癌遺伝子作用を抑制する微生物二次代謝産物

梅 澤 一 夫*

Microbial Secondary Metabolites Inhibiting Oncogene Functions

Kazuo UMEZAWA*

Streptomyces and other microorganisms produce antibiotics, anticancer agents and enzyme inhibitors as secondary metabolites. Microorganisms are a treasury of organic compounds which have various structures and biological activities. Therefore, isolation of the specific bioactive products in culture broths is dependent upon the testing method. Since oncogene theory has been extensively developed, we have screened oncogene function inhibitors as a new group of microbial secondary metabolites. Oncogene functions include acting as a modified growth factor receptor (erb B, erb B2 fms), acting as a growth factor itself (sis, hst), the tyrosine kinase activity (src oncogene group), and acting as a G protein to activate phosphatidylinositol turnover (ras).

Erbstatin is an inhibitor of erb B, erb B2 and src products-associated tyrosine kinase. In cell culture it inhibited EGF receptor internalization, delayed the onset of EGF-induced DNA synthesis in quiescent cells, and induced normal phenotypes in src oncogene expressing cells. It inhibited the growth of human breast and esophageal carcinomas in nude mice. Lavendustin A was isolated from *Streptomyces* as a potent inhibitor of tyrosine kinase. It is a novel compound and about 50 times stronger than erbstatin in *in vitro* inhibition of tyrosine kinase. Many oncogenes including ras, src, sis, fms, and fes are considered to activate cellular phosphatidylinositol turnover. We have isolated psi-tectorigenin, inostamycin and piericidin B₁ N-oxide as inhibitors of inositol incorporation into phospholipids. Thus, various inhibitors of oncogene functions including novel structures have been discovered in microbial secondary metabolites. They are useful for the dynamic study of oncogenes.

Key words : Oncogene ; *Streptomyces* ; Synthesis ; Enzyme inhibitor ; Tyrosine kinase ; Phosphatidylinositol turnover ; Erbstatin.

はじめに

癌は体内のひとつの細胞が増殖調節機能を失い、転移能を持つ細胞に変化することで発生する。癌細胞発生の原因として環境の化学発癌物質、放射線、癌ウイルス等が考えられてきたが、近年まで癌発生の機構は系統的に説明できなかった。それがヒト癌組織に癌遺伝子が存在する場合があることがわかって、癌発生の機構は一部にしても系統的な説明ができるようになった。発癌物質やウイルスは正常細胞の一部の遺伝子を活性化して癌遺伝子を誕生させ、癌細胞が発生するというものである。た

だ、癌の発生や進行に癌遺伝子がどれほど重要なのかは未だ残された問題である。そして癌遺伝子の働きにも未知の点が多く残されている。

一方、現在化学療法で使われる抗癌剤はほとんどがDNA合成、RNA合成、細胞分裂のどれかを阻害して細胞を殺す。正常細胞、癌細胞の選択性は増殖速度の差等にたよるが、あまり高いものではなく、副作用を生ずる。より選択性の高い、今までの抗癌物質と作用機構の異なる抗癌化学療法が望まれている。

癌遺伝子の作用を阻害する物質を探索し、機構解明に使用する研究は上記の二つの問題の両方に関与する。私達は主に微生物二次代謝産物から阻害物質を単離している。ここでは微生物二次代謝産物と癌遺伝子について概要を述べ、次に阻害物質のスクリーニング、構造、合成、生物活性をまとめてみた。

* 慶応義塾大学理工学部応用化学学科 ()

* Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University ()

1. 微生物二次代謝産物

約 60 年前に Flemming は青かび培養液に抗菌活性があることを発見し、活性物質をペニシリンと名付けた。その後、Florey, Chain, Abraham, Heatley は青かび培養液からペニシリンを抽出、精製し、動物実験で抗菌活性を確認して、臨床使用に成功した。ペニシリンは Woodward, Hodgekin らに構造決定され、Sheehan により合成された。Abraham はさらに微生物からセファロスポリンを発見し、この一連の化合物が現在最も広く使われる抗生物質になっている。一方、Waxman は土壌の放線菌から結核に効くストレプトマイシンを発見し、こちらはアミノグリコシド抗生物質としてカナマイシン、アミカシンに発展し、広く使用されている。その他、各地で微生物の生産する抗菌物質（抗生物質）が発見された。また、アンストラサイクリン類、プレオマイシン、マイトマイシン等は土壌の放線菌から抗癌物質として発見された。

