

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 朴 海龍
指導教官 早川 洋一

論文題目 分子シャペロン GRP78 の発現を抑制する物質に関する研究

小胞体 (ER) ストレス応答は、細胞にある種々のストレスが負荷され小胞体の機能が障害された際、細胞が死から逃れるための防衛機構である。そのうち最も大きな役割を担う機構は、分子シャペロンの発現によるものである。代表的なストレス応答分子シャペロンは GRP78 であるが、これは小胞体内に立体構造が異常なタンパク質が蓄積すると発現し、異常タンパク質の正常化を促進する活性を有する。

ER ストレス応答は外界からのストレスより細胞を保護する役目を果たすが、一方で多くの癌細胞が小胞体内で起こる分子シャペロンの誘導を活性化させ、薬剤耐性を獲得していることが報告されている。特に、固形癌の中心部では血管新生が十分でないため、常に低グルコース、低酸素状態になっており分子シャペロンの活性化が促進されている。したがって、ER ストレスから誘導される GRP78 の発現を阻害するような薬剤は、化学療法が困難な固形癌に対し有効な制癌剤となることが期待される。そこで、ER ストレス応答を制御する物質のスクリーニングを、約 25,000 株の微生物代謝産物について行ったところ、土壌分離放線菌 *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株から新規活性物質を単離し versipelostatin と命名した。本研究は、新

規分子シャペロン誘導阻害物質 versipelostatin に関して行ったものである。

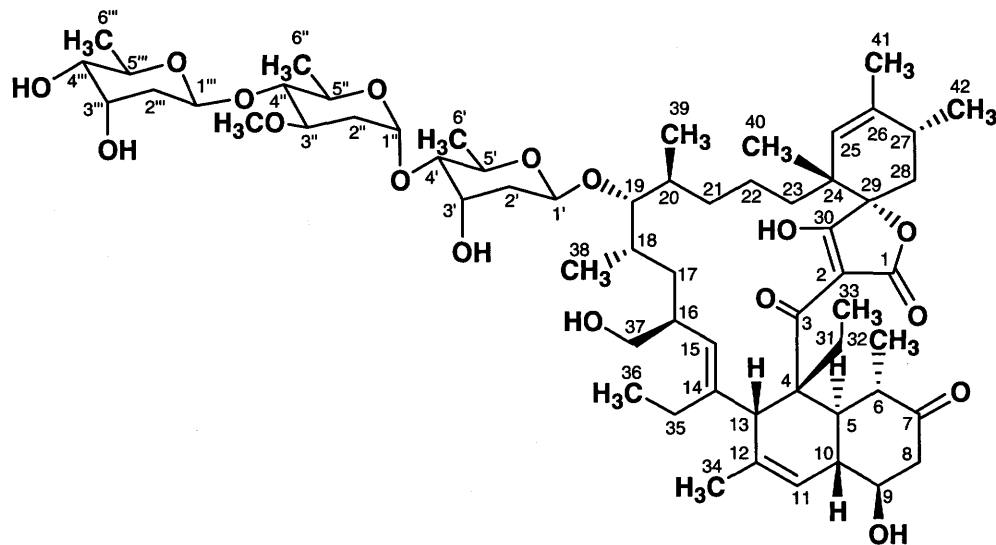


図 1. Versipelostatin の構造

1. スクリーニング法

スクリーニングは GRP78 の遺伝子転写検出法であるリポーターアッセイを用いて行った。ER ストレスによって活性化されるプロモーターである ERSE の下流に、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼを挿入したプラスミドで形質転換した HeLa 細胞 (HeLa78C6) を用いた。本細胞に、微生物代謝産物由来のサンプルおよび ER ストレス誘導物質ツニカマイシンを同時に添加し、誘導されるルシフェラーゼ活性を定量することによってサンプルの活性評価を行った。

