



| | |
|--------------|---|
| Title | 海綿由来細胞毒性ポリケタイドcallystatin Aの化学構造と生物活性 |
| Author(s) | 樋口, 浩一 |
| Citation | 大阪大学, 2000, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/41961 |
| 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

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | 樋 口 浩 一 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (薬 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 5 3 6 1 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 12 年 3 月 24 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科薬品化学専攻 |
| 学 位 論 文 名 | 海綿由来細胞毒性ポリケタイド callystatin A の化学構造と生物活性 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 小 林 資 正 (副査) 教 授 田 中 徹 明 教 授 北 泰 行 教 授 今 西 武 |

論 文 内 容 の 要 旨

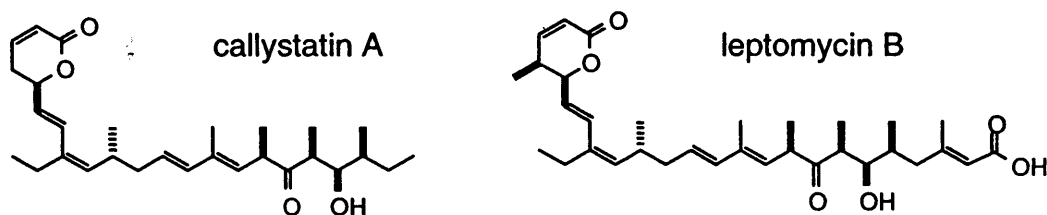
海洋生物由来の生物活性物質の探索研究の一環として、1994年長崎県五島列島で採集した海綿 *Callyspongia truncate* の抽出エキスについて、ヒト咽頭扁平上皮腫瘍細胞株 KB cells およびマウス白血病細胞株 L1210 に対する細胞毒性活性試験を行ったところ活性が認められた。そこで、細胞毒性活性試験の結果を指標に活性本体の分画精製を行った結果、callystatin A と命名した活性成分を海綿 1 kg からの収量が 1 mg という超微量活性成分として単離することに成功した。2 次元 NMR データを中心とする物理化学データの詳細な解析により、callystatin A が α 、 β -不飽和 δ -lactone、2 個の共役ジェンと β -hydroxyketone 構造を有する新規ポリケタイドであり、その平面構造を明らかにすることができた。

Callystatin A の関連化合物を検索してみると、土壌放線菌から leptomycin 類、kazusamycin 類、anguinomycin 類、および leptofuranin 類などの非常に近似した化学構造を有する抗腫瘍抗生物質が見出されていた。また、著者は海綿 *Callyspongia truncate* と全く同じ場所で採集した他属の海綿および未同定の原索動物ホヤからも細胞毒性活性試験の結果を指標に活性成分を分画精製したところ、callystatin A が活性成分として得られてきた。

一方、callystatin A と関連する土壌放線菌由来の類縁ポリケタイド類は、いずれも平面構造しか明らかにされておらず、立体構造については全く検討されていなかった。そこで著者は callystatin A の立体構造の解析に着手した。Callystatin A は 6 個の不斉炭素を有しており、その構造解析には X 線結晶構造解析が最善であると当初は考えられたが、構造解析時の単離収量が 1 mg 未満であり、直接的な結晶化はもとより化学誘導化による結晶化は困難であった。しかしながら、前述のように callystatin A は α 、 β -不飽和 δ -lactone、2 個の共役ジェンと β -hydroxyketone 構造を有するという特徴的な構造を有していることから、著者は以下の方法で立体構造解析が可能であると考えた。まず、callystatin A と類似の β -hydroxyketone 構造を有している抗生物質の報告例は数多く存在することから既知物質との NMR データの比較によりその相対立体配置の解析ができ、さらに、 β -hydroxyketone 部分の 2 級水酸基に改良 Mosher 法を適用することで β -hydroxyketone 部分の絶対立体配置が決定できると考えた。また、callystatin A の共役発色団であるエノンと 2 個のジェンはそれぞれ 5 位と 10 位の不斉炭素を介して結合している為、その CD スペクトルは 5 位と 10 位の立体配置を反映するものと考えられた。以上の考察のもと、callystatin A の立体構造の解析に着手し、既知ポリケタイド類との NMR データの比較解析や改良 Mosher 法の適用、さらには合成した model 化合物類との CD スペクトルの比較解析により、callystatin A の絶対構造を含む全立体構造を明らかにすることができた。