一方、1960 年代から抗菌活性を酵素活性にかえて、抗生物質のスクリーニングと同じ方法で微生物から酵素阻害物質が単離されるようになった。初期にはロイペプチン、ペプスタチン等のプロテアーゼやフザリン酸など神経伝達物質代謝酵素の阻害物質が放線菌から得られた。これらは生化学研究に広く用いられるほか、アフィニティカラムのリガンドとしても使用されている。コンパクチンは HMG-CoA 還元酵素の阻害物質として放線菌から単離され、関連物質はコレステロール降下剤として臨床使用されている。

このように放線菌など微生物から多くの生理活性物質が単離されてきた。これらの生理活性物質は低分子で、多彩な構造を持ち、菌自身の生育には不必要な二次代謝産物である。以前、微生物から抗生物質のみが得られていた頃、抗生物質は他種菌株の増殖を抑制して、生存競争に勝つためと考えられたが、多くの酵素阻害物質は抗菌力がないのでこの説は当たっていないかもしれない。放線菌等は進化の過程の一時期に多くの不必要な遺伝子を残したままできていると考えられる。いずれにしても微生物は、二次代謝産物として歴史的に多様な構造の生理活性物質を生産することがわかっており、スクリーニングの方法を工夫すれば、癌遺伝子産物活性の阻害など新しい生理活性物質の源泉として最適である。

2. 癌遺伝子の発生と作用

癌遺伝子とは正常細胞を癌化する遺伝子である。正常細胞の遺伝子に新たに遺伝子が加わるか、既存の遺伝子

が変化して正常細胞が癌細胞に変わった場合、この加わった遺伝子や変化した遺伝子を癌遺伝子と呼ぶことができる。

動物や動物細胞を癌化する能力のある癌ウイルスには癌遺伝子を持っているものがある。例えばラウス肉腫ウイルスは 4 つの遺伝子で構成されているがそのひとつが src と呼ばれる癌遺伝子で、この部分が細胞の遺伝子の中に入り込んで癌化を引き起こす。このようなウイルスの癌遺伝子(v-onc)は多数発見されている。

一方、ヒト癌組織からも癌遺伝子が発見された。Weinberg はヒト膀胱癌組織の癌細胞を培養し、そこから DNA を抽出して、制限酵素で短いフラグメントを調製した。このフラグメントをリン酸カルシウムで処理して膜透過性を高めた正常マウス線維芽細胞に加えたところ、一部の細胞が癌化することがわかった。正常組織から調製した DNA では癌化はみられなかった。さらに癌化したマウスの細胞から DNA を取り出し、ヒト DNA に特異的な AluI 配列を目印に、加わった DNA 部分を探し出し、配列を調べたところ、既に知られていたウイルス性癌遺伝子 v-ras とホモロジーがあることがわかった。ヒト癌組織がウイルス性癌遺伝子とよく似ている DNA を持っていたのである。この ras 癌遺伝子は大腸癌、乳癌、白血病からも見い出され、ヒト癌組織全体の 20% 位に存在するといわれる。

現在の遺伝子操作技術を用いるとホモロジーのある配列は比較的簡単に探し出すことができる。この ras 癌遺伝子とよく似ている DNA の配列は正常細胞にも存在することがわかった。正常細胞には ras 以外の癌遺伝子にもホモロジーのある遺伝子が存在する。これらの遺伝子をプロト癌遺伝子(proto-onc)または細胞性癌遺伝子(c-onc)と呼んでいる。ras は分子量 21,000 で約 200 のアミノ酸からなる蛋白質をコードするが、ras と proto-ras の産物のアミノ酸配列のちがいは、ひとつだけの場合が多い。DNA 上ではプロト癌遺伝子の塩基ひとつの突然変異で癌遺伝子が誕生することになる。このようにプロト癌遺伝子が癌遺伝子に変わることを活性化という。活性化の機構には、突然変異、遺伝子コピーの増幅、遺伝子の再構成などがある。化学発癌物質、放射線、癌ウイルスはこのプロト癌遺伝子の活性化を行うという考え方もある。

現在、約 70 の癌遺伝子が知られており、それぞれ異なった蛋白質産物をコードしている。癌遺伝子産物の細胞内局在(図 1)、一次構造の既知蛋白質との比較、酵素活性などから作用機構が一部推察できるようになった。

ras の産物は GTP との結合が活性に必要なこと、分

Fig. 1 Intracellular localization of oncogene products.

