

放線菌の代謝産物を求めて
—抗ウイルス薬と酵素阻害薬—

上田 勝¹⁾

Metabolites Produced by Actinomycetes
—Antiviral Antibiotics and Enzyme Inhibitors—

Masaru UYEDA

Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Medical & Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

(Received February 16, 2004)

In 1995, we discovered new antiherpetic antibiotics, called fattiviracins. The producing organism was classified as a strain belonging to *Streptomyces microflavus*. The strain produced at least 13 fattiviracin derivatives (FV-1 to FV-13). Fattiviracins were obtained as a white amorphous powder, and their molecular weights are in the range of 1400 to 1500. They are readily soluble in water, methanol, pyridine, and DMSO, but insoluble in other organic solvents. Fattiviracins have macrocyclic diesters formed by the binding of two trihydroxy fatty acids and two D-glucose residues in the molecule, and they can be divided into five families according to the length of the fatty acid moiety. Fattiviracins have potent activity against enveloped DNA viruses such as the herpes family, HSV-1, and VZV and enveloped RNA viruses such as influenza A and B viruses, and three strains of HIV-1, with EC₅₀ values on the order of a few micrograms per milliliter. The biosynthetic pathway of fattiviracins is also becoming clearer. Using bacitracin-resistant strains, enhanced and astringent production of fattiviracin was achieved. Fattiviracin FV-13, which has the longest fatty acid chains in the molecule, was dramatically enhanced by a C₅₅-isoprenyl phosphate metabolism. In addition, we have screened various inhibitors of enzymes such as alkaline protease, glucosyltransferase, glucuronidase, phospholipase, deoxyribonuclease, DNA methyltransferase, and DNA topoisomerase. All the inhibitors we discovered are briefly summarized in this paper.

Key words—antiviral antibiotics; fattiviracin; *Streptomyces microflavus*; C₅₅-isoprenyl phosphate; bacitracin resistance; enzyme inhibitor

はじめに

著者は、学位を取得するまでの約10年間は九州大学農学部発酵学研究室に在籍し、細菌や糸状菌を用いた微生物培養の酸化還元電位に関する研究を行った。ここ熊本大学薬学部に移ってからは、主として放線菌を各地の土壌から単離し、彼らが産生する代謝産物から、(1)抗生物質、(2)酵素阻害薬を探索する研究を行ってきた。このほか、微生物の特異的機能を利用したマクロライド系抗生物質の微生物変換や *Pseudomonas* sp. による消毒剤クロルヘキシジンの微生物変換などについても検討し、一応の成果

を得ている。今回は上記(1)及び(2)について述べる。

1. 抗ウイルス性抗生物質

現在使用されている抗ウイルス性抗生物質は、大多数が化学合成法によって製造されたヌクレオシド類似体であり、かつ、その大半が抗ヘルペス薬である。例えば、アシクロビル、イドクスウリジン、ピダラビン、ガンシクロビルなどが国内で利用されている。なお、アマンタジンはA型インフルエンザウイルスの感染初期に有効で、構造的にはヌクレオシド類に属さない稀な例である。

微生物は、ウイルスに有効な抗生物質を産生しないのだろうかという疑問を抱きつつ、1990年頃からP2レベルで実験が可能なヘルペスウイルス1型(HSV-1)を対象に、いわゆる抗ヘルペス抗生物質のスクリーニングを開始した。方法は従来の古典的なスクリーニング法で、主に放線菌を単離した。気

熊本大学大学院医学薬学研究部薬学微生物学分野
(〒862-0973 熊本市大江本町5-1)
e-mail: tk-uyeda@shokei-gakuen.ac.jp

本総説は、平成15年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

菌糸の色はグレー系のものが多かったが、中でも褐色を帯びているもの、また極力細胞毒性の低いものを選択して実験を進めた。

そして1995年に、一放線菌 No. 2445 株が、水溶性で選択係数の優れた抗ウイルス活性物質を産生することを見出した。本生産菌を *Streptomyces microflavus* No. 2445 と同定し、有効物質名をファッティピラシン²⁾と命名した。本菌は多数の類似物を産生したため、各成分の分離、精製に困難を極めたが、HPLCの保持時間 (retention time) の短い順に番号を付し、現在 FV-1 から FV-13 までの13成分を産生することが分かっている。構造解析の結果、糖脂肪酸ラクトン構造を有しており、1992年にブリistolマイヤーズ・スクイップ東京研究所から発表されていた、シクロピラシン群抗生物質^{3,4)}に類似していた。

本稿では、筆者らが見出したファッティピラシン群抗生物質についてそれらの単離、精製、生合成、抗ウイルススペクトル、さらに特定成分への収斂、増産について解説する。

各地土壌から新たに分離した放線菌約 2500 株の

中から、筆者の研究室でこれまでに見出した抗ヘルペス活性を有する新規物質は、グルタールイミド系の AH-135Y,⁵⁾ バフィロマイシン系の AH-758,⁶⁾ サプトマイシンやエスピキュフォリンに類似の AH-1763 IIa,⁷⁾ 及びファッティピラシン群抗生物質の4種であった (Fig. 1)。(構造を明らかにしたその他13種は既知物質であった。) その中でも、ファッティピラシン群抗生物質は、Vero細胞に対する細胞毒性が低く (IC₅₀ (発育の50%を阻止する濃度) > 5000 µg/ml), EC₅₀ は 2.7 µg/ml (1.9 µM) であり、有望と考えられた。

1-1. ファッティピラシンを産生する菌 本生産菌は熊本市内の河川土壌から分離された。常法により、培養上の特性や生理学的特性、各種糖の利用性、気菌糸の形状 (spiral)、胞子表面 (smooth)、また、メラニン色素産生陽性などの特徴を「Bergey's Manual 第8版」や「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」(1989)と照合した結果、*Streptomyces microflavus* 近縁の一菌株と同定し、*S. microflavus* No. 2445 と名付けた。

