

微生物由来の新しい医薬品素材の開拓

Discovery and Production of Lead Compounds for Medicines from Microorganisms

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96I00304)

プロジェクトリーダー

大村 智 北里大学大学院薬学研究科・客員教授

コアメンバー

田中 晴雄 北里大学薬学部・教授
池田 治生 北里大学薬学部・助教授
小宮山寛機 北里研究所臨床薬理研究所・副所長
供田 洋 北里研究所生物機能研究所・副所長



1. 研究目的

この研究プロジェクトでは、微生物資源からの創薬に関して大きく次の二点から研究を推進した。

- (1) 重要疾病に対する予防治療薬となる素材の微生物資源からの開拓
(大村智、田中晴雄、小宮山寛機、供田洋)
- (2) 微生物遺伝子の機能的改変による非天然有用物質の微生物による創製技術の開拓
(大村智、池田治生)

2. 研究成果概要

2.1 重要疾病に対する予防治療薬の微生物資源から開拓

重要疾病として癌、エイズ、アレルギー、炎症、動脈硬化、肥満などに焦点をあてた。このような疾病の発症に関与する重要な現象に注目し、その過程を観測できる細胞評価系を構築し、独自の微生物培養液ライブラリーを対象に目的の活性物質の探索を行った。得られた新しい化合物については、作用点の解析と動物レベルでの評価を行った。

2.1.1 HIV 感染抑制を目的とした巨細胞形成阻害剤の探索^{1,2)}

HIV の接着・侵入過程はウイルス側の gp120 (*env* 遺伝子にコード)と宿主側の CD4 とケモカイン受容体によって進行する。この過程を薬剤標的として注目し、T 細胞 (T-)あるいはマクロファージ (M-) 指向性の *env* 遺伝子を発現させた細胞と対応する受容体発現細胞を共培養することによる巨細胞形成として HIV の接着・侵入を観

察できる評価系を構築した。微生物培養液を検索した結果、放線菌 K97-0003 株の培養液上清からアクチノヒビンと命名した 114 個のアミノ酸からなる新しいポリペプチドを単離した (図 1)。アクチノヒビンは、お互いに相同性の高い 3 つのセグメントを含み、T-及び M-指向性の巨細胞形成を阻止するのみならず、T-及び M-指向性の HIV-1 及び HIV-2 の細胞への感染を阻止した。その作用機構の解析から、アクチノヒビンは gp120 の高マンノース糖鎖に選択的に結合することにより、HIV-1 の細胞への接着・侵入を阻害することが明らかとなった (図 1)。

2.1.2 癌転移抑制を目的とした細胞接着阻害剤の探索^{3,4)}

標的組織や障害部位への細胞の遊走や接着・浸潤といった細胞間相互作用は生体の恒常性維持や免疫防御機構のみならず癌や関節炎、喘息、アレルギー、SLE、HIV 等の重篤な慢性疾患の発症や増悪の重要な因子となっている。ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) とヒトリンパ腫 HL60 細胞との接着を指標として、微生物代謝産物を対象にその阻害剤を検索した結果、糸状菌 *Microsphaeropsis* sp. FO-5050 株の培養液よりマクロスフェライドと命名した 16 員環マクロライド群を単離した。E-セレクトリン/シアリルルイス a 間の接着には影響を示さないのに対し、E-セレクトリン/シアリルルイス^x (sLe^x) 間の接着を阻害したことから、その作用点は E-セレクトリンの sLe^x 認識部位と推定された (図 2)。B16/BL6 メラノーマの肺転移モデルにおいて、マクロスフェライド A は著明な肺への転移結節の減少が認められ、sLe^x と E-セレクトリンの結合を阻害することが裏付けられた。一方、マクロスフェライド B (成分