量, アミノ酸配列, 細胞膜内側に局在することから G 蛋白質のひとつとわかった。G 蛋白質は細胞内情報伝達機構に関与し, イノシトールリン脂質代謝回転(PI turnover)やサイクリックヌクレオチドのレベルを調節する。sis の産物は細胞の増殖を促進する血小板由来増殖因子と一次構造のホモロジーのあることがわかった。また, hst は塩基性線維芽細胞増殖因子と相同性のある産物をつくる。この二つの増殖因子は細胞膜のレセプターに結合してそのチロシンキナーゼを活性化する。一方, erbB の産物は一次構造が上皮性増殖因子(EGF)のレセプターと一部ホモロジーがある。レセプターの細胞表面に出ている EGF と結合する部分が失われ, チロシンキナーゼの部分を持している。erbB 産物は EGF がなくてもそのチロシンキナーゼが活性化されているレセプターの変型と考えられる。fms はコロニー刺激因子のレセプターとホモロジーのある蛋白質をつくる。src, yes, ros, abl, fps, などやはりチロシンキナーゼ活性を持ち, 細胞膜内側に存在する蛋白質をコードしている。

以上の癌遺伝子は産物が膜や細胞質に局在するが, fos, jun, myc の産物は核内にある(図1)。これらの産物は特定の遺伝子の転写調節に関与するものと考えられている。

このように癌遺伝子産物の機能が解明されてくるとその阻害物質のスクリーニングが可能になる。なかでもチロシンキナーゼは特に多くの癌遺伝子の作用に必須な酵素活性である。

3. チロシンキナーゼ阻害物質

3.1. スクリーニング法¹⁾ EGF レセプターのチロシンキナーゼは EGF の添加により活性化される。またヒト上皮癌 A 431 細胞は EGF レセプターを過剰発現していることで知られている。この A431 細胞の膜画分をチロシンキナーゼ酵素源として用いた。Mn²⁺ と牛血清ア

Fig. 2 Tyrosine kinase inhibitors.

ルブミンを含む緩衝液(pH 7.4)に A 431 細胞膜, EGF, 基質としてヒストンまたは合成ペプチド, それに検体を添加し, 0°C で 10 分間プレインキュベーションした後, γ-³²P-ATP を添加して 0°C で 30 分間反応させた。0°C で行うのはホスファターゼ活性を抑制するためである。反応は, トリクロロ酢酸(TCA)添加により停止させ, その TCA 不溶性画分の ³²P の放射活性を測定することによりチロシンキナーゼ活性とした。検体として放線菌など微生物培養液を用いチロシンキナーゼ阻害物質の探索を行った。

3.2. アーブスタチン アーブスタチン(図2)は放線菌の生産する, 新規物質として得られたチロシンキナーゼ阻害物質である¹⁾。

アーブスタチンの合成に関して多くの報告があるが, ここでは一色らによる合成を述べる³⁾。彼らは図3に示すように Wittig 反応を用いてイソニトリル体を合成し, 加水分解してアーブスタチンを得た。Shölkopf らの方法に従い, ホルムアミド, ジエチルアミンおよびホルムアルデヒドより 4 工程で得たイソシアノメチルホスホン酸ジエチルと 4-メトキシベンズアルデヒドを THF 中, -78°C で当量のナトリウムビストリメチルシリルアミドの存在下に反応させると, シス-およびトランス-ビニルイソシアニドが約 1:1 の割合で生成する。同様に, 5-ジヒドロキシベンズアルデヒドと 5 倍モル量の上記試薬を用いて, 水酸基を保護することなく反応させるとほとんどトランス体のみを与えた。

次に, このイソニトリル体を窒素置換した容器を用い, 0.1M 塩酸水と酢酸エチルの混合溶媒中で 2 日間激しく攪拌すると目的のアーブスタチンを効率良く得ることができた(全収率 42%)。合成された化合物の物理化学的性状および生物活性は天然のそれと完全に一致した。

アーブスタチンは EGF レセプターのチロシンキナー

Fig. 3 Total synthesis of erbstatin.

に対してヒストンを基質にして $0.55 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 50% 阻害する。蛋白質のセリン、スレオニン残基をリン酸化するプロテインキナーゼ C と A は $100 \mu\text{g/ml}$ で阻害しない。ホスファチジルイノシトール (PI) をリン酸化する PI キナーゼに対しては 50% 阻害濃度が $20 \mu\text{g/ml}$ である。そこでアープスタチンはチロシンキナーゼに高い特異性を示す阻害剤である。またチロシンキナーゼに対するアープスタチンの阻害様式は、リン酸化される基質に対して拮抗的で、ATP に対しては非拮抗阻害であり、 K_i 値は $5.58 \mu\text{M}$ である³⁾。この阻害様式は構造がチロシンに似ていることをあわせ、特異性の高さを予想させる。

