

氏 名	風見 紗弥香
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	博理工甲第 711 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	真核生物に作用する小分子化合物の作用機構解析
論文審査委員	委員長 連携教授 長田 裕之 委 員 教 授 松本 幸次 委 員 連携教授 吉田 稔 委 員 准教授 原 弘志

論文の内容の要旨

【背景および目的】

悪性新生物（がん）は現在まで約 30 年にわたって死因の第一位を占めており、その死亡者の数は年々増加の一途をたどっている。がんの治療には外科手術、放射線療法、化学療法などが単独あるいは併用して行われる。化学療法に用いられる抗がん剤はアルキル化薬、代謝拮抗薬、抗がん性抗生物質、植物アルカロイド、モノクローナル抗体などに分類されるが、いずれも細胞増殖を阻害するという特徴を有している。

細胞増殖阻害活性を有する小分子化合物は微生物、海洋生物、植物など天然資源から数多く見出され、これらは複雑な化学構造と特異的な標的分子を有しているものが多い。その標的分子や作用機構を明らかにすることはがん治療のみならず、生命現象の解明に繋がる有用なツールになると考えられるが、これらの解明は時間と経験を要する困難なステップであり、未だ標的分子や作用機構が明らかにされていない有用な化合物が数多く存在する。

本研究では、細胞増殖阻害活性を有する小分子化合物の標的分子を短期間に推測する多表現型解析システムの構築を目的として研究を行なうとともに、構築したシステムを用いて作用が未知であった小分子化合物の標的分子、結合部位および作用機構解明を試みた。

【多表現型解析システムの構築】

同様の作用を示す化合物同士は類似した表現型を示すことを利用し、複数の表現型データから標的分子を推測する「多表現型解析システム」の構築を行なった。作用既知の化合物 33 種類について標的分子の推測に繋がる細胞増殖阻害、細胞周期阻害、細胞形態変化、高分子合成阻害の表現型を取得し、データをカタログ化した。次に、作用未知の化合物、iejimalide A および B、FD-891、glaziovianin A の表現型を同様に取得し、比較することで標的分子を推測した。さらに、推測結果が実際の標的分子と一致するか、作用未知化合物の詳細な解析を行い、検証した。

【小分子化合物の作用機構解析】

－ Iejimalide A および B －

Iejimalide A および B は強い細胞増殖阻害活性を有する海産のマクロライドである。多表現型解析システムにおいて細胞周期の S 期停止、酸性小胞の消失を誘導したことから、標的分子は V-ATPase である可能性が示唆された。同時にプロテオーム解析においても標的分子は V-ATPase である可能性が示唆されたことから、V-ATPase 阻害について詳細な解析を行った。その結果、酵母 V-ATPase を *in vitro* で強く阻害したことから、標的分子が V-ATPase であり、さらに V-ATPase の部位特異的変異酵母を用いた解析により結合部位を推定することが出来た。

－ FD-891 －

FD-891 は強い細胞増殖阻害活性を有する放線菌由来のマクロライドである。多表現型解析システムにおいて細胞周期を G₂/M 期停止させ、アクチン形態変化を誘導したことから、標的分子はアクチンあるいはアクチン関連タンパク質である可能性が示唆された。また、アクチン形態変化を詳細に解析した結果、既存のアクチン阻害剤とは作用が異なると考えられた。ビオチン化体を用いた結合解析により、アクチンと相互作用する CH (Calponin-homology) ドメインを有するタンパク質を同定した。FD-891 は他の CH ドメインを有するタンパク質とアクチンとの結合も阻害したことから、標的分子はアクチンあるいは CH ドメインを有するアクチン結合タンパク質であると考えられる。

－ Glaziovianin A －

Glaziovianin A は細胞増殖阻害活性を有する植物由来のイソフラボンである。多表現型解析システムにおいて細胞周期を G₂/M 期停止させ、紡錘体形態変化を誘導したことから、標的分子はチューブリンあるいはチューブリン関連タンパク質である可能性が示唆された。精製チューブリンを用いた解析において阻害が見られたことから、標的分子がチューブリンであることが明らかとなった。

よって、以上、4 つの化合物の解析を通じ、多表現型解析システムによる解析結果と実際の標的分子は一致することが明らかとなった。

【総括】

複数の作用既知化合物の表現型データを取得し、作用未知化合物の標的分子を推測する多表現型解析システムを構築した。このシステムを基に細胞増殖阻害活性を有する作用未知化合物の標的分子を推測した結果、1 週間のうちに標的分子を推測することが可能となった。また、詳細な解析を行った結果、これらの標的分子は推測結果と一致した。よって、このシステムがこれまで困難であった標的分子解析の有用なツールとなることが示された。

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査会は、平成 21 年 2 月 18 日（水）に埼玉大学理学部 3 号館にて公開の論文発表会を開催し、引き続き学位論文および発表内容について審議した。審査結果の概要は以下の通りである。

