOEが観測されない場合は三次元構造を決定することは困難である。三次元構造を決定するための計算方法はいろいろなものが考案されており、多くの研究がなされている^{104~108)}。

今回、アイベリンについてNMRによる二次構造の解析を行うことにした。第2,3章で既に述べたように、アイベリンはその一次構造よりペプタイポール類に属するペプチドであることが判明した。これまで多くのペプタイポールが報告されているが、ペプタイポールの中でNMRによる高次構造研究がなされているものは非常に少ない。現在までに二次構造が報告されているものは、alamethicin¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾, trichosporin^{112, 113)}, saturnisporin⁷⁶⁾のみである。これは、ペプタイポールに多く含まれるAibのメチル基の¹H-NMRシグナルを帰属することが困難であることと、AibはC_αプロトンを持たないために得られるNOE情報が少ないためである。同様の理由により、NMRによる三次元構造が決定されているペプタイポールは一つもない。しかし、アイベリンは他のペプタイポールにはないユニークな構造上の特徴、すなわちC末端の2個の酸性アミノ酸 (Glu) と新規なアミノアルコールを有している (第3章)。そのため、その高次構造を解析することは、今までに報告されている他のペプタイポールとのコンフォメーションを比較する上でも意義あることだと思われる。

さらに、この高次構造情報は、第5,6章で述べるアイベリンのルーメン発酵改善活性を説明する上でも重要な情報を与える可能性もある。すなわち、モネンシンなどのポリエーテル系抗生物質がルーメン発酵改善効果を有する説明として、ルーメン微生物の細胞膜との相互作用ということが提唱されている^{14, 47)}。これは、ポリエーテル系抗生物質が陽イオンとのコンプレックスを形成して生体膜におけるイオン透過性を変え、そのことが結果的に微生物の生理機能に何らかの影響を与えるというものである (第1章)。アイベリンの場合直鎖ペプチドであるため、ポリエーテル系抗生物質のように陽イオンとのコンプレックスを作ってそれ自身が生体膜透過体として働くとは考えにくい。しかし、アイベリンが生体膜と相互作用して膜に入り込み、細胞内外の陽イオン濃度差を変えるような作用を持っていれば、ポリエーテル系抗生物質と同じような影響を微生物に及ぼすことが予想される。ペプチドが膜と相互作用するためには、安定したヘリックス構造のような高次構造の特徴を有することが必要である^{114, 115)}。したがって今回、アイベリンの高次構造を解析することは、ルーメン発酵改善活性との関連性を説明する上で参考となるデータが得られることが期待される。

2. 結果及び考察

2-1. ^1H 及び ^{13}C -NMRシグナルの帰属

既に述べたように、ペプチドやタンパク質の高次構造をNMRによって決定するためにまず行わなければならないことは、各アミノ酸残基のすべての ^1H -NMRシグナルを一義的に帰属することである。この ^1H -NMRシグナルの帰属方法は連鎖帰属法と言われ、Wütrichらにより確立されている⁸⁵⁾。すなわち、DQF-COSY⁹⁴⁾とHOHAHA⁹⁵⁾スペクトルによりアミノ酸のスピンを同定した後、NOESY⁹⁶⁾スペクトルにより各アミノ酸残基の帰属を行うものである。軽メタノール(CD_3OH)中における ^1H -NMRスペクトルをFig. 10に示したが(第2章)、アイベリンの場合Aibが C_α プロトンを持たないために、すべての ^1H -NMRシグナルの帰属は難しい。そこで、 ^{13}C -NMRシグナルについても完全な帰属をすることにより、Aibの C_βH_3 プロトンを含めたすべての ^1H -NMRシグナルの一義的な帰属を行うことを試みた。

まず、DQF-COSYとHOHAHAスペクトルを用いてアミノ酸のスピンの同定を行った。Fig. 27とFig. 28に、室温(27°C)におけるDQF-COSYとHOHAHAスペクトルの部分拡大図を示したが、Aib以外のアミノ酸とC末端のアミノアルコール(Phaol-20)のNMRシグナルは、これらのスペクトルにおいて良く分離していたため、容易にスピンの同定を行うことができた。

次に、同定したスピンをそれぞれのアミノ酸ごとに一義的に帰属するため、NOESYスペクトルにおける $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ と $d_{\text{aN}}(i, i+1)$ の相関を用いて解析を進めた。NOESYスペクトルは負のNOEを強調させるため、5°Cで測定した。この温度での ^1H -NMRスペクトルは、27°Cのものとは比べていくつかのアミドプロトンの化学シフトが変化したものの、 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ の値の変化はなかった。このことはアイベリンのバックボーンのコンフォメーションは、5°Cと27°Cとでほとんど変わっていないことを示している。Fig. 29にNOESYスペクトルのNH-NH領域を示したが、Aib-1からAib-13、及びAib-15からPhaol-20に $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ の相関が観測された。なお、プロリン残基(Pro-14)はアミドプロトンを持たないが、その $\text{C}_\alpha\text{H}_2$ プロトンとAib-13のアミドプロトン及びVal-15のアミドプロトンと

の間にNOEが観測され (Fig. 30)、これを利用して連鎖帰属を行った。こうして、すべてのバックボーンのアミドプロトンシグナルが各アミノ酸ごとに一義的に帰属され、Aib以外のアミノ酸については側鎖の帰属も行うことができた。AibのC β H $_3$ プロトンについては、バックボーンのアミドプロトンの帰属結果に基づいて、HMBC¹¹⁶⁾ スペクトルのC β -NH相関を解析することで帰属を行った。また、Gln-7のNH $_2$ プロトンは6.82と7.42 ppmにブロードなシングレットシグナルとして観測された。しかし、Phaol-20の1-OHと3-NHプロトンは観測されなかった。以上の $^1\text{H-NMR}$ シグナルの帰属結果をTable 6に示した。

$^1\text{H-NMR}$ シグナルの帰属結果に基づき、DEPT、 $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$ 、HMBCスペクトルを解析することにより $^{13}\text{C-NMR}$ シグナルの帰属を行った (Table 7)。Aib以外のC $_{\alpha}$ 及びC $_{\beta}$ 炭素シグナルは、 $^{13}\text{C-}^1\text{H COSY}$ スペクトルより容易に帰属することができた。AibのC $_{\alpha}$ とC $_{\beta}$ 炭素シグナルはHMBCスペクトルにおけるアミドプロトンとのクロスピークを解析することで帰属した。また、Pro-14は、そのC $_{\gamma}$ 炭素の化学シフトの値 (27.61 ppm) より、トランス配置をとっていることが判明した¹¹⁷⁾。各アミノ酸のカルボニルシグナルについては、HMBCスペクトルのCO-C $_{\alpha}$ HとCO-NH相関を解析することにより、その帰属を行った。Fig. 31にHMBCスペクトルのCO-NH領域を示した。

Table 6. ¹H NMR data for aibellin in CD₃OH at 27°C.