1-2. 分離、精製⁸⁾ 抗生物質に限らず、微生物

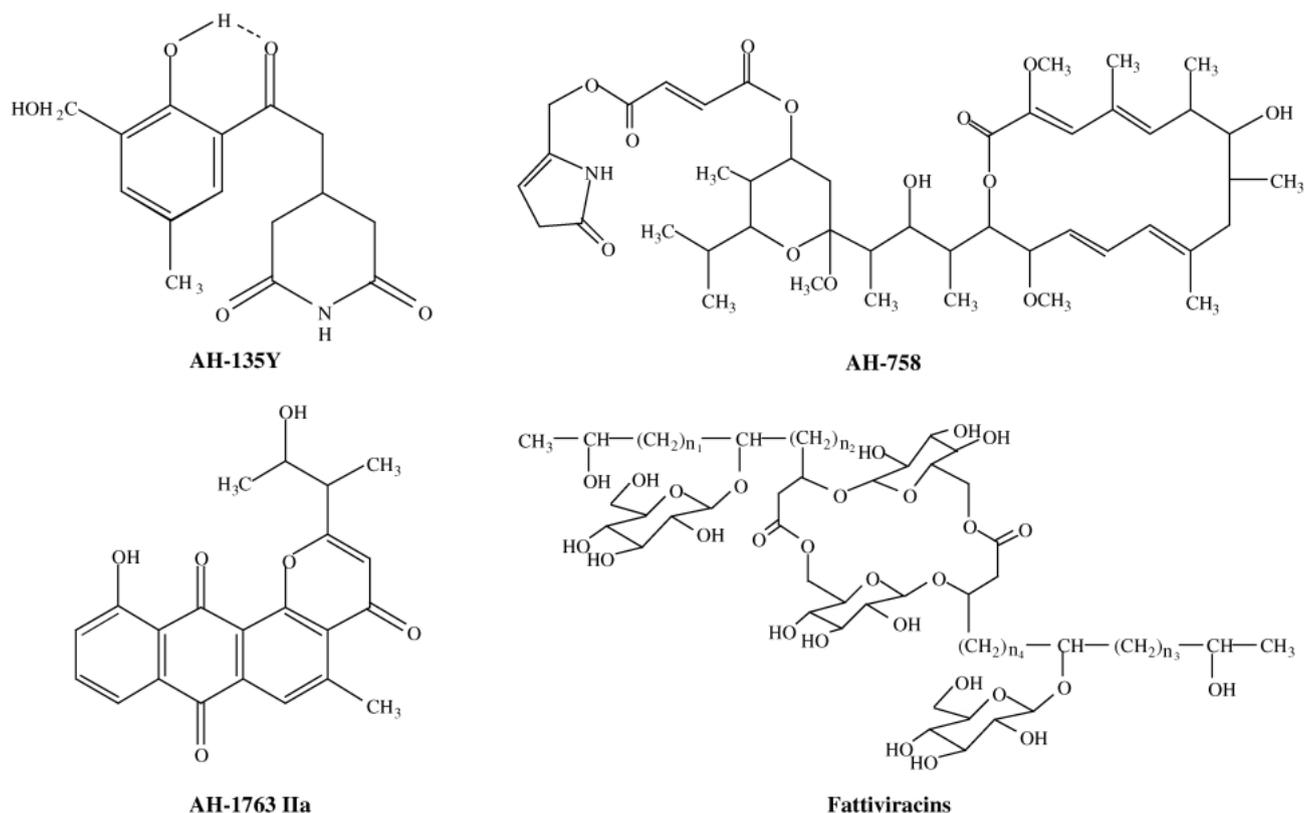


Fig. 1. Novel Antiherpetic Agents Found in Our Labs.

物が類似の化合物を数種類産生することは珍しいことではない。このファッティピラシン産生菌においてもしかりであった。

培養液をダイヤイオン HP-10 に吸着させ、メタノール溶出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ついで逆相系の ODS カラムで処理したのち、分取型 HPLC を駆使して分離精製を試みた。結果的に本菌は 13 成分の類似物を産生しており、retention time の短い順に FV-1—13 と名付けた。この内、FV-1—3 は精製量が僅少で、いまだ構造解析に至っていない。一方、FV-4—13 は各種機器分析、酸分解後の脂肪酸の長さなどから整理すると、Table 1 に示すように 5 つのファミリーに区分された。各ファミリーは、2 分子の脂肪酸の長さが 2 メチレン単位 (分子量にして 28) ずつ増加していることが分かる。どの段階かで生合成が止まってくれば、成分数も減り精製が少し楽になるのだが、

Table 1. Structures of Fattiviracins

Fattiviracin Family	Carbon number of fatty acid		MW (CH ₂)
	Long chain	Short chain	
FV-4	22	22	1388 (basis)
FV-5	22	22	1388 (basis)
FV-6	24	22	1416 (+2)
FV-7	24	22	1416 (+2)
FV-8	24	22	1416 (+2)
FV-9	24	24	1444 (+4)
FV-10	26	24	1472 (+6)
FV-11	26	24	1472 (+6)
FV-12	26	24	1472 (+6)
FV-13	28	24	1500 (+8)

No. 2445 株は筆者の願いを聞き入れてくれそうにはない。また、分子内には不斉炭素が散見される (正確には 6 個ある) ので、同一ファミリー内の物質は互いに立体異性体と考えられる。

1-3. 抗ウイルススペクトル⁹⁾ 抗ウイルス活性のスクリーニングに当たって、まず、ヒトヘルペス 1 型 (HSV-1) に有効かどうかを調べた。収量が高く代表的な FV-8 について抗ウイルススペクトルを調べた結果を Table 2 に示す。ヒトヘルペスウイルスでは 1 型のほか、3 型の Varicella-Zoster ウイルス (VZV; 水痘-帯状疱疹ウイルス) に有効であり、エイズの HIV-1 では T 細胞指向性株、マクロファージ指向性株、さらには T, M 両細胞指向性株のいずれに対しても、若干程度の差があるものの細胞指向性とは関係なく有効であった。その他、インフルエンザウイルスの A 型及び B 型に有効で、ポリオ (急性灰白髄炎) ウイルスには無効であることが明らかになった。

これらの結果から、FV-8 は DNA ウイルスや RNA ウイルスに関係なく有効であり、調べた限りではエンベロープを有しないポリオウイルスに無効であり、むしろエンベロープを有するウイルスに有効であろうと考えられた。このことはのちの作用機作を考察するときのヒントになった。

なお、本物質は主だったグラム陽性菌やグラム陰性菌、さらに真菌類に対して抗菌活性を示さなかった (MIC > 100 µg/ml)。

1-4. ファッティピラシンの作用機作⁹⁾ ファッティピラシンが、HIV-1 感染のどの段階で作用するのかを MAGI assay で調べた。MAGI (multinuclear activation of a galactosidase indicator) は

Table 2. Antiviral Activities and Cytotoxicities of Fattiviracin FV-8

Virus	Strain	Cell	Antiviral activity (EC ₅₀ , µg/ml)	Cytotoxicity (IC ₅₀ , µg/ml)
HIV-1	IIIB ^{a)}	MAGI/CCR5 ^{d)}	4.3	280
HIV-1	JR-FL ^{b)}	MAGI/CCR5	3.5	280
HIV-1	89.6 ^{c)}	MAGI/CCR5	6.1	280
HSV-1	KOS	Vero	2.7	>5000
VZV	Oka	Vero	3.0	>5000
Influenza A	H1N1	MDCK	1.9	—
Influenza B	B/Lee/40	MDCK	3.3	—
Polio	Sabin type 1	Vero	>1000	>5000

a) T-tropic virus strain. b) M-tropic virus strain. c) Dual-tropic virus strain. d) a clone of MAGI cells that express the human chemokine receptor CCR5. MAGI cell line is a HeLa cell clone expressing human CD4 and HIV LTR-β-galactosidase.

