

論文の内容の要旨

論文題目 放線菌二次代謝産物からの抗菌・抗癌物質の探索研究

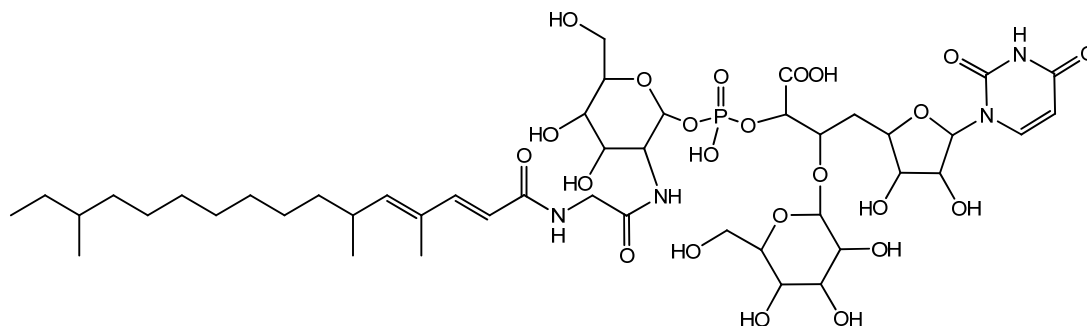
氏名 村上 亮

ペニシリンの発見以来、微生物代謝産物は医薬探索の重要なソースとして盛んに利用されてきた。とりわけ、抗菌剤と抗癌剤に関しては、現在、実際に臨床で用いられている薬剤の多くが天然物由来の化合物であり、微生物代謝産物は抗菌剤や抗癌剤開発の重要な探索源と考えられる。また、近代医学の進歩に伴い、病気の原因や発症のメカニズムが分子レベルで解明されつつあり、これらの分子を標的とした医薬の探索が可能となってきた。そこで、私は、感染症と癌に対する薬剤のソースを微生物産物に求め、最近の様々な知見を踏まえて標的を選定し、新薬シーズの探索を試みた。

細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン¹は内部と外界との間の浸透圧から自己の形を保つために機能しているため、細菌にとって生育に必須である。また、この生合成経路を担う酵素群はヒトをはじめとする脊椎動物には存在しないため、細菌に対してのみ選択毒性を示すことが期待される。以上よりペプチドグリカンの生合成経路は抗菌剤開発の魅力的なターゲットとして注目されてきた。実際、ペニシリンなどの β -ラクタム系抗生物質やバンコマイシンなどのグリコペプチド系抗生物質など世の中で用いられている多くの抗生物質はこの生合成経路を標的としている化合物である。しかしながら、これらの抗生物質のほとんどは transpeptidation や transglycosylation などペプチドグリカン生合成経路の後半のステップを阻害するものばかりで、初期のステップである UDP-MurNAc-pentapeptide 合成に関わる酵素群の阻害剤の報告は数少ない。

本研究では、ペプチドグリカン生合成経路上の Alr、Ddl、MurF、translocase I に着目し、

μg/ml の抗菌活性を示した。A-94964 の部分構造は tunicamycin の部分構造と類似していたため、A-94964 と tunicamycin の哺乳類細胞に対する細胞毒性を測定した。その結果、tunicamycin は非常に強い細胞毒性活性を示した (HeLa と A549 に対してそれぞれ IC₅₀ 値 0.075 μg/ml と 0.072 μg/ml) が、A-94964 では、100 μg/ml の濃度でも細胞毒性活性は認められなかった。よって、A-94964 は tunicamycin の標的である UDP-N-acetylglucosamine:dolichol phosphate GlcNAc-1-P transferase (GPT) に対して阻害活性を示さず、translocase I を特異的に阻害する化合物であることが示唆された。



