薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
116 (7) 548-563 (1996)

微生物の産生する低分子酵素阻害物質. 探索並びに医学・薬学的応用

青柳高明

昭和薬科大学, 〒194 東京都町田市東玉川学園 3-3165

Screening, Characterization and Pharmaceutical and Medical
Application of Enzyme Inhibitors from Microbial Origin
with Low-Molecular-Weight

Takaaki AOYAGI

*Showa College of Pharmaceutical Sciences Higashitamagawagakuen
3-chome, Machida-shi, Tokyo 194, Japan*

(Received April 1, 1996)

In living organisms a large number of enzymes are working in complicated networks to express various biological functions. In order to analyze such functions from various aspects, specific enzyme inhibitors are likely to become useful tools. They are also useful for the studies of reaction mechanisms and analysis of three-dimensional structures of enzymes. Moreover, they are of great value in elucidating disease processes and seem to have usefulness in treatment of various diseases.

Searching for inhibitors in culture filtrate of microbes, we discovered many substances which specifically inhibit various enzymes such as endopeptidases, exopeptidases, glycosidases, lipases, and so forth. These inhibitors have low-molecular-weights and unique structures. We found significant activities of exopeptidases, alkaline phosphatases, esterases, and so forth, on surface membranes of various mammalian cells. Searching for specific inhibitors against these cell surface enzymes, we have discovered many interesting inhibitors. These inhibitors proved to bind to the cellular surface and to modify the functions of cells involved in immune responses.

Thus the studies on these enzyme inhibitors may well afford important keys to understand various aspect of biological phenomena and diseases: inflammation, immune response, hypertension, hyperlipemia, diabetes, Alzheimer's disease, carcinogenesis, metastasis, viral infection, autoimmune diseases, and so forth. Because of their interesting pharmacological activities, some of the inhibitors are now under clinical evaluation for their uses as medical drugs. Enzyme inhibitors seems to propose a new promising field of science.

Key words—enzyme inhibitor; protease inhibitor; glycosidase inhibitor; Alzheimer's disease; autoimmune disease; hypertension

酵素並びにその阻害物質は, 個体発生から老化に至るすべての生命現象と深いつながりを有している. 生体の Homeostasis (恒常性) を乱す様々な現象を理解するには, 生体内における酵

本総説は, 平成8年度日本薬学会学術貢献賞の受賞業績を中心に記述したものである.

素並びに阻害物質の役割を理解することが大切である。生体内で作用する各種の酵素は、個々の独立した反応として作用するより、相互に因果関係を持った連鎖反応、すなわちネットワークとして作用している。疾病は、しばしば動的平衡の乱れを原因として誘起されるが、逆に疾病によって動的平衡の乱れが引き起こされることも当然考えられる。

生体の Homeostasis を究明するため、正常及び病態動物の血清、臓器内の各種の酵素活性の変動を経時的に調べ、また酵素阻害物質を長期間投与することにより誘起される酵素網の変動を究明した。阻害物質の生体内における動態を明らかにするとともに、難病を含む様々な疾病に新しいアプローチを試みることができるようになった。かくして、病態解析を行うことにより key enzyme を選出し、この標的酵素に対する阻害物質を探索する。新規阻害物質を発見しえたなら、これをリード化合物として類縁化合物を合成し、その治療効果を調べるという strategy の基に、常に新しい領域の開拓を目的としている。

標的酵素に対する阻害物質の探索研究は、故梅沢浜夫先生創始の微生物化学研究所において施行し、微生物二次代謝産物から 60 以上の新規構造を有する低分子酵素阻害物質を発見した。¹⁻¹⁰⁾ 同研究所における酵素阻害物質の研究が飛躍的發展を遂げたばかりでなく、この領域の今日の隆盛が築かれたのである。微生物代謝産物から、人類の福祉に貢献し得る医薬などをもっと開発すれば、地球上の限られた資源と異なり、無限の富をもたらしてくれるものと信じる。

本稿では、微生物代謝産物として発見した多数の新規構造を有する低分子酵素阻害物質を中心に、最近の知見を述べる。

I. 生化学的方法論への寄与

1. 酵素阻害物質の酵素学への寄与 a) 酵素の精製——Leupeptin, Antipain, Poststatin, Pepstatin, Phosphoramidon, Amastatin, Bestatin, Benastatin などのアフィニティクロマトグラフィーは酵素の精製を容易にするとともに、新しい酵素発見の糸口になった。ことに Pepstatin アフィニティクロマトグラフィーはレニン、プロレニンなどの精製を可能にし、血圧調節に関与するレニン・アンジオテンシン系の作用機序の解明に貢献している。また Pepstatin, Phosphoramidon などの酵素複合体は差スペクトルによる酵素の純度の測定を可能にした。さらに、ペプチド様阻害物質 (Pepstatin, Leupeptin など) はマルチエンザイムシステムにより N 末端から C 末端へと段階的に生合成されることを明らかにした。

b) 立体構造の解明——立体構造の解析が困難であった酵素は阻害物質との複合体を作ることにより X 線解析による立体構造の解析を可能にした。すなわち、ペプシンと Pepstatin, サーマライシンと Phosphoramidon などは複合体の X 線解析により立体構造が明らかにされた。これらの研究はコンピューターグラフィックによる酵素の活性部位の解明、また新しい阻害物質を合成する扉を開き、構造・活性相関の研究の飛躍的發展をもたらした。

