

学位論文題名

Studies on Protease Inhibitors of Freshwater Cyanobacteria

(淡水産シアノバクテリアのプロテアーゼ阻害物質に関する研究)

学位論文内容の要旨

淡水産シアノバクテリアは富栄養化した湖沼などで大発生するアオコなどの現象で問題となる。これらは多種多様な2次代謝産物を合成しており、特にプロテアーゼ阻害物質が多数存在する。このような阻害物質の生態的意義はアオコの大量発生・消失の機構との関連で興味深い。医学への応用も期待できる。本研究では、プロテアーゼの一種であるアミノペプチダーゼN(APN)およびカタレプシンB(CatB)を用い、水生生物を対象とした阻害物質のスクリーニングにおいて顕著な活性を示した2種の淡水産シアノバクテリア由来の活性化化合物の単離および構造解析を目的とした。

APNは、人の内皮細胞や上皮細胞などに広く存在する膜結合メタロプロテアーゼであり、神経ペプチドや血管作動性ペプチド、化学走性ペプチドの分解に関与している。また、APNは酵素としての役割以外にもレセプターやシグナル伝達分子としても機能していることが知られており、非常に興味深いタンパク質である。このAPNは多くの癌細胞において異常発現が報告されており、転移や浸潤への関与が示唆されている。近年では血管新生過程におけるAPNの役割に注目され、癌細胞の転移を抑制する目的からその阻害剤の開発が望まれている。

北海道産海藻・海産無脊椎動物および淡水産シアノバクテリアを対象としたスクリーニングにおいて、顕著なAPN阻害活性を示した淡水産シアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* (NIES-100) を大量培養し、阻害活性物質の単離を行った。

まず、*M. aeruginosa* の培養藻体のメタノール抽出物をジエチルエーテルと水で液液抽出後、水層をさらにブタノール (BuOH) で抽出することにより脂溶性画分・BuOH可溶性画分・水溶性画分を得た。阻害活性を指標として、BuOH画分をODSフラッシュカラムクロマトグラフィーにより分画し、さらに逆相HPLCによって精製することにより阻害活性物質を単離した。1D-NMRおよびマススペクトルの解析から、この化合物を既知の直鎖ペプチド microginin であると同定した。さらに、microginin と共に新規の活性化化合物を単離した。この新規化合物を各種NMRおよびマススペクトルにより解析したところ、microginin の末端β-アミノ酸 (Ahda) に隣接するアミノ酸残基がAlaからSerに置換した類縁体であることがわかった。得られた2種の microginin のAPN阻害活性を評価したところ、両化合物ともに顕著な阻害活性 (IC₅₀ 0.02 μg/mL) を示した。これまでにAPNに構造的に類似しているLeucine aminopeptidase (LAP) と microginin FR1の結晶構造解析結果が報告されており、Ahdaおよび隣接するアミノ酸がLAPの活性部位に近いサブサイトに結合するとされてい

る。APNにおいても同様の結合様式が予想され、microgininと新規microgininの阻害活性における差違が期待されたが、明瞭な差異は確認できなかつた。このことから、microgininのAla残基および新規microgininのSer残基がAPNのS1'サブサイトに対して弱い結合力しかもたないことが示唆された。

次に、APN阻害活性化合物の精製過程でODSクロマトグラフィーにより得たフラクションをLC/MSにより分析したところ、複数の新規化合物の存在が示唆されたため、それらの単離・構造解析を行った。得られた4種の化合物は、各種NMRスペクトルおよびMSの解析から環状ペプチドであるmicropeptin類の新規化合物であった。これらはmicropeptin類に特徴的な3-amino-2-hydroxy-6-piperidone (Ahp) 残基をもち、それに隣接するアミノ酸および側鎖の脂肪酸の長さが互いに異なる類縁体であった。それらを加水分解後、キラルカラムを用いたHPLC分析により各アミノ酸の絶対立体配置を全てLと決定した。また、各種プロテアーゼ（キモトリプシン、トリプシン、トロンピン）に対する阻害活性を評価した。その結果、トリプシンおよびトロンピンに対する阻害活性は示さなかつたが、キモトリプシンに対しては強い阻害活性（IC₅₀ 1~2 μg/mL）を示した。Micropeptin類はセリンプロテアーゼに対して阻害活性を示すことが知られており、Ahp残基のN末端側に隣接するアミノ酸により阻害活性を示す酵素が異なるとされている。本研究においても、これまでに知られている構造活性相関に基づく阻害活性を示した。

また、micropeptin類のほかにも、新規の三環性ペプチドであるmicroviridin類で、分子量1700を超えるペプチドを単離したが、構造決定には至っていない。

CatBはリソソーム中に存在するエンドペプチダーゼおよびエキソペプチダーゼの活性をもつ興味深い酵素である。この酵素は、悪性黒色腫をはじめ、大腸癌、胃癌、前立腺癌、乳癌における過剰発現が認められ、癌細胞の浸潤や転移に関与していると考えられている。このことから、CatBは癌治療において重要なターゲットとされている。また、CatB選択的阻害剤がアルツハイマー病の原因とされるβ-アミロイドの生成を抑制するといった報告もあり、癌治療以外においても阻害剤の開発が望まれている。

上記のスクリーニングにおいて、非常に強い阻害活性を示した淡水産シアノバクテリア*Anabaena spiroides* s. f. *spiroides* (NIES-263)より阻害物質の探索を行った。

