

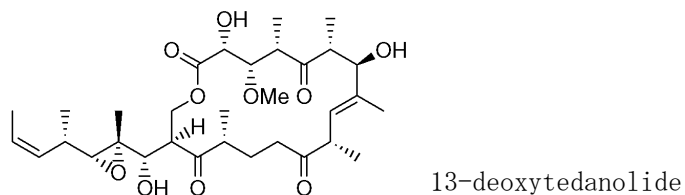
[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 西村 慎一

海洋無脊椎動物から発見された強い細胞毒性を持つ物質のなかには、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が明らかにされたものもあるが、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 (13-DT) 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* から 13-DT が作用する分子の探索を試みた。その結果、13-DT 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. 構造 - 活性相関

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 11 種の誘導体を調製し活性を調べたところ、いくつかの重要な構造-活性相関を明らかにできた。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、<sup>3</sup>H ラベル体を調製する目的で、[<sup>3</sup>H]-NaBH<sub>4</sub> 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を作成した。そして、出芽酵母 *S. cerevisiae* を対象に、<sup>3</sup>H ラベル体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した。

### 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、<sup>3</sup>H ラベル体の結合を 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。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 サブユニットには全く結合せず、60S サブユニットにのみ特異的に結合した。このときの解離定数は 2.1 nM であり、非常に強い結合であることが示唆された。

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 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-DT 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 の存在下での <sup>3</sup>H ラベル体のリボゾームへの結合能を検討したところ、前二者は <sup>3</sup>H ラベル体のリボゾーム結合能に全く影響を及ぼさなかったが、後二者はその結合を阻害した。しかし、cycloheximide は精製した 80S 複合体や 60S サブユニットを用いた場合には、<sup>3</sup>H ラベル体と競合せず、結合部位を共有しないことが示唆された。一方、pederin は精製した 60S サブユニットに対しても <sup>3</sup>H ラベル体と競合した。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。同様に、海綿由来の pederin 誘導体である onnamide A と theopederin A も pederin と酷似した挙動を示した。

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 サブユニット上の同じ結合部位を共有することを示したもので、学術上、応用上寄与するところは大きい。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。