

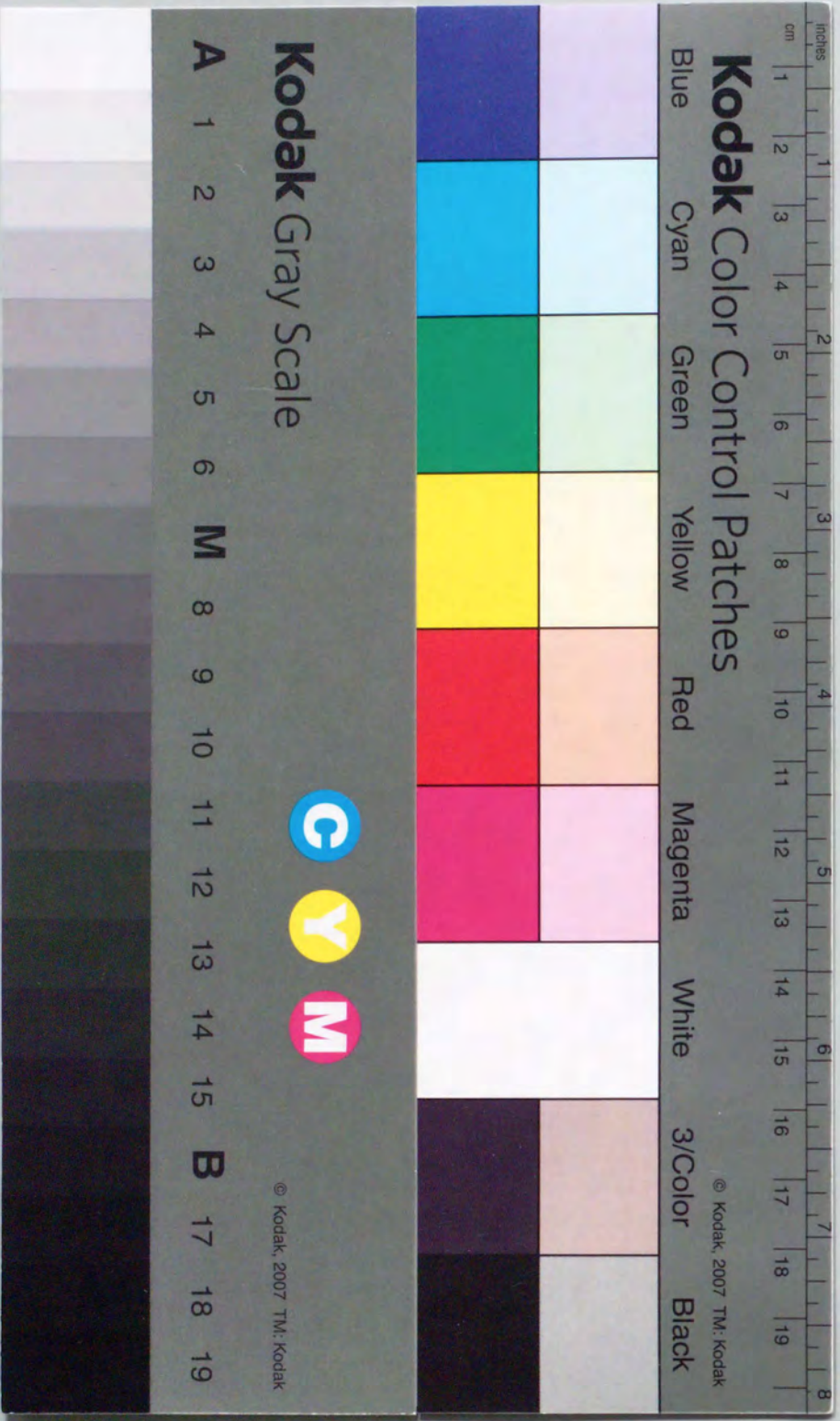


Title	新規微小管作用薬Tryprostatin類およびPironetin類に関する研究
Author(s)	近藤, 昌夫
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3172750
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka



①

新規微小管作用薬 Tryprostatin 類および Pironetin 類
に関する研究

2000年

近藤昌夫

目次

目次	1
緒論	3
本論	9
第一章 新規微小管作用薬 Tryprostatin A の作用機作解析	9
第一節 培養細胞への作用	11
第二節 微小管に対する作用	15
第三節 チューブリンに対する作用	18
第四節 小括	24
第二章 新規微小管作用薬 Tryprostatin 類縁体の作用機作解析	27
第一節 培養細胞への作用	28
第二節 微小管に対する作用	31
第三節 小括	33
第三章 新規微小管作用薬 Pironetin 類の作用機作解析	35
第一節 培養細胞への作用	35
第二節 微小管に対する作用	40
第三節 チューブリンに対する作用	42
第四節 小括	46

第四章 Pironetin の抗腫瘍効果	49
第一節 Pironetin の抗腫瘍効果	49
第二節 ヒト白血病細胞 HL60 における殺細胞効果	52
第三節 小括	56
総括	58
結論	61
謝辞	63
参考文献	65

緒論

細胞骨格は真核生物の細胞質全体に縦横に張りめぐらされた網目状あるいは束状の繊維からなる構造体であり、マイクロフィラメント、中間径フィラメント、微小管という3種の繊維に大別される。マイクロフィラメントはアクチンが、中間径フィラメントはケラチン、デスミン、ビメンチンなどが、微小管はチューブリンがそれぞれ規則正しく方向性を持って重合したものである。これら構造体は静的に安定したものは無く、常に重合と脱重合を繰り返しその形態と機能を変化させる動的構造体であり、細胞に構造的な強度や方向性を付与するのみならず、有糸分裂、細胞運動、細胞内物質輸送、分泌、細胞内小器官の局在、シグナル伝達などの多種多様な機能を有している。この中でも微小管の生理作用は多岐に渡っており、生命現象の根幹を為す細胞分裂に際し、分裂装置の主要構成成分となり重合と脱重合を巧みに繰り返し染色体の分配を実行する役割を担っていたり[1-3]、ミトコンドリアなどの細胞内小器官の細胞内局在を規定する要因となっている[4-6]。さらに最近、アルツハイマー病患者の脳において微小管結合タンパク質の一つ tau タンパク質のリン酸化異常亢進が観察されたことから痴呆症との関与も示唆されている[7, 8]。

微小管を構成するタンパク質（微小管タンパク質）は、大きく分けてチューブリンとチューブリンに結合する微小管結合タンパク質からなる（Fig. 1）。チューブリンは分子量約 50 kDa のタンパク質であり、 α 、 β 、 γ -チューブリンの3種のアイソフォームが存在する。 α -チューブリンと β -チューブリンはヘテロダイマーを形成し、このヘテロダイマーが一つの単位となり極性を持って直線上に重合してプロトフィラメントを形成する。プロトフィラメントは13本円筒状に並び、さらに微小管と呼ばれる構造体を構成する。このプロトフィラメントは常に重合と脱重合を繰り返し動的平衡状態を保っており、伸長速度が早いプラス端と伸長速度が遅いマイナス端に

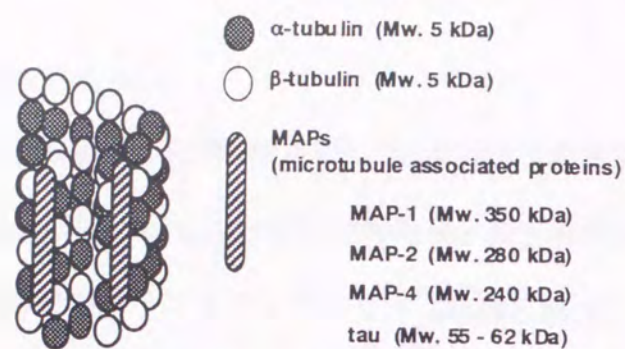


Figure 1 Structure of microtubule

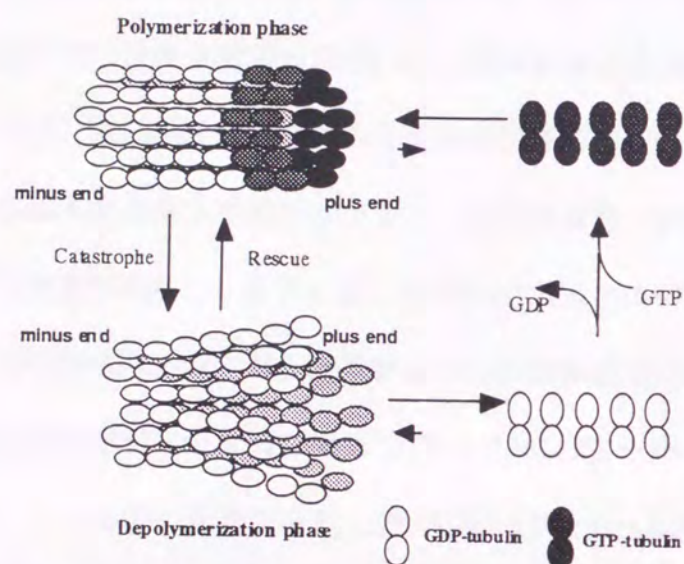


Figure 2 Microtubule dynamic instability: Dynamic instability is characterized by the coexistence of polymerizing and depolymerizing MTs [9].

区別される (Fig. 2) [9]。細胞内においてマイナス端は細胞の中心側 (星状体) もしくは中心体や紡錘体極のような微小管形成中心側に位置しており、微小管の極性を決定している [9]。プラス端は、常に重合と脱重合を繰り返しており、GTP 結合型のチューブリンが結合している重合状態 (polymerization phase) と GDP 結合型のチューブリンが解離している脱重合状態 (depolymerization phase) の状態を遷移 (catastrophe、rescue) している。また、この微小管の動的不安定性は Table 1 に示してあるような種々の因子によって制御されている。細胞内での微小管の量は、中心体に存在する微小管形成中心 (MTOC) の数で決定される。γ-チューブリンは MTOC の構成タンパク質の一つであり、その生理的役割の一つは微小管形成の核形成

Table 1 Factors of microtubule dynamic instability

Tubs / MAPs	function	Effect	Ref
γ-tubulin	nucleation	components of MTOC*	[9-12]
β-tubulin	GTP hydrolysis	dynamic instability	[13-16]
MAP1	MT stabilizing factor	inhibiting catastrophe and promoting rescue	[17]
MAP2	MT stabilizing factor	inhibiting catastrophe and promoting rescue	[17, 18]
tau	MT stabilizing factor	inhibiting catastrophe and promoting rescue	[19-21]
MAP4	MT stabilizing factor	promoting rescue	[22]
Op18 / stathmin	MT destabilizing factor	signal transduction to the MT	[26, 27]
Kar3	MT destabilizing factor	nuclear fusion after mating	[28]

* MTOC ; microtubule organizing center

にあると考えられている [9-12]。α/β-チューブリンヘテロダイマーはそのままでは重合能を持たないが、GTPase 活性を有する β-チューブリンに GTP が結合することによって微小管の末端に重合することができるようになる。この GTP 結合型のチューブリン重合は安定に存在するが、重合後速やかに β-チューブリン自身が有する GTPase 活性により GTP から GDP へ加水分解され、解離し易い GDP 結合型チューブリンへと変換される。この GTP-GDP 変換反応がチューブリンの重合速度と解離速度の割合を規定し、微小管の重合と脱重合を調節していると考えられている [9, 13-16]。微小管結合タンパク質 (MAPs) には、チューブリンタンパク質 C 末の酸性領域への結合を通じて微小管の安定化に関与する MAP1、MAP2、MAP4、tau タンパク質が存在する [9, 17-25]。また、脱重合に関与する因子としては、Op18/stathmin、Kar3 などが知られている [9, 26-28]。MAP2/tau タンパク質のチューブリン結合はリン酸化によって調節を受けており、リン酸化によって微小管結合タンパク質の微小管安定化能が阻害されることが知られている [9, 29-31]。特に tau のリン酸化はアルツハイマー病患者の脳において亢進していたことから臨床面においても注目されている [7, 8]。さらに最近、チューブリンと MAPs の重合を調節する因子として MAP-modulin が単離され、微小管重合の調節機構として新たな経路の存在が示唆された [32]。微小管タンパク質は以上のような制御機構により動的不安定性を示し、こ

の性質を利用して増殖、老化等の多種多様な生理作用に寄与している。しかしながら、この動的不安定性ゆえに微小管の生理機能発現機構の解析が非常に困難となっている。微小管が関与する細胞内の複雑な生化学的諸現象を理解するためには、微小管タンパク質のそれぞれの機能を十分に把握する必要があり、その為には多種多様な特異的阻害剤の利用が有効である。

既存の微小管作用薬は1) 微小管重合阻害剤と2) 微小管過重合剤に大別され、これらの大半がβ-チューブリンに作用することが知られている。微小管重合阻害剤にはβ-チューブリン上の作用部位の違いによってさらにA) colchicine 結合部位作用薬[33, 34]、B) *vinca* alkaloid 結合部位作用薬[35, 36]、C) maytansine-rhizoxin 結合部位作用薬[37-39]の三つに分類できる (Fig. 3, 4)。β-チューブリン

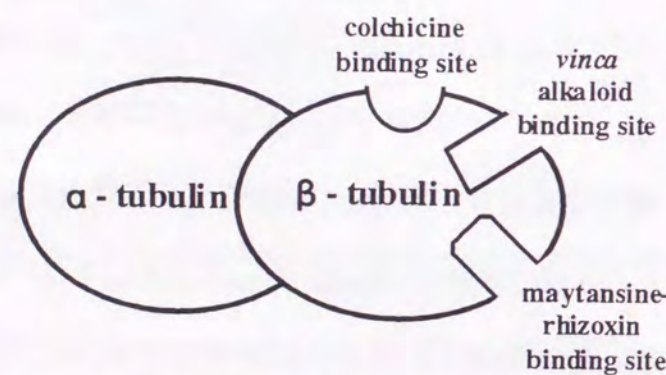


Figure 3 Tubulin binding sites of various tubulin binders

ン以外に作用点を持つユニークな化合物として estramustine や 5,5'-Bis[8-(phenylamino)-1-naphthalenesulphonate] (bis-ANS) がある。Estramustine は MAP2 とチューブリンに作用することによって微小管重合を阻害し、bis-ANS はチューブリンの C 末上の MAPs 結合部位に作用することによって MAPs 依存的なチューブリン重合を阻害することが報告されている[40-45]。これら微小管作用薬は抗がん剤[46]、抗カビ剤、抗寄生虫剤[47]などの多岐に渡り応用されている。しかし、

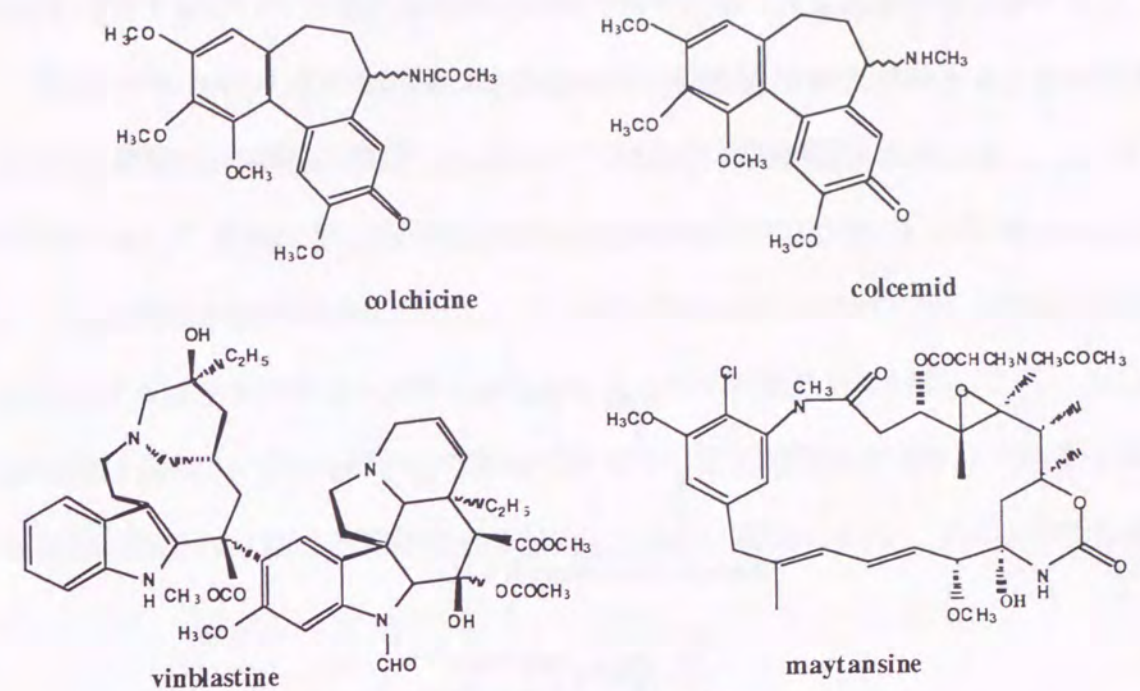


Figure 4 Structures of tubulin binders

微小管の生理的役割が次々と解明されつつある昨今の現状を踏まえると、未だ阻害剤の多様性は十分であるとは言い難い。特に、微小管結合タンパク質依存的な重合阻害剤は bis-ANS を除くと他に報告がなくその開発が望まれている。また既存の微小管作用薬は構造が複雑なものが多く、構造活性相関等の解釈が非常に困難となっている。

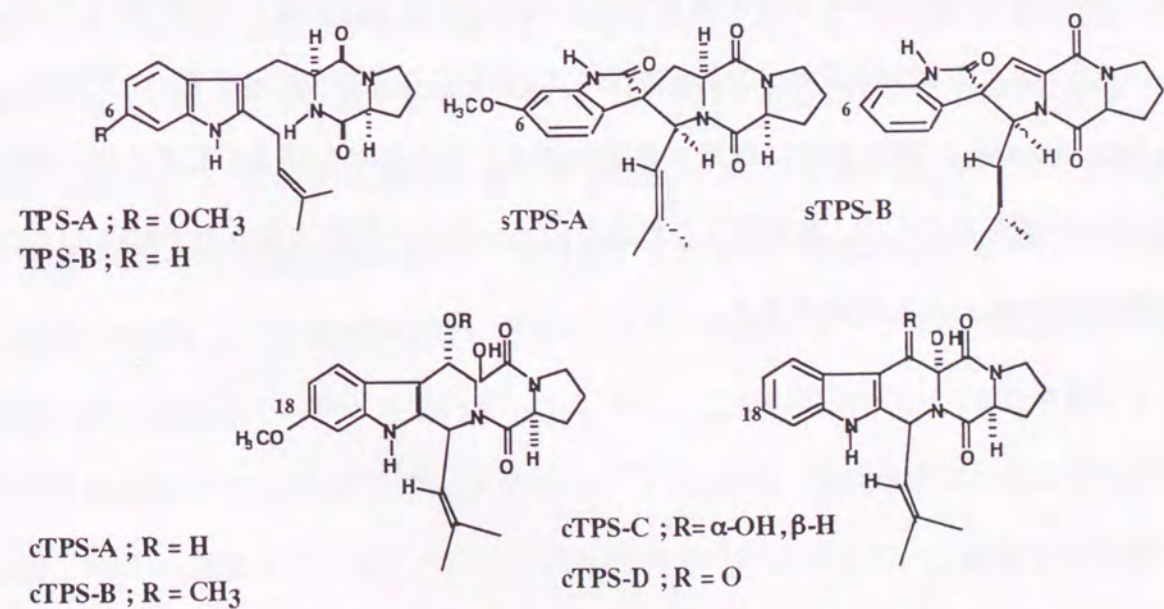


Figure 5 Structure of tryprostatin and its derivatives

以上の様な現状を踏まえ、理化学研究所抗生物質研究室において微小管作用薬の共通の特徴である細胞周期のM期停止作用を指標に単離された tryprostatin 類 (Fig. 5)、及び日本化薬株式会社において植物の生長抑制物質として単離された pironetin 類 (Fig. 6) についてその作用機構解析を行った。その結果、Tryprostatin

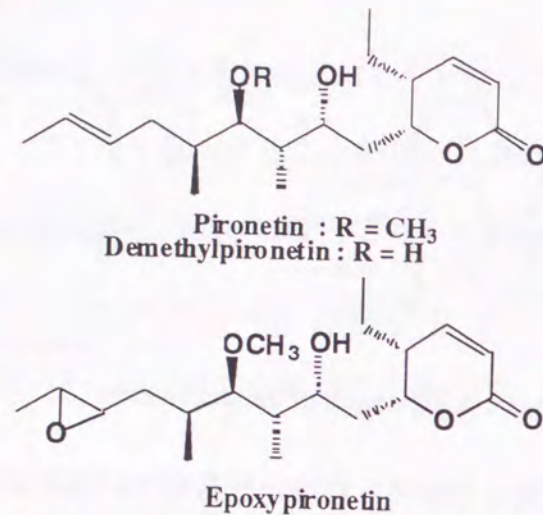


Figure 6 Structure of pironetin and its derivatives.