Residue	NH (amide)	αH	βH	Others
Ac		2.02 s		
Aib-1	8.44 s		1.34 s, 1.49 s	
Ala-2	8.35 d (J=4.5)	4.00 m	1.42 d (J=7.5)	
Aib-3	7.69 s		1.44 s, 1.48 s	
Ala-4	7.74 d (J=5.5)	4.06 m	1.44 d (J=7.5)	
Aib-5	8.06 s		1.44 s, 1.48 s	
Ala-6	8.02 d (J=5.2)	4.13 m	1.56 d (J=7.5)	
Gln-7	8.10 d (J=5.0)	4.01 m	2.16 m, 2.25 m	γH ₂ 2.35 m, 2.56 m; εNH ₂ 6.82 brs, 7.42 brs
Aib-8	8.14 s		1.52 s, 1.55 s	
Phe-9	7.76 d (J=5.4)	4.24 m	3.16 dd (J=15, 8.3)	4H 7.20 m; 3,5H ₂ 7.26 m; 2,6H ₂ 7.32 m
			3.26 m	
Aib-10	8.28 s		1.43 s, 1.57 s	
Gly-11	8.25 t (J=5.5)	3.63 dd (J=16, 5.5)		
		3.79 dd (J=16, 5.5)		
Aib-12	8.01 s		1.45 s, 1.48 s	
Aib-13	8.08 s		1.47 s, 1.54 s	
Pro-14		4.35 dd (J=8.3, 5)	1.82 m, 2.24 m	γH ₂ 1.97 m, 2.07 m; δH ₂ 3.72 m, 4.08 m
Val-15	7.53 d (J=8.0)	3.62 dd (J=9.5, 8)	2.30 m	γMe ₂ 0.98 d (J=6.7), 1.04 d (J=6.7)
Aib-16	7.59 s		1.55 s, 1.56 s	
Aib-17	7.91 s		1.46 s, 1.48 s	
Glu-18	7.99 d (J=5.6)	3.96 m	2.18 m, 2.25 m	γH ₂ 2.35 m, 2.57 m
Glu-19	8.21 d (J=5.4)	3.93 m	1.90 m, 2.05 m	γH ₂ 2.26 m, 2.37 m
Phaol-20 ^a	7.52 d (J=8.2)	4.61 m	2.71 dd (J=13.3, 10)	2H ₂ 3.24 m; 4H ₂ 3.36 m, 3.45 m; 1H ₂ 3.89 m;
			2.94 dd (J=13.3, 8.3)	10H 7.20 m; 9,11H ₂ 7.26 m; 8,12H ₂ 7.32 m

^a The αH and βH protons of Phaol-20 are 5H and 6H₂ protons, respectively.

Table 7. ^{13}C NMR data for aibellin in CD_3OH at 27°C .

Residue	CO	αC	βC	Others
Ac	173.08	23.09		
Aib-1	178.36	57.14	22.96, 26.36	
Ala-2	176.54	53.87	16.65	
Aib-3	178.27	57.18	23.07, 26.66	
Ala-4	177.29	53.95	16.82	
Aib-5	178.22	57.23	23.09, 26.88	
Ala-6	178.07	54.22	17.02	
Gln-7	175.66	57.15	26.81	γC 32.45; δC 176.78
Aib-8	178.11	57.39	23.19, 26.99	
Phe-9	174.12	59.64	37.84	4C 127.60; 3,5C 129.19; 2,6C 130.29; 1C 137.89
Aib-10	178.72	57.51	23.32, 26.21	
Gly-11	172.08	45.80	24.15, 27.27	
Aib-12	174.90	57.96	24.14, 27.20	
Aib-13	178.40	58.03		
Pro-14	176.84	64.50	29.79	γC 27.61; δC 50.17
Val-15	175.38	65.12	30.10	γC_2 19.24, 20.76
Aib-16	177.55	57.31	23.89, 27.58	
Aib-17	178.75	57.27	23.18, 27.08	
Glu-18	177.30	57.80	27.20	γC 32.58; δC 177.43 ^b
Glu-19	175.06	58.05	27.27	γC 32.83; δC 177.47 ^b
Phaol-20 ^a		48.32	39.37	2C 50.87; 4C 51.70; 1C 58.16; 10C 127.72; 9,11C ₂ 129.27; 8,12C ₂ 130.49; 7C 138.34

^a The αC and βC carbons of Phaol-20 are 5C and 6C carbons, respectively.

^b Assignments may be interchanged.

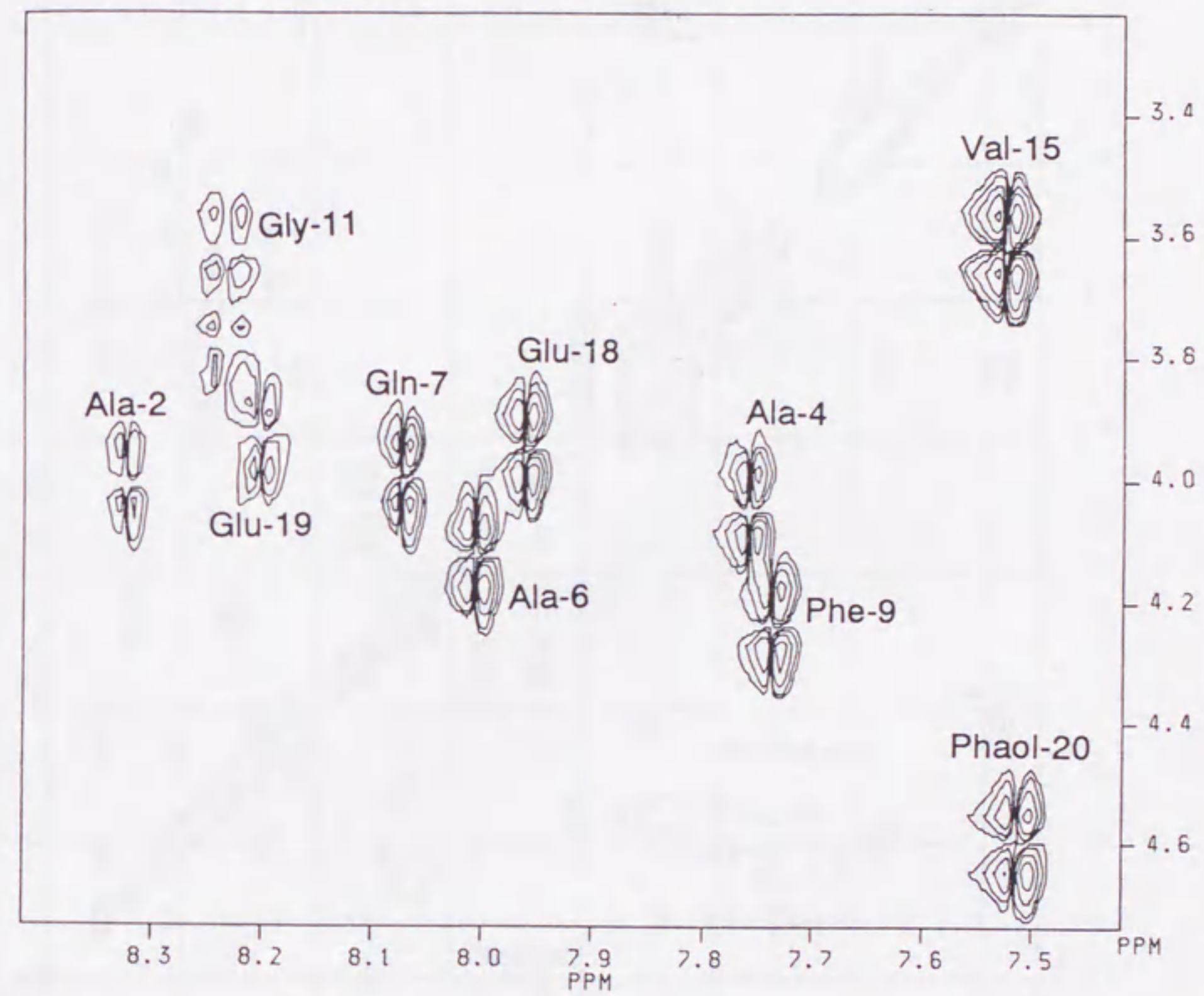


Fig. 27. NH-aliphatic region of the DQF-COSY spectrum of aibellin in CD_3OH at $27^\circ C$. The assignments of the cross peaks are shown.