一方、培養細胞系でのアープスタチンの活性を検討したところ、A 431 細胞において $15 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ のアープスタチンは EGF のレセプターへの結合を阻害することなく EGF により促進する EGF レセプターのリン酸化を阻害した⁴⁾。また温度感受性の src 遺伝子を導入したラット腎細胞 (RSV^{ts}-NRK 細胞) の許容温度下での src 産物のリン酸化をも阻害した。このことからアープスタチンは *in situ* 系でもチロシンキナーゼを阻害することがわかった。

RSV^{ts}-NRK 細胞は許容温度では小さな細い三角形の形態を示す。アープスタチンは添加して数時間でこの癌細胞の形態を丸く平たい正常細胞の形態に変化させた⁵⁾。同時に癌細胞では消失しているアクチンフィラメントの構成を復活させ、フィブロネクチン発現も増加させた。このように src で癌化した細胞の表現型を正常化する役割を示した。また、戸井らにより *in vivo* でヒト上皮性腫瘍 MCF-7 と EH-4 の増殖を抑制することがわかった⁶⁾。

ホスホリパーゼ C は PI turnover に含まれる酵素の一つである。この酵素が増殖因子レセプターのチロシンキナーゼにリン酸化されることが報告されたが、活性調節に関与するかどうかわからなかった。そこで私達はアープ

スタチンを用いて A 431 細胞の EGF によるホスホリパーゼ C の活性化が抑制されるか調べた⁷⁾。その結果、チロシンキナーゼを抑制すると、酵素の活性化が起こらないことがわかった。

一方、アープスタチンは血清や培養液中で分解されやすい。三価鉄イオンと酸素の存在下でアープスタチンは一部 2,5-ジヒドロキシベンズアルデヒドに分解される。そこで血清中で約 4 倍安定で、同等のチロシンキナーゼ阻害活性を持つメチル 2,5-ジヒドロキシシナメート を合成した。この誘導体は EGF による NRK 細胞の S 期誘導⁸⁾ や MCF-7 の *in vivo* 増殖をアープスタチンより効果的に抑制した。

3.3. ゲニステイン 小河原らは緑膿菌から植物性イソフラボノイドとして知られているゲニステイン (図 2) を EGF レセプターチロシンキナーゼ阻害物質として単離した⁹⁾。50% 阻害濃度は A 431 細胞膜の EGF レセプターチロシンキナーゼに対して $0.7 \mu\text{g/ml}$ 、RSV-3Y 1 細胞の src 産物チロシンキナーゼに対して $8.0 \mu\text{g/ml}$ であった。ゲニステインはプロテインキナーゼ C と A を阻害しない。チロシンキナーゼの阻害様式はアープスタチンと異なり、ATP に拮抗、リン酸アクセプター (ヒストン H2B) に非拮抗である。やはりイソフラボノイドのオロボールがチロシンキナーゼ阻害物質として放線菌から得られている¹⁾。ゲニステインもしばしば放線菌から単離される。

3.4. ラベンダスチン 私達はより強力なチロシンキナーゼ阻害物質を求めて合成トリデカペプチド (RRLLIEDAEYAARG) を基質として EGF レセプターチロシンキナーゼの阻害物質を検索した。その結果、放線菌から新規構造で活性が強いラベンダスチン (図 2) を単離した¹⁰⁾。生産菌は *Streptomyces griseolavendus* と同定された。

ラベンダスチンの単離精製は以下のように行った。培養液を酸性で酢酸エチルで抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーを行い活性成分をクロロホルム:メタノール=3:1 で溶出した。さらにメタノール中で LH-20 カラムにかけた後、高速液体クロマトグラフィーにかけ 15% アセトニトリルで活性画分を分画した。この段階では 2 種類のラベンダスチンを含んでおり、調製用シリカゲル TLC を用いてラベンダスチン A およびラベンダスチン B をそれぞれ単離した。この方法で培養液 20 l からラベンダスチン A 42.3 mg, B 29.7 mg が得られた。ラベンダスチン A の構造は、マスおよび NMR スペクトル解析を行ったが、芳香環に対する水酸基の位置が決定せず、最終的に図 4 に示すような全合成により構造が決

Fig. 4 Total synthesis of lavendustin A.

