

氏 名 河 野 圭 太
 学位(専攻分野) 博 士 (工 学)
 学位記番号 論 工 博 第 3634 号
 学位授与の日付 平 成 14 年 1 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
 学位論文題目 スフィンゴシンキナーゼ阻害剤に関する研究

(主 査)
 論文調査委員 教 授 田 中 渥 夫 教 授 齋 藤 烈 教 授 檜 山 爲 次 郎

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴシン-1-リン酸 (SPP) は動脈硬化症などの血管病変との関連から新たな脂質性の生理活性物質として注目されている。最近, SPP の細胞膜受容体群が明らかにされたが, SPP の生成機構に関しては未解明であった。本研究は SPP の生成酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) に焦点を当て, その生理機能や活性制御機構の解明を目標に, SPHK 阻害剤の探索を微生物培養液中より行なった結果, 見出した3種類の新規化合物についてまとめたものであり, 緒論, 総括および本論4章(第2章は全2節)より構成される。

第1章はスクリーニング系の確立と新規 SPHK 阻害剤 F-12509A に関する報告である。迅速かつ多検体処理可能な SPHK の活性測定系を確立し, ラット肝臓細胞質画分を酵素源に微生物培養液約12,000検体のスクリーニングを行った。その結果, 盤菌類 *Trichopezizella barbata* SANK 25395株より新規セスキテルペンキノンである F-12509A を見出した。F-12509A は基質アナログ以外では世界で初めての SPHK 阻害剤であった。ラット肝臓由来 SPHK に対する阻害作用を解析した結果, 50%阻害濃度 (IC_{50} 値) は $18\mu\text{M}$ であった。また Lineweaver-Burk Plot 解析より, その阻害様式はスフィンゴシン (SPH) に対して拮抗的で, 阻害定数 (K_i 値) は $18\mu\text{M}$ であった。ヒト血小板を使用した解析から無損傷の細胞においても細胞膜を透過すること, さらに関連する他の酵素群での解析から SPHK に対して高い特異性を有していることが明らかとなった。

第2章は新規 SPHK 阻害剤 B-5354 類に関する報告である。第1節では, スクリーニングの結果, 新規な海洋細菌 SANK 71896株の培養液中に阻害活性を見出し, 単離精製, 構造解析の結果, 長鎖不飽和アルコールが4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸とエステル結合した新規化合物群 B-5354a, b, cであることを明らかにした。第2節では, ラット肝臓由来 SPHK に対する阻害作用を解析した結果, IC_{50} 値はそれぞれ7, 20, $13\mu\text{M}$ であった。ヒト血小板を使用した解析から無損傷の細胞においても細胞膜を透過すること, さらに関連する他の酵素群での解析から SPHK に対して高い特異性を有していることが判明した。誘導体を合成し構造活性相関を検討した結果, 阻害活性にはアミノ基, 水酸基, 長鎖不飽和脂肪鎖のいずれも重要であることを証明した。B-5354c の阻害様式は SPH に対して非拮抗的で, K_i 値は $12\mu\text{M}$ であった。F-12509A と同様に阻害活性はあまり強くないものの, 特異性の点で優れた阻害剤であることが明らかとなった。

第3章は新規 SPHK 阻害剤 S-15183 類に関する報告である。スクリーニングの結果, 糸状菌 *Zopfella inermis* SANK 15183株より新規アザフィロンである S-15183a, b を見出した。ラット肝臓由来 SPHK に対する阻害作用を解析した結果, IC_{50} 値はそれぞれ2.5, $1.6\mu\text{M}$ であった。ヒト血小板を使用した解析から, 無損傷の細胞においても細胞膜を透過することが判明した。しかしながら, 一般的にアザフィロンはアンモニア分子などと容易に反応するなど反応性に富んでいることが知られており, S-15183 類の SPHK 阻害活性がそのような非特異的な反応性に由来する可能性を否定できなかった。従って S-15183 類は SPHK の生理機能を解析するツールとして使用するにはあまり適さない化合物であると考えられた。

