

新規制癌抗生物質ラクトキノマイシン
に関する研究

岡 部 隆 義

目 次

緒論	1
第1章 スクリーニング系	3
序	3
第1節 実験方法	4
第2節 結果	6
第3節 小括及び考察	7
第2章 ラクトキノマイシンの発見	8
序	8
第1節 ラクトキノマイシン生産菌の菌学的性状	9
第2節 ラクトキノマイシンの生産	1 2
第3節 ラクトキノマイシンの単離、精製	1 5
第4節 小括及び考察	1 7
第3章 ラクトキノマイシンの構造	1 8
序	1 8
第1節 ラクトキノマイシンAの物理化学的性状	1 9
第2節 ラクトキノマイシンAの構造解析	2 1
第3節 ラクトキノマイシンBの物理化学的性状	3 4
第4節 ラクトキノマイシンBの構造解析	3 6
第5節 小括及び考察	4 4
第4章 ラクトキノマイシンの生物活性	4 6
序	4 6
第1節 ラクトキノマイシンの抗菌、抗カビ活性	4 7
第2節 ラクトキノマイシンの細胞毒性	4 9

第3節	ラクトキノマイシンの抗腫瘍効果	5 1
第4節	ラクトキノマイシンの急性毒性	5 3
第5節	小括及び考察	5 4
第5章	ラクトキノマイシンの作用機作	5 6
	序	5 6
第1節	高分子合成への影響	5 7
第2節	D N Aとの作用	5 9
第3節	膜への作用	6 7
第4節	電子伝達系への干渉	7 2
第5節	radicalの発生	7 8
第6節	生体内S Hとの反応	8 6
第7節	細胞内カルシウム濃度への影響	9 1
第8節	小括及び考察	9 4
第6章	ラクトキノマイシンの感受性を支配する細胞内因子	9 6
	序	9 6
第1節	ラクトキノマイシンの細胞内への取り込み	9 7
第2節	ラクトキノマイシン還元酵素	9 9
第3節	細胞内glutathione量	1 0 1
第4節	小括及び考察	1 0 3
	総括	1 0 4
	謝辞	1 0 6
	参考文献	1 0 7

緒論

近年、白血病、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍に対する癌化学療法は著しく進歩し、治癒と考えられる症例もではじめている。その一方、再発や転移の際には以前きいていた制癌剤がきかなくなる事が多く、制癌剤耐性細胞が出現していると考えられる。しかもこの場合化学構造の異なる、従って作用機作も異なる制癌剤に対しても同時に耐性を示す、いわゆる多剤耐性細胞¹⁾であることが多く見受けられる。制癌剤耐性の問題を克服できれば、癌化学療法は著しく向上するものと期待される。

多剤耐性の機構としては、生化学レベルの研究から、耐性細胞に於ける薬剤のactive effluxの昂進²⁾が観察されている。また分子レベルの研究からはP-glycoprotein^{3,4)}あるいはgp-170と称される膜タンパクが耐性細胞にのみ出現しているのが認められている。昨年このタンパクの遺伝子mdr⁵⁾がクローニング⁶⁾され、mdrを薬剤感受性細胞に導入すると細胞が耐性になることが示され⁷⁾、P-glycoproteinと多剤耐性との関係^{8,9)}が明らかになって来た。またmdr geneのシークエンスの解析^{10,11)}からbacteriaのtransport proteinとの類似性¹²⁾が指摘され、その機能についても、解明されつつある。

一方耐性癌細胞の問題を克服する方法としては、その物質自体は制癌効果を示さないが、併用する事によって、薬剤耐性癌細胞を感受性細胞にする物質を探す、いわゆる併用療法の道と、それ自身で耐性癌細胞にも有効な物質を探索する方法とが考えられる。

併用療法の観点からは、鶴尾等のCa²⁺ antagonist, verapamil¹³⁾、桑野等の合成イソプレノイド¹⁴⁾、稲葉等の非制癌性 vinca alkaloid,

anthracycline aglycone などの研究が知られ、これらはin vitroのみならず、in vivo¹⁵⁾でもその有効性が示されている。

筆者はもう一つの、耐性癌細胞にも有効な物質を探索するという観点にたち、耐性癌細胞をスクリーニング系に用いて、放線菌を中心する微生物およそ2000株の代謝産物をスクリーニングした。その結果新規制癌抗生物質ラクトキノマイシン(lactoquinomycin, LQM)A,Bを発見した。

本論文は、ラクトキノマイシンの単離、精製、構造解析、生物活性、作用機序に関する研究をまとめたものであり、その大意は下記の筆者等の文献に記載されている。

J.Antibiotics 38: 1327-1332, 1985

J.Antibiotics 38: 1333-1336, 1985

J.Antibiotics 39: 1-5, 1986

第 1 章 スクリーニング系

序

耐性癌細胞にも有効な物質を探索すべく、耐性癌細胞をスクリーニング系に用いて、放線菌を中心とする微生物およそ2000株の代謝産物をスクリーニングした。その結果IM8442T株の培養液中に目的とする活性物質を見出した。

第1節 実験方法

1 微生物の培養

土壌より微生物を分離し、放線菌はoatmeal液体培地(oatmeal 2%, yeast ext. 0.1%, pH 7.2)を用いて27°Cで4日間、細菌はheart infusion液体培地(Difco, pH7.4)を用いて37°C2日間振とう培養した。

2 検定液の調整

上記培養液10 mlに等量のacetoneを加え、vortex mixerにて30秒撹はん後、遠心(3,000 rpm x 10 min)する。上清200 μ lを小試験管にとり、デシケーター中真空ポンプにて溶媒をとばす。残さを蒸留水200 μ lにとかし検定液とする。

3 アッセイ

マウスT細胞リンパ腫L5178Y細胞の親株(L5178Y/S)とそのadriamycin耐性株¹⁶⁾(L5178Y/ADM)に対する細胞毒性を測定した。細胞の培地にはRPMI 1640 + 10% horse serumを用いた。96穴のmicroplate (Corning)に 1×10^5 cells/mlのL5178Y/S細胞あるいはL5178Y/ADM細胞を180 μ lずつ分注し、これに上記の検定液、及びその5倍希釈液を20 μ lずつ加える。37°C, 5% CO₂ + 95% airで2時間incubationした後、1 μ Ci/ml [³H] thymidine 20 μ lを加え、更に1時間incubationを続ける。細胞はcell harvester(アベ科学)を用いてglassfiber filter (Whatman, GF/C)上に集め、PBS (phosphate buffered saline), ice-cold 5% TCA (trichloroacetic acid)で洗浄後乾燥した。filterのradioactivityはtoluene scintillator(2,5-di-

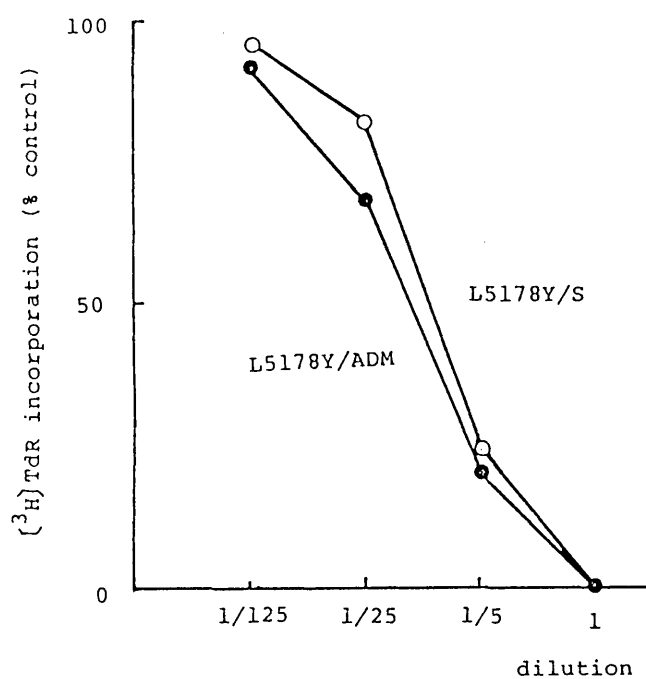
phenyloxazole 4.0 g , 1,4-bis-2-(5-phenyloxazole)-benzen 0.1 g ,
toluene 1 L) 中 liquid scintillation counter (Packard 3225) にて測定し
た。L5178Y/ADM細胞に対してL5178Y/S細胞に対するよりも強い、ある
いは同等の [^3H] thymidine 取り込み阻害を示す検定液を有効と判定した。

[methyl- ^3H] thymidine (25 Ci/ml) Amersham

第2節 結果

放線菌約 1400株、細菌約 500株をスクリーニングした。その結果、IM8442T株の培養液中に目的とする活性物質が含まれる事を見出した(Fig. 1-1)。IM8442T株の培養ろ液はL5178Y/ADM細胞に対しL5178Y/S細胞に対するよりも若干ではあるがより強い取り込み阻害を示した。

Fig. 1-1 Effect of strain IM8442T broth filtrate on the incorporation of (^3H)-thymidine into L5178Y/S or L5178Y/ADM cells



第3節 小括及び考察

本スクリーニング系に用いたL5178Y/ADM¹⁸⁹細胞はTable 1-1に示すように、adriamycinのみならず、他の anthracycline 系抗生物質や、actinomycin D, vinca alkaloidとも交差耐性を示す典型的な多剤耐性細胞である。

L5178Y/ADM細胞の既知抗生物質に対する感受性を調べたが、L5178Y/Sよりも、L5178Y/ADM細胞により強い細胞毒性を示す物質は見あたらなかった。この点からIM8442T株の産生する抗生物質は新規である可能性が高く、以下物質の単離、精製、構造解析を行なった。

Table 1-1 Drug sensitivity of an adriamycin-resistant subline of mouse lymphoblastoma L5178Y cells in comparison with that of the parental cell line.

Antibiotics	IC ₅₀ (μg/ml) for		Degree of* resistance
	Parental	Resistant	
Adriamycin	0.01	0.2	20
Daunorubicin	0.01	0.2	20
Baumycin A ₁	0.004	0.08	20
Baumycin A ₂	0.004	0.08	20
1-Deoxypyrrromycin	0.03	0.12	4
MA144-S1	0.01	0.12	12
Aclacinomycin A	0.01	0.02	2
Aclacinomycin B	0.01	0.02	2
Aclacinomycin Y	0.01	0.02	2
Pyrromycin	0.04	0.04	1
Musettamycin	0.004	0.008	2
Cinerubin A	0.006	0.006	1
Bleomycin A ₂	0.7	0.8	1
Mitomycin C	0.06	0.08	1
Actinomycin D	0.0005	0.001	2
Neothramycin	0.15	0.15	1
Blasticidin S	1.0	1.2	1

* The resistance is expressed as ratio of IC₅₀ values for resistant to parental cell line.

第2章 ラクトキノマイシンの発見

序

ラクトキノマイシン生産菌IM8442T株は、1984年10月、神奈川県平塚市の土壌より採取されたものである。本章ではIM8442T株の菌学、ラクトキノマイシンの培養生産、単離、精製について述べる。

第1節 ラクトキノマイシン生産菌の菌学的性状

1 生産菌の形態的特徴

IM8442T株をyeast-malt agar培地で、生育させた後、形態を顕微鏡にて観察した。気菌糸は比較的長く、やや曲がっている。成熟した孢子鎖は20個以上の孢子よりなり、孢子は円筒状($0.4-0.6 \times 1.0-1.3 \mu\text{m}$)で表面は滑らかである(Fig. 2-1)。典型的な輪生枝は認められない。

2 培養基上の特徴

IM8442T株を種々の培養基に植え、27°Cで3,7,14,21日間培養した後、観察を行なった。色の記載は"Color Harmony Manual"¹⁷⁾によった。成熟した気菌糸の色はGray series¹⁸⁾に属する。ある種の培地では、メラニン様色素及び、黄かっ色の可溶性色素を作る。各種培地上、27°C,2週間培養した時の本菌の特徴はTable 2-1に示した通りである。

3 生理学的性状

本菌株は、yeast-malt agar培地上10-37°Cの範囲で生育し、至適温度は27-30°Cである。またoatmeal agar培地上では20-37°Cで生育し、至適温度は20-30°Cであった。

炭素源の利用性の検討はPridham-Gottliebの方法¹⁹⁾によった。炭素源としては、D-glucose, L-arabinose, D-xylose, galactose, salicinを利用した(Table 2-2)。他の生理学的特徴はTable 2-3に示した。

細胞壁成分をBecker等の方法²⁰⁾で分析した結果、L,L-diaminopimelic acid を含む事が判明した。この事より本菌株は Tape I に分類され、

*Streptomyces*属に帰属された。

4 生産菌の分類

以上の形態、培養上の特徴及び生理学的性状から、IM8442T は *S. tanashiensis*, *S. nashvillensis*, *S. violaceorectus* に類縁であることが示唆された。²¹⁾ISP標準菌株ISP5195(IMC S-0302), ISP5314(IMC S-0342) 及びISP5279(IMC S-0349)と比較した結果IM8442T株は*S. tanashiensis*に属する事が分かった。

Fig. 2-1 Electron microphotograph of spore chains of strain IM8442T (tyrosine agar, 27°C, 10-day culture).
The inserted scale is 1 μ m.

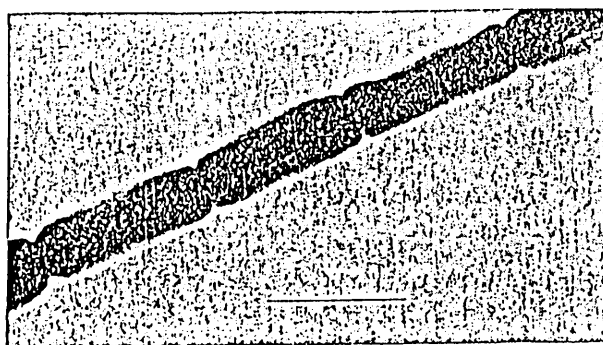


Table 2-1 Cultural characteristics of strain IM8442T.

Medium	Growth	Aerial mycelium	Reverse	Soluble pigment
Sucrose - nitrate agar	Moderate	Poor, powdery; pale yellow (2ca)	Pale yellow (2ca)	None
Glucose - asparagine agar	Poor	Moderate, powdery; pale yellow (2ca)	White (a)	None
Glycerol - asparagine agar (ISP-5)	Moderate	Good, velvety; light brownish gray (3fe) & gray (d)	Dull yellow (2ne)	None
Inorganic salts - starch agar (ISP-4)	Good	Good, velvety; pale yellowish brown (2fe) & light brownish gray (3fe)	Pale yellowish brown (2ec)	None
Tyrosine agar (ISP-7)	Good	Abundant, floccus; light brownish gray (3fe) & pale yellowish brown (2fe)	Pale yellowish brown (2ie)	Dark brownish gray (3nl)
Nutrient agar	Poor	Poor, powdery; pale yellow (2db)	Pale yellow (1½ ca)	None
Yeast extract - malt extract agar (ISP-2)	Good	Good, velvety; light brownish gray (3fe), gray (d) & pale orange (5dc)	Grayish yellow brown (3ni)	Dark brownish gray (3nl)
Oatmeal agar (ISP-3)	Good	Good, powdery; light brownish gray (5fe)	Light brownish gray (3ge)	Dark brownish gray (2nl)

Incubation at 27°C for 2 weeks.

Color and number in parenthesis followed the color standard .

Table 2-2 Utilization of carbon sources by strain IM8442T.

Growth	Carbon source
Positive	D-Glucose, L-arabinose, D-xylose, galactose, salicin
Negative	Sucrose, D-fructose, raffinose, rhamnose, inositol, D-mannitol

The basal medium used was ISP medium 9.

Table 2-3 Physiological properties of strain IM8442T.

Property	Medium
Starch hydrolysis	Positive Inorganic salts - starch agar
Gelatin liquefaction	Positive Glucose - peptone - gelatin
Milk coagulation	Negative Skim milk
Milk peptonization	Positive Skim milk
Melanoid pigment production	Positive Tryptone - yeast extract broth, peptone - yeast extract - iron agar
H ₂ S production	Negative

第2節 ラクトキノマイシンの生産

1 培養条件

培地にはoatmeal-yeast ext.液体培地を用いた。

oatmeal	(日食オーツ)	20 g
yeast ext.	(オリエンタル酵母)	1 g
ion exchanged water		1 L
pH 7.2		

500 ml坂口フラスコに上記培地100 mlを分注し、滅菌後植菌する。培養は27°C,180 strokes/minで4日間振とう培養した。

2 ラクトキノマイシンの検出

培養液中のLQM-A,Bの検出には以下のHPLC システムを用いた。

column	Nucleosil 5 C ₁₈ (8 φ x 200 mm)
mobile phase	H ₂ O-CH ₃ CN-CH ₃ COOH (70:30:1)
flow rate	2.0 ml/min
detection	UV 260 nm
temperature	r.t.

この条件でLQM-A,Bの保持時間は各々15分,13分であった(Fig. 2-2)。

3 培養経過

坂口フラスコでの培養で、LQM-A,Bの産生と培養時間との関係を調べた。培養開始後、所定の時間ごとにサンプリングし、遠心上清を前述のHPLCシステムにて分析した。LQM-A,Bの量は、HPLCのピークの高さで示した。

LQM-Aは培養開始後30時間で産生され始め60-80時間で最高に達した後、緩やかに減少した。一方LQM-Bは90時間以降にようやく産生され始めた。

Fig. 2-2

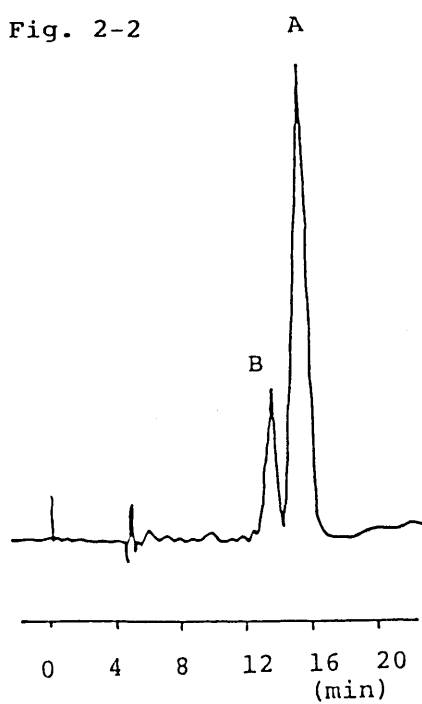
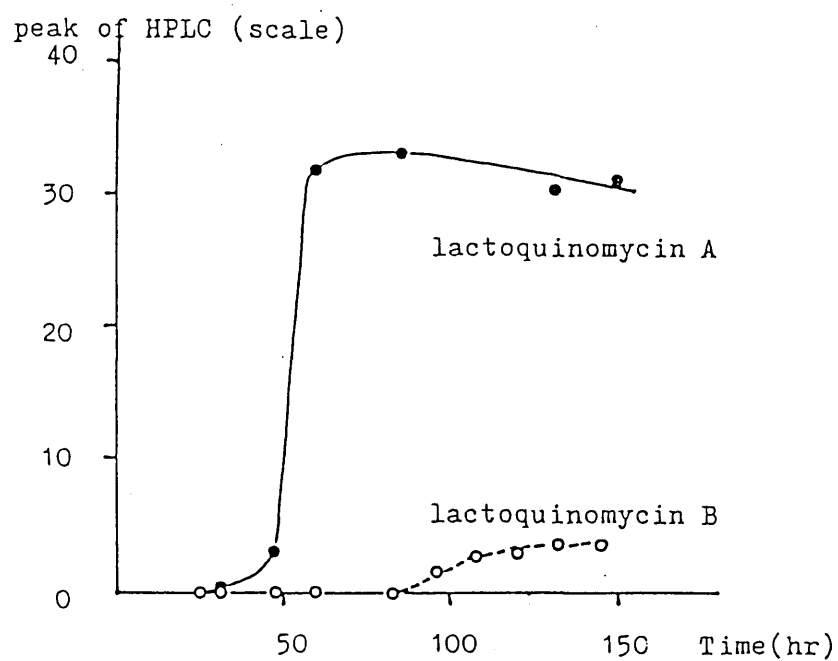


Fig. 2-3

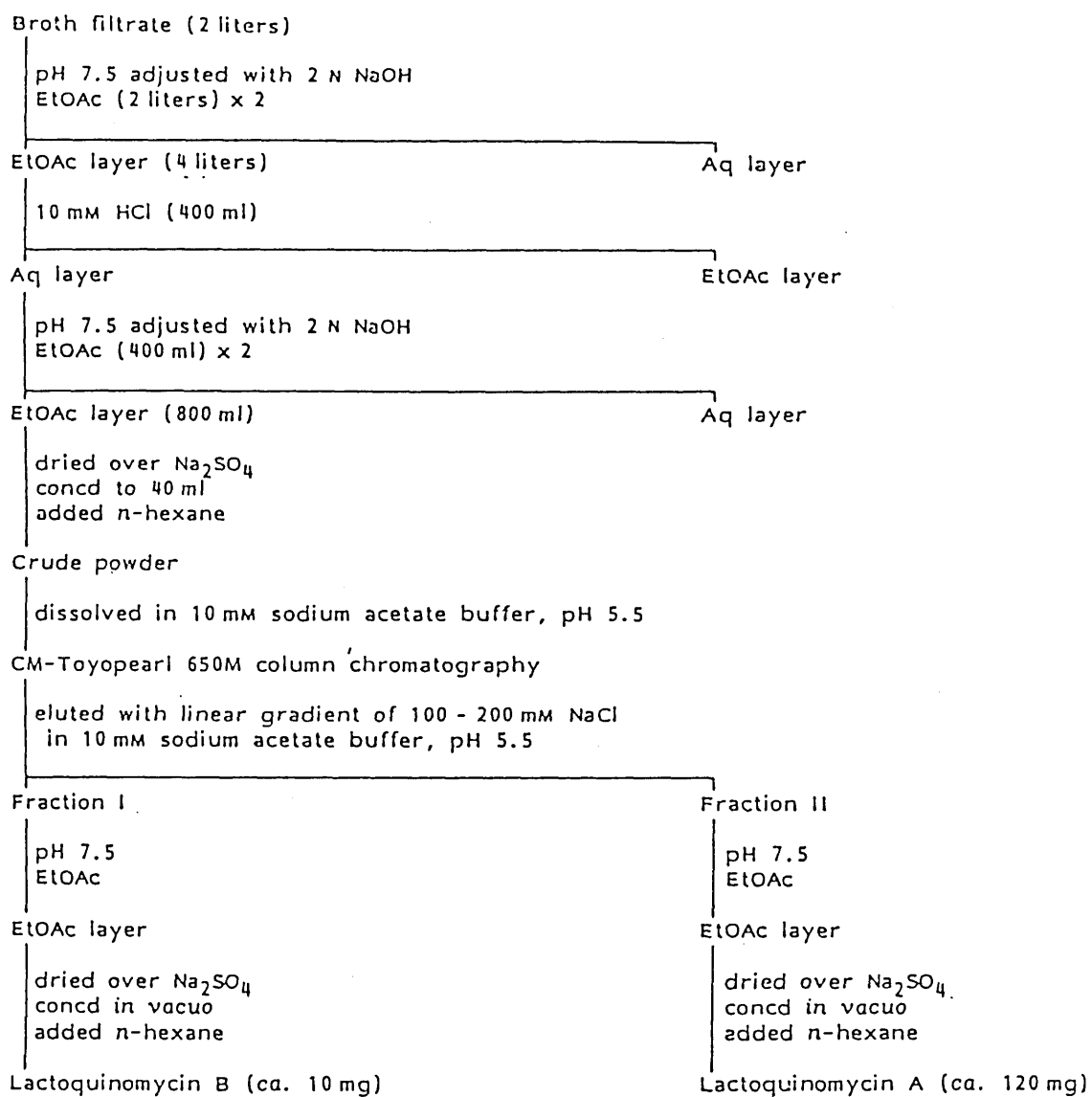


第3節 ラクトキノマイシンの単離、精製

LQM-A,B の単離、精製は、Fig. 2-4に示す。培養液2 Lを10,000 rpm x 10 min遠心して上清をとり、pH 7.5に調整する。ethyl acetate 2 L x2回抽出した後10 mM HCl 400 mlに逆転溶させる。水層を再びpH 7.5に調整し、ethyl acetate 400 ml x 2回抽出する。Na₂SO₄で脱水後40 mlまで濃縮し、n-hexaneを加えるとLQM-A,Bを含むとう色の粗粉末が得られた。これを10 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)に溶かしCM-Toyoparl 650 M (東洋曹達)のcolumn(1.5 φ x 40 cm)にかける。buffer中100-200 mM NaClの直線濃度勾配をかけて溶出すると、LQM-A,Bが分離された。各々のフラクションを集め、pH 7.5にした後 ethyl acetate で抽出する。Na₂SO₄で乾燥後濃縮し、n-hexaneを加えるととう色のLQM-A約120 mg及び淡黄色のLQM-B約10 mgが得られた。

Fig. 2-4

Isolation scheme for lactoquinomycins A and B.



