

氏 名（本籍） 小 出 芳 夫

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 250 号

学位授与年月日 昭和 60 年 12 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 抗腫瘍抗生物質ネオカルチノスタチン・
クロモフォアに関する研究

（主 査）

論文審査委員 教授 野 副 重 男 教授 曳 野 宏

教授 高 野 誠 一

論文内容要旨

緒言

ネオカルチノスタチン (NCS) は、すでに臨床に用いられている抗腫瘍性抗生物質である。その化学構造は、長い間単純タンパク質と考えられていた。

筆者は、NCSが単純タンパク質ではなく、低分子のクロモフォア物質 (NCS-chr) と、アポタンパク (apo-NCS) からなる複合タンパク質であることを発見し、このNCS-chrの単離、精製、その化学構造、生物活性および apo-NCSとの結合様式等を解明することを目的として、研究を行った。

第1章 NCS-chrの発見

NCSは、*Streptomyces carzinostaticus* var F-41の培養濾液から得られるが、その培養濾液中には、NCSとまったくおなじアミノ酸組成、分子量を示すが、NCSの生物活性を持たないプレネオカルチノスタチン (Pre-NCS) を副生する。

筆者は、紫外線を照射させたNCSとPre-NCSおよびNCSの三者の性状を比較した。

NCSは、紫外線照射すると、抗菌活性を失い、Pre-NCSに類似した紫外吸収スペクトルを示し (Fig. 1)、またセファデックスG-25クロマトグラフィーで低分子物質の遊離を確認した (Fig. 2)。

このことにより、NCSは、考えられていたような単純タンパク質ではなく、タンパク部分 (apo-NCS) 以外に、活性に関与と思われる低分子物質 (NCS-chr) が存在することを見いだした。

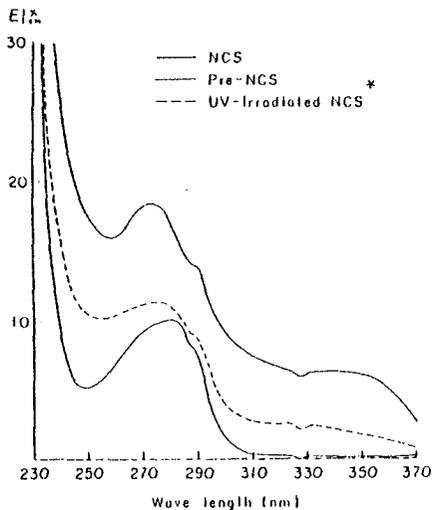


Fig. 1. UV Absorption Spectra of NCS, Pre-NCS and UV-irradiated NCS

* NCS in 1 mg/ml solution was treated with UV irradiation for 10 minutes at $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ followed by dialysis against distilled water for 8 hours in 4°C .

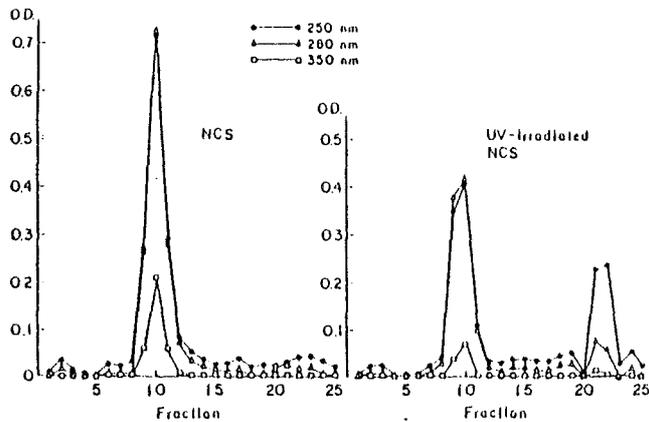


Fig. 2. Gel Filtration of NCS and UV-irradiated NCS

Half ml samples of NCS and UV-irradiated NCS (10-minutes irradiation) were applied on the Sephadex G-25 column (bed volume 10 ml) and eluted with PBS. Half ml fraction were collected from the left to right and measured of the UV absorption at 250 nm, 280 nm and 350 nm.