第4章は組換え体ヒト SPHK に対する阻害作用を解析した報告である。著者の研究から SPHK には2つのアイソフォー

ム (SPHK1, SPHK2) が存在することが遺伝子レベルで明らかとなった。両アイソフォームの生化学的性状に関してはある程度解析が進んだものの、その生理機能の役割分担や活性制御機構に関しては全くと言って良いほどわかっていなかった。そこで F-12509A および B-5354c のヒト SPHK 両アイソフォームに対する阻害作用をそれぞれの遺伝子組換え体を作製し検討した。その結果、F-12509A の各アイソフォームに対する IC₅₀ 値はそれぞれ 41 μ M および 11 μ M であり、SPHK1 よりも SPHK2 を約 4 倍強く阻害した。一方、B-5354c の IC₅₀ 値はそれぞれ 7.8 μ M および 5.0 μ M であり、両アイソフォームを既存の基質アナログよりも強力に阻害した。さらに F-12509A は両アイソフォームにおいて SPH に対して拮抗的に阻害し、B-5354c は非拮抗的に阻害することが明らかとなった。

以上のように、本研究により天然物から得られた新規化合物群は、SPH とは異なる構造の初めての SPHK 阻害剤であり、阻害活性はそれほど強くないものの、SPHK に対して高い特異性を有していることが明らかとなった。これらの構造的にユニークかつ阻害様式の異なる阻害剤は、今後細胞レベルでの阻害活性を詳細に検討した上で、SPHK の生理機能、活性制御機構など未解決の問題を解決できる有用なツールとして応用できるものと期待できる。

論文審査の結果の要旨

本論文は、新たな脂質性の生理活性物質スフィンゴシン-1-リン酸 (SPP) の生成酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) に焦点を当て、SPHK の阻害剤を探索した結果、微生物代謝産物に見出した 3 種類の新規化合物についての研究をまとめたものであり、得られた成果は以下のとおりである。

1. 迅速かつ多検体処理可能な SPHK の活性測定系を確立し、ラット肝臓細胞質画分を酵素源に微生物培養液約 12,000 検体のスクリーニングを行った。その結果、盤菌類加 *trichopezizella barbata* SANK 25395 株より新規セスキテルペンキノンである F-12509A の取得に成功した。酵素阻害活性を詳細に解析した結果、SPHK 阻害活性はあまり強くないものの、特異性の点で優れた阻害剤であることを明らかにした。

2. 新規な海洋細菌 SANK 71896 株の培養液中に SPHK 阻害活性を見出し、単離精製、構造解析の結果、長鎖不飽和アルコールが 4-アミノ-3-ヒドロキシ安息香酸とエステル結合した新規化合物群 B-5354a, b, c であることを明らかにした。

3. B-5354 類の酵素阻害活性を詳細に検討した結果、SPHK 阻害活性はそれほど強くないものの、特異性の点で優れた阻害剤であることを明らかにした。さらに誘導体を合成し構造活性相関を検討した結果、阻害活性にはアミノ基、水酸基、長鎖不飽和脂肪鎖のいずれもが重要であることを証明した。

4. 糸状菌 *Zopfella inermis* SANK 15183 株より新規アザフィロンである S-15183a, b の取得に成功した。アザフィロンは非特異的な反応性に富んでいることが知られており、S-15183 類は SPHK の生理機能を解析するツールとして使用するにはあまり適さない化合物であると考察した。

5. F-12509A および B-5354c に関して、遺伝子レベルで明らかとなっているヒト SPHK の 2 つのアイソフォームに対する阻害作用を遺伝子組換え体を作製し検討した。アイソフォーム選択性こそ見られなかったが、F-12509A は両者においてスフィンゴシンに対して拮抗的に、B-5354c は非拮抗的に阻害することを明らかにした。

以上のように、本論文は生理活性脂質の合成に関与する酵素に対する阻害剤の検索と同定、およびその阻害機構に関して重要な成果を挙げたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成 13 年 12 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。