類は天然物由来の化合物としては初めて微小管結合タンパク質依存的なチューブリン重合を特異的に阻害する薬剤であった。さらに、トリプロスタチン類縁体間で微小管に対する作用が相反する性質を有する化合物が存在した。また pironetin は β -チューブリン上の *vinca* alkaloid 結合部位に作用する可能性が示唆され、既存の *vinca* alkaloid 結合部位に作用する薬剤の中で最も単純な構造を有する化合物であることを明らかにした。本論文はこれら tryprostatin 類および pironetin 類の作用機構解析をまとめたものである。

本論

第一章 新規微小管作用薬 Tryprostatin A の作用機作解析

細胞周期の進行は触媒サブユニットである cyclin dependent kinase (Cdk) と制御サブユニットである cyclin の複合体によって制御されている。このうち G2/M 期進行は Cdc2/cyclin B 複合体が担っており、この複合体が活性化されると細胞周期は G2 期から M 期へと進行する (Fig. 7) [48]。著者のグループはマウス乳がん細胞

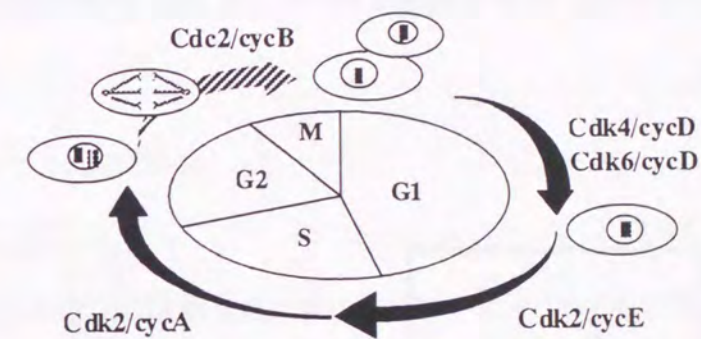


Figure 7 Involvement of the various cyclin-dependent kinases (cdc2 and CDKs) and their associated cyclins during the mammalian cell cycle

胞 FM3A の Cdc2 温度感受性変異株 *ts*FT210 細胞を用いて、新規細胞周期阻害剤を単離するスクリーニング系を構築した[49]。*ts*FT210 細胞の Cdc2 は 32°C 培養では正常に機能しているが 39°C 培養により不活性化型となる。このため *ts*FT210 細胞の細胞周期は Cdc2 不活性化条件の 39°C で培養すると M 期への進行が阻害され G2/M 期の境界で停止する。この細胞を許容温度の 32°C で培養すると Cdc2 が活性化となり細胞周期は同調的に M 期へと進行する[50, 51]。この系において、39°C 培養により G2/M 期の境界で細胞周期を停止させた *ts*FT210 細胞に微生物の二次代謝産物を添加後、32°C へ温度を下げるにより細胞周期を G2/M 期において阻害する薬剤のスクリーニングを行ってきた。

Tryprostatin A および B (TPS-A, -B) は、静岡県大井沖海底土壌より単離した *Aspergillus fumigatus* BM939 株の培養上清中に含まれ、本スクリーニング系を用いて G2/M 期阻害剤として単離、構造決定されたジケトピペラジン構造を有する化合物である (Fig. 8) [52-55]。前述したように、G2/M 期阻害剤は生命現象解明の探索針としてばかりでなく、がんをはじめとする各種疾病に対する治療薬としての応用が期待される。この応用のためには *tsFT210* 細胞のような変異細胞のみならず正常細胞に対する作用およびその阻害機構に対する解析が不可欠である。そこで本章では本薬剤の低分子プローブとしての応用の一里塚として、ラット正常繊維芽細胞 3Y1 を用いて細胞周期に対する効果を検討し、さらにその作用機構に関して生化学的な解析を行った。

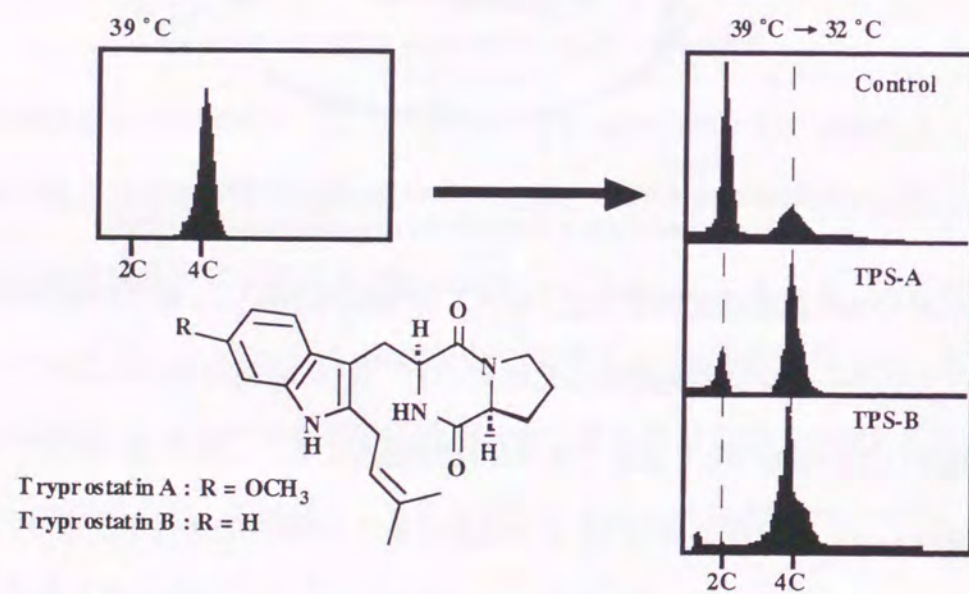


Figure 8 Tryprostatin A and B inhibit the G2/M progression of synchronous culture of *tsFT210* cells

第一節 培養細胞への作用

現在までに colchicine、vinblastine、paclitaxel、rhizoxin 等の M 期阻害剤が単離されているが、いずれの阻害剤も分裂装置の主要構成成分である微小管タンパク質を標的としている [56-59]。TPS-A、-B は、Cdc2 温度感受性変異株 *tsFT210* 細胞を用いたスクリーニング系によって細胞周期を G2/M 期で停止させる薬剤として単離されたが、その標的分子、正常細胞に対する作用は未だ検討されていない。そこでまず対数増殖期にあるラット正常繊維芽細胞 3Y1 を用いて TPS-A、TPS-B の細胞周期阻害作用の解析を行った。

[実験材料と方法]

[薬剤]

TPS-A、-B は DMSO に溶解した。Staurosporine は協和発酵より、また colchicine は Sigma より購入し DMSO に溶解した。

尚、特に記載の無い場合はナカライテスクの特級もしくはそれに準ずるものを使用した。

[細胞培養]

ラット正常繊維芽細胞 3Y1 は 10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum) を含むイーグル DMEM 培地 (日水) で培養した。

[細胞周期に対する作用]

対数増殖期にある 3Y1 細胞を 8 well dish (Nunc) に 2×10^5 cells/well となるように播種し、12 時間後に薬剤を細胞に加えた (この時、溶媒が終濃度 1% 以下となるよう添加した)。薬剤添加 24 時間後に細胞をトリプシン処理により回収後、70% エタノールで細胞を固定した。この細胞を PBS

で洗浄し Propidium iodine 溶液を添加し約 30 分間暗所で放置した。その後、フローサイトメーター (Coulter) を用いて細胞周期を解析した。

[細胞内微小管ネットワークに対する作用]

3Y1 細胞をカバーガラス (24 mm x 24 mm) 上に 1×10^4 cells 播種し、24 時間後に薬剤を終濃度 1% (v/v) となるよう添加した。6 時間後に細胞を PBS で一回洗浄後、3.7% ホルムアルデヒド/PBS を加え室温に 5 分間固定した後、0.2% (v/v) Triton X-100/PBS を 5 分間作用させた。その後、1% BSA 含有 PBS で洗浄後、抗 α -チューブリン抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を 37°C、1 時間作用させた。その後、1% BSA 含有 PBS で洗浄し、FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Kirkegaard) を 37°C、45 分間作用させた。PBS で洗浄後マウントし細胞骨格の形態を Olympus AX 70 を用いて観察した。また、アクチンの観察には rhodamine-phalloidine (Molecular Probe) を用いて染色を行い蛍光顕微鏡により観察した。

[結果及び考察]

各種薬剤の細胞周期への影響を検討したところ、薬剤無処理細胞では DNA 含量が 2C 即ち G1 の細胞が 59.8%、2C-4C 即ち S 期の細胞が 11.3%、4C 即ち G2/M 期の細胞が 20.4% 存在していた (Table 2, Fig. 9)。低濃度 (20 nM) の staurosporine は G1 期細胞を、また M 期阻害剤である colchicine は M 期細胞の割合をそれぞれ増加させた。一方、TPS-A 処理細胞では濃度依存的に G2/M 期細胞の割合が増加していた。また、核の形態観察によって細胞周期の停止点は M 期であることを確認している。これに対し、TPS-A のデメトキシ体である TPS-B は増殖阻害活性を示したが、その阻害は細胞周期非依存的であった。さらに TPS-B 添加後 24 時

Table 2 Distribution of DNA content in asynchronous culture of 3Y1 cells treated with various drugs

drug	conc. μ M	DNA contents			cell number % ^a
		2C	2C-4C	4C	
control	0.00	59.8	11.3	20.4	161.8
staurosporine	0.02	70.4	7.8	10.2	143.1
colchicine	1.00	9.4	11.5	65.9	69.4
tryprostatin A	25.00	26.7	14.8	45.2	89.6
	50.00	8.2	13.9	64.5	68.7
tryprostatin B	25.00	26.2	17.5	22.7	57.4
	50.00	29.1	18.7	13.9	57.8

^a cell number at 24 h per initial cell number at 0 h x 100

Exponentially growing 3Y1 cells were treated with various compounds for 24 h and the distribution of DNA content and relative cell numbers were determined.

間以内に細胞の形態が泡沫化していた。以上の結果より、TPS-A は新規 M 期特異的阻害剤であり、この細胞周期特異的停止作用と細胞毒性抑制作用には、TPS-B との比較より 6 位のメトキシ基が重要であると考えられた。そこで今後の研究は M 期特異的阻害活性を示した TPS-A に絞って作用機序の解析を行った。

既存の M 期阻害剤は微小管を標的とする薬剤が多いことから、TPS-A も微小管

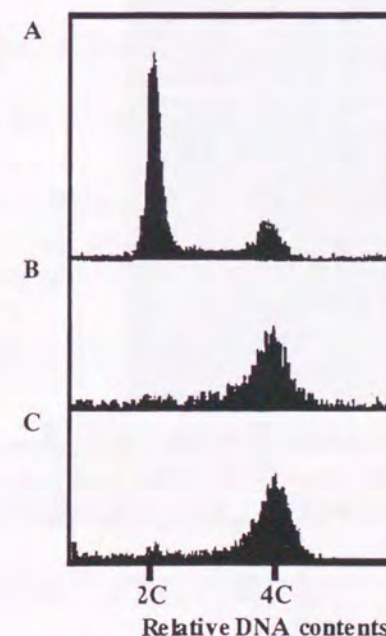


Figure 9 Effect of TPS-A and colcemid on distribution of DNA content in asynchronous cultures of 3Y1 cells

A. control
B. colchicine 1 μ M
C. TPS-A 50 μ M

を標的として細胞周期阻害作用を発揮するものと推察される。そこで、 α -チューブリン抗体を用いた免疫学的蛍光染色により、TPS-A の *in situ* 微小管ネットワークに対する作用を検討した (Fig. 10)。薬剤無処理細胞では間期の細胞に特徴的なスプレッドした細胞形態と微小管ネットワークが観察されるが (Fig. 10a)、微小管重合剤である colchicine 処理細胞では細胞の形態が丸形となり、微小管ネットワークは消失していた (Fig. 10b)。TPS-A 処理細胞では colchicine 処理細胞と同様球状の細胞形態と微小管ネットワークの消失が観察された (Fig. 10c)。一方、もう一つの重要な細胞骨格であるアクチンネットワークには影響は見られなかった (Fig. 10f)。また、微小管ネットワークの消失は TPS-A 20 μ M 以上の濃度において観察され、TPS-A の M 期阻害濃度と一致していた。以上の結果から TPS-A の細胞周期阻害作用は微小管の脱重合によって引き起こされている可能性が強く示唆された。

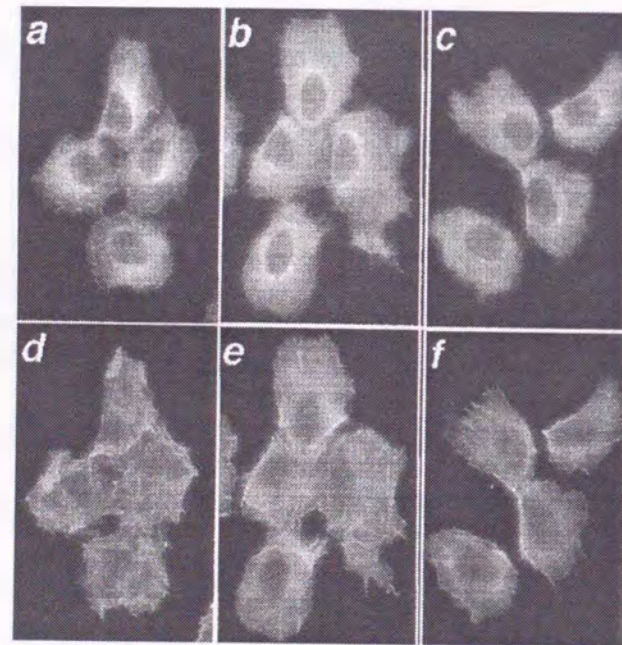


Figure 10 Depolymerization of cellular microtubules by TPS-A. Microtubules of 3Y1 cells were incubated with 1 μ g/ml colchicine (b, e), 20 μ M TPS-A (c, f) or in the absence of either compound (a, d) for 6 h. Microtubules (a-c) and actin filaments (d-f) were observed under a fluorescence microscope.

第二節 微小管に対する作用

前節において TPS-A は細胞周期を M 期特異的に阻害した。また TPS-A の細胞周期阻害作用と細胞内チューブリンネットワークの消失濃度が一致していたことから、この作用機構には微小管の脱重合が関与している可能性が示唆された。微小管は細胞内において常に重合と脱重合を繰り返しており、この動的安定性を維持するために直接的、間接的に種々の調節機構を有している。微小管の細胞内安定性を司る要因としては微小管安定化因子と微小管不安定化因子があり、両因子とも多数存在している[9]。そこで本節では、牛脳より精製した微小管タンパク質を用いて、*in vitro* (無細胞系) 微小管重合再構成系を構築し、TPS-A の微小管重合に対する直接的な脱重合作用について検討した。

[実験材料と方法]

[微小管タンパク質の精製]

微小管タンパク質は Shelanski らの方法を用いて牛脳より精製した[60]。屠殺場より冷却して持ち返った新鮮な牛脳を生理食塩水で洗浄、血管や膜を取り除いた後、1 g 当たり RB buffer (100 mM MES (pH6.8), 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA) を 0.5 ml 加え、ミキサーで破碎後、テフロンペッセル型ガラスホモジナイザーで 5 回ホモジナイズした。ホモジナイズ後、20,000 \times g、60 分間、4 $^{\circ}$ C 遠心分離した。この上清に 1/3 容量のグリセロール、終濃度 1 mM の GTP を添加し、37 $^{\circ}$ C、30 分間加温し、微小管タンパク質を重合させた。重合後、100,000 \times g、50 分間、30 $^{\circ}$ C 遠心した。遠心後、沈澱した微小管タンパク質に牛脳 1 g 当たり 0.05 ml の 1 mM GTP 含有 RB buffer を加えて 4 $^{\circ}$ C でホモジナイズし、微小管タンパク質

を脱重合させた。その後、100,000 x g、50 分間、4°C遠心し上清を回収した。この重合脱重合を再度繰り返し精製を行った。精製した微小管タンパク質は RB buffer に懸濁し、約 10~15 mg/ml の微小管タンパク質溶液として-80°C保存した。また、この方法で得られた微小管タンパク質は、SDS-PAGE により純度の検定を行った (Fig. 11)。

[*in vitro* 微小管重合アッセイ]

微小管タンパク質を氷中で溶解し終濃度 2 mg/ml となるよう RB buffer で希釈、脱気した。微小管タンパク質溶液に 1 mM GTP を添加し攪拌後、薬剤を溶媒の終濃度が 1% (v/v) となるよう添加した。その後、30°Cに加熱し重合反応を開始させ、吸光波長 350 nm の濁度を指標に経時的に重合度を評価した。また重合した微小管タンパク質への脱重合活性は、重合反応開始 15 分後重合が定常状態に達したところで TPS-A を 250 μ M 添加し、重合度の変化を測定することにより検討した。また、薬剤添加後 4°Cに冷却することによって微小管の脱重合を誘導し、脱重合に対する TPS-A の作用も併せて検討した。

[結果及び考察]

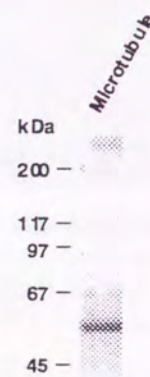


Figure 11 SDS-PAGE of microtubule protein. Prepared MT was applied to SDS-PAGE gel (12.5%), and was stained with Coomassie Brilliant Blue.