第4節 小括及び考察

LQM-A,Bの培養生産は500 ml坂口フラスコ(100 ml仕込み),5 Lコブ付き
コルベン(1 L仕込み), 50 L jar fermentor(25 L仕込み)などで行なった
が、培養環境によって生産性に著しい差異がみられた。坂口フラスコでの
培養が最も生産性が高く(LQM-Aで40-80 mg/l),jar fermentorでは低かっ
た。またLQM-A,Bの産生の比率も、坂口フラスコではA:B=10:1位であるの
に対し jar fermentorではA:B=1:1位であった。培養の際の通気量、攪はん
数により、これらの差異が生じるのかも知れない。

第3章 ラクトキノマイシンの構造

序

第2章にのべた操作で得られたLQM-A,Bについて、本章ではその構造解析を行なった。その結果 LQM-A,B は naphthoquinone 骨格にアミノ糖が C-glycoside結合で導入された構造を有することが明らかになった。

第1節 ラクトキノマイシンAの物理化学的性状

1 実験方法

物理化学的性状の測定は次のようにして行なった。

融点測定	柳本Micromelting point apparatus No.996
分子量測定	FAB-MS
UV測定	日立Spectrophotometer 220
IR測定	日本分光Infrared spectrophotometer A102

2 物理化学的性状

LQM-Aはとう色の粉末として得られ、その物理化学的性状は以下に示す通りである。

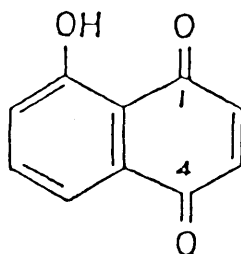
Color of powder	orange
Color of aqueous solution	orange(at acidic pH) purple(at alkaline pH)
Solubility	
soluble in	ethylether, chloroform, ethylacetate, methanol, water
hardly soluble in	n-hexane
M.P.	151-159°C(decomposition)
$[\alpha]_D$	+316.9° (c 0.2, methanol)
M.W.	458(MH ⁺ , FAB-MS)
Elemental analysis (%)	
found	C 61.18, H 6.21, N 3.20, O 27.70
calcd. for C ₂₄ H ₂₇ NO ₈ ·1/3HCl*	C 61.38, H 5.87, N 2.98, O 27.25

Molecular formula	$C_{24}H_{27}NO_8$
UV $\lambda_{\max}(\epsilon)$	215(37,600), 254(10,700), 432 nm(4,760)
	in methanol
	215(42,800), 253(10,800), 429 nm(4,980)
	in 0.01 N HCl-methanol
	222(32,200,sh), 262(8,680), 273(8,640) 558 nm(4,980)
	in 0.01 N NaOH-methanol
IR ν_{\max} (chloroform)	
	1790 cm^{-1} γ -lactone carbonyl
	1665 non-chelated quinone carbonyl
	1650 chelated quinone carbonyl
pK _a '	6.8, 8.6
R _f (Kieselgel 60F ₂₅₄ , Merck)	
	0.27 chloroform-ethanol (1:1)
	0.30 methanol
Color reaction	
	(+) magnesium acetate
	for quinone
	Dragendorff reagents
	for secondary or tertiary amine
	(-) ninhydrin
	for primary amine

※: 含まれるHClの分子数は一定しない

第2節 ラクトキノマイシンAの構造解析

LQM-Aの分子式はFAB-MS(MH^+ 458), 元素分析 1H , ^{13}C -NMRより $C_{24}H_{27}NO_8$ である。UV, IR スペクトル (Fig. 3-1, 3-2) より構造中に juglone (5-hydroxy-1,4,-naphthoquinone) 骨格を有している事が示唆された。中性に於ける UVの254,432 nm の極大吸収²²⁾、及び IRの 1665 cm^{-1} (non-chelated quinone), 1650 cm^{-1} (chelated quinone)の吸収²³⁾はjugloneに特徴的である。



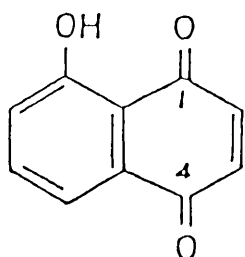
juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone)

またIR より 1790 cm^{-1} の γ -lactone carbonyl に由来する吸収があり LQM-Aはラクトキノマイシン生産菌と同じ種に属する*S.tanashiensis* Kalaが生産する抗カビ抗生物質kalafungin($C_{16}H_{12}O_6$)^{24,25)}によく似ている。

X線解析等で絶対構造既知のkalafunginとLQM-Aの 1H -NMR を比較すると (Table 3-1)、両者には非常によく似た部分がある。LQM-Aには aromatic protonが2つしかなく、kalafungin のmono 置換体であることが予想される。この置換基は NMR の解析より、2-substituted 4-dimethylamino-5-

hydroxy-6-methyltetrahydropyrane²⁷⁾である事が分かった。

これらのaromatic proton(δ_{H} 7.71, 7.91 ppm)はortho-coupling($J=7.8$ Hz)しており、置換基の位置は C6 あるいは C8 でなければならない。selective decouplingにより δ_{H} 7.71 ppmのproton は δ_{C} 119.6 ppm の carbonとcouplingしている。chemical shiftから、この carbonはphenolのpara 位に帰属される。従って置換基は C8 に結合していると考えられる。^{28, 29)} この推定は、置換基の2'-H(δ_{H} 4.87 ppm)とphenolic carbon, C9(δ_{C} 157.7 ppm)の間にlong range couplingが観測される事により支持された。



C1	C2	C3	C4	C4a
190.0	138.4	139.3	183.9	131.5
C5	C6	C7	C8	C8a
118.9	136.4	124.2	161.2	114.8 (ppm)

Fig. 3-1 UV absorption spectra of lactoquinomycin A (10 $\mu\text{g/ml}$)

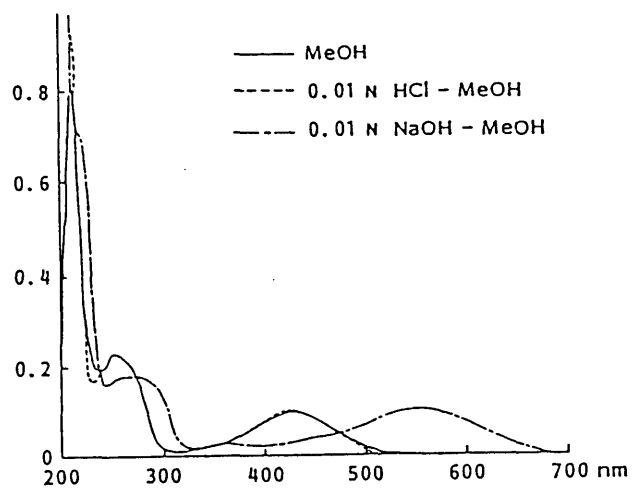


Fig. 3-2 IR spectrum of lactoquinomycin A (CHCl_3)

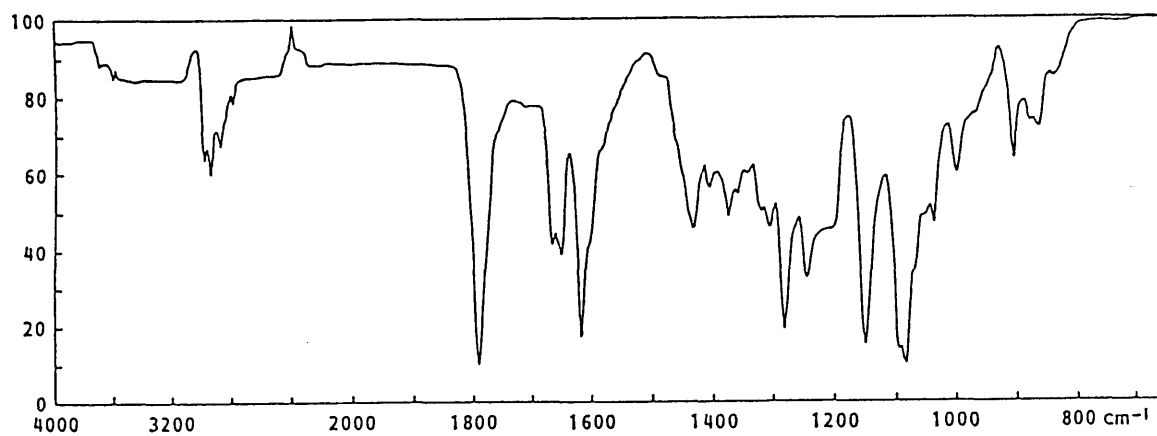
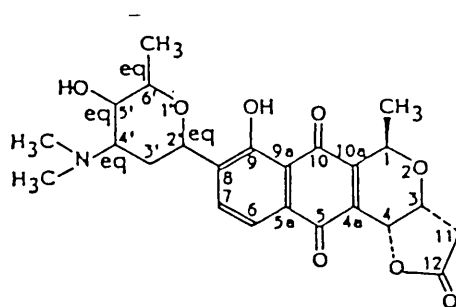


Table 3-1 400 MHz ^1H NMR data of lactoquinomycin A in CDCl_3 in comparison with kalafungin

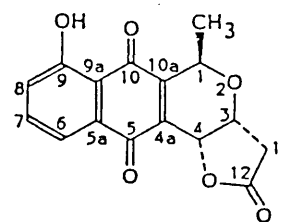
Proton	Lactoquinomycin A *	Kalafungin
1-H	5.08 q (7.0)**	5.05 q (7)
3-H	4.69 dd (5.1, 2.9)	4.69 dt (4.5, 3.0)
4-H	5.25 d (2.9)	5.20 d (3.0)
6-H	7.71 d (7.8)	} 7.00~7.78 m
7-H	7.91 d (7.8)	
8-H	—	
11-H ₁	2.69 d (17.6)	2.57 d (18)
11-H ₂	2.97 dd (17.6, 5.1)	3.02 dd (18, 4.5)
1-CH ₃	1.57 d (7.0)	1.52 d (7)
9-OH	12.2 br s	11.80
2'-H	4.87 dd (10.9, 2.0)	
3'-H _{ax}	1.30 ddd (12.5, 12.4, 10.9)	
3'-H _{eq}	2.26 ddd (12.4, 3.8, 2.0)	
4'-H	2.78 ddd (12.5, 9.5, 3.8)	
5'-H	3.20 dd (9.5, 8.9)	
6'-H	3.53 dq (8.9, 6.2)	
4'-N(CH ₃) ₂	2.34 s	
5'-OH	3.4 br s	
6'-CH ₃	1.43 d (6.2)	

* TMS (0 ppm) was used as an internal standard.

** δ_{H} , multiplicity, coupling constant.



lactoquinomycin A



kalafungin

Table 3-2

100 MHz ^{13}C NMR data of lactoquinomycin A in CDCl_3

Carbon	Chemical shift*	Multiplicity	Carbon	Chemical shift*	Multiplicity
1	66.3	d	10a	149.2	s
3	66.5	d	11	37.0	t
4	68.7	d	12	173.5	s
4a	134.9	s	1-CH ₃	18.8	q
5	180.8	s	2'	72.2	d
5a	129.7	s	3'	28.2	t
6	119.6	d	4'	67.2	d
7	133.5	d	5'	71.5	d
8	138.6	s	6'	77.6	d
9	157.7	s	4'-N(CH ₃) ₂	40.3	q
9a	114.0	s	6'-CH ₃	18.9	q
10	187.8	s			

* TMS (0 ppm) was used as an internal standard.

Fig. 3-3

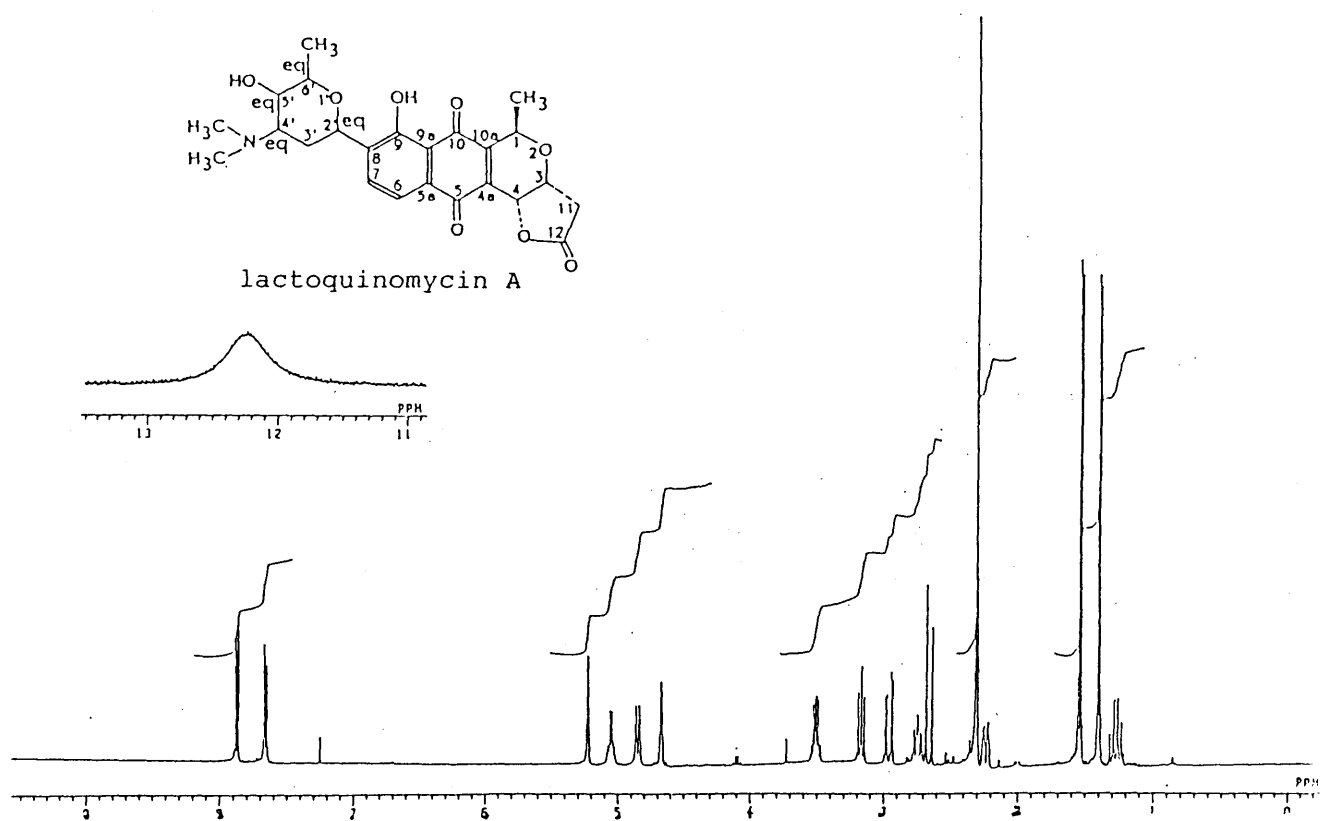
400 MHz ^1H NMR spectrum of lactoquinomycin A

Fig. 3-4

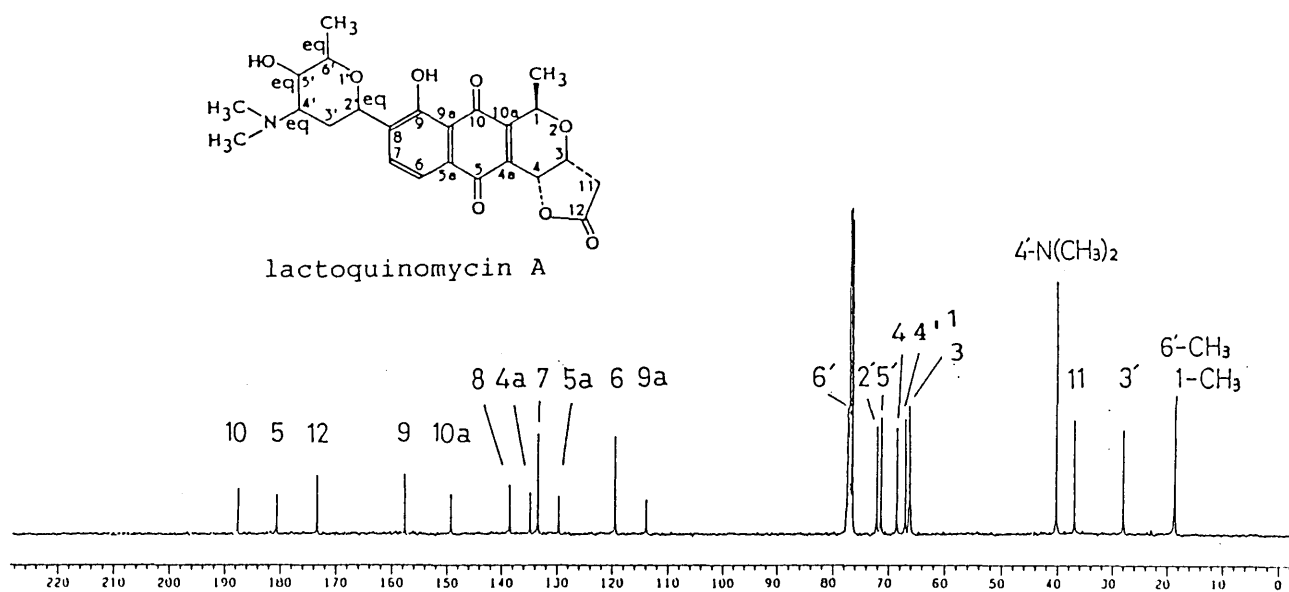
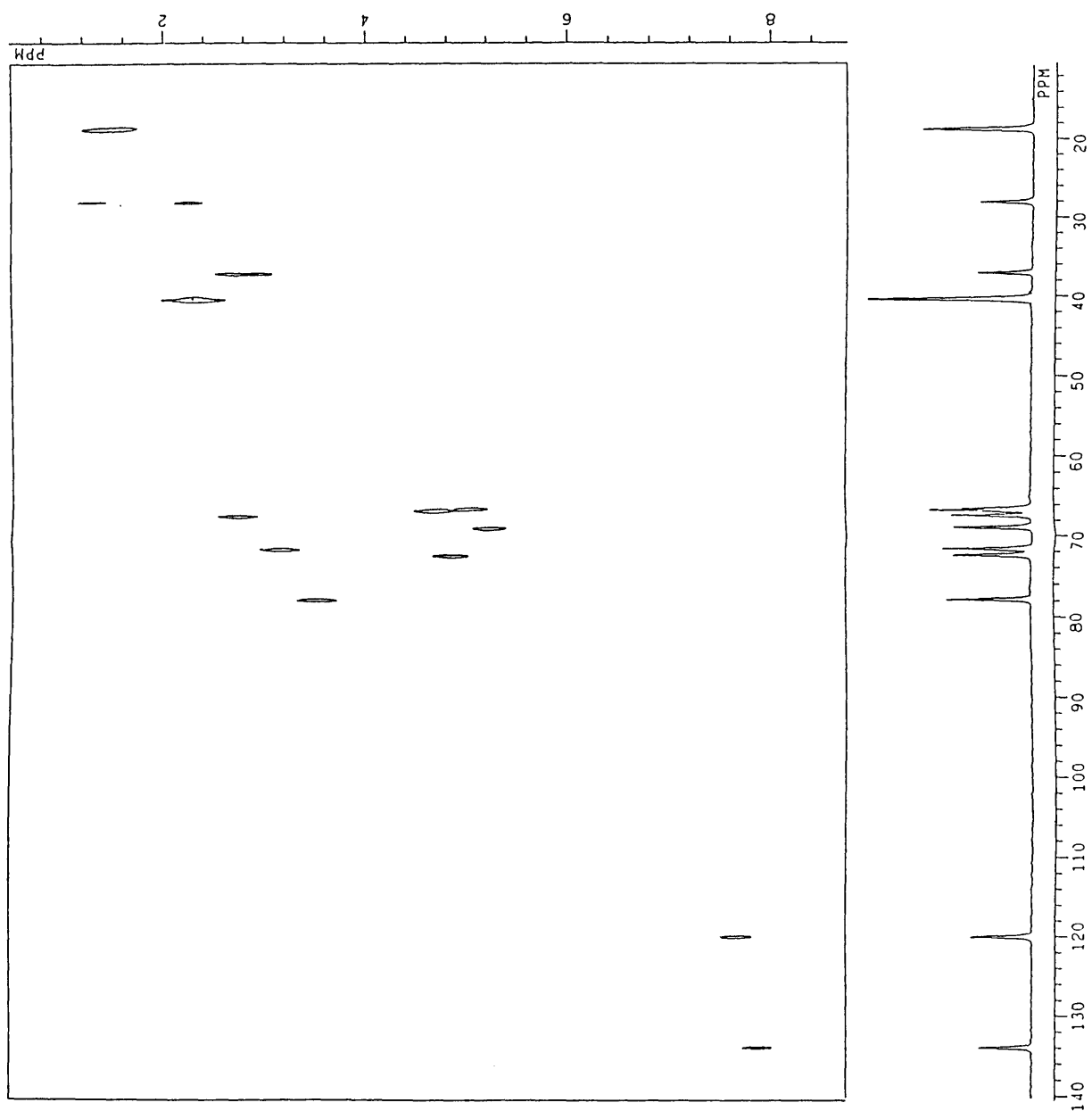
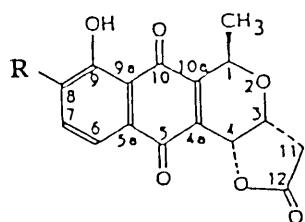
100 MHz ^{13}C NMR spectrum of lactoquinomycin A

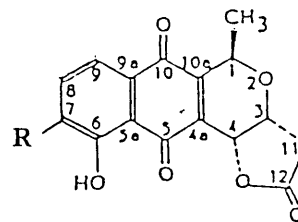
Fig. 3-5 ^{13}C - ^1H COSY NMR spectrum of lactoquinomycin A



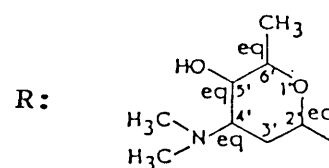
これまではphenol-OHをC9位において構造 I を推定したがphenol-OHをC6におく構造 II でもNMRのデータに矛盾しない。I, II のいずれかを決定するため $^{13}\text{CH}_3\text{COONa}$ を取り込ませたLQM-Aの ^{13}C -NMRを検討した。



