

## 学位論文題名

新ピログルタミルペプチターゼ阻害物質 benarthin および  
pyrizinostatin に関する研究

## 学位論文内容の要旨

酵素は、個体発生から老化に至るすべての生命現象と深いつながりを有している。生体内で起こる様々な現象に関与する酵素の働きを知り、それらの酵素に対する阻害物質の役割を明らかにすることは、生体の制御機構ならびに病因を理解する上に役立ち、治療への重要なアプローチの一つであると考えられる。これらの観点から、微生物化学研究所では抗生物質研究を応用し、微生物培養液より数々の酵素に対する阻害物質の探索研究が行われ、数多くの低下分子酵素阻害物質が発見されている。この研究の一環として、ピログルタミルペプチダーゼ（PGPase）に対する阻害物質を微生物培養液中に探索した。PGPase はエキソペプチターゼの一種であり、1968年に *Pseudomonas fluorescens* 菌体中に見出され、部分精製された酵素である。この酵素はタンパク質やペプチドのアミノ末端のピログルタミン酸残基を特異的に遊離する酵素である。また、PGPase は広く各組織に分布しているにもかかわらず、その生理的機能に関しては未だ解明されていない部分が多く残されているのが現状である。この点からも、その阻害物質の発見はPGPaseの生理機能の解明においても大いに役立つと考えられ、また、新たな薬理活性を有する薬剤開発へのアプローチを可能にすることが期待される。

この様な背景の中で、PGPase に対する阻害物質を微生物培養液中より探索し、新規化合物 benarthin 及び pyrizinostatin を見いだした。本研究はこれらの阻害物質の探索方法、生産菌の同定、単離方法、生物活性、物理化学的性状および構造解析について検討したものである。さらに、benarthin に関しては合成法を確立し、構造活性相関を検討した。

本研究の結果を要約すると、

1. 牛肝臓由来 PGPase のアッセイ系を確立し、微生物培養液中より阻害物質の探索を行ったところ、約1500の被検菌株のうち一株である MJ244-SF 1 株の培養液中に阻害物質が生産されていることを見いだした。構造解析の結果、新規化合物であったので benarthin と命名した。

2. Benarthin 生産菌である MJ244-SF 1 株は、東京都品川区の土壌より分離された放線菌である。その形態および菌学的性状から *Streptomyces* 属に属すると考えられ、*Streptomyces* 属より MJ244-SF 1 株類似の既知菌種を検索した結果、*Streptomyces xanthophaeus* がほぼ一致した。従って、MJ 244-SF 1 株は *Streptomyces xanthophaeus* MJ 244-SF 1 株と同定された。
3. *Streptomyces xanthophaeus* MJ244-SF 1 による benarthin の生産は 2 日目で最高に達し、その後培養液の pH 上昇とともに低下した。

従って、Benarthin の精製は培養 2 日目の培養濾液より行った。培養濾液 4 L を活性炭、ついでダイアイオン HP-20 で処理し、活性粗粉末を得た。この粗粉末をセファデックス G-10 によるゲル濾過、さらに、遠心液-液分配クロマトグラフィーを行い、benarthin を 396 mg 単離した。
4. Benarthin の PGPase に対する阻害様式を Lineweaver-Burk プロットにより解析したところ、基質に対して拮抗的であり、その  $K_i$  値は  $1.2 \times 10^{-6}$  M であった。また、benarthin のマクロファージ、好中球およびリンパ球への作用、細胞障害性および分化誘導活性を検討したが強い活性は認められなかった。Benarthin は抗菌および抗真菌活性は示さず、マウスに対して 100 mg/kg の静脈内投与で毒性は認められなかった。
5. Benarthin は水溶性の無色粉末として得られ、その分子式は、高分解能 FAB-MS および元素分析の結果より  $C_{17}H_{25}N_5O_7$  と決定された。呈色反応においては坂口、GL、モリブデン硫酸試薬に陽性で、ニンヒドリン試薬には陰性であった。IR スペクトルにおいて  $1660, 1520\text{cm}^{-1}$  にアミド基に由来する吸収が認められた。
6. Benarthin の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは 17 本の炭素シグナルが観測され、DEPT および HMQC 実験により、メチル炭素一つ、メチレン炭素三つ、 $sp^2$  のメチン炭素三つ、さらにカルボニル炭素三つを含む七つの  $sp^2$  四級炭素であることが判明した。 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいては、それぞれの炭素に対応したシグナルのほかに三つの交換性水素のシグナルが認められた。これらのシグナルのつながりを、 $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY および HMBC 実験により解析し、平面構造の決定を行った。次いで、酸加水分解により L-arginine および L-threonine を得ることにより benarthin の絶対構造を L-(2,3-dihydroxy-benzoyl) arginyl-L-threonine と決定した。また、この構造を合成により確認した。
7. Benarthin の合成法を応用し、12 個の誘導体を合成し構造活性相関の検討を行った。その結果、benarthin の PGPase に対する阻害活性発現部位はカテコール部分であることが