Callystatin A は海洋生物由来の天然物としては初めて単離された leptomycin 類縁ポリケタイドで、最も分子量が小さくかつ関連する抗腫瘍抗生物質群の中で全立体構造が解明された初めての例となった。さらに、著者が推定した化学構造をもとに当研究室で不斉全合成が達成され、絶対立体構造が正しいことが確認されている。

核蛋白質および細胞質に存在する蛋白質は核膜に存在する核膜孔複合体 NPC (nuclear pore complex) を介して核内外に輸送される。核内に存在する蛋白質が細胞質に移行するのに必要な核外移行シグナル NES (nuclear export signal) 配列を有する蛋白質は、CRM 1 (chromosome region maintenance) と呼ばれる輸送担体に結合して核から細胞質に能動輸送される機構が提唱されている。そして、callystatin A の類縁化合物である leptomycin B が NES と CRM 1 蛋白質の結合を阻害することにより蛋白質の核外移行を阻害する化合物として現在注目されている。著者は、callystatin A と leptomycin B の構造類似性に着目し、callystatin A の分子標的を確認する目的で分裂酵母や培養腫瘍細胞を用いて作用の検討を行った。その結果、急性前骨髄性白血病細胞株 HL60 に対してアポトーシス誘導作用が認められ、正常線維芽細胞 3Y 1-B を用いた細胞周期解析により細胞周期を G 1 期、G 2 期で停止させることが明らかになった。さらに癌遺伝子 H-ras で形質転換した線維芽細胞の形質を正常様に戻す作用を有していることが判明した。そして、遺伝子改変分裂酵母による蛋白質核外移行阻害実験の結果、leptomycin B と同様に callystatin A は NES 依存的蛋白質の核外移行を阻害した。さらに、ビオチン標識 leptomycin B を用いた競合阻害実験を行った結果、CRM 1 に結合して核外移行を阻害することが判明した。最近、著者が明らかにした callystatin A の立体構造をもとに leptomycin B の立体構造が合成化学的に検討され、両者が同じ立体構造を有していることが明らかにされている。



論文審査の結果の要旨

天然薬物資源から新しい生物活性物質を探索する研究は、創薬科学における先導的な役割を果たしている。また、海洋生物からの探索研究が盛んに行われ、今日、海洋生物は新しい生化学資源や医薬リード化合物の供給源として重要な研究対象となっている。

本論文では、長崎県五島列島で採集した海綿 *Callyspongia truncata* から、細胞毒性活性試験を指標に分画精製し、callystatin A と命名した新規ポリケタイド活性成分を超微量成分として単離し、NMR の詳細な解析によりその平面構造を明らかにすることができた。土壌放線菌から非常に近似した化学構造を有する抗腫瘍抗生物質群が見出されていたが、類縁ポリケタイド類はいずれも平面構造しか明らかにされていなかった。そこで、callystatin A の立体構造の解析を行い、既知ポリケタイド類との NMR データの比較解析や改良 Mosher 法の適用、さらには合成した model 化合物類との CD スペクトルの比較解析により、6 個の不斉炭素を有する callystatin A の絶対構造を含む全立体構造を明らかにすることができた。類縁ポリケタイド類の中で、callystatin A は海洋生物からは初めて単離されたポリケタイドであり、かつ全立体構造が解明された初めての例となった。

Callystatin A の類縁化合物である leptomycin B が、NES と CRM 1 蛋白質の結合を阻害することにより蛋白質の核外移行を阻害する化合物として注目されていた。そこで、callystatin A の分子標的を確認する目的で作用の検討を行い、アポトーシス誘導作用、細胞周期の G 1、G 2 期での停止作用、癌遺伝子 H-ras で形質転換した線維芽細胞の形質を正常様に戻す作用の他、leptomycin B と同様に callystatin A は CRM 1 蛋白に結合して NES 依存的蛋白質の核外移行を阻害することを明らかにしている。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。