2. 酵素阻害物質からみた酵素学 プロテアーゼは合成基質に対する作用様式並びに触媒残基に基づき、Fig. 1 のように分類されている。一方、多数の特異的阻害物質が発見され集大成された結果、阻害物質によるプロテアーゼの分類が不可欠になった (Fig. 1)。また酵素-阻害物質複合体は酵素の X 線解析を容易にし、多くの酵素の解析を促進した。さらにコンピューターグラフィックを用いた新しい阻害物質の合成への道を拓いたことは、多くの疾病に対する新しい治療薬の開発研究に大きな貢献を与えている。

プロテアーゼ、グリコシダーゼを含む多くの酵素において、阻害物質の特異性から分子種の存在が明らかにされた。酵素分子の進化を考えるうえに重要な発見である。さらに、エクトエ

Fig. 1. Classification of Proteases by Inhibitors

ンザイムに対する阻害物質の発見は細胞膜と細胞機能との関連性に大きな示唆を与え、免疫学の分子レベルの研究に役立っている。

II. 病態生理学からみた酵素阻害物質

難病を含む多くの病気を解析し、病因にもっとも深い関係を有する酵素を決め、この標的酵素に対する阻害物質を探索し、治療に貢献することを目的とした研究である。

1. 病態解析 a) 筋ジストロフィー症——Duchenne 型筋ジストロフィー症では筋繊維の壊死、さらにそれに伴う貪食反応、再生などが認められる。筋繊維の変性、壊死にプロテアーゼが関与することが示唆され、1979 年から 12 年間に亘り厚生省新薬開発研究班として「低分子酵素阻害物質による難病治療の開発研究」が施行された。筋ジストロフィー症の病因解明並びに Leupeptin, E64 誘導体及び Bestatin などが治験薬として用いられ、大きな成果が得られた。¹¹⁻¹⁶⁾

b) 自己免疫疾患——根本的治療法のない難病である全身性エリテマトーデス、進行性全身硬化症、慢性関節リウマチなどを含む膠原病また脱髄性神経疾患、重症筋無力症などを対象とし、1986 年から 5 年間に亘り厚生省新薬開発研究班として「自己免疫疾患の治療薬の開発研究」が施行された。これらの疾患に対する治療薬として、15-Deoxyspergualin, Bactobolamine, Poststatin などが用いられ、大きな期待が寄せられている。¹⁷⁻²³⁾

2. 病態生理からみた酵素阻害物質 高血圧症、高脂血症、糖尿病、老人性痴呆症、自己免疫疾患、筋ジストロフィー症などの患者血清、病理解剖後の臓器並びに病態モデル動物の血清並びに臓器などの酵素活性の変動を経時的に調べ、標的酵素に対する阻害効果を調べた。筋ジストロフィー症並びに自己免疫疾患に関しては既に述べた。東京都老人総合研究所の痴呆プロジェクトで「アルツハイマー病とプロテアーゼ」に関する研究を施行した。病理解剖後の患者脳及び血清中の酵素活性の変動を調べた結果、血液凝固系、繊維素溶解系、キニン形成系などに関与する酵素の異常を認めた。²⁴⁻³³⁾

近年、高齢発症型家族性アルツハイマー症家系に関与するアポ蛋白 E がアルツハイマー病の危険因子として注目されている。リポ蛋白中でのアポ蛋白 E の役割、また isoform と高脂血症、

動脈硬化、アルツハイマー症などを中心とした痴呆を呈する疾患との関係を明らかにするため、apo E 3/3 及び apo E 3/4, 4/4 などの患者血清中の酵素の動態を究明している。

従来、報告されていない酵素が各疾患と深い関係にあることを示唆し、これらの標的酵素に対する阻害物質の探索により、治療への新しいアプローチを可能にした。

III. プロテアーゼ阻害物質

1960年代に始まった低分子酵素阻害物質の研究は、酵素の反応機構、立体構造の解明、アフィニティークロマトグラフィーの活性基、また活性物質精製時に起こる酵素分解を防ぎ、遺伝子工学の領域に不可欠なものとして、医学、薬学、農学、生化学、生物学などの領域で汎用されている。さらに、炎症、免疫、癌、ウイルス感染、糖尿病、高血圧症、高脂血症、筋ジストロフィー症、自己免疫疾患症、老人性痴呆症などを含む、様々な疾病の病因の解明と治療へのアプローチを可能にした。まさに、“第3世代の研究”とよばれるべきものである。

1. エンドペプチダーゼ阻害物質 血液凝固系、繊維素溶解系、キニン形成系及び補体系に参与する多くの酵素はエンドペプチダーゼに属する (Fig. 2)。

セリン・システインプロテアーゼに属する酵素に対して Leupeptin, Antipain, Elastatinal, Chymostatin, Poststatin などを発見した。また酸性プロテアーゼ阻害物質として Pepstatin 群を見出した。Pepstatin はレニンを阻害することから、高血圧症の治療薬としての関心が高まり、また、HIV (human immunodeficiency virus) の酸性プロテアーゼを阻害することから、Pepstatin 構造中の statin[(3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid] を応用した多くの化合物が合成され、エイズ撲滅へ熱い視線が注がれている。また、メタロプロテアーゼに属するコラゲナーゼ、サーモライシンなどを阻害する Actinonin, Steffimycin, Phosphoramidon など、さらに Phosphoramidon はエンドセリン変換酵素を阻害することで注目されている。Actinonin は IV 型コラゲナーゼに阻害活性を示す。上記阻害物質の構造並びに阻害機構は Fig. 3 (1, 2) 及

