

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	奈賀 俊人
学位授与の日付	2020年3月31日	
論文名	<i>Bacillus cereus</i> が産生する嘔吐型毒素に関する生物有機化学的研究	
論文審査委員	主査	谷森 紳治
	副査	秋山 康紀
	副査	阪本 龍司

論文要旨

第1章 緒論

日本では戦後以来、生活の基盤である食の安全を確保するため、食品衛生管理が整備・改良されている。理化学分野では食品添加物や残留農薬等にポジティブリスト制が導入され、意図的混入事件もあったことから高度な分析装置を備えた検査体制が急速に普及している。食の安全を脅かす要因の一つに、細菌汚染が挙げられる。細菌が産生する食中毒毒素など、天然から微量しか得られない成分の分析は、質量分析計を備えたクロマトグラフィ技術を基軸とするが、標準品の効率的な合成法の開発が必要であり、詳細な発症メカニズムなど未解明の課題が多く残る。

本研究では、*Bacillus cereus*（セレウス菌）が引き起こす嘔吐型食中毒を題材として取り上げた。セレウス菌は土壌など生活圏の近傍に生息する環境細菌であり、食品の汚染リスクが高い。下痢症状または嘔吐症状を呈する食中毒を引き起こし、日本では嘔吐型が一般的である。激甚な症状に至ることは少なく注目を集めてこなかったが、近年死亡事例が出たことなどにより、詳細な発症メカニズムを解明して有効な防止策を確立することや食品汚染の実態を把握することなどが強く求められている。

培養液から原因毒素として単離・構造決定されたセレウリド（cereulide）は、32員環状のデプシペプチドである。セレウリドは K^+ イオノフォア活性を有し、細胞膜電位に障害を引き起こす。このため細胞内のミトコンドリアを膨張させ、原形質に空胞を形成してアポトーシスを引き起こす。セレウリドの耐熱性は高く高圧殺菌にも安定であり、酸・塩基に

も分解されない。このため潜在的な食品汚染のリスクも指摘されるなど、食品加工や保存におけるセレウリド汚染の定量的な実態把握や、リスク管理指針の作成が求められている。

本研究では腫瘍細胞に強い毒性を示すホモセレウリド (homocereulide) など、微量成分の化学構造の解明および食中毒性など生物学的特性の解明を行う。化学合成により得られる標準品をツール分子とするケミカルバイオロジー的手法を用いることで、セレウリド類の変動プロファイルを確定し、セレウリド類の産生と分解の全容を定量的に把握する。

第2章 Cereulideの類縁体 homocereulideの全合成と空胞化変性活性の測定

ホモセレウリドは食中毒とは無関係に海洋性セレウス菌から単離された類縁体であり、培養液中にセレウリドとともに存在を確認することができる。ホモセレウリドは、セレウリドの L-バリン酸が L-アロイソロイシン酸に置き変わっているほか、隣接する L-バリンはエナンチオマーである D-バリンとなった構造を有している。セレウリドは全合成や構造活性相関、K⁺イオノフォア活性に関する多くの報告がなされているが、ホモセレウリドは強い細胞毒性が報告されているものの、全合成は未だ達成されておらず、詳細な化学的特性や食中毒への関与も明らかにされていない。そのためホモセレウリドを液相フラグメント縮合法により合成し、天然物の構造を明らかにするとともに、生物活性について評価した。

市販のアミノ酸および縮合剤、保護試薬を原料として合成を行った。光学活性な α -ヒドロキシ酸は、対応するキラルアミノ酸から立体保持でヒドロキシ化することで調製した。ホモセレウリドの逆合成を行うと、3種のテトラデプシペプチドフラグメント A: L-TBDMSO-*allo*-Ile-D-Val-D-O-Leu-D-Ala、B1: L-TBDMSO-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala、B2: L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala-OBn に分解される。これらのフラグメントを順次カップリングする経路に基づいて合成を行った。フラグメント A、B1 および B2 が有するアミド結合はウロニウム系縮合剤である EDCI (*N*-ethyl-*N'*-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide) を用いて構築し、エステル結合は塩化 *p*-トルオイルをアシル化剤として構築した。前駆体である鎖状ドデカデプシペプチドは A、B1、B2 を順次エステル縮合し、オクタデプシペプチドを経て合成した。最終段階である head-to-tail 型分子内環化反応に椎名法 (椎名試薬: *m*-nitrobenzoic anhydride、MNBAN) を使い、全 18 段階 (全収率 11%以上) でホモセレウリドの全合成を達成した。合成品の NMR スペクトルは一部文献値と符合しなかったものの合成した構造を支持しており、比旋光度は文献値とよく一致した。