牛脳より精製した微小管タンパク質を用いた無細胞微小管重合系を用いて *in vitro* における TPS-A の微小管重合に対する直接的な効果を検討したところ、

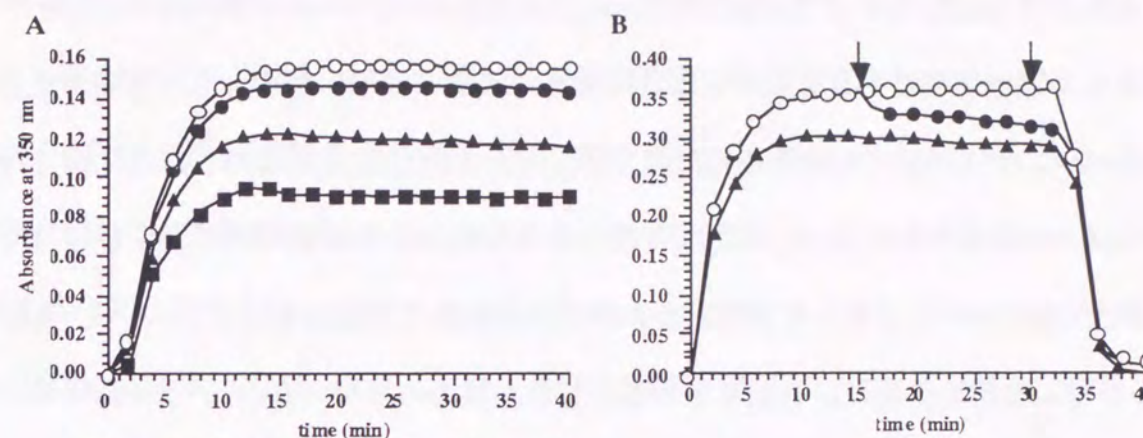


Figure 12 Effects of TPS-A on microtubule assembly. (A) Time course of *in vitro* microtubule assembly is shown as turbidity. Microtubule proteins (2 mg/ml) were incubated with various concentrations of TPS-A, 0 μ M (open circles), 50 μ M (closed circles), 125 μ M (closed triangles), and 250 μ M (closed squares). (B) Effect of TPS-A on assembled microtubules. Microtubule proteins were assembled in the absence of TPS-A. TPS-A 250 μ M was added (closed circles) or not (open circles) at 15 min after the incubation (the left arrow), and samples were cooled at 0°C for 30 min (the right arrow). The sample, incubated with 250 μ M TPS-A at 0 min, is shown as closed triangles.

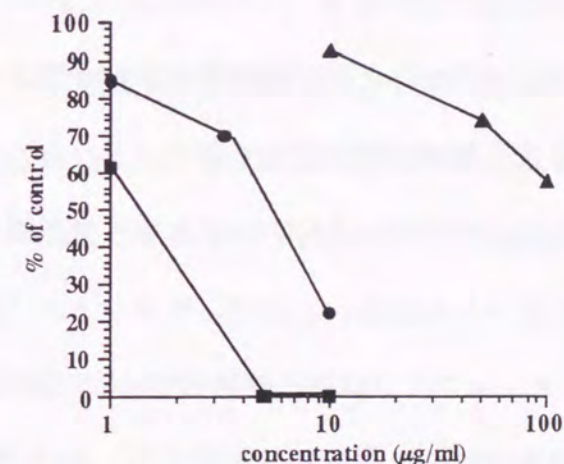


Figure 13 Effect of various tubulin binders on microtubule assembly *in vitro*. Microtubule proteins (2 mg/ml) were incubated with various concentrations of colchicine (■), vinblastine (●), and TPS-A (▲). % of control = 100 x turbidity of control at 40 min / turbidity of treatment at 40 min.

TPS-A は濃度依存的に微小管重合阻害作用を示した (Fig. 12A)。しかしながら微小管タンパク質重合系 (2 mg/ml) における TPS-A (分子量 381) の微小管重合阻害作用 (IC_{50} 約 250 μ M) は、colchicine (分子量 399) (IC_{50} 5.0 μ M) や

vinblastine (分子量 909) (IC_{50} 12.3 μ M) と比較してはるかに弱いものであった (Fig. 13)。TPS-A はあらかじめ重合させた微小管に対しても脱重合作用を示したことから (Fig. 12B)、TPS-A の細胞周期阻害作用は分裂装置の構成成分である微小管ネットワークに対する直接的な重合阻害及び脱重合作用に起因していると考えられる。また vinblastine は重合した微小管に対して脱重合作用を示すことが知られているが、高濃度処理によって微小管の凝集塊を形成しこの凝集塊は 0°C に冷却しても脱重合しない [61]。TPS-A は重合した微小管に対して脱重合作用を有していたものの、0°C に冷却することにより微小管が脱重合したことから vinblastine とは異なる作用機序を有しているものと推察された (Fig. 12B)。

第三節 チューブリンに対する作用

微小管タンパク質はチューブリンと微小管結合タンパク質から構成されている。チューブリンタンパク質は分子量が約 50 kDa であり、 α 、 β 、 γ の類縁体が存在する。 α -チューブリンと β -チューブリンはヘテロダイマーを形成して一つの単位となって重合し、プロトフィラメントとなる。このフィラメントが 13 本円筒状に並び微小管を形造っている。 γ -チューブリンは微小管形成中心の主要構成成分であり、中心体等において微小管の伸長末端を形成している [9-11]。微小管結合タンパク質 (microtubule associated proteins: MAPs) は、MAP1、MAP2、MAP4、tau タンパク質などからなり、さらにそれぞれアイソフォームが存在する [9]。MAPs はチューブリン重合体の周囲に結合し微小管に安定性を付与するばかりでなく細胞増殖制御においても重要な役割を果たしている。また、この MAPs の微小管安定化作用はリン酸化によって調節されている。最近になってアルツハイマー病患者の脳において、tau タンパク質の異常なリン酸化亢進が観察されたことから、微小管重合やそれを司

る MAPs がアルツハイマー病発症に関与している可能性が示唆されており、MAPs の生理的意義が益々重要になってきた [62, 63]。

前節において TPS-A の細胞周期阻害作用の作用点が微小管重合阻害である可能性が示唆された。前述したように微小管はチューブリンタンパク質及び種々の MAPs から構成されていることから、微小管作用薬の標的分子としてはチューブリンタンパク質もしくは MAPs が考えられる。そこでまず TPS-A のチューブリンに対する作用を β -チューブリン上に結合し重合阻害作用を発揮することが知られている colchicine、vinblastine との拮抗阻害実験により検討した [64]。また、チューブリンは無細胞系においても種々の生理的、非生理的重合促進剤によって電子顕微鏡レベルで細胞内と同様の重合像が得られることが知られている [58, 65, 66]。そこで次に非生理的チューブリン重合促進剤として知られているグルタミン酸 [65]、paclitaxel [67]、poly-L-lysine [65]、さらに自己重合活性を示すことが知られているチューブリンの C 末端を subtilisin によって切断した S-tubulin [68-70] を用いたチューブリン重合系により、重合阻害機構の解析を行った。さらに生理的因子として微小管結合タンパク質である MAP2、tau タンパク質によるチューブリン重合系も併せて検討した。

[実験材料と方法]

[チューブリンの精製]

チューブリンタンパク質は微小管タンパク質よりホスホセルロースカラム (Whatman P11) を用いて精製した [71]。PC-GTP buffer (20 mM MES (pH 6.8), 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 0.1 mM GTP) でカラムを平衡化した後、微小管タンパク質をアプライ、PC-GTP buffer で溶出し、未吸着画分としてチューブリンタンパク質を得た。チューブリンタンパク質溶液

は溶出後直ちに 0.9 M MES, 11 mM MgCl₂, 1 mM EGTA (pH6.8) を加え、終濃度 100 mM MES, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM GTP (pH6.8) 溶液として保存した。

[チューブリン結合アッセイ]

[³H]colchicine、[³H]vinblastine は ICN Biomedicals、NEN Life Science よりそれぞれ購入した。チューブリン (5 μM) に 50 nM [³H]colchicine または 50 nM [³H]vinblastine、薬剤を各濃度添加後、DMSO を終濃度 5% (v/v) となるよう添加し、室温に 5 分間静置した。その後、セファデックス G-50 (superfine) によりチューブリン結合薬剤と非結合薬剤を分離し、チューブリンに結合している [³H] を液体シンチレーションカウンターにより定量した。

[チューブリン重合阻害作用]

グルタミン酸による重合はチューブリン (10 μM) を 1 M グルタミン酸溶液に溶解し、DMSO 4% (v/v)、0.4 mM GTP 存在下 37°C に加温することにより行った。Paclitaxel による重合は、チューブリン (10 μM) に対し paclitaxel (10 μM) を添加し 1 mM GTP 存在下 37°C に加温することにより行った。S-tubulin は、ホスホセルロースカラムを用いて精製したチューブリンタンパク質 (10 μM) に subtilisin (Sigma) を 1% (w/w) 添加し 30°C、60 分間反応後、PMSF を 1% (w/v) 加え調整した。S-tubulin は調整後直ちに薬剤を添加し 37°C に加温しアッセイを行った。poly-L-lysine による重合はチューブリン (15 μM) に対して poly-L-lysine (MW 150,000 - 300,000、0.05 mg/ml) を添加し、37°C に加温することによって行った。尚、いずれのアッセイも吸光波長 350 nm の濁度を指標に重合度を評価した。

[微小管結合タンパク質依存的重合系に対する作用]

MAP2、tau タンパク質の精製は Hamel らの方法を一部改変して行った [64]。微小管タンパク質を 1 M NaCl 存在下、4°C、60 分間反応後、沸騰水中に 5 分間静置した。その後、25,000 rpm、4°C、30 分間 (Beckman 120AT) 遠心し上清を得た。この上清を monoQ カラム (Amersham Pharmacia Biotech) に通し、50 mM から 300 mM KCl の濃度勾配により、MAP2 及び tau タンパク質を精製した。精製後、PD-10 カラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて RB buffer に置換しセントリコン (Millipore) を用いて濃縮した。また、純度の検定は SDS-PAGE により行った (Fig. 14)。

チューブリン重合はチューブリン (15 μM) に対して MAP2 (0.45 mg/ml)、tau (0.22 mg/ml) をそれぞれ添加し、37°C に加温することによって行った。

[結果及び考察]

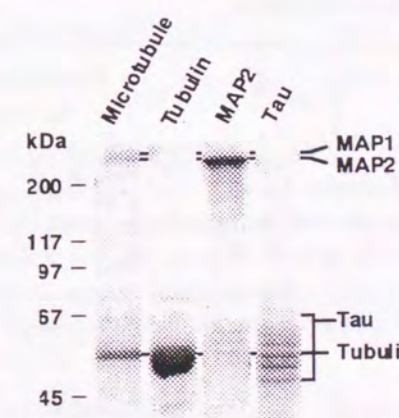


Figure 14 SDS-PAGE of tubulin, MAP2, and tau. Prepared proteins were applied to SDS-PAGE gel (12.5%), and were stained with Coomassie Brilliant Blue.

微小管タンパク質 (2 mg/ml) を用いた重合阻害アッセイ系において 40% の重

合阻害を示した TPS-A 250 μ M でも、 $[^3\text{H}]$ colchicine、 $[^3\text{H}]$ vinblastine のチュ

Table 3. Inhibitory effects of TPS-A on the binding of colchicine and vinblastine to tubulin.

Drug added	Radiolabeled drug bound	
	$[^3\text{H}]$ -colchicine	$[^3\text{H}]$ -vinblastine
	% of control	
colchicine	30.0 \pm 0.7	119.7 \pm 5.1
vinblastine	160.4 \pm 9.2	19.7 \pm 2.5
TPS-A	112.7 \pm 4.7	97.1 \pm 4.8

The reaction mixture (0.35 ml) contained 0.5 mg/ml (ca. 5 μ M) tubulin, 50 nM $[^3\text{H}]$ colchicine or $[^3\text{H}]$ vinblastine, 5% (v/v) dimethyl sulfoxide, and a mitotic inhibitor (colchicine 50 μ M, vinblastine 50 μ M, or TPS-A 250 μ M). Incubation was for 5 min at room temperature. Aliquots (0.1 ml) were applied to triplicate columns of Sephadex G-50 and processed by centrifugal gel filtration. Results are means \pm S.D. (n=3 experiments).

ーブリン結合を阻害しなかった(Table 3)。このことから TPS-A はチューブリン上の colchicine 結合サイト、vinblastine 結合サイトとは異なるサイトに作用していると考えられる。

Table 4 Effects of TPS-A and colchicine on the assembly of tubulin under several assembly conditions.

Assembly inducer	Tubulin (μ M)	Tubulin assembly (% of control)	
		TPS-A	colchicine
Glutamate	5	86.0 \pm 2.7	22.8 \pm 0.0
Paclitaxel	10	86.2 \pm 0.7	6.0 \pm 1.9
S-Tubulin	15	105.8 \pm 0.4	61.1 \pm 5.0

Percentage activity of *in vitro* tubulin self-assembly induced under several conditions with 250 μ M TPS-A or colchicine. In each case, the turbidity of purified tubulin without drug at 37°C was calculated as 100%.

チューブリン重合条件として、非生理的重合促進剤・促進条件であるグルタミン酸、paclitaxel、S-tubulin を用いて検討したところ、 β -チューブリンに結合する colchicine はいずれの重合条件においてもチューブリン重合を強く阻害したのに対し、TPS-A は 250 μ M 処理においてもグルタミン酸、paclitaxel、S-tubulin を用いた重合系においてほとんど阻害作用を示さなかった (Table 4)。一方、TPS-A は微小管結合タンパク質の主要構成成分である MAP2、tau タンパク質によるチューブリン重合を約 50%、poly-L-lysine による重合を約 70% 阻害した (Fig. 15B, C, D)。S-tubulin は微小管結合タンパク質の結合部位であるチューブリンの C 末端が切断されており、poly-L-lysine は、MAP2、tau と同様チューブリンタンパク質の

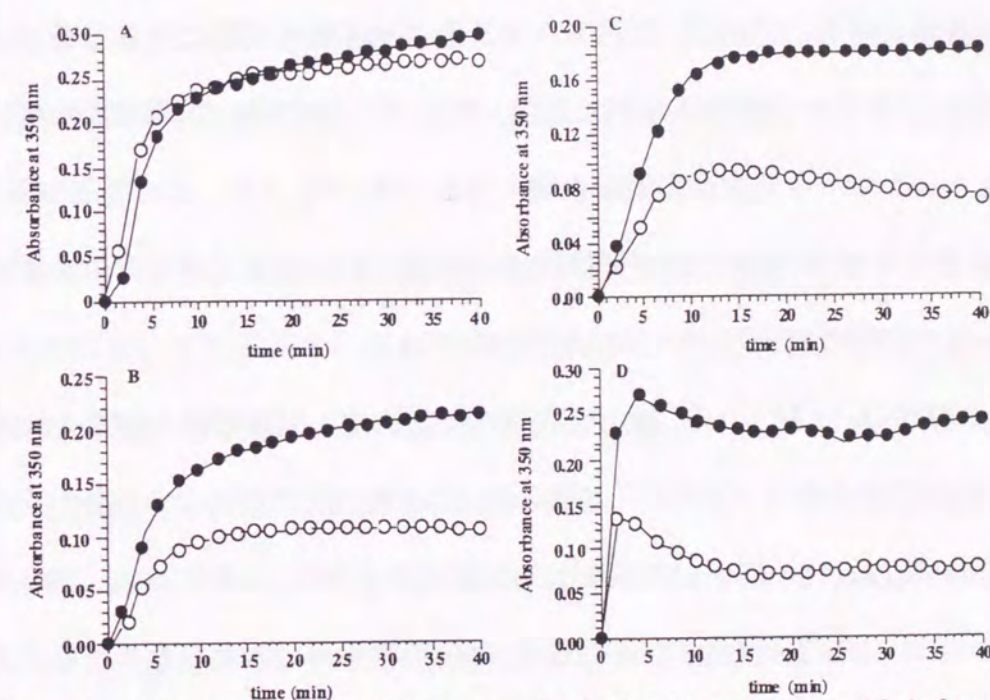


Figure 15 Effects of TPS-A on tubulin assembly in the presence of assembly inducers. Time course of *in vitro* tubulin self-assembly induced by glutamate (A), MAP2 (B), tau (C), and poly-L-lysine (D). Tubulin assembly was induced by MAP2 (0.45 mg/ml), tau (0.22 mg/ml), or poly-L-lysine (MW. 150,000 - 300,000) (0.05 mg/ml), using 15 μ M tubulin with TPS-A, 0 μ M (closed circles), 250 μ M (open circles).

