

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朴 海龍

本研究は、新しい抗癌剤の発見をめざして、固形癌における小胞体 (ER) ストレス応答シャペロン GRP78 の発現抑制物質の探索を行ったものであり、序論に続く 4 章からなる。

序論では、研究の背景、ならびに本研究の目的と意義について述べている。小胞体ストレス応答は、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。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。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。

第 1 章では、分子シャペロン GRP78 の発現抑制物質 versipelostatin の生産、単離、構造解析について述べている。スクリーニングは GRP78 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドで形質転換した HeLa 細胞 (HeLa78C6) を用いたりポーターアッセイにより行い、*Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株より、新規活性物質 versipelostatin を単離した。

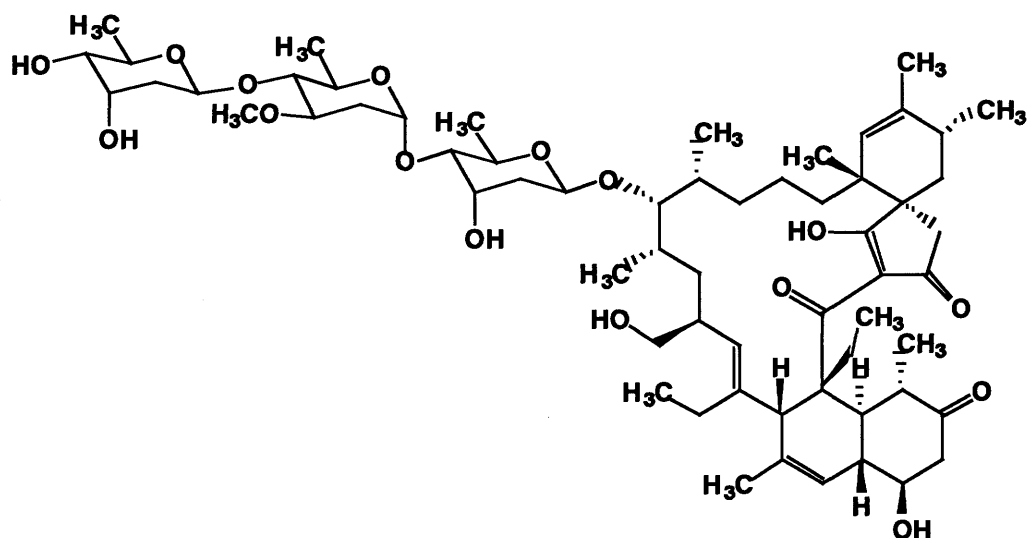


図. Versipelostatin の構造

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、UV スペクトルより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、図に示すように決定した。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。

第 2 章では versipelostatin の生物活性について述べている。本スクリーニングで用いた HeLa78C6 細胞を ER ストレス誘導物質ツニカマイシンで処理すると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。次に ER ストレス応答が亢進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。グルコース飢餓または 2-デオキシグルコース (2-DG) 処理による分子シャペロン誘導を RT-PCR および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、versipelostatin は低濃度で GRP78 の誘導を阻害することが判明した。また、グルコース飢餓あるいは 2-DG 存在下 versipelostatin で処理することにより、顕著な細胞死が誘導された。

第 3 章では実験結果の考察を述べている。Versipelostatin は ER 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。

第 4 章は実験の部であり、詳細な実験法について述べている。

以上、本研究は、分子シャペロン GRP78 の誘導阻害物質の探索において発見した新規 17 員環テトロン酸マクロライド versipelostatin が、グルコース飢餓に基づく ER ストレスにより誘導される GRP78 の発現を抑制し、固形癌細胞に対して特異的に細胞死を誘導することを見出したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。