まず、*A. spiroides* f. *spiroides*の培養藻体メタノール抽出物を酢酸エチルと水で液液抽出後、水層をさらにBuOHで抽出することにより脂溶性画分・BuOH可溶性画分・水溶性画分を得た。また、培養上清を合成吸着剤XAD-4により処理し、培養上清抽出物を得た。藻体由来の水溶性画分および培養上清抽出物が顕著な阻害活性を示したため、それらをODSクロマトグラフィーにより分画後、各種カラムを用いたHPLCで阻害活性物質を精製した。藻体および培養上清より精製したCatB阻害活性物質は、その¹H-NMRスペクトルより同一のものであることが示唆されたが、微量であったため構造解析には至らなかつた。これまでに阻害物質として海綿由来のペプチド類などが報告されているが、本研究で得られた化合物はペプチドに特徴的なアミノ酸のα-メチンプロトン由来のピークが確認できなかつた。また、同様にCatB阻害物質として報告のあるフラボノイドのようなベンゼン環プロトン由来のピークも確認されていない。したがって、高活性かつ、これまでに報告のない構造をもつ化合物ではないかと期待される。現在、ラン藻を再度大量培養し活性化合物の単離を目指している。

これまでにシアノバクテリアから多くの生理活性ペプチドが報告されているが、本研究においても新規化合物5種を含むプロテアーゼ阻害ペプチドを得た。また、それらの阻害様式は結晶構造解析を基に検討されたこれまでの報告に矛盾しないことが示唆された。一方、CatB阻害活性を示した化合物は、新規構造かつ高活性が期待される。

学位論文審査の要旨

主査 准教授 沖野龍文
副査 教授 松田冬彦
副査 教授 坂入信夫
副査 教授 中村貴義

学位論文題名

Studies on Protease Inhibitors of Freshwater Cyanobacteria

(淡水産シアノバクテリアのプロテアーゼ阻害物質に関する研究)

淡水産シアノバクテリアが富栄養化した湖沼における大発生は世界中で問題となっている。特に、ミクロシスチンなどの有毒物質による死亡事故が発生しているほか、このような湖沼の水を適切に処理することなく飲料水に利用している地域では発ガンの原因となっていることが疑われている。また、有毒物質に加えて、多数のペプチド性プロテアーゼ阻害物質が報告されており、これらの物質がシアノバクテリアを分解するバクテリアに対する防御物質として働くなどの生態的意義も注目されている。

本論文では、淡水産シアノバクテリアからプロテアーゼ阻害物質を探索することを目的とした。これまで、非常に多くの化合物が報告されているセリンプロテアーゼではなく、メタロプロテアーゼであるアミノペプチダーゼNとシステインプロテアーゼのカテプシンBをスクリーニング対象とした。アミノペプチダーゼNは、ガン細胞の転移における血管新生過程に重要な役割を果たしているため、その阻害剤は転移抑制剤の開発につながる。また、カテプシンBもガン細胞の浸潤や転移に関与するとされており、ガン治療の重要なターゲットである。

スクリーニングの結果、顕著なアミノペプチダーゼN阻害活性を示した淡水産シアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* (NIES-100) の培養藻体より、溶媒分画と各種クロマトグラフィーを用いて極めて強い2種の阻害活性物質を単離した。NMRとMSの解析により、既知の microginin と microginin の Ala が Ser に置換された新規類縁体であることが判明した。新規化合物の立体化学については、酸加水分解物をキラルカラムにより分析して通常のアミノ酸を決定し、長鎖βアミノ酸についてはNMRの化学シフトと多数の既知物を注意深く比較して決定した。両者のアミノペプチダーゼN阻害活性はIC₅₀が20 ng/mLときわめて強かった。この活性はよく知られるアミノペプチダーゼN阻害物質のベスタチンに比べて約30倍強い値である。ジペプチドであるベスタチンと酵素の結合様式を比較して議論した。長鎖βアミノ

酸の重要性はベスタチンの構造活性相関研究でも示唆されていたとおりであり、他の部位については差が認められた。

次に、同株の抽出物について、酵素阻害活性を指標とするのではなく、LC/MSの結果を指標にすることで迅速にペプチド類を分析する方法を採用した。その結果、多数の新規化合物の存在が示唆された。そのうち4種の化合物の単離に成功し、機器分析を中心に構造決定したところ、micropeptin類の新規化合物であった。さらに、加水分解後キラルカラムを用いて通常のアミノ酸残基の立体を決定した。また、micropeptin類に特徴的な3-amino-2-hydroxy-6-piperidoneの立体化学は、還元後加水分解して得られるペンタホモセリンを、合成して得られた標品とキラルカラムにより比較して決定した。Micropeptins C-Fと命名した新規化合物の各種セリンプロテアーゼ阻害活性を評価したところ、予想通りキモトリプシンに対して強い阻害活性を示した。

その他、分子量1700を越える三環性のペプチドなど複数の新規化合物の単離に成功した。さらに、淡水産シアノバクテリア*Anabaena spiroides f. spiroides* (NIES-263)の培養藻体および培養ろ液よりカテプシンB阻害活性物質の単離に成功した。その構造は、既知のカテプシンB阻害物質にみられるペプチドやフラボノイドではなく、高活性かつシアノバクテリアとしても類をみない構造であることが示唆された。

以上のように、本論文において淡水産シアノバクテリアのプロテアーゼ阻害活性物質の多様性を明らかとし、精密な立体化学を含む構造決定を最新の手法と合成を組み合わせることで達成することができた。一部、構造未解明の化合物もあるが、逆にシアノバクテリアの天然物探索源としての期待が示されたといえる。得られた構造や活性の情報を基に、プロテアーゼ阻害活性の実用化に向けた開発を進めることができると期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。