



Title	好熱菌産物 Bis (2-hydroxyethyl) Trisulfide の生物活性に関する研究
Author(s)	飯田, 健太郎
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46132
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	飯 田 健 太 郎
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 4 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	好熱菌産物 Bis (2-hydroxyethyl) Trisulfideの生物活性に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 三 村 務 (副査) 教 授 真 弓 忠 範 教 授 馬 場 明 道 教 授 田 中 慶 一

論 文 内 容 の 要 旨

著者は、極限条件下に生息する微生物の特殊性に着目し、これら新しい遺伝子資源の医薬あるいは生化学試薬素材としての開発研究を行なっているが、今回好熱菌、好冷菌等、種々の極限微生物の培養液中からマウス白血病細胞株 P388D 1 の増殖抑制を指標にスクリーニングを行なったところ、偏性好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* UK563株から活性成分を見出した。本論文ではその活性成分の分離、構造決定及びその生物活性に関する研究を行なった。

Bacillus stearothermophilus UK563株を連続培養後、培養濾液及び菌体に分離、この培養濾液及び菌体自己消化物について限外濾過を行ない、その低分子画分をさらに液体クロマトグラフィーにより分離・精製した。培養濾液、菌体共に溶出時間26分のピークにP388D 1 の増殖抑制活性を認め、BS-1 と名付けた。

さらに、種々のスペクトル解析により化学構造決定を行なった。マスマスペクトル、高分解能マスマスペクトルの測定から $C_4H_{10}O_2S_3$ という分子式が推測され、 ^1H-NMR 、 $^{13}C-NMR$ 測定結果より、BS-1 の構造を bis (2-hydroxyethyl) trisulfide と決定した。

BS-1 は、種々の培養株化腫瘍細胞の増殖を抑制したが、特にマウス肥満細胞種 P815及びリンパ腫 EL 4 に対し強い増殖抑制作用 ($IC_{50}: 10^{-7} g/ml$) を示した。また、BS-1 は腹腔マクロファージを介した細胞傷害作用を亢進し、細胞傷害性マクロファージを誘導していることが示唆された。そこで、種々のマクロファージ機能を測定したところ、BS-1 によって糖消費、nitric oxide 産生、腫瘍壊死因子産生、インターロイキン1産生、エイコサノイド産生等の亢進が見られ、マクロファージ機能を活性化することを認めた。さらに、*in vivo*での活性化作用としてBS-1 腹腔内投与後の血中腫瘍壊死因子を測定したところ、投与4時間後に増大する結果が得られ、BS-1 は *in vitro*だけでなく *in vivo*においてもマクロファージを活性化していることが示唆された。

このような細胞に対する機能亢進が腹腔マクロファージに対してのみ特異的に生じるものなのか、培養株化細胞について同様の検討を行なった。その結果、BS-1 によってマクロファージ様株化細胞 J774A. 1 において nitric oxide 産生、腫瘍壊死因子産生の亢進が見られた。このことより、BS-1 による細胞増殖抑制作用と細胞機能亢進作用は異なる作用機構に基づくものと推定される。

つぎに、このBS-1のマクロファージ活性化作用機構の解明を目的として、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた遺伝子発現誘導の解析を行なった。20種類のランダムプライマー及び4種類のアンカープライマーの組み合わせにおいて、合計約2万個のバンドの中からBS-1処理により、2個のクローンを見出した。この発現量に

相違の見られたバンドをゲルから切り出し、PCRにより再増幅してTベクターを用いてクローニング、塩基配列の決定を行なったところ、マウスミトコンドリア cytochrome *b* mRNA と相同性を示すクローンが得られた。このクローンをを用いたノーザンブロット分析の結果、BS-1 処理後12時間でその発現は最大となる結果が得られた。bis (2-hydroxyethyl) trisulfide の加硫化反応機構として、極めて反応性の高いパーチルラジカルを反応中間体として生成する報告があること、J774A. 1 存在下 BS-1 が cytochrome *c* を還元することから、BS-1 のマクロファージへの作用機構の一つとしてラジカル生成から誘導される電子伝達系の亢進が関与するものと考えられる。

また、もう一つのクローンは、細胞周期に関連する growth arrest specific gene 3 のC末端側と高い相同性を示す新しいクローンであることを認めた。さらに、このクローンをを用いたノーザンブロット分析の結果、BS-1 処理後2, 24時間でその発現が見られた。

以上より、本論文では次の結論に至った。偏性好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* UK563株から腫瘍細胞の増殖を抑制する物質BS-1 を単離し、その構造を解析したところ bis (2-hydroxyethyl) trisulfide であった。BS-1 は、培養株化腫瘍細胞特にマウス肥満細胞腫 P815及びリンパ腫 EL 4 に対して強い増殖抑制作用 ($IC_{50} : 10^{-7} \text{ g/ml}$) を示した。BS-1 は、細胞傷害性マクロファージの誘導及び糖消費、NO 産生、TNF 産生、IL-1 産生、エイコサノイド産生の亢進等、マクロファージ機能を活性化することを認めた。BS-1 はマクロファージのミトコンドリア cytochrome *b* 及び growth arrest specific gene 3 類似遺伝子の mRNA 発現を誘導した。

論文審査の結果の要旨

本研究は特殊な条件下、とくに好熱状態で生息する好熱性の細菌から抗腫瘍活性物質を得る目的で活性成分の単離、構造決定、活性発現機構について検討を加えたもので、以下の知見を得ている。

1. 偏性好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* UK563株から腫瘍細胞の増殖を抑制する物質BS-1 を単離し、その構造を解析したところBS-1 はbis (2-hydroxyethyl) trisulfide であった。
2. BS-1 は、培養株化腫瘍細胞特にマウス肥満細胞腫 P815及びリンパ腫EL 4 に対して強い増殖抑制作用 ($IC_{50} : 10^{-7} \text{ g/ml}$) を示した。
3. BS-1 は、細胞傷害性マクロファージの誘導及び糖消費、NO産生、TNF産生、IL-1産生、エイコサノイド産生の亢進等、マクロファージ機能を活性化することを認めた。
4. BS-1 はマクロファージのミトコンドリア cytochrome *b* 及び growth arrest specific gene (gas) 3 類似遺伝子の mRNA 発現を誘導した。

以上のように、本論文はBS-1 が新しいタイプの抗腫瘍物質として医薬の開発に大きなインパクトを与えるもので博士論文として価値あるものと認める。