I



II



LQM-AのA,B,C,D環は酢酸から下図に示すようにpolyketideをへて生合成される³⁰⁾事が予想される。Iの場合、添加培養で得られるLQM-Aの ^{13}C -NMRにおけるphenolic carbonのsignalは増強するが、IIの場合は変化しないはずである。1日培養後の培養液に、 $\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ (0.5 mg/ml, ICN Bio-medicine INC)を添加し、更に2日間培養して得られるLQM-Aの ^{13}C -NMRを測定した(Fig. 3-6)。この結果phenolic carbonのsignal(δ_c 157.7 ppm)の増強が観測されOHの位置はC9、従って構造 I である事が明らかになった。

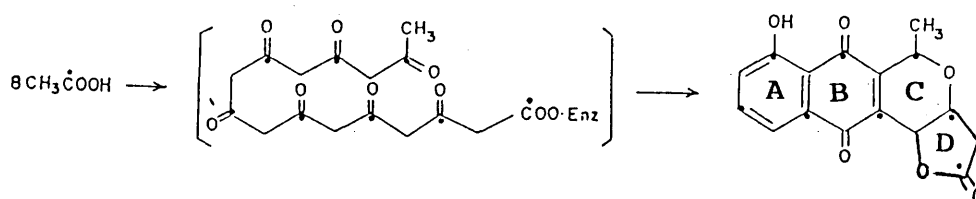
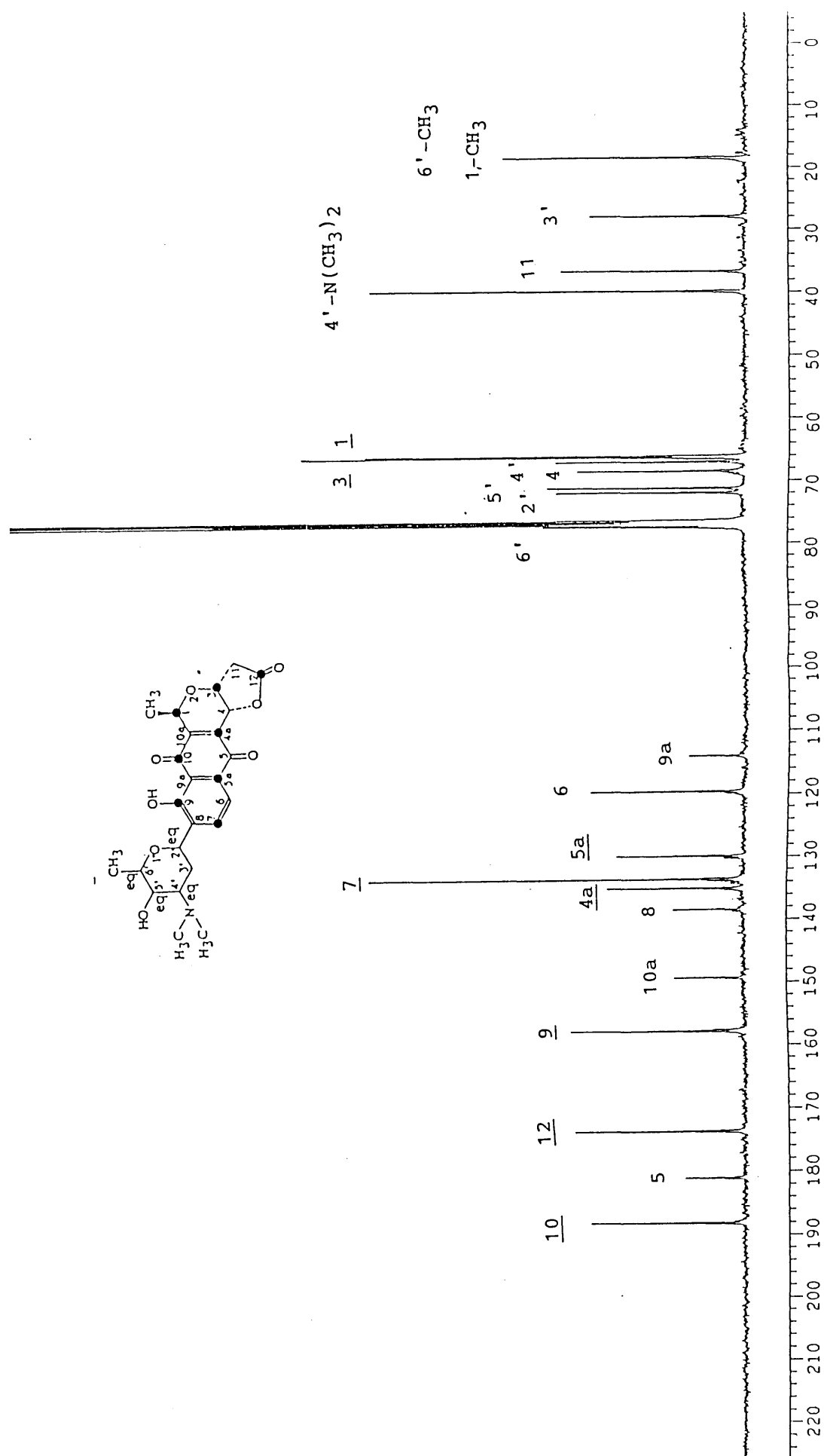


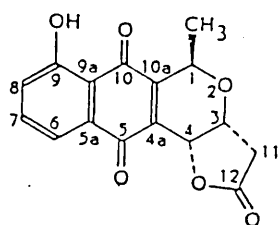
Fig. 3-6 ^{13}C -NMR spectrum of lactoquinomycin A ($\text{CH}_3^{13}\text{COONa}$ fed)



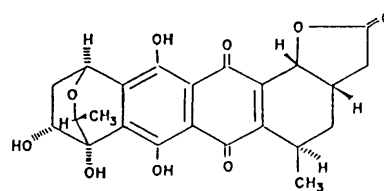
次にdihydropyran- γ -lactone部分(C,D環)の立体構造について検討した。

$J_{3,4}=2.9$ Hzは絶対構造既知のkalafungin($J_{3,4}=3.0$ Hz)²⁶⁾, granaticin ($J_{3,4}=3.5$ Hz)³¹⁾とよく一致し3-H,4-H:cis構造が明らかとなった。

この場合下記の4つの可能性がのこる。

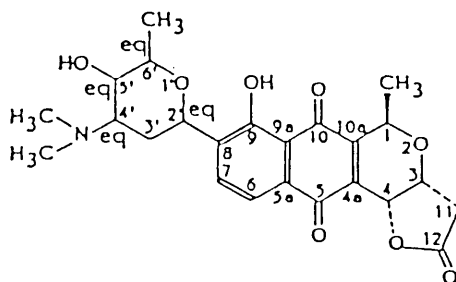


kalafungin

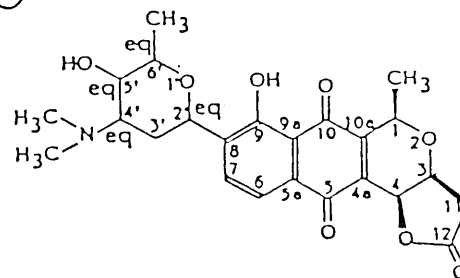


granaticin

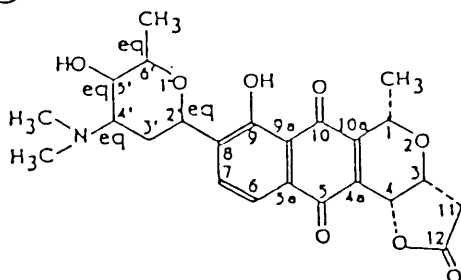
①



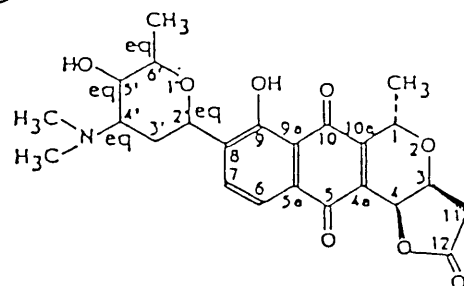
②



③



④

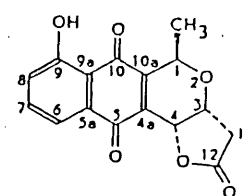
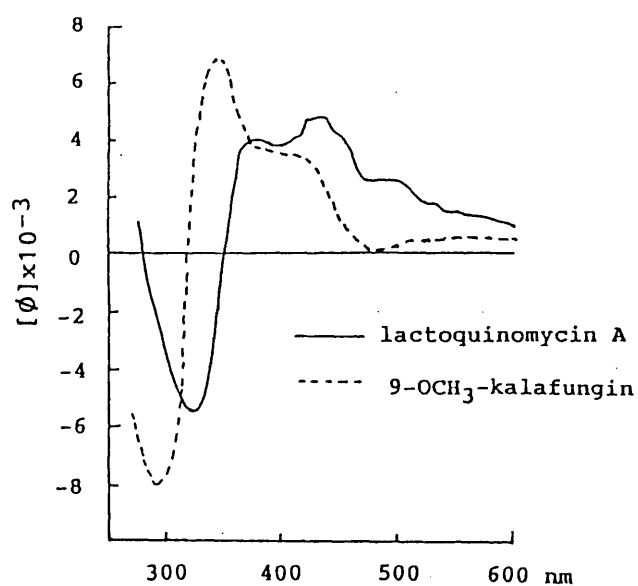


1-CH₃ (δ_{H} 1.57 ppm)と3-H (δ_{H} 4.69 ppm)の間にNOE(11%)が認められたので1-CH₃と3-Hが空間的に近い位置にある事から、②と③の可能性は否定される。①と④のどちらかであるかを明らかにすべくORDの測定を行なった。kalafunginにはその光学異性体としてnanaomycin D³²⁾が知られている。kalafunginのORDはpositive Cotton effectを示し、nanaomycin Dではnegative Cotton effectを示す。LQM-Aはpositive Cotton effectを示すので、そのdihydropyran- γ -lactone部分の立体化学は④のnanaomycin D typeではなく①のkalafungin typeであると考えられる。

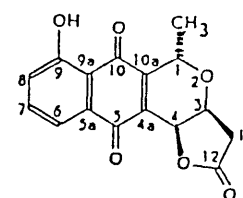
以上よりLQM-Aの構造はFig. 3-8に示すように推定した。アミノ糖部分の絶対構造については未決定である。

Fig. 3-7

ORD curves of lactoquinomycin A
and 9-OCH₃-kalafungin

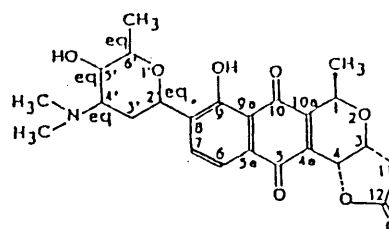


kalafungin



nanaomycin D

Fig. 3-8



lactoquinomycin A

第3節 ラクトキノマイシンBの物理化学的性状

1 実験方法

第1節に同じ。ただし分子量測定はFD-MSで行なった。

2 物理化学的性状

LQM-Bは淡黄色の粉末として得られ、その物理化学的性状は以下に示す通りである。

Color of powder	light yellow
Color of aqueous solution	pale yellow(at acidic pH) orange yellow(at alkaline pH)
Solubility	
soluble in	ethylether, chloroform, ethylacetate, methanol, water
hardly soluble in	n-hexane
M.P.	149-152°C(decomposition)
$[\alpha]_D$	+145.5° (c 0.15, methanol)
M.W.	473(M ⁺ , FD-MS)
Elemental analysis (%)	
found	C 58.91, H 5.81, N 2.77, O 29.63
calcd. for C ₂₄ H ₂₇ NO ₉ ·2/5HCl*	C 59.06, H 5.66, N 2.87, O 29.50
Molecular formula	C ₂₄ H ₂₇ NO ₉

UV $\lambda_{\max}(\epsilon)$ 239(15,100), 287(3,450), 369 nm(5,300)

in methanol

240(16,800), 285(3,550), 366 nm(5,650)

in 0.01 N HCl-methanol

223(19,880,sh), 287(6,430), 442 nm(6,240)

in 0.01 N NaOH-methanol

IR ν_{\max} (chloroform)

1790 cm^{-1} γ -lactone carbonyl

1700 non-chelated quinoe carbonyl

1650 chelated quinone carbonyl

Rf (Kieselgel 60F₂₅₄, Merck)

0.28 chloroform-ethanol (1:1)

0.30 methanol

Color reaction

(+) magnesium acetate

for quinone

Dragendorff reagents

for secondary or tertiary amine

(-) ninydrin

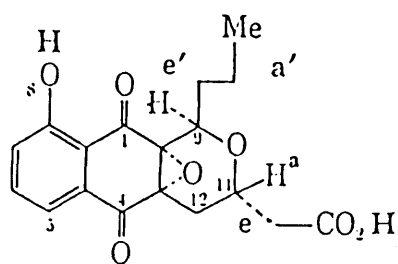
for primary amine

*: 含まれるのHClの分子数は一定しない

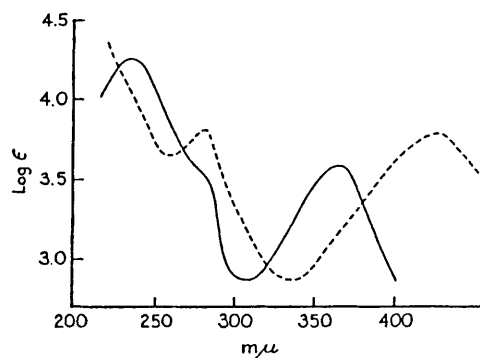
第4節 ラクトキノマイシンBの構造解析

LQM-Bの分子式はFD-MS(M^+ 473)、元素分析、 1H , ^{13}C -NMRより $C_{24}H_{27}NO_9$ である。物理化学的性状が LQM-A とよく似ている事から LQM-B はLQM-A ($C_{24}H_{27}NO_8$)に酸素が1原子付加したものと考えられる。

LQM-Bの UV, IR スペクトル(Fig. 3-9, 3-10)はLQM-Aのそれとは異なり、chromophore が変化していると考えられる。LQM-B の UV スペクトルは frenolicin^{33,34)}の UV スペクトルによく似ており、この事は、LQM-Bの chromophore が jugloneではなく、その epoxy体5-hydroxy-1,4-naphtho-quinone-2,3-epoxideに変化したことを示唆する。



frenolicin



Ultraviolet spectrum of frenolicin: —, in methanol; ----, in methanolic sodium hydroxide.

Fig. 3-9

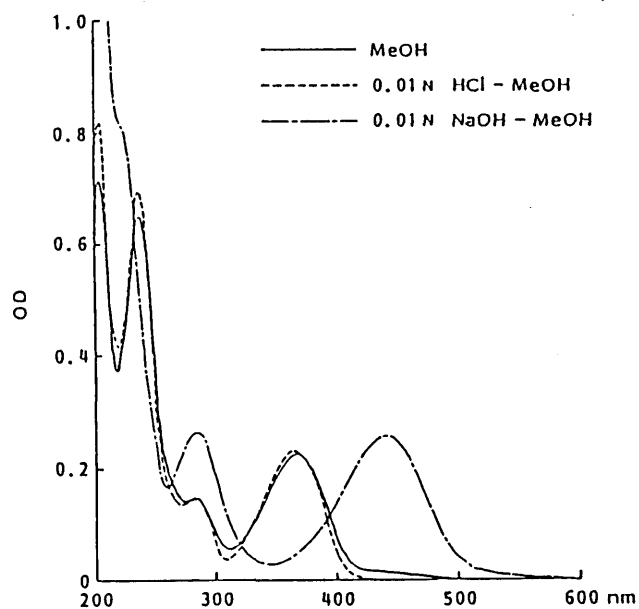
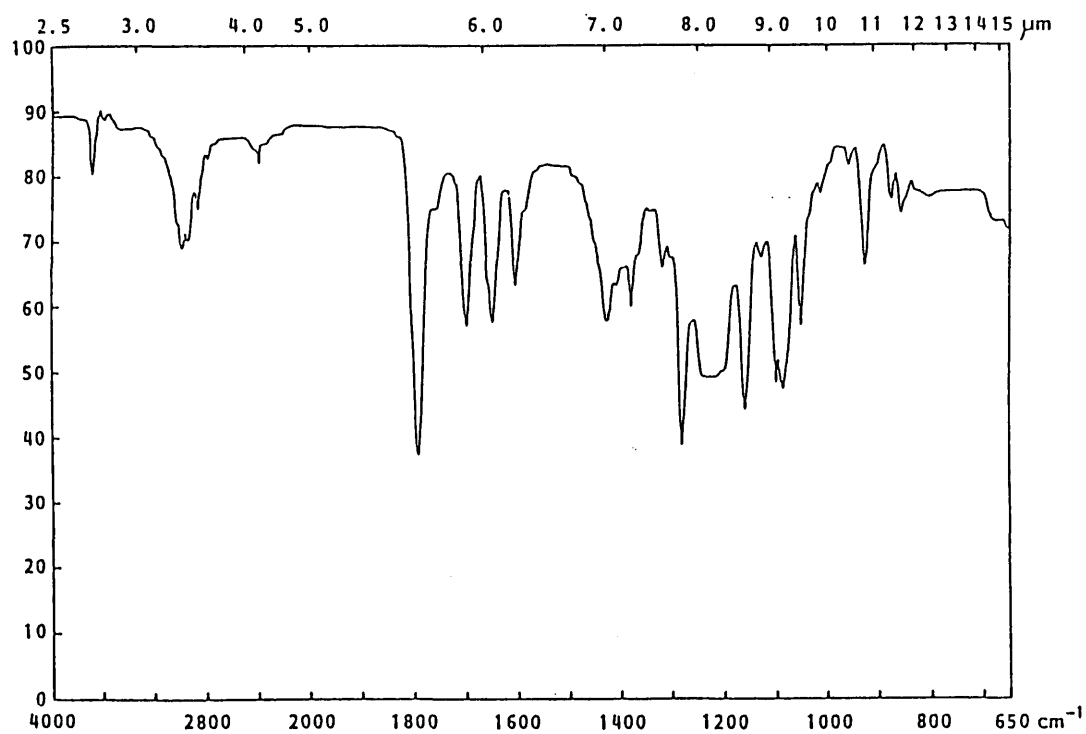
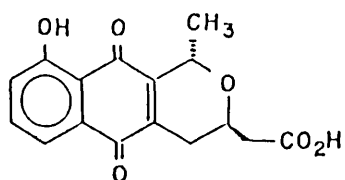
UV spectra of lactoquinomycin B. ($20 \mu\text{g/ml}$)

Fig. 3-10

IR spectrum of lactoquinomycin B (CHCl_3).

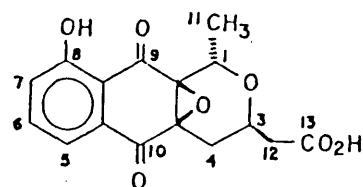
IRスペクトルでnon-chelated quinone carbonylの吸収が 1700 cm^{-1} に有り、LQM-Aに比して高波数シフトしていることも上記の推定を支持する。LQM-A,B両者のNMRスペクトルを比べると、 ^1H -NMR(Fig. 3-11, Table 3-3)は比較的よく似ているが、 ^{13}C -NMR(Fig. 3-12, Table 3-4)では著しい相違がみられる。C4a, C10a, のchemical shift がLQM-Aでは δ_c 134.9, 149.2 ppm であるのに対して、LQM-Bでは δ_c 60.0, 64.4 ppmと高磁場シフトしている。一方quinone carbonyl carbon はLQM-Bでは低磁場シフトしており $\alpha\beta, \alpha'\beta'$ -unsaturated ketoneから $\alpha\beta$ -unsaturated ketoneに変化したことを裏付ける。LQM-A,Bと同じ関係にある nanaomycin A, E³⁵⁾ でも類似の chemical shiftの変化が観測されている。



nanaomycin A

C9 188.1ppm

C10 182.7



nanaomycin E

C9 195.9ppm

C10 190.0

Fig. 3-11

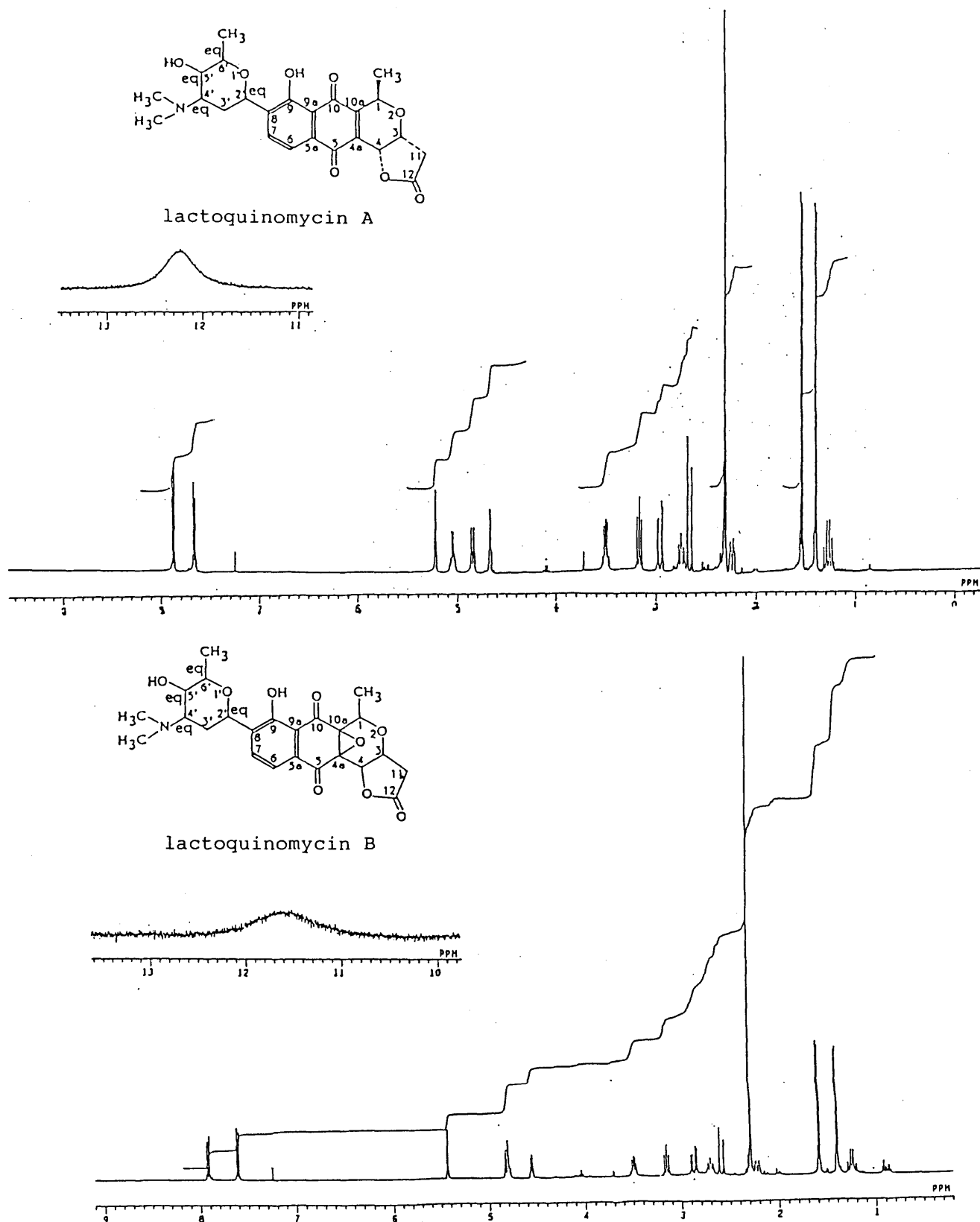
400 MHz ^1H NMR spectra of lactoquinomycins A and B

