

## 論文の内容の要旨

論文題目 放線菌 *Streptomyces* sp. の生産する新規免疫抑制剤 lymphostin に関する研究

氏名 永田裕之

Src ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼ Lck は、リンパ球、特に T 細胞に特異的に発現しており、CD4、CD8 および IL-2 レセプターβ鎖などの T 細胞上の分子に細胞内で会合し、T 細胞内のシグナル伝達に重要な機能を果たしている。Lck を欠失したヒト Jurkat T 細胞は、抗 T 細胞レセプター抗体に応答せず、一方 Lck ノックアウトマウスは皮膚移植片拒絶反応などの T 細胞を介した反応を示さない。

T 細胞レセプター刺激により、Lck は T 細胞レセプターと鎖や ZAP70 をチロシンリン酸化して活性化させ、さらに、カルシニューリンなどの下流のシグナル伝達分子を介して、IL-2 の産生を惹起する。免疫抑制剤の FK506 および cyclosporin A (CsA) は、イムノフィリンと結合してカルシニューリンを阻害することにより IL-2 の産生を抑制する。しかし、カルシニューリン阻害により腎毒性などの副作用が発現すると考えられている。したがって Lck の阻害剤は、これらの薬剤とは作用機序の異なる新しいタイプの免疫抑制剤になると期待される。

このような状況のもとで本研究では、毒性の弱い免疫抑制剤の開発を目的に、微生物代謝産物を対象とした Lck 阻害剤の検索を行ったところ、lymphostin と命名した新規アルカ

ロイドを放線菌から単離・構造決定するとともに、その作用機序を明らかにすることができた。その概要は以下の通りである。

## 1. スクリーニング

まず、Lck の酵素活性を阻害する化合物をスクリーニングするために、Lck の酵素アッセイ系を構築した。すなわち、仔牛胸腺の抽出液を DEAE セルロース、ヘパリンアガロースおよびブチルアガロースを用いたクロマトグラフィーにより順次精製して Lck 標品を得た。基質にはペプチド(Tyr-Ala-Glu)<sub>7</sub>と[γ-<sup>32</sup>P] ATP を用い、反応後トリクロロ酢酸を添加し、沈殿した(Tyr-Ala-Glu)<sub>7</sub>をろ取して放射活性を測定することにより、(Tyr-Ala-Glu)<sub>7</sub>への<sup>32</sup>Pの取り込みを指標に Lck の酵素活性を測定するスクリーニング系を開発した。なお、プロテインキナーゼ C 酵素アッセイ系を比較対照にして阻害活性の選択性の評価を行い、キナーゼを非選択的に阻害する物質を排除した。

本スクリーニング系を用いて 9722 検体の微生物培養液を対象に Lck の酵素活性を阻害する物質をスクリーニングしたところ、群馬県嬲恋村の土壌より分離された放線菌 *Streptomyces* sp. KY11783 が強力な Lck 選択的阻害物質を生産することを見出した。

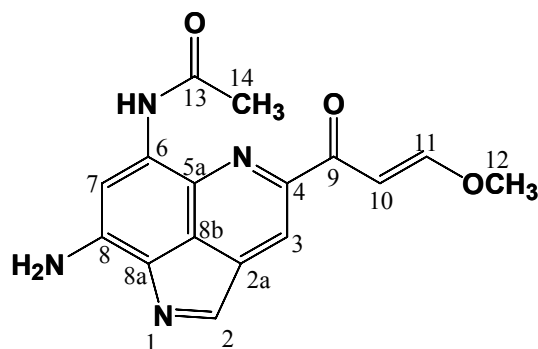
## 2. Lymphostin の発酵生産、単離および構造決定

次に、*Streptomyces* sp. KY11783 が生産する阻害物質の分離・同定を試みた。培養には、炭素源として soluble starch、窒素源に soybean meal、corn steep liquor および dry yeast を、無機塩として KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、NiSO<sub>4</sub> および Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O、さらに吸着樹脂 Diaion HP-20 を添加した培地を用いた。活性物質は培養 1 日目から生産されはじめ、2 日目でピークに達し、その後ほぼ一定に推移した。なお、本活性物質の生産には Diaion HP-20 の添加が極めて効果的であった。これは活性物質が Diaion HP-20 に吸着されることにより、培養液中での失活が回避されたためと考えられる。

得られた培養液 25 L から Diaion HP-20 をろ取し、酢酸エチルで抽出した。抽出液をシリカゲルクロマトグラフィーおよび ODS-HPLC に順次付し、活性成分を 100.2 mg 単離した。

本活性成分は、赤橙色粉末で、218(15,200)、256(19,300)、284(16,000)、344(11,900)、412(6,000)、467 nm (8,200)に UV 吸収を示した。IR 吸収からα,β-不飽和ケトン(1671 cm<sup>-1</sup>)とアミド(1659 cm<sup>-1</sup>)の存在が示唆された。また、FABMS において *m/z* 311 に疑似イオ

