

氏名(本籍)	しのざき たじり ゆきこ 篠崎(田尻)由紀子(東京都)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3365号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	シデロフォアの新規生理活性とその利用

主査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学教授	工学博士	國府田悦男
副査	筑波大学教授	薬学博士	熊谷嘉人

論文の内容の要旨

マトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinases:MMP)は、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを特異的に分解する金属要求性プロテアーゼの総称である。MMPは生体組織の構築や恒常性の維持に重要な役割を果たす一方、そのうちの幾つかは、ガン転移や皮膚の老化などに関与することが近年明らかとなり、MMP阻害剤に関する研究が広く行われる様になった。これまでに報告されているMMP阻害剤はヒドロキサム酸等を有し、これがMMPの活性中心にある Zn^{2+} に配位結合してキレート活性を示す事により阻害が起きるが、その多くは化学合成品あるいは植物や酵母由来の化合物であり、微生物由来のMMP阻害剤に関する知見は極めて少ない。

本論文は、微生物由来の化合物である金属キレーター(シデロフォア)に着目し、その Zn^{2+} キレート活性およびMMP阻害活性について研究したものである。主たる研究目的は、シデロフォアの新規生理活性としての Zn^{2+} キレート活性およびMMP阻害活性を明らかにする事であり、併せてこれら活性とシデロフォアの構造との関連性を明らかにし、微生物由来の新規MMP阻害剤開発のための知見を得ることも重要な課題とした。

まず、土壌サンプルより約90株のシデロフォア生産菌を単離し、各菌株の培養上清のMMP阻害効果を調べた結果、19株の培養上清がMMP阻害効果を示した。このうち8株は、BIOLOGによる同定の結果、*Pseudomonas*属細菌と高い相同性を示し、蛍光性*Pseudomonas*に特徴的なpyoverdineタイプのシデロフォアを生産している事が示された。

Pyoverdineは、発色団とそれに結合したコハク酸またはコハク酸アミド等の側鎖およびペプチド部分より構成される。これまでにpyoverdineのMMP阻害効果を調べた報告例は無いため、取得した菌株の培養上清よりpyoverdine粗サンプルを調製し、そのMMP阻害効果について検討を加えた。また、各粗サンプルの成分を調べるため、LC-MS分析を行った。その結果、選抜した19株のうち8株の粗サンプルには、互いに分子量の異なるpyoverdineが含まれており、これらpyoverdineを含む全てのサンプルが、比較的高いMMP阻害効果を示した。また、粗サンプルの Zn^{2+} キレート活性とMMP阻害率の関係を調べた結果、正の相関関係が認められた。以上の結果より、pyoverdineがMMP活性中心にある Zn^{2+} をキレートすることに

より MMP 活性を阻害している可能性を示した。

さらに、単離株の一つである 113A1 株を用い、またコントロールとして *P. aeruginosa* PAO1 株(以下 PAO1 株)を用いて pyoverdine を精製し、pyoverdine の構造、 Zn^{2+} キレート活性と MMP 阻害効果との相関関係を検討した。その結果、発色団とペプチド部分が同一である pyoverdine では、側鎖の違いがキレート活性に影響することが示唆された。しかし、異なるペプチドを有する 113A1 株と PAO1 株の pyoverdine を比較した場合、113A1 株ではコハク酸を、PAO1 株ではコハク酸アミドを有する pyoverdine が高い Zn^{2+} キレート活性を示し、側鎖の種類とキレート活性の強さには相関性が認められなかった。以上の結果より、ペプチドと側鎖の相互作用が pyoverdine のキレート活性を決定すると推察した。これまでのところ、pyoverdine の構造と Zn^{2+} キレート活性の関連性は報告されておらず、従って、本論文で得られた知見は微生物由来の新規 MMP 阻害剤の開発において重要であるといえる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

マトリックスプロテアーゼ (MMP) は生体組織の構築や恒常性の維持に重要な役割を果たすと同時に、ガン転移や皮膚の老化などとも関連することから、その阻害剤に関する研究が広く行われる様になり、これまでに化学合成品あるいは植物・酵母由来でヒドロキサム酸等を有する化合物が MMP 阻害剤として報告されている。しかしながら、大量調製の面で有利である微生物由来の MMP 活性阻害物については殆ど報告されていない。本論文の著者は、以上の点に注目し、微生物由来で MMP 阻害活性を有している化合物について研究を行った。その結果、以下の重要な科学的知見を得ている。①金属キレート活性を有するシデロフォアに着目して本生産菌株を自然界から多数単離し、さらにそれらの培養上清の MMP 阻害効果をゼラチンザイモグラフィーで簡便に判定することにより、効率的に MMP 阻害効果を示す菌株の選抜・取得に成功した。②取得した菌株の培養上清よりシデロフォア粗サンプルを調製してその成分を分析し、取得した菌株のうち約半数のサンプルについては、蛍光性 *Pseudomonas* が特異的に生産する pyoverdine タイプのシデロフォアであることを示し、pyoverdine が MMP 阻害効果を示すことを初めて見出した。③代表株を用いて pyoverdine の精製を行い、pyoverdine の構造、 Zn^{2+} キレート活性および MMP 阻害効果の関連性を検討し、阻害効果が pyoverdine の Zn^{2+} キレート活性と相関することを実証した。また、pyoverdine のペプチド部分及び側鎖の相互作用が Zn^{2+} キレート活性に影響する可能性を示し得た。

これらの成果は、医薬・化粧品工業分野のみならず、微生物機能の開発分野からも高く評価出来る。

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。