明らかとなった。

8. Benarthin 発見の後も、微生物培養液中より阻害物質の探索を行ったところ、約350の被検菌株のうち一株である SA2289株の培養液中に阻害物質が生産されていることを見いだした。構造解析の結果、新規化合物であったので pyrizinostatin と命名した。
9. Pyrizinostatin 生産菌である SA2289株は、中国上海市海底土壌より分離された放線菌である。その形態および菌学的性状から *Streptomyces* 属に属すると考えられ、*Streptomyces* sp. SA2289と同定された。
10. *Streptomyces* sp. SA2289の培養濾液14Lより、ダイアイオン HP-20、セパビーズ SP-206、遠心液 - 液分配クロマトグラフィーおよびセファデックス LH-20により精製し、無色活性粉末を得た。その無色粉末をメタノール中より結晶化することにより pyrizinostatin 無色針状結晶として40.2mg単離した。
11. Pyrizinostatin の阻害様式を Lineweaver-Burk プロットにより解析したところ、基質に対して不拮抗的であり、その  $IC_{50}$  値は  $1.8 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。また、pyrizinostatin は各種癌細胞に対し細胞障害性を示したが、マクロファージ、好中球およびリンパ球への作用、分化誘導活性を検討したが強い活性は認められなかった。
12. Pyrizinostatin は無色針状結晶として得られ、その分子式は、高分解能 FAB-MS および元素分析の結果より  $C_{11}H_{15}N_3O_4$  と決定された。呈色反応においては硫酸、GL、モリブデン硫酸試薬に陽性であった。Pyrizinostatin の構造は x 線結晶解析により 2, 4, 4 a, 8-tetrahydro-2, 6, 8-trimethyl-4 a-(2-oxopropyl) pyrimido [5, 4-e]-1, 2, 4-triazine-3, 5, 7(6H)-trione と決定した。また、HMBC 実験等により、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR シグナルの帰属を行った。

Benarthin および pyrizinostatin は PGPase 阻害物質としてはじめて報告された天然化合物である。これら阻害様式の異なる阻害物質は、生理活性ペプチドおよび蛋白質の代謝機構を理解する上に、また、免疫疾患の予防および治療へのアプローチに寄与することが期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男  
副 査 教 授 水 谷 純 成  
副 査 教 授 市 原 耿 民

本論文は和文82頁，図72，表33，引用文献138，研究史，和文および英文総括からなり，ほかに参考論文13編が付されている。

酵素は，個体発生から老化に至るすべての生命現象と深いつながりを有している。生体内で起こる様々な現象に関与する酵素の働きを知り，それらの酵素に対する阻害物質の役割を明らかにすることは，生体の制御機構ならびに病因を理解する上に役立ち，治療への重要なアプローチの一つであると考えられる。これらの観点から，ピログルタミルペプチダーゼ（PGPase）に対する阻害物質を微生物培養液から探索した。PGPaseはタンパク質やペプチドのアミノ末端のピログルタミルン酸残基を特異的に遊離する酵素である。また，PGPaseは広く各組織に分布しているにもかかわらず，その生理的機能に関しては未だ解明されていない部分が数多く残されているのが現状である。

この様な背景の中で，本研究はPGPase阻害物質の探索方法，生産菌の同定，単離方法，生物活性，物理化学的性状および構造解析あるいは合成法について検討したものである。