2. 分子シャペロン誘導阻害物質 versipelostatin の単離・精製、構造決定

Versipelostatin の単離・精製は、生産菌の培養濾液を酢酸エチルにて抽出後、シリカゲルカラムおよび ODS-HPLC を用いて行い、versipelostatin を約 2 L の培地より 35 mg 単離した。

Versipelostatin の分子式は、高分解能 FAB-MS により $C_{61}H_{94}O_{17}$ と決定した。UV スペクトルにおいて 250 nm および 270 nm に特徴的な吸収が観測され、テトロン酸の存在が示唆された。COSY および HMBC スペクトルの解析の結果、3 つの部分構造と、3 分子の糖の存在を明らかにした。これらの部分構造の結合は、HMBC スペクトルにおける遠距離スピン結合を解析することにより決定した。テトロン酸部分については、分子式および各炭素の化学シフト値を類縁化合物と比較することにより明らかにした。Versipelostatin の糖部分については、各プロトン間の結合定数の解析、および 5% 塩酸メタノール処理により得られたメチル化糖の比旋光度の文献値との比較により、2 分子の D-digitoxose および 1 分子の D-cymarose と決定した。また、これらの立体化学については、NOE および 1H - ^{13}C の結合定数を解析することにより、図 1 に示すように決定した。本化合物はテトロン酸マクロライド系化合物であるが、17員環からなるテトロン酸マクロライドは versipelostatin が初めての報告例である。

3. Versipelostatin の生物活性

本スクリーニングで用いた HeLa78C6 細胞を、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツニカマイシンで処理すると小胞体ストレスが誘導されルシフェラーゼが産生される。この時、versipelostatin は、ツニカマイシンによるルシフェラーゼ産生を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は約 10 μM であった。一方、本化合物は 100 μM という高濃度においても弱い細胞毒性しか示さなかった。このように、HeLa78C6 細胞において GRP78 誘導活性を阻害することが確認されたが、次に ER ストレス応答が亢進することにより、制癌剤への薬剤耐性を獲得しているヒト大腸癌細胞 HT-29 細胞、およびヒト繊維肉腫細胞 HT1080 細胞を用いて versipelostatin の効果を検討した。HT-29 細胞におけるグルコース飢餓による分子シャペロン誘導を RT-PCR にて検討した結果、熱ショックタンパク HSP70 およびアクチンなどの発現には影響を与えず、GRP78 および GRP94 の発現を特異的に抑制することを明らかにした。また、分子シャペロンのタンパクレベルをウェスタンブロットにより検討した結果、HT-29 および HT1080 両細胞において、低濃度で GRP78 の誘導を阻害することを明らかにした(図2)。この時、ストレス負荷をかけていない状態では、GRP78 のタンパクレベルに影響を与えなかったことから、本物質は ER ストレス負荷により誘導される GRP78 の発現のみを選択的に阻害することが判明した。

