

氏 名 矢 野 浩 史  
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)  
 学位記番号 論 農 博 第 2229 号  
 学位授与の日付 平 成 11 年 3 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 Blockade of Histamine Secretion by Wortmannin through the Inhibition of Phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 Cells  
 (RBL-2H3 細胞におけるウォルトマンニンによるフォスファチジルイノシトール3-キナーゼ阻害を介するヒスタミン分泌の抑制)  
 (主査)  
 論文調査委員 教 授 木 村 光 教 授 佐 々 木 隆 造 教 授 大 東 肇

### 論 文 内 容 の 要 旨

フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3-k) は脂質キナーゼの一種である。本論文では、糸状菌の二次代謝産物のwortmannin (WTM) が、PI3-kを強力かつ選択的に阻害することを明らかにした。これにより、それまで未知であったPI3-kの生理作用に対する研究手段を提供した。また、WTMがPI3-kを阻害することにより、RBL-2H3細胞からのヒスタミン分泌を抑制することを見いだした。これにより、PI3-kの生理作用の一つを初めて明らかにし、PI3-kの阻害という全く新しい作用機作に基づく抗アレルギー剤の探索を可能にした。本論文の主な内容は以下の通りである。

#### 第1章 MLCK阻害剤の取得と生化学及び薬理学的解析

血圧降下剤を得る目的で、血管平滑筋の収縮に関与する鍵酵素であるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) に対して阻害活性を有する化合物を探索した。その結果、MLCK阻害剤として、WTM, MS-282, MS-347, MS-444, MS-681などの化合物を微生物培養液から精製単離した。さらに、これらの化合物がラット胸部大動脈のミオシン軽鎖のリン酸化抑制、平滑筋の収縮抑制、及びin vivoにおける血圧降下などの作用を持つことを明らかにした。

#### 第2章 MLCK阻害剤によるヒスタミン分泌抑制

ラット由来の培養肥満細胞であるRBL-2H3細胞からのヒスタミン分泌に対するMLCK阻害剤の影響について調べた結果、MS-282, MS-347, MS-444が、MLCKを阻害する濃度域でヒスタミン分泌を抑制することを見いだした。これにより、ヒスタミン分泌過程にMLCKが関与していることを示した。

一方、WTMはMLCKを阻害する濃度域よりもはるかに低い濃度域でRBL-2H3細胞からのヒスタミン分泌を抑制した。この結果は、WTMがMLCKとは異なる強力なヒスタミン分泌抑制の作用点を有することを示唆している。

#### 第3章 WTM及びその誘導体のPI3-k阻害作用の解析

WTMの強力なヒスタミン分泌抑制作用点を探索する過程で、WTMがPI3-kを強力かつ選択的に阻害することを示した。さらに、WTMがPI3-kの触媒サブユニットに結合することによりPI3-k活性を不可逆的に阻害することを明らかにした。一方、WTMの誘導体を多数合成し、PI3-kとMLCKに対する阻害活性が異なる種々の誘導体を得た。

#### 第4章 抗原刺激時のPBL-2H3細胞細胞内におけるPI3-kの活性化

抗PI3-k抗体を用いたウェスタン解析、及び、無細胞抽出液中のPI3-k活性の測定により、RBL-2H3細胞においてPI3-kが発現していることを明らかにした。次に、RBL-2H3細胞の抽出液より抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫複合体を調製した。複合体中のPI3-k活性は細胞を抗原で刺激することにより上昇した。またこのとき、抗PI3-k抗体によって沈降される90, 100及び110kDaのタンパク質のチロシンリン酸化度の増加が観察された。これらの結果から、抗原刺激によって、RBL-2H3細胞内のPI3-k活性がチロシンキナーゼ系を介して上昇することを明らかにした。

## 第5章 WTM誘導体とLY294002によるヒスタミン分泌抑制

PI3-k阻害剤がヒスタミン分泌に与える影響を調べた。その結果、WTM誘導体のヒスタミン分泌抑制活性とPI3-k阻害活性が良く相関すること、及び、WTMとは別骨格を有するPI3-k阻害剤であるLY294002がPI3-kを阻害する濃度域でヒスタミン分泌を抑制することを明らかにした。

## 第6章 WTMによるPBL-2 H3細胞内のPI3-k阻害

WTMを作用させたRBL-2 H3細胞から無細胞抽出液を調製し、抗PI3-k抗体を用いて免疫複合体を得た。得られた免疫複合体中のPI3-k活性は、WTMの処理で濃度依存的に阻害されていた。また、ウェスタン解析により、WTMがPI3-kの触媒サブユニットに結合していることを明らかにした。

## 第7章 WTMのヒスタミン分泌阻害点

細胞内のPI3-k活性化に関して機能的に上流に位置すると考えられるチロシンキナーゼのLynの活性化をWTMは阻害しなかった。一方、ヒスタミンとは異なり、開口分泌ではなく構成分泌によって分泌されるロイコトリエンの分泌をWTMは抑制した。従って、WTMの作用点であるPI3-kは、Lynより下流に位置し、ヒスタミン分泌とロイコトリエン分泌のシグナル分岐より上流に位置すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

試薬として、或いは、医薬品として、微生物の二次代謝産物が科学の進歩や社会の福祉に貢献している。本論文では、MLCK阻害剤として単離した糸状菌の二次代謝産物wortmannin (WTM) をPI3-k阻害剤として再発見し、解析した。また、PI3-kの生理作用の一つを初めて明らかにすることにより、PI3-k阻害に基づく全く新しい抗アレルギー剤の探索の可能性を示した。評価すべき点は以下の通りである。

1. MLCKに阻害活性を示す化合物としてWTM, MS-282, MS-347, MS-444, MS-681などの微生物二次代謝産物を単離した。これらのうち、WTMは、以下に示す新たな薬理作用、生理作用を示した。
2. WTM, MS-282, MS-347, MS-444は、血管平滑筋においてMLCKを阻害し、この阻害が血圧降下作用につながることを明らかにした。
3. ヒスタミン分泌過程にMLCKが関与していることを明らかにした。
4. WTMが強力なPI3-k阻害剤であることを示し、その阻害の高い選択性を明らかにした。WTMはPI3-k阻害試薬として発売され、現在、世界中で広く使用されている。
5. ヒスタミン分泌細胞であるRBL-2 H3細胞でPI3-kが発現していることおよび、抗原刺激にともなって、RBL-2 H3細胞内のPI3-k活性がチロシンキナーゼ系を介して上昇することを初めて明らかにした。
6. WTM誘導体のヒスタミン分泌抑制活性とPI3-k阻害活性が良く相関することを初めて示した。さらに、WTMとは化学構造が全く異なるPI3-k阻害剤のLY294002もヒスタミン分泌を抑制することを初めて示した。
7. 細胞内においてもWTMがPI3-kの触媒サブユニットに結合し、酵素活性を阻害していることを明らかにした。
8. 機能的にPI3-kよりも上流に位置するLynの活性化をWTMが阻害しないこと、及び、ヒスタミンとは分泌機構の異なるロイコトリエンの分泌をWTMが抑制することを明らかにし、細胞内におけるWTMの作用点に関するモデルを提出した。以上のように、本論文は微生物の二次代謝産物WTMの薬理活性を生化学及び細胞学レベルで解析し、WTMの研究試薬としての基礎研究と、医薬品への応用研究をまとめたものであり、応用微生物学、細胞生理学、細胞薬理学などの発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成11年1月18日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が充分あるものと認めた。