C 末側を介してチューブリン重合を誘導することが知られている [9, 65, 72]。従ってこれらの結果より TPS-A の微小管重合阻害作用の標的部位はチューブリン上の微小管結合タンパク質結合サイトもしくは微小管タンパク質上のチューブリン結合サイトであると考えられる。

第五節 小括

TPS-A、-B は、静岡県大井沖海底土壌より単離された *A. fumigatus* BM939 株の代謝産物で、Cdc2 温度感受性変異株 *tsFT210* 細胞を用いたスクリーニングによって細胞周期を M で停止させる薬剤として単離精製された[9, 52-55, 65, 72]。ラット正常繊維芽細胞 3Y1 を用いて細胞周期に対する作用を検討したところ、TPS-A は M 期特異的な細胞周期停止活性を有していたが、TPS-B は細胞周期非特異的な細胞毒性を示した (Table 2)。TPS-A、B の構造上の違いはインドール環上のメトキシ基の有無にあることから、このメトキシ基が細胞毒性発現に重要であると考えられる。一方、TPS-A の細胞周期停止濃度 (20 - 50 μ M) は、本薬剤の細胞レベルでの微小管ネットワーク消失作用濃度と同一であった (Fig. 10)。このことから TPS-A の M 期停止作用は、分裂装置の主要構成成分である微小管タンパク質の脱重合に伴う紡錘体形成不能等に起因しているものと推察される。

また、TPS-A は *in vitro* 微小管重合系においても顕著な微小管重合抑制効果を有していた (Fig. 12A)。TPS-A の微小管タンパク質 (2 mg/ml) 重合系における重合阻害の IC_{50} 値は約 250 μ M であり、colchicine (IC_{50} : 5.0 μ M)、vinblastine (IC_{50} : 12.3 μ M) と比較して TPS-A の重合阻害作用は微弱なものであった (Fig. 13)。この *in vitro* 微小管重合系における TPS-A の重合阻害作用濃度は、細胞における微小管ネットワーク消失作用濃度 (20 - 50 μ M) よりもはるかに高いものであったが、M 期阻害剤である colcemid も *in vitro* 微小管重合系において約 20% の重合阻害を示す濃度で細胞内微小管ネットワークの脱重合を引き起こしていたことから (data not shown)、この TPS-A の作用濃度の相違は実験系の特性によるものと考えられる。

微小管は生理的条件下において重合と脱重合を繰り返して動的平衡状態を保っている。そこで TPS-A の脱重合作用が重合している微小管に対しても引き起こされるか検討したところ、TPS-A は重合している微小管に対しても脱重合作用を有していた (Fig. 12B)。vinblastine も同様の作用を有していることが知られているが、*vinca* alkaloid は高濃度で微小管の凝集を引き起こしこの凝集塊は 0°C に冷却しても脱重合しない[61]。TPS-A 添加により脱重合を引き起こした微小管タンパク質を 0°C に冷却することによって微小管が脱重合した (Fig. 12B)。さらに、他の実験から TPS-A が高濃度処理によっても凝集塊は形成しないという結果を得ている。これら微小管を用いた実験の結果から、TPS-A の作用様式は *vinca* alkaloid とは異なる可能性が示唆された。実際に精製チューブリンを用いた結合実験の結果から、TPS-A は vinblastine、colchicine 結合サイトとは異なる部位に作用していると考えられる (Table 3)。

チューブリン重合は、生理的因子のみならず非生理的因子によっても誘導される [9]。本実験において生理的因子として微小管結合タンパク質の主要成分である MAP2、tau タンパク質によるチューブリン重合を検討したところ、TPS-A はこれら MAP2、tau タンパク質による重合を阻害していた (Fig. 15B, C)。非生理的因子としてグルタミン酸、paclitaxel、poly-L-lysine によるチューブリン重合系により検討したところ、TPS-A は poly-L-lysine による重合のみを有意に抑制した (Fig. 15A, D, Table 4)。また、チューブリンの C 末を切断した S-tubulin の重合を TPS-A は抑制しなかった。MAP2、tau タンパク質及び poly-L-lysine はチューブリン分子上の C 末上に作用してチューブリン重合を引き起こすことが知られている。これらの結果から、TPS-A はチューブリン分子上の C 末に作用することによってチューブリンの脱重合を引き起こす可能性が示唆された。過去の報告で MAPs 依存的なチューブリン重合を阻害する薬剤として知られているのは estramustine と bis-ANS だけであり、

bis-ANS の過去の報告においても TPS-A と同様の重合阻害様式を示していた[9, 40, 41]。このことから TPS-A の作用機構がチューブリンの C 末を介する可能性が強く示唆される。さらに最近 Nogales らのグループによって微小管の構造が解析され、チューブリンの C 末はプロトフィラメントの外側に位置していると報告された[73]。この報告を併せて考慮すると、TPS-A は微小管重合安定化因子である MAPs のプロトフィラメントへの結合をアンタゴナイズすることによって脱重合を促すと考えられる。

天然物由来の微小管作用薬の中で、本 TPS-A は微小管結合タンパク質依存的な重合阻害機構を有する最初の化合物となる。しかしながら、TPS-A の細胞周期阻害活性および微小管重合阻害活性は、既存の微小管作用薬と比較してはるかに低く、生命現象解明の探索針としての応用を考えた場合には、活性の強い類縁体の開発が必要であろう。この点に関しては、現在多くの化学合成が TPS-A、TPS-B の生命現象解明の探索針および癌化学療法への応用を目指し種々試みられており[74, 75]、今後の展開が期待される。

第二章 新規微小管作用薬 Tryprostatin 類縁体の作用機作解析

第一章において *Aspergillus fumigatus* BM939 株の培養上清中より単離した tryprostatin A (TPS-A) が、微小管結合タンパク質 (MAP2、tau) 依存的なチューブリン重合阻害を介して細胞周期を分裂期で停止させる可能性が示唆された。*A. fumigatus* BM939 株培養上清中には TPS-A 以外にも種々の類縁体が存在しており、

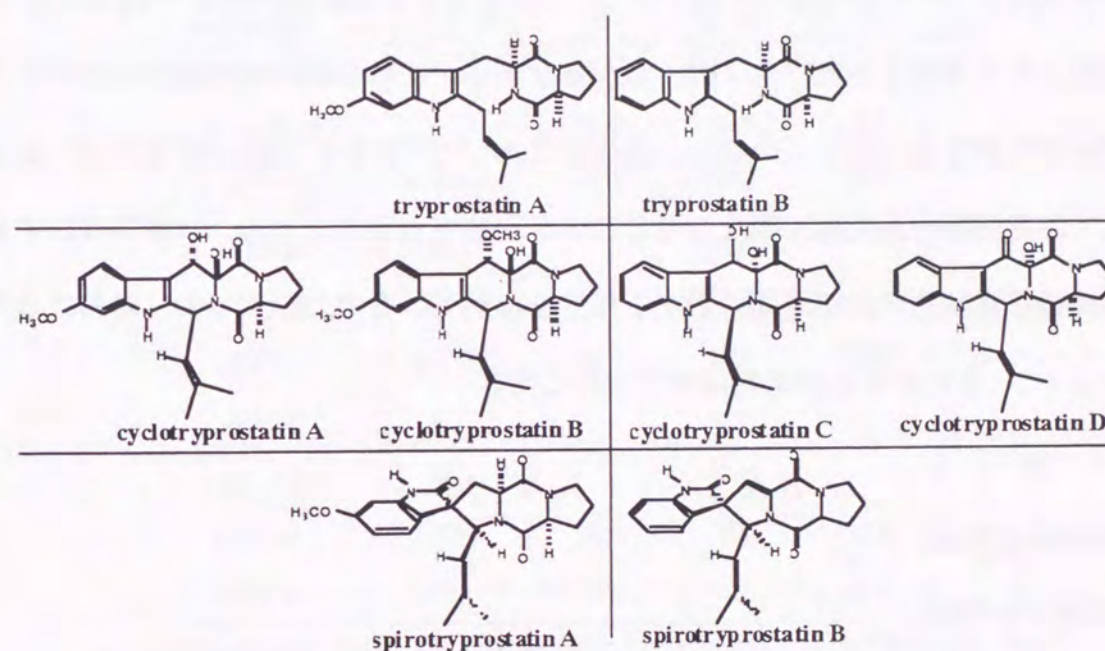


Figure 16 Structure of tryprostains

構造上の特徴からこれら類縁体は tryprostatis (TPS)、cyclotryprostatis (cTPS)、そして spirotryprostatis (sTPS) に大別できる (Fig. 16)。cTPS には cTPS-A、-B、-C、-D の4種の類縁体が、また sTPS には sTPS-A と sTPS-B の2種の類縁体が存在し、いずれも *tsFT210* 細胞を用いたスクリーニング系において細胞周期を分裂期で停止させる作用を有していた[76, 77]。TPS-A および TPS-B は *A. fumigatus* BM939 株培養上清中の主要成分であり、TPS-A は TPS-B の6位にメトキシ基が付いた構造をしている。前章の結果から、この6位のメトキシ基が TPS の細胞毒性軽減に重要であると考えられた。そこで本章においては、cTPS およ

び sTPS 類縁体の細胞周期停止活性等を調べることにより TPS 類縁体の構造活性相関について検討を試みた。

第一節 培養細胞への作用

TPS-A と同様、cTPS-A、-B、-C、-D 及び sTPS-A、-B は、Cdc2 温度感受性変異株 *tsFT210* 細胞を用いたスクリーニングによって細胞周期を M 期で停止させる薬剤として単離された[76, 77]。しかしながら、これら類縁体の活性についてその詳細は未だ明らかとなっていない。第一章において TPS-A は微小管タンパク質に作用して細胞周期を分裂期で停止させることが示唆されたことから、本節ではまず各種類縁体の正常細胞の細胞周期に対する作用を検討し、その上で *in situ* における微小管ネットワークに対する作用を併せて検討した。

[実験材料と方法]

[細胞毒性作用]

TPS-A および TPS-B の殺細胞効果は MTT アッセイにより検討した。細胞を 1×10^5 cells/well 播種し、各薬剤を各濃度添加し、添加 24 時間後の細胞の生存率を MTT アッセイにより評価した [78]。

[細胞周期に対する作用]

TPS 類縁体はメタノールに溶解した。

細胞周期のアッセイはラット正常繊維芽細胞 3Y1 を用いて第一章第一節に準じて行った。また、TPS、cTPS、sTPS 類縁体は終濃度 250 μ M となるよう添加し、24 時間後に細胞周期を解析した。

[*in situ* における微小管ネットワークに対する作用]

第一章第二節に準じて実験を行った。

[結果及び考察]

18 位 (TPSs、sTPSs の 6 位に相当する) にメトキシ基を有する cTPS-A、

Table 5. Effects of tryprostatin derivatives on the cell cycle progression

Compound	C-6/C-18	DNA distribution (%) ^a		
		2C	2C-4C	4C
control	-	67.5	13.1	14.3
colchicine	-	11.4	19.5	50.5
TPS-A	OCH ₃	12.0	24.8	55.2
TPS-B	H		N.D. ^b	
cTPS-A	OCH ₃	14.4	17.1	49.1
cTPS-B	OCH ₃	10.3	19.8	52.0
cTPS-C	H		N.D.	
cTPS-D	H		N.D.	
sTPS-A	OCH ₃	72.6	6.8	14.6
sTPS-B	H	14.1	19.8	43.1

^a The exponentially growing 3Y1 cells were treated with 1 μ M colchicine or 250 μ M compounds. After 24 h treatment, DNA contents were quantified by flow cytometry.

^b N.D.: Not determined due to the cytotoxicity.

cTPS-B を処理した細胞では、メトキシ基を有する TPS-A 処理の場合と同様、M 期特異的な細胞周期停止が観察された (Table 5)。一方、デメトキシ体である cTPS-C、cTPS-D では薬剤添加後急速な細胞の浮遊及び細胞死が観察された。TPS-A、TPS-B の細胞毒性を MTT アッセイで検討したところ、IC₅₀ 値がそれぞれ 400 μ M、4 μ M であり、メトキシ基の有無によって細胞に対する毒性に 100 倍の差が観察された (Fig. 17)。cTPS 類縁体においても同様の結果が得られたことから TPS 類縁

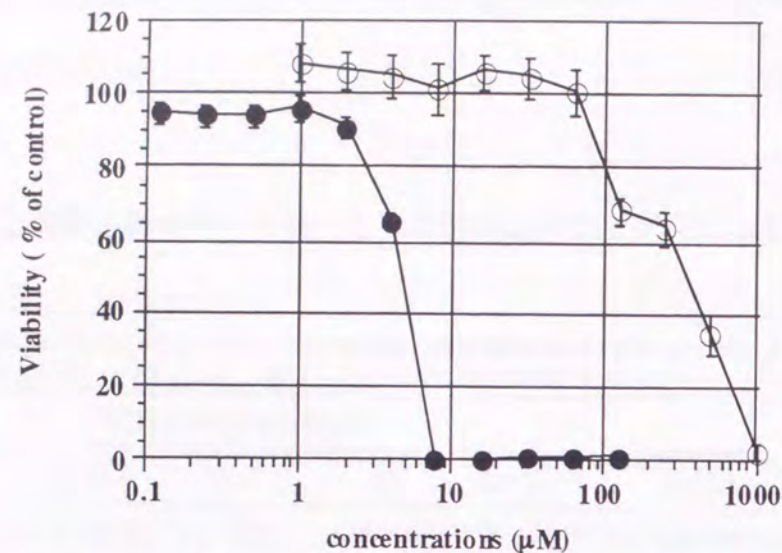


Figure 17 Effects of TPS-A and -B on the growth of 3Y1 cells. 2×10^4 cells were seeded in each well of a 96-well plate. Various concentrations of TPS-A or -B were then added and the plate was incubated for 24 hr. And then Viability of 3Y1 cells was evaluated by MTT assay. TPS-A (○), TPS-B (●).

体の細胞毒性軽減には6位/18位のメトキシ基が重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。一方、sTPS類縁体ではsTPS-Aは細胞周期になんら影響を与えなかったが、sTPS-B処理では細胞毒性は観察されず有為な細胞周期の分裂期停止が観察された。この結果はTPS, cTPSの結果とは異なり、メトキシ基を持たないsTPS-Bは細胞周期の分裂期停止作用を示したがメトキシ基を有するsTPS-Aは作用を示さないというものであった。この結果についてはさらに詳細な検討が必要であるが、スピロ環を有することによりsTPSの構造がTPSs, cTPSsとは大きく異なり、作用自体がTPSsやcTPSsとは異なっている可能性が考えられる。M期特異的阻害活性を示したcTPS-A, cTPS-B, sTPS-B 250 μMを6時間処理したところ、colchicine処理と同様、微小管ネットワークの消失が観察された (Fig. 18)。このことから、cTPS-A, cTPS-B, sTPS-B細胞周期阻害作用はTPS-Aと同様、微小管ネットワークの消失によるものであると考えられる。

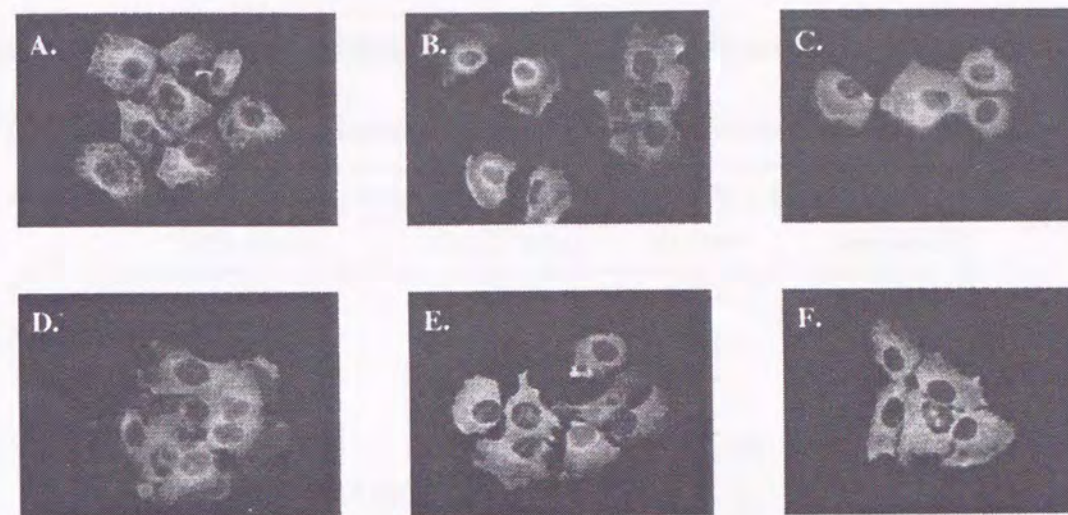


Figure 18 Depolymerization of microtubule network by tryprostatin derivatives *in situ*. 3Y1 cells were incubated with 1 μM colchicine (B) or 250 μM tryprostatin derivatives for 6 h, and were observed under a fluorescence microscopy. Control cells without compounds (A). TPS-A (C), cTPS-A (D), cTPS-B (E) and sTPS-B (F) treated cells, respectively.

第二節 微小管に対する作用

前節の検討で、cTPS-A, -B, sTPS-Bは微小管に作用して細胞周期停止作用を発揮する可能性が示唆された。さらに、C-6/C-18位のメトキシ基が細胞毒性発現に重要な役割を果たしているものと推察された。そこで、本節ではこれら類縁体を用いて微小管重合の再構成系における構造活性相関について解析を行った。

[実験材料と方法]

[*in vitro* 微小管重合アッセイ]

第一章第二節に準じて行った。

[結果及び考察]

cTPS類縁体の微小管重合に対する作用を検討したところ、250 μMのTPS-B、

cTPS-A、-B、-C、sTPS-B 処理によって微小管重合阻害作用が観察された (Table 6)。このことから細胞の場合とは異なり、微小管重合阻害活性にはメトキシ基の存

Table 6 Effects of tryprostatin derivatives on the microtubule assembly *in vitro*

Compound	C-6/C-18	conc. (μ M)	microtubule assembly
			<i>in vitro</i> (%) ^a
colchicine	-	6	43.6
TPS-A	OCH ₃	250	57.9
TPS-B	H	250	33.4
cTPS-A	OCH ₃	250	66.4
cTPS-B	OCH ₃	250	66.0
cTPS-C	H	250	51.1
cTPS-D	H	250	137.0
sTPS-A	OCH ₃	250	95.0
sTPS-B	H	250	75.3

^a Percentage activity of *in vitro* microtubule assembly with 6 μ M colchicine or 250 μ M compounds. Average of two values

在は影響を与えていないことが示唆された。一方、cTPS-D 処理では微小管の過重合

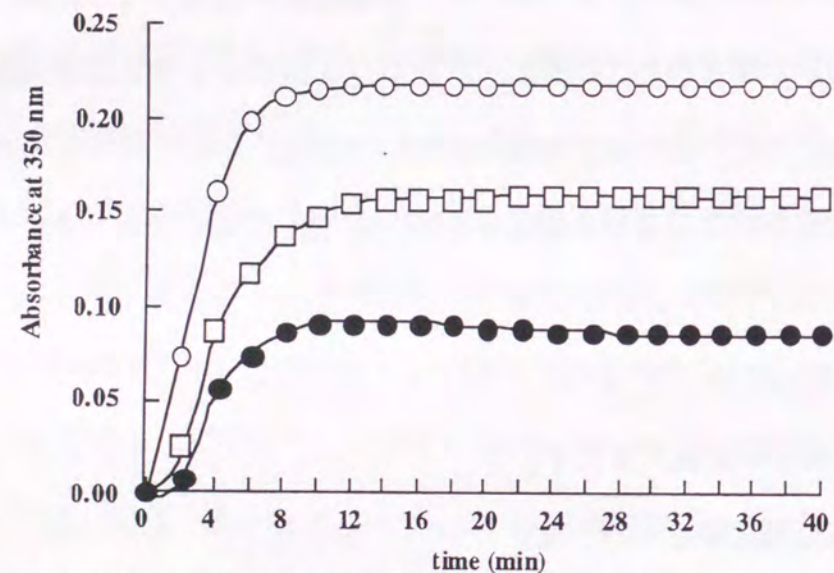


Figure 19 Effects of cTPS-C and -D on microtubule assembly. Time course of *in vitro* microtubule assembly is shown as turbidity. Microtubule proteins (2 mg/ml) were incubated with cTPS-C (closed circles) and -D (open circles) 250 μ M. Control without compounds (open squares).

