

P-4. 土壌放線菌からの新規プロテインホスファターゼ阻害物質の探索

(北大院農) ○柳田 進太郎、三橋 進也、重富 顕吾、生方 信

1. はじめに

放線菌は土壌分解菌として土壌物質の循環プロセスに関わっており、多種多様な代謝産物を産生することで知られている。その中で *Streptomyces* 属からは多くの生理活性物質が同定され、現在も新たな生理活性物質の検索が続けられている¹⁾。

トウトマイセチン (tautomycetin, 以下 TC) は 1989 年に理化学研究所において放線菌 *Streptomyces griseochromogenes* から単離・構造決定が報告されたポリケチド化合物である (Fig.1)²⁻³⁾。さらに当研究室および菊池らのグループ (北大遺制研) との共同研究によってプロテインホスファターゼ 1 型 (PP1) の特異的な阻害剤であることが報告されている⁴⁾。

生体内において、多数のタンパク質がプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの作用によって、それぞれリン酸化と脱リン酸化の作用を受ける。これらの酵素が基質タンパク質のリン酸化状態を調整することで、細胞増殖・分化・アポトーシスをはじめ多くの細胞機能の制御に関与している⁵⁾。

TC などのプロテインホスファターゼ阻害剤を用いた研究は、プロテインホスファターゼの作用機構や基質タンパク質における脱リン酸化の生理的意義の解明に大きく寄与すると考えられる⁴⁾。本研究では TC 産生菌である *Streptomyces griseochromogenes* に変異を誘導することで、より PP1 に対し選択的かつ安定な構造をもつ新規化合物の単離・構造決定を試みた。すなわち TC 生産株に変異を誘導し、PP1 阻害活性と HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来の細胞) の形態変化を指標に一次スクリーニングを行ない、HPLC 分析によって新規 PP1 阻害物質の探索を行なった。加えて、ポリケチド生合成に関与する前駆体を添加することにより新規活性物質の生産性の増強を試みた。

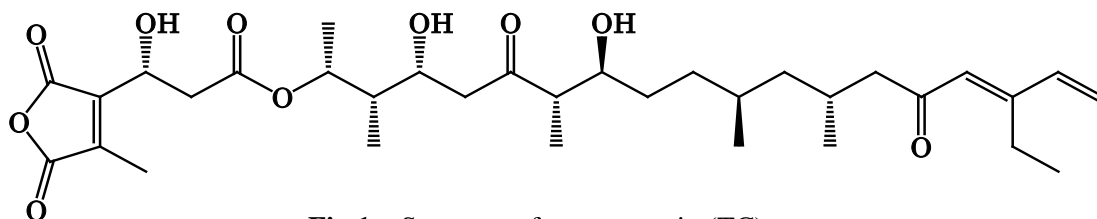


Fig.1 Structure of tautomycetin (TC).

2. 材料と方法

2.1 変異株の取得

本研究で用いた放線菌は、クリーンベンチの室内殺菌用の紫外線を変異原として変異させた。採取した変異株はそれぞれ、5 ml の生産培地 (soluble starch 1.9 %、D-(+)-glucose 3.81 %、yeast extract 1.14 %、soybean meal 1.14 %) で 28°C、170 rpm の条件で 6 日間振とう培養した。6 日後、培養液は遠心分離によって上清と沈殿に分けた。沈殿にはそれと同量の acetone を加え抽出を行なった。これを遠心分離に

