



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

氏 名 ^{こん}近 ^{どう}藤 ^{ます}昌 ^お夫

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 1 5 6 2 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 12 年 5 月 31 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 新規微小管作用薬 Tryprostatin 類および Pironetin 類に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 真弓 忠範

(副査)
教 授 前田 正知 教 授 山元 弘 教 授 馬場 明道

論 文 内 容 の 要 旨

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。これに対し阻害剤を生命現象解明の探索針（バイオブローブ）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、細胞種と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る。現在までに種々の微小管作用薬が単離されてはいるものの、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えず、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。そこで本論文では、当研究室において細胞周期のM期停止作用を指標に単離された tryprostatin 類および pironetin 類についてその作用機構解析を行った。

ラット正常繊維芽細胞3Y1を用いて TPS-A、-B の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 細胞周期非特異的な細胞毒性を示した。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。さらに、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おり、重合した微小管に対しても脱重合作用を有していた。精製チューブリンを用いて結合実験を行ったところ、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た。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系を用いて検討したところ、TPS-A はこれら MAP2、tau タンパク質による重合を阻害した。一方、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。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、TPS-A は天然物由来としては初めての微小管結合タンパク質依存的なチューブリン重合阻害剤であるものと推察された。

TPS-A の類縁体、cTPS 類および sTPS 類を用いて3Y1細胞に対する作用を検討したところ、インドール環上にメトキシ基を有する cTPS-A、cTPS-B は TPS-A と同様に微小管ネットワークの消失および細胞周期をM期停止作用を有していた。これに対し、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たことから、インドール環上に存在するメトキシ基が細胞障害性において重要であると推察された。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。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た。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。現在までに、種々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。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。

Pironetin (NK) には類縁体として demethylpironetin (De-NK)、epoxypironetin (Epo-NK) が存在し、*ts* FT 210細胞を用いた細胞周期阻害剤のスクリーニングの結果、細胞分裂阻害活性を有していた。NK はラクトン環とアルキル鎖からなり、既存の微小管作用薬と比較しても単純な構造を有している。NK 類を3Y1細胞に添加したところ、3種の NK 類縁体のいずれも濃度依存的な細胞周期停止活性および微小管ネットワーク消失活性を有していた。また類縁体間で活性は異なり、De-NK は NK とほぼ同等の、Epo-NK は約1/10程度活性を有していた。さらに、微小管重合系およびチューブリン重合系を用いた検討においても同様の傾向が認められた。このことから、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。NK の β -チューブリンに対する相互作用を検討したところ、NK は 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、その親和性は vinblastine よりも約10倍強固なものであった。 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。現在までに、*vinca* alkaloid 結合サイトに作用する微小管作用薬は数多く単離されているが、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その詳細は未だ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。また、NK の腫瘍細胞に対する殺細胞効果を検討したところ、HeLa、A2470、K-NRK、P388そして HL 60細胞において nM オーダーで殺細胞効果を示した。さらに、HL60細胞を用いた検討から、この殺細胞作用は微小管の監視機構を司るアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2のリン酸化に起因するアポトーシスの誘導に依るものと推察された。

以上本研究では、新規微小管作用薬 tryprostatin 類および pironetin 類のバイオプローブとしての応用の為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決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が解析され、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。

論文審査の結果の要旨

微小管タンパク質は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っており、チューブリンはヘテロダイマーを形成し、直線状に重合してプロトフィラメントを形成している。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、有糸分裂、細胞運動など多種多様な機能を営んでいる。しかしながら、微小管タンパク質はこの様な動的不安定性を示すが故に、生理機能発現機構の解析が困難となっている。従って、微小管が関与する細胞内の複雑な生化学的諸機能を理解するためには、多数の特異的阻害剤を開発した上で、それらを有効利用することが不可欠と考えられている。なお、既存の微小管作用薬は、微小管重合阻害剤と微小管過重合剤に大別されるが、特に微小管結合タンパク質依存的な重合阻害剤は一つの報告があるのみであり、その開発が強く望まれている。

著者は、以上のような現状をふまえて、既存の微小管作用薬とは異なる性質を有する阻害剤の開発を目的に研究を進めた。その結果、以下の成果を得た。

- 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を明らかにした。
- 2) 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。
- 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ことから、本 Tryprostatin 類は類縁体間で微小管重合に関して相反する作用を有する初めての化合物であることが判明した。
- 4) さらに、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、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を明らかにした。
- 5) Pironetin は腫瘍細胞に対してアポトーシス抑制因子 Bcl-2 のリン酸化を通じて、アポトーシスを誘導することを見出した。

以上、本論文は、既存の微小管作用薬とは異なる性質を有する新たな重合阻害剤の開発に成功したものであり、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものとする。