氏　　　　　名	米田耕三
学 位 の 種 類	博 士（理 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 7651 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科
学 位 論 文 題 目	

Study on the Mode of Action of Marine Natural Product Aplyronine A by Using Novel Chemical Probes
（新規ケミカルプローブを用いた海洋天然物アプリロニン A の作用機序に関する研究）

主　　査	筑波大学教授	理学博士	木越　英夫
副　　査	筑波大学教授	理学博士	関口　章
副　　査	筑波大学教授	工学博士	鍋島　達弥
副　　査	筑波大学教授	理学博士	長瀬　博

論　文　の　要　旨

Chapter 1 では研究背景として、天然物の創薬への応用における作用機序の解明の重要性や、作用機序を解析するケミカルプローブについて記述した。

Chapter 2 では様々なケミカルプローブを用いて、海洋天然物アプリロニン A (ApA) の医薬リードへの発展を目指し、作用機序の研究を行った。ApA はマクロラクトン部と側鎖構造を持つ海洋産マクロリドで、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa S3 細胞) に対する強力な増殖阻害活性と、様々な担癌モデルマウスに対する強い抗腫瘍活性を示す。また ApA はその側鎖部で細胞骨格を構成する G-アクチンと 1:1 の複合体を形成し、重合体の F-アクチンを脱重合させる。ApA の抗腫瘍活性は既存のアクチン結合性分子や、多くの抗がん剤よりも強いことから、その抗腫瘍活性の発現機構に大きな興味が持たれる。また ApA マクロラクトン部上のトリメチルセリン基を持たないアプリロニン C (ApC) は ApA と同等のアクチン脱重合活性を示すが、その細胞増殖阻害活性は約 1000 倍弱い。さらに構造活性相関研究から、ApA のマクロラクトン構造だけではアクチン脱重合活性も細胞増殖阻害活性も示さないことが報告されている。そのため、ApA の強力な抗腫瘍活性の発現において、トリメチルセリン基の作用と、側鎖部を介したアクチンとの結合の 2 つの効果が重要な役割を果たすと予想される。

そこで著者は ApA の活性発現のメカニズムにおいて 2 つの仮説を立てた。1 つ目は、マクロラクトン部のトリメチルセリン基の影響で ApA は他のアクチン結合性分子よりも多く細胞に蓄積し、より多くのアクチン分子に作用するという説、2つ目は、ApA は細胞内でアクチンと結合した後、トリメチルセリン基を介して第二標的タンパク質に作用することで活性を示すという説である。ApA と ApC のケミカルプローブを用いて、これらの仮説を検証することで、ApA の作用機序解明を目指した。

まず ApA と ApC から、蛍光基を有する蛍光プローブ ApA-FL, ApC-FL と、光反応基のジアジリン基を持つ光親和性ビオチンプローブ ApA-PB, ApC-PB を合成した。4 つのプローブはいずれも天然物の強い細胞増殖阻害活性を十分に維持しており、ApA と ApC の活性の差を反映していた。

次に、ApA と ApC の細胞内の蓄積と局在を比較するため、ApA-FL と ApC-FL を HeLa S3 細胞に加え、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメトリーで分析した。その結果、ApA-FL と ApC-FL は細胞内に短時間で取り込まれ、細胞質全体に同程度分布するが、洗浄しても細胞内から排出されなかったが、両者の間では細胞内への局在には際立った差がなかったことが明らかとなり、上記の 1 つ目の仮説は適当でないと考えられた。

そこで 2 つ目の仮説を検証するために、共同研究者と共に ApA-PB と ApC-PB を用いて標的タンパク質を生きた HeLa S3 細胞から探索した。その結果、ApA-PB を用いたときのみ、アクチンの他にチューブリンのα体とβ体が検出された。すなわち、ApA はアクチンの他に、トリメチルセリン基を介してチューブリンと相互作用すると考えられる。

チューブリンは微小管を構成するタンパク質で、有糸分裂の際に重要な紡錘体を構成するので、紡錘体や細胞周期に対する ApA の効果を調べた。ApA は 0.1 nM で紡錘体を多極化させ、1 nM で紡錘体形成を抑制した。一方、ApC は 100 nM でも紡錘体に影響しなかった。すなわち ApA のトリメチルセリン基は紡錘体の形成阻害に対しても重要な役割を示すと考えられる。さらに ApA は濃度依存的に細胞周期を G2/M 期で停止させ、1 nM で細胞内のカスパーゼ 3 を活性化してアポトーシスを誘導することを明らかにした。

