

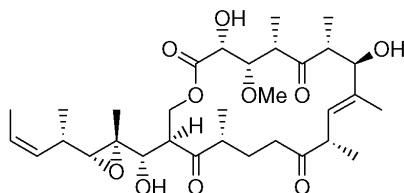
論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成 13 年度博士課程進学
氏名 西村 慎一
指導教官名 伏谷 伸宏 教授

論文題目 Studies on the Mode of Action of 13-Deoxytedanolide
(和訳 13-デオキシテダノライドの作用機序に関する研究)

海洋無脊椎動物からは強い細胞毒性を持つ物質が多く発見されている。それらのなかには DNA のアルキル化、微小管形成阻害、アクチン重合阻害、タンパク質リン酸化酵素阻害、あるいはタンパク質合成阻害をすることにより細胞毒性を示すことが明らかになったものもあるが、詳細な作用機序が明確になったものは少ない。

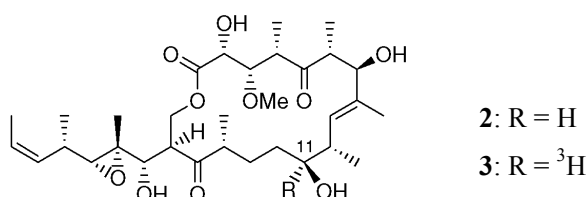
海綿 *Mycale adhaerens* から単離された 13-deoxytedanolide (1) は 18 員環マクロライドで、強い細胞毒性と有望な抗腫瘍活性を示し抗がん剤として期待されているが、その作用機序は全く不明であった。そこで、本研究では出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を対象に 13-deoxytedanolide が作用する分子を探索することにより、作用機序の解明を試みた。その結果、13-deoxytedanolide はリボゾームの 60S サブユニットに結合し、タンパク質合成を強く阻害することが明らかとなった。その概要は以下の通りである。



1: 13-deoxytedanolide

1. 構造-活性相関

13-deoxytedanolide (13-DT)は多くの酸素原子を含む官能基と2つの二重結合を擁しているため、これらをターゲットとして誘導体を調整し活性を調べたところ、活性発現に重要な部位とそうでない部位とを明らかにすることができた。すなわち、分子下半分の酸素原子を含む官能基が重要で、なかでも 11 位のケトン基を還元することによって得られる 3 級水酸基は、その立体配座が活性発現に大きな影響を及ぼした。11*S* 体 2 のみが 13-DT と同等の細胞毒性を示し、11*R* 体の活性は著しく減少した。



2. 標的分子の探索

次に、13-DT が結合する標的分子の探索を行った。すなわち、³H ラベル体を調整する目的で、^{[3}H]-NaBH₄ を用いて 11 位のケトン基を選択的に還元し、11*S* の立体を有する放射性同位体ラベル化合物 3 を作成した。

そして、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を対象に、3 が特異的に結合する分子を探索した。出芽酵母の粗抽出液中に 3 が特異的に結合する分子の存在を確認後、各種のクロマトグラフィーを用いて分画を行い、結合分子の絞込みを行った結果、陰イオン交換カラムおよびゲル濾過カラムにおける活性画分の挙動から標的分子はリボゾームと推測された。

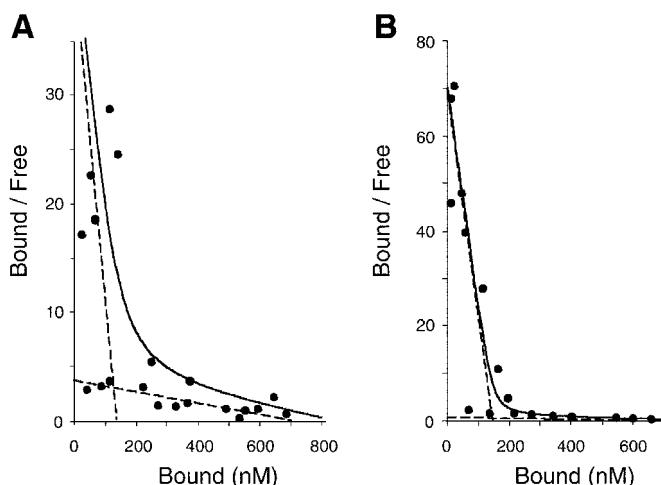


図 1. 13-deoxytedanolide とリボゾームとの結合の Scatchard plot 解析。A) 3 の 80S 複合体への結合; B) 3 の 60S 大サブユニットへの結合。

3. リボゾームへの結合と生物活性

80S リボゾーム複合体を常法により精製し、3 の結合を Scatchard plot で解析したところ、非常に低い解離定数 (3.3 nM) を与えた (図 1 A)。さらに、精製した 40S 小サブユニットと 60S 大サブユニ

ットへの結合を測定したところ、40S には全く結合せず、60S にのみ特異的に結合した。このときの解離定数は 2.12 nM であり、非常に強い結合であることが示唆された(図 1 B)。

リボゾームは複数の RNA と多数のタンパク質からなる巨大分子であり、遺伝暗号をタンパク質へと翻訳する器官である。その遺伝暗号は 40S 小サブユニット上で解読され、60S サブユニット上でペプチドの伸長が触媒される。そこで、13-deoxytedanolide のペプチド伸長に及ぼす影響を調べる目的で、出芽酵母の粗抽出液中でのペプチド伸長阻害能を検討した。その結果、13-DT はコントロールの cycloheximide と同等の阻害能($IC_{50} = 0.15$ および $0.40 \mu M$)を示した。従って、13-DT は 60S サブユニットに結合して、ペプチド伸長を効率的に阻害することが明らかとなった。

4. 結合部位の探索

リボゾームによるペプチド伸長には「ペプチド結合生成」と「tRNA の転移」の 2 つの段階が含まれ、それぞれに特異的な抗生物質が生化学的に同定されている。そこで、機能が明らかとなっている古典的な抗生物質を用いて 13-DT のリボゾーム上の結合部位を探索した。すなわち、ペプチド結合生成を阻害する puromycin と anisomycin および tRNA の転移を阻害する cycloheximide と pederin の存在下で 3 のリボゾームへの結合能を検討したところ、興味深いことに前二者は 3 のリボゾーム結合能に全く影響を及ぼさなかったが、後二者は 3 の結合を阻害した(図 2 A, B)。しかし、cycloheximide は精製した 80S 複合体や 60S 大サブユニットを用いた場合には 3 と競合せず、結合部位を共有しないことが示唆された。Cycloheximide の結合によって誘導される多様な効果の詳細は明らかとなっておらず、粗リボゾーム画分での競合結合を現段階では説明できない。一方、pederin は精製した 60S 大サブユニットに対しても 3 と競合した。従って、pederin と 13-deoxytedanolide は共通の結合部位を有することが示唆された(図 2 B)。同様に、海綿由来の pederin 誘導體である onnamide A と theopederin A も pederin と酷似した挙動を示した(図 2 A, B)。