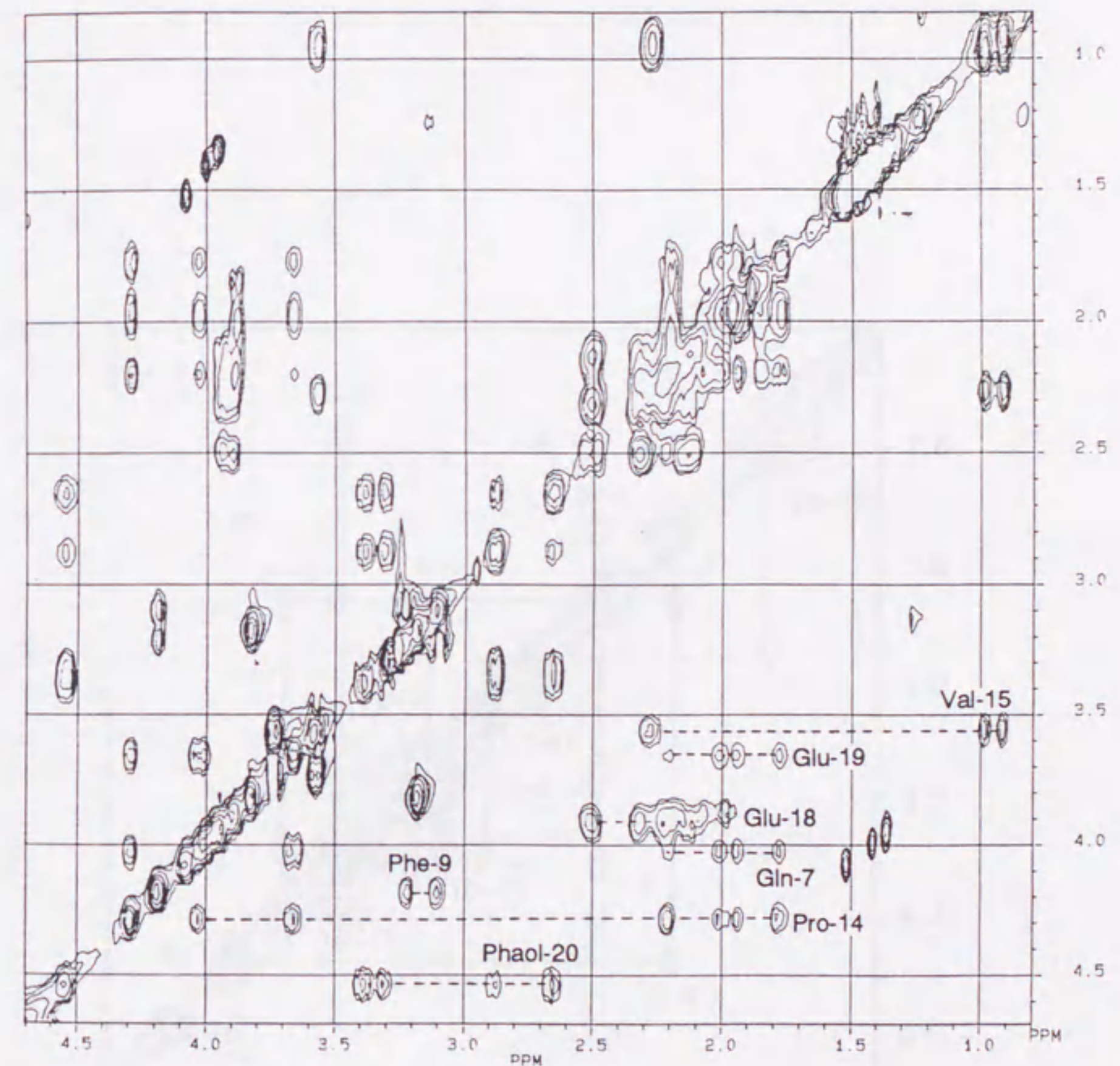


Fig. 28. Aliphatic region of the HOHAHA spectrum of aibellin in CD_3OH at 27°C with a mixing time of 90 ms. The spin systems of Gln-7, Phe-9, Pro-14, Val-15, Glu-18, Glu-19 and PhaoI-20 are shown.