(コントロールの137%) が誘導されていた (Fig. 19)。cTPS-C と cTPS-D で

は、13 位以外の構造が同じであるにも関わらず、微小管重合に対する作用は相反するものであった。今後さらなる検討を要するが、TPS-A がチューブリンに作用している可能性を考慮すると cTPS-C はチューブリン重合に対するアンタゴニストとして、cTPS-D はアゴニストとして作用している可能性が考えられる。

第三節 小括

A. fumigatus BM939 培養上清中から単離された cTPS、sTPS 等の TPS 類縁体も *tsFT210* 細胞を用いたスクリーニング系により細胞周期を G2/M 期で停止させる薬剤として単離された天然化合物である。これら類縁体の正常細胞に対する作用を検討したところ、インドール環上のメトキシ基の有無によって作用は大きく異なっていた (Table 5)。3Y1 細胞に各種類縁体 (250 μ M) を作用させたところ、インドール環上にメトキシ基を有する cTPS-A、cTPS-B は TPS-A と同様に細胞周期を M 期で停止させた。それに対しメトキシ基を持たない cTPS-C、cTPS-D は TPS-B と同様に顕著な細胞毒性を示し、薬剤添加後直ちに細胞の形態が球状に変化した。TPS-A と TPS-B の細胞障害性を MTT アッセイにより検討したところ、それぞれの IC₅₀ 値は 400 μ M、4 μ M でありその細胞毒性には 100 倍の開きがあった (Fig. 17)。これらの結果からインドール環上に存在するメトキシ基によって薬剤の細胞毒性が軽減され、M 期停止作用が顕在化したものと考えられる。さらに分裂装置の主要構成成分である微小管タンパク質に対する作用を蛍光抗体染色で観察したところ、細胞周期停止作用を有していた cTPS-A、cTPS-B 添加によって、TPS-A と同様微小管ネットワークが消失した。以上の結果から cTPS-A、cTPS-B の M 期停止作用は微小管重合阻害によるものと考えられた。

さらにこれら類縁体の微小管重合の *in vitro* 再構成系における作用を検討した

ところ、cTPS-A、-B、-C は微小管重合を阻害し、その重合度は 33.4%~66.4%であった (Table 6)。このことからインドール環上のメトキシ基の有無は少なくとも *in vitro* における重合阻害に重要ではないと考えられる。一方、cTPS-D は cTPS-C と 13 位が異なるのみであるが微小管重合系における作用を検討したところ cTPS-C とは逆に微小管重合を促進し、コントロールの 137%の重合度を示した。前章の検討から、TPS-A はチューブリン C 末の MAPs と相互作用する領域に作用し、MAPs とチューブリンの相互作用を阻害することにより微小管重合を阻害する可能性が示唆された。以上の結果を考慮すると、TPS 類縁体はチューブリン重合において微小管結合タンパク質に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして作用しているものと推察される。すなわち、TPS-A、TPS-B、cTPS-A、cTPS-B および cTPS-C は MAPs のアンタゴニストとして作用し微小管重合を阻害し、cTPS-D は微小管結合タンパク質のアゴニストとして作用するために微小管の重合を促進しているのではないだろうか。

現在までに、*vinca* alkaloids、paclitaxel、dolastatin 10、2-methoxyestradiol、epothilones などの微小管作用薬が知られており、これらの化合物には種々の類縁体が存在するものの、微小管に対する活性は全て親化合物と同様の作用である [79-83]。本研究の結果、TPS 類は類縁体間で逆の作用を示す初めての微小管作用薬である可能性が示唆された。今後、さらなる作用機構の解明が必要であるが、本薬剤をリード化合物として基礎臨床両面において有用な新規微小管作用性の探索針の開発が期待される。

第三章 新規微小管作用薬 Pironetin 類の作用機作解析

Pironetin は植物の生長抑制活性を指標に日本化薬株式会社の小林らによって放線菌 *Streptomyces* sp.株から単離精製された化合物であり、基本骨格としてラクトン環とアルキル鎖を有している [84, 85]。*Streptomyces* sp.株からは pironetin の他、pironetin の 7 位のメトキシ基が水酸基に変換した demethylpironetin が得られている [74]。また pironetin の 12-13 位の二重結合を化学的にエポキシ体に置換した epoxy pironetin も合成されている (Fig. 6)。これらの薬剤を *tsFT210* 細胞のスクリーニング系にかけたところ、細胞周期進行を G2/M 期で停止させる活性を有していた (Fig. 20)。そこで、本章では pironetin 類の細胞周期停止活性について作用機作解析を行った。

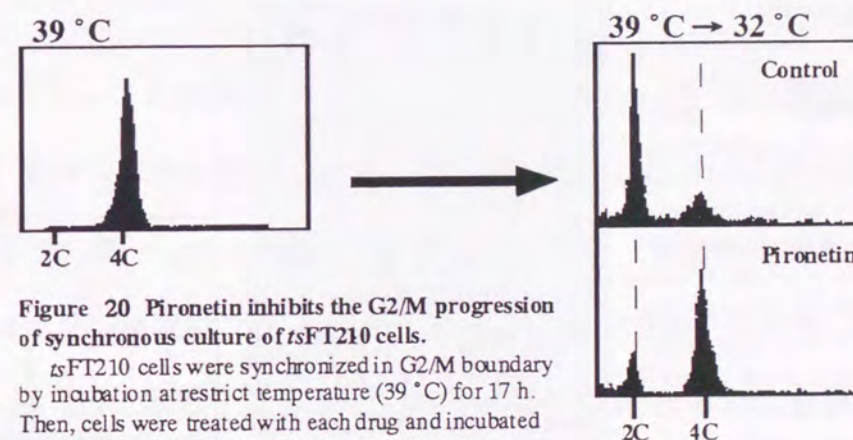


Figure 20 Pironetin inhibits the G2/M progression of synchronous culture of *tsFT210* cells. *tsFT210* cells were synchronized in G2/M boundary by incubation at restrict temperature (39 °C) for 17 h. Then, cells were treated with each drug and incubated for 4 h at permissive temperature (32 °C). After incubation, cells were collected and DNA contents measured by flow cytometry.

第一節 培養細胞への作用

Pironetin は *tsFT210* 細胞において細胞周期を M 期で停止させる活性を有して

いたが、今後バイオプローブとしての応用等を考えた場合には正常細胞を用いた解析が不可欠である。そこでまず始めに対数増殖期にあるラット正常繊維芽細胞を用いて pironetin の細胞周期に対する作用を検討した。さらにその結果を踏まえて、M 期阻害剤の主要標的部位である微小管ネットワークに対する作用を免疫学的蛍光法を用いて細胞レベルで検討した。

[実験材料と方法]

[細胞周期に対する作用]

Pironetin 類は DMSO に溶解し、第一章第一節に準じて実験を行った。

[*in situ* 微小管ネットワークに対する作用]

第一章第一節に準じて実験を行った。Pironetin 類処理 6 時間後に抗体染色を行った。

[核の形態観察]

核の形態観察は、カルノア固定法を用いて行った。細胞をエッペンに集め、0.55% KCl 溶液で室温で 20 分間膨潤させた。次に 3 倍量のカルノア液（メタノール 75%、酢酸 25% 溶液）を加え、30 分間以上固定した。一度、カルノア液で洗浄した後、水を薄く乗せたスライドガラスにたらし細胞をはじかせ、染色体を広げ、乾燥後、Hoechst33258 で染色し、顕微鏡で観察した。

[結果及び考察]

Pironetin、demethylpironetin、epoxypironetin の細胞周期に対する作用を検討したところ、いずれにおいても濃度依存的な細胞周期の G2/M 期停止作用が観察された (Table 7)。Carnoy 染色により核の形態を観察したところ大半の細胞が M 期に存在していたことから、Pironetin 類は細胞周期を M 期で停止させる作用を有し

Table 7 Distribution of DNA content in asynchronous culture of 3Y1 cells treated with various drugs.

	conc. ng/ml	DNA contents (%)		
		2C	2-4C	4C
control	0	61.0	16.5	16.5
colcemid	100	4.4	4.9	62.8
	20	11.6	10.0	64.6
pironetin	50	7.2	10.6	68.1
	100	6.4	10.3	70.5
demethyl-	20	33.1	10.6	44.7
pironetin	50	12.9	10.4	65.4
	100	9.5	9.9	67.1
epoxy-	100	70.3	6.2	17.4
pironetin	500	7.9	10.0	73.2
	1000	4.5	7.8	77.1

Exponentially growing rat normal fibroblast 3Y1 cells were treated with various compounds for 24 h and the distribution of DNA content was determined.

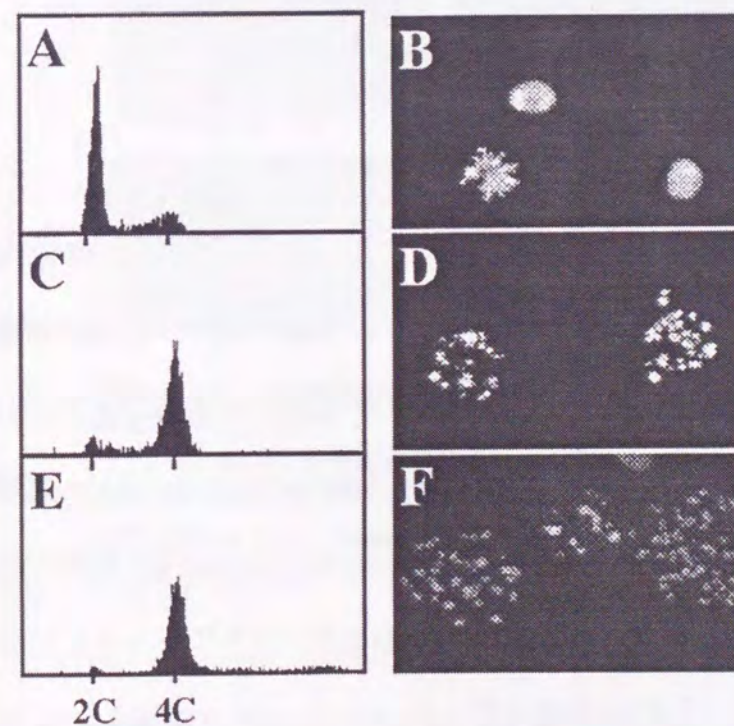


Figure 21 Effect of pironetin and colcemid on the distribution of DNA content in asynchronous 3Y1 cell cultures. Asynchronous 3Y1 cells (A and B) were treated with pironetin (C and D) and colcemid (E and F). Panels A, C and E; the cells were collected and the distribution patterns of DNA content were determined by flow cytometry. Panels B, D and F; chromosome preparations were stained with Hoechst 33258.

ていることが示唆された (Fig. 21)。また、類縁体間での細胞周期停止活性を比較したところ、pironetin と demethylpironetin はほぼ同程度の細胞周期停止活性を

有していたが、epoxypironetinの細胞周期阻害作用は他の類縁体と比較して約10分の1と低く、pironetinやdemethylpironetinが約70%の細胞でG2/M期停止を示す100 ng/mlの濃度においても全く細胞周期停止作用を示さなかった。この結果より、pironetin類の細胞周期停止作用には12-13位の二重結合が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

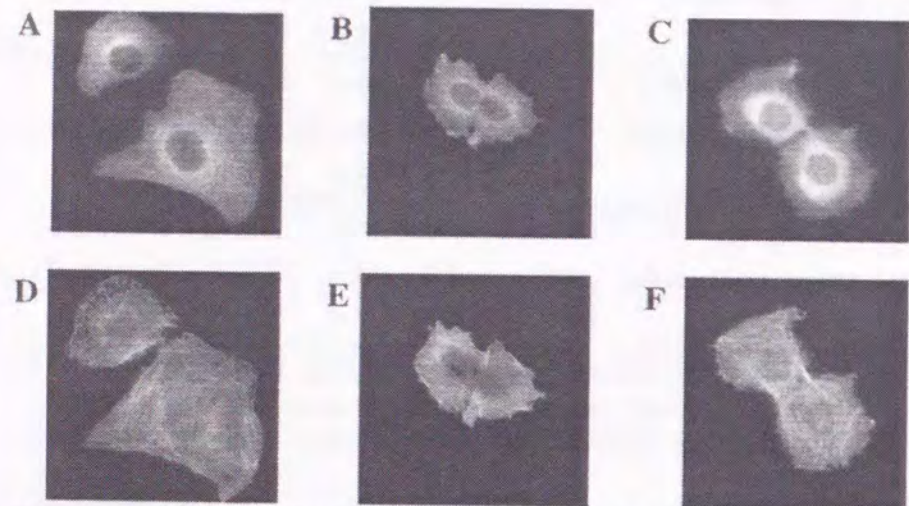


Figure 22 Pironetin induced microtubule disassembly *in situ*.

3Y1 cells were incubated with 250 nM colcemid (B, E), 300 nM pironetin (C, F) or in the absence of either compound (A, D) for 12 h. Microtubule (A-C) and actin filaments (D-F) were observed under a fluorescence microscope.

次に *in situ* 微小管ネットワークに対する作用を抗 α -チューブリン抗体を用いて検討したところ、pironetin処理によってチューブリンネットワークの消失が観察された (Fig. 22)。尚、この微小管ネットワークの消失作用は濃度依存的であり20 nM以上の処理でネットワークは消失していた (Fig. 23)。Demethylpironetin処理した細胞でも pironetin と同程度の活性が観察されたが、epoxypironetin 処理では微小管ネットワークの消失に100 nM以上の濃度が必要とされ、さらにネットワークの完全な消失には pironetin の約50倍の濃度を要した (data not shown)。また、pironetin 処理によってアクチンフィラメントには何ら影響が見られなかったことから、pironetin は微小管特異的に作用することが示唆された。Pironetin の微小管

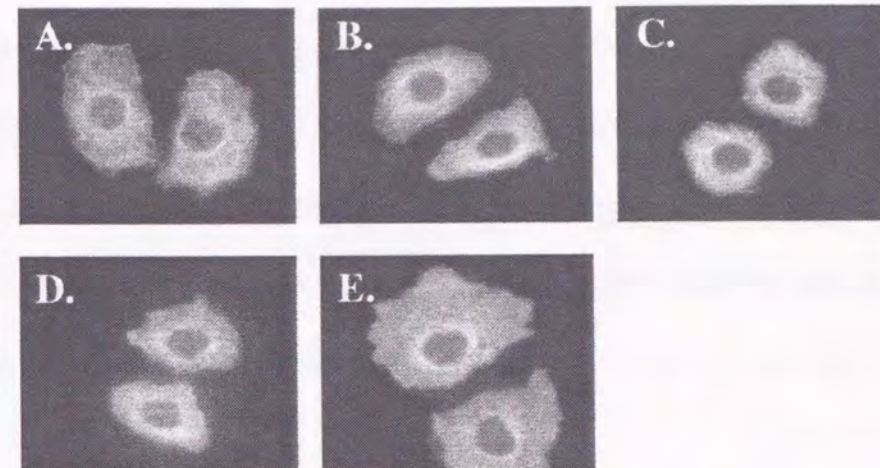


Figure 23 Dose dependency of pironetin on microtubule disassembly *in situ*.

3Y1 cells were incubated with pironetin at the indicated concentration for 6 hr (A; 0, B; 5, C; 10, D; 20, E; 50 ng/ml). Microtubule filaments were observed under a fluorescence microscope.

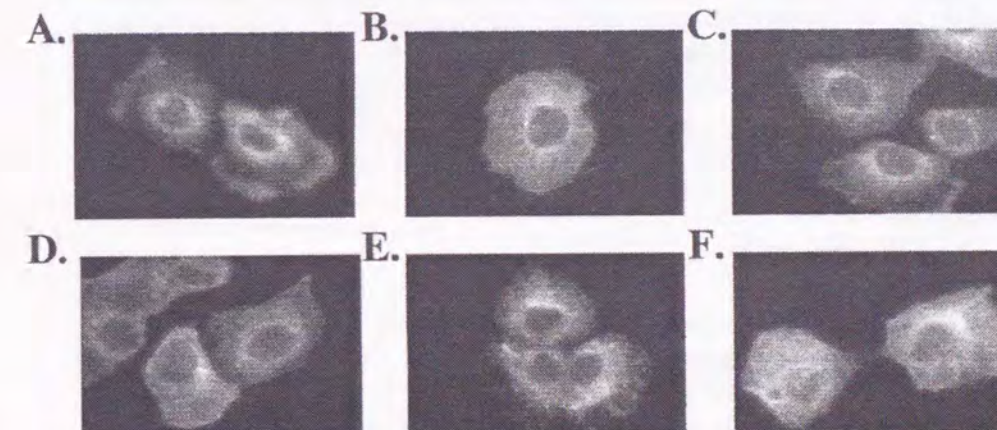


Figure 24 Reversibility of pironetin on microtubule disassembly *in situ*.

3Y1 cells were incubated with pironetin (50 ng/ml) for 6 hr, and then the medium was replaced by fresh medium without pironetin. After the replacement, microtubule filaments were observed at 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D), 8 (E), and 12 (F) hr.

ネットワーク消失作用の可逆性について検討するために、pironetin (50 nM) 処理6時間後に細胞を培地で洗浄したところ、洗浄後12時間してチューブリンネットワークの再構築が確認された。colchicineやTPS-Aでは、洗浄後約3時間ほどでネッ

トワークの再構成が生じていたことから、pironetin の細胞に対する作用は見かけ上可逆的であるが、標的分子レベルでは不可逆の可能性も残されている (Fig. 24)。

以上の結果より、pironetin の細胞周期停止作用は微小管タンパク質を標的としていることが示唆された。さらに、pironetin 類縁体間で *in situ* における微小管ネットワークに対する作用が異なっていたことから、類縁体間での細胞周期阻害作用の活性の相違は微小管ネットワークに対する作用の相違に起因するものと推察された。

第二節 微小管に対する作用

前節において pironetin 類は細胞レベルにおいて微小管ネットワークの消失を引き起こした。そこで本節では、pironetin 類の微小管重合に対する直接的な作用を精製した微小管を用いた *in vitro* 微小管重合系によって検討した。

[実験材料と方法]

[微小管に対する作用]

第一章第二節に準じて検討を行った。

[結果及び考察]

Pironetin 類縁体の微小管重合に対する作用を検討したところ、pironetin は微小管重合系 (微小管タンパク質濃度 2 mg/ml) において 15 μ M 処理で完全に重合を阻害していた (Fig. 25)。この系における微小管重合阻害の 50% 阻害濃度は pironetin、demethylpironetin において約 5 μ M、epoxypironetin では 30 μ M 以上であった。また pironetin は重合した微小管に対しても重合前に加えた場合とほぼ同程度の脱重合作用を示した (Fig. 26)。以上の結果より、pironetin 類の細胞

レベルでの微小管脱重合作用は微小管の重合阻害および重合した微小管の脱重合の両面によるものであると推察された。

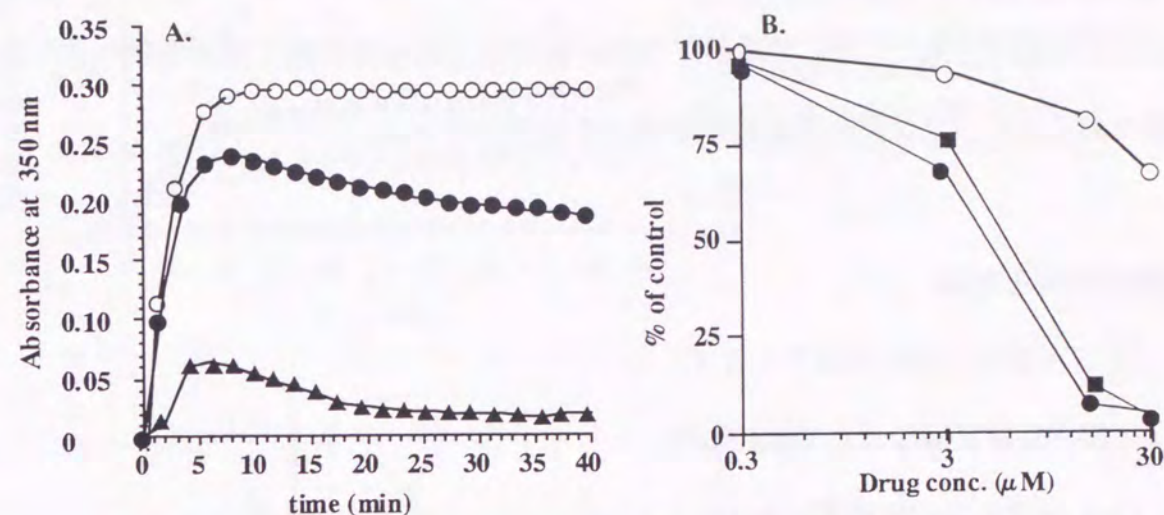


Figure 25 Pironetin and its derivatives inhibited microtubule assembly *in vitro*. A. Time course of *in vitro* microtubule assembly in term of turbidity. Microtubule proteins (2 mg/ml) were incubated with various concentrations of pironetin. The final concentrations of pironetin were 0(\circ), 3(\bullet), 15(\blacktriangle) μ M respectively. B. Comparison of inhibition effect on microtubule assembly between pironetin and its derivatives. Microtubule proteins (2 mg/ml) were incubated with various concentrations of pironetin (\bullet), demethylpironetin (\blacksquare) and epoxypironetin(\circ). % of control = 100 x turbidity of c control at 40 min / turbidity of treatment at 40 min

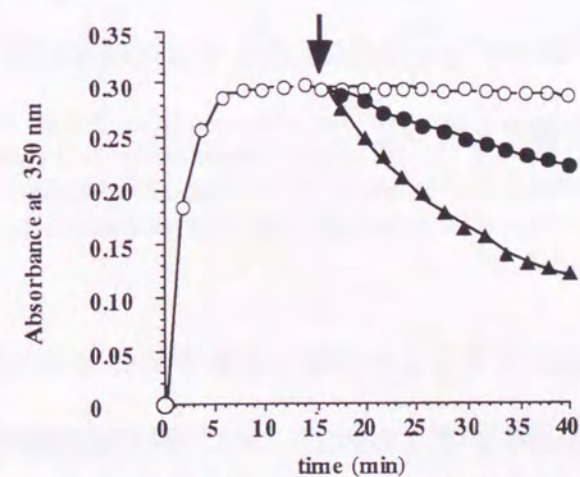


Figure 26 Effect of pironetin on microtubule disassembly *in vitro*. Microtubule proteins (2 mg/ml) were assembled in the absence of pironetin. After 15 min (arrow) pironetin was added and disassembly was then monitored. The final concentrations of pironetin were 0(\circ), 3(\bullet), 15(\blacktriangle) μ M, respectively.

第三節 チューブリンに対する作用

前節までの検討で pironetin は微小管の脱重合を介して M 期停止作用を発揮することが示唆された。そこで本節では微小管脱重合作用の詳細な機構を調べるために種々のチューブリン重合再構成系を用いて検討を行った。

[実験材料と方法]

[チューブリン結合阻害アッセイ]

第一章第三節に準じて検討した。

[チューブリンの結合アッセイ]

チューブリンタンパク質と薬剤との相互作用を、表面プラズモン共鳴解析法により行った。表面プラズモン共鳴測定は SRP670 (日本レーザーエレクトロニクス研究所) を用いた。チューブリンタンパク質をセンサーチップに固定後、薬剤を添加しシグナルの変化を酵素反応評価ソフトを用いて解析した。この際、用いた RB buffer の pH が 6.8 では再現性が得られなかったため、7.4 に変更して解析を行った。

[結果及び考察]

微小管重合阻害作用の標的分子としてはチューブリンタンパク質および微小管結合タンパク質が考えられる。そこでまずチューブリン重合に対する直接的な作用を検討した。非生理的重合促進条件であるグルタミン酸によるチューブリン重合系を用いて検討したところ、pironetin はチューブリン重合を阻害した (Fig. 27)。Pironetin 類縁体の 50% 阻害濃度は、pironetin (10 μ M)、demethylpironetin (10 μ M)、epoxypironetin (約 100 μ M) であった (Fig. 28)。この値は pironetin 類縁

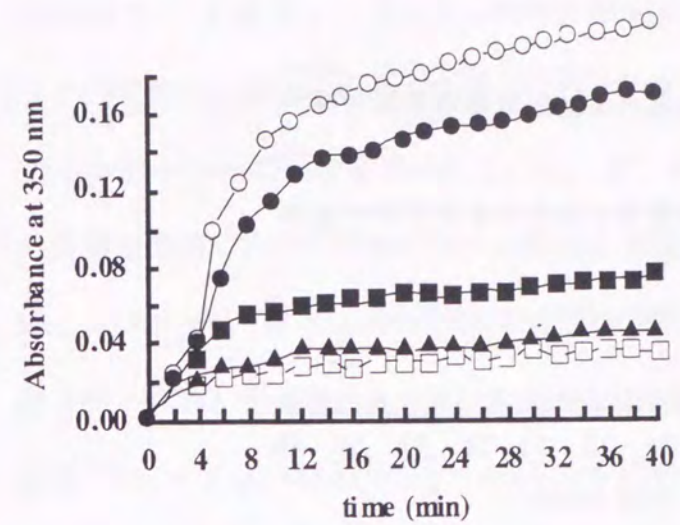


Figure 27 Effects of pironetin and its derivatives on tubulin assembly in the presence of glutamate. Time course of *in vitro* tubulin self-assembly induced by glutamate using 5 μ M tubulin with 5 μ M epoxypironetin (●), 5 μ M demethoxypironetin (■), 5 μ M pironetin (▲), 5 μ M colchicine (□), vehicle (○).

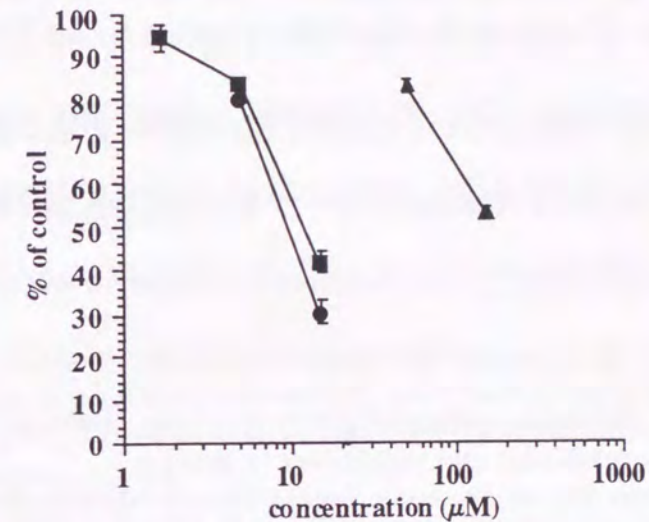


Figure 28 Effects of pironetin and its derivatives on tubulin assembly. The assay was performed as shown in Fig. 23. pironetin (■), demethylpironetin (●), epoxypironetin (▲). % of control = 100 x turbidity of control at 40 min / turbidity of treatment at 40 min. The values were means \pm S.D.

体の微小管重合に対する作用濃度と相関があることから、これら類縁体の微小管に対する作用濃度の相違はチューブリンに対する作用の相違に起因するものと考えられる。また、この類縁体間の作用濃度の相違は細胞レベルのアッセイにおいても観察されたことから、細胞内においても pironetin の標的分子がチューブリンであることが示唆された。さらに、非生理的チューブリン重合促進剤である paclitaxel によるチューブリン重合も pironetin は阻害していた (Fig. 29)。TPS-A は paclitaxel に

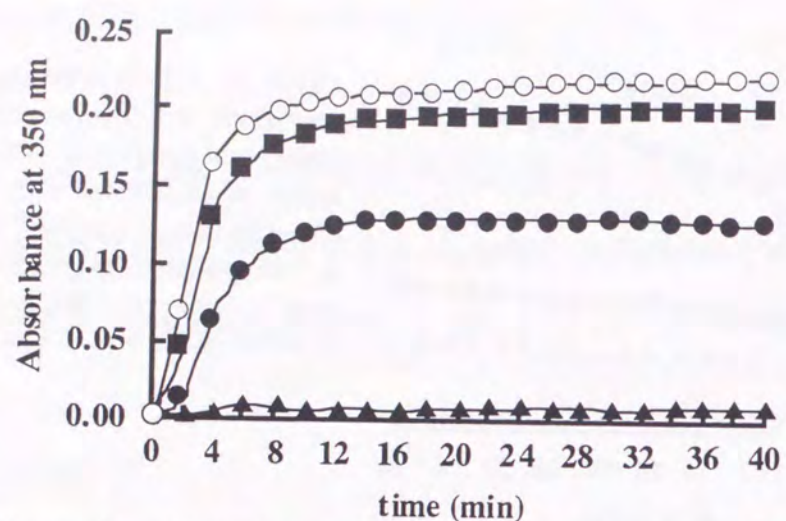


Figure 29 Effect of pironetin on the assembly of tubulin by paclitaxel. Tubulin proteins ($10 \mu\text{M}$) were incubated with paclitaxel ($10 \mu\text{M}$) containing vehicle (\circ), pironetin $10 \mu\text{M}$ (\bullet), $50 \mu\text{M}$ (\blacktriangle) and TPS-A $250 \mu\text{M}$ (\blacksquare).

よるチューブリン重合を全く阻害しないことから、pironetin の微小管に対する作用機構は前述の微小管結合タンパク質依存的チューブリン重合阻害薬 TPS-A とは異なる可能性が示唆された。そこで次に、 ^3H colchicine、 ^3H vinblastine を用いてチ

Table 8 Inhibitory effects of pironetin on the binding of colchicine and vinblastine to tubulin

The reaction mixture (0.35 ml) containing 0.5 mg/ml (approx. $5 \mu\text{M}$) tubulin, 50 nM ^3H -colchicine or ^3H -vinblastine, 5%(v/v) DMSO and $50 \mu\text{M}$ mitotic inhibitor, was incubated for 5 min at room temperature. Aliquots (0.1 ml) were applied to triplicate columns of sephadex G-50 and processed by centrifugal gel filtration.

Drug	^3H -colchicine	^3H -vinblastine
	% of control	
colchicine	49.0	150.0
vinblastine	139.3	63.1
pironetin	148.4	59.3

ューブリン結合サイトの検索を行った。チューブリン上の colchicine、vinblastine 結合サイトは β -チューブリン上にあり、colchicine は vinblastine、vinblastine

は colchicine のチューブリンへの結合を促進することが知られている[3]。実際、我々の実験系においても cold の vinblastine は ^3H vinblastine の結合を阻害し ^3H colchicine の結合を促進していた。また cold の colchicine は ^3H colchicine の結合を抑制し ^3H vinblastine の結合を促進していた (Table 8)。本実験系において、pironetin は vinblastine の結合を阻害するとともに colchicine の結合を促進 (約 148%) するという vinblastine と同様の性質を示したことから、pironetin は β -チューブリン分子上の vinblastine 結合サイトもしくはその近傍に作用することによってチューブリン重合を阻害しているものと推察された。そこで次に表面プラズモン共鳴法を用いた解析により pironetin とチューブリン分子との相互作用の検討を行った。いずれの薬剤も解離速度定数 (K_{diss}) には大きな相違は観察されなかったが、結合速度定数 (K_{ass}) は pironetin は $2.0 \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$ 、vinblastine は $4.2 \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$ であり、チューブリンに対する結合力は pironetin の方が

Table 9 Kinetic constants for mitotic inhibitors of tubulin

The apparent dissociation constant (K_d) was calculated using the relationship, $K_d = K_{\text{diss}}/K_{\text{ass}}$. The rate constants were determined from sensorgram curves using kinetic evaluation software.

Drug	Surface plasmon resonance measurement		
	$K_d \text{ (M)}$	$K_{\text{ass}} \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$	$K_{\text{diss}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Pironetin	3.3×10^{-7}	2.0×10^4	6.8×10^{-3}
Vinblastine	1.5×10^{-6}	4.2×10^3	6.4×10^{-3}
Tryprostatin A	1.1×10^{-3}	5.3×10^0	6.0×10^{-3}

vinblastine よりも強いと考えられる。また解離定数 (K_d) は、pironetin が $3.3 \times 10^{-7} \text{ (M)}$ 、vinblastine が $1.5 \times 10^{-6} \text{ (M)}$ であり、チューブリンとの親和力も pironetin の方が vinblastine よりも強固であると推察される。一方、TPS-A の K_d は vinblastine、pironetin と比較して 3~4 オーダー高く、TPS-A とチューブリンと

の相互作用が極めて弱いことが示唆された (Table 9)。このことから TPS-A による微小管重合阻害の IC_{50} 値の高さ (250 μ M 以上) が TPS-A のチューブリンに対する親和力の強度に起因するものと推察される。

第三節 小括

Pironetin は植物の生長抑制活性を指標に放線菌より単離された化合物であり、類縁体として 3 種の化合物 pironetin、demethylpironetin、epoxypironetin が単離・合成されている [84-86]。過去の報告で pironetin は免疫抑制活性を有することが報告されていたが、細胞周期に対する作用については未だに報告が無かった [87]。我々は tsFT210 細胞を用いた細胞周期阻害剤のスクリーニングの結果、pironetin が細胞分裂阻害活性を有することを見出した。そこで pironetin をバイオプローブとして応用する第一歩として本薬剤の細胞周期停止作用機構を検討した。

細胞周期阻害活性を見いだした tsFT210 細胞のスクリーニング系は G2/M 期同調培養系である。そこでまず pironetin の細胞周期阻害点が G2/M 期に限定されるものであるかどうかを検討する目的で、ラット正常繊維芽細胞 3Y1 の非同調培養系に pironetin 添加したところ、3 種の pironetin 類縁体のいずれも濃度依存的な細胞周期停止活性を有していた (Table 7)。また、early S 期同調系においても同様の結果が得られた (data not shown)。このことから、pironetin の細胞周期停止点は G2/M 期に限定されることが分かった。核の形態観察をしたところ、核膜は消失し染色体凝縮が見られたことから、pironetin 類は M 期で細胞周期を停止していると考えられる (Fig. 21)。また類縁体間で活性は異なり、demethylpironetin は pironetin とほぼ同等の、epoxypironetin は約 1/10 程度の M 期停止活性を有していた。M 期阻害剤である vinblastine や paclitaxel の作用点は分裂装置の主要構成

成分のチューブリンであり、pironetin もこれらの薬剤と同様に M 期阻害活性を示すことから、pironetin 類の作用点が微小管である可能性が高い。そこで pironetin 類の微小管に対する作用を細胞レベルで検討したところ、pironetin 添加により濃度依存的に細胞の微小管ネットワークの消失が誘導された (Fig. 22、23)。このことから、pironetin の細胞周期停止作用は微小管の脱重合作用によるものであると考えられる。また pironetin による *in situ* 脱重合作用は、細胞を培地で洗浄して薬剤を除去してから微小管ネットワークの再構成が観察されるまでかなりの時間が必要であったことから pironetin 直接の作用は不可逆的である可能性が高い。

細胞を用いた検討から pironetin 類が微小管に作用している可能性が示唆された。そこで牛脳から精製した微小管タンパク質を用いて微小管重合系に対する直接的な影響を調べたところ、細胞への作用と同様に pironetin は濃度依存的な重合阻害活性を示した (Fig. 25)。類縁体間で微小管重合阻害活性を比較すると、pironetin と demethylpironetin はほぼ同程度の脱重合活性を示したが epoxypironetin は約 1/10 の活性しか示さなかった。次に、チューブリンに対する直接的な作用を微小管タンパク質から精製したチューブリンを用いたグルタミン酸重合系により検討したところ、微小管重合同様、チューブリン重合も阻害し、pironetin、demethylpironetin、epoxypironetin の IC_{50} 値はそれぞれ約 10 μ M、10 μ M、100 μ M 以上であった。チューブリン単独の重合系においても epoxypironetin が他の 2 種より阻害活性が低かったことから、類縁体間での細胞周期停止作用の相違は類縁体のチューブリンに対する作用の相違に起因している可能性が示唆された (Fig. 28)。 $[^3H]$ colchicine、 $[^3H]$ vinblastine を用いて β -チューブリンに対する結合を検討したところ pironetin は vinblastine と同様、vinblastine のチューブリンに対する結合を阻害し、colchicine の結合を促進していた。この結果から pironetin はチューブリンに直接作用することによって vinblastine と同じ様式でチューブリン重合

を阻害していることが示唆された。さらに表面プラズモン共鳴法によりチューブリンに対する親和力を調べたところ、pironetin は vinblastine よりもチューブリンに対する親和力が強いことが示された (Table 9)。β-チューブリン上の *vinca* alkaloid 結合部位は、細胞内在性のチューブリン重合因子である交換性ヌクレオチドの結合部位であり、チューブリンの機能発現に重要な役割を担っていると考えられている [88]。現在までに *vinca* alkaloid 結合サイトに作用する微小管作用薬として、*vinca* alkaloid 以外に maytansine [89]、rhizoxin [59]、dolastatin 10 [90]、phomopsin A [91] 等が単離されているがいずれの薬剤も複数のキラル中心を有する複雑な構造であり、β-チューブリンとの分子認識機構については未だその詳細は明らかとなっていない。一方、pironetin はアルキル鎖とラクトン環から成り既存の *vinca* alkaloid 部位作用薬の中で最も構造が単純である。今後種々の類縁体合成に伴う構造活性相関の解析を通して、pironetin がチューブリンの機能発現機構解明に対する有効なバイオプローブとなるものと期待される。

第四章 Pironetin の抗腫瘍効果

細胞周期を標的とする抗がん剤は現在のところ DNA 合成期 (S 期) と分裂期 (M 期) を作用点としているものが主流である。とりわけ M 期は、核膜が消失し細胞内において染色体がむき出しになる時期であり放射線や DNA アルキル化剤に対する感受性が高くなる。このため M 期阻害剤単独療法ばかりでなく、放射線療法やシスプラチンなどとの併用療法などの応用も行われている [92, 93]。現在までに vinblastine、paclitaxel、rhizoxin などのチューブリン作用薬が抗がん剤として利用されており、細胞周期 M 期停止剤は抗がん剤としての応用が期待される [91]。前章において pironetin が低濃度でチューブリンに作用し、細胞周期を M 期で停止させることを明らかにした。抗がん剤として利用されている M 期阻害剤は構造が複雑であるのに対し、pironetin はラクトン環とアルキル鎖から成り、既存のチューブリン作用薬と比較して非常にシンプルな構造を有していることから、M 期作用性新規抗がん剤のリード化合物となり得るものと期待される。そこで本章では、pironetin の抗腫瘍効果を *in vitro*、*in vivo* において検討した。

第一節 Pironetin の抗腫瘍効果

前章の結果より pironetin は nM オーダーの低濃度で細胞周期停止活性を示すことを明らかにした。既存の抗がん剤には分裂期に作用するものが多いことから本薬剤も抗がん剤としての応用が期待される。そこで本節では、まず pironetin の抗腫瘍効果を細胞レベルで検討し、さらにその上でマウスを用いた腹水癌モデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果を併せて検討した。

[実験材料と方法]

[*in vitro* 抗腫瘍効果]

薬剤は DMSO に溶解した。

ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞、ヒト子宮癌 A2780 細胞、ラット腎臓形質転換細胞 K-NRK 細胞を用いた。

細胞を 96 well に 2×10^4 cells/well 播種し、一晩培養後、各濃度の pironetin を添加しさらに三日間培養した。その後、定法に従い MTT アッセイを行い細胞生存率を測定した[78]。

[*in vivo* 抗腫瘍効果]

マウス白血病 P388 細胞を 1×10^5 cells、CDF₁-SLC マウス（雌、10 週齢）腹腔内に播種した。播種後 5 日間毎日腹腔内に各濃度の薬剤を投与して、pironetin の抗腫瘍効果を検討した。抗腫瘍効果の評価は、 $100 \times$ （薬剤処理マウスの平均生存日数/無処理群の生存日数）で行った。マウスの体重は、薬剤投与日と投与後 9 日目で比較した。

[結果及び考察]

Pironetin の各種がん細胞に対する作用を比較したところ、いずれの細胞に対しても IC₅₀ 値は約 10 ng/ml であり細胞レベルにおいて顕著な殺細胞作用を有していた (Fig. 30)。M 期阻害剤は癌化学療法においても多く用いられており、pironetin も細胞レベルで顕著な抗腫瘍活性を有していることから抗がん剤としての応用が期待される。そこで次に、マウス白血病細胞 P388 を用いたマウス腹水癌モデルにおいて pironetin の抗腫瘍効果を検討したところ、pironetin 6.3 mg/kg、5 日間投与によって若干の抗腫瘍効果が観察された (T/C 値 128%)。しかしながら、副作用として顕著な体重減少が観察されたことから (Table 10)、pironetin そのものを抗

がん剤として応用することは困難であるものと推察される。

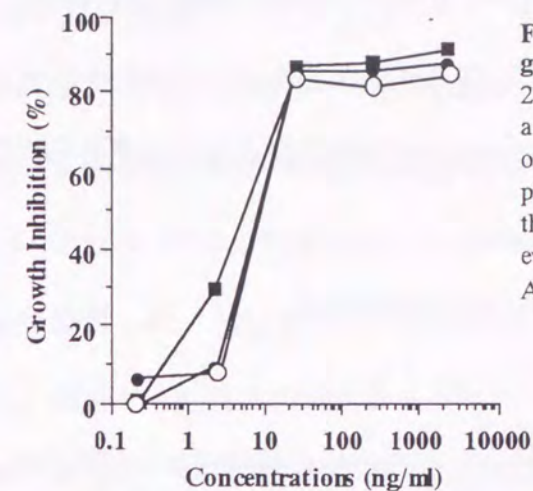


Figure 30 Effects of pironetin on the growth of various cell lines.