Fig. 2. Clotting System, Fibrinolytic System, Kinin-generating System and Complements System

2. エキソペプチダーゼ阻害物質 細胞が外部環境に適応し、よりよい条件下で生存するためには、細胞はその表面に様々な特異性のある作用を有する特殊な構造を、長い進化の過程で作り出してきたと考えられる。細胞膜の諸現象と細胞機能との関係を研究することは、生命現象を明らかにするための新しい分子生物学が指向する重要な研究分野である。

Table 1. Kinetic Constants of Endopeptidase Inhibitors

Inhibitor	Enzyme	Substrate	K_m ($\times 10^{-4}$ M)	K_i ($\times 10^{-7}$ M)	Type of inhibition
Leupeptin	Trypsin	TAME ^{c)}	7.1	3.4	Competitive
		BAEE ^{d)}	4.8	1.3	Competitive
Elastatinal	Elastase	Ac-(Ala) ₃ ·NA ^{e)}	3.2	2.4	Competitive
		Ac-(Ala) ₃ ·ME	4.3	2.1	Competitive
Poststatin	PEP ^{b)}	Z·Gly·Pro·NA ^{f)}	4.0	0.56	Competitive
Pepstatin	Pepsin	Phe-Gly-His-Phe(NO ₂)- Phe-Ala-Phe·ME	0.4	0.001	Competitive
Phosphoramidon	Thermolysin	Z-Gly-Leu·NH ₂ ^{g)}	20	0.28	Competitive
	<i>B. subtilis</i>	Z-Gly-Leu·NH ₂	33	65.0	Competitive
	<i>B. griseus</i>	Z-Gly-Leu·NH ₂	40	0.2	Competitive
P-Leu-Trp ^{a)}	Thermolysin	Z-Gly-Leu·NH ₂	20	0.02	Competitive
	<i>B. subtilis</i>	Z-Gly-Leu·NH ₂	33	3.0	Competitive
	<i>B. griseus</i>	Z-Gly-Leu·NH ₂	40	0.01	Competitive

a) L-Leucyl-L-tryptophan *N*-phosphate, b) prolyl endopeptidase, c) *a*-*N*-(*p*-toluene sulfonyl)-L-arginine methyl ester HCl, d) *a*-*N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester HCl, e) acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine *p*-nitro-anilide, f) benzyloxycarbonyl-glycyl-L-proline β -naphthylamide, g) carbobenzoxyglycyl-L-leucineamide.

筆者らはインフルエンザウイルスの感染初期過程の研究から、免疫担当細胞を含む各種の細胞表面にアミノペプチダーゼ、ホスファターゼ、エステラーゼなどがエクトエンザイムとして存在することを明らかにした。^{5, 6, 34-39)} エクトエンザイムに対する阻害物質は、細胞表面で酵素-阻害物質複合体を形成し、細胞機能に影響を与える。この複合体の細胞機能に及ぼす影響を解明することは、細胞表面と細胞機能との関連性を理解する鍵と考える。

アミノペプチダーゼ (AP) 阻害物質として Amastatin, Bestatin, Probestin, Leuhistin, Pyridinostat, Formestin, Benarthin などを見い出した。Bestatin は、その構造に 3 個の不斉炭素有する。立体異性体と活性相関を調べた結果、2 位の配位が *S* である (2*S*,3*R*)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-(*S*)-leucine が活性体であることを明らかにした。Bestatin (Ubenimex) は免疫増強作用に基づく抗悪性腫瘍活性が認められ、非リンパ性白血病の治療薬として臨床応用されている。Bestatin は微生物起源の阻害物質として臨床応用された治療薬の第一号である。上記阻害物質の構造、阻害機構並びに免疫活性は Fig. 4 及び Table 2, 3 に示す。¹⁻¹⁰⁾

ジペプチジルペプチダーゼ (DPP)-I, DPP-II, DPP-III 及び DPP-IV (CD26) に対する阻害物質として, Dioctatin, Fluostatins 及び Diprotins などを見い出した。自己免疫疾患における DPP 及びその阻害物質の役割の解明は興味のある課題である。上記阻害物質の構造、阻害機構並びに免疫作用は、Fig. 5 及び Table 3, 4 に示す。⁷⁻¹⁰⁾

一方、カルボキシペプチダーゼ (CP) は metallo-CP と serine-CP に分けられている。Metallo-CP に属する CP-A, CP-B, CP-H, CP-N 及びアンジオテンシン変換酵素 (ACE) などに対する阻害物質として, Benzylmalic acid, Histargin, Foroxymithine など、また serine-CP に属する CP-Y, 血小板デアミナーゼなどに対する阻害物質として Piperastatins,⁴⁰⁾ Belactins,⁴¹⁾ Ebelactones などを見い出した。上記 2 群の酵素に対する阻害物質は極めて高い特異性を有し、分子種を明らかにするとともに生体内 CP の役割解明に貢献している。

ジペプチジルカルボキシペプチダーゼの阻害物質として、レニン・アンジオテンシン系の鍵酵素である ACE の阻害物質として Histargin 及び Foroxymithin などを見い出した。ACE 阻害