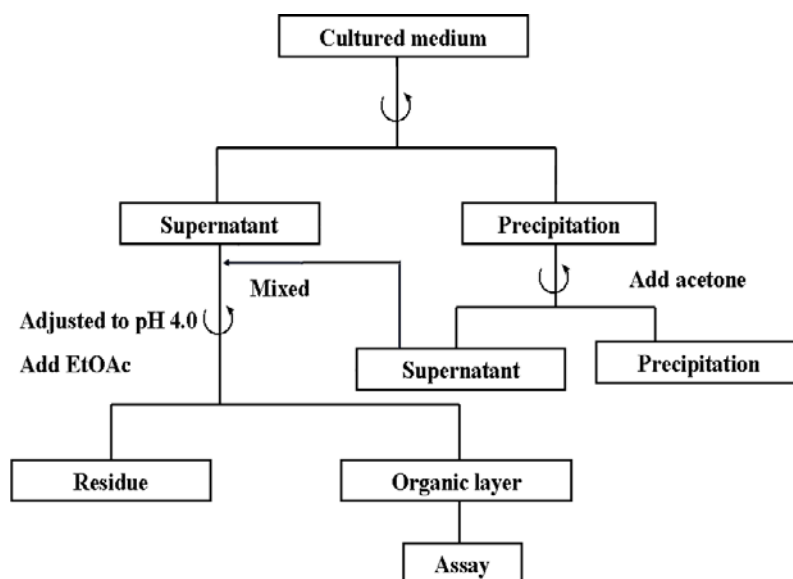


Fig.2 Extraction and measurement of activity in first screening.

よって上清と沈殿に分け、上清を acetone 抽出前に分離した上清と混ぜた。pH を 4.0 に調節したのちに EtOAc を全量の 3 分の 1 加えて抽出を行なった。これを遠心分離によって有機層と水層に分離し、有機層をスピードバックコンセントレーターによって揮発させ、抽出物を得た(Fig.2)。

2.2 一次スクリーニング

二つのスクリーニング手法を用いた。まず、採取した変異株 180 株のうち PP1 阻害活性の高い株を選定した。次にプロテインホスファターゼ阻害剤はヒト細胞の形態変化を誘導することが知られているため⁶⁾ PP1 阻害活性の高い株のうち HeLa 細胞の形態変化を誘導する株の選定を行なった。

スクリーニングソースは、上記の培養液から得られた抽出物を dimethyl sulfoxide (DMSO) 50 μ l に溶解することで調製した。

PP1 の阻害活性試験は文献 7 を参考に *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) を PP1 の人工基質として用いた。ホスファターゼ活性により *p*NPP から分離した *p*-nitrophenol (*p*NP) はアルカリ下で H^+ を失い、*p*-nitrophenolate が生成することで黄色を呈する。その吸収度を測定し PP1 阻害活性を評価した。20 mM *p*NPP を含む 40 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (pH 8.4) の溶液 388 μ l へ、スクリーニングソース 2 μ l または DMSO (コントロール) 2 μ l をエッペンチューブに加えて全量 390 μ l とした。攪拌後、室温で 120 μ g/ml PP1 を 10 μ l 加えて反応させた。25 分後に 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) を 100 μ l 加えて反応を停止し、450 nm で吸光度を測定した。

HeLa 細胞処理は、細胞培地に上記のスクリーニングソースを最終濃度 2 % になるように加え、5 時間後の細胞の形態変化を光学顕微鏡で観察した。

2.3 HPLC 分析

菌株は実験 2.1 と同様の条件で培養し、その抽出物を MeCN で溶解することで HPLC 測定溶液とした。検出器は HITACHI Photodiode Array (L-7455) を用い、移動相は以下のように A および B の二種類の溶離液を Fig.3 に示した MeCN の濃度勾配になるよう測定を行なった。

<HPLC 条件>

カラム : Waters Nova-PakC₁₈ (ϕ 3.9 mm \times 150 mm)

溶離液 : (A) 0.1% AcOH

(B) 95% MeCN / 0.1% AcOH

流速 : 1.0 ml / min

温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出波長 : 260 nm

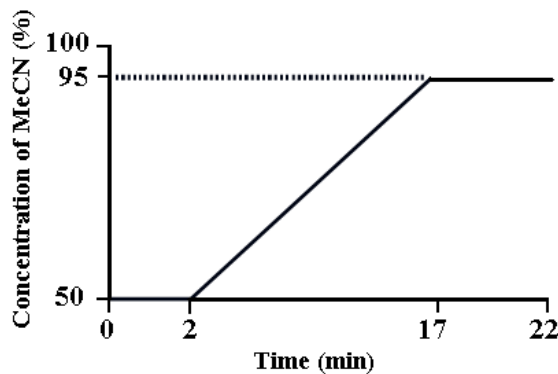


Fig.3 Eluent composition.

