

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏 名 升岡 優太

指導教官 早川 洋一

論文題目

微生物が生産する転写活性化物質に関する研究

近年、動物細胞における生物応答シグナルの解明が進むにつれ、増殖抑制シグナルの転写制御と癌化の関係が注目されつつある。例えば、増殖抑制性の成長因子である TGF- β (transforming growth factor- β) は、転写因子 Smad を介して PAI-1 など種々の遺伝子の転写を活性化するが、多くの癌細胞において TGF- β 下流のシグナル伝達の低下が認められている。従って TGF- β 応答性遺伝子の転写を活性化する物質は癌細胞に対して増殖抑制作用を示すことが期待される。

一方、真核細胞の転写はヒストンのアセチル化状態によって制御されているが、ヒストンの脱アセチル化を担うヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の阻害剤が *p21^{WAF1}* など様々な遺伝子の転写を活性化することが知られている。HDAC 阻害剤は癌細胞に対して細胞周期停止やアポトーシスを誘導することから、新しいタイプの制癌剤として注目されている。

このように TGF- β 様活性物質や HDAC 阻害剤は、転写活性化を介して抗腫瘍作用を示すことが期待され、転写制御機構を解析する分子プローブとしても有用であると考えられる。そこでこのような転写活性化物質の検出法として、TGF- β や HDAC 阻害剤によって効率よく誘導される PAI-1 遺伝子のプロモーターを利用したリポーターアッセイに着目し、微生物代謝産物を中心とした天然物から転写活性化物質の探索を試みた。

1. Diheteropeptin および phoenistatin に関する研究

PAI-1 遺伝子プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したコンストラクトを有するミンク肺上皮 Mv1Lu 細胞を用いて、ルシフェラーゼ産生を発光法で検出することにより転写

活性化物質の探索を行った。その結果、鹿児島県屋久島の土壌より分離した糸状菌 *Diheterospora chlamydospora* Q58044 株の培養液から、新規活性物質を単離し *diheteropeptin* と命名した。

Diheteropeptin の分子式は高分解能 FAB マススペクトルにより $C_{28}H_{42}N_4O_6$ と決定した。構造解析は主に NMR を用いた各種機器分析により行い、4 残基のアミノ酸を有する環状テトラペプチドであることが明らかになった。本物質の絶対立体配置の解析は、*diheteropeptin* 生産菌から多量に得られ、*diheteropeptin* に変換可能な類縁体 TAN-1746 を用いて行った。Pro と Phe は、加水分解物の解析によりそれぞれ *R* 体、*S* 体であることが判明した。2-Amino-8,9-dihydroxydecanoic acid (Add) 残基中の1,2-ジオールの絶対立体配置は、NOE 解析で相対立体配置を決定した後、*dibenzoate* 誘導体を調製し CD スペクトル解析を行うことにより *R,R* であると決定した。最後に残った Add の α -メチンの立体配置は、ルテニウム酸化後、加水分解して得られた α -アミノスベリン酸の比旋光度から *S* と決定した。

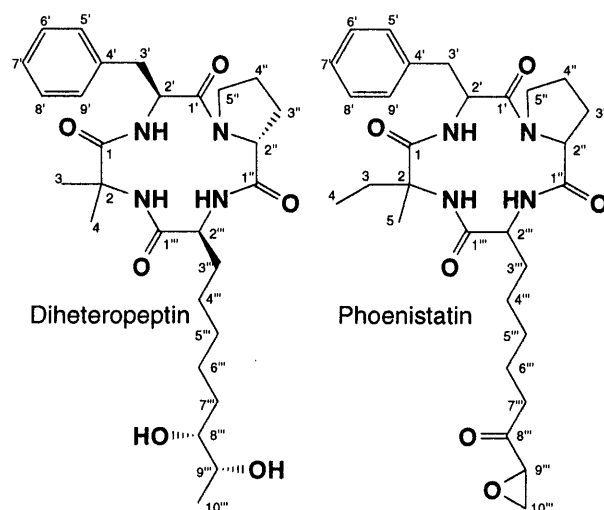


図 1. *Diheteropeptin* および *phoenistatin* の構造

Diheteropeptin と同様な活性を示す新規構造類縁体として小笠原諸島父島の枯れ木より分離した糸状菌 *Acremonium fujigerum* QN5320 株より *phoenistatin* を単離した。