Fig. 3-12 100 MHz ^{13}C NMR spectra of lactoquinomycins A and B

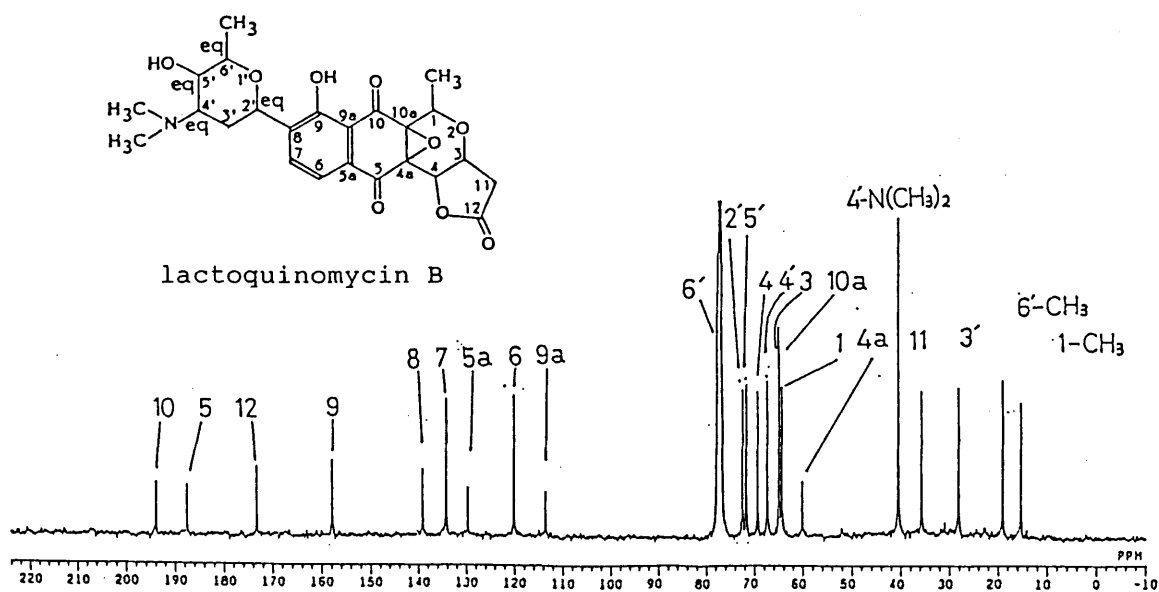
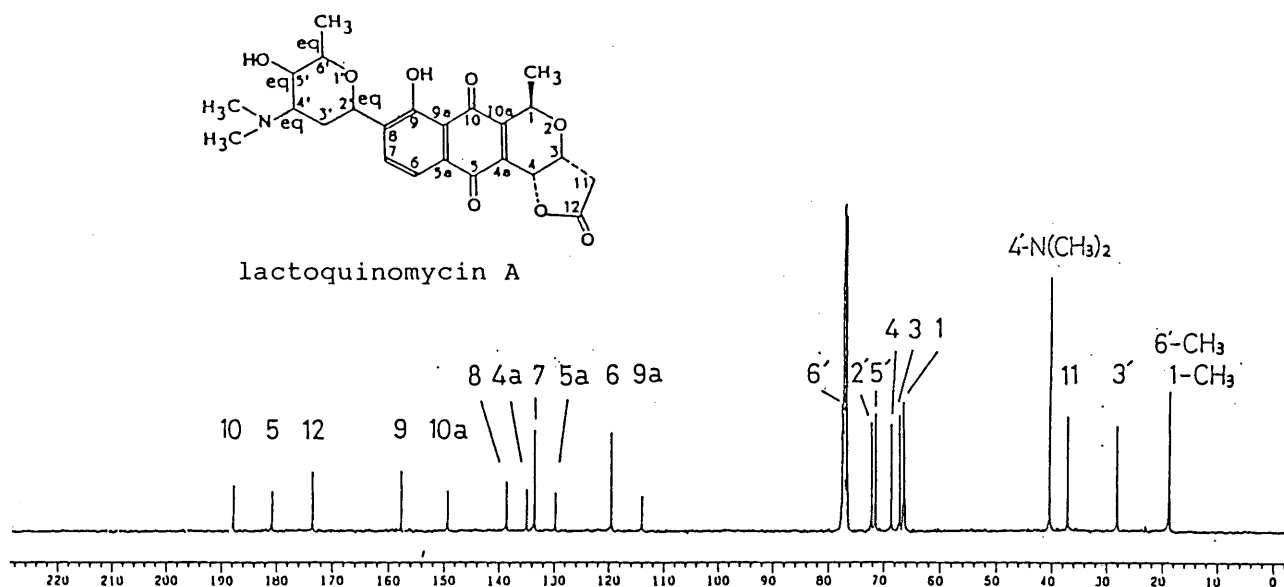


Table 3-3 400 MHz ^1H NMR data of lactoquinomycin B in comparison with lactoquinomycin A in CDCl_3 .

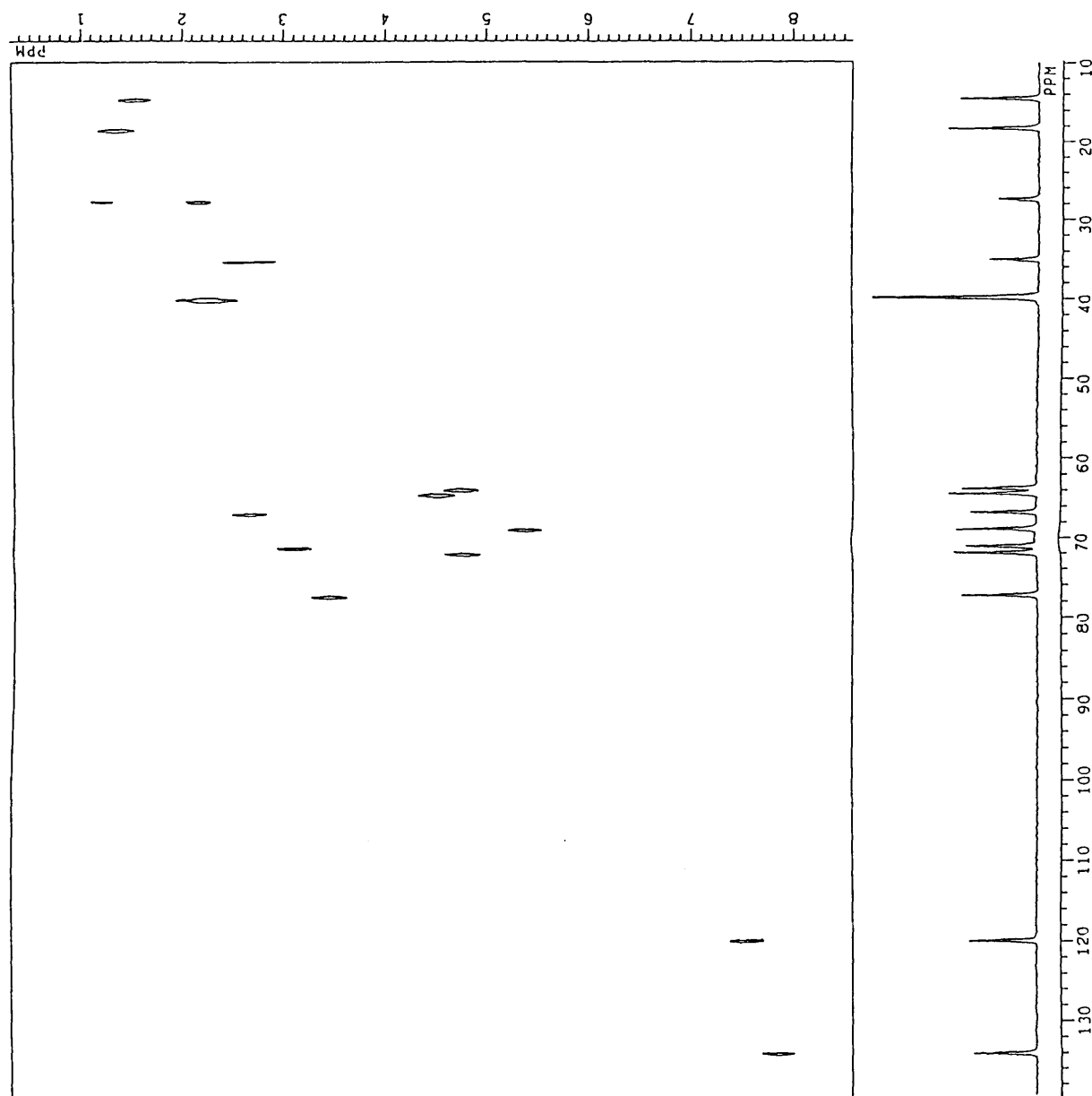
Proton	Lactoquinomycin A	Lactoquinomycin B
1-H	5.08 q (7.0)*	4.81 q (7.3)
3-H	4.69 dd (5.1, 2.9)	4.56 dd (6.6, 4.5)
4-H	5.25 d (2.9)	5.44 d (4.5)
6-H	7.71 d (7.8)	7.61 d (7.8)
7-H	7.91 d (7.8)	7.92 d (7.8)
11-H ₁	2.69 d (17.6)	2.59 d (18.3)
11-H ₂	2.97 dd (17.6, 5.1)	2.87 dd (18.3, 6.6)
1-CH ₃	1.57 d (7.0)	1.59 d (7.3)
9-OH	12.2 br s	11.6 br s
2'-H	4.87 dd (10.9, 2.0)	4.82 dd (10.5, 2.3)
3'-H _{ax}	1.30 ddd (12.5, 12.4, 10.9)	1.25 ddd (12.5, 12.3, 10.5)
3'-H _{eq}	2.26 ddd (12.4, 3.8, 2.0)	2.22 ddd (12.5, 3.6, 2.3)
4'-H	2.78 ddd (12.5, 9.5, 3.8)	2.70 ddd (12.3, 9.6, 3.6)
5'-H	3.20 dd (9.5, 8.9)	3.15 dd (9.6, 9.1)
6'-H	3.53 dq (8.9, 6.2)	3.50 dq (9.1, 6.5)
4'-N(CH ₃) ₂	2.34 s	2.29 s
5'-OH	3.4 br s	2.8 br s
6'-CH ₃	1.43 d (6.2)	1.40 d (6.5)

* δ_{H} relative to TMS, multiplicity, coupling constant.**Table 3-4** 100 MHz ^{13}C NMR data of lactoquinomycin B in comparison with lactoquinomycin A in CDCl_3 .

Carbon	Lactoquinomycin A	Lactoquinomycin B	Carbon	Lactoquinomycin A	Lactoquinomycin B
1	66.3*(d)**	64.2 (d)	10a	149.2 (s)	64.4 (s)***
3	66.5 (d)	64.8 (d)	11	37.0 (t)	35.6 (t)
4	68.7 (d)	69.2 (d)	12	173.5 (s)	173.3 (s)
4a	134.9 (s)	60.0 (s)***	1-CH ₃	18.8 (q)	15.2 (q)
5	180.8 (s)	187.6 (s)	2'	72.2 (d)	72.4 (d)
5a	129.7 (s)	129.7 (s)	3'	28.2 (t)	28.1 (t)
6	119.6 (d)	120.0 (d)	4'	67.2 (d)	67.2 (d)
7	133.5 (d)	134.2 (d)	5'	71.5 (d)	71.5 (d)
8	138.6 (s)	139.1 (s)	6'	77.6 (d)	77.6 (d)
9	157.7 (s)	157.8 (s)	4'-N(CH ₃) ₂	40.3 (q)	40.3 (q)
9a	114.0 (s)	113.5 (s)	6'-CH ₃	18.9 (q)	19.0 (q)
10	187.8 (s)	193.9 (s)			

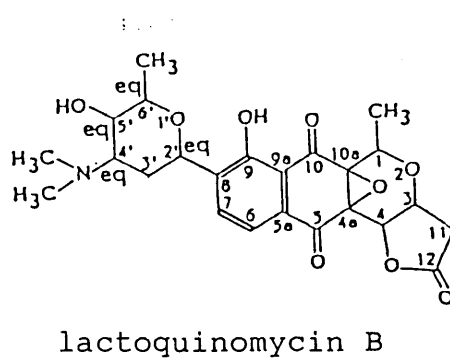
* δ_{C} relative to TMS. ** Multiplicity. *** The assignments may be interchanged.

Fig. 3-13 ^{13}C - ^1H COSY NMR spectrum of lactoquinomycin B



以上より、LQM-B はLQM-Aの C4a,C10aの二重結合に酸素原子が付加した epoxideであると推定した(Fig. 3-14)。しかし立体化学については以上のデータだけからでは特定できない。

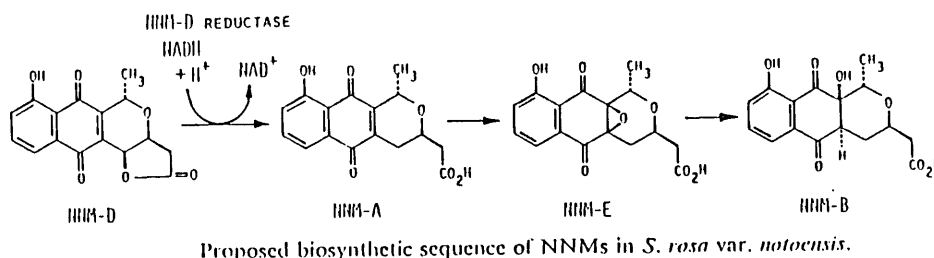
Fig. 3-14



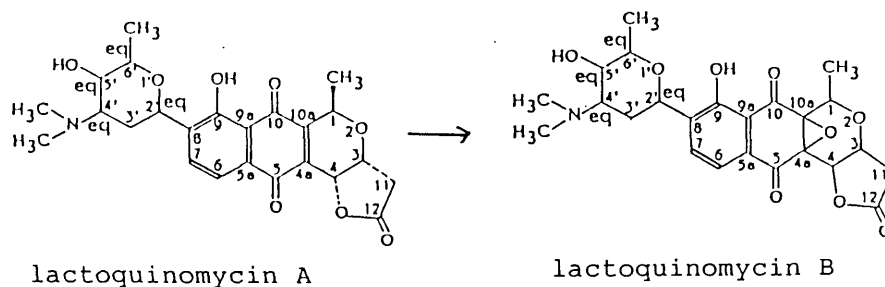
第5節 小括及び考察

LQM-A の構造決定を行なった時点までに類似した化合物として luteomycin³⁶⁾, substance No.289³⁷⁾, substance SAX 10³⁸⁾, medermycin³⁹⁾ などの報告が有るが、構造は明らかにされていなかった。また筆者等も先に LQM-A と類似の構造を有すると考えられる、tokimycin A, B⁴⁰⁾ を単離したが、その物質の持つ不安定さゆえ、構造決定には至っていない。LQM-A はこれ等一連の抗生物質の中で構造解析のためのデータが安定な形で測定でき、構造を明らかにすることの出来た幸運な例と言えよう。

LQM-A と B の様な関係は nanaomycin D と E との間にもみられ、nanaomycins の場合下記のような生合成経路が明らかになっている。^{41, 42)}



ラクトキノマイシンの培養経過 (Fig. 2-3) で、LQM-A の産生が最高に達してから、LQM-B が産生され始める事を考えると、ラクトキノマイシンの場合も下図のような生合成経路が想定しうる。



(付記)

LQM-Aの構造をJ.Antibiotics 38: 1333-1336, 1985に発表後、北里大学小倉教授より、LQM-Aは教授等が構造決定したmedermycinと同一ではないかとの連絡を受けた。medermycinの構造研究について論文は発表されていないので、詳細な比較は出来ないが、学会発表の要旨からは、LQM-A と medermycinは比旋光度、物質の安定性、LSPDの結果などいくつかの点で異なっている。今後出来るだけはやい機会にLQM-Aの絶対構造を決定し、またmedermycinとの異同をはっきりさせたいと考えている。

第4章 ラクトキノマイシン の生物活性

序

LQM-A,Bの抗菌、抗カビ活性、各種培養癌細胞に対する細胞毒性、マウス実験腫瘍に対する抗腫瘍効果について調べた。

LQM-A,Bは強い細胞毒性(IC_{50} 0.5 $\mu g/ml$ 以下)を有し、多剤耐性になったL5178Y細胞に、その親株よりもより低い濃度で細胞毒性を示した。また Ehrlich ascites carcinoma に対して顕著な延命効果が認められた。

第1節 ラクトキノマイシンの抗菌、抗カビ活性

1 実験方法

細菌にはMuller-Hinton agar medium(Difco)を用いて37℃で1日、カビにはyeast sucrose agar mediuma(yeast ext. 0.2%, sucrose 1%, agar 1.5%, pH 6.0)を用いて27℃2日間培養して最小発育阻止濃度(MIC)を調べた。

2 結果

Table 4-1に示す通りである。LQM-Aはグラム陽性菌に対しては強い抗菌活性を示したがグラム陰性菌に対してはその活性は弱かった。カビに対しては100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても無効であった。LQM-BもLQM-Aと同様な傾向が認められたが、その活性はLQM-Aより弱かった。

Table 4-1 Antimicrobial activity of lactoquinomycins A and B

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	LQM-A	LQM-B
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209	1.56	5.0
<i>Micrococcus luteus</i> IAM 1056	6.25	-
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	3.13	10
<i>B. cereus</i> T	12.5	20
<i>Corynebacterium xerosis</i>	3.13	25
<i>Mycobacterium smegmatis</i> R-15	>100	200
<i>M. phlei</i> IAM 12064	50	100
<i>Escherichia coli</i> B	100	50
<i>E. coli</i> K 12	100	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3455	>100	>200
<i>P. fluorescens</i> H 3	>100	>200
<i>Salmonella typhi</i> '	50	-
<i>S. enteritidis</i> 11	100	>200
<i>Shigella sonnei</i>	25	200
<i>Proteus vulgaris</i>	100	>200
<i>Aspergillus niger</i> JIS 1-1	>100	>200
<i>A. oryzae</i> IAM 2630	>100	>200
<i>Botrytis cinerea</i> IAM 5126	>100	>200
<i>Mortierella ramannicinus</i> IAM 6128	>100	>200
<i>Penicillium chrysogenum</i> IAM 7326	>100	>200
<i>Candida albicans</i>	>100	>200
<i>C. utilis</i> Y 21-6	>100	>200
<i>Cryptococcus neoformans</i> IAM 12253	>100	>200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y 23-9	>100	>200

第2節 ラクトキノマイシンの細胞毒性

1 実験方法

K562ヒト白血病細胞とL1210マウス白血病細胞には、培地に RPMI 1640 +10% FCS(fetal calf serum) を、P388マウス白血病細胞にはRPMI 1640 +10% FCS+5 μ M 2-hydroxyethylthiopyranを、L5178Yマウス白血病細胞の親株とその薬剤耐性株にはRPMI 1640+10% HS(horse serum)をそれぞれ用いた。細胞(2.0×10^4 cells/ml)をLQM-AあるいはLQM-Bと一緒に37℃で5% CO₂+95% air中72時間培養してtrypan blue dye exclusionにより生細胞数を計測した。

2 結果

50%細胞増殖阻止濃度(IC₅₀)でTable 4-2に示した。LQM-AのIC₅₀は6-33 ng/mlであり、強い細胞毒性が認められた。LQM-BのIC₅₀は120-430 ng/mlであり、LQM-A より効果は弱い。本実験において特に興味深いのは、L5178Yの親株より、制癌剤耐性株により低い濃度できいていることである。adriamycin耐性株、acliarubicin耐性株は細胞膜が変異した典型的な多剤耐性細胞であるが、LQM-A,Bはその耐性を完全に克服している。

Table 4-2 Cytotoxicity of lactoquinomycins A and B

Cell line	IC ₅₀ (ng/ml)	
	LQM-A	LQM-B
K562 human leukemia	33	160
L1210 murine leukemia	13	120
P388 murine leukemia	30	200
L5178Y murine lymphoma		
Parental	20	430
Adriamycin-resistant	6	210
Aclarubicin-resistant	13	430
Bleomycin-resistant	8	190

第3節 ラクトキノマイシンの抗腫瘍効果

1 実験方法

Ehrlich ascites carcinomaに対する効果

ICRマウスに 10^6 のEhrlich ascites carcinoma細胞をi.p.移植し、翌日から連日9日間、LQM-AあるいはLQM-Bをi.p.投与した。

IMC carcinomaに対する効果

CDF₁マウスに 10^6 のIMC carcinoma細胞をi.p.移植し、翌日から連日、あるいは1日2回、あるいは隔日LQM-Aをi.p.投与した。

2 結果

Ehrlich ascites carcinomaに対する効果はFig. 4-1に、IMC carcinomaに対する効果はTable 4-3に示した。Ehrlich ascites carcinomaに対して、LQM-Aは1 mg/kg/dayの投与で、LQM-Bは2 mg/kg/dayの投与でそれぞれ顕著な延命効果がみられた。IMC carcinomaを用いての実験は投与スケジュールの検討を兼ねて行なった。1日2回の分割投与が効果的であることが示唆された。

Fig. 4-1 Effect of lactoquinomycins A and B on
Ehrlich ascites carcinoma in ICR mice

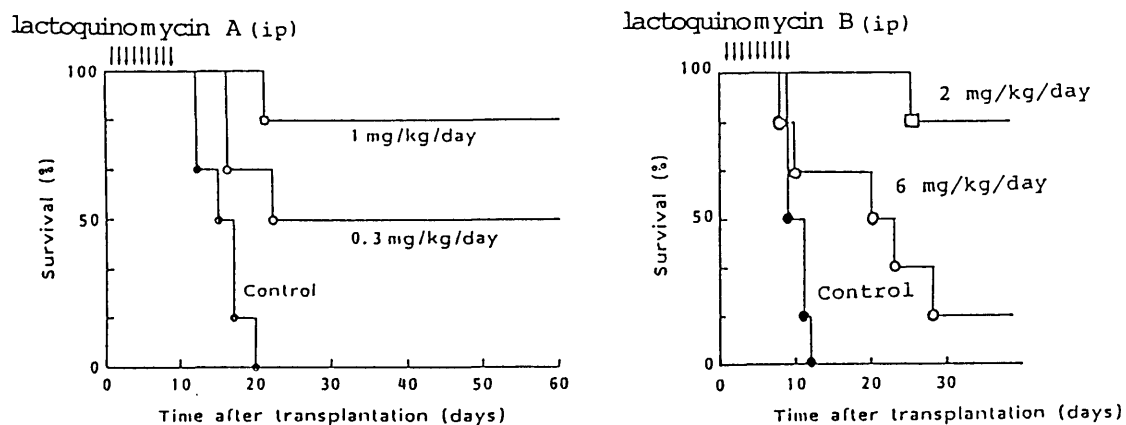


Table 4-3

Effect of lactoquinomycin A on IMC carcinoma in CDF₁ mice

Drug	Dose (mg/kg/day)	Schedule	No. of mice	Survival days (mean \pm S.D.)	T/C (%)
Control	-	-	6	13.2 \pm 0.4	-
LQM-A	1.5	d1-d9	5	23.2 \pm 5.0	176
	0.75		6	28.7 \pm 5.1	217
	0.375		6	14.8 \pm 1.0	112
	0.75x2	d1-d9	6	31.2 \pm 3.1	236
	0.375x2		6	23.8 \pm 6.0	180
	0.1875x2		6	32.8 \pm 4.5	248
	3.0	d1,3,5,7,9	6	24.3 \pm 4.5	184
	1.5		6	27.8 \pm 4.3	211
	0.75		6	22.7 \pm 8.4	172

第4節 ラクトキノマイシンの急性毒性

1 実験方法

ddYマウスにLQM-A,Bをi.v.またはi.p.投与して50%致死濃度(LD₅₀)を求めた。

2 結果

Table 4-4に示した通りである。LQM-Bの毒性はLQM-Aの4分の1であった。

Table 4-4

LD₅₀ values of lactoquinomycins A and B

Drug	Route	LD ₅₀ (mg/kg)
LQM-A	i.v.	10
	i.p.	10
LQM-B	i.v.	40

第5節 小括及び考察

LQM-AはL5178Y細胞の親株より、その薬剤耐性株により強い細胞毒性を示した。ここに用いたL5178Yadriamycin耐性株¹⁶⁾、aclarubicin耐性株⁴³⁾、bleomycin耐性株⁴⁴⁾の各種制癌抗生物質に対する感受性は以下の表に示す通りである。親株よりもこれ等耐性株により感受性を示す薬剤は、bleomycin耐性株でのblasticidin Sのみが知られ、3種の耐性株全てに親株よりもより低い濃度で有効なものはLQM-Aが唯一である。adriamycin耐性株、aclarubicin耐性株の耐性機構としては、細胞膜変異による薬剤のactive effluxの昂進^{43,45)}が観察されており、LQM-A,Bはこの機構にのらないと考えられる。bleomycin耐性株の耐性機構については明らかではない。

ある薬剤の耐性細胞が他の薬剤に高感受性を示す現象は、collateral sensitivityとして知られ、いくつかの報告がある。例えばL5178Y methotrexate耐性細胞に於けるadriamycin高感受性^{46,47)}、CHO adriamycin耐性細胞に於ける methotrexate 高感受性⁴⁸⁾、A2780 melphalan, A2780 adriamycin, A2780 cisplatin耐性細胞に於けるbleomycin高感受性⁴⁹⁾などがある。

collateral sensitivityの機構は明らかではないが、先に上げたA 2780細胞の場合耐性細胞でのglutathioneレベルの上昇との関連が指摘されている。筆者もL5178Y adriamycin耐性株のLQM-A,Bに対する高感受性の機構について第6章で解析を試みた。collateral sensitivityの現象がみられるかどうかは、個々の細胞により異なると考えられるが、LQM-A,Bが多剤耐性の機構にのらない点は、今後耐性細胞に有効な薬剤を開発する上で注目に値する。

Drug sensitivity of an adriamycin-resistant subline of mouse lymphoblastoma L5178Y cells in comparison with that of the parental cell line.