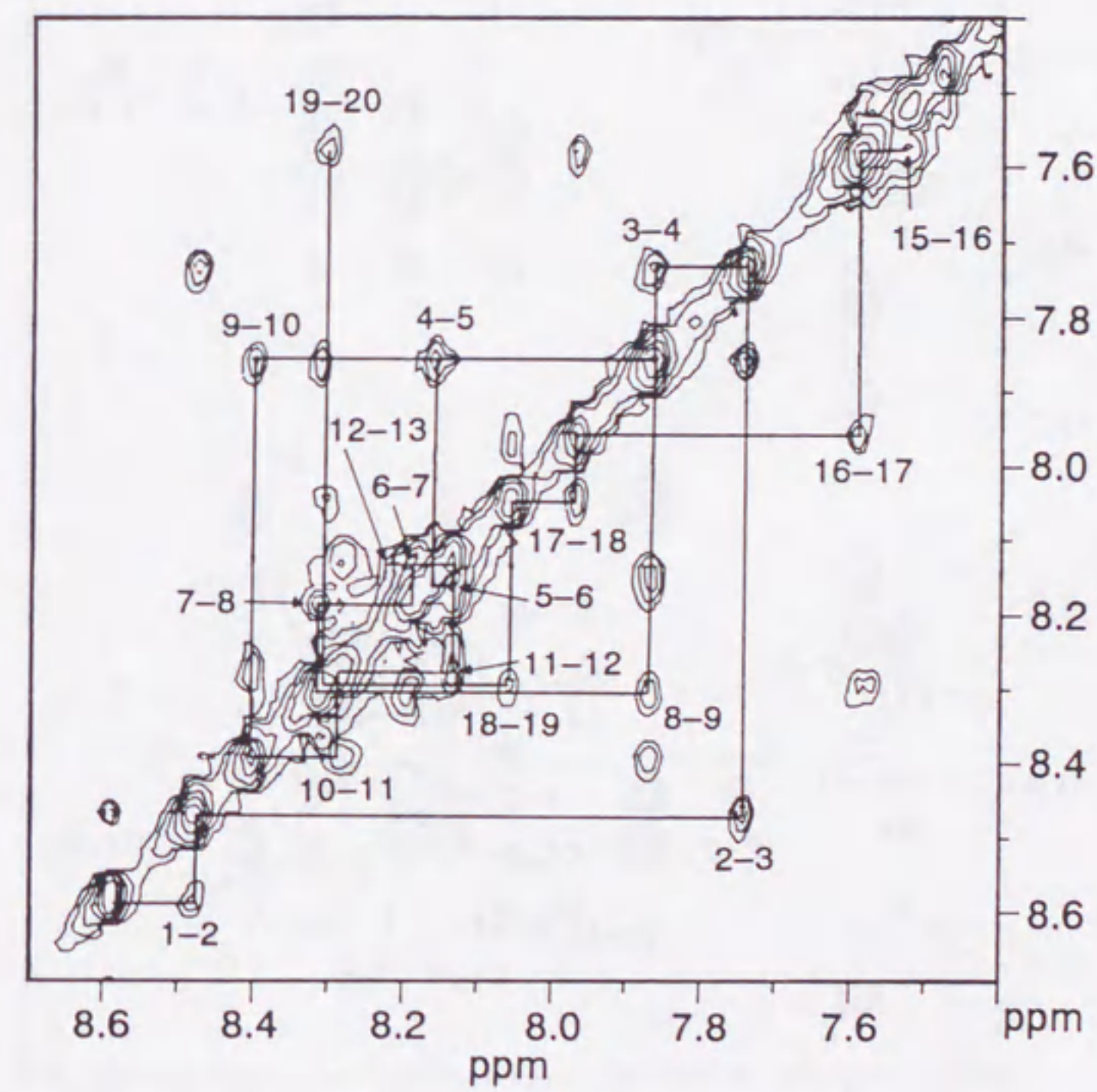


Fig. 29. NH-NH region of the NOESY spectrum of aibellin in CD_3OH at 5°C with a mixing time of 300 ms. The sequential $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ connectivities are shown.

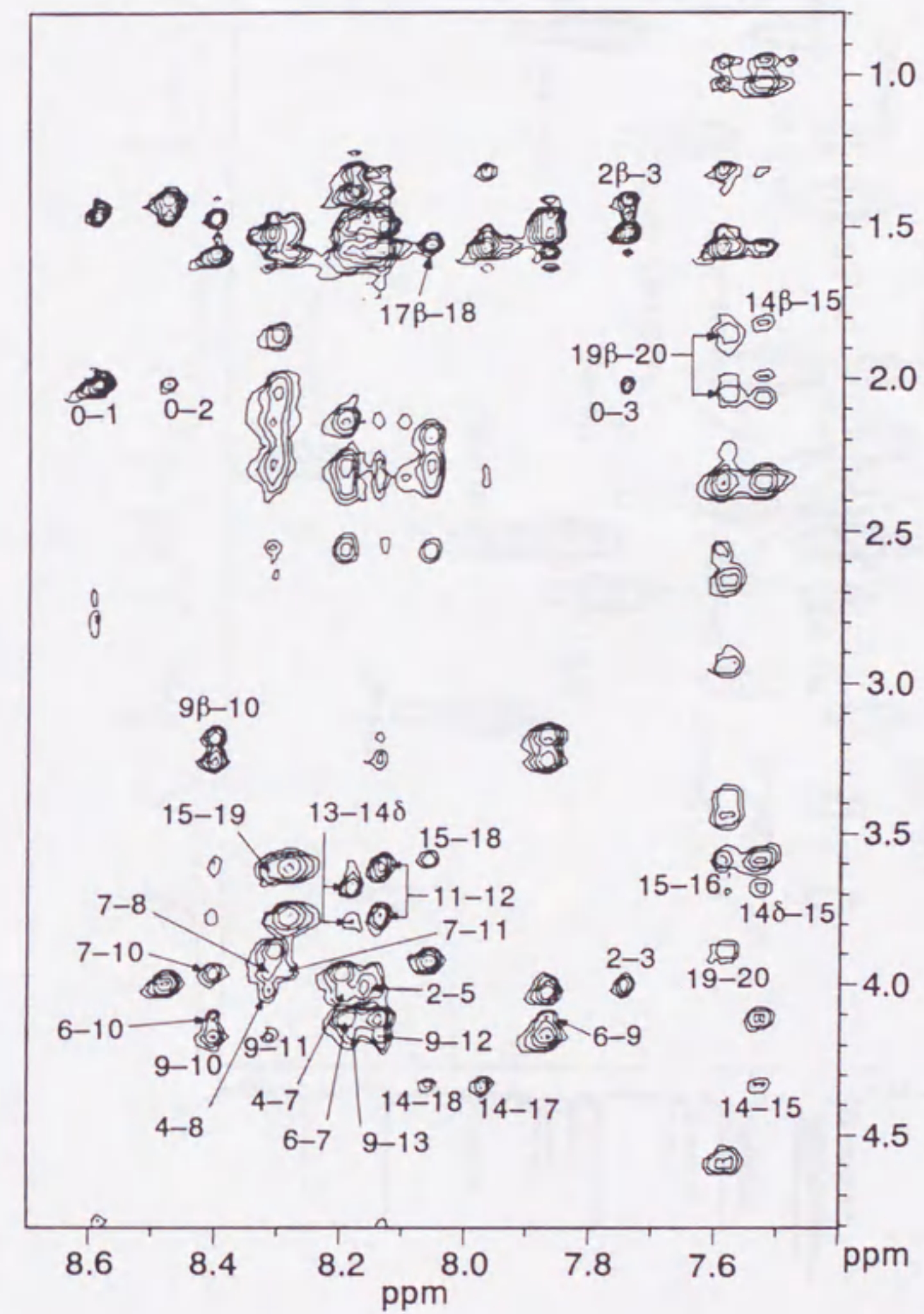


Fig. 30. NH-aliphatic region of the NOESY spectrum of aibellin in CD_3OH at $5^\circ C$ with a mixing time of 300 ms. The assignments of interresidue cross peaks are shown.

