

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 永田裕之

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。したがって、Lck の阻害剤は、シクロスポリンなど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。

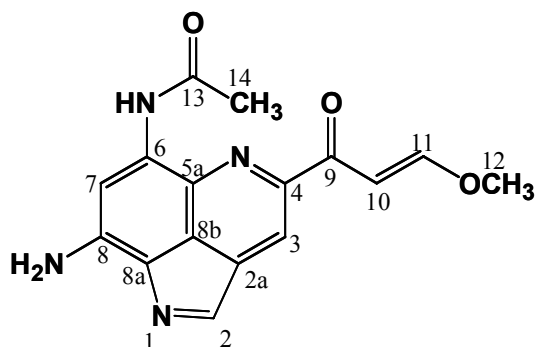
このような状況のもとで本研究では、毒性の弱い免疫抑制剤の開発を目的に、微生物代謝産物を対象とした Lck 阻害剤の検索を行ったところ、lymphostin と命名した新規アルカロイドを放線菌から単離・構造決定するとともに、その作用機序を明らかにすることができた。その概要は以下の通りである。

### 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、仔牛胸腺から精製した Lck 標品を基質のペプチド (Tyr-Ala-Glu)<sub>7</sub> および [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP とインキュベーションした。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アッセイ系を開発した。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。本アッセイ系を用いて 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、群馬県嬭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 Diaion HP-20 を添加した培地を用いた。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、C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub> の分子式を持つ赤橙色粉末で、各種 2 次元 NMR から、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<sub>50</sub> 0.05 μM 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。次に、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ところ、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、lymphostin のマウス遅延型過敏症実験モデルへの影響を調べた結果、lymphostin はマウスの足浮腫を 1 mg/kg(ip) で 65%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た。

以上本研究では、新しい作用機序を有する免疫抑制剤の開発を目的に、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て lymphostin と命名した新規アルカロイドを単離・構造決定するとともに、本物質が Lck ばかりでなく PI3-キナーゼを強力に阻害して免疫抑制作用を示す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。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。

