

学 位 論 文 題 名

微生物由来の慢性疾患治療薬の探索

学位論文内容の要旨

慢性疾患として炎症と循環器疾患を取り上げ、これら疾患への治療薬となる可能性を有する化合物の微生物培養液からの探索を行なった。

1. インターロイキン-1 β 変換酵素 (ICE) 阻害剤に関する研究

炎症反応に深く関与するインターロイキン-1 (IL-1)の作用を阻害する物質が、新しいタイプの抗炎症薬になりうると考えられた。IL-1の作用を阻害するにあたっては、IL-1の産生、受容体への結合の阻害、受容体から下流のシグナル伝達の阻害の3点を想定し、阻害剤が得られる可能性の高さ、それぞれの作用点に関する情報量、経験の応用などを比較して、特に有望と考えられたIL-1の産生抑制に着目した。

IL-1 β 産生の経路にはIL-1 β の不活性な前駆体を活性を有する成熟型に変換するICEが関与している。この酵素は基質選択性の高いプロテアーゼであることから、この酵素を阻害することによって、IL-1 β 産生を特異的に抑制できると考え、ICEの阻害剤の探索に着手した。

ICE阻害剤をスクリーニングする系を構築するにあたって、その塩基配列に基づきICE遺伝子をクローニングし、これを大腸菌で発現させてから再構成を行い、酵素活性を有するICEを調製した。このICEを用いた酵素活性の測定には、ICEの基質としてAc-Tyr-Val-Ala-Asp-AMCを用い、酵素反応により生成されるAMCの量を蛍光強度の変化により検出した。また、酵素阻害の選択性を評価するため、カテプシンB活性測定系を構築し、これを対照として用いた。さらに、ICE阻害活性を有する物質の細胞系での活性を評価をするために、THP-1細胞からLPS刺激により分泌されるIL-1 β を測定する系を作製した。これらスクリーニング系を用いて放線菌および糸状菌株の培養液をスクリーニングした結果、*Streptomyces* sp. E-1507株、E-1511株、E-1625株の3株の培養液中にICE阻害活性を見いだした。

放線菌*Streptomyces* sp. E-1507株の培養液17 Lより、疎水吸着レジン、シリカゲル及び逆相シリカゲルを用いて、ICE 阻害活性物質EI-1507-1とEI-1507-2を単離した。EI-1507-1とEI-1507-2はともにベンズ[a]アントラセン骨格を有し、分子内にエポキシドを有する新規化合物であることが明らかとなった。EI-1507-1とEI-1507-2のICE阻害活性は濃度依存的で、50 %阻害濃度値(IC₅₀値)はそれぞれ0.23、0.42 mMであった。また、これら化合物はTHP-1細胞からのLPS刺激によるIL-1 β 分泌を濃度依存的に抑制し、そのIC₅₀値はそれぞれ1.1、1.4 mMであった。

放線菌*Streptomyces* sp. E-1511株培養液17 Lより、疎水吸着レジン及び逆相シリカゲル

ルを用いて、ICE阻害活性を有する化合物 EI-1511-3、EI-1511-5が、E-1625株培養液2 Lより、同じく疎水吸着レジン及び逆相シリカゲルを用いてEI-1625-2を単離した。これらは構造解析の結果から、ともにマニユマイシン系の骨格を有する新規化合物であった。

EI-1511-3、EI-1511-5、EI-1625-2のICE阻害活性は濃度依存的であり、大腸菌で発現させて再構成したICEに対するIC₅₀値はそれぞれ0.09、0.38、0.2 mMであった。これらはTHP-1細胞から抽出、精製したICEに対しても、大腸菌で発現させて再構成したICEと同様の強さで阻害した。また、これらはTHP-1細胞からのLPS 刺激によるIL-1 β 分泌を濃度依存的に抑制し、そのIC₅₀値はそれぞれ5.4、3.6、2.2 mMであった。

EI-1511類の絶対配置を決定するために、C4位の側鎖を除去した誘導体を調製したが、これらはそれぞれの元の化合物と同等のICE阻害活性を有していた。これらのことからEI-1507類、1511類、1625類は選択的なICE阻害剤であるとともに、IL-1 β 分泌抑制活性を有することが判明した。また、EI-1511類はEI-1625類を単離する際に、マニユマイシン系の既知物質である、アリサマイシン、U-56,407、マニユマイシンA、B、Gが単離されたが、これら化合物いずれもICE阻害活性を有していた。