もともとは HIV-1 の LTR- β -galactosidase を組込んだ CD4-HeLa 細胞であり、ウイルス感染により発現した β -ガラクトシダーゼにより X-Gal が分解されてインドール系のブルーに着色するので、倍率 100 倍程度の顕微鏡で着色した感染細胞を計数することができるという便利な定量法である。

Figure 2 に示すように、感染直前にファッティビラシンが存在すると本薬剤は強い抗 HIV-1 活性を示した (EC_{50} : 4.3 μ g/ml (3.0 μ M)). しかし、1 時

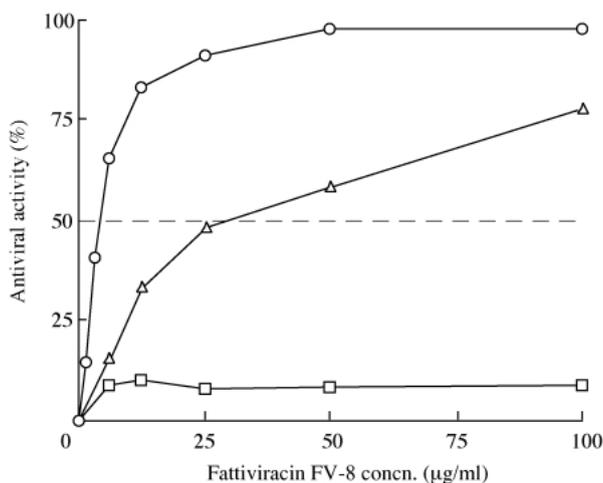


Fig. 2. Effect of FV-8 on HIV-1 Infection

○ : Addition of FV-8 just before HIV-1 infection, Δ : Addition of FV-8 at 1 h after HIV-1 infection, \square : Addition of FV-8 at 3 h after HIV-1 infection.

間後に添加すると活性は低下し (EC_{50} : 28.9 μ g/ml (20.1 μ M)), さらに感染がほぼ終了したと考えられる 3 時間後に添加すると、もはや活性は認められなかった (EC_{50} > 100 μ g/ml). このことは本薬剤は感染して宿主細胞内に侵入したウイルス粒子には影響を及ぼさず、むしろ感染前の HIV-1 ウイルス粒子に直接作用するものと考えられた。

それでは、この薬剤がウイルス粒子のどの部分に作用しているのか興味が行かれるところである。前にウイルスのエンベロープに触れたが、HIV-1 を例にとると、このウイルスのエンベロープは、粒子表面の脂質二重層に膜貫通糖タンパク質と呼ばれる gp 41 と、それに連結したスパイクと呼ばれる糖タンパク質 gp 120 とから成る (Fig. 3).

ファッティビラシンがこれらのエンベロープ糖タンパク質に作用するかいなか、ELISA 法を用いて gp 120 と CD4 レセプター及び gp 41 とそのモノクローナル抗体 (2F5mAb) の結合阻害活性を検討したところ、ファッティビラシンは前者の結合には影響を及ぼさず、後者の gp 41-2F5mAb の結合を濃度依存的に阻害した。恐らくファッティビラシンはウイルスの脂質二重層に突きささった gp 41 に影響して、この部位に distortion というか“ユラギ”を引き起こし、ウイルスそのものにダメージを与え、宿主への感染力を失わせるものと推定される。この

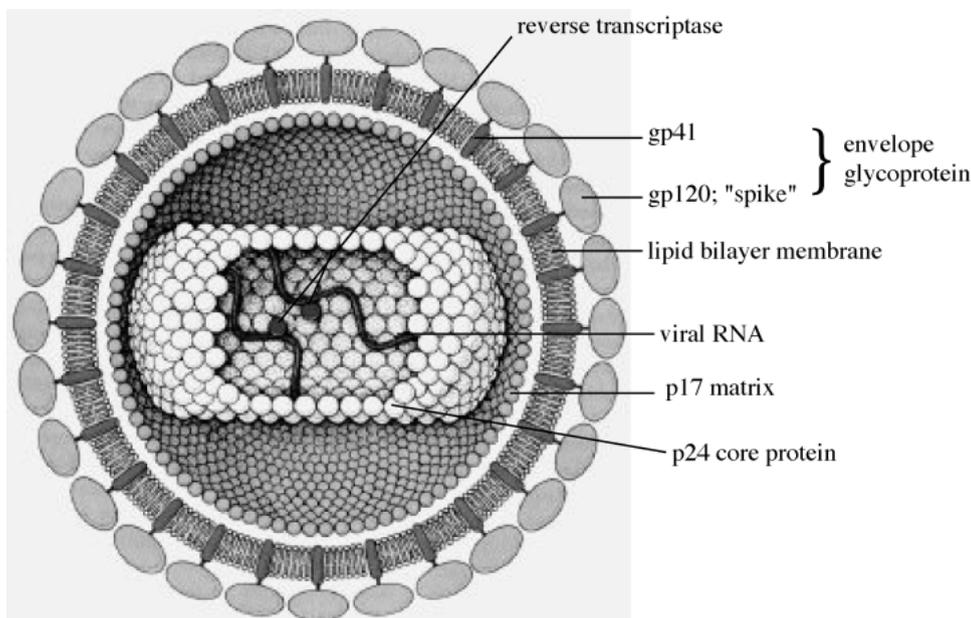


Fig. 3. Schematic Diagram of HIV

作用機作は、これまでの HIV-1 粒子の逆転写酵素阻害剤であるジドブジンやプロテアーゼ阻害剤であるリトナビルなどの作用機作とは全く異なっている点で、新しい治療薬と成る可能性が高い。

