

Title	Specific Inhibitors of Tyrosine-Specific Protein Kinase : Properties of 4 -Hydroxycinnamamide Derivatives in vitro
Author(s)	白石, 忠義
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/36928">http://hdl.handle.net/11094/36928</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

## 【13】

氏名・(本籍)	し 白	い 石	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 <i>in vitro</i> (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 <i>in vitro</i> 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、扁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 p130gag-v-fps, p70gag-actin-v-fgr, pp60v-src, および pp60c-src の免疫複合体を調製し、それに阻害剤を作用させた後 [ $\gamma$ <sup>32</sup>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 p70gag-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<sub>50</sub> はそれぞれ 8.0, 1.2, 3.2, 4.2  $\mu$ M 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>pp60v-src, p70gag-actin-v-fgr>p130gag-v-fps, pp60v-srcの順で強く阻害した。pp60v-srcとpp60c-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p130gag-v-fpsを用いてカイネティック解析を行った。ST638は、外部基質のリン酸化に関して、ATPとは非拮抗的に、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、pp60v-srcとpp60c-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<sup>v-src</sup>とpp60<sup>c-src</sup>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。