2×10^4 cells were seeded in each well of a 96-well plate. Various concentrations of pironetin were then added and the plate was incubated for 3 days. And then Viability of tumor cells was evaluated by MTT assay. HeLa (○), A2780 (●), K-NRK (■)

Table 10 The antitumor activity of pironetin against P388 cells *in vivo*

Compound	Dose (mg/kg)	Body weight change (g)	Mean survival (days)	T / C (%)
control	0.00	5.30	11.2 ± 0.84	100
pironetin	0.78	3.70	11.7 ± 0.58	104
	1.56	0.50	11.7 ± 0.58	104
	3.13	-0.07	13.3 ± 1.15	119
	6.25	-2.60	14.3 ± 0.58	128

Approximately 1×10^5 cells of murine leukemia cell line P388 were given by intraperitoneal injection to CDF₁-SLC mice (10 weeks, female) on day 0. Pironetin was administered intraperitoneal daily for 5 days beginning on day 1. For the evaluation of antitumor activity against P388, treated/control (T/C) (%) values (median survival days of treatment/mean survival of control $\times 100$) was calculated. Each mouse was weighed on day 1 and 10, and mortality was monitored. The T/C values greater than 125% were considered to be significant according to the criteria of National Cancer Institute.

Pironetin はラクトン環とアルキル鎖からなり、vinblastine、paclitaxel などの既存の微小管作用性抗がん剤と比べてはるかに単純な構造を有している。これら

の薬剤は副作用を有しているものの構造が複雑なために、作用副作用分離につながる構造活性相関については未だ十分な検討がなされていない。今後、pironetin の構造的な利点を生かし、構造活性相関に関する研究が進展すれば、pironetin をリード化合物とした新規微小管作用性の抗がん剤の開発が期待できるものと考えられる。

第二節 ヒト白血病細胞 HL60 細胞における殺細胞効果

前節において pironetin の抗がん剤としての応用の可能性が示唆された。そこで、本節では pironetin の抗腫瘍効果について解析を試みた。Paclitaxel、vinblastine はがん細胞に対してアポトーシスを誘導することが知られている[95]。そこでまず、pironetin のアポトーシス誘導能をマウス白血病細胞 P388 およびヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いて検討した。細胞は恒常性の維持が不能になると、異常を感知するセンサー系、異常を伝達する伝達系、異常に対して反応を起こす誘導系の三つのシステムが機能し、アポトーシスを誘導すると考えられている[4]。微小管ネットワークに対するセンサー系としてはアポトーシス抑制因子である Bcl-2 が機能していると考えられている[96]。bcl-2 遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫に高頻度で見られる t(14;18)(q32;q21) 転座点近傍に位置する癌遺伝子として、辻本らによって発見されたがん遺伝子であり、Vaux らにより Bcl-2 のアポトーシス抑制機構が報告されて以降、放射線や抗がん剤など多くのアポトーシスを誘導する系において Bcl-2 のアポトーシス抑制作用が示されてきた[97, 98]。1997 年 Halder らによって微小管ネットワークの監視機構に Bcl-2 が関与していることが示唆され、微小管ネットワークの機能が阻害されると Bcl-2 はリン酸化を受けて不活性化型となりアポトーシスが誘導されることが考えられている[96, 99, 100]。Pironetin は微小管ネットワークを消失する活性を有していたことから、pironetin のアポトーシス誘導能と Bcl-2 のリ

ン酸化の相関を併せて検討した。

[実験材料及び方法]

[Pironetin によるアポトーシス誘導]

マウス白血病 P388 細胞及びヒト前骨髄性白血病 HL60 細胞は RPMI 1640 10% FCS で培養した。Pironetin の殺細胞効果は MTT アッセイにより検討した。細胞を 1×10^5 cells/well 播種し、各薬剤を各濃度添加し、添加 24 時間後の細胞の生存率を MTT アッセイにより評価した。薬剤のアポトーシス誘導能は DNA 断片化を指標に検討した。細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、10 mM EDTA、0.5% SDS (w/v) and 0.1% RNase A (w/v)) を添加し、50°C、60 分間インキュベートした。その後、1 mg/ml proteinase K を添加しさらに 50°C、60 分間反応した。その後、DNA を抽出し 1.8% (w/v) アガロース電気泳動を行い、泳動後エチジウムブロマイド染色により DNA の断片化を検出した。

[Pironetin のアポトーシス誘導機構]

Pironetin に対して感受性の高かった HL60 細胞を用いて検討を行った。Pironetin (33 nM) 添加後、経時的に細胞を回収し、細胞溶解液 (14.5 mM KCl、5 mM MgCl₂、10 mM HEPES (pH 7.2)、1 mM EGTA、0.2% NP40、proteinase inhibitor cocktail) を添加後、超音波処理、4°C、15,000 x g、10 分間遠心を行い可溶性画分を得た。この可溶性画分を 12.5% SDS-PAGE 電気泳動後、定法に従い PVDF 膜にブロッティングした。5% スキムミルク/T-TBS (0.05% Tween-20, 20 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.9% NaCl) でブロッキング後、一次抗体として抗 Bcl-2 抗体 (DAKO)、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体を反応させ、化学発光 (Super Signal Substrate: Pierce) により Bcl-2 タンパク質を検出した。また、

リン酸化 Bcl-2 タンパク質は移動度の相違によって検出した。

[結果及び考察]

Pironetin の P388 細胞に対するアポトーシス誘導能を検討したところ、1 μ M 以上の処理でアポトーシスが誘導されていた (Fig. 31)。このアポトーシス誘導

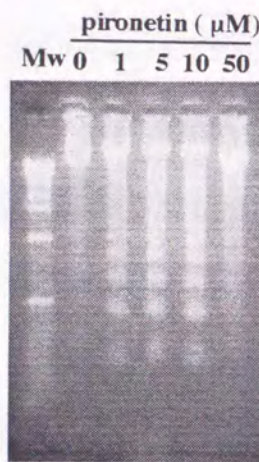


Figure 31 The electrophoresed genomic DNA of the pironetin-treated P388 cells for 24 h at the indicated concentration

を HL60 細胞を用いてさらに詳細に検討したところ、33 nM 以上の濃度で DNA 断片化を誘導しており、MTT アッセイの結果と相関があった (Fig. 32)。このことから pironetin も vinblastine、paclitaxel と同様に抗腫瘍効果発現にはアポトーシスの誘導が強く関与している可能性が示唆された。

次に、pironetin 33 nM 添加後のアポトーシス誘導能を検討したところ、6 時間目から Bcl-2 のリン酸化バンドが DNA 断片化に先だって検出され、9 時間目以降に DNA の断片化が観察された (Fig. 33)。vinblastine および paclitaxel 処理によっても同様の傾向が観察されたことから、pironetin の抗腫瘍効果の一部は Bcl-2 のリン酸化に伴うアポトーシスの誘導によるものであると推察される。

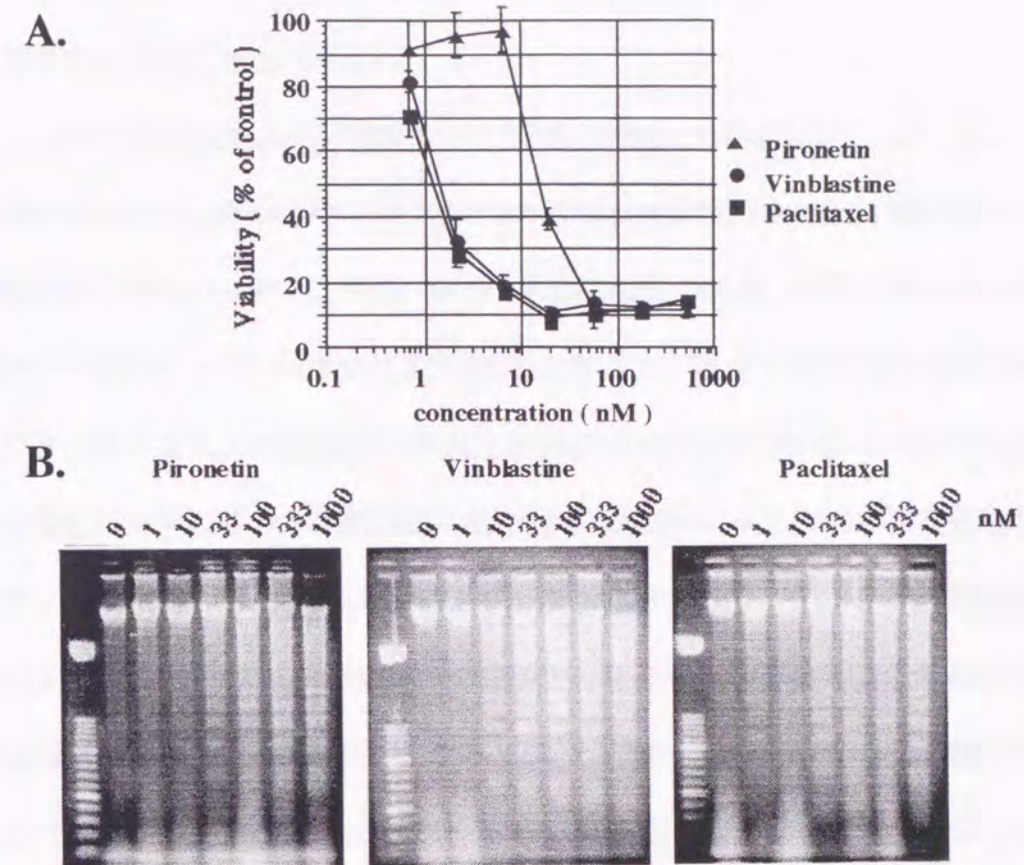


Figure 32 Effect of Pironetin on the viability and the induction of apoptosis of HL-60 cells
A ; The viability of the cells treated with various drugs for 24 h using MTT assay.
B ; The electrophoresed genomic DNA of the drug-treated cells for 18 h .

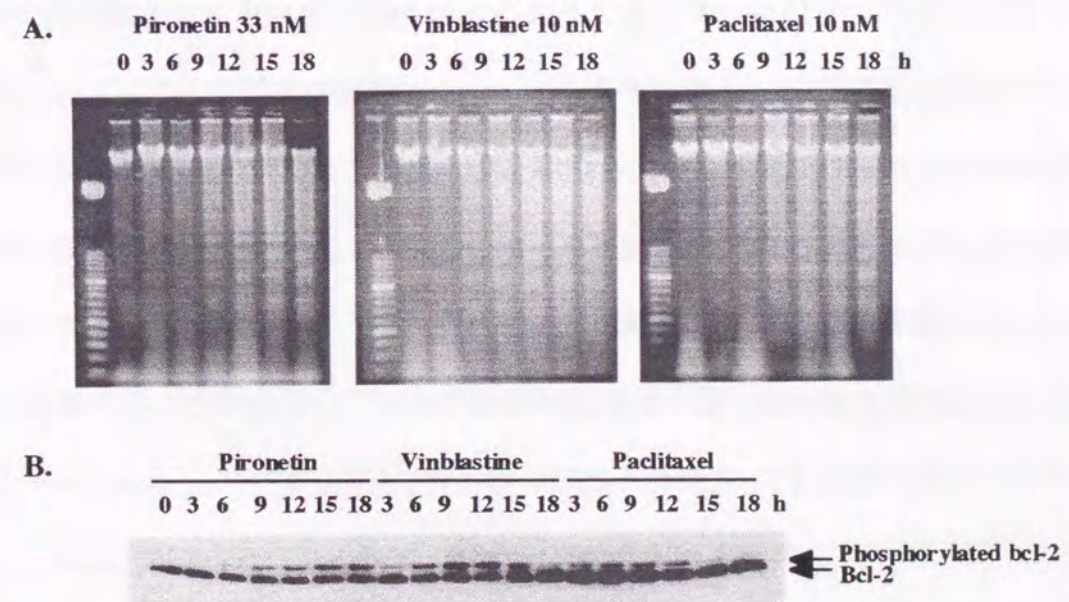


Figure 33 The results of Western analyses of Bcl-2 in Drug-treated HL-60 cells
A ; The electrophoresed genomic DNA from the drug-treated cells.
B ; The results of western blot analysis of Bcl-2 on the drug-treated cells.

本章では、pironetin の抗がん剤としての応用に関する基礎的検討を行った。既存の抗がん剤には、*vinca* alkaloid、paclitaxel、rhizoxin 等の種々の微小管作用薬が用いられている。前章において pironetin はチューブリンに作用して細胞周期を M 期で停止させる活性を有していることが示唆された。ラクトン環とアルキル鎖からなる pironetin は、既存の微小管作用薬と比較して構造的に大きく異なることから、微小管作用薬の新規リード化合物としての応用が期待される。そこでまず pironetin の抗腫瘍効果を細胞レベルで検討したところ、HeLa、A2470、K-NRK、P388 そして HL60 細胞において nM オーダーで殺細胞効果を示した。P388 細胞を用いたマウス腹水癌モデルでは、6.25 mg/kg/day の 5 日間投与で T/C = 128% の抗腫瘍作用を有していた。しかしながら副作用によると思われる体重減少が観察されたことから、本薬剤の臨床応用に際しては、より副作用の少ない類縁体の開発等のさらなる検討が必要であると考えられる。Vinblastine、paclitaxel はがん細胞に対してアポトーシスを誘導することが知られている。そこで pironetin のマウス白血病細胞 P388 およびヒト白血病細胞 HL60 に対するアポトーシス誘導能を検討したところ、両細胞に対し nM オーダーでアポトーシスを誘導した。またこのアポトーシス誘導と MTT アッセイによる細胞毒性の間に相関があったことから、pironetin の殺細胞効果はアポトーシスの誘導に起因する可能性が示唆された。そこでこのアポトーシス誘導に関してさらなる解析を試みた。微小管の監視機構を担っている分子としてアポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 が知られている[96]。Vinblastine、paclitaxel 処理細胞では Bcl-2 がリン酸化され不活性型になり、アポトーシス抑制能が消失しアポトーシスが誘導されることが考えられている。Pironetin 処理した細胞においても Bcl-2 のリン酸化が生じており、このリン酸化が DNA 断片化に先だって生じていたこと

から pironetin のアポトーシス誘導は vinblastine 等と同様に Bcl-2 の不活性化によって誘導されることが示唆された。

Pironetin はマウスを用いた検討で、体重減少といった副作用を示していたものの、化合物の構造的特徴及びがん細胞に対して低濃度でアポトーシスを誘導したことから新規抗がん剤のリード化合物としての展開が期待される。また、Bcl-2 のリン酸化が観察されたことから微小管ネットワークとアポトーシスとの相関を探る為の有用なバイオプローブになると考えられる。現在 Bcl-2 のリン酸化とアポトーシスについては諸説入り乱れており未だ定説は得られていない。Ling らは Bcl-2 のリン酸化がアポトーシスの抑制作用に必要であると報告しているが[101]、この現象については Bcl-2 をリン酸化する酵素の同定が必要であり、この点についても本薬剤は有用なツールになると考えられる。

生命現象解明の方法論の視点から生命科学の歴史を紐解くと四つの時代に大別できる。第一の時代は、タンパク質精製といった生化学的手法の進歩による種々のタンパク質の機能解析による生命現象の解明であった。そして1980年代に入るとDNAテクノロジーや組み換えDNA技術の飛躍的な進歩により第二の時代に入り、遺伝子テクノロジーを駆使した研究が展開され、免疫学などを始めとした広範に渡る領域において矢継ぎ早に細胞の生理機能が解明されていった。しかしながら、個体という60兆個の細胞が有機的に連動し合う精巧緻密なモデルを再現する系にはほど遠いものであった。そして第三の時代では、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの開発によって、個体レベルで特定の遺伝子発現を調節することが可能となり、細胞および組織の有機的な集合体である個体を用いて単一タンパク質の機能を解析することが可能となった。しかしながら、これとても intact 状態を反映しているかどうかについては議論の別れるところである。さらに、現在では第四の時代が到来している。これはチップテクノロジーと言われる数千単位の遺伝子の発現を一網打尽に解析する技術の開発に端を発した時代であり、この手法を用いることにより必要なときに必要な場所の遺伝子発現を数千の単位で有機的に解析することが可能となった。

しかしながら、これら分子生物学を駆使した手法は、特殊な機械が必要な点やその手技が煩雑であり、そのうえ細胞種そして動物種ごとに新たな細胞や動物を作成しなくていけないなど種々の問題点がある。これに対し阻害剤を生命現象解明の探索針（バイオプローブ）として利用する研究は、遺伝子操作等の煩雑な手法を用いることなく、単に細胞培養液中に添加もしくは個体に投与することによって、細胞種そして個体種を越えて解析できるという他の手法では類を見ない有利な特徴を有している。さらに、標的とする細胞機能や生理現象に対するバイオアッセイ系を構築することに

より合目的な阻害剤のスクリーニングが可能であり、現在でも多種多様なスクリーニング系が構築され阻害剤の探索がなされている。これらバイオプローブは、研究の有用なツールとしてばかりでなく医薬品として開発されていくものもあり、基礎臨床両面において多大な貢献を果たしている。