1-5. ファッティビラシンの生合成¹⁰⁾

1-5-1. ファッティビラシン分子中のグルコースを他の糖に置換できるか? ファッティビラシン分子中には4個のグルコースがある。これらの糖を他の糖に置換できるか、置換できれば抗ウイルス活性のより高いものが得られるのではないかと考えた。産生用培地に各種の糖を単独に添加してファッティビラシンを産生させ、FV-8画分に相当するものを単離し(“修飾”FV-8と仮称)、得られたものから酸加水分解後、糖を単離してRI屈折計を接続したHPLCで調べた。Table 3に示すように、果糖やガラクトース、マンノースなどの六単糖を始め、アラビノース、キシロースなどの五炭糖添加培地で培養した菌が産生する“修飾”FV-8のいずれからもグルコースが検出された。培養液の活性が弱く一連の解析ができていないものもあるが、これまでの実験の限りでは、この産生菌は各種の糖を一度グルコースに変換してファッティビラシン分子中に取り込むものと考えられた。

特に興味を持った五炭糖キシロースからグルコースに至る経路について詳細に追跡したところ、ペントースリン酸回路を經由してキシロースがグルコースに変換されることが明らかとなった。

1-5-2. 生合成 炭素1位に¹³Cラベルしたグルコースから得られた標識ファッティビラシンのNMRスペクトルを調べると、分子中4個のグル

コースの1位に帰属する炭素のシグナル強度が増加した。したがって、本菌は培地中のグルコースを、直接ファッティビラシン分子中に取り込んでいると考えられた。次に、2本の脂肪酸部分については常法通り酢酸の1位に¹³Cをラベルした1-¹³Cアセテートと2位に¹³Cをラベルした2-¹³Cアセテートをそれぞれ添加して得られたファッティビラシンから、脂肪酸の奇数番号の炭素に1-¹³Cアセテートが、一方、偶数番号の炭素に2-¹³Cアセテートが取り込まれていることが分かった。

ファッティビラシン全体の大まかな生合成系は確立されたので、ポリケタイド経路によって生合成される脂肪酸生合成の阻害剤であるセルレニン¹¹⁾を添加したところ、生育には影響なく、ファッティビラシンの生合成のみが抑制されることが確定した(Fig. 4)。ただ厳密に言うと、トリヒドロキシ脂肪酸のヒドロキシル基が何に由来するのかが、いまだ明らかにできていない。

1-6. バシトラシン耐性株によるFV-13成分への収斂・増産 前述のとおり、産生菌 *S. microflavus* No. 2445株は13成分のファッティビラシンを産生した。せめて2-3成分に収斂するか、さらに増産できれば精製を始め、いろいろな面で好都合である。筆者らは、始めストレプトマイシン耐性株を育成して量産を試みたがうまくいかなかった。悩みつつ、細胞壁ペプチドグリカン生合成経路上のリピドサイクルを見渡し、バシトラシン(BC)がC₅₅-イソプレニルニリン酸を一リン酸に変換する部位(isoprenyl pyrophosphatase)を阻害することに注目した。2002年、BC耐性株の育成に着手した。ま

Table 3. Exchange of Sugar Moiety in Fattiviracin Molecule

Modified fattiviracin FV-8	Sugar detected	pH	Growth (g/flask)	EC ₅₀ ^{b)} (μg/ml)	PD ₅₀ ^{c)} (unit/ml)
Glucose-fattiviracin	glucose	7.6	7.84	3.5	260
Galactose-fattiviracin	glucose	7.2	6.46	4.0	250
Mannose-fattiviracin	glucose	7.2	8.39	4.2	210
Fructose-fattiviracin	glucose	7.2	6.45	4.5	220
Sorbose-fattiviracin	NE ^{a)}	8.8	6.45	NE	30
Arabinose-fattiviracin	NE	4.8	7.40	NE	60
Xylose-fattiviracin	glucose	7.0	11.23	3.5	200
Sucrose-fattiviracin	NE	8.8	3.63	NE	<40
Starch-fattiviracin	NE	7.8	9.38	NE	70

a) Not examined. b) Antiherpetic activity of purified sample. c) Antiherpetic activity of culture filtrate.

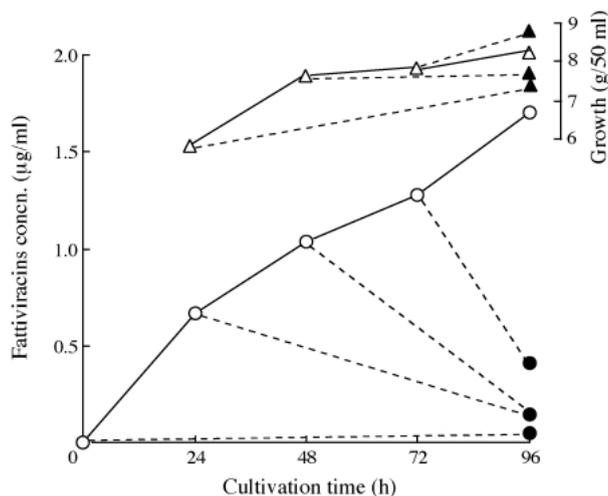


Fig. 4. Effects of Cerulenin on Fattiviracin Production

Cerulenin was added at 0, 24, 48, and 72 h at a final concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$. FV-8 concn. ($\mu\text{g/ml}$) and mycelium weight were measured after 96 h of cultivation. \circ : FV-8 concn. without cerulenin, \bullet : FV-8 concn. with cerulenin, Δ : cell growth without cerulenin, \blacktriangle : cell growth with cerulenin.

ず、産生菌（野生株）の BC に対する MIC を測定し、10 $\mu\text{g/ml}$ という値を得た。MGA 寒天培地上に胞子を塗抹し、およそ 10 日目毎に生じたコロニーをより高濃度の BC を含む MGA 寒天培地に植え継ぎ、最終的にそれぞれ 40, 120 及び 350 $\mu\text{g/ml}$ の BC に耐性の株を得た。

まず、BC 40 $\mu\text{g/ml}$ に耐性の 40-BCR を培養し、野生株と抗ヘルペス活性及び菌糸体重量を比較した結果を Fig. 5 に示した。6 日培養後、野生株及び 40-BCR の抗ヘルペス活性はそれぞれ 134 及び 280 unit/ml となり、BC 耐性株の方が約 2.1 倍高い活性を示した。各 500 ml の培養液から従来の精製法に基づいてファッティビラシン画分を集め、HPLC 分析に供した。Figure 6 に示すように 40-BCR は FV-13 を劇的に増産した。¹²⁾ 一方で FV-10 や FV-12 が減少し、ある程度の収斂が認められた。

1-7. バシトラシン耐性のメカニズム これまでの結果から BC 耐性はファッティビラシン生産菌の膜あるいは細胞壁の脂質代謝（リピドサイクル）と関連していると考えられる。BC 耐性になると、 C_{55} -イソプレニルニリン酸 \rightarrow C_{55} -イソプレニルニリン酸の障害が解除されるのかもしれない。

