

|             |  |      |              |
|-------------|--|------|--------------|
| 氏 名 (本 籍)   | いそ だ ひろ こ<br>磯 田 博 子 (埼 玉 県)   |      |              |
| 学 位 の 種 類   | 博 士 (農 学)  |      |              |
| 学 位 記 番 号   | 博 乙 第 1,454 号  |      |              |
| 学位授与年月日     | 平 成 10 年 10 月 31 日   |      |              |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 4 条 2 項該当  |      |              |
| 学 位 論 文 題 目 | Induction of Differentiation of Animal Cells by Microbial Extracellular Glycolipids<br>(微生物産生糖脂質による動物細胞分化誘導) |      |              |
| 主 査         | 筑波大学教授   | 農学博士 | 中 原 忠 篤      |
| 副 査         | 筑波大学教授   | 工学博士 | 松 村 正 利      |
| 副 査         | 筑波大学併任教授   | 薬学博士 | 三ッ井 洋 司      |
|             | (工業技術院生命工学工業技術研究所)   |      |              |
| 副 査         | 筑波大学教授   | 理学博士 | 斎 藤 建 彦      |
| 副 査         | 筑波大学助教授  | 農学博士 | オボンナ J. チュクマ |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

糖脂質の多くは生体膜の主要な構成成分であり、動物細胞では、細胞の膜抗原、血液型物質、相互識別など重要な膜機能との関連が注目されている。近年、スフィンゴ糖脂質に属するある種のガングリオシドや中性糖脂質が、外来性で白血病細胞や神経芽腫細胞を分化誘導することが見出され、医薬品としての応用も期待される。一方、微生物が比較的多量の糖脂質を菌体外に蓄積することが報告され、バイオサーファクタントとしての応用が検討されている。

本研究では、微生物産生糖脂質の生理学的機能に着目し、主に動物細胞を用いた生理活性の検索が行われた。用いた糖脂質は、Succinoyl trehalose lipid (STL) -A, B, Mannosylerythritol lipid (MEL) -A, B, Polyol lipid (PL), Rhamnolipid (RL) および Sophorose lipid (SL) の 7 種類である。検索の結果、これらの糖脂質がヒト白血病細胞株やラット神経系細胞株の分化誘導を引き起こすことが見出された。そこで、糖脂質の構造と分化誘導活性の相関を物理化学的および生物学的視点から検討し、さらに、細胞内情報伝達系を調べることにより作用機作の解明を目指した。以下にその概要を述べる。

1. 3 種類のヒト骨髄性白血病細胞株 K562, KU812 および HL60 において、RL を除いた 6 種類の糖脂質に分化誘導活性が認められた。STL-B, PL および SL については、分化方向における特異性は認められなかったが、STL-A はいずれの細胞も単球系に、MEL-A および MEL-B は顆粒球系に分化を誘導した。6 種類の糖脂質による処理細胞はいずれも有意に NTB 還元能が上昇し、in vivo のプロテインキナーゼ C 活性が抑制された。また、STL-A 処理によって、ガングリオシド GM3 が著しく増加することが観察された。GM3 は、単球系分化の際に細胞膜表面で特異的に増加し、外来性でも単球系の分化を引き起こすことが既に報告されており、STL-A は GM3 を介して二次的に脱ガン化を引き起こしたと考えられた。一方、MEL-A はインシュリンレセプターである 95Kd と 135Kd のタンパクのチロシン残基および 30Kd タンパクのセリン・スレオニン残基のリン酸化を阻害した。これらのことから、MEL-A は、インシュリンレセプターチロシンキナーゼを阻害し、インシュリン依存性の増殖抑制と分化を誘導すると推論された。

2. ヒト由来肺癌細胞株 3 種、胃癌細胞株 2 種および乳癌細胞株 1 種に対する PL の抗腫瘍活性を調べた。PL はヒト肺癌細胞株 A549 の増殖を抑制し、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性を阻害した。増殖抑制効果は PL の

臨界ミセル濃度 (CMC) 以下では認められず、CMC を越えた濃度で著しい細胞増殖抑制活性を示した。また、フローサイトメトリーによる DNA 解析の結果、G0-G1期の細胞の集積が経時的に認められた。これらの結果に基づいて、PL による A549細胞の PKC 抑制を介した細胞周期の G0-G1期での停止は、ミセルを形成した PL が細胞膜流動性を促進し、それが引き金となっていると推論された。

3. ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12細胞は、神経成長因子 (NGF) により神経突起を伸ばし、神経細胞に分化することが知られている。本細胞を用いて各種糖脂質の分化誘導能を調べた結果、MEL-A 処理により PC12細胞に神経突起の伸展と考えられる形態変化が認められ、その効果は、NGF と MEL を同時に処理した場合に著しく増大した。その際、分化マーカーであるアセチルコリンエステラーゼも NGF 処理と同様有意に上昇した。これらの現象に基づいて、MEL-A による神経細胞分化の誘導機構に関し予備的な検討を進め、低親和性 NGF レセプターを介さない機構の存在を示唆する結果を得た。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は微生物が産生する菌体外糖脂質の動物細胞分化誘導活性に関し基礎的知見を得ることを目的としている。

Succinoyl trehalose lipid (STL) -A, B, Mannosylerythritol lipid (MEL) -A, B, Polyol lipid (PL), Rhamnolipid (RL) および Sophorose lipid (SL) の 7 種類の糖脂質について、ヒト白血病細胞株、ヒト由来腫瘍細胞株およびラット神経系細胞株に対する分化誘導活性の検索を行った結果、RL を除く 6 種類の糖脂質に当該活性を確認した。この発見は世界に先駆けて行われたものであり、独創性が極めて高いといえる。そこで、これらの糖脂質の化学構造と白血病細胞株に対する分化誘導活性との相関について検討を進め、糖脂質の構造の違いによって分化の方向が異なることを明らかにした。さらに、分化誘導の機構についても予備的な検討を行い、STL-A はガングリオシド GM3 を介して白血病細胞株を二次的に脱ガン化すると考えられること、MEL-A はインシュリンレセプターチロシンキナーゼを阻害し、白血病細胞株のインシュリン依存性の増殖抑制と分化を誘導すると考えられることなど興味ある考えを提出した。続いて、PL の抗腫瘍活性を調べ、PL がヒト肺癌細胞株の増殖を抑制し、プロテインキナーゼ C 活性を阻害すること、PL の増殖抑制効果に臨界ミセル濃度が関与することを明確にした。さらに、MEL-A がラット神経系細胞株 PC12 の分化誘導を引き起こし、神経突起の伸展とみられる形態的变化を認めた。この分化誘導機構を明らかにするために予備的な検討を進めた結果、低親和性神経成長因子 (NGF) レセプターを介さない機構の存在を示唆した。

本研究は、微生物産生糖脂質が動物細胞分化誘導活性を有することを発見し、これら糖脂質の分化誘導のメカニズムの解明にあたって新しい知見を加えており、基礎・応用の両面から高く評価できる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。