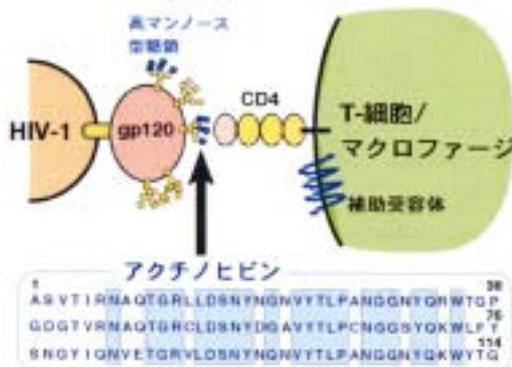


図1 アクチノヒビンとその作用部位

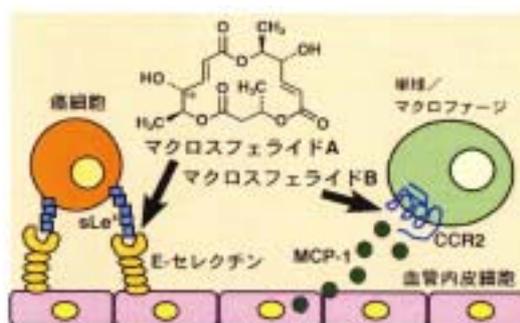


図2 マクロスフェライドとその作用部位

A の 14 位ケト体)は、同種同系 (ddY/ddY) 及び同種異系 (ddY/C57BL) マウス間での皮膚移植に対する拒絶反応の抑制が認められ、免疫抑制作用を示すことが明らかとなった。その作用機序は FK506 やシクロスポリン A とは異なり、ケモカインの MCP-1/CCR-2 間の結合を強力にかつ選択的に阻害することが示された (図 2)。

2.1.3 動脈硬化抑制を目的としたマクロファージ泡沫化阻害剤の探索^{5,6)}

動脈硬化初期病巣ではマクロファージが変性 LDL を取り込み、細胞内に主にコレステリルエステル (CE) とトリグリセリド (TG) を脂肪滴として大量に蓄積し泡沫化し、さらに動脈硬化症へと進展する。マクロファージのこの泡沫化過程を模倣した細胞評価系を構築し、微生物代謝産物を対象に阻害剤の検索を行った結果、糸状菌 *Beauveria* sp. FO-6979 株の菌体中よりポーベリオライド類を、海洋由来の糸状菌 *Phomopsis* sp. FT-0211 株の培養液よりフェノカラシン類を、また放線菌 *Streptomyces* sp. K97-0239 株の菌体中より K97-0239 類を発見した。ポーベリオライド III はコレステロールをアシル化して CE を生成する酵素 ACAT を阻害することにより CE の生成を阻害しマクロファージの泡沫化を阻害すること、フェノカラシン A は変性 LDL の取込みからリソソームでの加水分解までの過程を阻害すること、また K97-0239 はリソソーム以降 CE 生成までの過程を阻害することが明らかとなった (図 3)。さらに、ポーベリオライドは動脈硬化動物モデルにおいて有効性が示された。