一方では、イソプレノールをイソプレニルニリン酸にリン酸化するキナーゼ活性が増強されるのかもしれない。

実際にイソプレノールキナーゼ反応を行い、各

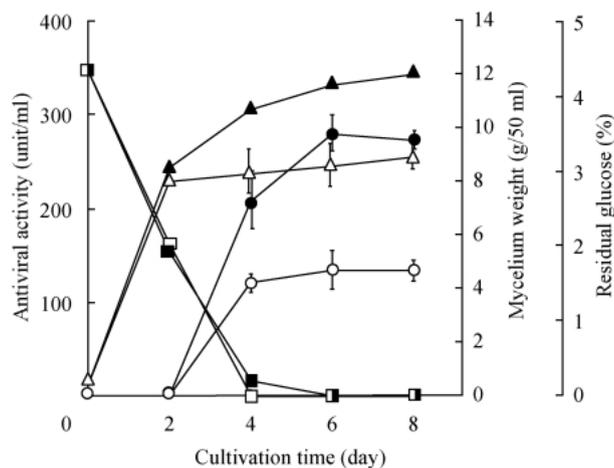
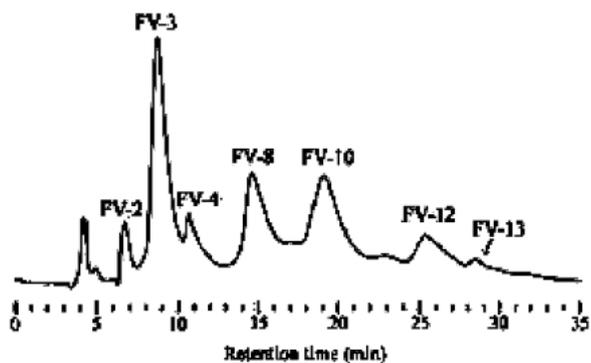


Fig. 5. Antiviral Activity and Cell Growth of Wild Strain and BC-resistant Strain (40-BCR) of Strain No. 2445

Wild strain and 40-BCR were incubated at 28°C on a rotary shaker set up at 180 rpm. Antiviral activity; \circ : wild strain, \bullet : 40-BCR. Mycelium weight; Δ : wild strain, \blacktriangle : 40-BCR. Residual glucose; \square : wild strain, \blacksquare : 40-BCR.

A



B

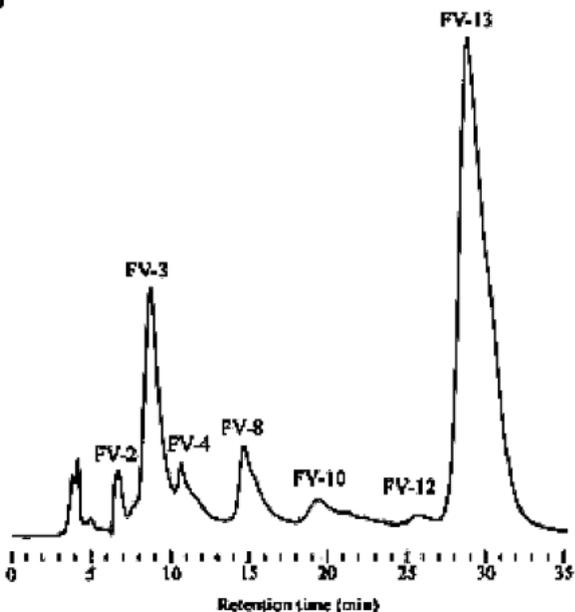


Fig. 6. HPLC Profiles of the Fattiviracin Components in the Culture Filtrate from Wild Strain (A) and 40-BCR (B)

BC 耐性株の生成物の放射活性を野生株と比較した結果、40-BCR で 1.4 倍、120-BCR で 2.6 倍、350-BCR で 5.2 倍増加しており、¹³⁾ 耐性濃度の上昇に伴い酵素活性の増加が見られた。また、放射標識生成物のラジオルミノグラフィーにより、C₅₅-イソプレノールニリン酸に相当するスポットの顕著な増加が確認された。C₅₅-イソプレノールニリン酸がさらにリン酸化を受けたか、若しくはリピドサイクルの代謝回転が増加して、C₅₅-イソプレノールニリン酸が増加したと考えられる。したがって、*Streptomyces microflavus* No. 2445 株の BC 耐性化はイソプレノールキナーゼの活性化に起因し、過剰に生成された C₅₅-イソプレニルニリン酸がファッティビラシンの脂肪酸鎖の前駆体としてその増産に寄与していると考えられる (Fig. 7)。

ファッティビラシンの中で最長鎖脂肪酸から成る FV-13 は長鎖が C₂₈、短鎖が C₂₄ である。仮に上記 C₅₅-イソプレニルニリン酸がトランスフェラーゼにより C₃₀ と C₂₅ に分割され、それぞれから C₂ 及び C₁ が脱落すれば、炭素数だけでは FV-13 と合致する。FV-13 に収斂することこそ理屈に合うと虫の

良い計算をしているところである。

2. 酵素阻害薬

治療薬開発のリード化合物として、疾病に関わる酵素や生命機能を制御する酵素の活性を阻害する新規な酵素阻害薬を微生物の培養液を用いて探索し、その分離精製、特性、構造解析及び作用機構などを解明した。

2-1. アルカリプロテアーゼ阻害薬 アルカリプロテアーゼは酵素の活性中心にセリン残基を持つセリンプロテアーゼに分類される。セリンプロテアーゼの阻害薬は数多く見出されているが、微生物起源のアルカリプロテアーゼを特異的に作用する阻害薬は、本研究に着手した時期 (1975 年) には例が少なく、アルカリプロテアーゼ全般の共通点やセリンプロテアーゼとの異同を解明するのに役立つ阻害薬の探索を行った。

土壌から分離した放線菌 *Streptomyces pseudo-griseolus* が産生する蛋白性の阻害薬 AP-I¹⁴⁻¹⁶⁾ と *Streptomyces griseoincarnatus* が産生する 3 種の蛋白性阻害薬 API-2a, API-2b 及び API-2c¹⁷⁻²²⁾ を見出し、その諸性質を明らかにした (Table 4)。これ

