

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 12 年度博士課程入学
氏 名 富川泰次郎
指導教官 早川 洋一

論文題目

癌遺伝子導入細胞に対して 選択的に作用する新規抗腫瘍物質の研究

1. 序論

癌化は、癌遺伝子の活性化を含む複数の遺伝子変異により成立する。癌遺伝子はその多くが細胞周期の制御に関わっているが、こうした細胞周期を制御する癌関連遺伝子の中に、アポトーシスに関与するものが報告されている。代表的な癌遺伝子である *myc*、*E2F*、*cdc25A*、アデノウイルス E1A などは、細胞周期を G1 期から S 期に進行させる役割を担うだけでなく、細胞に対してアポトーシス感受性を増大させる。特に E2F は S 期に働く遺伝子のプロモーター領域に結合し、DNA 合成関連遺伝子の発現を正に制御していることから、すべての増殖の盛んな細胞において共通に活性化していると考えられる。しかし、同時に E2F は p53 の安定化に寄与する p19^{ARF} の発現を促進し、細胞のアポトーシス感受性を増大させる。正常細胞では E2F は RB 蛋白質によって負に制御されているが、多くの癌細胞で RB 蛋白質の機能失活が認められている。したがって、癌細胞に共通して E2F の脱制御が存在すると考えられ、このような癌細胞ではアポトーシス感受性が増大していることが予想される。

一方で、癌細胞はアポトーシスを抑制するシステムをも有している。癌抑制遺伝子 *p53* はヒト癌において最も高頻度に変異が観察される癌関連遺伝子であるが、細胞周期を制御するだけでなく、DNA 損傷に伴いアポトーシスを誘導することが知られている。これは遺伝情報に損傷を受けた不必要な細胞を排除する癌抑制機構であると考え

られる。多くの癌細胞では RB の失活とともに p53 の機能の消失が起こっており、アポトーシス感受性の亢進とともにアポトーシス抑制機構を獲得していると考えられる。

ヒトパピローマウイルスは子宮頸癌の発癌に深く関わっている DNA ウイルスであるが、ヒトパピローマウイルス 16 型の E7 癌遺伝子産物はアデノウイルスの E1A と同様、癌抑制遺伝子産物である RB 蛋白質と結合してこれを不活性化する。また、同じヒトパピローマウイルス 16 型の E6 癌遺伝子産物は p53 と結合し、その分解を促進する。したがって、これらの癌遺伝子を細胞に導入することにより、アポトーシス誘導と抑制機構のモデルを構築することができる。そこで、本研究では、癌細胞に対して選択的に作用する新しい抗癌剤の発見とアポトーシスの制御機構の解明をめざして、微生物代謝産物を対象として、ヒトパピローマウイルス癌遺伝子導入細胞に対して選択的なアポトーシス誘導物質の探索を試みた。

2. QN5727 の単離精製と構造解析

ヒトパピローマウイルスの E6 および E7 癌遺伝子を導入したラットグリア細胞に対して選択的に細胞死を誘導する抗腫瘍物質の探索を行った結果、土壌より分離した細菌 *Pseudomonas* sp. QN05727 株の培養液から新規活性物質 QN5727 を見いだした。

高分解能 FAB-MS により、QN5727 の分子式は $C_{23}H_{24}N_2O_6$ と決定した。QN5727 の NMR スペクトルは室温ではブロードになるため、 $-12^{\circ}C$ の低温条件下で測定した。その結果、互いに類似した二組のピークが 1 : 1 の積分比で観測され、これは同一の平面構造を持つ二つの化合物に由来することが示唆された。片方の化合物について構造解析を行ったところ、COSY スペクトル解析により 3 つの部分構造 (C-4~C-6、C-8~C-18、C-20~C-22) が判明し、これらの繋がりには HMBC スペクトル解析によって明らかになった。22 位の炭素の化学シフトと分子式から、残った窒素原子が 22 位に結合してイミン構造をとることが判明した。2 位にカルボニル炭素が結合することと窒素原子にメトキシル基が結合することは、HMBC スペクトルにおける 4-結合の遠距離スピン結合から明らかになった。15 位のオキシメチンプロトンとカルボニル炭素の間に遠距離スピン結合が観測されたことから、QN5727 は 12 員環マクロライドであることが判明した。オレフィンの幾何異性はスピン結合定数より 8 位と 17 位は E 配置、10 位と 20 位は Z 配置であることが示され、これは NOESY スペクトルの解析により確認した。また、メトキシル基と 22 位の間 NOE からオキシムは E 配置であると決定した。もう一方の化合物も同様の解析により、全く同一の平面構造を有していることが判明した。二つの化合物の関係は 12~16 位のスピン結合定数に差が認められたことが

