The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ジペプチジルペプチダーゼに対する微生物由来の阻害物質に関する研究
Author(s)	秋山, 哲男
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46550
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

【12】

氏　　名	秋山哲男（あきやま　てつお）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　19905　号
学位授与年月日	平成18年2月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**ジペプチジルペプチダーゼに対する微生物由来の阻害物質に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　山口　明人 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　小林　資正　　教　授　村上　啓寿

論文内容の要旨

生体は各種酵素によって維持されている。酵素に含まれるプロテアーゼは最も研究されている酵素群のひとつであり、生体の維持に必須である。さまざまな疾病においてプロテアーゼの過剰発現または欠損や減少が観察されており、疾病の主因と示唆されているものも多い。

青柳らは微生物培養液中にプロテアーゼ阻害剤を探索し、多くの新規な低分子阻害剤を発見してきた。これらの阻害剤は標的となるプロテアーゼの生理的な役割を明らかにすることが可能となるばかりでなく、治療薬としても期待できた。著者はその研究の一環としてジペプチジルペプチダーゼ（dipeptidyl peptidase、DPP）の阻害剤を微生物培養液中に探索した。

DPPは生体内に4種類存在し、ホルモンなどのポリペプチドのアミノ末端ジペプチドを限定分解し、分解の基質特異性によって分類されている。4種のDPPはアミノ酸相同性が低く、遺伝的に相関性はない。また、細胞内の局在部位もそれぞれ異なっている。

DPP-Iは炎症やアレルギーに関与していることが示唆されている。DPP-IIはその生理的な役割について依然として不明である。DPP-IIIは痛みに関与していることが示唆されている。DPP-IVはインスリン放出因子であるGLP-1不活化の律速酵素であることが証明されている。また、免疫の調節に関与することが示唆されている。これら4種のDPPのより詳細な生理的な役割を解明するために各酵素に選択的な阻害剤が求められている。また、選択的な阻害剤はDPPによって引き起こされる疾病の治療薬として期待できる。

DPP-Iを特異的に阻害する微生物培養液を探索し、放線菌MK117-23F1株がDPP-I阻害物質を産生することを見出し、単離・構造決定し、既知抗菌物質(2*S*,3*S*)-(+)-Aziridine-2,3-dicarboxylateであると同定した。(2*S*,3*S*)-(+)-Aziridine-2,3-dicarboxylateはDPP-Iを中程度阻害し、IC_{50}値は23.7μMであった。また、(2*S*,3*S*)-(+)-Aziridine-2,3-dicarboxylateは他の3種のDPPを100μg/mlにおいて阻害しなかった。

DPP-IIを特異的に阻害する微生物培養液を探索し、*Streptomyces* sp. MJ995-OF5株が新規なDPP-II阻害物質を産生することを見出し、単離・構造決定し、新規な物質を得て、エポスタチン（*N*α-[4-(2-hexyl-1a,2,3,4,4a,7-hexahydro-cyclopent[*b*]oxireno[*d*]-pyrid-7-ylidine)-2-butenoyl]-L-glutamine）と命名した。エポスタチンのDPP-IIに対するIC_{50}値は2.33μMであった。エポスタチンは他のDPPを100μg/mlにおいて阻害しなかった。エポスタチンのDPP-IIに対する阻害様式は、合成基質Lys-Ala-NAに対して拮抗阻害であり、Lineweaver-Burkプロットからエポスタチンの*Ki*値は1.44μMと算出された。

DPP-III を特異的に阻害する微生物培養液を探索し、*Streptomyces* sp. TA-3391 株が新規な DPP-III 阻害物質を産生することを見出し、単離・構造決定し、新規な２物質を得て、フルオスタチン A（1,4-dihydro-6,7-dihydroxy-3-methyl-11*H*-benzo[a]fluorenone-1,4,11-trione）および B（1,2,3,4-tetrahydro-1,2,6,7-tetrahydroxy-3-methyl-11*H*-benzo[a]fluorenone-4,11-dione）と命名した。フルオスタチン A は難溶性のため、ナトリウム塩を調製した。フルオスタチン A および B は合成基質 Arg-Arg-NA の DPP-III による分解を阻害し、その IC_{50} 値は 1.43 および 73.8 μM であった。また、フルオスタチン A および B は他の DPP を 100 μg/ml において阻害しなかった。DPP-III による生体内基質ヒト Leu-エンケファリン分解をフルオスタチン A ナトリウム塩は濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 16.2 μM であった。フルオスタチン A ナトリウム塩による DPP-III に対するヒト Leu-エンケファリン分解阻害の様式は Lineweaver-Burk プロットによって拮抗および非拮抗が混合した阻害様式を示し、フルオスタチン A ナトリウム塩の *Ki* 値は 14.2 μM と算出された。

DPP-IV を特異的に阻害する微生物培養液を探索し、*Streptomyces* sp. MK251-43F3 株が DPP-IV 阻害物質を産生することを見出し、単離・構造決定し、新規な物質を得て、スルフォスチン（3-amino-1-[amino（sulfoamino）phosphinyl]-2-piperidone）と命名した。スルフォスチンの立体構造は共同研究者の阿部らによって合成的に（3*S*、*R*P）であることが明らかとなった。スルフォスチンは DPP-IV を強力に阻害し、その IC_{50} 値は 22.1 nM であった。スルフォスチンは塩基性条件下でエピ化し、3-エピスルフォスチンとの存在比が１：１となる。スルフォスチンは *in vitro* において DPP-IV によるヒト GLP-1(7-36)-amido の分解を強力に阻害し、その阻害活性は臨床開発中の DPP-IV 阻害剤 P32/98 の約 10 倍であり、ジプロチン A の 1000 倍であった。

以上のように生体に４種存在する DPP に対して個々に選択的に阻害する阻害物質を微生物培養液という天然から得ることができた。既知物質であった(2*S*,3*S*)-(+)-Aziridine-2,3-dicarboxylate を除くこれらの阻害物質はそれぞれ既存の阻害剤と異なる特徴的な構造を有しており、各 DPP の生理的な役割を解明するのに役立つばかりでなく、免疫調節剤や２型糖尿病治療薬として期待される。

論文審査の結果の要旨

秋山哲男君の博士論文「ジペプチジルペプチダーゼに対する微生物由来の阻害物質に関する研究」に関して審査を行った。ジペプチジルペプチダーゼは生体内に４種類存在し（DPP-I～IV）、様々な生理活性を担っている。特に、細胞表層に結合したエクトエンザイムである DPP-IV は、ホルモン、サイトカイン、神経ペプチドなどの生理活性を調節しており、その阻害剤は糖尿病を始め多くの疾患に治療効果が期待できる。秋山君は、４種類のジペプチジルペプチダーゼにそれぞれ特異的な阻害剤を微生物培養液中から単離し、その構造決定と性質の検討を行った。このうち、DPP-I 阻害剤アジリジンジカルボン酸は既知の抗菌物質であったが、DPP-II、III、IV の阻害剤は新規物質であり、それぞれ、エポスタチン、フルオスタチン、スルフォスチンと命名した。精製・構造決定・阻害剤としての生化学的性質の決定はそれぞれ定法に従って手堅く行われており、信頼性の高いものである。中でも、スルフォスチンは糖尿病治療薬としての開発に期待が持たれている。完成度が高く、社会的有用性も期待される研究として、本論文は大阪大学大学院薬学研究科博士の学位にふさわしいものと認められる。