定した。検索の結果新規物質であり生産菌の名前に由来してラベンダスチンAと命名した。ラベンダスチンAはチロシンキナーゼを特異的に阻害し、活性はアープスタチンより50倍強かった。ラベンダスチンBはベンジルの5'水酸基が欠けただけのちがいである。Bの阻害活性はAに比べはるかに弱い。ラベンダスチンAは、おそらく細胞膜透過性に乏しいために *in situ* でチロシンキナーゼを阻害しなかった。分子中のカルボン酸基が極性を与えるためと考えられる。そこでメチルエステル体を合成したところ、培養細胞に生物活性を示すようになった¹¹⁾。しかし *in vitro* の活性がアープスタチンと同程度に低下した。

3.5. ハービマイシン ハービマイシン(図2)は大村らにより1979年に発見された除草作用のあるアンサマイシン構造の抗生物質である¹²⁾。その後上原らは放線菌から RSV^{ts}-NRK 細胞の形態を正常化する物質として再度スクリーンした¹³⁾。ハービマイシン 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を許容温度の細胞に加えると2日間で形態が正常化する。その時フィブロネクチン発現量も増加することがわかった¹⁴⁾。ハービマイシンの作用機構は src 産物の分解を促進すること、およびチロシンキナーゼ活性部位近辺の SH 基に結合して酵素活性を阻害することが考えられている¹⁵⁾。ハービマイシンは、おそらく abl 産物のチロシンキナーゼを阻害して、慢性骨髄性白血病細胞の分化を誘導した¹⁶⁾。

4. ras 癌遺伝子の作用抑制物質

4.1. オキザノシン オキザノシン(図5)は嶋田らにより1981年放線菌から得られた抗菌物質である¹⁷⁾。異常核酸の構造を持ち、抗菌活性はグアニンやグアノシンでアンタゴナイズされる。また、マウス L1210 白血病に対し、弱い抗癌活性も示す。

Fig. 5 Inhibitors of ras oncogene functions.

オキザノシンは温度感受性 Kirsten 肉腫ウイルスで形質転換したラット腎細胞(K-ras^{ts}-NRK 細胞)の癌細胞形態を正常化することが堀らにより見出された¹⁸⁾。2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のオキザノシンを2日間細胞に与えると形態とフィブロネクチンの発現を完全に正常細胞の状態に変化させた。非許容温度の細胞や src を発現している細胞に加えても表現型は変化しない。そこでオキザノシンは ras の作用を特異的に阻害する物質である。

ras 産物の作用発現には GTP との結合が必要である。オキザノシンは細胞内で5'位の水酸基がリン酸化されて IMP デヒドロゲナーゼを阻害するようになる。グアニンヌクレオチドの生合成にはこの酵素活性が必要ことから、オキザノシンは GTP の細胞内濃度を低下させると考えられる。実際、オキザノシン処理により K-ras^{ts}-NRK 細胞内の GMP, GDP, GTP 濃度は6時間後をピークに減少していた。ATP 濃度には変化がなかった。IMP デヒドロゲナーゼ阻害剤として知られるマイコフェノール酸も K-ras^{ts}-NRK 細胞の形態変化を誘導する¹⁸⁾。

4.2. 2-デメチルステフィマイシン D 堀らは K-ras-NRK 細胞の形態を正常化させる物質のスクリーニングで放線菌から新規アンサラサイクリン化合物 2-デメチルステフィマイシン D(図5)を単離した¹⁹⁾。細胞に3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2日間添加すると形態を正常化し、RSV-NRK 細胞には影響を与えない。作用機構はよくわかっていないが、蛋白合成を核酸合成より低い濃度で阻害するため、ras 産物の速い代謝回転を阻害しているのかもしれない。ステフィマイシンやステフィマイシン B, C, D, アクラシノマイシン, ダウノマイシン, アドリアマイシンなど他のアンサラサイクリンは ras 発現細胞の形態変化誘導を示さない。

5. PI turnover 阻害物質

5.1. PI turnover 阻害物質のスクリーニング ras のほか、src, sis, fms, fes などの癌遺伝子は細胞の PI turnover を促進させることが知られている。そこで PI

Fig. 6 PI turnover pathway. PIP, PI monophosphate; PIP₂, PI diphosphate; DG, diacylglycerol; PA, phosphatidic acid; I, inositol; IP₃, inositol triphosphate; 2,3-diOH-BA, 2,3-dihydroxybenzoic acid. Dark square, white arrow, dark arrow and broken line show growth factor receptor, binding, activation and inhibition, respectively.

turnover は癌遺伝子産物の作用のひとつと考えられる。PI turnover の代謝経路を図 6 に示す。PI turnover が活発になるとプロテインキナーゼ C が活性化され、細胞質内の Ca²⁺ 濃度が上がる。