2. エンドセリンアンタゴニストに関する研究

エンドセリンは、強力かつ持続的な血管収縮、昇圧作用を示す生体内物質として発見された。その発見以来、血管収縮、昇圧作用以外にも内皮由来弛緩因子 (EDRF)の放出、細胞増殖作用、気管収縮など多くの薬理的、生理学的作用を示すことが報告されていて、他の血管作動性物質とともに血圧の調節、恒常性の維持に関与していることが示唆されている。

そこで、新しいタイプの降圧剤および循環器疾患治療薬を得る目的で、エンドセリンの受容体拮抗物質の探索を行った。その結果、微生物培養液のスクリーニングから、放線菌*Streptomyces* sp. RE-701株がエンドセリン拮抗物質を生産していること見いだされた。*Streptomyces* sp. RE-701株の培養液100 Lより、疎水吸着レジン、ゲルろ過、逆相シリカゲルを用いた精製により、RES-701-1を単離することができた。単離したRES-701-1はGly-Asn-Trp-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Asp-Trp-Phe-Phe-Asn-Tyr-Tyr-Trpの配列からなる16アミノ酸残基の新規ペプチドであるとともに、Gly¹の α アミノ基とAsp⁹の γ カルボキシル基の間でアミド結合を有する環状ペプチドであることが明らかとなった。

RES-701-1のエンドセリン受容体拮抗作用はB型受容体 (ET_B受容体) に選択的であり、牛小脳膜画分上の受容体への¹²⁵I-エンドセリン-1の結合をIC₅₀値: 10 nMで阻害したが、A型受容体 (ET_A受容体) に対しては5 mMでも作用を示さなかった。RES-701-1のエンドセリン受容体拮抗作用は動物種により強さが異なり、ヒト、ブタ、ウシ、モルモットに対してはIC₅₀値: 8~25 nMと強力に作用するが、イヌ、ウサギに対してはIC₅₀値: 2.5 mM、ラットに対してはIC₅₀値: 5 mM以上と弱くしか作用しない。

ET_A、ET_B受容体を発現させたCOS細胞を用いてエンドセリンによる細胞内Ca²⁺濃度を測定する実験では、RES-701-1はET_B受容体を発現させた細胞のエンドセリンによる細胞内Ca²⁺濃度上昇を抑制するが、ET_A受容体を発現させた細胞には作用を示さないことと、いずれの細胞でもRES-701-1はそれ自身のみでは細胞内Ca²⁺濃度に影響を与えないことから、RES-701-1がET_B受容体選択的なアンタゴニストであることが

証明された。麻酔下ラットのエンドセリン-1による血圧変動に対するRES-701-1の作用の検討からは、RES-701-1はエンドセリン-1 投与直後の一過性の降圧を用量依存的に抑制し、その後の昇圧を増強することから、生体内においてもアンタゴニストとして作用することが明らかとなった。

これらのことからRES-701-1は、選択性の高い、優れたエンドセリンB型受容体アンタゴニストであることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 富 田 房 男

副 査 教 授 市 原 耿 民

副 査 教 授 葛 西 隆 則

学 位 論 文 題 名

微生物由来の慢性疾患治療薬の探索

本論文は和文120頁、図38、表24、引用文献102、緒論、第1部（4章）、第2部（4章）、総括、英文要旨からなり、ほかに参考文献16編が付されている。

慢性疾患として炎症と循環器疾患を取り上げ、これら疾患への治療薬となる可能性を有する化合物の微生物培養液からの探索を行なった。

1. インターロイキン-1 β 変換酵素 (ICE) 阻害剤に関する研究

炎症反応にインターロイキン-1 (IL-1)は炎症反応に深く関与しており、その作用を阻害する物質は新しいタイプの抗炎症薬になりうると考えられた。IL-1の作用を阻害するにあたっては、阻害剤が得られる可能性の高さなどを比較し、特に有望と考えられたIL-1の産生抑制に着目した。IL-1 β 産生の経路にはIL-1 β の不活性な前駆体を活性を有する成熟型に変換するICEが関与している。ICEは基質選択性の高いプロテアーゼであることから、ICEを阻害することによって、IL-1 β 産生を特異的に抑制できると考え、ICEの阻害剤の探索に着手した。

ICE阻害剤のスクリーニング系は、クローニングしたICE遺伝子が大腸菌で発現させてから再構成を行い取得した、酵素活性を有するICEと、Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AMCを基質として用い、酵素反応により生成されるAMCの量を蛍光強度の変化により検出する系を構築した。さらに、阻害剤の細胞系での作用を評価をするために、THP-1細胞からLPS刺激により分泌されるIL-1 β を測定する系を作製した。これらスクリーニング系を用いて放線菌および糸状菌株の培養液をスクリーニングした結果*Streptomyces* sp. E-1507株、E-1511株、E-1625株の3株中にICE阻害活性を見いだした。