2.4 TC の前駆体による生産性の増強

Fig.4 に添加した前駆体の構造を示した。前駆体はそれぞれのナトリウム塩を、最終濃度 0.05 % になるように生産培地に溶解させた。抽出後は PP1 阻害活性試験によってそれぞれの活性を評価した。

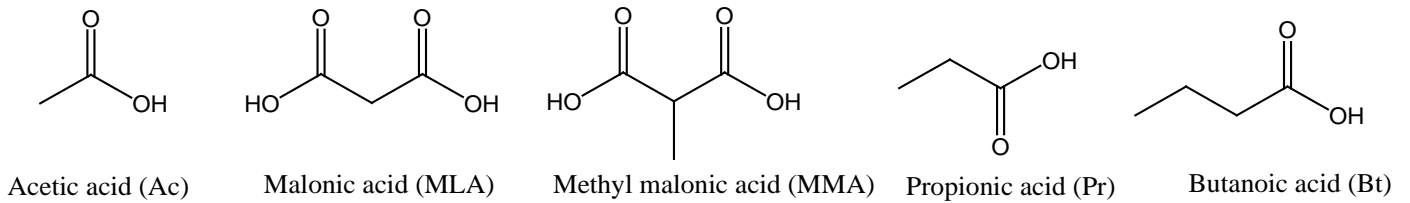


Fig.4 Additives in the culture medium.

3. 結果と考察

3.1 一次スクリーニング

採取した 180 株の変異株のうち、PP1 阻害活性が高く HeLa 細胞の形態変化を誘導する株を 7 株まで選定した。

3.2 HPLC 分析

一次スクリーニングから選定した株は、さらに HPLC 分析によって標品の TC とは異なる保持時間および吸収波長の化合物を生成する株の選定を目的に行なわれた。TC 標品を測定した結果、保持時間が約 9 分にピークが観測された。次に最も PP1 阻害活性の高い株 (53-1-25 株) の培養液から得た抽出物を測定した結果、約 12 分に活性物質のピークが観測された。さらに、これら二つを混合し 0°C で一時間インキュベートした後に測定したところ、Fig.5 に示すように別々のピークとして検出された。Fig.6 にそれぞれの UV スペクトルを示す。ピーク I では 268 nm に吸収極大が観測され、ピーク II では 252 nm に吸収極大が観測された。したがってピーク II の化合物が TC の標品と異なる保持時間と UV スペクトルを示すことから 53-1-25 株が産生する化合物は TC とは異なる構造の化合物であることが示唆された。また、ピーク II を分取し、PP1 阻害活性を行なったところ高い活性が見られたことから、これがピーク II の化合物の活性本体だと考えられる。

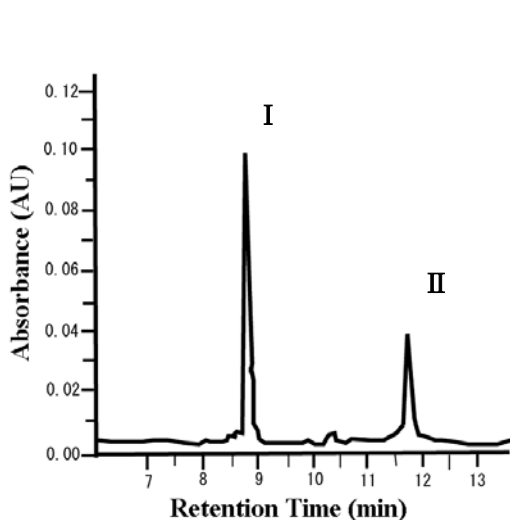


Fig.5 Profile of HPLC analysis

Peak I : TC.

Peak II : Active compound from strain 53-1-25.

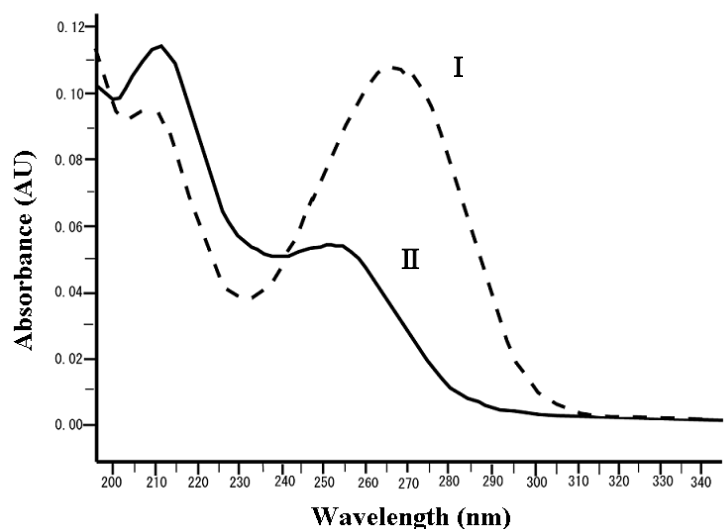


Fig.6 UV spectra of I and II .

