The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Specific Inhibitors of Tyrosine-Specific Protein Kinase : Pro-perties of 4 —Hydroxycinnamamide Derivatives in vitro
Author(s)	白石, 忠義
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36928
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【13】

氏名・(本籍)	白石忠義（しらいしただよし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8734 号
学位授与の日付	平成元年5月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Specific Inhibitors of Tyrosine-Specific Protein Kinase : Properties of 4－Hydroxycinnamamide Derivatives *in vitro* （チロシンキナーゼ特異的阻害剤：4－ヒドロキシ桂皮酸アミド誘導体の*in vitro* における特性）
論文審査委員	(主査) 教授 中田 篤男 (副査) 教授 和田 博　教授 羽倉 明

論文内容の要旨

（目　的）

チロシンキナーゼ（以下TKaseと略す）は，蛋白質中のチロシン残基を特異的にリン酸化する酵素で，その活性はsrc系癌遺伝子産物や細胞増殖因子受容体等に認められ，偏平上皮癌やある種の腺癌では本酵素活性の昂進が報告されている。これらの知見は，TKaseが細胞の増殖，癌化，および分化のコントロールに深く関わっている事を示唆しているが，本酵素の生理的意義は殆ど未解明のままである。TKase阻害剤はTKaseの生理的意義の解明に役立つのみならず，制癌剤開発にも有用な情報をもたらすものと考えられる。筆者は既に，4－ヒドロキシ桂皮酸アミド骨格を有する一連の合成化合物が，ＥＧＦ受容体TKaseを強力に阻害する事を見出し報告して来た。本論文では，6種の代表化合物を用いsrc系TKaseに対する阻害作用とその機構を解明するとともに，TKaseの特性の一端を明らかにした。

（方法ならびに成績）

TKase阻害剤としては，筆者が合成したＳＴ271，280，458，633，638，および642と，対照化合物としてケルセチンを用いた。TKase阻害活性の測定は，Fsv＃9，NIH／fgr，RR1022およびNIH／3Ｔ3細胞の抽出液より抗体を用いて，それぞれp130*gag-v-fps*, p70*gag-actin-v-fgr*, pp60*v-src*, およびpp60*c-src*の免疫複合体を調製し，それに阻害剤を作用させた後［γ^{32}P］ＡＴＰを加えてリン酸化反応を行い，リン酸化された蛋白質をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離しその放射能を測定した。まず阻害剤のp70*gag-actin-v-fgr*に対する作用を検討したところ，ＳＴ280，458，633，および638が本酵素を強力に阻害し，IC_{50}はそれぞれ8.0，1.2，3.2，4.2μＭであることが明らかとなった。そこで，更に他のTKase

に対する作用を検討したところ，酵素の種類によって阻害活性の表れ方は大きく異なった。最も阻害スペクトラムが広く強い活性を示した化合物はＳＴ638で，各TKaseをＥＧＦ受容体＞pp60*v-src*, *p70gag-actin-v-fgr*＞p130*gag-v-fps*, pp60*v-src*の順で強く阻害した。pp60*v-src*とpp60*c-src*の一次構造は，高い相同性を有していることが知られているが，両酵素の活性中心の性質は，本阻害剤に対する感受性の面より見る限り，顕著に異なる事が明らかとなった。続いて，阻害作用の特異性を確認するため，ＳＴ271，638およびケルセチンをＲＲ1022細胞の細胞膜画分に作用させ，リン酸化アミノ酸組成の変化を分析した。その結果，ケルセチンがセリン残基のリン酸化も強く阻害したのに反し，ＳＴ271と638はセリン，スレオニン残基のリン酸化に影響を与えることなく，顕著にチロシン残基のリン酸化を阻害した。両化合物は極めて特異性の高いTKase阻害剤であるといえる。次に，ＳＴ638によるTKaseの阻害機構を解明するため，ＥＧＦ受容体とp130*gag-v-fps*を用いてカイネティックス解析を行った。ＳＴ638は，外部基質のリン酸化に関して，ＡＴＰとは非拮抗的に，α－カゼインとは拮抗的に阻害を示した。ＳＴ638はTKase活性中心の基質結合部位に直接作用し，基質蛋白質の結合を阻止する事によって阻害活性を発揮するものと思われる。一方，両TKaseの自己リン酸化に関し，ＳＴ638はα－カゼインと拮抗的な阻害を示さなかった。これらの結果は，ＥＧＦ受容体による外部基質のリン酸化反応と自己リン酸化反応が異なった機構によって起こっていることを示唆している。

（総　　括）

ＳＴ638に代表される４－ヒドロキシ桂皮アミド誘導体は，各種TKaseの強力で，しかも特異的な阻害剤であることが明らかとなった。また，その阻害機構は基質蛋白質との拮抗作用によると考えられる。本阻害剤を用いることにより，pp60*v-src*とpp60*c-src*の特性の違いや，TKaseによる外部基質のリン酸化反応と自己リン酸化反応の機構の相違に関し若干の知見を得ることができた。この様な特性を持つTKase阻害剤は本論文で報告した化合物が最初であり，TKaseの特性や生理的意義の解明において極めて有用であると思われる。

論文の審査結果の要旨

本論文はＳＴ638に代表される新規に合成した４－ヒドロキシ桂皮酸アミド誘導体が*in vitro*において，極めて特異性の高いチロシンキナーゼ阻害剤であり，src系の癌遺伝子産物や細胞増殖因子受容体のTKase活性を巾広く阻害し，その阻害機構は基質蛋白質との拮抗作用による事を明らかにしたものである。また，本阻害剤を用いることにより，$pp60^{v\text{-}src}$と$pp60^{c\text{-}src}$の阻害剤に対する感受性が大きく相違すること，及びチロシンキナーゼの自己リン酸化反応と外部基質のリン酸化反応が異なる機構で進行する事等，興味ある知見を見い出した。この様な特性を持つチロシンキナーゼ特異的阻害剤の発見は初めてであり，チロシンキナーゼ特性や細胞内での機能の研究に非常に有用な物質と思われる。本論文は学位論文として適切であると認められる。