Phoenistatin の分子式は高分解能 FAB マススペクトルにより $C_{29}H_{40}N_4O_6$ と決定した。COSY および HMBC 解析により *phoenistatin* は *diheteropeptin* と同様に 4 残基のアミノ酸を有する環状テトラペプチドであることが判明した (図 1)。しかし構成アミノ酸は *diheteropeptin* とは若干異なり、2-amino-8-oxo-9,10-epoxydecanoic acid 残基および *isovaline* 残基を含んでいた。

本系で用いた *Mv1Lu* 細胞において *diheteropeptin* および *phoenistatin* は *PAI-1* プロモーターを強く活性化し、その作用濃度範囲はそれぞれ $0.98 \mu\text{M} \sim 1000 \mu\text{M}$ 、 $3 \text{ nM} \sim 1000 \mu\text{M}$ であった。また両化合物は *Mv1Lu* 細胞に対して細胞障害を示さずに、それぞれ IC_{50} 値 $20 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ で細胞増殖を抑制した。一方、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害活性を検討したところ、両

化合物とも顕著な HDAC 阻害活性を示し、TGF- β シグナルではなく HDAC 阻害を介した転写調節物質であることが判明した。

2. Spiruchostatin A および B に関する研究

さらにスクリーニングを継続した結果、長野県北佐久郡望月町の土壌より分離した細菌 *Pseudomonas* sp. Q71576 株の培養液から新規活性物質を見出し、spiruchostatin A および B と命名した。

Spiruchostatin A および B の分子式は、高分解能 FAB-MS によりそれぞれ $C_{20}H_{31}N_3O_6S_2$ および $C_{21}H_{33}N_3O_6S_2$ と決定し、B の分子式は A よりメチレンが 1 個多いものと判明した。また両化合物とも、チオグリセロールを添加した FAB-MS において、2 マス大きい分子イオンピークが観測され、分子内にジスルフィド結合を有することが示された。Spiruchostatin A の平面構造は、COSY スペクトルの解析により 4 つの部分構造を決定し、部分構造間の結合関係を HMBC スペクトル解析により決定することによって明らかにした。Spiruchostatin A は図 2 に示すようなジスルフィド結合を有する 2 環性のデプシペプチドであった。Spiruchostatin B も同様の解析により spiruchostatin A のイソプロピル側鎖が *sec*-ブチル側鎖に置換した構造であることが判明した。両者のオレフィン炭素の幾何異性はスピン結合定数より *E* 配置であると決定した。

次に spiruchostatin B の絶対立体配置の決定を行った。まず spiruchostatin B を過酸処理した後に加水分解を行い、得られたアラニンとシステイン酸を光学異性体が分離可能な溶媒系を用いて ODS-HPLC で分析し、それぞれ *R* 体、*S* 体であることを明らかにした。次に 3''位の立体を明らかにするため、spiruchostatin B をオゾン酸化し、カルボン酸に変換した後、加水分解してリンゴ酸を得た。これを HPLC にてリンゴ酸標品と比較した結果、*S* 体であることが判明した。3''位のアルコールの絶対立体配置については、改良 Mosher 法により *S* と決定した。最後に残ったアルキル側鎖の立体配置は NOE および 1H - 1H 、 ^{13}C - 1H カップリングを解析することにより 4''*R*、5''*S* と決定した。