Continuous line : Peak I .

Dashed line : Peak II .

3.3 マロン酸添加による PP1 阻害物質の生産性の増強

HPLC 分析で検出した化合物を同定するにあたって、大量培養を必要とした。そこで、効率良く目的物を得るために文献 8 を参考にして TC の前駆体を培養液に添加する実験を行なった。PP1 の阻害活性はマロン酸およびメチルマロン酸を添加したときに高い活性を示した。さらに、サンプルを 50 倍、100 倍と希釈したときの PP1 阻害活性はマロン酸を添加したときで最も高い活性を示した。(Fig.7) したがって、この PP1 阻害活性物質の生合成にはマロン酸が大きく寄与していることが考えられる。

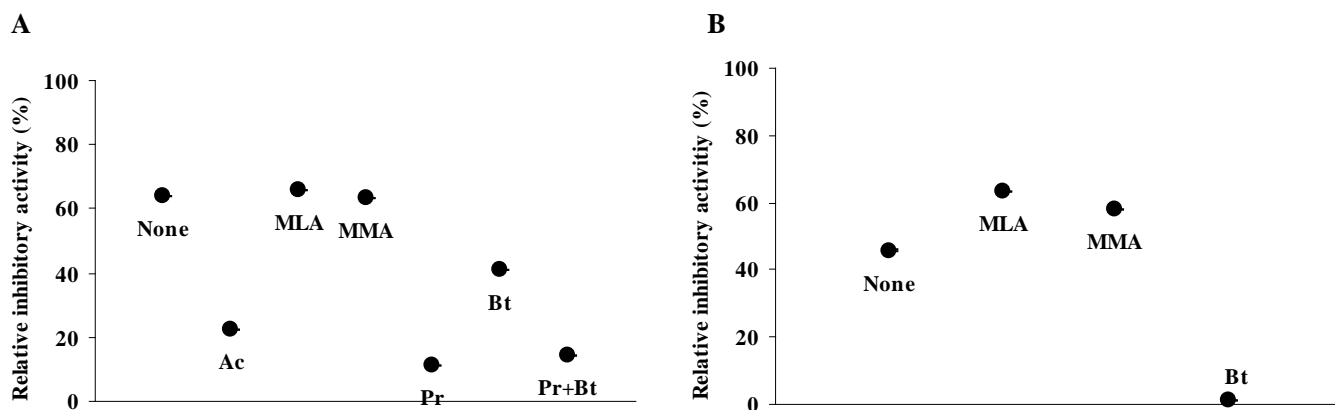


Fig.7 PP1 inhibitory activity of extracts. Extracts were dissolved in 50 μ l DMSO , and then they were diluted by 50-fold (A) and 100-fold (B) , representatively.

4. まとめ

HPLC 分析および PP1 阻害活性試験から本研究で用いた TC 生産株は、紫外線による変異処理によって TC 生産能を失う代わりに、新規 PP1 阻害活性物質の生産能を獲得したと考えられる。現在は、このピーク II に相当する化合物の構造決定に向け単離・精製を試みている。

5. 参考文献

- 1) 室伏きみ子, 関啓子 監訳, 『Brock 微生物学』(2002),オーム社
- 2) X.-C.Cheng., et al: *J.Antibiot.*,**42**,141-144 (1989)
- 3) X.-C.Cheng., Ubukata M., and Isono K: *J. Antibiot.*, **43**,890-896(1990)
- 4) Mitsuhashi S., and Ubukata M., et al: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,**287**,328-331(2001)
- 5) 秋山徹, 河府和義, 編集, 『阻害剤活用ハンドブック』(2006), 羊土社
- 6) Magae J., et al: *Proc. Jpn. Acad. B: Phys. Biol. Sci.*,**66**,209-212 (1990)
- 7) Kita A., Matsunaga S., et al: *Structure.*,**10**,715-724(2002)
- 8) Ubukata M., X.-C.Cheng., Uzawa J., and Isono J: *J.Chem.Soc.*,**19**,2399-2404(1995)