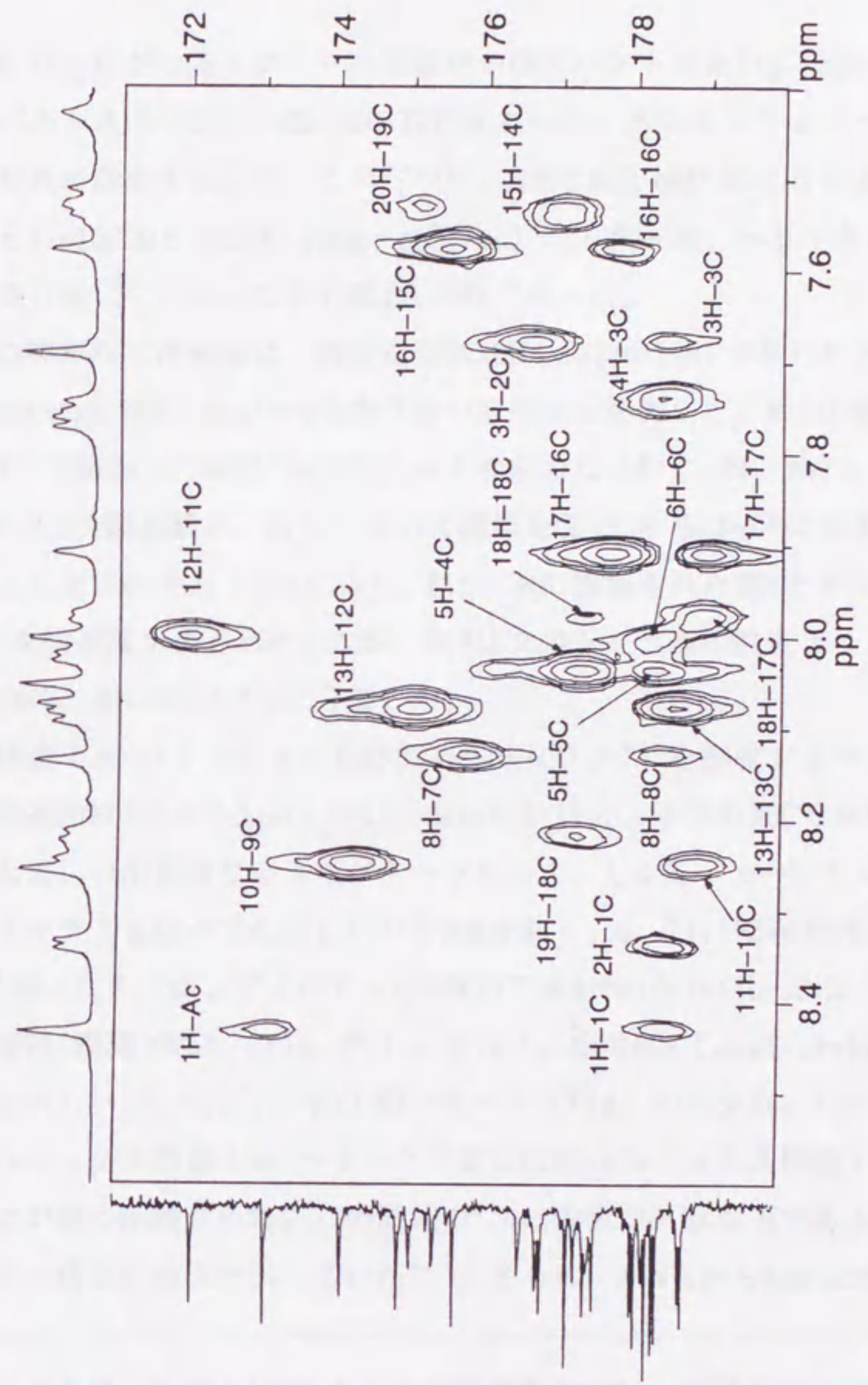


Fig. 31. NH-CO region of the HMBC spectrum of aibelin in CD₃OH at 27°C. The assignments of the cross peaks are shown.

2-2. 二次構造の決定

アイペリンの25°Cにおけるメタノール溶液中のCDスペクトルをFig. 32に示した。そのスペクトルは、208と222 nmに右巻きのヘリックスコンフォメーションに特徴的な負の吸収を示していた¹¹⁸⁻¹²⁰⁾。208と222 nmにおける分子楕円率は、それぞれ-16800と-16290 ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)であった。ヘリックス含量をChenらの方法¹²¹⁾によって求めると、46%であった。

アイペリンの詳細な二次構造は、隣接残基間NOE (sequential NOE) と中位のNOE (medium-range NOE) 及びH-D交換実験の結果から解析した。NOEは既に述べたように5°Cで測定したNOESYスペクトルより求めた (Fig. 29, 30)。アミドプロトンのH-D交換実験は、27°Cにおいて溶媒を CD_3OH から CD_3OD に変えて測定をすることにより行った (Fig. 33)。Fig. 34に観測されたNOEとアミドプロトンのH-D交換速度をまとめた。なお、NOEは交差シグナルの強度より、強いNOE、中間NOE、弱いNOEの3つに分類した。

ヘリックス構造 (α -ヘリックスまたは 3_{10} -ヘリックス*) を形成するペプチドは、隣接残基間NOEである $d_{\text{NN}}(i, i+1)$, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ と、中位のNOEである $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$, $d_{\beta\text{N}}(i, i+3)$ が同じようなパターンを示す。しかし、 α -ヘリックスでは 3_{10} -ヘリックスと比べて $d_{\alpha\text{N}}(i, i+4)$ のNOEが強く、 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ のNOEは弱い⁸⁵⁾。既に述べたように、アイペリンのNOESYではAib-1からAib-13に $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ のNOEが観測された (Fig. 29)。さらに、他のNOE [$d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$, $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3)$, $d_{\beta\text{N}}(i, i+1)$, $d_{\beta\text{N}}(i, i+3)$] のパターン (Fig. 30) から、Aib-1からAib-13はヘリックス構造 (α -ヘリックスまたは 3_{10} -ヘリックス構造) をとっていることが強く示唆された。この領域の $^3J_{\text{HN}\alpha}$ の値が6 Hz以下であることも、ヘリックス構造の特徴を示していた⁸⁵⁾。さらに、Aib-4からAib-13に

* 3_{10} -ヘリックスとは、らせん1回転あたりの残基数が3で、 i 番目のカルボニル基と $(i+3)$ 番目の残基のアミド基との間の水素結合によりできる環状構造の原子数が10であるヘリックス構造である。 3_{10} -ヘリックスは、 α -ヘリックスに比べて細い筒になっており、また α -ヘリックスほど安定でなく、多くは α -ヘリックスの両端側などに断片的に見られる¹²²⁾。

においては α -ヘリックス構造に特徴的な $d_{\alpha N}(i, i+4)$ のNOEが観測された (Fig. 30)。このことは、この領域 (Aib-4からAib-13) が α -ヘリックス構造をとっていることを示していた。

Val-15からPhaol-20の領域についても、既に述べたように $d_{NN}(i, i+1)$ のNOEが観測された (Fig. 29)。Pro-14とVal-15間については、Pro-14の $C_{\beta}H_2$ プロトンとVal-15のアミドプロトンとのNOEが観測された (Fig. 30)。このNOEは、 $d_{NN}(i, i+1)$ と等価とみなしてよいとされている⁸⁵⁾。さらに、観測された他のNOE [$d_{\alpha N}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, $d_{\alpha N}(i, i+4)$] から (Fig. 30)、Pro-14からPhaol-20は α -ヘリックス構造をとっていることが考えられた。この領域のH-D交換速度が遅いことも α -ヘリックス構造を支持するものであった。

上述したように、Ala-4からAib-13及びPro-14からPhaol-20は、それぞれ α -ヘリックス構造をとっていることが判明した。今までに二次構造が決定されているペプタイボールでは、Proの前後のアミノ酸の 3_{10} -ヘリックス型の水素結合が分子全体のヘリックス構造の折れ曲がりを引き起こしていると考えられている^{76, 110, 113)}。アイベリンの場合も同様に、この 3_{10} -ヘリックス型の水素結合、すなわちAib-12のカルボニル炭素とVal-15のアミドプロトンとの水素結合の存在が考えられた。なぜなら、Aib¹²-Aib-Pro-Val¹⁵というアイベリンと共通のアミノ酸配列を有するsaturnisporinは、 3_{10} -ヘリックス型の水素結合の存在のために、Val-15のアミドプロトンのH-D交換速度が遅くなり、またVal-15の $^3J_{NH\alpha}$ は大きな値を示すことが報告されている⁷⁶⁾。アイベリンの場合も、Val-15のアミドプロトンのH-D交換速度は非常に遅く (Fig. 33)、 $^3J_{NH\alpha}$ の値 (8 Hz) は他のアミノ酸に比べて大きな値を示していた (Table 6)。これらのことより、アイベリンにおいてもAib-12のカルボニル炭素とVal-15のアミドプロトンの間で他のペプタイボールと同様に 3_{10} -ヘリックス型の水素結合が存在していると思われる。したがって、アイベリンのヘリックス構造はPro-14のまわりで折れ曲がって存在していると予想された。残る問題は、N末端の最初の3残基のヘリックス構造 (α -ヘリックスまたは 3_{10} -ヘリックス) の決定である。アセチル基の CH_3 プロトンはAib-2とAla-3のアミドプロトンとの間にNOEが認められた [$d_{\alpha N}(i, i+2)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$] (Fig.