ンピークを与え、高分解能 FABMS などにより分子式を  $C_{16}H_{14}O_3N_4$  と決定した。 $^1H$  および  $^{13}C$  NMR スペクトルから、メチル基 [ $\delta_H$  2.35 (3H, s),  $\delta_C$  24.5]、メトキシ基 [ $\delta_H$  3.94 (3H, s),  $\delta_C$  58.5 ]、5つの  $sp^2$  メチン [ $\delta_H$  8.62 (1H, s), 8.39 (1H, s), 8.14 (1H, s), 7.87 (1H, d), 7.64 (1H, d);  $\delta_C$  117.6, 145.8, 110.8, 163.9, 101.9]、2つのカルボニル炭素( $\delta_C$  188.7, 169.7)、および7つの4級  $sp^2$  炭素( $\delta_C$  150.3, 147.7, 139.5, 136.6, 133.5, 124.9, 124.4)の存在が示された。また、アミノプロトン [ $\delta_H$  8.21 (2H, s) ]およびアミドプロトン [ $\delta_H$  10.14 (1H, s) ]と考えられる交換性のプロトンが観察された。HMBC などの2次元 NMR から、 $\beta$ -メトキシエノンおよびアセトアミドの存在が示された。また、C-2 メチン ( $\delta_H$  8.39,  $\delta_C$  145.8) は  $^1J_{CH}$  結合定数 (190 Hz) などから窒素原子に隣接すると考えられた。これ以上の解析は窒素原子や4級炭素が多いため困難であったため、重水素交換実験での  $^{13}C$  シグナルのシフトおよび HMBC の相関から、交換性プロトンを含む部分構造を構築した。残りの構造は、NOE 差スペクトルで観察された H-2 と H-3 の NOE の相関および HMBC の相関から構築した。以上の結果から、本活性成分の構造を下図のようなピロロ[4,3,2-*de*]キノリン骨格を有する新規アルカロイドと決定し、lymphostin と命名した。



### 3. Lymphostin の生物活性

Lymphostin は仔牛胸腺から部分精製した Lck の人工基質ペプチド(Tyr-Ala-Glu)<sub>7</sub> に対するリン酸化を  $IC_{50}$  0.05  $\mu M$  で阻害した。本阻害活性は Lck と lymphostin の前反応時間に依存して強くなった。また、反応液中の ATP 濃度を変えても阻害活性に変化はなかったが、基質ペプチドの濃度を下げると阻害活性は強くなった。したがって、lymphostin は Lck の基質との結合部位またはその近傍に不可逆的または解離の遅い結合をしてキナーゼ活性を阻害すると推察された。また、ヒト T 細胞株 Jurkat から抗 Lck 抗体を用いて免疫沈降で得た Lck の自己リン酸化も  $IC_{50}$  0.33  $\mu M$  で阻害した。

次に、lymphostin の細胞レベルでの Lck 阻害活性を評価するため、CD3 刺激によって惹起される Jurkat T 細胞内タンパク質のチロシンリン酸化に lymphostin が与える影響を調べた。その結果、lymphostin は濃度依存的に細胞内タンパク質のチロシンリン酸化を抑制したが、その活性は 23 kDa のタンパク質のチロシンリン酸化で測定したとき、IC<sub>50</sub> 0.2 μM であった。

Lymphostin の細胞レベルでの免疫抑制活性を評価するため、混合リンパ球反応に与える影響を調べたところ、lymphostin は混合リンパ球反応を濃度依存的に抑制し、その IC<sub>50</sub> 値は 0.009 μM であった。一方、同じ条件で測定した CsA の IC<sub>50</sub> 値は 0.05 μM であった。さらに、*in vivo* での免疫抑制活性を評価するため、lymphostin のマウス遅延型過敏症実験モデルへの影響を調べた。その結果、lymphostin はマウスの足浮腫を 1 mg/kg(ip)で 65%抑制した。なお、CsA は 30 mg/kg(ip)で 91%抑制した。

Lymphostin の混合リンパ球反応の阻害活性は、細胞レベルの Lck 阻害活性より強かったので、lymphostin には Lck 阻害活性以外の作用があることが示唆された。そこで、他のキナーゼに対する阻害活性を調べたところ、プロテインキナーゼ A および C に対しては、それぞれ IC<sub>50</sub> 4.8 および 1.3 μM の阻害活性を示したが、Jurkat T 細胞由来のホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-キナーゼ) に対する阻害活性は、IC<sub>50</sub> 0.001 μM ときわめて強力であった。これは既存の PI3-キナーゼ阻害剤である wortmannin の IC<sub>50</sub> 値 0.003 μM を上回る阻害活性であった。また、lymphostin の PI3-キナーゼに対する阻害様式は、不可逆的あるいは解離の遅い結合であった。したがって、PI3-キナーゼも T 細胞のシグナル伝達に関与していることが示唆されているので、lymphostin の免疫抑制活性には PI3-キナーゼ阻害活性も寄与していると考えられる。

以上のように本研究では、リンパ球特異的に発現している Lck の阻害剤について微生物代謝産物を対象に検索したところ、lymphostin と命名した新規アルカロイドを単離・構造決定することができた。さらに、その阻害作用の解析の結果、Lck ばかりでなく PI3-キナーゼに対しても強力な阻害活性を有することを明らかにし、lymphostin が新しいタイプの免疫抑制剤として有望であることを示すと同時に、Lck および PI3-キナーゼの機能を調べる試薬としても利用できることを示唆したもので、学術ならびに産業に貢献するところは大きいものと思われる。