Antibiotics	IC ₅₀ (μg/ml) for		Degree of* resistance
	Parental	Resistant	
Adriamycin	0.01	0.2	20
Daunorubicin	0.01	0.2	20
Baumycin A ₁	0.004	0.08	20
Baumycin A ₂	0.004	0.08	20
1-Deoxyypyrrromycin	0.03	0.12	4
MA144-S1	0.01	0.12	12
Aclacinomycin A	0.01	0.02	2
Aclacinomycin B	0.01	0.02	2
Aclacinomycin Y	0.01	0.02	2
Pyromycin	0.04	0.04	1
Musettamycin	0.004	0.008	2
Cinerubin A	0.006	0.006	1
Bleomycin A ₂	0.7	0.8	1
Mitomycin C	0.06	0.08	1
Actinomycin D	0.0005	0.001	2
Neothramycin	0.15	0.15	1
Blasticidin S	1.0	1.2	1

* The resistance is expressed as ratio of IC₅₀ values for resistant to parental cell line.

Drug sensitivity of an aclacinomycin A-resistant subline of L5178Y cells in comparison with that of the parental cell line.

Antibiotics	IC ₅₀ (μg/ml)		Degree of* resistance
	Parental	Resistant	
Aclacinomycin A	0.02	0.22	11
B	0.03	0.14	5
Y	0.01	0.07	7
MA144-S	0.08	1.8	23
1-Deoxyypyrrromycin	0.14	1.3	9
Cinerubin A	0.03	0.1	3
Musettamycin	0.02	0.19	10
Pyromycin	0.1	0.44	4
Daunorubicin	0.12	3.2	27
Adriamycin	0.06	2.5	42
4'-O-Tetrahydropyranyladriamycin	0.02	0.3	13
Baumycin A1	0.06	>0.5	>8
A2	0.03	0.47	16
Mitomycin C	0.02	0.36	18
Actinomycin D	0.03	0.27	9
Macromomycin	0.06	0.45	8
Auromomycin	0.0013	0.016	13
Bleomycin A ₂	2.1	3.1	1
Neothramycin	0.145	0.185	1
Blasticidin S	1.85	1.85	1
Vinblastine	<0.06	0.27	>5
Cytochalasin B	0.58	>2.4	>4

* The resistance is expressed as a ratio of IC₅₀ values for resistant to parental cell line. The cells were incubated with the drugs at 37°C for 3 days.

Drug sensitivity of a bleomycin-resistant subline of L5178Y cells in comparison with that of the parental cells.

	Antibiotic	IC ₅₀ (μg/ml) for		Degree of resistance*
		Parental	Resistant	
Experiment 1	Bleomycin A ₂	0.48	8.4	17.5
	Neocarzinostatin	0.01	0.02	2.0
	Macromomycin	0.015	0.028	1.8
	Mitomycin C	0.064	0.094	1.5
	Adriamycin	0.07	0.08	1.1
	Aclacinomycin A	0.047	0.058	1.2
	Blasticidin S	3.4	0.94	0.28
	Fusidic acid	35	52	1.5
Experiment 2	Bleomycin A ₂	0.82	8.5	10.4
	Peplomycin	0.45	3.4	7.7

* The resistance was expressed as ratio of IC₅₀ values for resistant to parental cell line.

第5章 ラクトキノマイシンの作用機作

序

ラクトキノマイシンの作用を薬剤としてはLQM-Aを、細胞としては感受性の最も高かったL5178Y adriamycin耐性細胞を用いて調べた。LQM-Aとanthracycline系抗生物質の構造上の類似からDNAとの作用を、細胞形態変化の観察から、膜への作用を、quinone骨格を有している点から、電子伝達系への作用を研究した。

第1節 高分子合成への影響

1 実験方法

L5178Y/ADM細胞(2.0×10^5 cells/ml)をmicroplateにまき、LQM-Aと2時間 incubationする。その後 [^3H] thymidine, [^3H] uridine, [^3H] alanineを各々終濃度0.5, 1.0, 4.0 $\mu\text{Ci/ml}$ で加え、更に30分間incubationする。細胞は glass fiber filter 上に集め、radioactivity をliquid scintillation counterにて測定した。また同時にLQM-A処理2時間30分後の cell viabilityをtrypan blue dye exclusionにより計測した。

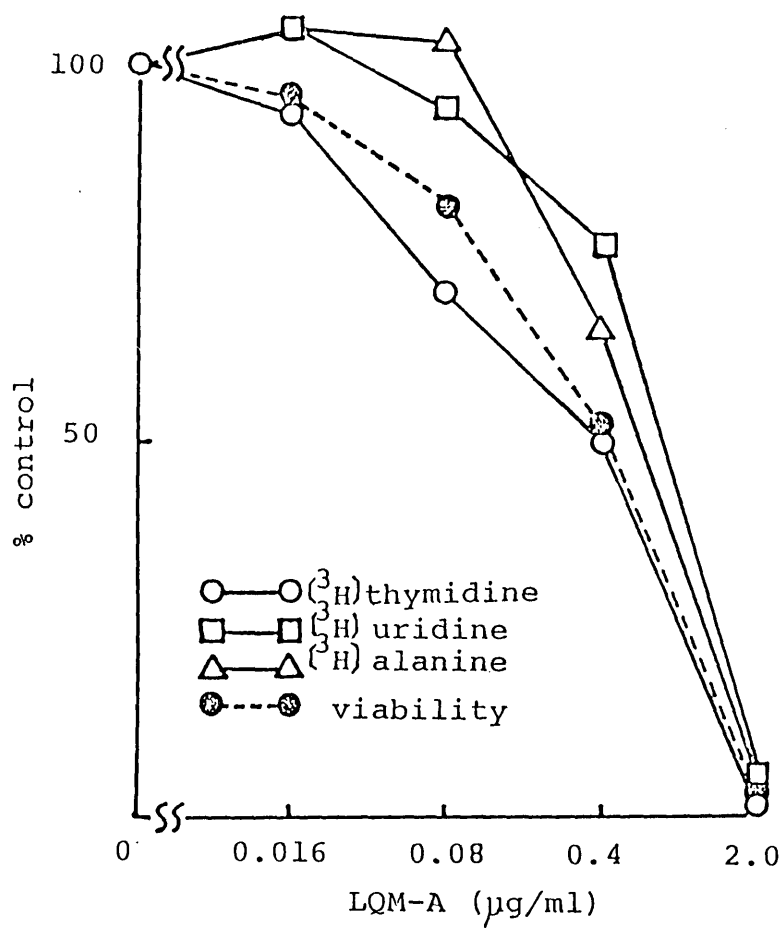
[5,6- ^3H] uridine (45.9 Ci/mmol) New England Nuclear
L- [3- ^3H] alanine (82.7 Ci/mmol) New England Nuclear

2 結果と考察

LQM-AのDNA, RNA, タンパク質合成に対する影響を [^3H] thymidine, [^3H] uridine, [^3H] alanineの酸不溶分画への取り込みによって調べた。Fig. 5-1に示すようにDNA, RNA, タンパク質合成は同程度に阻害されており、その阻害の程度はcell viabilityとよい一致を示していた。この事は、これら高分子合成阻害は細胞死の結果生じたものであることを示唆し、高分子合成阻害が本物質の1次作用点であるとは考え難い。

Fig. 5-1

Effects of lactoquinomycin A on the incorporation of precursors and cell viability



第2節 DNAとの作用

1 実験方法

in vitroに於けるDNA鎖切断⁵⁰⁾

LQM-Aと0.1 A₂₆₀ unit PM-2 phage DNA(Boehringer Mannheim)を50 mM Tris-HCl (pH 7.6)buffer 50 μ l中37°Cで30分間incubationする。反応液はLoening's buffer(37 mM Tris-HCl, 30 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.6)中agarose gel電気泳動(0.9% agarose, Seakem ME, FMC corporation)にかけた。gelは1 μ g/ml ethidium bromideで染色した後、350 nmのUV照射下、写真撮影を行なった。

in vivoに於けるDNA鎖切断⁵¹⁾

L5178Y/ADM細胞(2.5×10^5 cells/ml)を0.5 μ Ci/ml [³H] thymidineと14時間 incubation する。細胞は遠心洗浄し、次にLQM-A 100 μ g/mlと1時間 incubation する。この細胞液(1.0 ml)をそのまま溶解液(0.2 ml, 0.5 M NaOH, 0.02 M EDTA, 0.1% Triton X)を重層した5-20%(w/v)のアルカリリショ糖勾配(4.2 ml, 0.3 M NaOH, 0.7 M NaCl, 0.01 M EDTA)の液面の上に静かにのせる。室温で10時間反応させた後20°Cで30,000 rpm x 90 min遠心する。サンプルはISCO fractionator Model 640を用いて0.3 mlずつ分画する。各々のフラクションの radioactivity をliquid scintillation counterにて計測した。

DNA融解温度(T_m)の測定⁵²⁾

LQM-Aとcalf thymus DNA (62 μ M, Sigma)をcitrate buffer(15 mM NaCl, 1.5 mM sodium citrate, pH 6.4)中加温しながら、260 nmの吸光度の変化をGilford spectrophotometer 250により測定し、T_mを求めた。

差スペクトルの測定

LQM-Aとcalf thymus DNA(200 μ M)をcitrate buffer中混和させた場合の吸光度変化を日立spectrophotometer 220にて測定した。

2 結果

in vitroに於けるDNA鎖切断

無傷の PM-2 phage DNA は超らせん構造(form I, covalently closed circular)をとっており、2本鎖のどちらか一個所に切れ目がはいると、open circular form (form II) にかわる。また2本鎖切断が起こると linear form(form III)を生じる。

LQM-A処理によりDNAの1本鎖切断がみられた。Table 5-1にはこのform I からform II への変化の程度を-, +で示した。

(1) DTT(dithiothreitol)の効果

LQM-A 10 μ g/mlでは1 mM DTTが存在すると鎖切断が起こるが、DTTがないと起こらない。LQM-Aが作用するとき還元剤の存在が必要であることが示唆された。

(2) 金属イオンの効果

1 mM DTT存在下でも鎖切断が起こらない濃度として、LQM-A 1 μ g/mlを選び、金属イオンによる鎖切断の促進効果を調べた。 Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} に促進効果がみられたが、DTTが存在しないと鎖切断は起こらなかった。また鉄イオンとしては Fe^{3+} より Fe^{2+} の方が有効であった。

(3) 切断活性の阻害

1 mM DTT存在下で十分に鎖切断が起こる濃度としてLQM-A 10 μ g/mlを選び、 H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ などの活性酸素種のscavengerとして知られている試薬を加え鎖切断を抑制するかどうか調べた。 H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ のscavengerは

鎖切断をよく押えたことより、この系でのDNA鎖切断には、LQM-Aにより発生した H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH などの活性酸素種が関与していると考えられる。

in vivoに於けるDNA鎖切断

in vitroでLQM-AがDNA鎖切断を起こすことは分かった。そこで細胞内(in vivo)でもDNA鎖切断が起こっているかどうかアルカリしよ糖密度勾配遠心により調べた(Fig. 5-2)。LQM-A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1時間処理した細胞では、コントロールに比して低分子フラクションへのDNAの移行がみられた。しかしDNA鎖切断が1次作用点であるbleomycinに比して、その移行の程度は軽微であり、LQM-A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1時間処理した細胞がもはや細胞の形態を示さないほど、崩壊している事とあわせると、本実験でみられたDNA鎖切断は2次的な作用と考えられる。

T_mの変化

Table 5-2に示した様に、DTTのあるなしにかかわらず、T_mの変化はほとんどみられなかった。この事はLQM-Aとの結合も、LQM-AによるDNAの切断も起きていない事を示している。

差スペクトルの変化

calf thymus DNAとLQM-Aが10:1のモル比の時の差スペクトルをFig. 5-3に示した。LQM-AとDNAとの相互作用は観察されなかった。

Table 5-1

DNA strand scission

(1) effect of DTT

lactoquinomycin A	+DTT 1mM	-DTT 1mM
100 μ M	+++	
10	+++	-
1	-	-

(2) effect of Metal ions

lactoquinomycin A 1 μ g/ml

		+DTT 1mM	-DTT 1mM
+ Fe ²⁺	2 μ M	++	-
	0.2	++	-
+ Fe ³⁺	20	++	-
	2	+	-
+ Cu ²⁺	0.5 mM	+++	
	50 μ M	+	-
+ Mg ²⁺	0.5 mM	±	
+ Ca ²⁺	0.5	-	
+ Zn ²⁺	0.5	-	

(3) Inhibition

lactoquinomycin A 10 μ g/ml + 1mM DTT

			trapped
+ catalase	1 μ g/ml	+	H ₂ O ₂
	10	-	
	10 #	+++	
+ SOD	100 μ g/ml	+	O ₂ ⁻
	1 mg/ml	-	
	1 #	+++	
+ isopropyl-	2%	+	•OH
alcohol	4%	-	
+ tryptophan	10mM	+	
	20	+	
+ KI	10	+	
	20	+	

+ DABCO	10 mM	+++	$^1\text{O}_2$
	20	+++	
+ histidine	10 mM	+++	
	50	+++	

DABCO :diazabicyclo octane

: inactivated by heating for ten minutes at 100°C

PM-2 phage DNA 0.1 A₂₆₀ u/ml

Fig. 5-2

DNA strand scission induced by lactoquinomycin A
in L5178Y/ADM cells: Sedimentation profiles

▲ lactoquinomycin A 100 $\mu\text{g/ml}$, ● 0

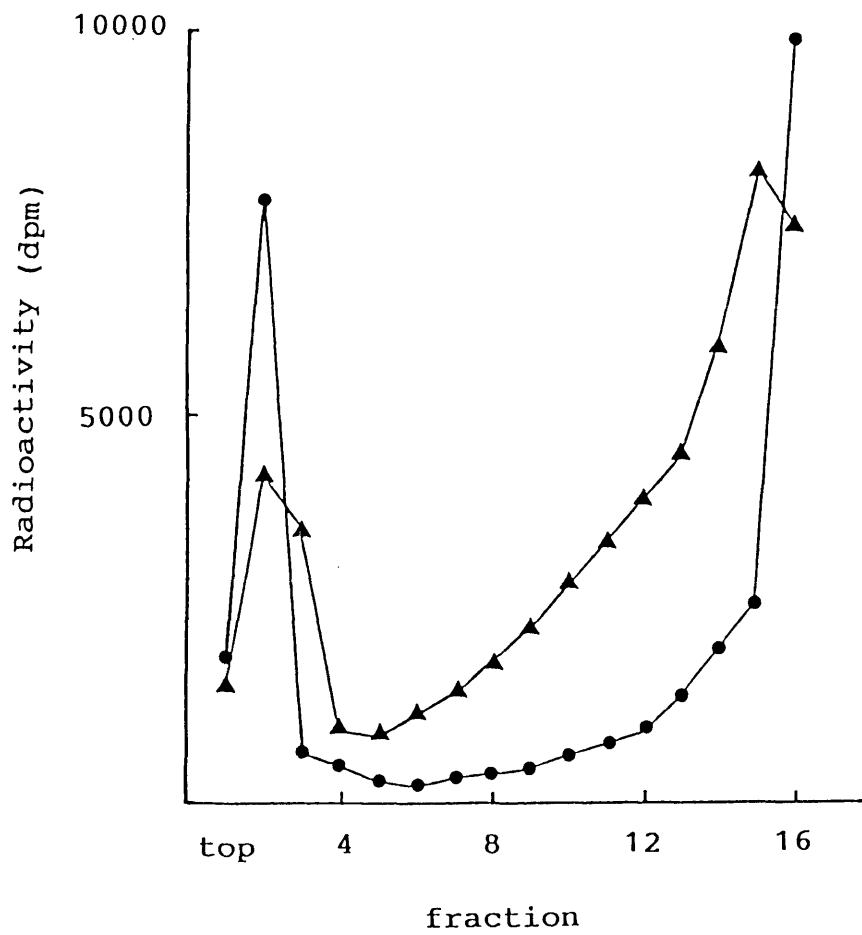
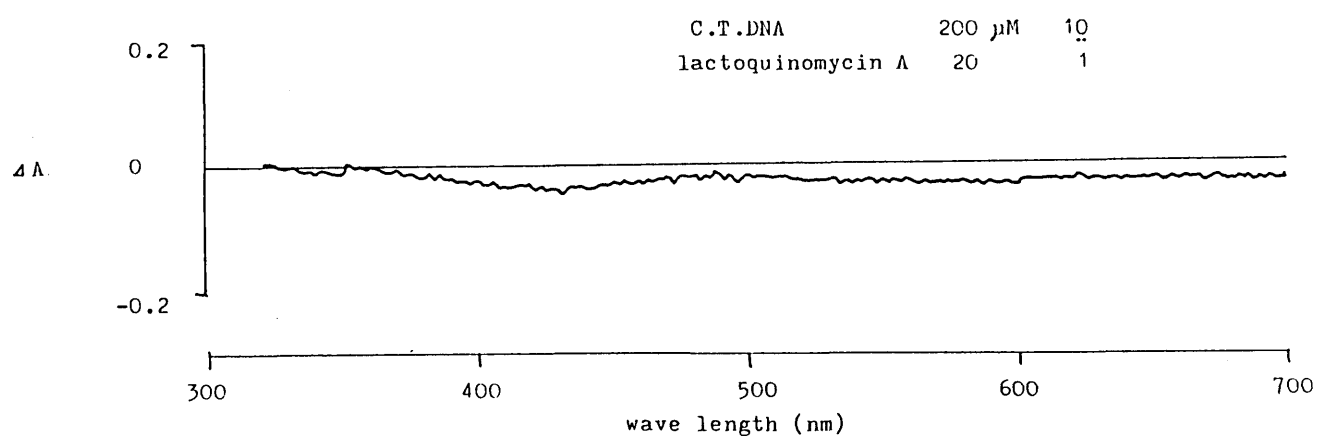


Table 5-2

T_m of C.T.DNA in the presence of lactoquinomycin A.

C.T.DNA 62 μ M		
(1) -DTT		
lactoquinomycin A	pH	T _m ($^{\circ}$ C)
0 μ M	6.95	70.2
6.2	6.93	70.0
31	6.95	72.4
62	6.88	73.4
(2) + DTT (1 mM)		
lactoquinomycin A	pH	T _m ($^{\circ}$ C)
0 μ M	7.09	70.2
6.2	7.09	70.0
62	7.01	69.8

Fig. 5-3 Different spectrum



3 考察

LQM-Aがquinone骨格とアミノ糖を有している事より、作用機作に於ける anthracycline系抗生物質との類似性が考えられた。そこでDNAとの作用を in vitro, in vivoに於けるDNA鎖切断、 T_m 、差スペクトルについて調べたが、DNAへの作用があることを支持する積極的なデータは得られなかった。しかしin vitro に於けるDNA 鎖切断の実験より、LQM-A が還元剤存在下 radicalを発生しうるといふ、この物質の持つ特徴の1つが示された。

第3節 膜への作用

1 実験方法

細胞形態変化の観察

ヒト肝癌PLC細胞をLQM-A 10 $\mu\text{g/ml}$ で60分間処理し、methanolで固定後Giemsa染色した。

Na⁺,K⁺-ATPaseに対する作用

下記反応液1.0 mlにLQM-Aを加え37℃,30分間incubationする。ice-cold 50% TCAを加えて反応停止後、タウスキーショール試薬1.0 mlを加え、700 nmの吸光度を測定した。

0.025 unit/ml Na⁺,K⁺-ATPase (E.C.3.6.1.3.,Sigma,from dog
kidney grade IV)

140 mM	NaCl
14 mM	KCl
5 mM	MgCl ₂
3 mM	ATP
50 mM	Tris-HCl(pH 7.6)

赤血球に対する溶血作用⁵³⁾

ヒツジ赤血球(SRBC)を生理食塩水に懸濁し、LQM-Aと1時間incubationした後、3,000 rpm x 5 min遠心する。上清の550 nmの吸光度を測定した。

2 結果

細胞形態変化

LQM-A処理したPLC細胞では、Fig. 5-4からも分かるように、細胞表面にblebを生じ、特徴的な形態変化を示して死に至るのが観察された。

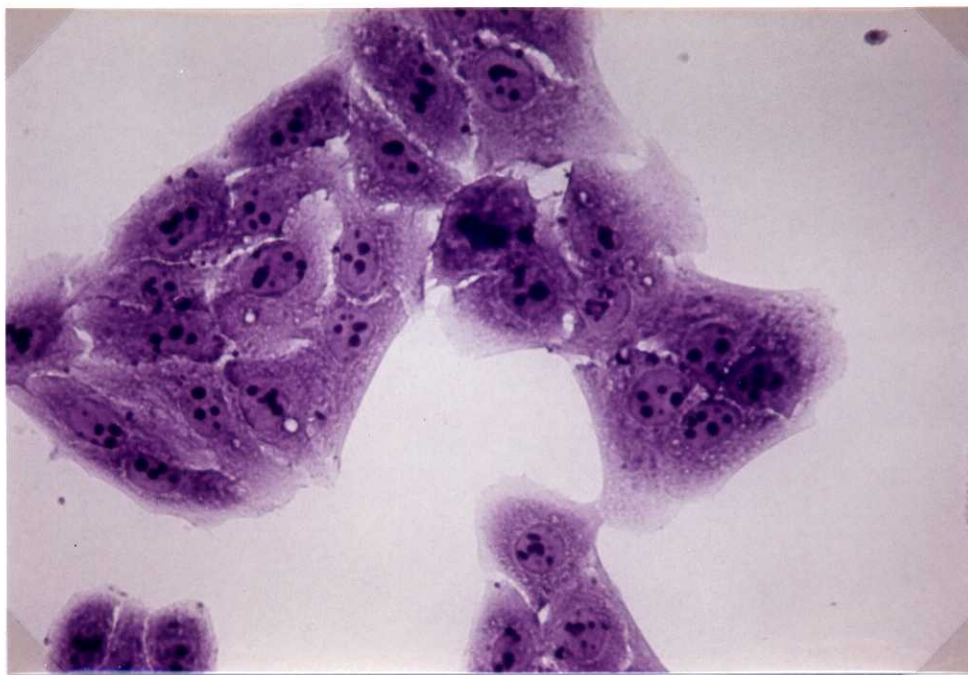
Na⁺,K⁺-ATPaseに対する作用

LQM-AはNa⁺,K⁺-ATPaseに対して弱い阻害作用（20 μ g/mlで23%）を示した（Fig. 5-5）。またこのとき代表的なNa⁺,K⁺-ATPase阻害剤であるouabain 1 mMは91%の阻害を示した。このように Na⁺,K⁺-ATPase 活性をほとんどおさえてしまう ouabain 1 mMでも、前述のような細胞形態変化は認められなかったので、Na⁺,K⁺-ATPaseの阻害による浸透圧変化がLQM-Aによる細胞死の原因であるとは考え難い。