ら、互いに配座異性体であることが示された。

QN5727 の相対立体配置について、NOE、 ^1H - ^1H および ^1H - ^{13}C スピン結合定数により解析した結果、図 1 に示すような立体構造が示唆された。さらに QN5727 の塩酸メタノール分解物における 13 位と 15 位の相対配置を確認することにより、QN5727 の相対立体配置を下図のように決定した。QN5727 の絶対立体配置と立体配座については現在、検討中である。

以上の結果から、QN5727 はベンゾラクトンエナミド構造を有する V-ATPase 阻害剤 Oximidine I や Lobatamide A の類縁化合物であることが判明した。

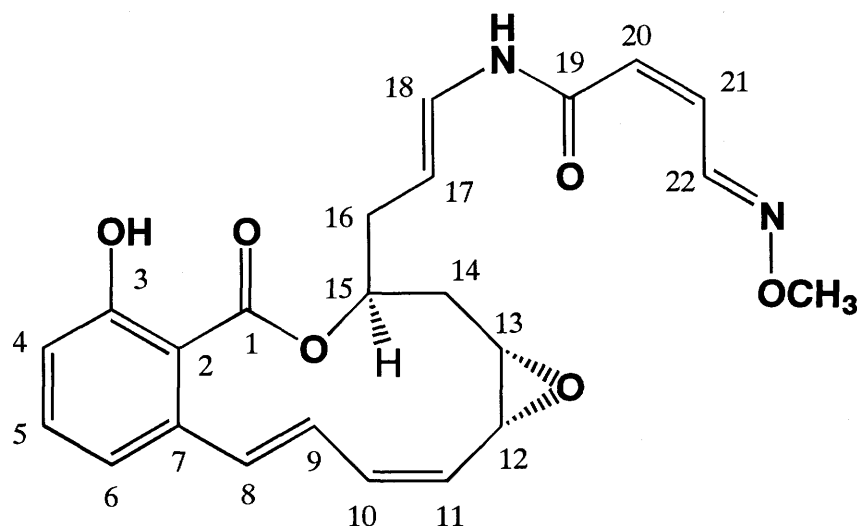


図 1. QN5727 の構造

3. QN5727 の生物活性

ヒトパピローマウイルス癌遺伝子導入ラットグリア細胞と、各種癌遺伝子により形質転換したラット 3Y1 細胞を用いて、QN5727 の活性を検討した。QN5727 はヒトパピローマウイルスの E6 および E7 遺伝子導入ラットグリア細胞に対して低濃度で (IC_{50} 4.2 nM) 細胞死を誘導した。QN5727 で処理した細胞を Heochst33258 で染色すると、クロマチンの凝縮、核の断片化が観察されたことから、QN5727 による細胞死はアポトーシスによるものであることが確認された。また、QN5727 は低濃度で、*ras* や *src* により形質転換した 3Y1 細胞の増殖を阻害した (IC_{50} *ras*-3Y1 4.5 nM、*src*-3Y1 14 nM)。しかし、これらの細胞に対する作用はウイルス癌遺伝子導入細胞に対する細胞死誘導

と異なって細胞周期停止によるものであった。一方、正常 3Y1 細胞に対する IC₅₀ 値は上記細胞と比較して、10~30 倍以上の高い値を示し (IC₅₀ 140 nM)、QN5727 がこれらの癌遺伝子を導入した細胞に対して選択的な活性を有することが示唆された。

ras 遺伝子導入 3Y1 細胞を 20 nM の QN5727 で処理すると、サイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白質である p21^{WAF1} の発現が上昇することが観察された。一方、3Y1 細胞では同濃度の QN5727 で処理しても p21^{WAF1} の発現上昇は観察されなかった。

QN5727 の V-ATPase 阻害活性について検討するため、QN5727 で処理した 3Y1 細胞をアクリジンオレンジで染色した。その結果、未処理細胞ではアクリジンオレンジにより酸性オルガネラの染色が観察されたのに対して、QN5727 で処理した 3Y1 細胞では観察されなかった。したがって、QN5727 が V-ATPase 阻害活性を有することが示された。QN5727 の V-ATPase 阻害活性と p21^{WAF1} 発現誘導、癌遺伝子の機能との関連性については現在解析中である。

4. まとめ

Pseudomonas sp.と同定した細菌の培養液から、癌遺伝子導入細胞に対して選択的にアポトーシスまたは細胞周期停止を誘導する新規ベンゾラクトンエナミド QN5727 を見いだした。QN5727 は V-ATPase 阻害活性を有し、癌遺伝子導入細胞に p21^{WAF1} の発現を誘導することが明らかとなった。QN5727 を分子プローブとして用い、V-ATPase 阻害活性に基づく癌遺伝子導入細胞に選択的な p21^{WAF1} 発現機構を解析することにより、新しい癌分子標的の解明と癌治療法の開発が期待される。