Fig. 4. Structure of Aminopeptidase Inhibitors

Table 2. Kinetic Constants of Amino-peptidase Inhibitors

Inhibitor	Enzyme	Substrate	K_m ($\times 10^{-4}$ M)	K_i ($\times 10^{-7}$ M)	Type of inhibitor
Amastatin	AP-A	Glu·NA ^{c)}	8.0	2.5	Competitive
Amastatin	Leu-AP	Leu·NA	37.0	16.0	Competitive
Bestatin	AP-B	Arg·NA	1.0	0.6	Competitive
Bestatin	Leu-AP	Leu·NA	5.8	0.2	Competitive
Arphamenine A	AP-B	Arg·NA	1.0	0.025	Competitive
Arphamenine B	AP-B	Arg·NA	1.0	0.008	Competitive
Ile-Arg	AP-B	Arg·NA	1.0	5.0	Competitive
Val-Arg	AP-B	Arg·NA	1.0	21.0	Competitive
Actinonin	AP-N(M)	Leu·NA	0.8	1.7	Competitive
Probestin	AP-N(M)	Leu·NA	0.8	0.19	Competitive
Leuhistin	AP-N(M)	Leu·NA	0.8	2.3	Competitive
Hydrostatin A	Leu-AP	Leu·NA	13.0	4.0	Competitive
Hydrostatin B	Leu-AP	Leu·NA	13.0	20.0	Competitive
AHPA-Val-Phe ^{a)}	AP-N	Leu·NA	0.8	0.295	Competitive
Pyrizinoastatin	PG-peptidase ^{b)}	PyrGlu·NA	0.33	—	Non competitive
Benarthin	PG-peptidase	PyrGlu·NA	0.33	12.0	Competitive
Formestin A	fMet-AP	fMet·NA	2.0	0.39	Competitive
Formestin B	fMet-AP	fMet·NA	2.0	1.23	Competitive
Ebelactone A	fMet-AP	fMet·NA	2.0	1.73	Non competitive
Ebelactone B	fMet-AP	fMet·NA	2.0	0.63	Non competitive

a) (2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-L-valyl-L-phenylalanine, b) pyroglutamyl peptidase, c) L-glutamic acid β -naphthylamide.

Table 3. Immunological Effect of Low-Molecular-Weight Inhibitors

Inhibitor	Immunity	Inhibitor	Immunity
Amastatin	Humoral $\uparrow$	Diprotin A	Cellular $\uparrow$
Bestatin	Cellular $\uparrow$	Diprotin B	Cellular $\uparrow$
Arphamenine A	Cellular $\uparrow$	Benzylmalic acid	Cellular $\uparrow$
Arphamenine B	Cellular $\uparrow$	Histargin	Cellular $\uparrow$
Formestin A	Cellular $\uparrow$	Foroxymithine	Cellular $\uparrow$
Formestin B	Cellular $\uparrow$	EDDS	Cellular $\downarrow$
Actinonin	Cellular $\uparrow$	Forphenicine	Cellular $\uparrow$
Probestin	Humoral $\uparrow$	Esterastin	Cellular $\downarrow$
Prostatin	Humoral $\uparrow$	Ebelactone A	Cellular $\uparrow$
Leuhistin	Cellular $\uparrow$	Ebelactone B	Cellular $\uparrow$
Benadrostin	Humoral $\uparrow$	Plipastatin A ₁	Cellular $\downarrow$
Diocastin A	Cellular $\uparrow$	Plipastatin B ₁	Cellular $\downarrow$
Diocastin B	Cellular $\uparrow$	Cyclooctatin	Cellular $\downarrow$

EDDS; (s,s)-N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid

Fig. 5. Structure of Dipeptidylpeptidase Inhibitors

Table 4. Kinetic Constants of Dipeptidylpeptidase, Carboxypeptidase and Esterase Inhibitors

Inhibitor	Enzyme	Substrate	K_m ($\times 10^{-4}$ M)	K_i ($\times 10^{-7}$ M)	Type of inhibition
DCA ^{a)}	DPP-I ^{b)}	Gly-Arg·NA ^{e)}	8.0	42.0	Competitive
Epostatins	DPP-II	Lys-Ala·NA	14.3	14.4	Competitive
Fluostatin A	DPP-III	Arg-Arg·NA	0.6	6.59	Mixed type
Fluostatin A	DPP-III	Leu-enkephalin	0.1	142.0	Competitive
Diprotin A	DPP-IV	Gly-Pro·NA	4.0	22.0	Competitive
Diprotin B	DPP-IV	Gly-Pro·NA	4.0	76.0	Competitive
(S)- α -Benzylmalic acid	CP-A ^{c)}	Hip-Phe ^{f)}	10.0	6.7	Competitive
Histargin	CP-B	Hip-Lys	62.0	320.0	Competitive
Foroxymithin	ACE ^{d)}	His-His-Leu	0.5	—	Uncompetitive
Piperastatin A	CP-Y	Bz-Gly-Phe	20.0	0.43	Competitive
Forphenicine	Alkaline phosphatase	NPP ^{g)}	4.6	—	Uncompetitive
Esterastin	Esterase (pancreas)	NPA ^{h)}	4.0	0.002	Competitive
Ebelactone A	Esterase (liver)	NPA	6.7	0.92	Competitive
Ebelactone B	Esterase (liver)	NPA	6.7	0.005	Competitive

a) 2,3-Dicarboxyaziridine, b) dipeptidylpeptidase I, c) carboxypeptidase A, d) angiotensin-converting enzyme, e) glycyl-L-arginine β -naphthylamide, f) hippuryl-L-phenylalanine, g) *p*-nitrophenyl phosphate, h) *p*-nitrophenyl acetate.