Chapter 3 では ApA の標的タンパク質との分子レベルの結合位置解析に着手した。アクチン－チューブリン－ApA 三元複合体構造の解明は ApA の創薬研究や薬理学ツールへの応用に重要である。著者はアクチンやチューブリンの動的不安定性を考慮し、不安定な複合体の構造にも適用できるケミカルプローブ法を用いて ApA とタンパク質の結合様式の解明を目指した。しかし、ケミカルプローブ法にはラベル化ペプチドの精製過程における回収量の低下などの問題がある。

そこで著者はマトリックスを使用しないラベル支援レーザー脱離イオン化法による質量分析法 (label-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, LA-LDI MS) に注目した。ピレン基を持つ化合物は LA-LDI MS で選択的に検出される。よって検出基としてピレンを導入したケミカルプローブを用いてラベル化と酵素消化を行い、その後ペプチド混合物の LA-LDI MS を測定することで、ラベル化ペプチドを精製せずに選択的に検出できると考えた。本手法の有用性を評価するため、ApA のピレンプローブを用いてアクチンとの結合様式を解析し、結晶構造との比較を行うこととした。

まずピレン基とジアジリン基を含む ApA 光親和性ピレンプローブ(ApA-PP)を合成した。しかし ApA-PP は ApA のアクチン重合阻害活性を示さなかった。この理由として、疎水性の高いピレン基が非特異的にアクチンに作用することなどが考えられた。そこで親水性向上のため、ピレン基にアミド基を導入した ApA 光親和性アミドピレンプローブ(ApA-PaP)を合成した。ApA-PaP は ApA のアクチン重合阻害活性を保持していた。

次にアクチンに対する ApA-PaP の光ラベル化効率を評価するため、365 nm の紫外線を照射後、タンパク質混合物を MALDI-TOF MS で解析した。しかし複合体の分子イオンピークはほとんど検出されなかった。これはプローブがアクチンではなく、水などの溶媒分子と主に光反応したためと考えられた。

そこでラベル化効率向上のため、反応性官能基をNHSエステル基に変換したアミドピレンプローブを合成した。このNHSプローブとアクチンの混合物をMALDI-TOF MSで解析すると、プローブ－アクチン1:1複合体のイオンピークが顕著に検出され、その複合体の形成は ApA により競合阻害された。すなわち、NHS プローブは ApA と同じ位置でアクチンに特異的に結合したと考えられる。

次に、ApA－プローブ複合体をトリプシンと Glu-C で酵素消化し、得られたペプチド混合物を LA-LDI MS で解析した。その結果、アクチンの 108 番目のアラニン残基 (A108) から 116 番目のアルギニン残基 (R116) のノナペプチドにプローブが付加した化合物とその脱ケテン体の分子イオンピークが検出された。さらに、MALDI-TOF MS/MS 解析により、NHS プローブは 113 番目のリジン残基で共有結合したことがわかった。A108-R116 のアミノ酸残基は、アクチン上の ApA 側鎖部の結合位置近傍に存在するため、今回アミドピレンプローブを用いることで、ApA のアクチンへの結合位置を LA-LDI MS で解析できたことが確認された。

Chapter 4 では今後の可能性として、検出感度を改善したアミドピレンプローブ法を用いて、チューブリンを含めた三元複合体の結合様式を解明することで、ApA を医薬リードとした天然物創薬への発展を示した。

審　査　の　要　旨

〔批評〕

強力な抗腫瘍性海洋産天然物アプリロニン A はアクチンと相互作用することがわかっていたが、それのみではアプリロニン A の強力な生物活性を説明できなかったが、著者は、アプリロニン A の細胞内蓄積の程度と変化をケミカルプローブを用いて明らかにし、生物活性と細胞内蓄積の程度が関係しないことを示した。このことは、本化合物の生体反応課程を研究するための重要な知見を供給したものと評価される。また、この化合物が細胞周期を停止させ、アポトーシスを引き起こすことを見いだしたことにより、この化合物の生物活性の過程に関する理解が進んだ。さらに、アプリロニン A と生体分子の反応を解析するための新しい考え方によるケミカルプローブを開発した。この新しいケミカルプローブは、今後天然物と生体高分子の相互作用を研究するための有効なツールになるものと考えられる。

以上のように、本論文は天然物化学分野およびケミカルバイオロジー分やで高く評価される内容であり、博士論文としてふさわしい内容と評価される。

〔最終試験結果〕

平成２８年２月１０日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。