第2章 NCS- γ -chr の単離・精製

NCS- γ -chr は、冷暗所で、NCS粉末から、0.1N-塩酸：メタノール（1：10）により抽出した（不溶の沈殿は、apo-NCS）。抽出したNCS- γ -chr は、逆相系のシリカゲルクロマトグラフィーにて精製した。精製NCS- γ -chr は、生物活性を保持し、HPLC的にほぼ単一の淡黄色粉末として得た（NCS- γ -chr II と称す）。

このNCS- γ -chr II の物性を測定した結果、天然のNCSクロモフォア（NCS- γ -chr I）に塩化水素が付加した物質であることが判明した。天然のNCS- γ -chr I は、NCS粉末から酢酸にて抽出した。

またNCS生産菌は、 Mg^{++} を多量に含む培地で長時間培養すると、通常の培養条件下では、存在しない遊離のNCS- γ -chr が生産されていることを確認した。

一方、NCS- γ -chr を抽出したあとの apo-NCS は、CMセルロースクロマトグラフィーで精製した。そして培養濾液中に副生する Pre-NCS と比較すると、apo-NCS は、アミノ酸組成、分子量、等電点が Pre-NCS と同一であることを確認した。

第3章 NCS-chrの化学構造

NCS-chrの部分構造は、まず分解によって得られる分解産物を同定することにより、ナフタレンカルボン酸誘導体及びアミノ糖を確認した。

次いで、NCS-chrの全構造は、FAB-MS、元素分析値の結果から、組成式は $C_{35}H_{33}NO_{12}$ と推定した。さらにNMRの選択デカップリング、 1H - 1H デカップリング、NOE、LSPDのスペクトルを詳細に検討して、NCS-chrは、ナフタレンカルボン酸、N-メタルフコサミン、炭酸エチレンおよびエポキシドを置換基にもつ bicyclo [7, 3, 0] dodecadiyne 系の新規化合物であることを推定した (Fig. 3)。またNCS-chr II の塩化水素の付加位置も併せて推定した。

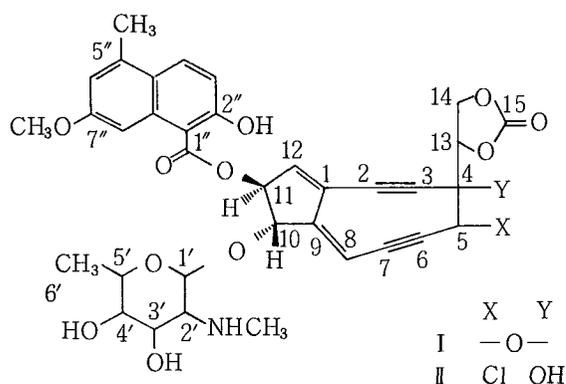


Fig. 3. Total Chemical Structure of NCS-chr

第4章 NCS-chrの生物活性

NCS-chr, apo-NCSおよびNCSについて、抗菌活性、抗腫瘍活性、急性毒性等について検討した。その結果、NCSのもつ直接的な作用すべてが、NCS-chrにあり、apo-NCSには、そのような作用は認められなかった (Table I)。

Table I Biological Activities of NCS-chr II, Apo-NCS and NCS

	NCS-chr II	apo-NCS	NCS
Antibacterial activity <i>M. luteus</i> (MIC, $\mu\text{g}/\text{ml}$)	12.5	> 100	3.1
Antitumor activity Yoshida sarcoma (MED, mg/kg)	0.1	> 100	0.05
Acute toxicity in mice (iv, LD_{50} , mg/kg)	1.8	> 100	1.5
Immunological activity	ND	+	ND