セレウリドの産生量が多い、トリプチケースソイブロス (TSB 培地) を用いてセレウス菌を培養し、合成品と天然物の比較を行った。C18 逆相クロマトグラフィにより分析し、HPLC リテンションタイムが同一であることを確認した。検出時間に確認されるマススペクトルも互いに高い一致を示した。

セレウリドの毒性強度の指標として用いられる、ヒト喉頭ガンに由来する HEp-2 細胞に対する空胞化変性の最低活性濃度を測定した。セレウリドは 3.95 nM で活性を示したのに対し、ホモセレウリドは 1.39 nM であり、セレウリドの約 3 分の 1 の濃度で毒性を発現した。TSB 培養液中の濃度はセレウリドで 65.4 nM、ホモセレウリドで 9.3 nM であり、培養液中の濃度はホモセレウリドの方が低いものの、セレウリドより強い毒性を示すことから、食中毒への関与が強く示唆された。また合成中間体を用いた構造活性相関では、3種のド

デカデブシペプチドはいずれも最低活性濃度が 1,000 nM 以上であり、毒性の発現には環状構造が強く関係していることが示された。本成果から、食品衛生検査の方法が拡充され、セレウス食中毒の全容解明に貢献できると考えられる。

第 3 章 *Bacillus cereus* 培養液における食中毒毒素セレウリドの産生と分解

セレウリドの生合成機構や嘔吐毒性については、食品衛生や食中毒防止の観点から多くの研究成果が報告されているが、経時的な動態変化、特に分解消長に関する報告は見られない。新たに培養液から見出したセレウリド分解物の構造を決定し、培養液を詳細に分析することで、セレウリドの産生と分解の過程が明らかとなり、食中毒の発症メカニズムの解明につながる。食中毒のリスク管理に資するため、セレウリド毒素の変動プロファイルを作成することを目的とした。

培養液の LC-MS 分析から、セレウリドの一次加水分解物であるドデカデブシペプチドおよび二次加水分解物であるテトラデブシペプチドの存在が示唆された。セレウリドの化学構造は、テトラデブシペプチドを 3 回繰り返した *cyclo(L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala)₃* である。一般的にアミド開裂よりもエステル開裂の方が起こりやすいことから、分解物の構造を D-Ala-L-O-Val 間または L-Val-D-O-Leu 間のエステル結合開裂体と推定した。第 2 章で行ったホモセレウリドの合成中間体を活用し、デブシペプチド鎖を伸長することで次の 4 化合物、すなわちドデカデブシペプチド (L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala)₃ (**29**) および (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ (**30**)、テトラデブシペプチド L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala (**31**) および D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val (**32**) を合成した。

合成方法は前章と同様に行ったが、途中 D-TBDMSO-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val-OBn のベンジル基を水素接触還元により脱離する際、*t*-ブチルジメチルシリル基が同時に脱離し、触媒を Pd/C から Pd(OH)₂/C に変更する必要があるがあった。

LC-TOFMS を用いて合成品と培養液を比較し、天然物の構造を確認した。天然物のリテンションタイムおよびマススペクトルは化合物 **30** および **31** と一致した。化合物 **29** は確認されず、化合物 **32** は極微量の痕跡を認めた。

培養液を用いたセレウリド添加回収試験では、無処理の培養液の回収率は 1.6% であり、煮沸した培養液では回収率が 92.4% であった。煮沸により分解活性が失活したことから、培養液中の分解酵素の存在が強く示唆された。

化合物 **30** および **31** の化学構造から、分解酵素は異なる反応点を 2 つ有しており、基質特異性は 2 種類のエステル結合を識別するほど高くないと考えられた。立体障害の大きな部分構造 Val-O-Leu を有するデブシペプチドが培養液中に残存したと考えられ、立体障害が小さい Ala-O-Val 間のエステル結合を反応点とするデブシペプチドは、速やかに分解されて培養液に確認されなかったと考えられる。