放線菌*Streptomyces* sp. E-1507株の培養液より、ICE阻害活性を有する新規化合物 EI-1507-1とEI-1507-2を単離した。EI-1507-1とEI-1507-2はともにベンズ[a]アントラセン骨格を有し、分子内にエポキシドを有してしていた。EI-1507-1とEI-1507-2のICE阻害活性は濃度依存的であり、50%阻害濃度値(IC₅₀値)はそれぞれ0.23、0.42 mMであった。また、これら化合物はTHP-1細胞からのLPS刺激によるIL-1 β 分泌を濃度依存的に抑制し、そのIC₅₀値はそれぞれ1.1、1.4 mMであった。

放線菌*Streptomyces* sp. E-1511株およびEI-1625株の培養液より、ICE阻害活性を有

する新規化合物 EI-1511-3、EI-1511-5、EI-1625-2を単離した。これらはともにマニユマイシン系の骨格を持つことを特徴としていた。

EI-1511-3、EI-1511-5、EI-1625-2のICE阻害活性は濃度依存的であり、50%阻害濃度値(IC₅₀値)はそれぞれ0.09、0.38、0.2 mMであった。また、これら化合物THP-1細胞からのLPS刺激によるIL-1 β 分泌を濃度依存的に抑制し、そのIC₅₀値はそれぞれ5.4、3.6、2.2 mMであった。これらの結果からEI-1507類、1511類、1625類は選択的なICE阻害剤であるとともに、IL-1 β 分泌抑制活性を有することが判明した。

2. エンドセリンアンタゴニストに関する研究

エンドセリンは、強力かつ持続的な血管収縮、昇圧作用を示す生体内物質として発見された。その発見以来、血管収縮、昇圧作用以外にも内皮由来弛緩因子 (EDRF)の放出、細胞増殖作用、気管収縮など多くの薬理学的、生理学的作用を示すことが報告されていて、他の血管作動性物質とともに血圧の調節、恒常性の維持に関与していることが示唆されている。

そこで、新しいタイプの降圧剤および循環器疾患治療薬を得る目的で、エンドセリンの受容体拮抗物質の探索を行った。その結果、微生物培養液のスクリーニングから、放線菌*Streptomyces* sp. RE-701株がエンドセリン拮抗物質を生産していること見いだされた。引き続き、この株の培養、精製および単離の検討を行った結果、RES-701-1を単離することができた。

構造解析の結果、単離したRES-701-1はGly-Asn-Trp-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Asp-Trp-Phe-Phe-Asn-Tyr-Tyr-Trpの配列からなる16アミノ酸残基の新規ペプチドであるとともに、Gly¹の α アミノ基とAsp⁹の γ カルボキシル基の間でアミド結合を有する環状ペプチドであることが明らかとなった。

RES-701-1のエンドセリン受容体拮抗作用はB型受容体 (ET_B受容体)に選択的であり、牛小脳膜画分上の受容体への¹²⁵I-エンドセリン-1の結合を50% 阻害濃度 (IC₅₀値): 10 nMで阻害したが、A型受容体 (ET_A受容体)に対してはIC₅₀値: 5 mM以上と作用を示さなかった。RES-701-1のエンドセリン受容体拮抗作用は動物種により異なり、ヒト、ブタ、ウシ、モルモットに対してはIC₅₀値: 8~25 nMと強力に作用するが、イヌ、ウサギに対してはIC₅₀値: 2.5 mM、ラットに対してはIC₅₀値: 5 mM 以上と弱くしか作用しないことが明らかとなった。

ET_A、ET_B受容体を発現させた細胞を用いてエンドセリンによる細胞内Ca²⁺濃度を測定する実験からは、RES-701-1がET_B受容体選択的なアンタゴニストであることが証明された。麻酔下ラットのエンドセリン-1による血圧変動に対するRES-701-1の作用の検討からは、RES-701-1はエンドセリン-1投与直後の一過性の降圧を用量依存的に抑制し、その後の昇圧を増強することから、生体内においてもアンタゴニストとして作用することが明らかとなった。

これらの結果から、RES-701-1は、選択性の高い、優れたエンドセリンB型受容体アンタゴニストであることが明らかとなった。

以上、自然界より微生物由来の慢性疾患治療薬の探索し、生産菌の同定、生産物の単離、構造決定、作用機作に関する研究を行った。これらは慢性疾患治療薬の分野において基礎的及び産業的な貢献を果たすものである。

よって、審査員一同は別に行った最終試験の結果と併せて、本論文の提出者 田中健穂 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。