物質は酵素阻害物質研究の1つのエポックとして取り上げることができる。ACEの関与により生成されるブラジキニンとアンジオテンシンの形成と分解はFig. 6に示す。CP-AとACEはZn²⁺を含む酵素でCP-Aは最も詳しく研究された酵素の1つである。

CP-Aの活性部位からACEの活性中心を推定し、ACE阻害剤のドラッグデザインを試みた

Fig. 6. Formation and Degradation of Bradykinin and Angiotensin II

Fig. 7. Structure of Metallo-Carboxypeptidase Inhibitors

ことはまことに賢明であった。膨大な研究の結果、1日1回の経口投与で血圧をコントロールすることが可能な薬剤が開発され、治療薬としての目的が達せられたと思われる。ドラッグデザインの典型的な成功例である。上記阻害物質の構造、阻害活性並びに免疫活性は Fig. 7, 8 及び Table 3, 4, 5 に示す。^{7-10, 24-28)}

IV. 糖鎖関連酵素阻害物質

細胞表面に存在する糖蛋白質や糖脂質の糖鎖は細胞間の認識、情報伝達や細胞の分化などに重要な役割を果たし、細胞の相互認識、細胞表面抗原、ウイルス感染、癌転移、免疫などと深い関係を有する。また、多くのエクトエンザイムが CD 抗原 (cluster of differentiation antigen) として分類され、エクトエンザイム及びその阻害物質の役割が細胞機能を理解する鍵として注

Fig. 8. Structure of Serine-Carboxypeptidase Inhibitors

Table 5. Inhibitory Activities of Various Inhibitors on Metallo- and Serine-Carboxypeptidases

Inhibitor	IC ₅₀ (μg/ml)						ACE
	Metallo-Carboxypeptidase			Serine-Carboxypeptidase			
	CP-A	CP-B	CP-N	CP-W	CP-Y	Deaminase	
Benzylmalic acid	0.4	10	>100	>100	>100	>100	>100
Arphamenine A	90	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Arphamenine B	5.2	>100	75	>100	>100	>100	>100
Histargin	>100	17	6.0	>100	>100	>100	1.6
Foroxymithin	>100	>100	>100	>100	>100	>100	7.0
Piperastatin A	>100	>100	>100	>100	0.052	8.4	>100
Belactin A	>100	>100	>100	27.5	0.18	>100	>100
Belactin B	>100	>100	>100	>100	0.65	>100	>100
Esterastin	>100	>100	>100	1.6	0.05	1.7	>100
Ebelactone A	>100	>100	>100	3.8	0.05	>100	>100
Ebelactone B	>100	>100	>100	0.2	0.002	2.2	>100
Poststatin	>100	>100	>100	>100	>100	2.9	>100
Chymostatin	>100	>100	>100	>100	5.0	>100	>100

CP-A, bovine pancreas; CP-B, hog pancreas; CP-N, human serum; CP-W, wheat; CP-Y, human platelet; ACE, rabbit lung.

目されている。この視点から糖蛋白質あるいは糖脂質に作用するグリコシダーゼ，トランスフェラーゼ並びにそれらの阻害物質の役割を理解することは，疾病の機序を明らかにするとともに，治療へのアプローチを可能にすることが期待される。

糖鎖関連酵素，すなわち，シアリダーゼ，グリコシダーゼ，ガラクトシダーゼ，マンノシダーゼ，*N*-Ac-グルコサミニダーゼなどを標的酵素として，Sia-statins, Pyridindolol, Mannostatins, Nagstatins,⁴²⁾ Pyrostatins^{5,10,43)} など，多くの阻害物質を見出した。上記阻害物質の阻害機構から，グリコシダーゼの分子種が明らかになった。阻害物質の構造並びに阻害活性は Fig. 9, Table 6 に示す。^{7-10,34-39)}

Fig. 9. Structure of Glycosidase Inhibitors

Table 6. Inhibitory Activities of Various Inhibitors on Glycosidases

Inhibitor	IC ₅₀ (μg/ml)			
	Sialidase ^{a)}	β-D-Galactosidase ^{b)}	α-D-Mannosidase ^{c)}	N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase ^{d)}
Siastatin B	3.0	>100	>100	>100
Pyridindolol	>100	1.8	>100	>100
Mannostatin A	>100	>100	0.02	>100
Mannostatin B	>100	>100	0.02	>100
Nagstatin	>100	>100	>100	0.002
Pyrostatin A	>100	>100	>100	0.45
Pyrostatin B	>100	>100	>100	0.82

a) *Cl. perfringens*, b) bovine liver, c) rat epididymis, d) hog kidney.