30)。この結果より、N末端の最初の3残基は 3_{10} -ヘリックスを優先的にとっていることが予想された。このことは、 α -ヘリックスに特徴的な、アセチル基からの $d_{\alpha N}(i, i+4)$ のNOEが見られなかったことから支持された。過去に二次構造が報告されているtrichosporin、saturnisporinについても、N末端の最初の3残基は同様に 3_{10} -ヘリックスが推定されている^{76, 113)}。

こうして、アイベリンのメタノール溶液中の二次構造を決定することができた。アイベリンは、Pro-14のところで 3_{10} -ヘリックス型の水素結合の存在によって折れ曲がった構造をしており、その両側のセグメントは α -ヘリックスをとっていることが判明した。ただし、N末端の最初の3残基は 3_{10} -ヘリックス構造を優先的にとっていることも推定された。考えられる水素結合スキームをFig. 35に示した。

また、 α -ヘリックス及び 3_{10} -ヘリックスの標準二面角データを用いてコンピュータによる三次元モデルの構築、すなわち分子力場計算による構造最適化(geometry optimization)も試みた。その結果をFig. 36に示したが、このようにして推定された三次元構造もPro-14の位置で折れ曲がったヘリックス構造をしており、NMRから推定された二次構造情報と良く一致するものであった。

今回、明らかになったアイベリンの立体構造上の特徴は、既に二次構造が報告されているtrichosporin¹¹³⁾とsaturnisporin⁷⁶⁾のものによく似たものであった。N末端の部分以外はalamethicin¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾のものとも似ていた。以上の結果は、アイベリンのユニークな構造上の特徴であるC末端の2個の酸性アミノ酸(Glu)と新規なアミノアルコールはペプタイボール類に共通な二次構造上の特徴であるヘリックス構造に大きく影響を与えないことを示している。

ペプチドが生体膜と相互作用を持つためには、プロリン残基によって折れ曲がったヘリックス構造が重要な役割を果たすと考えられている¹²³⁻¹²⁵⁾。今回、アイベリンもPro-14の位置で折れ曲がったヘリックス構造をとっていることが判明した。したがって、アイベリンも生体膜と相互作用することが予想され、このことがルーメン発酵改善作用に何らかの関係を持つ可能性も考えられる。

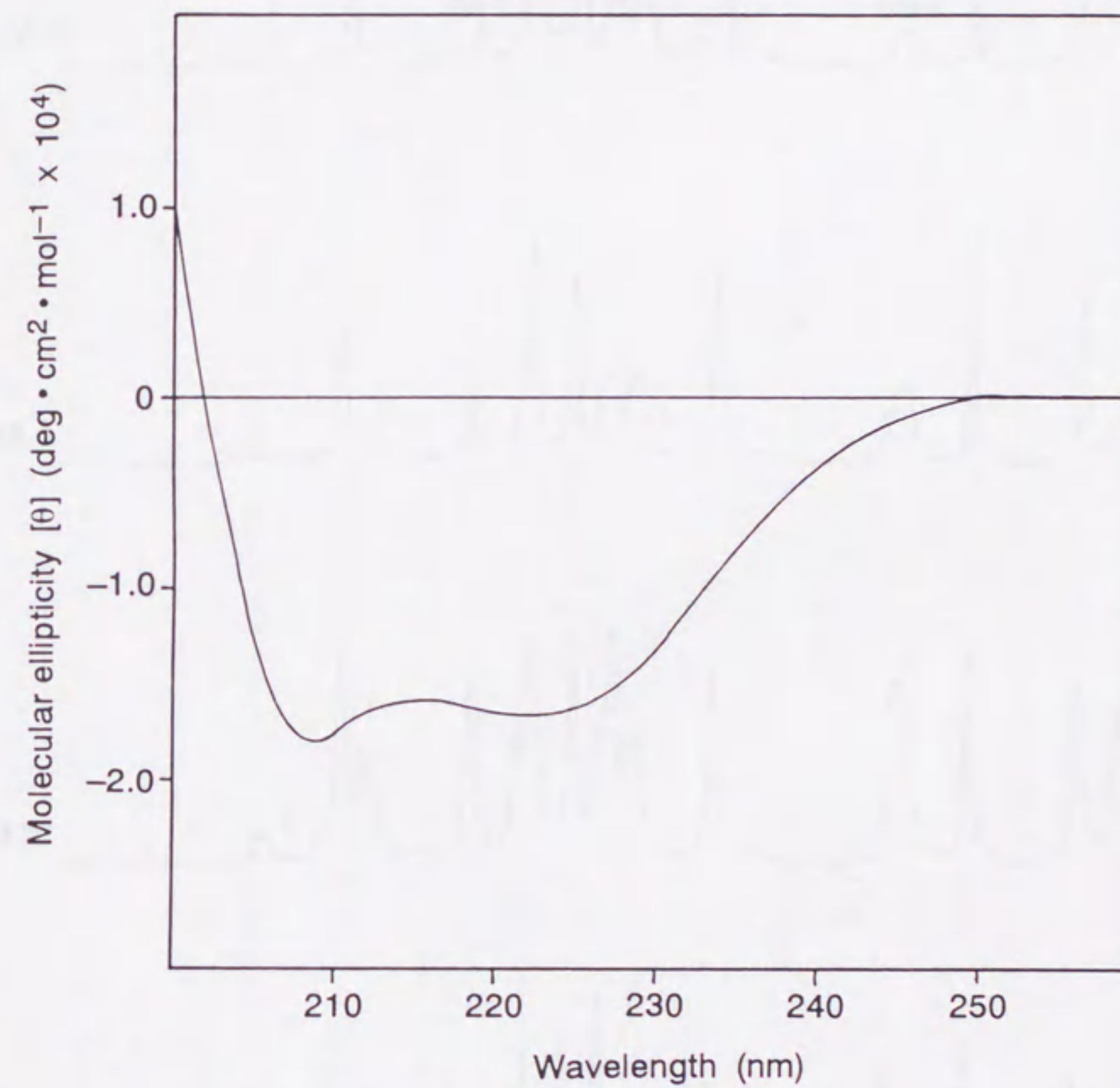


Fig. 32. CD spectrum of 25 μ M aibellin in MeOH at 25°C.