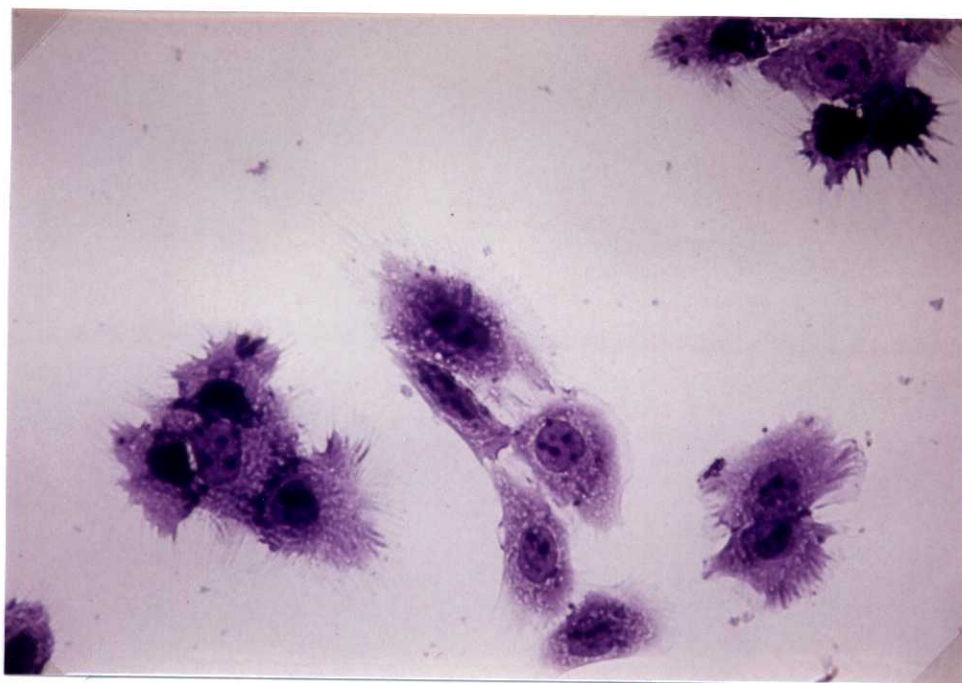
赤血球に対する溶血作用

SRBCにたいしてLQM-Aは全く溶血作用を示さなかった（Fig. 5-6）。この事よりLQM-Aによる膜傷害はpolyene抗生物質（例えばamphotericin B）の様な小孔形成によるものではない事が分かった。

Fig. 5-4 Morphological change of PLC cells
by lactoquinomycin A treatment



control



lactoquinomycin A 10 µg/ml 60'

Fig. 5-5

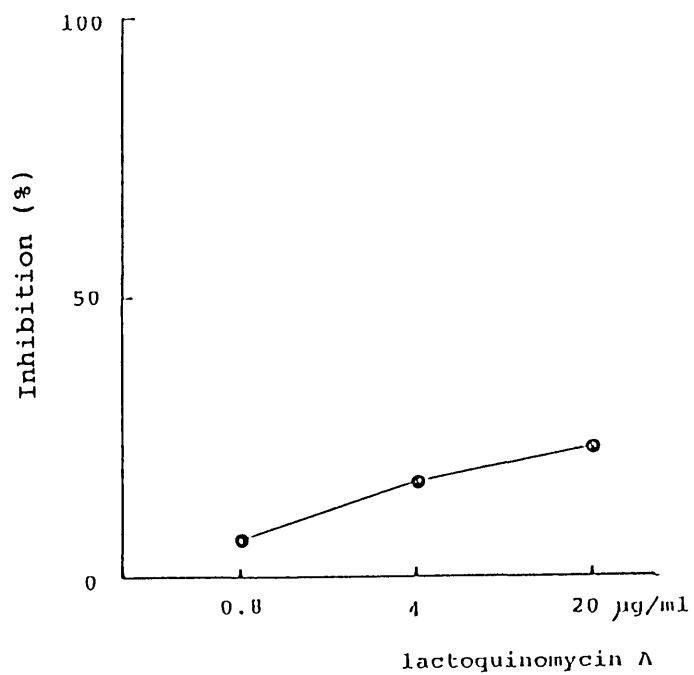
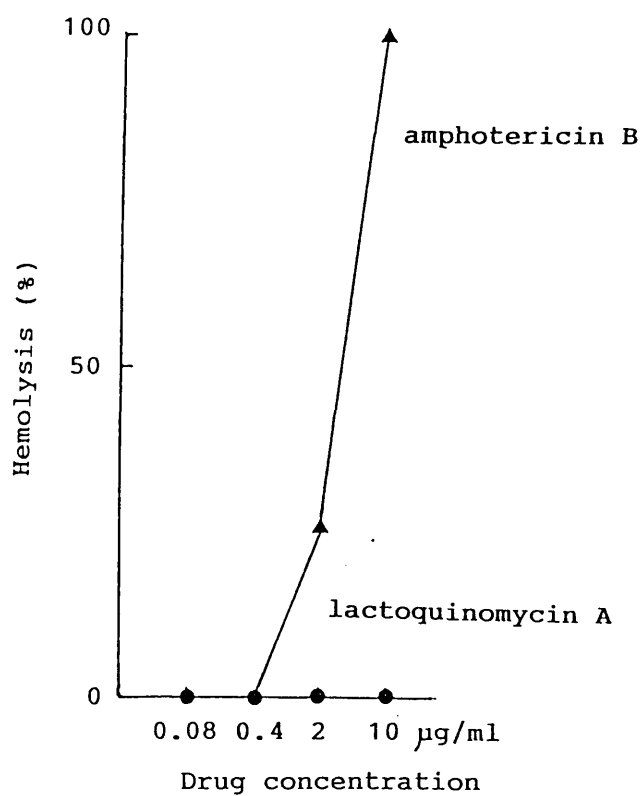
Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase by lactoquinomycin A

Fig. 5-6 Hemolytic activity of lactoquinomycin A on sheep red blood cells



3 考察

本節では LQM-A の作用を細胞形態変化の面から調べてみた。その結果 LQM-Aによる細胞死は Na^+, K^+ -ATPase阻害による浸透圧死でもなく、細胞膜での小孔形成によるものでもないことが分かった。また写真に示した様な細胞形態変化は、細胞をcytochalasin Bで処理した場合にもみられる⁵⁴⁾ので、LQM-Aの細胞骨格に対する作用が示唆される。

第4節 電子伝達系への干渉

1 実験方法

electron acceptorとしての能力⁵⁵⁾

下記反応液中30℃に於けるNADHの消費を340 nmの吸光度の減少により測定した。

0.05 unit/ml	cytochrome c reductase(E.C.1.6.99.3. Sigma,from porcine heart type I)
0.01 mM	electron acceptor (LQM-A or other quinones)
0.15 mM	NADH
1 mM	EDTA
0.1 M	potassium phosphate buffer(pH 7.0)

細胞内ATPレベルの測定

L5178Y/ADM細胞(2.0×10^5 cells/ml)をLQM-Aと所定の時間incubationし、細胞を遠心洗浄後Dick等の方法⁵⁶⁾により、nucleotideを抽出する。抽出したnucleotideはHPLCにて分析した。

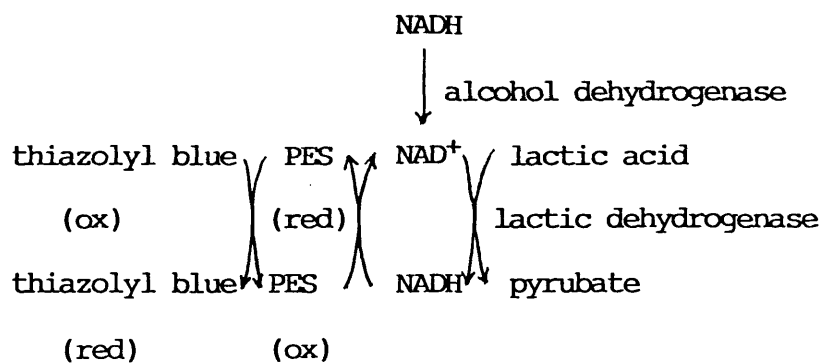
HPLCの分析条件

column	Nucleosil 5 C ₁₈ (8 φ x 200 mm)
mobile phase	0.2 mM phosphate buffer (pH 7.0) 20% methanol,10 mM tetra-n-butyl- ammonium bromide
detection	UV 260 nm

細胞内NADHレベルの測定^{57,58)}

L5178Y/ADM細胞(1.0×10^6 cells/ml)をLQM-Aと所定の時間incubationし、遠心洗浄する。細胞からNADHを0.5 M KOH-50% ethanol 300 μ l, 90°C 5分の処理で抽出し、中和する。抽出液中のNADHは30 μ mol acetaldehyde, 3 unit alcohol dehydrogenase (E.C.1.1.1.1., オリエンタル酵母, from yeast) と37°C, 30分間反応させて NAD^+ に変える。次いで抽出液を2 M m-phosphoric acidで酸性にし、遠心により除タンパクを行ない、再び中和する。 NAD^+ の定量はcycling spectrophotometric assayを利用して行なった。すなわち下記に示す反応液中、37°C, 30分間反応を行ない、thiazolyl blueの還元による570 nmの吸光度の上昇を測定した。

10 unit/ml	lactic dehydrogenase(E.C.1.1.1.27., Sigma, from rabbit muscle type XI)
5 mM	lactic acid
0.8 mM	phenazine ethyl sulfate(PES)
0.2 mM	thiazolyl blue
0.1 M	Tris-HCl(pH 7.0)
cell ext.	400 μ l



2 結果

electron acceptorとしての能力

NADHをelectron donor, cytochrome c reductaseを還元酵素とした系で、LQM-A が基質 (electron acceptor) となりうるかどうかを調べた。Table 5-3に示すように LQM-A は cytochrome c reductaseの生理的基質である CoQ₁₀よりも遥かによい基質として働いていることが分かった。興味ある事にLQM-BはLQM-Aの約30分の1の能力しか示さず、細胞毒性に於ける両者の相違に相関していた。言い換えればelectron acceptorとしての働きが、ラクトキノマイシンの細胞毒性を現わす上で重要なものであると考えられる。

細胞内ATPレベルへの影響

LQM-Aが呼吸鎖の電子伝達系に干渉する可能性が示されたので、実際に細胞内で LQM-A 処理により ATP レベルが低下するか否かを調べた。Fig.

5-7に示すように、LQM-A 2 μ g/ml, 60分処理によりATPレベルはコントロールの約60%にまで低下した。この効果はATP産生に於けるuncouplerであるdinitrophenol 1mMに匹敵する。dinitrophenol処理では処理後2-3時間は死細胞は出現しないが、LQM-A処理では1時間後から徐々に死細胞が出現し、2時間後にはほとんど全ての細胞が死滅してしまっている。このことからATPレベルの低下だけが細胞死の原因ではないと考えられる。

細胞内NADHレベルへの影響

LQM-A処理による細胞内NADHレベルの低下は、Fig. 5-8に示した通りである。NADHの減少はATPの場合よりも著しく、LQM-A 2 μ g/ml処理では15分でコントロールの約50%、30分で約25% にまで減少していた。これはLQM-Aが細胞内でもcytochrome c reductaseの様なNADH dehydrogenaseのよい基質として働いているためと考えられる。

Table 5-3 Ability as the electron acceptor of cytochrome c reductase

acceptor (0.01 mM)	NADH consumption (nmol/mg protein/min)
lactoquinomycin A	206
lactoquinomycin B	7
menadion (vitamin K ₃)	120
coenzyme Q ₁₀	10

Fig. 5-7

Effect of lactoquinomycin A on cellular ATP level

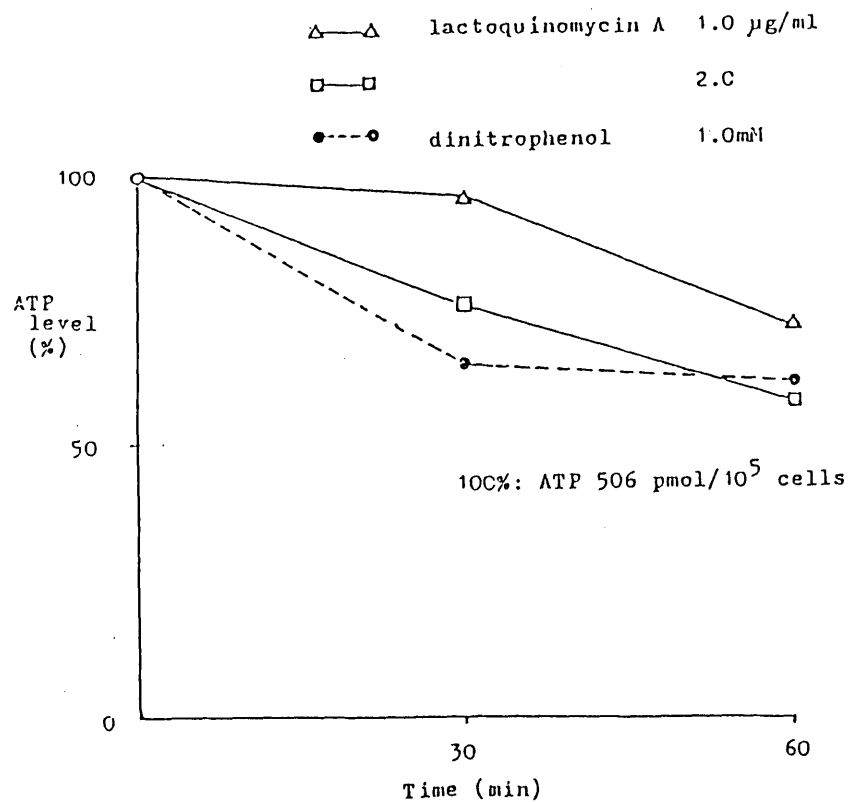
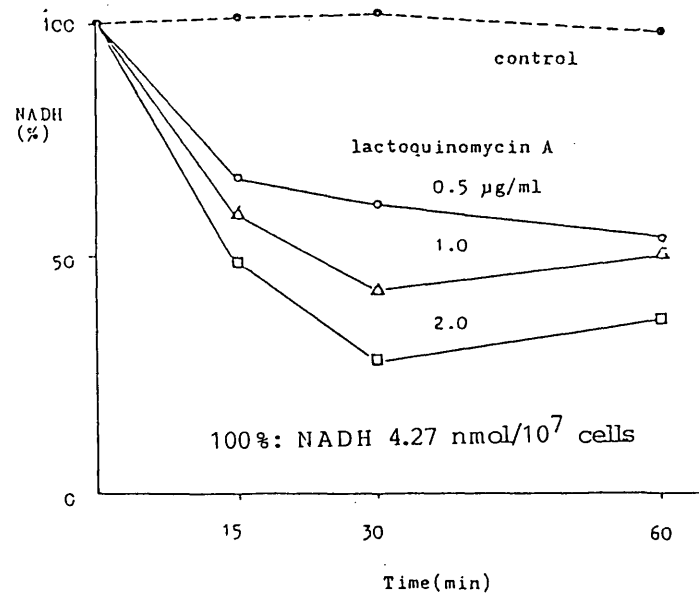


Fig. 5-8

Effect of lactoquinomycin A on cellular NADH level



3 考察

LQM-Aはその構造中にquinone骨格を有しているので、呼吸鎖に於ける電子伝達系に干渉する可能性が考えられた。実際cytochrome c reductaseにたいしてCoQ₁₀よりも遥かにより基質として働き、細胞内でもATP, NADHレベルを低下させた。NADHレベルの低下はATPレベルの低下よりも著しいこと、dinitrophenolがATPレベルを低下させるにもかかわらず、死細胞の出現はそれほど著しくないことを考えあわせると、LQM-Aの場合NADHレベルの低下の方がATPよりもLQM-Aによる細胞への影響としてはより重要であると思われる。

第5節 radicalの発生

1 実験方法

ESRによるradicalの検出

下記反応液をcapillaryに吸い、JEOL JES-FE 3XによりESRを測定した。

0.5 unit/ml	cytochrome c reductase or DT-diaphorase(E.C.1.6.99.,オリエンタ ル酵母,from yeast)
0.5 mg/ml	LQM-A
0.5 mM	NADH
270 mM	DMPD(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)
0.2 M	potassium phosphate(pH 7.0)

superoxide anionの測定(NBT法)

L5178Y/ADM 細胞を15 mM KCl, 1 mM EDTAを含む0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)中homogenizeし、遠心により沈殿を除いて、上清をcell lysateとして用いた。cell lysate (1.1 mgタンパク)を0.05% NBT (nitro blue tetrazolium)及びLQM-Aと37°Cで30分間incubationする。反応液に1 N HClを加え遠心し、残さを1 N HClで洗った後、hot pyridineに溶かす。遠心後上清の515 nmの吸光度を測定した。

LQM-Aの細胞毒性に対するvitamin Eの効果

L5178Y/ADM細胞(2.0×10^5 cells/ml)にLQM-A 2 μ g/ml及び種々の濃度のvitamin E(α -tocopherol acetate)を加え2時間incubation 後trypan blue dye exclusionにより生細胞数を計測した。

脂質に対する作用

L5178Y/ADM 細胞 (1.7×10^5 cells/ml) を LQM-A $5 \mu\text{g/ml}$ と1時間 incubation した後、洗浄して凍結乾燥した。それを4.8% HCl-methanol 中 100°C , 3時間反応させた(ester交換)後、反応液をn-hexaneで抽出し、gas chromatographyにより脂肪酸の分析を行なった。

2 結果

ESRによるradicalの検出

spin trap 剤を用いない場合にはradicalの発生は検出できなかった。
DMPDをspin trap剤として用いた場合にはLQM-A, cytochrome c reductase, NADHの3者が共存した場合のみradicalの発生が認められた(Fig. 5-9(1))。LQM-A あるいは cytochrome c reductase が欠けた場合(2), (3)には、radicalのシグナルは検出されていない。cytochrome c reductaseのかわりにDT-diaphoraseを用いた場合(4)にもやはりシグナルはみられなかった。(1)で検出されているシグナルの hyperfine coupling constantは $a^N = a^H = 14.9 \text{ G}$ であり、DMPD:OH adduct^{59, 60)}のシグナルと考えられる。

superoxide anionの測定

cell lysateとLQM-Aを37°C, 30分間incubationする事により、LQM-Aの濃度に依存してsuperoxide anionの生成が認められた(Fig. 5-10)。またこのsuperoxide anionの発生はSOD(superoxide dismutase, E.C.1.15.1.1., Sigma, from bovine erythrocyte)の添加により完全に抑制された。

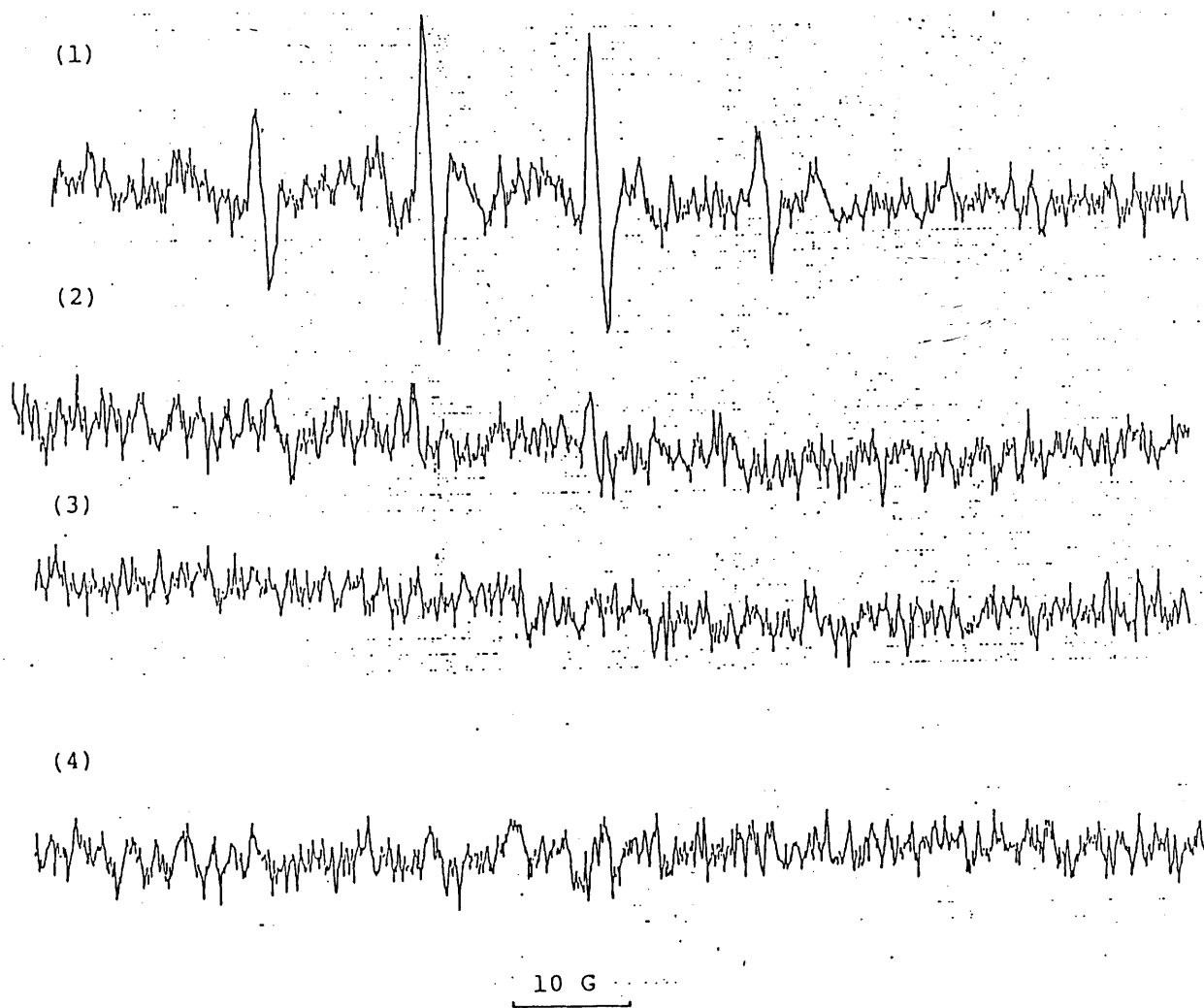
vitamin Eの効果

抗酸化剤であるvitamin Eを細胞に加えることにより、LQM-Aによる細胞毒性は減弱した(Fig. 5-11)。radicalの発生がLQM-Aによる細胞毒性に関与していると考えられる。

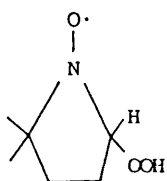
脂肪酸分析

LQM-A処理により細胞の脂肪酸組成に変化が生じるかどうか調べた。結果はTable 5-4に示した通りである。差異はほとんど見られない。しかしLQM-A $5 \mu\text{g/ml}$ 処理細胞では凍結乾燥後の重量が未処理細胞に比して7%減少しており、膜傷害による内容物の漏出が起きていると考えられる。