A 431 細胞において、EGF により PI turnover が活性化されるのでこの系を用いて阻害物質のスクリーニングを行った。まず 3×10^6 個の A 431 細胞を播き、翌日イノシトールを含まない培地中で 30 分間 ³H-ミオイノシトールを加えて細胞をラベリングし、微生物培養液および EGF を添加し 60 分間反応を行った。反応は、TCA を添加することにより停止させ、さらに TCA 不溶画分よりクロロホルムおよびメタノールで抽出することにより、脂質層にとりこまれた ³H の放射活性を測定して PI turnover 阻害物質の検索を行った²⁰⁾。

5.2. プシテクトリゲニン 放線菌 *Nocardiosis* から既知イソフラボノイドのプシテクトリゲニン(図 7)を PI turnover 阻害物質として単離した²⁰⁾。プシテクトリゲニンは $1 \mu\text{g/ml}$ で EGF に誘導される PI turnover を 50% 阻害した。一方、*in situ* で $50 \mu\text{g/ml}$ まで EGF レセプターのチロシンキナーゼを阻害しなかった。プシテクトリゲニンの阻害機構として PI turnover の律速酵素であるホスホリパーゼ C への効果を調べたが阻害しなかった。一方、プシテクトリゲニンは A 431 細胞で EGF によるイノシトールリン酸の生成を阻害した。また EGF 処理した A 431 細胞から調製したホスホリパーゼ C は無処理のそれより活性化されているが、プシテクトリゲニン処理した細胞では EGF による活性化がみら

Fig. 7 PI turnover inhibitors. Note that the structure of inostamycin is relative one.

れなかった²¹⁾。このことから、プシテクトリゲニンは EGF によるホスホリパーゼ C の活性化の過程に作用すると考えられる。

5.3. イノスタマイシン 同じアッセイ法で新規ポリエーテル化合物のイノスタマイシン(図 7)が放線菌から単離された²²⁾。

イノスタマイシンは EGF に誘導される A 431 細胞のイノシトールのイノシトールリン脂質への取り込みを $0.5 \mu\text{g/ml}$ で 50% 阻害する。イノスタマイシンは A 431 細胞に ³H-イノシトールと同時に添加した時にのみ EGF で促進する ³H-イノシトールリン酸の生成を阻害した。そこで CDP-DG: イノシトールトランスフェラーゼに

対する効果を調べたところ、*in vitro*で阻害することがわかった。

Ca²⁺を含まない培地で A 431 細胞に EGF を添加すると細胞が約 20 分で丸くなる現象 (rapid rounding) がみられる。イノスタマイシンとプシテクトリゲニンを用いてこの rapid rounding の機構を解析した。その結果、rapid rounding には PI turnover の活性化およびプロテインキナーゼ C が必要なことがわかった²³⁾。

5.4. ペンドールマイシン プシテクトリゲニンを生産する同じ菌株から新規物質ペンドールマイシン (図 7) を単離した²⁴⁾。ペンドールマイシンの構造は発癌プロモーター作用のあるインドールアルカロイドのテレオシジンとリングピアトキシニンに類似している。実際、ペンドールマイシンはテレオシジンと同様に培養細胞でホスホリパーゼ A₂ を活性化したりホルボールエステルのレセプターへの結合を阻害した²⁵⁾。さらに *in vivo* で発癌プロモーター活性も見出された²⁶⁾。A 431 細胞の PI turnover を阻害する機構はペンドールマイシンがプロテインキナーゼ C を活性化して EGF レセプターをリン酸化により不活化するためと考えられる。

ペンドールマイシンは培養液の酢酸エチル抽出物をシリカゲルクロマトグラフィー、Toyopearl HW 40 カラム、逆相 HPLC を通して精製された。36 l の培養プロセスから 8.8 mg のペンドールマイシンが得られた。岡部らはペンドールマイシンの全合成に成功した²⁷⁾。

5.5. ピエリシジン B₁ N-オキシド ピエリシジンは *Streptomyces mobaraensis* や *Streptomyces pactum* から得られる殺虫作用のある物質である。ピエリシジン A は電子伝達系を NADH デヒドロゲナーゼと補酵素 Q の間でブロックすることが知られている。私達は最近、新規構造のピエリシジン B₁ N-オキシド (図 7) を PI turnover 阻害物質として放線菌から単離した²⁸⁾。