合成品を LC-MS 分析の標準として、培養時間の経過にともなうセレウリド類の濃度変動プロファイルを作成した。TSB 培地で 35°C にて振盪培養 (180 rpm) したセレウス菌は、導入期の後 12 時間まで対数増殖期となり、定常期、死滅期を経て 70 時間後には、ほぼ生菌を確認しなくなった。セレウリドは対数増殖期を過ぎて定常期に入ると増加した。培養 39 時間で最大濃度 0.23 μM となった後に減少に転じ、70 時間以降には痕跡を認めるのみとなった。ドデカデブシペプチドはセレウリドに似た挙動だったが、最大 0.02 μM と微量で

あり、明確ではなかった。テトラデブシペプチドはセレウリドが減少を始めた後も増加し、死滅期に近い培養 52 時間に最大 2.31 μM となった後に減少した。セレウリドとデブシペプチド類の間にモル当量関係は確認されなかった。

本研究の結果は、セレウリドが化学的、酵素化学的視点から安定とは言い難いことを示している。そのため分解物を探索、構造決定し、その特性を明らかにすることは学術的にも、食品衛生上にも意義がある。

第 4 章 総括

細菌によって引き起こされる食中毒では定性的な研究が多く、合成標準品を基準とした定量研究を展開する例は少ない。本研究で全合成したホモセレウリドや、培養液に見出されたセレウリド分解物は、セレウス菌が引き起こす食中毒の全容解明に資するものであり、簡易分析法や治療法の開発などの進展に期待できる。食品加工の現場においては、リスク管理および対策に役立つものと考えられる。人々が安心して生活を営むことができるよう、食中毒の防止に貢献し、食の安全性の一助になれば幸いである。

審査結果の要旨

生活の基盤である食の安全を確保するためには、食品衛生管理の整備・改良が重要課題の一つである。食の安全を脅かす要因の一つに細菌汚染があるが、細菌が産生する食中毒毒素など、天然から微量しか得られない成分の分析は、標準品の効率的な合成法の開発が必要であり、詳細な発症メカニズムなど未解明の課題が多く残る。

本研究では、*Bacillus cereus* (セレウス菌) が引き起こす嘔吐型食中毒を題材として取り上げた。セレウス菌は土壌など生活圏の近傍に生息する環境細菌であり、食品の汚染リスクが高い。下痢症状または嘔吐症状を呈する食中毒を引き起こすが、激甚な症状に至ることは少なく注目を集めてこなかった。しかし近年死亡事例が出たことなどにより、詳細な発症メカニズムを解明して有効な防止策を確立することや食品汚染の実態を把握することなどが強く求められている。

培養液から原因毒素として単離・構造決定されたセレウリド (cereulide) は、32 員環状のデブシペプチドであり、 K^+ イオノフォア活性を有し、細胞膜電位に障害を引き起こすことで細胞内のミトコンドリアを膨張させ、原形質に空胞を形成してアポトーシスを引き起こす。セレウリドの耐熱性は高く高圧殺菌にも安定であり、酸・塩基にも分解されない。このため潜在的な食品汚染のリスクも指摘されるなど、食品加工や保存におけるセレウリド汚染の定量的な実態把握や、リスク管理指針の作成が求められている。

本研究では腫瘍細胞に強い毒性を示すホモセレウリド (homocereulide) など、微量成分の化学構造の解明および食中毒性など生物学的特性の解明を行う。化学合成により得られる標準品をツール分子とするケミカルバイオロジー的手法を用いることで、セレウリド類