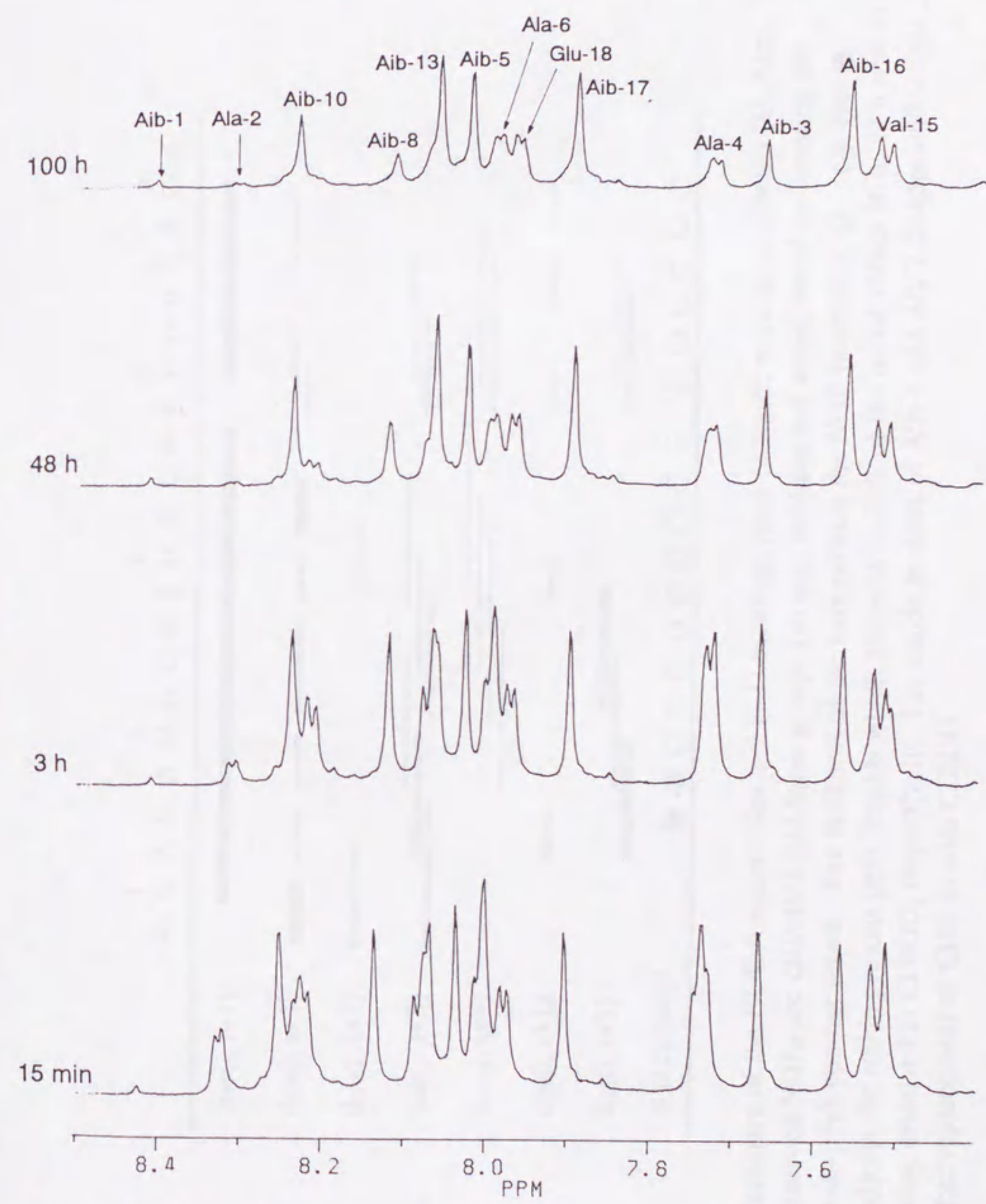
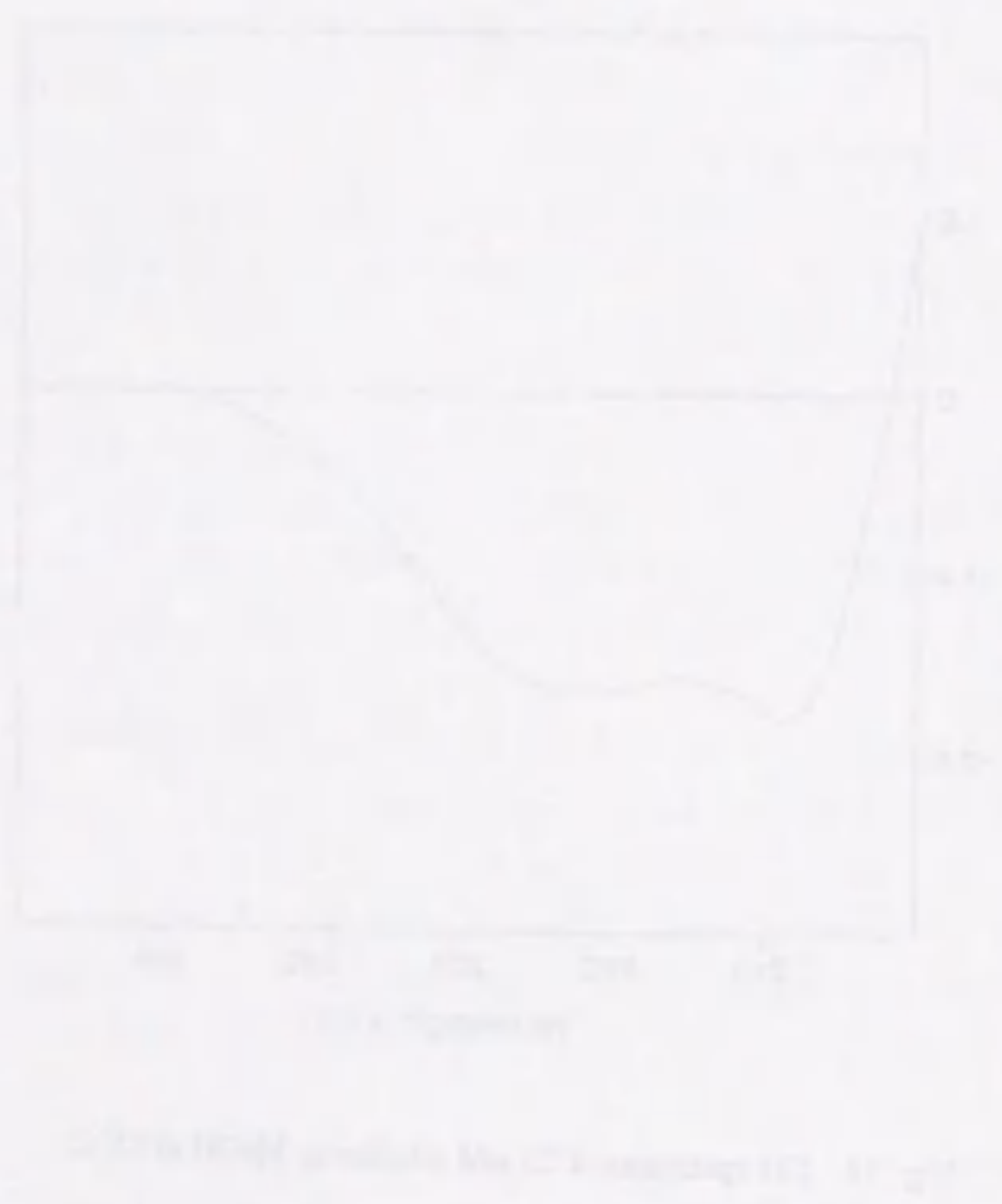


Fig. 33. Spectral changes in the amide proton region of aibellin in CD₃OD. The sample was kept at 27°C.