単離精製は以下のように行った。培養液を遠心分離法により菌体を分離し、菌体をアセトン抽出した。この抽出液を減圧下で濃縮後、先の遠心上清液と合わせて酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル画分を減圧乾固し、油状物質を得た。この油状物質を、シリカゲルカラムにかけ、クロロホルム-メタノール (10:1) 混合溶液で展開溶出した。濃縮乾固後、残渣を遠心分配クロマトグラフィーにより精製した。溶媒系として、クロロホルム-メタノール-水 (5:6:4) 混合溶液を用いた。次に、活性画分を集め、LH-20 カラムクロマトグラフを行い、酢酸エチルで展開した。最後に、この溶出液を分取用 HPLC にかけて分離を行った。以上の方法により、6 l の培養液から 53 mg のピエリシジン B₁ N-オキシドを単離、精製した。

このものを還元して既知のピエリシジン B₁ と同定した。

ピエリシジン B₁ N-オキシドは 1.5 μg/ml で PI turnover を 50% 阻害した。阻害の機構はまだわかっていない。ピエリシジン B₁ は抗菌作用がないが、N-オキシド体はグラム陰性菌やかびに抗菌活性を示した。

5.6. エチグアニン PI キナーゼは PI turnover に含まれる酵素群のひとつである。私達はこの酵素活性を阻害する物質のスクリーニングを行い、既知物質の 2,3-ジヒドロキシ安息香酸²⁹⁾ やトヨカマイシンを得た³⁰⁾。さらに最近新規物質のエチグアニン (図 7) を放線菌から単離した³¹⁾。

酵素アッセイには A 431 細胞の膜画分を酵素として、基質に PI と γ-³²P-ATP を用いた。PH 7.2 の 20 mM HEPES 緩衝液中で 20°C、20 分反応させ、クロロホルム-メタノール-1 N 塩酸を加えて反応を止めた。攪拌の後、下層をシリカゲルクロマトグラフィーに添加して未反応 ATP を除き、放射活性を測定した²⁹⁾。

エチグアニンの単離精製には培養液 (27 l) をダイアイオン HP-20 に吸着させ、水洗後、50% メタノール水で溶出させた。この溶出液を濃縮した後、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、30% メタノール水で展開溶出した。次に、活性画分を集め、CM-セファデックスカラムに吸着させ、0.4 M から 1.0 M の食塩濃度勾配法にて溶出を行った。それから、ダイアイオン CHP-20 に吸着させ、0.005 N HCl-50% メタノール水で溶出させた。この溶出液をアンバーライト IR-45(OH⁻) で中和し、エチグアニン A、B の混合物 (73 mg) を得た。最後に、向流分配法を応用した遠心分配クロマトグラフィーを用いて分離を行った。溶媒系は酢酸エチル-1-ブタノール-水 (4:7:10) 混合溶液を用いた。以上の方法により、エチグアニン A を 28.6 mg、エチグアニン B を 6.7 mg 得ることができた。

エチグアニン A と B の PI キナーゼ 50% 阻害濃度はそれぞれ 0.04 および 0.11 μg/ml で、知られている阻害物質の中で最も強力なものである。エチグアニン A、B は抗菌活性を示さず、マウスに腹腔内投与して 100 mg/kg で毒性を示さなかった。PI turnover 阻害物質のそれぞれの作用点は図 6 に示した。

6. おわりに

以上のように微生物二次代謝産物から癌遺伝子作用の阻害剤として多彩な構造の物質が得られている。この中にはアープスタチンやイノスタマイシンのように動物実験で抗癌活性を示すものもある。今後、さらに化学的な修飾を行って、またはスクリーニングを続けることで毒

性の少ない, 活性の強い, 安定で膜透過性の良い臨床応用可能な薬剤を探してゆきたいと思っている。一方, 紙面の都合で多くを紹介できなかったがアープスタチンおよびその誘導体, ゲニステイン, ハービマイシンは細胞の増殖, 分化の機構研究に広く使われている。一連の阻害剤は生化学試薬としても有用であろう。

(平成3年7月26日受理)