この様な背景のもと、本研究室では細胞周期阻害剤のバイオアッセイ系による種々の細胞周期阻害剤を単離してきた。本論文では tsFT210 細胞を用いた G2/M 期阻害剤探索系により単離された M 期阻害剤について、その阻害機構の解析を試みた。既存の細胞周期 M 期阻害剤は、微小管を標的としているものが大半を占め、生命現象解明のバイオプローブとしてばかりでなく抗がん剤としても応用されている。しかしながらこれらの薬剤は構造的な複雑さや作用メカニズムの多様性といった点において未だ充分であるとは言い難く、新規微小管作用薬の開発が待望されている。本論文において新規微小管作用薬であることを明らかとした tryprostatin 類や pironetin 類は既知の微小管作用薬には無い特徴を有している。Tryprostatin A は微小管結合タンパク質依存的なチューブリン重合を阻害する活性を有しており、近年アルツハイマー病との関与が取りざたされている微小管結合タンパク質の生理機能を解明する有用なバイオプローブと成る可能性がある。また、tryprostatin は類縁体間で *in vitro* 微小管重合系に対する作用が相反する化合物が存在した。この様な性質を具備する阻害剤は未だ同定されておらず、今後、合成研究の進展に伴って構造活性相関が解明されれば、微小管の生理機能解明のツールとしての応用が期待できる。Pironetin はβチューブリンの *vinca* alkaloid 結合部位に作用する薬剤としては最も単純な構造を有しており、またその活性も強いものであった。さらに pironetin は抗腫瘍活性を有しており、がん細胞に対しアポトーシスを誘導していた。この時、微小管機能の監視機構を担う Bcl-2 が不活性化されていたことから本薬剤は医薬品としてばかりでなく、Bcl-2 の機能を探るバイオプローブとしての応用が期待できる。

微小管タンパク質は細胞分裂時には分裂装置としてその機能を発揮し、間期の細胞においては分泌タンパク質の輸送や細胞内小器官の局在を決定することから「時間と場」の両面を司る器官であると言える。しかしながら、この性質故に遺伝子破壊等の方策によっては直ちに致死となってしまう分子生物学的手法を用いた解析の進展は余り期待できないのが現状である。現在までに種々の微小管作用薬が単離されているものの、構造や作用機構の面において多様性は未だ十分であるとは言い難く、新規骨格、新規作用機構を有する阻害剤の開発が望まれている。本研究では新規微小管作用薬としての基礎情報の収集を試みてきたが標的部位及び構造活性相関を同定するには至っていない。この点で本論文は萌芽的な研究であると言えるものの、現在行われている種々の類縁体合成により本薬剤に関してさらに詳細な作用機構の解析され、本研究を端緒として新たな微小管機能調節物質の開発並びに細胞機能の解明が期待される。

結論

新規細胞周期阻害剤 tryprostatin 類及び pironetin 類の細胞周期停止作用の解析を通じて以下の結論が得られた。

- 1) *Aspergillus fumigatus* BM939 株が産生する tryprostatin A が、微小管の脱重合を通じて細胞周期を M 期で停止させることが明らかになった。さらに微小管重合の再構成系を構築して作用機構の解析を試みたところ、tryprostatin A は種々の非生理的重合促進因子を用いたチューブリン重合系においては阻害作用を示さず、微小管結合タンパク質依存的チューブリン重合のみを特異的に阻害した。このことから、tryprostatin A は天然物由来の化合物としては初めての微小管結合タンパク質依存的チューブリン重合阻害剤であることを明らかにした。
- 2) *Aspergillus fumigatus* BM939 株が産生する tryprostatin A、B 及び cyclotryprostatin A-D を用いて細胞に対する作用を検討したところ、細胞毒性低減にはインドール環部分に存在するメトキシ基が重要であることが分かった。
- 3) Cyclotryprostatin D は *in vitro* 微小管重合系において微小管の過重合を誘導した。既存の微小管作用薬には類縁体間で微小管に対して脱重合と過重合という相反する作用を示す薬剤は存在しないことから、本 tryprostatin 類は類縁体間で微小管重合に対して相反する作用を有する初めての薬剤であることが分かった。このことから、本薬剤は微小管機能に対する有用なバイオプローブとなるものと期待される。
- 4) Pironetin が微小管の脱重合を通じて細胞周期を M 期で停止させること、さ

らにこの微小管脱重合作用は *vinca alkaloid* 結合部位作用性のものであることが分かった。Pironetin は *vinca alkaloid* 様の作用を示す薬剤としては構造が最も単純な薬剤でありバイオプローブ及び医薬品のリード化合物としての応用が期待される。

5) Pironetin はマウス腹水癌モデルにおいて抗腫瘍効果が観察され、腫瘍細胞に対しアポトーシスを誘導した。このアポトーシス誘導に先だってアポトーシス抑制因子 Bcl-2 のリン酸化が観察されたことから、本薬剤は抗がん剤としての応用のみならず、微小管ネットワーク監視機構における Bcl-2 の関与を調べるための有用なプローブとなると考えられる。

以上、二種の新規微小管作用薬 tryprostatin 類および pironetin 類は既存の微小管作用薬には無い独自の特徴を有しており、本薬剤のバイオプローブ並びに医薬品としての応用の可能が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、大阪大学薬学部教授 真弓忠範先生にはご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜ると共に、公私に渡り終始暖かいご配慮を賜り、さらに研究に対する喜びと厳しさを御教授いただきました。ここに喪心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究に導いていただき、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました理化学研究所抗生物質研究室主任研究員 長田裕之先生に謹んで深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、昼夜益暮を問わず有益なご助言、ご指導を賜りました理化学研究所抗生物質研究室研究員 臼井健郎先生に謹んで深謝致します。併せて、種々ご助言を賜りました理化学研究所抗生物質研究室基礎科学特別研究員 大森斉先生（現松田病院医師）、理化学研究所抗生物質研究室研究員 掛谷秀明先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、tryprostatin 類縁体を単離精製していただきました理化学研究所抗生物質研究室協力研究員 Cheng-Bin Cui 先生（現北京生物医薬研究所所長）に深謝致します。併せて、pironetin を御供与頂き、さらに pironetin の抗腫瘍効果を検討していただきました日本化薬株式会社に深謝致します。また、Cdc2 温度感受性変異株 *tsFT210* 細胞を御供与下さいました理化学研究所細胞生理学研究室主任研究員、大阪大学細胞工学センター教授 花岡文雄先生に深謝致します。

さらに、細胞等種々の実験に際しまして終始ご指導およびご協力頂きました理化学研究所抗生物質研究室共同研究員 小野瀬利恵先生をはじめとした抗生物質研究室の皆様に深謝致します。

また、研究生活を送るに当たり終始温かく励まして頂いた大阪大学薬学部助教授 中川晋作先生、久保一義先生、同助手 堤康夫先生、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員 水口裕之先生、大阪大学薬学部助手 中西剛先生ならびに中川哲彦博士、角田慎一博士、今津進博士、鈴木亮修士、国澤純修士、林哲修士をはじめとした

大阪大学薬学部薬剤学講座の皆様へ深謝致します。また、研究を仲立ちして出会った友人、研究者の方々には有形無形の励ましを頂戴いたしました。ここに深謝致します。

併せて在学中に経済的援助を賜りました日本育英会、東ソー奨学会ならびに財団法人理化学研究所ジュニアリサーチアソシエイト制度に深謝致します。

最後になりましたが長い研究生生活を終始見守り続けてくれた家族に感謝致します。

参考文献

- [1] Waters, J.C., Salmon, E. (1997) *Curr. Biol.* 9, 37-43.
- [2] Hyman, A.A., Karsenti, E. (1996) *Cell* 84, 401-410.
- [3] Pereira, G., Schiebel, E. (1997) *J. Cell Sci.* 110, 295-300.
- [4] Goodson, H.V., Valetti, C., Kreis, T.E. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 18-28.
- [5] Boom, G.S., Goldstein, L.S. (1998) *J. Cell Biol.* 140, 1277-1280.
- [6] Hirokawa, N. (1998) *Science* 279, 519-526.
- [7] Gibbons, A. (1998) *Science* 280, 1524-1525.
- [8] Alonso, A.d.C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5562-5566.
- [9] Desai, A., Mitchison, T.J. (1997) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83-117.
- [10] Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., Karsenti, E. (1996) *Nature* 382, 420-425.
- [11] Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., Agard, D.A. (1995) *Nature* 378, 638-640.
- [12] Oakley, C. E., Oakley, B. R. (1989) *Nature*, 338, 662-664.
- [13] David, P. T., Erickson, H. P. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74, 5372-5376.
- [14] MacNeal, R. K., Purich, D. L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4683-4687.

- [15] Mitchison, T. J., Kirschner, M. (1984) *Nature*, 312, 237-242.
- [16] Burns, R.G., Farrell, K.W. (1996) *Trends Cell Biol.* 6, 297-303.
- [17] Hyams, J. M., Lloyd, C. W., eds. (1994) *Microtubules*. New York: Wiley-Liss. 439 pp.
- [18] Pryer, N. K., Walker, R. A., Skeen, V. P., Bournas, B. D., Soboerio, M. F., Salmon, E. D. (1992) *J. Cell Sci.*, 103, 965-976.
- [19] Drechsel, D. N., Hyman, A. A. (1992) *Mol. Biol. Cell*, 3, 1141-1154.
- [20] Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (1995) *Mol. Biol. Cell*, 6, 1887-1902.
- [21] Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., Feinstein, S.C. (1997) *Mol. Biol. Cell* 8, 353-365.
- [22] Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J. C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T. J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K., Kishimoto, T. J. *Cell Biol.* (1995) 128, 849-62.
- [23] Herzog, W., Weber, K. (1978) *Eur. J. Biochem.* 92, 1-8.
- [24] Lee, J.C., Timasheff, S.N. (1975) *Biochemistry* 14, 5183-5187.
- [25] Lewis, S.A., Wang, D., Cowan, N.J. (1988) *Science* 242, 936-939.
- [26] Marklund, U., Larsson, N., Gardin, H. M., Brattsand, G., Gullberg, M. (1996) *EMBO J.*, 15, 5290-5298.
- [27] Belmont, L. D., Mitchison, T. J. (1996) *Cell*, 84, 623-631.
- [28] Endow, S. A., Kang, S. J., Satterwhite, L. L., Rose, M. D., Skeen, V. P., Salmon, E. D. (1994) *EMBO J.*, 13, 2708-2713.
- [29] Correas, I., Diaz-Nido, J., Avila, J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15721-15728.

- [30] Brugg, B., Matus, A. (1991) *J. Cell Biol.* 114, 735-743.
- [31] Yamamoto, H., Saitoh, Y., Fukunaga, K., Nishimura, H., Miyamoto, E. (1988) *J. Neurochem.* 50, 1614-1623.
- [32] Ulitzur, N., Humbert, M., Pfeffer, S.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5084-5089.
- [33] Bai, R., Pei, X.-F., Boye, O., Getahun, Z., Grover, S., Bekisz, J., Nguyen, N.Y., Brossi, A., Hamel, E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 12639-12645.
- [34] Basusarkar, P., Chandra, S., Bhattacharyya, B. (1997) *Eur. J. Biochem.* 244, 378-383.
- [35] Bai, R., Schwartz, R.E., Kepler, J.A., Pettit, G.R., Hamel, E. (1996) *Cancer Res.* 56, 4398-4406.
- [36] Bai, R., Paull, K.D., Herald, C.L., Malspeis, L., Pettit, G.R., Hamel, E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15882-15889.
- [37] Bhattacharyya, B., Wilff, J. (1977) *FEBS Lett.* 75, 159-162.
- [38] Mandelbaum-Shavit, F., Wolpert-Defilippes, M.K., Johns, D.G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 47-54.
- [39] Takahashi, M., Iwasaki, S., Kobayashi, H., Okuda, S., Murai, T., Sato, Y. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 926, 215-223.
- [40] Mazumdar, M., Parrack, P.K., Mukhopadhyay, K., Bhattacharyya, B. (1992) *Biochemistry* 31, 6470-6474.
- [41] Horowitz, P., Prasad, V., Luduena, R.F. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14647-

14650.

- [42] Mareel, M.M., Storme, G.A., Dragonetti, C.H., Bruyne, G.K.D., Hartley-Asp, B., Segers, J.L., Rabaey, M.L. (1988) *Cancer Res.* 48, 1842-1849.
- [43] Speicher, L.A., Barone, L., Tew, K.D. (1992) *Cancer Res.* 52, 4433-4440.
- [44] Hudes, G.R., Greenberg, R., Kriegel, R.L., Fox, S., Scher, R., Litwin, S., Watts, P., Speicher, L., Tew, K.D., Comis, R. (1992) *J. Clin. Oncol.* 10, 1754-1761.
- [45] Hudes, G.R., Nathan, F.E., Khater, C., Greenberg, R., Gomella, L., Stern, C., McAleer, C. (1995) *Semin. Oncol.* 22, 41-45.
- [46] Shi, Q., Chen, K., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H. (1998) *Curr. Pharm. Des.* 4, 219-248.
- [47] Zadrozinska, J. (1979) *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 30, 433-440.
- [48] Coleman, T.R., Dunphy, W.G. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 877-882.
- [49] Osada, H., Cui, C.-B., Onose, R., Hanaoka, F. (1997) *Bioorg. Med. Chem.* 5, 193-203.
- [50] Yasuda, H., kamijo, M., Honda, R., Nakamura, M., Hanaoka, F., Ohba, Y. (1991) *Cell Struct. Funct* 16, 105-112.
- [51] Mineo, C., Murakami, Y., Ishimi, Y., Hanaoka, F., Yamada, M. (1986) *Exp. Cell Res.* 167, 53-62.
- [52] Cui, C.-B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Ubukata, M., Takahashi, I., Isono, K., Osada, H. (1995) *J. Antibiot.* 48, 1382-1384.

- [53] Cui, C.-B., Kakeya, H., Osada, H. (1996) *J. Antibiot.* 49, 527-533.
- [54] Cui, C.-B., Kakeya, H., Osada, H. (1996) *J. Antibiot.* 49, 534-540.
- [55] Cui, C.-B., Kakeya, H., Osada, H. (1996) *J. Antibiot.* 49, 832-835.
- [56] Horwitz, S.B., Parness, J., Schiff, P.B., Manfredi, J.J. (1982) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46, 219-226.
- [57] Weisenberg, R.C., Borisy, G.G., Taylor, E.W. (1968) *Biochemistry* 7, 4466-4479.
- [58] Lee, J.C., Harrison, D., Timasheff, S.N. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9276-9282.
- [59] Takahashi, M., Iwasaki, S., Kobayashi, H., Okuda, S., Murai, T., Sato, Y. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 926, 215-223.
- [60] Shelanski, M.L., Gaskin, F., Cantor, C.R. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 765-768.
- [61] Himes, R.H., Kersey, R.N., Heller-Bettinger, I., Samson, F.E. (1976) *Cancer Res.* 36, 3798-3802.
- [62] Iqbal, K., Zaidi, T., Bancher, C., Grundke-Iqbal, I. (1994) *FEBS Lett.* 349, 104-108.
- [63] Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., Feinstein, S.C. (1997) *Mol. Cell Biol.* 8, 353-365.
- [64] Hamel, E., Lin, C.M. (1984) *Biochemistry* 23, 4173-4184.
- [65] Lee, J.C., Tweedy, N., Timasheff, S.N. (1978) *Biochemistry* 17, 2783-2790.

- [66] Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B. (1979) *Nature* 277, 665-667.
- [67] Schiff, P.B., Horwitz, S.B. (1981) *Biochemistry* 20, 3247-3252.
- [68] Bhattacharyya, B., Sackett, D.L., Wolff, J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10208-10216.
- [69] Sackett, D.L., Bhattacharyya, B., Wolff, J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 43-45.
- [70] Serrano, L., Torre, J.D.L., Maccioni, R.B., Avila, J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5989-5993.
- [71] Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.-Y., Kirschner, M.W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1858-1862.
- [72] Rodionov, V.I., Gyoeva, F.K., Kuznetsov, A.S., Gelfand, V.I. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5702-5707.
- [73] Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., Downing, K.H. (1999) *Cell* 96, 79-88.
- [74] Depew, K.M., Danishefsky, S.J., Rosen, N., Sepp-Lorenzino, L. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12463-12464.
- [75] Gan, T. and Cook, J.M. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 1301-1304.
- [76] Cui, C.-B., Kakeya, H., Osada, H. (1996) *Tetrahedron* 52, 12651-12666.
- [77] Cui, C.-B., Kakeya, H., Osada, H. (1997) *Tetrahedron* 53, 59-72.
- [78] Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

- [79] Himes, R.H., Kersey, R.N., Heller-Bettinger, I., Samson, F.E. (1976) *Cancer Res.* 36, 3798-3802.
- [80] Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Lavelle, F., Goff, M.T.L., Mangatal, L., Potier, P. (1991) *J. Med. Chem.* 34, 992-998.
- [81] Bai, R., Friedman, S.J., Pettit, G.R., Hamel, E. (1992) *Biochem. Pharmacol.* 43, 2637-2645.
- [82] Cushman, M., He, H.-M., Katzenellenbogen, J.A., Lin, C.M., Hamel, E. (1995) *J. Med. Chem.* 38, 2041-2049.
- [83] Bollag, D.M., Mcquaney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., Woods, C.M. (1995) *Cancer Res.* 55, 2325-2333.
- [84] Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Harada, T., Nishide, M., Kurokawa, T., Nakagawa, T., Shimada, N. (1994) *J. Antibiot.* 47, 697-702.
- [85] Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Kurokawa, T., Nakagawa, T., Shimada, N. (1994) *J. Antibiot.* 47, 703-707.
- [86] Tsuchiya, K., Kobayashi, S., Nishikiori, T., Nakagawa, T., Tatsuta, K. (1997) *J. Antibiot.* 50, 259-260.
- [87] Yasui, K., Tamura, Y., Nakatani, T., Horibe, I., Kawada, K., Koizumi, K., Suzuki, R., Ohtani, M. (1996) *J. Antibiot.* 49, 173-180.
- [88] Correia, J.J. (1991) *Pharmacol. Ther.* 52, 127-147.
- [89] Luduena, R.F., Roach, M.C. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 498-504.
- [90] Bai, R., Pettit, G.R., Hamel, E. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 17141-17149.

- [91] Luduena, R.F., Prasad, V., Roach, M.C., Lacey, E. (1989) Arch. Biochem. Biophys. 272, 32-38.
- [92] Pectasides, D., Papadopoulou, M., Varthalitis, J., Mylonakis, A., Kostopoulou, M., Dimitriadis, M., Athanassiou, A. (1998) Oncology 55, 228-234.
- [93] Frasci, G., Panza, N., Comella, P., Carteni, G., Guida, T., Nicoletta, G.P., Natale, M., Lombardi, R., Apicella, A., Pacilio, C., Gravina, A., Lapenta, L., Comella, G. (1999) Ann. Oncol. 10, 355-358.
- [94] Bunn, P.A.J., Kelly, K. (1998) Clin. Cancer Res. 4, 1087-1100.
- [95] Geran, R.I., Greenberg, N.H., MacDonald, M.M., Schmacher, A.M., Abbot, B.J. (1972) Cancer Chemother. Rep. 3, 1-103.
- [96] Haldar, S., Basu, A., Croce, C.M. (1997) Cancer Res. 57, 229-233.
- [97] Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1984) Science 226, 1097-1099.
- [98] Vaux, D.L. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 786-789.
- [99] Haldar, S., Jena, N., Croce, C.M. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4507-4511.
- [100] Haldar, S., Chintapalli, J., Croce, C.M. (1996) Cancer Res. 56, 1253-1255.
- [101] Ling, Y.H., Yang, Y., Tornos, C., Singh, B., Perez-Soler, R. (1998) Cancer Res. 58, 3633-3640.