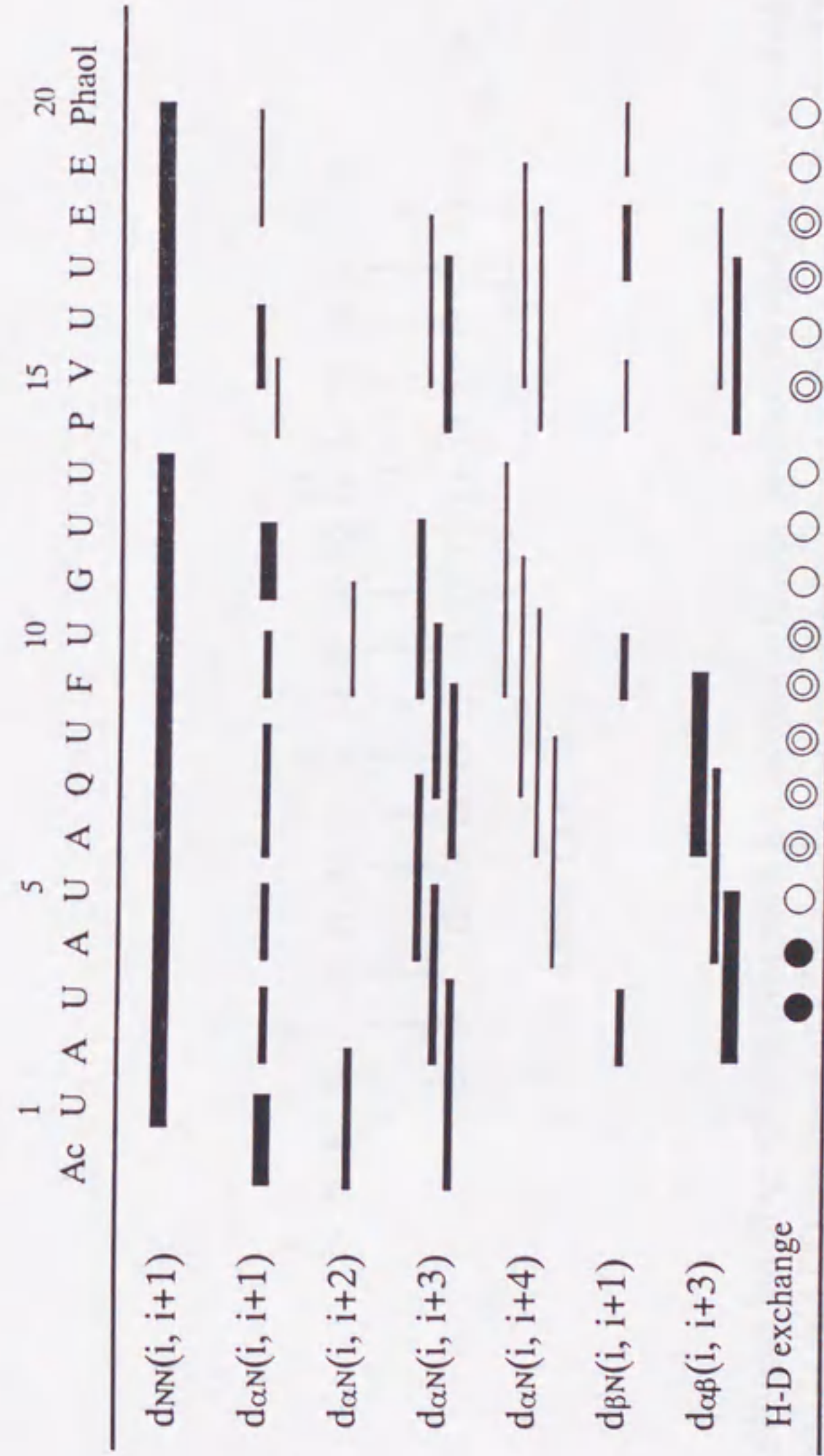


Fig. 34. Summary of the NOE connectivities and H-D exchange rates of amide protons of aibellin (U=Aib). The observed NOEs are classified into three groups (strong, medium and weak) based on counting the cross-peak contour levels. The thickness of the bars reflects the NOE intensities. ⊙, ○ and ● indicate the amide protons peak heights which decrease to 50% of the initial values 36 h, 12 h and 1 h after being dissolved in CD₃OD, respectively. The amide protons of Aib-1 and Ala-2 disappeared within 30 min after replacement of CD₃OH with CD₃OD.

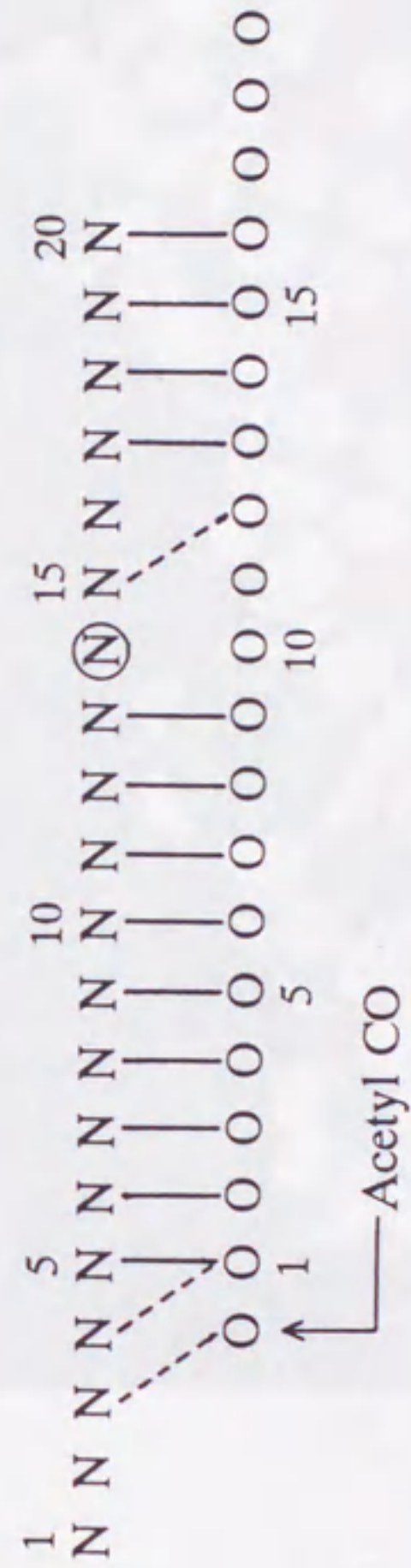


Fig. 35. Hydrogen bonding scheme proposed for aibellin. Upper symbols N and lower symbols O stand for NH protons and CO oxygens of each amino acid residue or amino alcohol, respectively. Circled symbol N is proline residue. Solid and broken lines indicate the α -helix and 3_{10} -helix type hydrogen bonding, respectively.



Fig. 36. CPK model of aibellin obtained by geometry optimization.

3. 要約

アイベリンのメタノール溶液中における二次構造をNMRを用いて決定した。まず、すべての ^1H -NMRシグナルの帰属をおこなった。帰属方法はWuthrichらにより確立された連鎖帰属法に従った。すなわち、DQF-COSYとHOHAHAスペクトルによってアミノ酸のスピンの同定をした後、NOESYスペクトルを解析することにより一義的な帰属をした。しかし、Aibの C_βH_3 プロトンはこの方法では帰属できなかったため、HMBCスペクトルからすべての ^{13}C -NMRシグナルを帰属し、その結果を用いて帰属を行った。二次構造は主にNOESYスペクトルを詳細に解析することにより決定した。その結果、20残基より成るこのペプチドは、分子全体としては14番目のプロリンのところで折れ曲がった形をしており、その両側のセグメントはいずれも α -ヘリックスを形成していることがわかった。なお、N末端の最初の3残基は 3_{10} -ヘリックス構造を優先的にとっていることも推定された。この二次構造上の特徴は、既に報告されている他のペプチポールとよく似たものであった。