文 献

- 1) H. Umezawa, M. Imoto, T. Sawa, K. Isshiki, N. Matsuda, T. Uchida, H. Iinuma, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, **39**, 171 (1985)
- 2) K. Isshiki, M. Imoto, T. Takeuchi, H. Umezawa, T. Tsuchida, T. Yoshioka, K. Tatsuta, *ibid.*, **40**, 1207 (1987)
- 3) M. Imoto, K. Umezawa, T. Sawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *ibid.*, **40**, 1471 (1987)
- 4) M. Imoto, K. Umezawa, T. Sawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Biochem. Int.*, **15**, 987 (1987)
- 5) K. Umezawa, K. Tanaka, T. Hori, S. Abe, R. Sekizawa, M. Imoto, *FEBS Lett.*, **279**, 132 (1991)
- 6) M. Toi, H. Mukaida, T. Wada, N. Hirabayashi, T. Toge, T. Hori, K. Umezawa, *Eur. J. Cancer*, **26**, 722 (1990)
- 7) M. Imoto, N. Shimura, H. Ui, K. Umezawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 208 (1990)
- 8) K. Umezawa, T. Hori, H. Tajima, M. Imoto, K. Isshiki, T. Takeuchi, *FEBS Lett.*, **260**, 198 (1990)
- 9) H. Ogawara, T. Akiyama, J. Ishida, S. Watanabe, K. Suzuki, *J. Antibiot.*, **39**, 606 (1986)
- 10) T. Onoda, H. Iinuma, Y. Sasaki, M. Hamada, K. Isshiki, H. Naganawa, T. Takeuchi, K. Tatsuta, K. Umezawa, *J. Nat. Prod.*, **52**, 1252 (1989)
- 11) T. Onoda, K. Isshiki, T. Takeuchi, K. Tatsuta, K. Umezawa, *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **16**, 249 (1990)
- 12) S. Omura, A. Nakagawa, N. Sadakane, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 4323
- 13) Y. Uehara, M. Hori, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 672 (1985)
- 14) K. Umezawa, S. Atsumi, T. Matsushima, T. Takeuchi, *Experientia*, **43**, 614 (1987)
- 15) Y. Uehara, H. Fukazawa, Y. Murakami, S. Mizuno, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 803 (1989)
- 16) Y. Homma, J. Okabe-Kado, M. Hozumi, Y. Uehara, *Cancer Res.*, **49**, 331 (1989)
- 17) N. Shimada, N. Yagisawa, H. Naganawa, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **34**, 1216 (1981)
- 18) O. Itoh, S. Kuroiwa, S. Atsumi, K. Umezawa, T. Takeuchi, M. Hori, *Cancer Res.*, **49**, 996 (1989)
- 19) K. Suzukake-Tsuchiya, Y. Moriya, K. Yamazaki, M. Hori, *J. Antibiot.*, **43**, 1489 (1990)
- 20) M. Imoto, T. Yamashita, T. Sawa, S. Kurasawa, H. Naganawa, T. Takeuchi, Z. Bao-Quan, K. Umezawa, *FEBS Lett.*, **230**, 43 (1988)
- 21) M. Imoto, N. Shimura, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **44**, 915 (1991)
- 22) M. Imoto, K. Umezawa, Y. Takahashi, H. Naganawa, Y. Iitaka, H. Nakamura, Y. Koizumi, Y. Sasaki, M. Hamada, T. Sawa, T. Takeuchi, *J. Nat. Prod.*, **53**, 825 (1990)
- 23) M. Imoto, N. Johtoh, K. Umezawa, *J. Cell Pharmacol.*, **2**, 49 (1991)
- 24) T. Yamashita, M. Imoto, K. Isshiki, T. Sawa, H. Naganawa, S. Kurasawa, Z. Bao-Quan, K. Umezawa, *J. Nat. Prod.*, **51**, 1184 (1988)
- 25) K. Umezawa, M. Imoto, T. Yamashita, T. Sawa, T. Takeuchi, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 15 (1989)
- 26) S. Nishiwaki, H. Fujiki, S. Yoshizawa, M. Suganuma, H. Furuya-Suguri, S. Okabe, M. Nakayasu, K. Okabe, H. Muratake, M. Natsume, K. Umezawa, S. Sakai, T. Sugimura, *ibid.*, **82**, 779 (1991)
- 27) K. Okabe, H. Muratake, M. Natsume, *Tetrahedron*, **46**, 5113 (1990)
- 28) H. Nishioka, T. Sawa, K. Isshiki, Y. Takahashi, H. Naganawa, N. Matsuda, S. Hattori, M. Hamada, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, Isolation and structure determination of a novel phosphatidylinositol turnover inhibitor, piericidin B₁ N-oxide, in press
- 29) H. Nishioka, M. Imoto, T. Sawa, M. Hamada, H. Naganawa, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Antibiot.*, **42**, 823 (1989)
- 30) H. Nishioka, T. Sawa, M. Hamada, N. Shimura, M. Imoto, K. Umezawa, *ibid.*, **43**, 1586 (1990)
- 31) H. Nishioka, T. Sawa, H. Nakamura, H. Iinuma, D. Ikeda, R. Sawa, H. Naganawa, C. Hayashi, M. Hamada, T. Takeuchi, Y. Iitaka, K. Umezawa, *J. Nat. Prod.*, Isolation and structure determination of novel phosphatidylinositol kinase inhibitors, echiguanine A and B, from *Streptomyces*, in press