2.2 抗寄生虫剤エバメクチン生合成遺伝子群の解析とおよび非天然有用物質創製^{7,8)}

エバメクチンは放線菌 *Streptomyces avermitilis* により生産され、抗寄生虫・抗昆虫活性物質として最も広く利用されてきたマクロラ

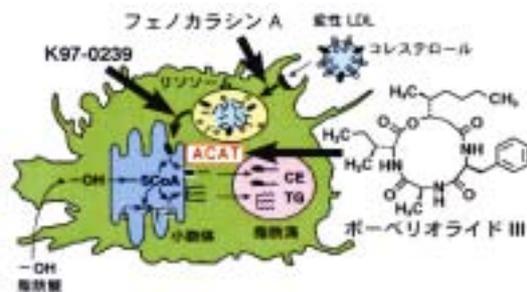


図 3 マクロファージ泡沫化阻害剤とその作用部位

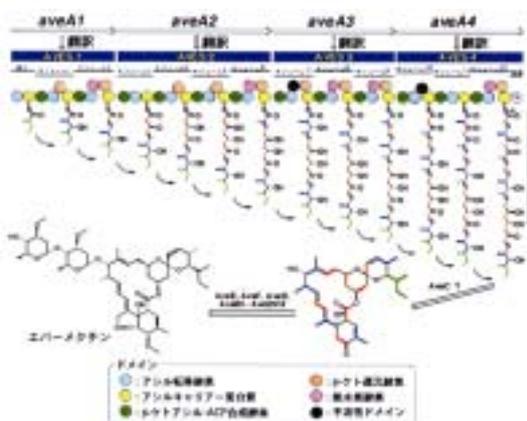


図 4 エバメクチンの生合成機構

イド抗生物質である。トランスポゾンを利用した高速塩基配列解析法を開発し、エバメクチン生合成遺伝子群およそ 82 kbp の全塩基配列を明らかにした。その結果、エバメクチンは 17 個の遺伝子産物によって生合成されること、そのポリケチド合成酵素をコードする 4 つの遺伝子領域 (AVES1~4) からなりそこに 55 個の機能ドメインが存在すること、さらにこれらのうち 2 個のドメインは不活性型であることを明らかにした (図 4)。また、エバメクチンに結合しているデオキシ糖はグルコース-1-リン酸から 7 つの遺伝子産物によって TDP-オレアンドロースを生成する機構が推定された。アイバメクチンはエバメクチンを化学変換し 22、23 位が飽和されたより優れた誘導体であるが、エバメクチンポリケチド合成酵素をコードする領域に新たな機能 (エノイル還元ドメイン) を付加した形質転換体を構築することによって、この非天然アイバメクチンを培養により蓄積させることに成功した。

このように微生物代謝産物の生合成遺伝子の機能を解析し、その機能領域を人為的に改変することにより有用医薬品の創製へ応用できる技術を提供でき、今後の幅広い実用化が期待される。

3 . 結論

細胞を利用し構築した独自の評価系を用いて、微生物代謝産物中よりエイズ、癌、免疫疾患、動脈硬化などに有効な新しい医薬品素材を発見した。また、微生物代謝産物の生合成遺伝子の機能を人為的に改変し、半合成有用医薬品の微生物による創製に成功した。

主な発表論文

- (1) H. Chiba, J. Inokoshi, M. Okamoto, S. Asanuma, K. Matsuzaki, M. Iwama, K. Mizumoto, H. Tanaka, M. Oheda, K. Fujita, H. Nakashima, M. Shinose, Y. Takahashi and S. Omura: Actinohivin, a novel anti-HIV protein that inhibits syncytium formation: isolation, characterization, and biological activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 595-601 (2001)
- (2) J. Inokoshi, H. Chiba, S. Asanuma, A. Takahashi, S. Omura and H. Tanaka: Molecular cloning of actinohivin, a novel anti-HIV protein from an actinomycete, and its expression in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**: 1261-1265 (2001)
- (3) S. Takamatsu, H. Hiraoka, Y.-P. Kim, M. Hayashi, M. Natori, K. Komiyama and S. Omura: Macrosphelides C and D, novel inhibitors of cell adhesion. *J. Antibiot.* **50**: 878-880 (1997)
- (4) T. Sunazuka, T. Hirose, Y. Harigaya, S. Takamatsu, M. Hayashi, K. Komiyama, S. Omura, P. A. Sprengeler and A. B. Smith, III: Relative and absolute stereochemistries and total synthesis of (+)-macrosphelides A and B, potent, orally bioavailable inhibitor of cell-cell adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 10247-10248 (1997)
- (5) I. Namatame, H. Tomoda, H. Arai, K. Inoue and S. Omura: Complete inhibition of mouse macrophage-derived foam cell formation by triacsin C. *J. Biochem.* **125**: 319-327 (1999)
- (6) H. Tomoda and S. Omura: Screening for inhibitors of lipid metabolism. *Enzyme Technologies for Pharmaceutical and Biotechnological Applications* (Eds. H. Kirst, W.-K. Yeh and Zmijewski) pp. 343-378. Marcel Dekker Inc., New York (2001)
- (7) H. Ikeda and S. Omura: Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.* **97**: 2591-2609 (1997)
- (8) H. Ikeda, T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta and S. Omura: Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9509-9514 (1999)