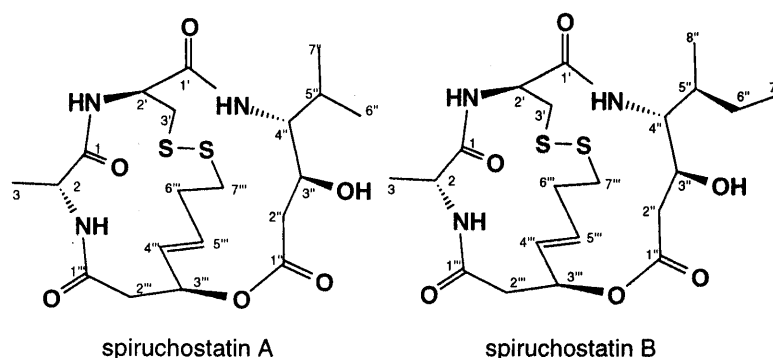


図 2. Spiruchostatin A および B の構造

本系で用いた Mv1Lu 細胞における、spiruchostatin の効果を検討した。Spiruchostatin A および B はすでに HDAC 阻害剤として知られている trichostatin A (TSA) と比較して約 10 倍低い濃度でルシフェラーゼ生産を誘導した (A: 7 nM~100 μ M, B: 3 nM~65 μ M)。しかしながらルシフェラーゼ活性の最大値は TSA よりも低い値を示した。Spiruchostatin は細胞障害を示さず、Mv1Lu 細胞の増殖を A、B それぞれ IC₅₀ 値 15 nM、6.1 nM という低濃度で抑制した。また HDAC 阻害活性について検討した結果、両化合物ともに強い HDAC 阻害活性を有していることが明らかとなった。

さらに HeLa 細胞を用いて、spiruchostatin A および B の細胞周期に対する効果をフローサイトメトリーにより検討した。HeLa 細胞を 100 nM の spiruchostatin A または B で処理し、propidium iodide で核染色を行い細胞周期を観察したところ、両化合物ともに G1、G2 期停止を誘導することが明らかとなった。

次にこの細胞周期停止が TSA 同様にサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質である p16^{INK4A} および p21^{WAF1} の発現によるものであるかを検討するため、spiruchostatin 添加による両タンパクの発現を観察した。その結果 p16^{INK4A} および p21^{WAF1} の発現上昇が確認されたことから、spiruchostatin はこれら細胞周期阻害タンパク質の発現によって細胞周期停止を誘導することが示唆された。

HeLa 細胞を spiruchostatin で処理すると形態変化が認められる。TSA は HeLa 細胞においてアクチンフィラメント調節タンパク質ゲルゾリンを発現させ、アクチンフィラメントの伸長と共に細胞形態変化を引き起こすことが報告されている。そこで HeLa 細胞を用いて、ゲルゾリンの発現およびアクチンフィラメントの観察を行った。その結果、spiruchostatin で処理した細胞は、処理後 24 時間でゲルゾリンの発現が認められ、アクチンフィラメントの伸長も確認された。

HDAC は転写を制御する重要な酵素であることから、近年新しい HDAC のクローニングや結合タンパクの解析が盛んに行われている。ヒトの HDAC は現在までに 8 種がクローニングされているが、そのうち組織全般で発現が見られる HDAC1 を対象に検討を行った。Spiruchostatin は既知の HDAC 阻害剤と異なり、化学修飾可能な水酸基を有している。低分子化合物により標的タンパク質をスクリーニングする場合には、biotin 化した化合物をプローブとして利用する方法が有効である。そこで spiruchostatin B を用いて、2 種の biotin 化誘導体を合成した。また、HDAC1 の純度および回収率を上げるため、TEV プロテアーゼで切り出すことが可能な TAP タグをつないだ HDAC1 を調製した。次に微量分子の相互作用を検出可能な BIAcore を用いて、spiruchostatin B と HDAC1 との分子間相互作用の解析を試みた。その結果、biotin 化 spiruchostatin B と HDAC1 との結合は極めて微弱であったが、biotin 化していない spiruchostatin B には HDAC1 との特異的な結合が観測された。また DTT 存在下でも結合の強さに顕著な変化は見られなかったことから、ジスルフィド結合の開裂は spiruchostatin の活性発現に関与していない可能性が示唆された。