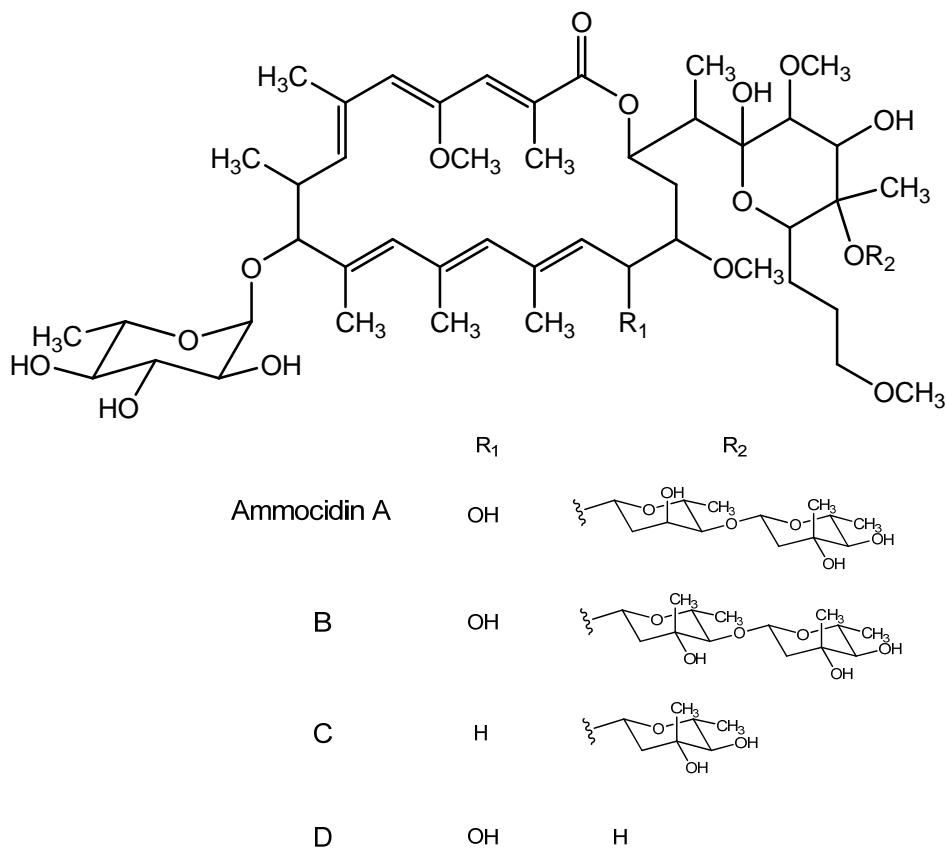
A-94964 の構造

細菌とは対照的に、癌細胞はもともと自身の細胞が変異して生まれた細胞であるため、正常細胞と極めて近い生理学的性質を有し、癌細胞と正常細胞の区別が難しく、副作用が常に問題となっている。実際、これまで開発された多くの抗癌剤も、正常細胞に対しても毒性を示すことが知られている。しかし、ここ最近、癌の生物学的研究の進歩により癌治療の標的となり得る分子が次々と明らかにされており、これらの分子を標的とする化合物は癌の選択的治療薬として期待できる。そのような標的分子候補として Ras があげられる。Ras タンパクは細胞膜の内側に存在する GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) であり、細胞の増殖・分化・アポトーシス抑制に関与している。また、癌においては、Ras の活性型変異が多く認められ、この変異が発癌や癌の進展に大きく寄与していることが最近明らかとなってきたことから、変異型 Ras の機能を阻害する物質は Ras が変異した癌細胞に対して有望な薬剤になり得ることが期待される。

IL-3 依存性のマウス pro-B 細胞 Ba/F3 は IL-3 除去後、28 時間でほぼ 100%がアポトーシスにより死滅する。この細胞に活性化変異型 Ras を発現させると、IL-3 非存在下で誘導されるアポトーシスが完全に抑制される。そこで dexamethazone (Dex) 添加による活性化変異型 Ras の発現誘導により IL-3 非存在下で Ras 依存的に生存する Ba/F3-V12 細胞を用い、IL-3 依存的に増殖する Ba/F3 細胞と比較して、選択的に細胞死を誘導する活性を指標としてスクリーニングを行った。その結果、*Saccharothrix* sp. AJ 9571 株の培養液中に目的の活性が見出された。各種クロマトグラフィーを行い本菌株培養抽出液から、ammocidin A の単離に成功した。NMR による解析の結果、本化合物は 3 分子の糖が結合した 20 員環マクロライドであることが判明した。

Ammocidin A は Dex を添加することにより IL-3 非依存的に生存する Ba/F3-V12 細胞に対して低濃度で細胞死を誘導し、その IC₅₀ 値は 66 ng/ml であった。一方、IL-3 に依存して生存する Ba/F3 細胞に対する IC₅₀ は 16 μg/ml であった。また、ammocidin A により細胞死が誘導された細胞の核においては、IL-3 を除去した時と同様なクロマチンの凝縮と核の断片化が観察され、DNA の断片化が検出された。したがって、ammocidin A が Ras によるアポトーシス抑制シグナルを阻害している可能性が示唆された。Ammocidin A が Ras のシグナル伝達経路のうちアポトーシス抑制を担う MAPK 経路あるいは PI3K 経路を阻害するかどうかを明らかにするために、MAPK と S6K のリン酸化について検討したところ、ammocidin A は MAPK である ERK2 のリン酸化を著しく低下させるとともに S6K のリン酸化も著しく低下させることが明らかとなった。

また、ammocidin 生産菌の培養液より ammocidin の類縁体を探索したところ、ammocidin B、C、D を得た。これらの化合物の主な構造上の違いは 24-O に結合する olivomycose 残基の数であった。Ammocidin 類の増殖阻害効果についてヒト癌細胞株を用いて評価した。全ての ammocidin 類が増殖阻害効果を示したが、とりわけ ammocidin A と B が ammocidin C と D に比べ強い増殖阻害効果を示した。よって、24-O に結合するデオキシ糖は ammocidin の増殖阻害活性において重要な役割を果たしているものと考えられた。



Ammocidin A, B, C, D の構造