Fig. 5-9 ESR spectra of the radical produced by lactoquinomycin A

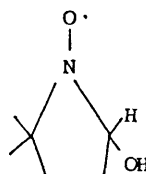


- (1) lactoquinomycin A + cyt-c reductase + NADH
 (2) cyt-c reductase + NADH
 (3) lactoquinomycin A + NADH
 (4) lactoquinomycin A + DT-diaphorase + NADH



DMPO:OOH adduct

$$a^N=14.3\text{G}, a^H_p=11.7\text{G}, a^H_r=1.2\text{G}$$



DMPO:OH adduct

$$a^N=a^H=14.9\text{G}$$

Fig. 5-10 Superoxide anion generation by lactoquinomycin A

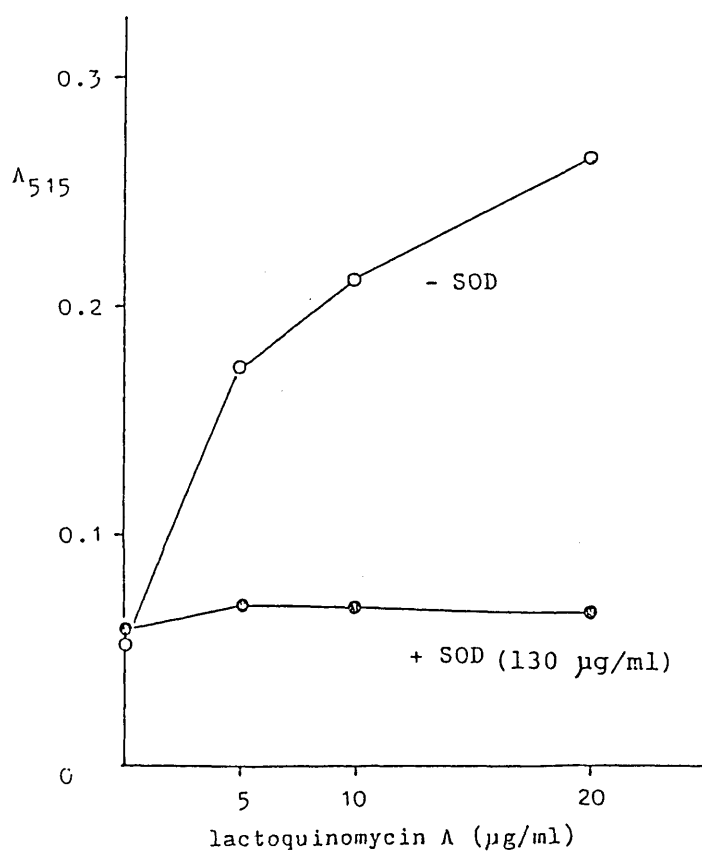


Fig. 5-11 Effect of vitamin E on lactoquinomycin A cytotoxicity

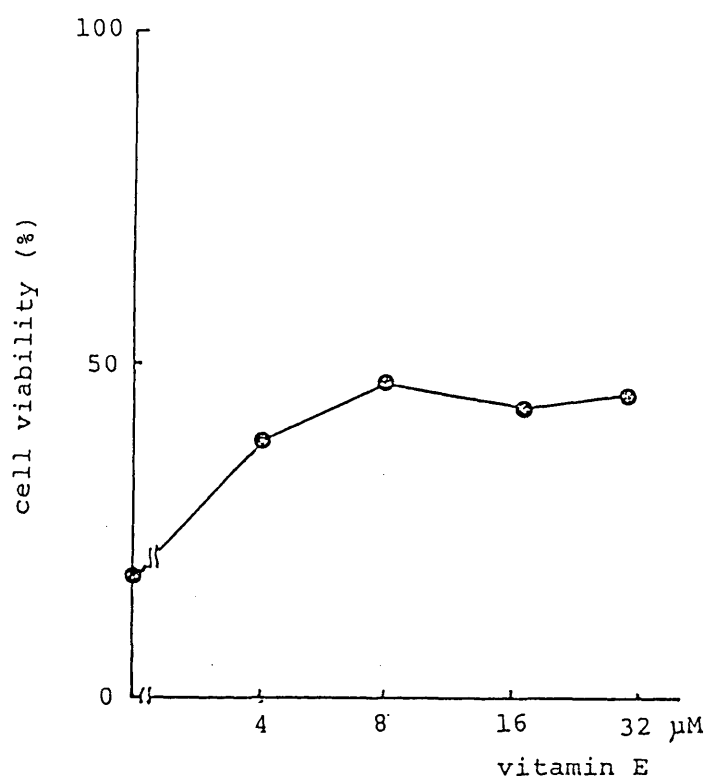


Table 5-4 Analysis of fatty acids

fatty acid	LQM-A	
	0	5 μ g/ml
14:0	3.9%	3.7%
16:0	23.7	22.3
18:0	17.2	17.6
18:1	16.8	16.2
18:2	17.5	17.6
20:1	1.7	1.8
20:2	2.8	3.0
20:3	4.4	5.2
20:4	10.1	10.5

3 考察

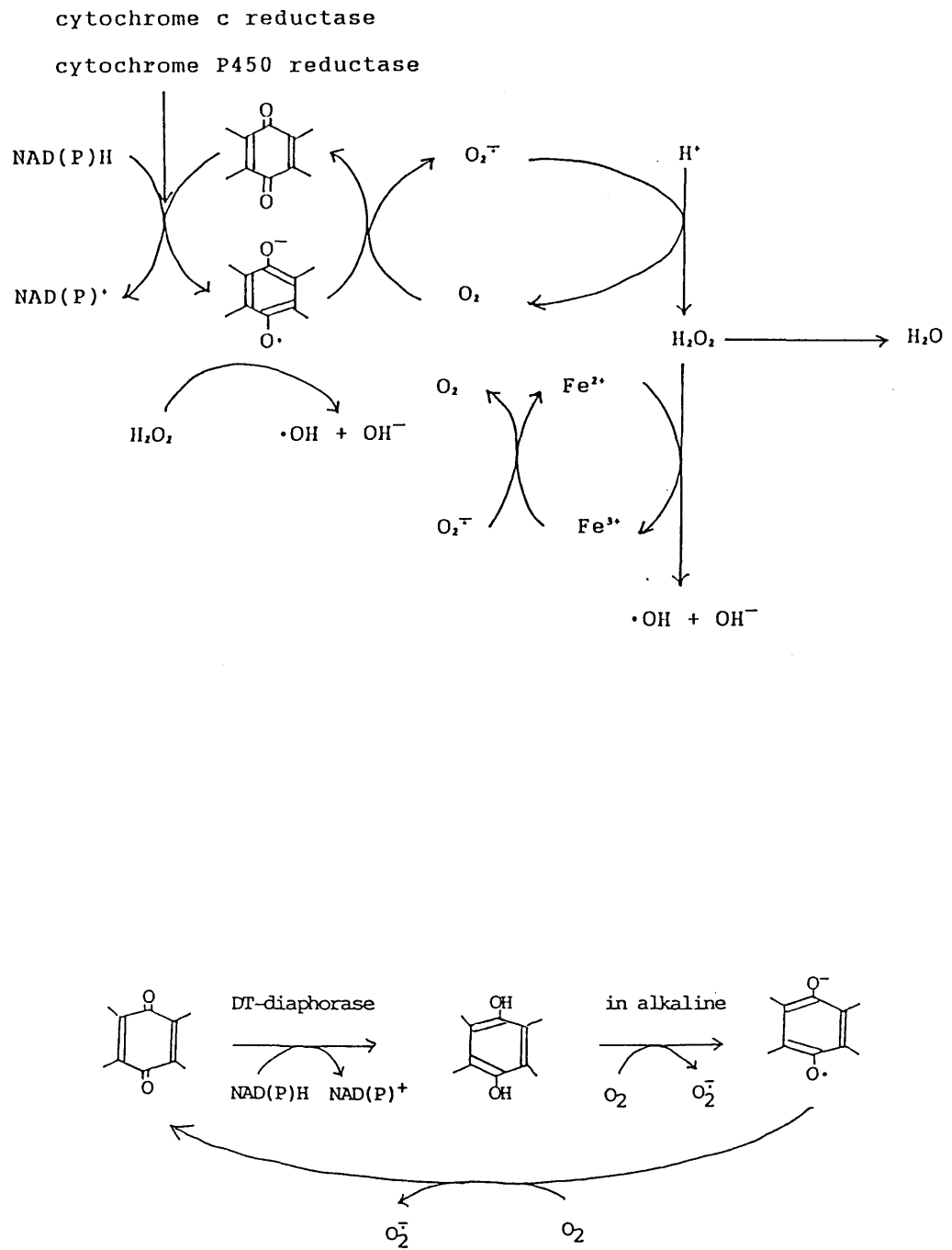
quinone を還元する NAD(P)H dehydrogenase には、cytochrome c reductaseやcytochrome P-450 reductaseに代表される 1 電子還元をして quinoneをsemiquinone radicalにするものと、DT-diaphoraseの様に 2 電子還元をして quinone を hydroquinone にするものとが知られている。quinone reductaseとして、cytochrome c reductaseを用いた場合にはFig. 5-12に示すような図式で、まずsemiquinone radical(実際にはESRで捕える事ができなかった)が生じると考えられる。このsemiquinone radicalと O_2 とからsuperoxide anion $O_2^{\cdot-}$ が生じ、 $O_2^{\cdot-}$ は H_2O_2 に変換し、 H_2O_2 と $O_2^{\cdot-}$ とからFenton reactionを介して $\cdot OH$ が生成すると考えられる。更に H_2O_2 とsemiquinone radicalとから直接 $\cdot OH$ が生成する可能性も考えられる。本実験のESRでDMPDとのadductとして捕えた $\cdot OH$ はこのようにして生じたものと推定される。

またこの実験でDMPDと $O_2^{\cdot-}$ とのadductが検出されないのは、 $O_2^{\cdot-}$ のDMPDに対する反応性の低さ、及び DMPD:OOH adductの寿命の短さのためと考えられる。

DT-diaphoraseをquinone reductaseとして用いた場合には、quinoneはhydroquinoneに還元され、hydroquinoneはpH 7付近では安定であるため、radicalの発生はみられない。一方塩基性ではhydroquinoneは不安定であり、semiquinone radicalを経由して自動酸化される事が知られている。

LQM-Aによるradicalの発生はESRだけでなくNBT法によっても確認したが、発生したradicalの細胞内での標的が何であるかは明らかではない。膜が標的の1つとしてあげられるが、その詳細は不明である。

Fig. 5-12



第6節 生体内SHとの反応

1 実験方法

細胞内glutathioneレベルの測定⁶¹⁾

L5178Y/ADM細胞(2.0×10^5 cells/ml)をLQM-Aと所定の時間incubation後 80% hot ethanolでglutathioneを抽出する。この抽出液(0.2 ml)に50 mM phosphate buffer (pH 8.0, 0.8 ml)及びEllman試薬を加え412 nmの吸光度を測定した。

LQM-Aの細胞毒性に対する低分子SH化合物の効果

L5178Y/ADM 細胞 (2.0×10^5 cells/ml) にLQM-A 及びdithiothreitol, cysteineを加え、2時間incubation後trypan blue dye exclusionにより、生細胞数を計測した。

5'-NPDaseに対する阻害作用⁶²⁾

下記反応液(200 μ l)にLQM-Aを加え37°C, 45分間 incubationする。405 nmの吸光度の上昇をELISA-Analyzer ETY-96(Oriental Instrument CO.)にて測定した。

50 mM	Tris-HCl(pH 9.0)
5 mM	MgCl ₂
1 mM	thymidine-5'-monophosphate-p-nitro-phenyl-ester

L5178Y/S cell ext.

2 結果

細胞内glutathioneレベルへの影響

細胞内でradicalが発生するとすれば、glutathioneの減少が起こると考えられる。そこで細胞内の glutathione 量を測定したところ、LQM-A 2 $\mu\text{g/ml}$, 30分処理により細胞内のglutathione量は約50%低下した(Fig. 5-13)。しかしながら反応時間を60分間にしてもそれ以上の減少は認められなかった。

低分子SH化合物の効果

低分子SH化合物の添加により、LQM-Aの細胞毒性は著しく減少した(Fig. 5-14)。dithiothreitol(DTT)とcystein(Cys)とではDTTの方がより効果が強かった。

5'-NPDaseに対する阻害作用

SH酵素の1例として5'-NPDase(5'-nucleotide phosphodiesterase, E.C. 3.1.4.1.)⁶³⁾を選び、LQM-Aによる阻害作用を調べた。Fig. 5-15に示すように5'-NPDase 活性はLQM-A 25 $\mu\text{g/ml}$ でほぼ完全に押えられた。IC₅₀は10 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Fig. 5-13 Effect of lactoquinomycin A on cellular glutathione level

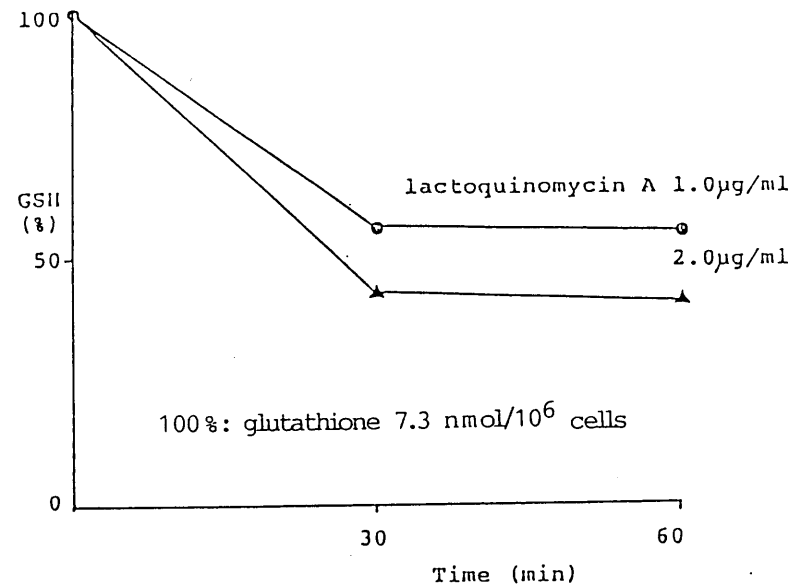


Fig. 5-14 Interaction of lactoquinomycin A with sulfhydryl compounds

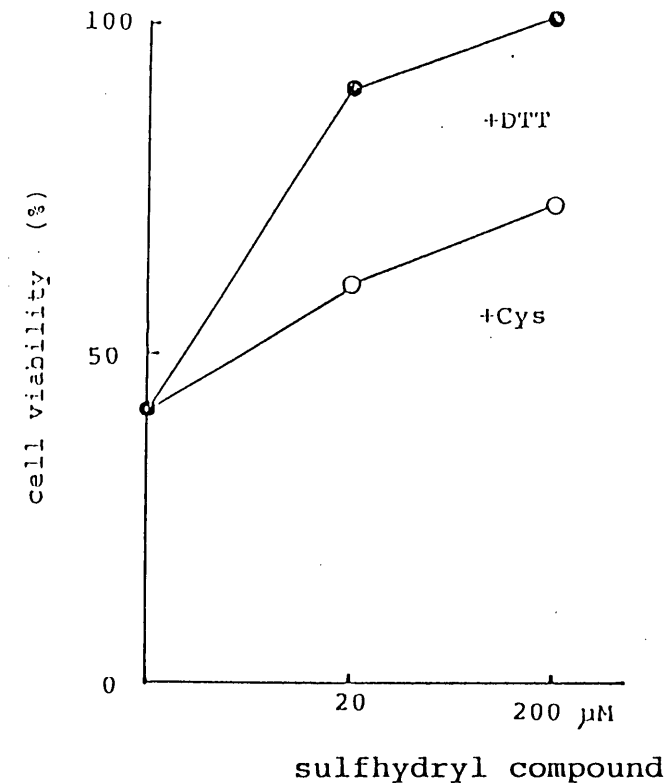
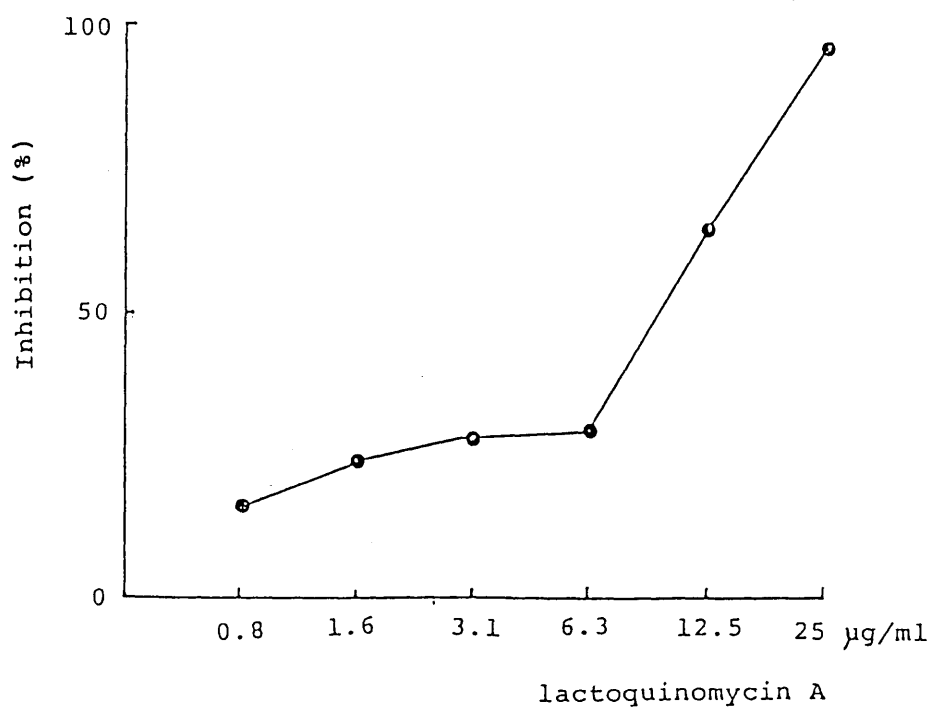


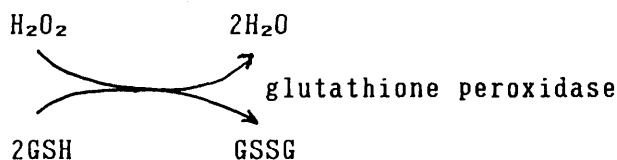
Fig. 5-15 Inhibition of 5'-NPDase by lactoquinomycin A



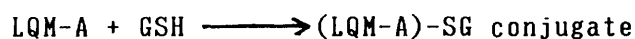
3 考察

LQM-Aによるglutathione(GSH)の減少には次の2つの要因が考えられる。

(1) radical発生の結果生じた H_2O_2 (Fig. 5-12)を除去する為に消費された。

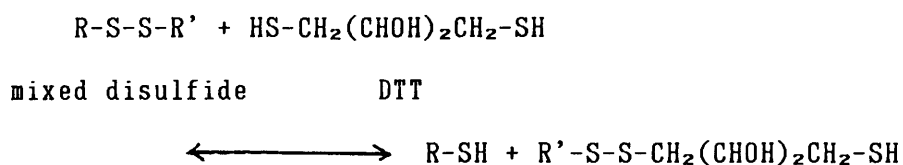


(2) LQM-A との直接の作用(conjugate形成)によって消費された。



この反応は酵素(glutathione-S-transferase)を介さなくても弱塩基性条件下(pH 7.4-7.6)で容易に起こることが試験管内反応で確認されている。

また低分子SH化合物によりLQM-Aの効果が減弱した理由としては先にあげた(2)のconjugate形成によるLQM-Aの不活性化及びradical発生によって生じると考えられるmixed disulfideの除去が考えられる。



LQM-Aは低分子SH化合物のみならず、酵素のSH基とも反応して阻害作用を示すと考えられるが、その作用の意義については標的の酵素を特定出来ないのではっきりしたことは分からない。

第7節 細胞内カルシウム濃度への影響

1 実験方法

カルシウム蛍光指示薬Quin 2-AM⁶⁴⁾処理したL5178Y/ADM細胞(1.0×10^6 cells/ml)にLQM-A $10 \mu\text{g/ml}$ を加え所定の時間incubationした後、 $12,000 \text{ rpm} \times 5 \text{ sec}$ 遠心して上清を除く。細胞を 145 mM NaCl , 5 mM KCl , 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM glucose を含む $2 \text{ mM phosphate buffer (pH 7.2)}$ に再び懸濁して、島津自記差スペクトル分光蛍光光度計 RF-503にてexcitation 339 nm (4 nm slit), emission 492 nm (7.5 nm slit)で蛍光強度 F を測定した。細胞内カルシウム濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は次式で求めた。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 115 \text{ nM} \frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}$$

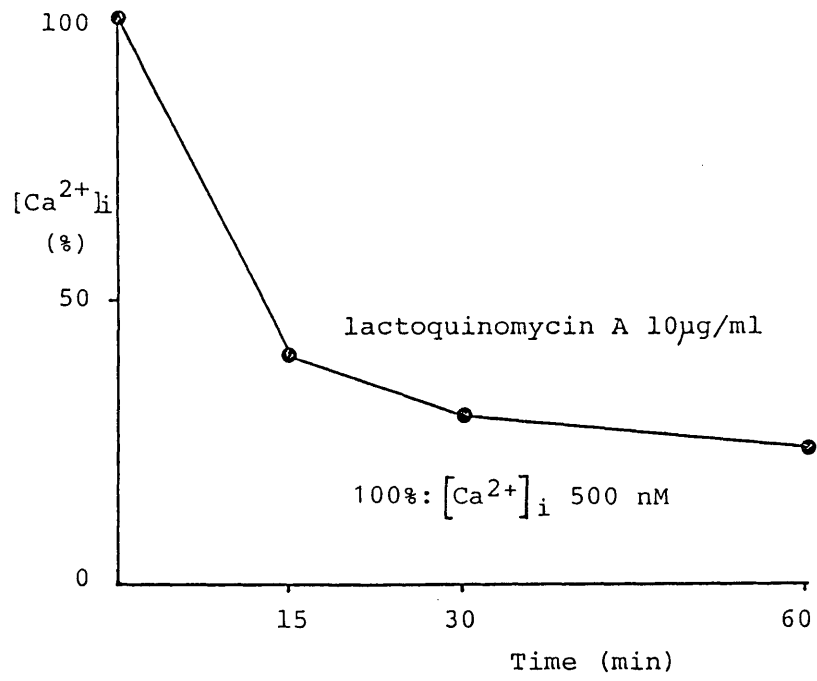
F_{\max} : $0.02\%(\text{v/v})$ Triton X-100で細胞を可溶化した時の蛍光強度

F_{\min} : 可溶化した細胞に 2 mM EGTA を加えた時の蛍光強度

2 結果

LQM-Aの添加により、細胞内カルシウム濃度の速やかな減少がみられた (Fig. 5-16)。薬剤処理後15分ですでに細胞内カルシウム濃度は40%にまで低下した。

Fig. 5-16

Effect on Intracellular Ca^{2+} Concentration

3 考察

H_2O_2 ⁶⁵⁾やcystamine⁶⁶⁾によって細胞内カルシウム濃度が上昇することが報告されている。その機序としては、 H_2O_2 の場合ATPの枯渇による細胞膜の Ca^{2+} -ATPase の阻害が考えられており、cystamine の場合は Ca^{2+} -ATPaseとのmixed disulfideの形成による Ca^{2+} -ATPaseの不活性化が考えられている。LQM-Aの場合その作用の結果として H_2O_2 の発生及び mixed disulfideの形成が考えられるので、細胞内カルシウム濃度を測定してみたが、予想に反し細胞内カルシウム濃度の急速な低下がみられた。LQM-Aの場合ATPの減少及び酵素のmixed disulfide形成は Ca^{2+} -ATPaseの活性を阻害するほど程度の甚だしいものではなかったためと考えられる。

