The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	天然物由来の蛋白核内外移行阻害成分の探索
Author(s)	叶, 英
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44159
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

【21】

氏　　名	叶（ヨウ）　英（エイ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　17777　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**天然物由来の蛋白核内外移行阻害成分の探索**
論文審査委員	（主査） 教　授　小林　資正 （副査） 教　授　田中　徹明　　教　授　今西　　武　　教　授　田中　慶一

論文内容の要旨

核と細胞質の間では核膜上に存在する小孔である核膜孔を介して、物質の運搬が行われているが、最近、核膜孔を単純拡散で通過できない分子量4万以上の蛋白質や蛋白質とRNAの複合体の核－細胞質間の輸送メカニズムや輸送に関与する分子が明らかにされてきた。すなわち、蛋白質の核から細胞質への移行には核外輸送シグナル（nuclear export signal、以下NESと略す）、また細胞質から核への移行には核局在化シグナル（nuclear localization signal、以下NLSと略す）と命名されたそれぞれの特定のアミノ酸配列の存在が必要であることが見出された。さらに、NESを有する蛋白質の輸送担体の役割を果たす蛋白質としてCRM1（chromosomal region maintenance 1）が、NLSを有する蛋白の輸送担体としてimportin αおよびβが発見された。

これまでに、NESを有し輸送担体であるCRM1と複合体を形成して核外へ運ばれる数種の蛋白質が見出されており、それらの中にはガン細胞の増殖に関与するマップキナーゼキナーゼ（mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK）やエイズウイルスの増殖に必須なRev蛋白が含まれている。したがって、NES含有蛋白質の核外移行を阻害する化合物は、新規作用機序の抗癌剤、抗エイズ剤の開発に繋がることが期待される。しかしながら、NES含有蛋白の核外移行を阻害する物質としては、放線菌由来のポリケチドleptomycin Bと著者らの研究室で海綿から微量細胞毒性成分として見出したleptomycin Bと類似の構造を有するcallystatin Aが知られているにすぎない。

一方、NLSを有する蛋白質の核内への移行を阻害する成分としては、小麦胚芽由来のレクチン（WGA : wheat germ agglutinin）が唯一見出されているが、その組成は単一ではない。したがって、同様の作用を有する低分子化合物の発見は、現在、解明のほとんど進んでいない核膜孔部分の受容体蛋白を解析するためのプローブ分子になることが期待される。

このような背景のもと、著者は、天然物由来の新規蛋白質核内外移行阻害成分の探索研究に着手した。まず、NES、NLS、蛍光蛋白（green fluorescence protein, GFP）、glutathione S-transferase（GST）の融合蛋白を発現させた分裂酵母を用いるアッセイ法を確立し、各種生薬の抽出エキスをスクリーニングした。NES含有蛋白質の核外移行阻害活性の認められた生薬カノコソウおよびダイコウリョウキョウの抽出エキスから、活性を指標とする分離精製を行い、NES含有蛋白質核外移行阻害成分としてカノコソウからvaltrateを、またダイコウリョウキョウから1'-acetoxychavicol acetateを見出した。

Callystatin Aの構造活性相関研究をもとに、アビジンとの高い親和性を有するビオチンを導入したプローブ分子を

設計し、CRM1 に対する結合能を有するビオチン標識プローブを合成した。そして、合成したビオチン標識プローブを用いた競合実験を行い、valtrate および 1'-acetoxychavicol acetate が、callystatin A や leptomycin B と同様に CRM1 の 529 番目のシステイン残基に結合することにより、NES 含有蛋白質の核外移行を阻害している可能性が強いことを明らかにした。また、valtrate と 1'-acetoxychavicol acetate について、*N*-acetyl-L-cystein methyl ester 付加体を調製し、両者の活性に関与する構造部位がエポキシ部分と 1-acetoxy-2-ene 部分であることを明らかにした。さらに、valtrate および 1'-acetoxychavicol acetate は、MAPKK の高度に活性化された培養腫瘍細胞に対する選択的な細胞毒性および HIV-1 ウイルスの増殖阻害活性をした。

一方、NLS 含有蛋白質核内移行阻害成分として、トウニンから *myo*-inositol, 5S, 6R-5,6-dihydro-3,5-dihydroxy-6-hydroxymethyl-2*H*-pyran-2-one を、チンピから hesperidin をそれぞれ活性成分として単離した。3 種の活性成分は、N-アセチルグルコサミン存在下で、活性が消失することから、WGA と同様に核膜孔に存在する N-アセチルグルコサミン結合糖タンパクに作用していると考えられる。また、市販品として入手できる *myo*-inositol 以外の 6 種の inositol 類には全く NLS 含有蛋白の核内移行阻害活性が認められなかったことから、*myo*-inositol の立体構造が活性発現に重要であることも見出した。今回、著者が見出した 3 種の活性成分は、分裂酵母を用いたアッセイ系においては、WCA より遥かに低濃度で作用していることから、今後 NLS 含有蛋白の核内移行阻害が引き起こすより正確な細胞応答を観測するツールとして有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

核膜孔を単純拡散で通過できない蛋白質や蛋白質と RNA の複合体の核－細胞質間の輸送には、核外輸送シグナル（NES）および核局在化シグナル（NLS）の特定のアミノ酸配列の存在が必要であり、NES を有する蛋白質の輸送担体として CRM1 が、NLS を有する蛋白の輸送担体として importin α および β が発見されている。これまでに、NES を有し CRM1 により核外へ運ばれる蛋白質として、ガン細胞の増殖に関与する MAPKK やエイズウイルスの増殖に必須な Rev 蛋白が知られている。したがって、NES 含有蛋白質の核外移行を阻害する化合物は、新規作用機序の抗癌剤、抗エイズ剤の開発に繋がることが期待される。

著者は、NES、NLS、蛍光蛋白（GFP）の融合蛋白を発現させた分裂酵母を用いるアッセイ法を確立し、天然物由来の新規蛋白質核内外移行阻害成分を探索した。その結果、生薬カノコソウおよびダイコウリョウキョウから、新規 NES 含有蛋白質核外移行阻害成分として valtrate と 1'-acetoxychavicol acetate を同定した。

また、CRM1 に対する結合能を有するビオチン標識プローブを合成して競合実験を行った結果、valtrate および 1'-acetoxychavicol acetate が、callystatin A や leptomycin B と同様に CRM1 の 529 番目のシステイン残基に結合することにより、NES 含有蛋白質の核外移行を阻害している可能性が強いことを明らかにした。さらに、両活性物質の *N*-actyl-L-cystein methyl ester との付加体の解析から、活性発現部位がエポキシ部分と 1-acetoxy-2-ene 部分であることを示した。また、valtrate および 1'-acetoxychavicol acetate は、MAPKK が活性化された培養腫瘍細胞に対する選択的な細胞毒性および HIV-1 ウイルスの増殖阻害活性を示した。

一方、NLS 含有蛋白質核内移行阻害成分としては、トウニンから *myo*-inositol と 5S, 6R-5,6-dihydro-3,5-dihydroxy-6-hydroxymethyl-2*H*-pyran-2-one を、チンピから hesperidin をそれぞれ活性成分として見出した。また、*myo*-inositol 以外の 6 種の inositol 類には全く NLS 含有蛋白の核内移行阻害活性が認められなかったことから、*myo*-inositol の立体構造が活性発現に重要であることも見出している。今回、著者が見出した 3 種の活性成分は、WGA より逢かに低濃度で作用していることから、今後、NLS 含有蛋白の核内移行を阻害する正確なツールとして有用であると考えられる。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。