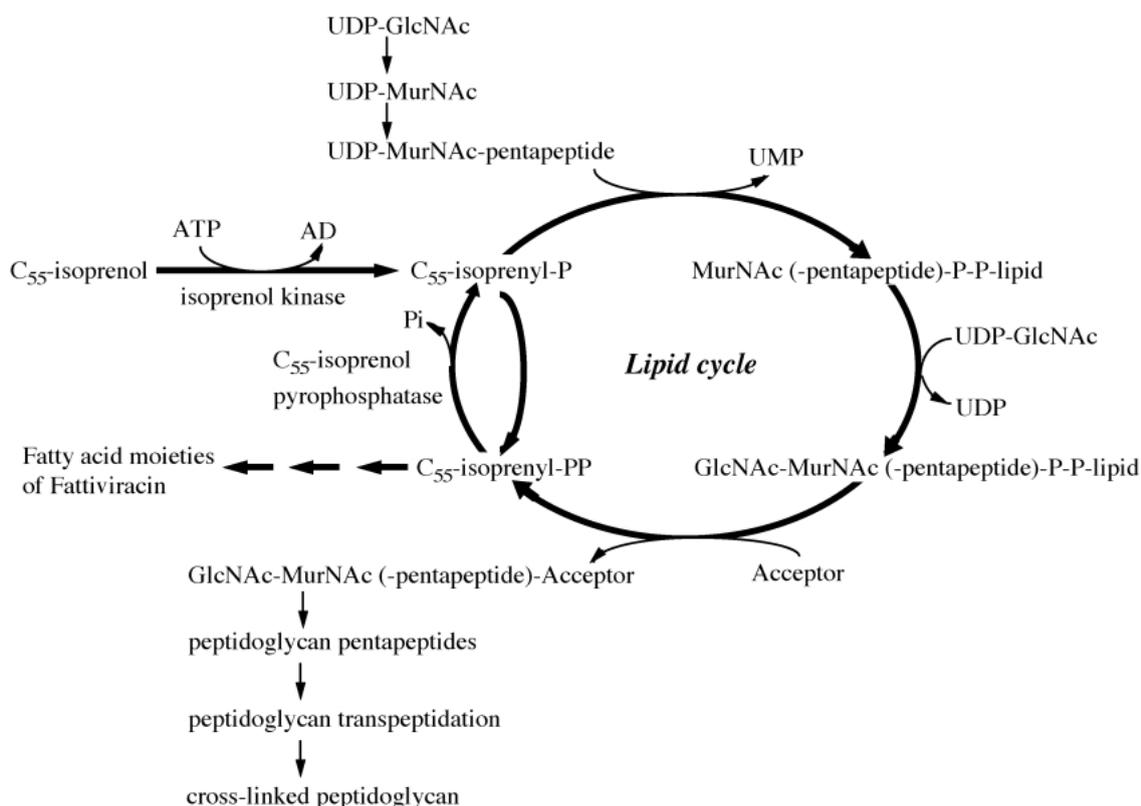


Fig. 7. Biosynthesis of Cell Wall Peptidoglycan and Fattiviracin

Table 4. Enzyme Inhibitors Produced by Streptomycetes

Inhibitor	Origin	Reference
Alkaline protease inhibitor		
AP-I	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	14—16
API-2a	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	17
API-2b	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	17
API-2c	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i>	18—22
Phospholipase inhibitor		
S-PLI	<i>Streptomyces</i> sp. No. A-6288	26
SHI	<i>Streptomyces</i> sp. No. A-6288	27
Glucuronidase inhibitor		
M-GCI	<i>Micromonospora</i> sp. No. BR-1613	30
Glucosyltransferase inhibitor		
M-GTFI	<i>Micromonospora narashinoensis</i>	31—33

らの阻害薬はそれぞれ2分子会合した2量体 (I₂) として存在し、酵素—阻害薬複合体は E₂-I₂ の型で微生物起源のアルカリプロテアーゼを拮抗的に阻害した。API-2b の全一次構造の解析結果から、阻害反応部位は S-S 架橋内に存在するメチオニン—イソロイシン残基で、API-2c は API-2b の N 末端側の6残基のアミノ酸配列が欠失した構造であった。

当時、この種の阻害薬には S-SI²³⁾ を始めとしてイソロイシン残基は含まれないこと、また、阻害反応部位はメチオニン—リジンあるいはメチオニン—バリンである点、API-2 は特徴的であった。

また、培養系における本阻害薬の消長に重要な役割を果たしている API-2b→API-2c 変換酵素²⁴⁾ と API-2c 分解酵素²⁵⁾ を精製し、酵素活性に金属を必要とする特異なアルカリプロテアーゼであることを明らかにした。

2-2. ホスホリパーゼ阻害薬 細胞溶解活性を示す有毒酵素の多くはリン脂質を分解するホスホリパーゼである。そのうち単独で溶血作用を示すのはホスホリパーゼ C (PLC) とスフィンゴミエリナーゼ (SMase) であるが、溶血を示さない PLC や SMase も多く存在し、リン脂質分解活性と溶血作用の有無を認識する阻害薬はホスホリパーゼの構造と活性に関する研究に役立つツールとなる。

土壌から分離した放線菌 No. 6288 株が産生する糖蛋白質の阻害薬 S-PLI²⁶⁾ と SHI²⁷⁾ を見出し、その諸性質を明らかにした (Table 4)。S-PLI は 609 残基のアミノ酸と 19 残基のグルコースから成る分子量 65000 の糖蛋白質で、溶血を示さない PLC や

ホスファチジルイノシトール特異的 PLC を強く阻害するが、溶血を示す PLC を全く阻害しない。一方、SHI は塩基性物質で、溶血を示す SMase を強く阻害した。有毒酵素の活性をコントロールし得る両阻害薬を利用して、毒性が有るために敬遠されていた有毒酵素の応用面を見出す可能性を示唆した。また、放線菌 No. BR-1381 株が産生する LAV²⁸⁾ は熱や酸アルカリに対して安定な蛋白質であり、微生物由来のリパーゼの酵素活性を高めた。LAV はリパーゼの反応生成物である脂肪酸を強く吸着し、脂肪酸によるリパーゼの阻害を緩和することにより酵素活性を高めていることを明らかにした。²⁹⁾

2-3. 糖質関連酵素の阻害薬 毒物の解毒と排泄に参与するグルクロニダーゼの阻害薬 M-GCI³⁰⁾ 及び虫歯に参与するグルコシルトランスフェラーゼの阻害薬 M-GTFI^{31—33)} を放線菌の培養液からそれぞれ単離し、構造、性質及び作用機構を明らかにした (Table 4)。

M-GCI は S 含有アミノ酸や塩基性アミノ酸を含まない酸性域で不安定な分子量 8700 の糖蛋白質 (44%糖質を含む) で、微生物由来の β -グルクロニダーゼのみを強く阻害した。