V. 脂質関連酵素阻害物質

コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) レダクターゼはメバロン酸合成に必須な酵素である。この HMG-CoA レダクターゼ阻害物質として Compactin, Mevinolin などが報告されている。これらの阻害物質をリード化合物として膨大な化合物が合成され、この中のいくつかは高脂血症及び高コレステロールによる動脈硬化症などの治療薬として繁用されている。また、スクワレンエポキシダーゼ阻害物質の探索及び合成研究が活発に行われ、抗高脂血症薬の開発が盛んである。さらに、食欲や脂肪の代謝に関与する肥満遺伝子が発見され、この遺伝子の変異が話題になっている。この遺伝子が作り出すタンパクの「やせ薬」的効能が注目されている。

一方、リパーゼ、ホスホリパーゼ (PL), リゾホスホリパーゼ (lyso-PL) などに対する阻害物質として Esterastin, Ebelactones, Plipastatins,⁴⁴⁾ Cyclooctatins⁴⁵⁾ などを見出した。¹⁰⁾

Esterastin 及び Ebelactones A と B はエステラーゼ、リパーゼに強い阻害活性を示す。Ebelactone B はホルミルメチオニンアミノペプチダーゼにも阻害活性を示す。また、Plipastatin は

Plipastatins (PL-A2, C, D)

Plipastatins (MW)

R

[X]

A1 (1462): 3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid

D-Ala

A2 (1476): 14-(S)-methyl-3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid

D-Ala

B1 (1490): 3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid

D-Val

B2 (1504): 14-(S)-methyl-3-(R)-hydroxy hexadecanoic acid

D-Val

EDDS (292): (S,S)-N,N'-Ethylenediaminedisuccinic Acid
(PL-C, D and ACE)

Fig. 10. Structure of Phospholipase Inhibitors

Fig. 11. Structure of Alkaline Phosphatase Inhibitors

PL-A2, PL-C, PL-D と ACE を阻害する.¹⁰⁾ さらに Cyclooctatin は lyso-PL を強く, PL-A2 と PL-C を弱く阻害する. 一方, Ebelactone B は脂肪負荷 1 時間前に投与した時, 血清グリセリド及び血清総コレステロールの減少が認められ, 高脂血症及び肥満防止作用が示唆されている.⁴⁶⁾ Plipastatins, EDDS の構造は Fig. 10 に示す. Esterastin, Ebelactones, Plipastatins, Cyclooctatins の免疫活性は Table 3 に示す.

VI. その他の酵素阻害物質

病因解明に対する生化学的研究の進歩に伴い, 酵素阻害物質の研究も日進月歩の感を呈し, 枚挙に暇なしの現状である.

1. ホスファターゼ・キナーゼ阻害物質 骨疾患, ペーチェット病, 胆道などの諸疾患に関与するアルカリ性ホスファターゼを標的酵素として, Fig. 11 に示す Forphenicine, Alphostatin⁴⁷⁾ を見い出した. Forphenicine の免疫活性は Table 3 に示す.

一方, 癌, 高血圧症, 喘息, 糖尿病などの諸疾患時に変動する cAMP ホスホジエステラーゼ, また, 癌遺伝子, 抑制遺伝子に関し, チロシンキナーゼ, プロテインキナーゼを含む多くの研究が報告され, さらに染色体末端部のテロメアと老化度などの問題に熱い視線が注がれている.

2. **グルタチオン S-トランスフェラーゼ阻害物質** 抗癌剤耐性腫瘍細胞の耐性機構に関与し、またロイコトリエン C4 合成酵素として炎症、アレルギー反応に関与するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) に対する阻害物質を探索し、Fig. 12 に示す化合物を見出した。基

Fig. 12. Structure of Glutathione Transferase Inhibitors

Table 7. Inhibitory Activities of Various Inhibitors on Glutathione Transferase Inhibitors

Enzymes	Substrates	IC ₅₀ (μg/ml)						
		Benastatins				Bequinostatins		Ethacrynic acid
		A	B	C	D	A	B	
Partially purified GST ^{a)}	DCNB ^{b)}	2.50	0.92	>100	>100	1.40	>100	0.95
Partially purified GST	CDNB ^{c)}	2.20	0.50	24.00	65.00	4.60	15.00	1.15
GST π	CDNB	1.25	1.10	0.16	0.70	0.60	100	0.35

a) Partially purified from rat liver, *b)* 3,4-dichloronitrobenzene, *c)* 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.

Immunopotential- - - - -	Ac, Am, Ar(A,B), Bm, Bs, Do, Dp(A,B), Es, Eb(A,B), Fl, Fm, Fn, Fo, Hs, Pi, Po, Pr
Fertilization- - - - -	Ap, Cs, Lp-
Analgesic action- - - - -	Ac, Am, Ar(A,B), Bs
Inflammation- - - - -	Ap, Cs, El, Es, Fm, Lp, Ph, Ps
Ascites and pleural fluid - -	Ps
Burn - - - - -	Lp
Pancreatitis - - - - -	Lp
Hypertension - - - - -	Bs, Fo, Hs, Pi, Ps
Malignant diseases- - - - -	Bs, Fl, Fn
Hyperlipemia- - - - -	Eb
Thrombosis- - - - -	Eb, Pi
Autoimmune diseases - - - -	Be, Po
Alzheimer's disease - - - - -	Po

Am: amastatin, Ac: actinonin, Ap: antipain, Ar: arphamenine, Be: benastatin, Bm: benzylmalic acid, Bs: bestatin, Cs: chymostatin, Do: dioctatin, Dp: diprotrin, Eb: ebelactone, El: elastatinal, Es: esterastin, Fl: forphenicicol, Fn: forphenicine, Fm: formestrin, Fo: foroxymithine, Lp: leupeptin, Hs: histargin, Ph: phosphoramidon, Pi: piperastatin, Po: postastatin, Pr: probestatin, Ps: pepstatin