ND : not determined

以上の事実から、NCSの活性本体は、NCS-chr 部分に存在することが明らかになった。しかし、NCS-chr II 単独では、その作用はNCSよりも弱く、apo-NCSの共存下で、NCSと同等まで上昇することから、apo-NCSは、NCS-chr の安定化、活性化の役割を担っていると考えられる。

なお、apo-NCSは、単独で、SRBC-マウスの系において、液性免疫能をもっていることも明らかになった。

第5章 NCS-chr と apo-NCSの結合

NCS-chr と apo-NCSは、モル比1：1，pH 5.0，37℃，24時間インキュベートすることにより、NCSに容易に再構成された。さらに、apo-NCSのトリプシン分解で得た疎水性側鎖やカルボキシル基に富む43個のアミノ酸からなるフラグメント(70-113)でもNCS-chrと結合可能であった。一方NCSからのNCS-chrの遊離は、塩基性および、SDS，尿素等の蛋白変性剤の添加により促進された。

これらの事実より、NCS-chr と apo-NCSの結合は、共有結合ではなく、イオン結合および疎水結合が重要であると推定された。

結 語

NCSは、従来考えられていたような単純タンパク質ではなく、NCS-chr と apo-NCS の2成分からなることを発見した。そして、このNCS-chrの構造をNMR，MS等の解析から、bicyclo〔7, 3, 0〕dodecadiyne 骨格をもつ新規化合物であることを推定した。

さらに、生物活性の比較から、NCS-chrは、NCSのもつ直接的な生物活性を担っている活性本体であり、apo-NCSは、NCS-chr とモル比1：1で非共有結合で結合し、NCS-chrの安定化、活性化等に関与しているタンパク質であることを明らかにした。

本研究の成果が、NCSの今後の研究の発展、たとえば、より安定で実用的な誘導体の合成等に示唆を与えることができれば幸甚である。

審査結果の要旨

ネオカルチノスタチン (Neocarzinostatin, NCS) は、1 放線菌 *Streptomyces carzino-staticus* 株の培養濾液から発見された抗腫瘍性抗生物質であり、現在すい臓癌、胃癌、急性白血病、膀胱癌等に広く臨床応用されている最初の高分子抗生物質である。その作用機序に関しても、すでに数多くの研究者によって報告されている。

ネオカルチノスタチンは、長い間、単純タンパク質と考えられていたが、その分子中に非タンパク性のクロモフォアを含む低分子化合物が存在することが見出された。本論文はこのクロモフォアの単離、化学構造の決定、生物活性についての研究を行ったものである。

まず最初に放線菌より得た NCS 粉末を HCl : MeOH 抽出および酢酸抽出でクロモフォアとタンパク部分に分離し、クロモフォアはさらに LH-20 および ODS クロマトグラフィー等により精製した。クロモフォア部分は、タンパク中に含まれる場合には安定であるが、単独に分離すると極めて不安定であり、その化学構造の決定は、安定な化学的分解産物が得られないこともあって難行した。しかし精製されたクロモフォアの各種機器データ、例えば UV スペクトル、IR スペクトル、FAB マススペクトル、NMR スペクトル等の詳細な解析を行う間、徐々にその化学構造は明らかになり、中でも近年非常な発達をとげた高磁場核磁気共鳴スペクトル (400 メガヘルツ) を駆使することにより、最終構造を明らかにすることができた。その化学構造は、従来全く例を見ない新規な bicyclo [7, 3, 0] dodecadiyne 骨格中の水酸基にナフタレンカルボン部と N-メチルピコサミンとが結合したものであることを初めて明らかにした。

一方、クロモフォアおよびタンパク部分の抗菌活性、抗癌性、毒性等の生物活性を比較したところ、NCS の活性は、すべてクロモフォアが担っていること、タンパク部分はクロモフォアを安定化、活性化していることを明らかにした。

以上のように、本論文は抗腫瘍性抗生物質ネオカルチノスタチンの化学構造、生物活性等の全貌を明らかにしたものであり、博士論文として十分な内容を含んでいると判定します。