M-GTFI は菌垢を形成する酵素グルコシルトランスフェラーゼの阻害薬として単離した。阻害活性に必須な3個の硫酸エステル基を含む酸性マクロライドで、ショ糖を基質として α -1,3-グルコシド結合から成る非水溶性グルカンを生成する *Streptococcus mutans* 由来のグルコシルトランスフェラーゼを強く阻害した。また、ノイラミニダーゼや

β -ラクタマーゼを阻害することから、抗ウイルス薬や抗菌薬への応用も期待された。また、コンドロイチナーゼやヒアルロニダーゼの阻害にエイコサトリエン酸が有効であることを見出した。³⁴⁾

2-4. 核酸関連酵素の阻害薬 DNA分解酵素、DNAメチル基転移酵素及びトポイソメラーゼ (Topo) は核酸の代謝、遺伝子発現、細胞の老化及び癌化に大きく関わっており、その阻害薬は酵素の生理機能の解明、反応機構、分子レベルでの反応解析に有用なツール及び抗癌薬となる。そこで、DNase II, M. *Eco* RI 及び Topo I を指標酵素として阻害薬の探索を行い、土壌から分離した放線菌が、阻害スペクトルの異なる数種の阻害薬を産生することを見出し、それらの阻害薬を分離精製して、その諸性質を検討した (Table 5)。

4種のDNase II阻害薬を見出した。5838-DNI³⁵⁾はテトラセノマイシンCの立体異性体、DNI-2³⁵⁾はコプロポルフィリン、DNI-3³⁶⁾及び5923-DNI³⁷⁾は酸性の高分子物質 (分子量60000及び2500)であった。各阻害薬はDNase IIやホスホジエステラーゼI及びIIに対して異なる阻害活性及び阻害形式を示し、核酸関連の研究分野での利用が期待された。

6種のM. *Eco* RI阻害薬を見出した。DMI-1³⁸⁾

は8-メチルペンタデカン酸で、分枝メチル基と炭素数が阻害活性に深く関与していた。DMI-2³⁹⁾は抗癌抗生物質であるデュートマイシンの互変異性体で、protein-polylysine複合体による外来遺伝子の形質転換の際に添加することで組み換え効率を高める効果を示し、遺伝子治療への応用も期待された。⁴⁰⁾ DMI-3³⁹⁾は蛍光発光を示す淡黄色液状物質、DMI-4⁴¹⁾は炭素数が奇数の脂肪酸を含むトリグリセライド、1513-DMIa⁴²⁾はグルコステロイド及び1513-DNIb⁴²⁾は分子量8400の塩基性物質であった。これらの阻害薬の阻害形式及び阻害活性はそれぞれ異なり、DNAのメチル化による細胞の老化や癌化に関する研究分野での利用が期待された。

6種のTopo阻害薬を見出した。2280-DTI、2890-DTI⁴³⁾及びマクロスタチン⁴⁴⁾は分子量 3×10^6 、 3.7×10^4 及び 4.5×10^3 の酸性高分子物質、2070-DTI⁴⁵⁾はグルコースを含むテルペン化合物、トポスタチン⁴⁶⁻⁴⁸⁾はペプチド、テルペノイド及び硫酸基を含む14員環の新規構造物質、イソオーロスタチン⁴⁹⁾はイソオーロン骨格に水酸基が結合した化合物であった。これらの阻害薬は従来知られている阻害薬と異なり、DNA切断複合体の安定化やDNAインターカレーションをせず、酵素を直接阻害してDNAに傷害を与えない新しいタイプのトポイソメラーゼ阻害薬

Table 5. Inhibitors of DNA-related Enzymes Produced by Streptomycetes

Inhibitor	Origin	Reference
Deoxyribonuclease inhibitor		
5838-DNI	<i>Streptomyces</i> sp. No. A-5838	35
5923-DNI	<i>Streptomyces</i> sp. No. A-5923	37
DNI-2	<i>Streptomyces</i> sp. No. A-5838	36
DNI-3	<i>Streptomyces</i> sp. No. A-5838	36
DNA methyltransferase inhibitor		
DMI-1	<i>Streptomyces</i> sp. No. 560	38
DMI-2	<i>Streptomyces</i> sp. No. 560	39, 40
DMI-3	<i>Streptomyces</i> sp. No. 560	39
DMI-4	<i>Streptomyces</i> sp. No. 560	41
1513-DMIa	<i>Streptomyces</i> sp. No. 1513	42
1513-DNIb	<i>Streptomyces</i> sp. No. 1513	42
DNA topoisomerase inhibitor		
2070-DTI	<i>Streptomyces</i> sp. No. 2070	45
2280-DTI	<i>Micromonospora</i> sp. No. 2280	43
2890-DTI	<i>Streptomyces antibioticus</i>	43
Macrostatin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	44
Topostatin	<i>Thermomonospora alba</i>	46-48
Isoaurostatin	<i>Thermomonospora alba</i>	49

で、細胞周期に作用することを明らかにした。特に、トポスタチンは脳腫瘍細胞、イソオーロスタチンは肺癌細胞の増殖を選択的に抑制し、細胞毒性も低いことから、弱毒性抗癌薬のリード化合物に成り得ると考えられる。

イソオーロスタチンの置換基を変換した誘導体を多数合成し、構造活性相関を明らかにして、抗癌効果の強い化合物を見出した。⁵⁰ また、不飽和脂肪酸ペトロセリエン酸やエピガロカテキン-3-O-ガレートが Topo I 型と II 型を阻害することを見出し、抗癌薬への応用を示唆した。^{51,52} また、抗腫瘍性プロスタグランジンが Topo II 型を特異的に阻害することを明らかにし、抗腫瘍性プロスタグランジンによる抗癌効果の作用機構を示唆した。^{53,54}