本論文は、動物細胞に増殖阻害活性を示す薬剤の作用機作、細胞内標的を明らかにするための手法を確立し、その有効性を示す研究結果に関するものである。

第 1 章では序論および研究目的について述べた。

悪性新生物（がん）は、現在まで約 30 年にわたって我が国の死因第一位であり、さらに増加の一途をたどっている。従って、これまでに見出されていない画期的な治療標的や治療薬の開発が望まれる。風見氏はがん化学療法に用いられる薬剤がいずれも細胞増殖を阻害する特徴を有していることに着目し、細胞増殖阻害活性を有する小分子化合物の標的分子を早期に明らかにすることを目的として研究を行なった。

第 2 章では多表現型解析システムの構築について述べた。

細胞増殖機構を阻害する化合物はがん治療や生命現象の解明に繋がる有用なツールになると考えられるので、その化合物と標的分子の相互作用を理解することは重要である。化合物の標的分子を同定するためには、まず、その化合物が細胞に対してどのような作用機作を有しているのか見出す必要がある。しかし、標的分子の推測に繋がる表現型を得るためには複数の表現型解析が必要であり、また、表現型を解釈して標的分子を解明するためには研究者独自の経験が必要なことから、一般的に困難である。そこで、同様の作用を示す化合物同士は類似した表現型を示すことを利用し、複数の表現型データから標的分子を推測する「多表現型解析システム」の構築を行なった。すなわち、作用既知の化合物 33 種類について標的分子の推測に繋がる細胞増殖阻害、細胞周期阻害、細胞形態変化、高分子合成阻害の表現型を取得し、データをカタログ化した。

第 3 章では小分子化合物の作用機構解析について述べた。

作用が未知である小分子化合物 iejimalide A および B、FD-891、glaziovianin A について多表現型解析システムと同様に表現型を取得し、比較することで標的分子を推測した。さらに、推測結果が実際の標的分子と一致するか、作用未知化合物の詳細な解析を行い、検証した。

Iejimalide A および B は強い細胞増殖阻害活性を有する海産のマクロライドである。多表現型解析システムにおいて細胞周期の S 期停止、酸性小胞の消失を誘導したことから、標的分子は V-ATPase である可能性が示唆された。V-ATPase 阻害について詳細な解析を行った結果、酵母 V-ATPase を *in vitro* で強く阻害したことから、標的分子が V-ATPase であることが明らかとなった。

FD-891 は強い細胞増殖阻害活性を有する放線菌由来のマクロライドである。多表現型解析システムにおいて細胞周期を G₂/M 期停止させ、アクチン形態変化を誘導したことから、アクチン重合阻害剤、アクチン重合安定化剤もしくはキナーゼ阻害剤である可能性が示唆された。さらに、アクチン骨格の形態変化を比較して標的分子を絞り込んだ結果、標的分子はアクチンあるいはアクチン関連タンパク質である可能性が示唆された。FD-891 処理による細胞内アクチン形態変化の過程を詳細に解析した結果、アクチンを直接標的とする既存のアクチン阻害剤とは異なり、膜骨格系などを介して間接的に作用する可能性が考えられた。そこで、膜骨格タンパク質とアクチンとの相互作用に FD-891 が影響を与えるか検討したところ、FD-891 処理によりこれらの結合が阻害された。よって、標的分子はアクチンあるいはアクチン結合タンパク質であるこ

とが強く示唆された。

Glaziovianin A は細胞増殖阻害活性を有する植物由来のイソフラボンである。多表現型解析システムにおいて細胞周期を G₂/M 期停止させ、紡錘体形態変化を誘導したことから、トポイソメラーゼ II 阻害剤もしくはチューブリン阻害剤である可能性が示唆された。さらに、紡錘体および染色体の形態変化を比較して標的分子を絞り込んだ結果、標的分子はチューブリンあるいはチューブリン関連タンパク質である可能性が示唆された。そこで、精製チューブリンを用いて解析を行った結果、チューブリン重合の阻害が見られたことから標的分子がチューブリンであることが示唆された。

第 4 章では総括について述べた。

複数の作用既知化合物の表現型データを取得し、作用未知化合物の標的分子を推測する多表現型解析システムを構築した。このシステムを基に細胞増殖阻害活性を有する 4 つの作用未知化合物の標的分子を推測した結果、1 週間のうちに標的分子を推測することが可能となった。また、詳細な解析を行った結果、多表現型解析システムによる解析結果と実際の標的分子は一致することが明らかとなった。よって、このシステムがこれまで困難であった標的分子解析の有用なツールとなることが示された。

以上、本論文においては標的分子・作用機構が不明な化合物の標的分子を推測するシステムの構築、およびシステムを利用して化合物の標的分子を解明した点で新しい知見を得ており、博士学位論文として十分な内容を含んでいる。本研究は Biosci Biotechnol Biochem. 誌に筆頭著者論文として、Bioorg Med Chem Lett. 誌に共著者論文として報告されている。以上のことから、本審査委員会は風見氏の研究成果は、学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格とした。