Fig. 13. Biological and Therapeutic Effects of Enzyme Inhibitors

本骨格が benzo[α]naphthacene である化合物を Benastatin,⁴⁸⁾ benzo[α]naphthacenequinone である化合物を Bequinostatin⁴⁹⁾ と命名した。また GST の新規阻害物質として Cysfluoretin⁵⁰⁾ を見出した。上記阻害物質の各種 GST に対する阻害活性から GST の分子種が明らかになった。阻害物質の構造並びに阻害活性は Fig. 12 と Table 7 に示す。

3. その他 ピログルタミルペプチダーゼ阻害物質として Pyridinostatin⁵¹⁾ 及び Benarthin⁵²⁾ を見出した。また, poly(ADP-ribose) 合成酵素阻害物質として Benadrostin⁵³⁾ 及び 2-methyl-4[3H]quinazolinone⁵⁴⁾ などを発見した。

上述の阻害物質は現在広範囲の基礎研究が行われているが、それぞれの阻害物質の薬理活性についてはその要約を Fig. 13 に示す。

おわりに

微生物代謝産物から得られた低分子酵素阻害物質は酵素の反応機構の解析に、またアフィニティクロマトグラフィーの活性基として、あるいは複雑な生体反応に関与する酵素を識別するとともに病因を明らかにし、医学、薬学、生化学、生物学、遺伝子工学などの広範囲の領域で汎用されている。さらに治療薬になりうることから多くの研究者の注目を集め、合成研究者との協同で膨大な研究が進行中である。

日本で生まれ、そして育った酵素阻害物質の研究は多くの研究者の関心をよび、この分野の急速な発展を導き、生命科学の進歩に貢献しつつあることは望外の喜びである。

謝辞 終始慈愛に満ちた御指導、御鞭撻をいただいた恩師微生物化学研究所所長 故梅沢浜夫先生並びに東京大学名誉教授 水野伝一先生に心より感謝申し上げます。

本研究を施行するにあたり、御懇篤な御鞭撻を戴いた微生物化学研究所所長 竹内富雄先生、また、御指導、御協力を戴いた研究所の諸先生方に深く御礼申し上げます。

さらに、本研究の続行にあたり温かい御厚情と御鞭撻を賜った昭和薬科大学の諸先生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Umezawa H., "Enzyme Inhibitors of Microbial Origin," University of Tokyo Press, Tokyo, 1972, pp. 1—114.
- 2) Aoyagi T., Umezawa H., "Proteases and Biological Control," ed. by Reich E., Riffkin D. B., Show E., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1975, pp. 429—454.
- 3) Aoyagi T., "Bioactive Peptides Produced by Microorganisms," ed. by Umezawa H., Takita T., Shiba T., Kodansha, Tokyo & Wiley, New York, 1978, pp. 129—151.
- 4) Umezawa H., "Methods in Enzymology," vol. 45, ed. by Lorand L., Academic Press, New York, 1978, Chap. 55.
- 5) 青柳高明, "酵素阻害物質," 共立全書 224, 共立出版, 東京, 1978, pp. 1—189.
- 6) 青柳高明, 代謝 (癌 '81), **18**, 879—889 (1981).
- 7) Aoyagi T., Ichikawa T., Maeda K., Mitscher L. A., "Japan, Antibiotics Research, Horizons on Antibiotic Research," ed. by Davis B. D., Association, Tokyo, 1987, pp. 149—165.
- 8) Aoyagi T., "Intracellular Proteolysis-Mechanisms and Regulations," ed. by Katsunuma N., Kominami E., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1989, pp. 377—383.
- 9) Aoyagi T., "Biochemistry of Peptide Antibiotics," ed. by Kleinkauf H., Dohrem H., Walter

- de Gruyter, Berlin, New York, 1990, pp. 311—363.
- 10) 青柳高明, 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 1891 (1993).
 - 11) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Umezawa H., *J. Clin. Invest.*, **67**, 51 (1981).
 - 12) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Miyoshino S., Umezawa H., *Clin. Chim. Acta*, **129**, 165 (1983).
 - 13) Aoyagi T., Wada T., Yamamoto K., Kojima F., Nagai M., Umezawa H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 312 (1984).
 - 14) Aoyagi T., Wada T., Ohuchi S., Kojima F., Nagai M., Harada S., Umezawa H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 681 (1984).
 - 15) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Umezawa H., *Biotech. Appl. Biochem.*, **9**, 355 (1987).
 - 16) 青柳高明, “筋ジストロフィー治療のチャレンジ—蛋白分解酵素阻害剤—” 厚生省新薬開発研究編, 東京, 1991, pp. 51—62.
 - 17) Aoyagi T., Wada T., Ishikawa Y., Kojima F., Nagai M., Osanai T., Nagai Y., Umezawa H., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **6**, 963 (1983).
 - 18) Aoyagi T., Wada T., Nagai M., Sakaguchi H., Osanai T., Nagai Y., Umezawa H., *Experientia*, **40**, 1405 (1984).
 - 19) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Okubo M., Masaki Y., Umezawa H., *J. Appl. Biochem.*, **7**, 273 (1985).
 - 20) Aoyagi T., Wada T., Daskalov H. P., Kojima F., Nagai M., Harada S., Fujiwara M., Makino M., Umezawa H., *Biochem. Int.*, **14**, 435 (1987).
 - 21) 青柳高明, *Dementia*, **5**, 199 (1991).
 - 22) 青柳高明, 和田孝雄, 小林 悟, 広川勝ゆき, 積田 亨, 一瀬邦弘, 浜本 真, “老人性痴呆に関する総合的研究,” 東京都老人総合研究所編, 1992, pp. 38—49.
 - 23) Aoyagi T., Osanai T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takeuchi T., Nagai Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1958 (1992).
 - 24) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Harada S., Hachisu M., Murata S., Umezawa H., *Biotech. Appl. Biochem.*, **8**, 32 (1986).
 - 25) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Hachisu M., Murata S., Umezawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4852 (1986).
 - 26) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takeuchi T., Tsunoda K., Abe K., Yoshinaga K., *Biotech. & Appl. Biochem.*, **12**, 258 (1990).
 - 27) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takeuchi T., Tsunoda K., Abe K., Yoshinaga K., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **9**, 269 (1990).
 - 28) Aoyagi T., Wada T., Nagai M., Kojima F., Harada S., Takeuchi T., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **10**, 35 (1991).
 - 29) Aoyagi T., Wada T., Nagai M., Kojima F., Harada S., Takeuchi T., Takahashi H., Hirokawa K., Tsumita T., *Experientia*, **46**, 95 (1990).
 - 30) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takeuchi T., Takahashi H., Hirokawa K., Tsumita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1748 (1990).
 - 31) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takahashi H., Hirokawa K., *Chem.*