謝辞 本原稿作成に当たり、当研究室の鈴木啓太郎助教教授、並びに横溝和美助手に協力いただいた。ここに深く謝意を表します。

REFERENCES

- 1) Present address: Shokei Womens Junior College; 6-78 2 Chome Kuhongi, Kumamoto 860-8678, Japan
- 2) Uyeda M., Yokomizo K., Miyamoto Y., Habib E. E., *J. Antibiot.*, **51**, 823-828 (1998).
- 3) Tsunakawa M., Komiyama N., Tenmyo O., Tomito K., Kawano K., Kotake C., Konishi M., Oki T., *J. Antibiot.*, **45**, 1467-1471 (1992).
- 4) Tsunakawa M., Kotake C., Yamasaki T., Moriyama T., Konishi M., Oki T., *J. Antibiot.*, **45**, 1472-1480 (1992).
- 5) Uyeda M., Aoki M., Nakajima K., Shiromoto C., Tatsuguchi N., Yokomizo K., Kido Y., Kino Y., *J. Antibiot.*, **45**, 1370-1372 (1992).
- 6) Uyeda M., Kondo K., Ito A., Yokomizo K., Kido Y., *J. Antibiot.*, **48**, 1234-1239 (1995).
- 7) Uyeda M., Yokomizo K., Ito A., Nakayama K., Watanabe H., Kido Y., *J. Antibiot.*, **50**, 828-832 (1997).
- 8) Habib E. E., Yokomizo K., Murata K., Uyeda M., *J. Antibiot.*, **53**, 1420-1423 (2000).
- 9) Habib E. E., Yokomizo K., Nagao K., Harada S., Uyeda M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 683-685 (2001).
- 10) Habib E. E., Yokomizo K., Suzuki K., Uyeda M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 861-864 (2001).
- 11) Omura S., Kitao C., Miyazawa J., Imai H., Takeshima H., *J. Antibiot.*, **31**, 254-256 (1978).
- 12) Uyeda M., Nagata T., Yokomizo K., Matsu-moto T., Toda H., Suzuki K., *J. Antibiot.*, **56**, 876-878 (2003).
- 13) Toda H., Yokomizo K., Uyeda M., Abstracts of papers, the 20th Annual Meeting of Kyushu Branch, the Pharmaceutical Society of Japan, Fukuoka, November 2003, p. 163.
- 14) Uyeda M., Yoshida S., Suzuki K., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1237-1238 (1976).
- 15) Uyeda M., Suzuki K., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1479-1483 (1976).
- 16) Uyeda M., Suzuki K., Umamoto Y., Matsuzaki I., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 703-704 (1977).
- 17) Uyeda M., Suzuki K., Uwatoko H., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 49-54 (1978).
- 18) Suzuki K., Uyeda M., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1539-1543 (1978).
- 19) Uyeda M., Suzuki K., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 699-700 (1980).
- 20) Suzuki K., Uyeda M., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2549-2553 (1980).
- 21) Suzuki K., Uyeda M., Ookubo K., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2555-2560 (1980).
- 22) Suzuki K., Uyeda M., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 629-634 (1981).
- 23) Ikenaka T., Odani S., Sakai S., Nabeshima Y., Sato S., Murao S., *J. Biochem.*, **76**, 1191-1209 (1974).
- 24) Uyeda M., Suzuki K., Sugiyama M., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1849-1854 (1979).
- 25) Suzuki K., Uyeda M., Sugiyama M., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 113-117 (1980).
- 26) Suzuki K., Siddique T., Ohya S., Kaneko M., Maruyama S., Shoji S., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **10**, 177-186 (1996).
- 27) Suzuki K., Siddique T., Uyeda M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 726-728 (1996).
- 28) Uyeda M., Hirotsu M., Itonaga M., Urata S., Suzuki K., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2739-2746 (1983).

- 29) Uyeda M., Suzuki K., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1503–1504 (1985).
- 30) Uyeda M., Suzuki K., Shibata M., *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 29–35 (1984).
- 31) Uyeda M., Yamane S., Yoshida A., Suzuki K., Shibata M., *J. Enzyme Inhibition*, **1**, 231–241 (1987).
- 32) Uyeda M., Yoshida A., Oshima H., Suzuki K., Shibata M., *J. Enzyme Inhibition*, **2**, 173–181 (1988).
- 33) Uyeda M., Oshima H., Nishi K., Suzuki K., Yahara S., Nohara T., Shibata M., *J. Enzyme Inhibition*, **2**, 279–294 (1989).
- 34) Suzuki K., Doi S., Yahara S., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition Med. Chem.*, **19**, 497–503 (2004).
- 35) Uyeda M., Nagao K., Kido Y., Suzuki K., Hara Y., Yamamura R., *J. Enzyme Inhibition*, **6**, 157–164 (1992).
- 36) Suzuki K., Nagao K., Goto M., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **7**, 27–32 (1993).
- 37) Uyeda M., Uehara K., Deguchi M., Tsuchiyama S., Suzuki K., Shibata M., *J. Enzyme Inhibition*, **4**, 359–363 (1991).
- 38) Suzuki K., Nagao K., Tokunaga J., Hirokawa M., Tsubone H., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **9**, 243–252 (1995).
- 39) Abdel-Aziz M., Matsuda K., Otsuka M., Uyeda M., Okawara T., Suzuki K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2004) (in press).
- 40) Ross G. F., Bruno M. D., Uyeda M., Suzuki K., Nagao K., Whitsett J. A., Korfhagen T. R., *Gene Therapy*, **5**, 1244–1250 (1998).
- 41) Suzuki K., Nagao N., Tokunaga J., Katayama N., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **10**, 271–280 (1996).
- 42) Nagao K., Suzuki K., Hamada S., Yahara S., Yamamura R., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **13**, 135–146 (1998).
- 43) Suzuki K., Siddique T., Nishimura H., Sekimoto J., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **13**, 41–55 (1998).
- 44) Suzuki K., Sekimoto J., Siddique T., Kamiya A., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **14**, 69–83 (1998).
- 45) Suzuki K., Doi S., Yahara S., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition Med. Chem.*, **18**, 1–7 (2003).
- 46) Suzuki K., Nagao K., Monnai Y., Yagi A., Uyeda M., *J. Antibiot.*, **51**, 991–998 (1998).
- 47) Suzuki K., Yahara S., Kido Y., Nagao K., Hatano Y., Uyeda M., *J. Antibiot.*, **51**, 999–1003 (1998).
- 48) Suzuki K., Yamaizumi M., Tateishi S., Monnai Y., Uyeda M., *J. Antibiot.*, **52**, 460–465 (1999).
- 49) Suzuki K., Yahara S., Maehata K., Uyeda M., *J. Natural Products*, **64**, 204–207 (2001).
- 50) Abdel-Aziz M., Matsuda K., Otsuka M., Uyeda M., Okawara T., Suzuki K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2003) (in press).
- 51) Suzuki K., Shono F., Uno T., Kai H., Uyeda M., *J. Enzyme Inhibition*, **15**, 357–366 (2000).
- 52) Suzuki K., Yahara S., Hashimoto F., Uyeda M., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1088–1090 (2001).
- 53) Suzuki K., Shono F., Uyeda M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 2073–2075 (1998).
- 54) Suzuki K., Uyeda M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1706–1712 (2002).