の変動プロファイルを確定し、セレウリド類の産生と分解の全容を定量的に把握することを目的とする。

第2章ではセレウリドの類縁体ホモセレウリドの全合成と空胞化変性活性の測定を行った。市販のアミノ酸および縮合剤、保護試薬を原料として、構成要素の α -ヒドロキシ酸は、対応するキラルアミノ酸から立体保持でヒドロキシ化することで調製した。3種のテトラデプシペプチドフラグメント A: L-TBDMSO-*allo*-Ile-D-Val-D-O-Leu-D-Ala、B1: L-TBDMSO-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala、B2: L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala-OBn を順次カップリングし、オクタデプシペプチドに導き、椎名法により head-to-tail 型分子内環化反応を行い、全18段階（全収率11%以上）でホモセレウリドの全合成を達成した。合成品のNMRスペクトルは一部文献値と符合しなかったものの構造をよく支持しており、比旋光度は文献値と一致した。TSB培地を用いてセレウス菌を培養し、C18逆相クロマトグラフィにより合成品と天然物の比較を行い、リテンションタイムが同一であり、さらにマススペクトルも高い一致を示した。

セレウリドの毒性強度の指標として用いられる、ヒト喉頭ガンに由来するHEp-2細胞に対する空胞化変性の最低活性濃度を測定したところ、ホモセレウリドは1.39 nMであり、セレウリドの約3分の1の濃度で毒性を発現した。TSB培養液中の濃度はホモセレウリドの方が低いものの、セレウリドより強い毒性を示すことから、食中毒への関与が強く示唆された。なお生合成中間体と推定される合成中間体である3種のドデカデプシペプチドはいずれも活性は確認されず、毒性の発現には環状構造が関係していると推定される。本成果から、食品衛生検査の方法が拡充され、セレウス食中毒の全容解明に貢献できると考えられる。

第3章では *Bacillus cereus* 培養液における食中毒毒素セレウリドの産生と分解に関する研究を行った。セレウリドの生合成機構や嘔吐毒性については、食品衛生や食中毒防止の視点から多くの研究成果が報告されているが、経時的な動態変化、特に分解消長に関する報告は見られない。新たに培養液から見出したセレウリド分解物の構造を決定し、培養液を詳細に分析することで、セレウリドの産生と分解の過程が明らかとなり、食中毒の発症メカニズムの解明につながる。

培養液のLC-MS分析から、セレウリドの一次加水分解物であるドデカデプシペプチドおよび二次加水分解物であるテトラデプシペプチドの存在が示唆された。分解物として4つの化合物、ドデカデプシペプチド (L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala)₃ (C) および (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ (D)、テトラデプシペプチド L-O-Val-L-Val-D-O-Leu-D-Ala (E) および D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val (F) を推定し、化学合成した。化学合成は、第2章で確立して方法を応用し行った。LC-TOFMSを用いて合成品と培養液を比較し、天然物のリテンションタイムおよびマススペクトルは化合物DおよびEと一致した。

合成品をLC-MS分析の標準として、培養時間の経過にともなうセレウリド類の濃度変動プロファイルを作成した。TSB培地で35°Cにて振盪培養(180 rpm)したセレウス菌は、導入期の後12時間まで対数増殖期となり、定常期、死滅期を経て70時間後には、ほぼ生菌を確認しなくなった。セレウリドは対数増殖期を過ぎて定常期に入ると増加した。培養39時間で最大濃度0.23 μ Mとなった後に減少に転じ、70時間以降には痕跡を認めるのみとなった。ドデカデプシペプチドはセレウリドに似た挙動だったが、最大0.02 μ Mと微量で

あり、明確ではなかった。テトラデプシペプチドはセレウリドが減少を始めた後も増加し、死滅期に近い培養 52 時間に最大 2.31 μM となった後に減少した。セレウリドとデプシペプチド類の間にモル当量関係は確認されなかった。

本研究の結果は、セレウリドが化学的、酵素化学的視点から安定とは言い難いことを示している。そのため分解物を探索、構造決定し、その特性を明らかにすることは学術的にも、食品衛生上にも意義がある。

細菌によって引き起こされる食中毒では定性的な研究が多く、合成標準品を基準とした定量研究を展開する例は少ない。本研究で全合成したホモセレウリドや、培養液に見出されたセレウリド分解物は、セレウス菌が引き起こす食中毒の全容解明に資するものであり、簡易分析法や治療法の開発などの進展に期待できる。この研究成果は、応用生命科学、天然物化学、食品衛生学分野とりわけ、食中毒毒素の簡便で正確な化学分析の発展に貢献するものであると判断する。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。