第二編，研究史では，微生物培養液中より見いだされた酵素阻害物質に関する研究史について述べられている。

第三編実験の部，第一章は，PGPase阻害物質，benarthinについて述べられ，下記の内容が含まれている。

1. 牛肝臓由来PGPaseのアクセシ系を確立し，阻害物質の探索を行い，MJ244-SF1株の培養液中に阻害物質が生産されていることを見だし，新規化合物であったのでbenarthinと命名した。
2. Benarthin生産菌であるMJ244-SF1株は，東京都品川区の土壌より分離され，形態および菌学的性状から*Streptomyces xanthophaeus* MJ244-SF1と同定された。
3. *Streptomyces xanthophaeus* MJ244-SF1の培養液4Lを活性炭，ついでダイアイオンHP-20で処理し，活性粗粉末を得た。この粗粉末をセファデックスG・10によるゲル濾過，さらに，遠心液-液分配クロマトグラフィーを行い，benarthinを396mg単離した。

4. Benarthin の阻害様式は、基質に対して拮抗的であり、その  $K_i$  値は  $1.2 \times 10^{-6} \text{M}$  であった。また、マクロファージ、好中球およびリンパ球への作用、細胞障害性および分化誘導活性を検討したが活性は認められなかった。
5. Benarthin は水溶性の無色粉末として得られ、その分子式は、高分解能 FAB-MS および元素分析の結果より  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_7$  と決定された。IR スペクトルにおいて  $1660, 1520 \text{ cm}^{-1}$  にアミド基に由来する吸収が認められた。
6. Benarthin の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは17本の炭素シグナルが観測され、また、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいては、それぞれの炭素に対応したシグナルのほかに三つの交換性水素のシグナルが認められた。これらのシグナルのつながりを、 $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY および HMBC 実験により解析し、平面構造の決定を行った。次いで、酸加水分解により L-arginine および L-threonine を得ることにより benarthin の絶対構造を L-(2, 3-dihydroxybenzoyl)arginyl-L-threonine と決定した。また、合成法を確立し、この構造を確認した。
7. benarthin の合成法を応用し、12個の誘導体を合成し構造活性相関の検討を行った。その結果、benarthin の PGPase に対する阻害活性発現部位はカテコール部分であることが明らかとなった。

第二章では、PGPase 阻害物質、pyrizinostatin について述べられ、下記の内容が含まれている。

1. Benarthin 発見の後も、阻害物質の探索を行ったところ、SA2289株の培養液中に阻害物質が生産されていることを見いだした。構造解析の結果、新規化合物であったので pyrizinostatin と命名した。
2. 生産菌である SA2289株は、上海市海底土壌より分離された放線菌で、その形態および菌学的性状から *Streptomyces* 属に属すると考えられる。
3. *Streptomyces* sp. SA2289の培養濾液14Lより、ダイアイオン HP-20、セパビーズ SP-206、遠心液-液分配クロマトグラフィーおよびセファデックス LH-20により精製し、メタノール中より無色針状結晶として pyrizinostatin を40.2mg単離した。
4. Pyrizinostatin の阻害様式を解析したところ、基質に対して不拮抗的であり、その  $\text{IC}_{50}$  値は  $1.8 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。また、各種癌細胞に対し細胞障害性を示した。
5. Pyrizinostatin は無色針状結晶として得られ、その分子式は、高分解能 FAB-MS および元素分析の結果より  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4$  と決定された。Pyrizinostatin の構造は x 線結晶解析により 2, 4, 4a, 8-tetrahydro-2, 6, 8-trimethyl-4a-(2-oxopropyl)

pyrimido [5, 4-*e*]-1, 2, 4-triazine-3, 5, 7 (6*H*)-trione と決定した。

Benarthin および pyrizinostatin は PGPase 阻害物質としてはじめて報告された天然化合物である。これら阻害様式の異なる阻害物質は、生理活性ペプチドの代謝機構を理解する上に、また、免疫疾患の予防および治療へのアプローチに寄与することが期待される。

よって、審査員一同は別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 正浩は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。