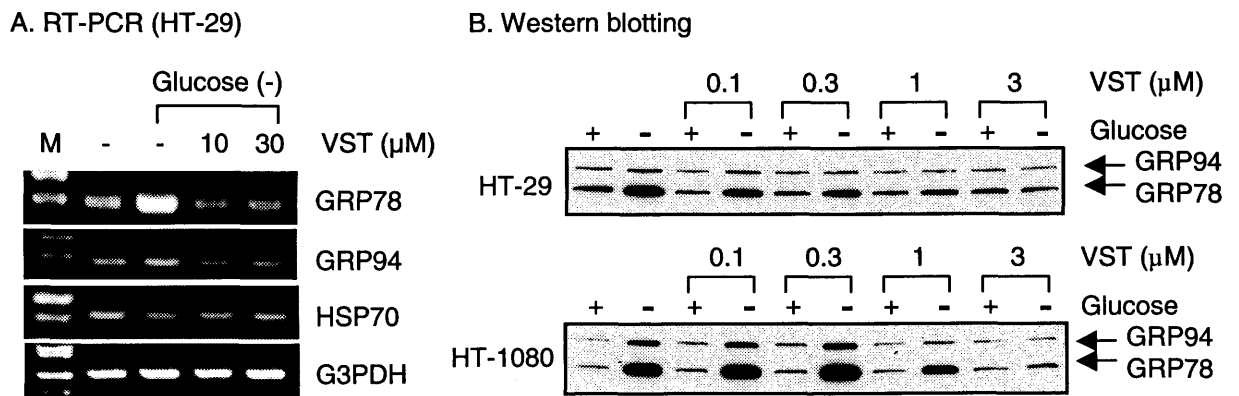


図 2. Versipelostatin のグルコース飢餓および 2-DG 誘導 GRP78 発現阻害活性

次にこの ER ストレス負荷によって誘導される GRP78 の発現を阻害することにより、癌細胞の ER ストレス感受性を回復させ細胞死を誘導するかを検討した。図に示すように ER ストレス応答が強く活性化されている HT-29 および HT1080 細胞では、グルコース飢餓あるいは 2-デオキシグルコース (2-DG) 単独処理では細胞死は誘導されない。それに対し、グルコース飢餓あるいは 2-DG 存在下 versipelostatin を同時に処理すると、顕著な細胞増殖の停止、あるいはアポトーシスが誘導されることが観察された(図3)。本結果により、細胞死抑制に働く GRP78 の誘導を特異的に阻害することにより、ER ストレスへの感受性を回復させることが確認することができた。生体内では、各正常組織は酸素およびグルコースが豊富に存在する条件下におかれているため、versipelostatin は影響を与えないと考えられる。それに対し、酸素、グルコースとも飢餓

状態にある固形癌の中心部環境は固形癌特有のものであり、versipelostatin がこのような部位で特異的に細胞死を誘導することが期待される。Versipelostatin はストレス下で誘導される分子シャペロンの発現を特異的に阻害するはじめての化合物であるが、本物質により ER ストレス応答が優れた癌分子標的の一つであることを証明することができた。今後、versipelostatin を含めたこの種の癌分子標的薬剤による固形癌治療の可能性が期待される。

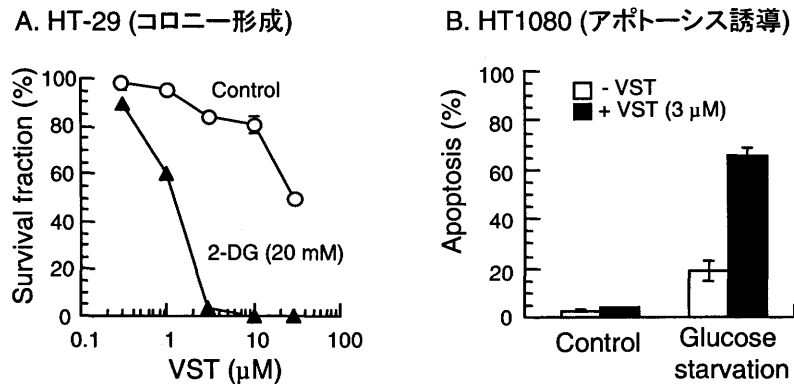


図 3. Versipelostatin による ER ストレス負荷下での細胞死誘導

4. まとめ

GRP78 誘導阻害物質の探索を行なった結果、微生物代謝産物より新規 17 員環テトロン酸マクロライド系化合物 versipelostatin を見出した。Versipelostatin は、HeLa78C6、HT-29 および HT-1080 細胞において、ER ストレスにより誘導される GRP78 の発現を特異的に抑制した。さらに、versipelostatin は癌細胞において ER ストレスへの感受性を回復させ、生体内での固形癌特有の環境モデルにおいて特異的に細胞死を誘導することを見出した。

Versipelostatin, a novel GRP78/Bip molecular chaperone down-regulator of microbial origin. H.-R. Park, K. Furihata, Y. Hayakawa, K. Shin-ya. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 6941-6945 (2002)