H_2O_2 やt-butylhydroperoxide,menadione,bromobenzenなどによって引き起こされる活性酸素が関与した傷害と細胞内カルシウム・ホメオスタシスとの関連⁶⁷⁻⁷¹⁾は肝細胞においてよく研究されている。これらの研究から細胞内の主要なカルシウム貯蔵部位であるmitochondria及びmicrosomeは各々NAD(P)H,glutathioneレベルによってカルシウム量が調節されている事が明らかになってきている。すなわちNAD(P)Hの枯渇はmitochondriaからのカルシウムの流失を、glutathioneの枯渇はmicrosomeからのカルシウムの流失を促すとされている。LQM-Aでも程度は弱いながらNADH,glutathioneの減少が観察されているので、同様にカルシウム貯蔵部位からのカルシウム流出が起こり得ると考えられるが、それが細胞内のカルシウム濃度の上昇につながらないのは、LQM-Aの場合細胞内のカルシウムを細胞外に汲み出す Ca^{2+} -ATPaseが正常に機能している為と考えられる。

第8節 小括及び考察

本章で行なった一連の実験の結果より、LQM-Aという物質の持つ基本的な性質が明らかになった。

- (1) NAD(P)H quinone reductaseにより還元され、radicalを発生しうる。
- (2) glutathioneなどのSH化合物と反応しうる。

またこれらの性質により、細胞に次のような作用を及ぼした。

- (i) NADHの減少、それに続くATPの減少
- (ii) superoxide anion及び他の活性酸素種(H_2O_2 , $\cdot OH$)の産生、及びこれらによって引き起こされる様々な傷害(oxidative stress)
- (iii) glutathioneの減少
- (iv) 細胞表面のbleb形成

(iv)のbleb形成(Fig. 5-4)がどのような機構で起こるか明らかではないが、現在この問題に関して2つの説が提出されている。1つは細胞内カルシウム濃度上昇によるnon-lysosomal proteaseの活性化が関与するという説⁷²⁾、もう1つはカルシウム濃度は関係なくATPの枯渇が重要であるとする説⁷³⁾である。

LQM-Aの場合、bleb形成にカルシウム濃度の上昇が関与していないことは第7節でしめした。また別の実験で筆者は細胞内のカルシウム濃度を上昇させた場合(Ca^{2+} ionophore A23187添加)にも、カルシウム濃度低下させた場合(A23187 + EDTA 添加)にもblebが形成される事を観察している。ATPの枯渇によってbleb形成が為されている訳でないことはFig. 5-7のdinitrophenolをポジティブ・コントロールに用いた実験により明らかである。以上の実験結果を包括する説として、膜電位の変化を考えているが、実証する為には更なる研究が必要である。

物質の作用機作の研究というのはつくづく難しいと思う。その物質が

cell free系である作用を示したからといって、細胞内でも同じ作用を発揮していると単純に考える訳にはいかない。その物質の細胞内での分布が重要になってくる。すなわち標的とされる分子の近傍においてある一定の濃度以上存在するか否かが、作用を示す上で決定的である。また作用機作の研究でもう1つ重要な点は、今観察している現象がその物質による直接的な作用なのか、2次的な作用なのかを区別しなければならない点である。

LQM-Aの場合、細胞内での分布は分かっておらず、その作用也多岐に亘るので、これこそ本物質の作用点であると言えるような作用点は見出せなかった。しかし1点にしぼろうとすること自体正しくないのかも知れない。

第6章 ラクトキノマイシンの 感受性を支配する細胞内因子

序

LQM-A,BはL5178Y細胞の親株よりもその薬剤耐性株により強い細胞毒性を示した。この細胞間の感受性の相違が何に由来するのか、親株とadriamycin耐性株について比較検討した。

第1節 ラクトキノマイシンの細胞内への取り込み

1 実験方法

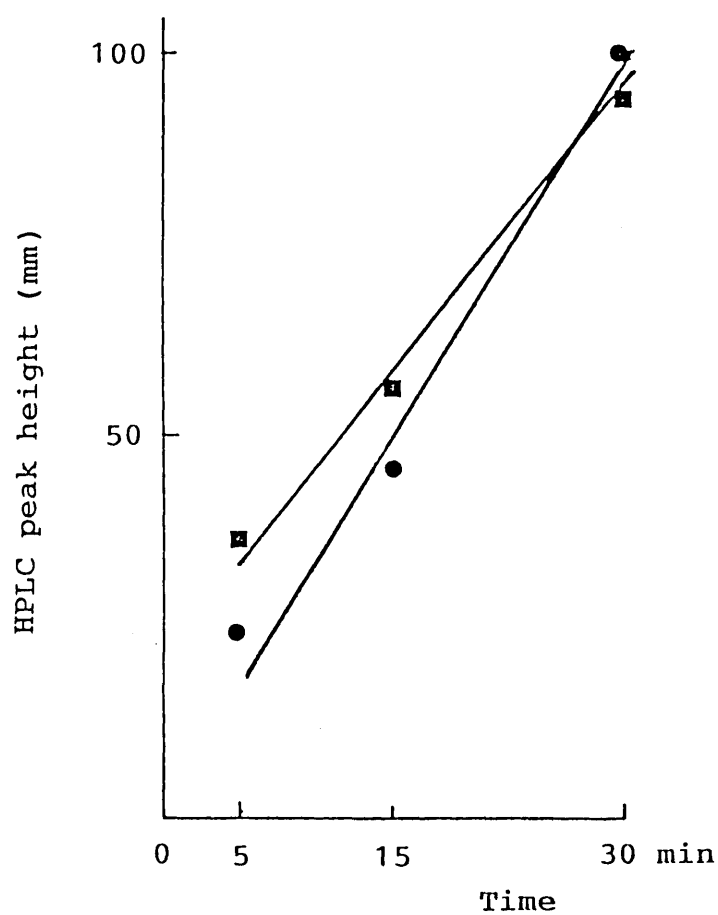
L5178Y/S あるいはL5178Y/ADM 細胞 (1.0×10^6 cells/ml) にLQM-A 50 μ g/ml を加え所定の時間 incubation 後細胞を洗浄し、10 mM HCl-methanol (1:1)でLQM-Aを抽出する。抽出液中のLQM-A量はHPLCにて定量した。(第1章第2節参照)

2 結果

時間と共に細胞内への LQM-A の取り込みは増加した (Fig. 6-1)。L5178Y/S 細胞とL5178Y/ADM 細胞とで比較すると、5分、15分の時点ではL5178Y/ADM細胞にやや多く取り込まれていた。

Fig. 6-1

Cellular uptake of lactoquinomycin A
by L5178Y/S(●) and L5178Y/ADM(■)



第2節 ラクトキノマイシン還元酵素

1 実験方法⁷⁴⁾

L5178Y/S 及びL5178Y/ADM 細胞を15 mM KCl, 1 mM EDTAを含む0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)中homogenizeし、1,000 g x 20 min 遠心して未破壊細胞、核分画を除く。このあと105,000 g x 60 min遠心してmitochondria+microsome分画(M-M fraction)をえた。LQM-A還元酵素活性は以下の反応系で30℃に於けるNADHの消費量によって測定した。

10 μ g/ml	LQM-A
0.1 mM	NADH
0.4 mg protein/ml	M-M fraction
\pm 100 μ M	dicoumarol
0.2 M	potassium phosphate(pH 7.0)

2 結果

結果はTable 6-1に示した。quinoneを2電子還元してhydroquinoneに変えるDT-diaphoraseはdicoumarolによって阻害を受ける⁷⁵⁾ので、dicoumarol 0 μ Mと100 μ Mとの還元酵素活性の差はDT-diaphorase活性に由来すると考えられる。L5178Y/ADM細胞ではDT-diaphorase 活性は、L5178Y/S細胞の約3分の1に低下していた。一方dicoumarol非感受性の還元酵素活性(cytochrome c reductaseやcytochrome P-450 reductase)は両株で差がなかった。

Table 6-1

Lactoquinomycin reductase activities of L5178Y/S and L5178Y/ADM

dicoumarol (μ M)	NADH oxidation (nmol/min/mgprotein)	
	L5178Y/S	L5178Y/ADM
0	14.6	12.7
100	11.7	11.7

acceptor : lactoquinomycin A 10 μ g/ml

第3節 細胞内glutathione量

1 実験方法

細胞内glutathione量の測定

第5章第6節の方法に準ず。

LQM-AとBSOの併用

L5178Y/ADM細胞(1.0×10^5)に0.2 mM BSO (DL-buthionine-S,R-sulfoximine) を加え15時間incubationする。次いでLQM-Aを加え、更に2時間incubationして生細胞数を計測した。

2 結果

細胞内glutathione量

Table 6-2に示す通り。L5178Y/ADM細胞ではglutathione量がL5178Y/S細胞より約30%少なかった。

LQM-AとBSOとの相乗効果

BSO⁷⁶⁾はglutathione合成酵素(γ -glutamylcysteine synthetase)の強力な阻害剤である。細胞を0.2 mMで15時間処理すると細胞内のglutathione量は約6分の1に低下した。しかしcell viabilityにはなんら影響を及ぼさなかった。このような条件下でLQM-Aを作用させるとLQM-Aの殺細胞効果は約3倍増強した。すなわち BSO 非存在下でのLD₅₀ 1.5 μ g/mlに対して、0.2 mM BSO存在下ではLD₅₀ 0.5 μ g/mlであった(Fig. 6-2)。

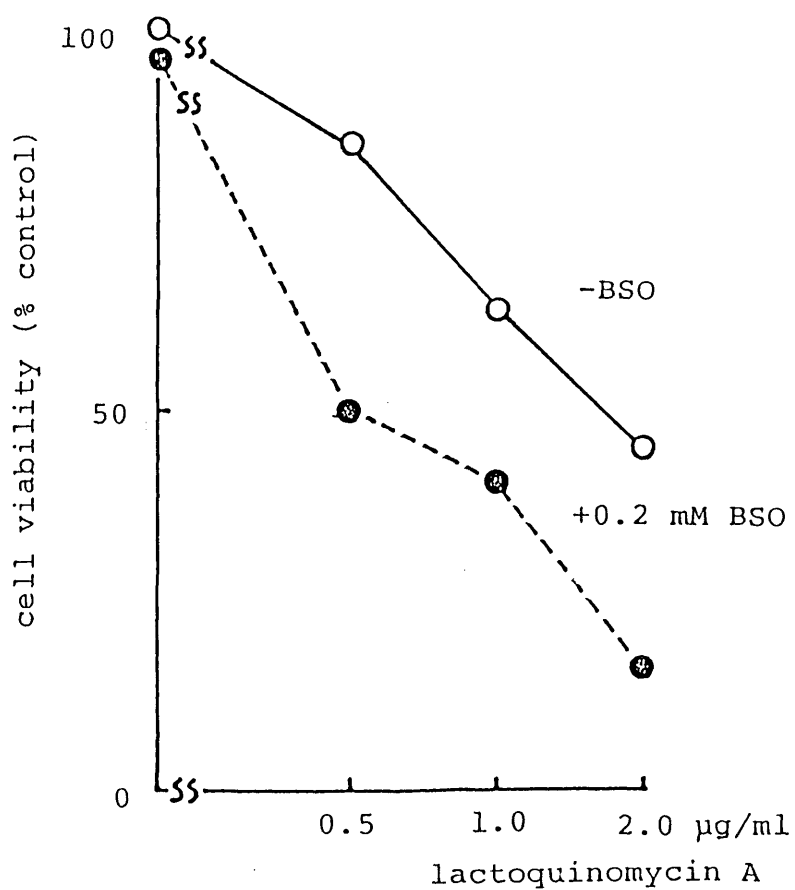
Table 6-2

Glutathione contents of L5178Y/S and L5178Y/ADM

cell line	glutathione (nmol/mg protein)
L5178Y/S	31.5 (100)
L5178Y/ADM	21.8 (69)

Fig. 6-2

Synergistic effect of lactoquinomycin A and BSO



第4節 小括及び考察

ラクトキノマイシンの感受性を支配する細胞内因子は多々有ると考えられるが、本章ではラクトキノマイシンが作用を発現する上で重要な最初の段階—細胞内への取り込み、細胞内での活性化、不活性化—にしぼって検討した。

LQM-Aの細胞内への取り込みは、L5178Y/ADM細胞の方がやや高い傾向がみられた。この事はLQM-AがL5178Y/ADM細胞の多剤耐性の機構にのらない事を示している。しかしここで得られた結果がL5178Y/ADM細胞の高感受性を説明出来るかどうかは更に検討を要す。放射性LQM-Aが利用出来れば詳しい解析が可能かもしれない。

先にも述べたが quinone reductase には cytochrome c reductase や cytochrome P-450 reductaseの様に1電子還元してquinoneを反応性に富むsemiquinone radicalに変えるもの（活性化）と、DT-diaphoraseの様に2電子還元して比較的安定なhydroquinoneにするもの（不活性化）とがある。後者の酵素はquinoneをhydroquinoneに変える事によって、前者の酵素による radical形成を調整していると考えられる⁷⁷⁾。このような機能を持つDT-diaphoraseはL5178Y/ADM細胞ではL5178Y/S細胞の約3分の1しかなく、L5178Y/ADM細胞の高感受性の一因を為すと考えられる。

また quinone toxicity の解毒に働くと考えられる glutathione も L5178Y/ADM 細胞では低下しており、この事も高感受性の一因たり得る。glutathioneが感受性を支配している事は、glutathione合成阻害剤BSOによってLQM-Aの活性増強がみられたことより確かめられた。

BSOとの併用のよる制癌剤の効果増強はvernolepin⁷⁸⁾やmelphalan⁷⁹⁾の例が報告されている。LQM-Aも含めてこれ等の薬剤がin vivoでもBSOとの併用によってその効果を高めるかどうかはこれからの研究課題である。

総括

筆者は癌化学療法において多剤耐性の克服が重要であると考え、制癌剤耐性細胞をスクリーニング系に用いて耐性細胞にも有効な物質を土壤微生物の2次代謝産物中に求めた。

その結果、平塚市の土壌より分離された1放線菌、*Streptomyces tanasiensis* IM8442T 株が新規制癌抗生物質を産生することを見だし、その構造に因んで本物質をラクトキノマイシン(lactoquinomycin, LQM)A,Bと命名した。

LQM-A,Bは強い細胞毒性を有し、多剤耐性になったL5178Y細胞に対しては、その親株よりも、より低い濃度で細胞毒性を示した。また Ehrlich ascites carcinomaに対して顕著な延命効果を示した。

LQM-Aは細胞内でquinone reductaseによりsemiquinone radicalに活性化され、種々の活性酸素種(O_2^- , H_2O_2 , OH)を生じ、その結果酸化還元系に関与する細胞内成分(NADH, ATP, glutathioneなど)に著しい変化を及ぼし細胞を死に導くという、従来からの制癌剤には知られていない新しい作用機構を有していた。

またラクトキノマイシンの感受性を支配する因子の1つとして DT-diaphorase, glutathioneの重要性が示唆された。

さいごにラクトキノマイシンを”薬”として開発する場合の可能性について考察してみたい。

ラクトキノマイシンは細胞内でradicalを発生するという、この物質の性質上、正常細胞と癌細胞との選択性はradical除去に関与する細胞内成

分に求められる。癌細胞に於けるSOD活性の低下^{80,81)}は、一般的な現象として認められている⁸²⁾。そして特徴的なのはmitochondriaのMn-SODの低下がより大きい点である⁸³⁾。O₂⁻分解能と併せて、H₂O₂を分解するcatalase, glutathione peroxidaseが癌細胞では低下しているとの報告⁸⁴⁾もある。これらの事実は癌細胞が、oxidative stressに対して正常細胞よりも感受性である基礎を与える。

radical除去に関与する因子には以上に述べた酵素群のほかglutathioneがあげられる。癌細胞でglutathioneレベルを低く、あるいは正常細胞で、glutathioneレベルを高くすることが出来れば、薬剤の選択性の向上が得られると考えられる。cystein の prodrug である oxothiazolidine-4-carboxylate⁸⁵⁾の投与によってlung adenocarcinoma細胞ではglutathioneレベルは変わらないが、lung fibroblast細胞ではglutathioneレベルの上昇がみられたとの報告⁸⁶⁾がある。この現象が癌細胞と正常細胞との間で一般的に見られるのかどうか不明であるが、ラクトキノマイシンの選択性向上を目指す上で魅力的なデータである。

薬剤の有効性を高める上で、細胞側の修飾を考えるだけでなく、当然薬剤自身の修飾を考えるべきである。ラクトキノマイシンの場合、構造活性相関の研究はなされていないので、化学修飾の戦略は必ずしもは明確ではないが、耐性細胞にも有効な薬剤をデザインする上で重要なリード化合物になり得ると期待している。

謝 辞

本研究において、終始御熱心な御指導、御鞭達を賜わりました東京大学応用微生物研究所田中信男名誉教授並びに鈴木日出夫助教授に心から御礼申し上げます。

本論文作成に当たり、御懇切な御助言と御高配を賜わりました東京大学応用微生物研究所奥田重信教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施に当たり、種々御協力いただきました東京大学応用微生物研究所第12研究部の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究について東京大学応用微生物研究所との共同研究の機会をいただきました万有製薬株式会社岩垂孝一代表取締役会長に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Ling,V. et al. J.Cell.Physiol. 83: 103,1974
2. Inaba,M. et al. Cancer Res. 39: 2200,1979
3. Kartner,N. et al. Science 221: 1285,1983
4. Kartner,N. et al. Nature 316: 820,1985
5. Shen,D.W. et al. Science 232: 643,1986
6. Roninson,I.B. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 4538,1986
7. Gros,P. et al. Nature 323: 728,1986
8. Safa,A.R. et al. J.Biol.Chem. 261:6137,1986
9. Cornwell,M.M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 3847,1986
10. Gros,P. et al. Cell 47: 371,1986
11. Chen,C. et al. Cell 47: 381,1986
12. Gerlach,J.H. et al. Nature 324: 485,1986
13. Tsuruo,T. et al. Cancer Res. 43: 2267,1983
14. Nakagawa,M. et al. Cancer Res. 46:4453,1986
15. Yamaguchi,T. et al. J.Natl Cancer.Inst. 76: 1986
16. Nishimura,T. et al. J.Antibiot. 31: 493,1978
17. Container Coporation of America, Color Harmony
Manual.4th.Ed.,Chicago,1958
18. Tresner,H.D. et al. Appl.Microbiol. 11: 335,1963
19. Pridham,T.G. et al. Eur.Bacteriol. 56: 107,1948
20. Becker,B. et al. Appl.Microbiol. 13: 236,1965
21. Kuster,E. Inst.J.Stst.Bacteriol. 22: 139,1972
22. Singh,I. et al. Tertahedron 24: 6053,1968
23. Tuji,N. et al. J.Antibiot. 29: 7,1976
24. Johnson,L.E. et al. Applied Microbiol. 16: 1815,1968

25. Bergy,M.E. J.Antibiot. 21: 454,1968
26. Hoeksema,H. et al. J.Antibiot. 29: 704,1976
27. Kondou,S. et al. J.Antibiot. 30: 1143,1977
28. Kobayashi,M. et al. tetrahedron Lett. 619,1976
29. Imamura,N. et al. Chem.Pharm.Bull. 29: 1788,1981
30. Tanaka,H. et al. J.Antibiot. 28: 868,1975
31. Keller-Schierlein,W et al. Helv.Chim.Acta 51: 1526,1968
32. Omura,S et al. J.C.S.Chem.Comm. 320,1976
33. Ellested,G.A. et al. J.Am.Chem.Soc. 88: 4109,1966
34. Ellested,G.A. et al. J.Am.Chem.Soc. 90: 1325,1968
35. Kasai,M. et al. J.Antibiot. 32: 442,1979
36. Sano,Y. J.antibiot. 5: 535,1952
37. Osato,T. et al. J.Antibiot. 6: 52,1953
38. Kinoshita,S. et al. J.Antibiot. 9,319,1956
39. Takano,S. et al. J.Antibiot. 29: 765,1976
40. Oda,T. Master theme,1984
41. Omura,S. et al. J.Biochem. 90: 291,1981
42. Omura,S. et al. J.Biochem. 90:355,1981
43. Nishimura,T. et al. J.Antibiot. 33: 737,1980
44. Suzuki,H. et al. J.Antibiot. 34: 1210,1981
45. Nishimura,T. et al. J.Antibiot. 32:518,1979
46. Hill,B.T. et al. J.Natl,Cancer Inst 59: 1311,1977
47. Hill,B.T. et al. Eur.J.Cancer 12: 541,1976
48. Herman,T.S. et al. Cancer Res. 39: 1937,1979
49. Tsuruo,T. et al. Jpn.J.Cancer Res. 77: 941,1986
50. Yagi,M. et al. Biochem.Biophys.Res.Commun 98: 642,1981
51. Ozawa,S. et al. J.Antibiot. 38: 1257,1985
52. Misumi,M. et al.J.Antibiot. 32: 48,1979

53. Komiyama,K. et al. J.Antibiot. 36: 301,1983
54. Yahara,I. et al. J.Cell.Biol. 92: 73,1982
55. Hayashi,M. et al. J.Antibiot. 35: 1078,1982
56. Dick,J et al. FEBS Lett. 179: 21,1985
57. Rernofsky,C. et al. Anal.Biochem. 53: 452,1973
58. Akman,S.A. et al. Cancer Res. 45: 5257,1985
59. Sinha,B.K. et al. Cancer Res. 44: 2892,1984
60. Mimnaugh,E.G. et al. Cancer Res. 45: 3296,1985
61. Ellman,G.L. Arch.Biochem.Biophys. 82: 70,1959
62. Okabe,T. et al. J.Antibiot. 38: 230,1985
63. Fukazawa,H. et al. Biochem.Biophys.Res.Comm.130: 1072,1982
64. Tsien,R.Y. et al. J.Cell.Biol. 94: 325,1982
65. Schraufstatter,I.U. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 4908
1986
66. Nicotera,P. et al. J.Biol.Chem. 261: 14628,1986
67. Lotscher,H.R.et al. J.Biol.Chem. 255: 9325,1980
68. Bollomo,G. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 6842,1982
69. Jewell,S.A. et al. Science 217: 1257,1982
70. Thor,H. et al. J.Biol.Chem. 257: 12419,1982
71. Orrenius,S. et al. Biochem.Soc.Trans. 12: 23,1984
72. Nicotera,P. et al. FEBS Lett. 209: 139,1986
73. Lemasters,J.J. et al. Nature 325: 78,1987
74. Bachur,N.R. et al. Cancer Res. 38: 1745,1978
75. Ernster,L. et al. Biochem.Biophys.Acta 58: 171,1962
76. Griffith,O.W. et al. J.Biol.Chem. 254: 7558,1979
77. Lind,C. et al. Arch.Biochem.Biophys. 216: 178,1982
78. Arrick,B.A. et al. J.Clin.Invest. 71: 258,1983
79. Green,J.A. et al. Cancer Res. 44: 5427,1984

80. Dionisi,O. et al. Biochim.Biophys.Acta 403: 292,1975
81. Peskin,A.V. et al. FEBS Lett. 78: 41,1977
82. Oberley,L.W. et al. Cancer Res. 39,1141,1979
83. Sahu,S.K. et al. J.Natl.Cancer Inst.58: 1125,1977
84. Bozzi,A. et al. Mol.&Cell.Biohem. 10: 11,1976
85. Williamson,J.M. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 6246,1982
86. Russo,A. et al. Cancer Res. 46: 2845,1986