- Pharm. Bull.*, **38**, 1750 (1990).
- 32) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takeuchi T., Isse K., Ogura M., Hamamoto M., Tanaka K., Nagao T., *Experientia*, **48**, 656 (1992).
 - 33) Aoyagi T., Wada T., Kojima F., Nagai M., Harada S., Takeuchi T., Isse K., Ogura M., Hamamoto M., Tanaka K., Nagao T., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **14**, 133 (1993).
 - 34) Kalckar H. M., *Science*, **150**, 305 (1965).
 - 35) Aoyagi T., Suzuki J., Nerome K., Nishizawa R., Takeuchi T., Umezawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **57**, 271 (1974).
 - 36) Aoyagi T., Nerome K., Suzuki J., Takeuchi T., Umezawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **60**, 1178 (1974).
 - 37) Aoyagi T., Komiyama T., Nerome K., Takeuchi T., Umezawa H., *Experientia*, **31**, 896 (1975).
 - 38) Aoyagi T., Suda H., Nagai M., Ogawa K., Suzuki J., Takeuchi T., Umezawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 131 (1976).
 - 39) Aoyagi T., Nagai M., Iwabuchi M., Liaw W. S., Andoh T., Umezawa H., *Cancer Res.*, **38**, 3505 (1978).
 - 40) Murakami S., Harada S., Yamazaki T., Takahashi Y., Hamada M., Takeuchi T., Aoyagi T., *J. Enz. Inhibition*, **10**, 93 (1996).
 - 41) Murakami S., Harada S., Kojima F., Kinoshita N., Takahashi Y., Hamada M., Takeuchi T., Aoyagi T., *J. Enz. Inhibition*, **9**, 263 (1995).
 - 42) Aoyagi T., Suda H., Uotani K., Kojima F., Aoyama T., Horiguchi K., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **45**, 1404 (1992).
 - 43) Aoyama T., Kojima F., Imada C., Muraoka Y., Naganawa H., Okami Y., Takeuchi T., Aoyagi T., *J. Enz. Inhibition*, **8**, 223 (1995).
 - 44) Umezawa H., Aoyagi T., Nishikiori T., Okuyama A., Yamagishi Y., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **39**, 737 (1986).
 - 45) Aoyagi T., Aoyama T., Kojima F., Hattori S., Honma Y., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **45**, 1587 (1992).
 - 46) Nonaka Y., Ohtaki H., Ohtsuka E., Kocha T., Fukuda T., Takeuchi T., Aoyagi T., *J. Enz. Inhibition*, **10**, 57 (1995).
 - 47) Aoyagi T., Morishima H., Kojiri K., Yamamoto T., Kojima F., Nagaoka K., Hamada M., Takeuchi T., Umezawa H., *J. Antibiot.*, **42**, 486 (1989).
 - 48) Aoyagi T., Aoyama T., Kojima F., Matsuda N., Maruyama M., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **45**, 1385 (1992).
 - 49) Aoyama T., Kojima F., Abe F., Muraoka Y., Naganawa H., Takeuchi T., Aoyagi T., *J. Antibiot.*, **46**, 914 (1993).
 - 50) Aoyama T., Zhao W., Kojima F., Muraoka Y., Naganawa H., Takeuchi T., Aoyagi T., *J. Antibiot.*, **46**, 1471 (1993).
 - 51) Aoyagi T., Hatsu M., Imada C., Naganawa H., Okami Y., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **45**, 1795 (1992).
 - 52) Aoyagi T., Hatsu M., Kojima F., Hayashi C., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **45**, 1079

(1992).

- 53) Aoyagi T., Yoshida S., Harada S., Okuyama A., Nakayama C., Yoshida T., Hamada M., Takeuchi T., Umezawa H., *J. Antibiot.*, **41**, 1009 (1988).
- 54) Yoshida S., Aoyagi T., Harada S., Matsuda N., Ikeda T., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiot.*, **44**, 111 (1991).