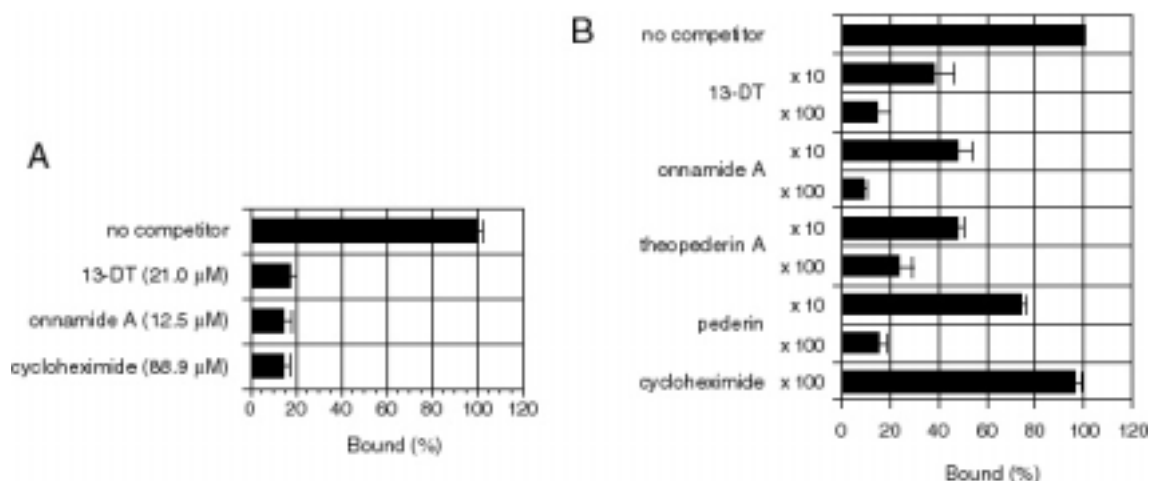
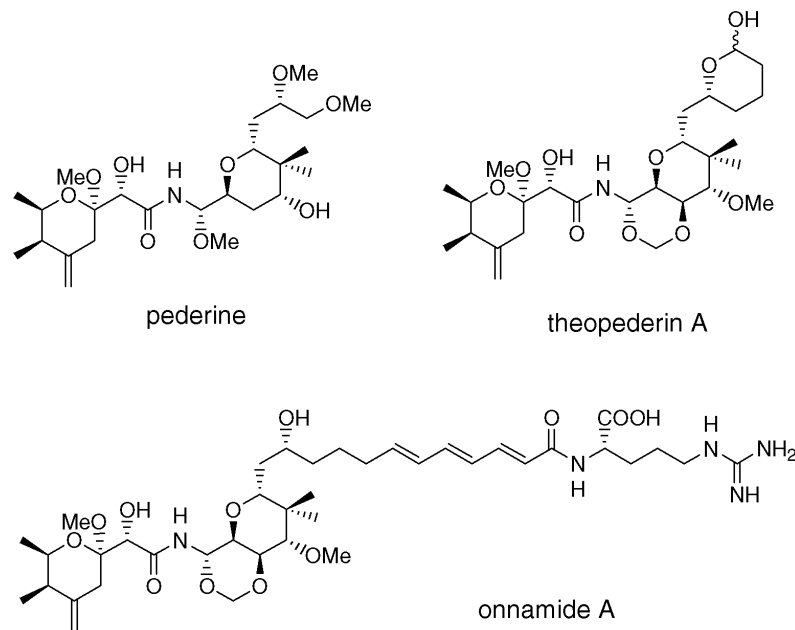


図 2. 13-deoxytedanolide のリボゾームへの結合に対するタンパク合成阻害剤の影響。A) 粗リボゾーム画分への 3 の結合とタンパク質合成阻害剤の影響； B) 60S リボゾーム大サブユニットへの 3 の結合とタンパク質合成阻害剤の影響。



以上本研究では、海綿由来の細胞毒性物質 13-deoxytedanolide の作用機序の解明を目的として、出芽酵母 *S. cerevisiae* を対象に、標的分子の探索を行ったところ、60S リボゾーム大サブユニットへ特異的にかつ強力に作用して、ペプチド伸長を阻害することを明らかにするとともに、全く化学構造の異なる 13-deoxytedanolide と pederin 類が 60S 大サブユニット上の同じ結合部位を共有することを示すことができた。リボゾームに結合してタンパク質合成を阻害する化合物は多数知られているが、13-deoxytedanolide は真核生物のリボゾームに作用する最初のマクロライド化合物であり、今後の詳細な作用機序の解明が期待される。