

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏 名 崔 仁權

指導教官 堀之内末治

## 論文題目

タンパク質の核-細胞質間輸送に影響を与える新しい生理活性物質の探索と作用機構の解析

真核細胞の核は核膜で囲まれて細胞質と区別され、双方向性に物質輸送が行われている。タンパク質の核-細胞質間の輸送は核膜に存在する核膜孔を介して行われ、細胞には核膜孔通過を能動的に、そして選択的に行わせる機構が備わっている。このような複雑な現象のうち、輸送シグナルとそれを認識して運ぶ輸送装置の分子の実体が明らかとなり、分子レベルでの作用機構が具体的に論じられるようになってきた。しかし、タンパク質核内輸送因子 (importin  $\alpha$  や importin  $\beta$ ) や核外輸送因子 (exportin) には多くの類縁体 (パラログ) が存在し、それぞれ異なるタンパク質の輸送に関与すると考えられている。我々の研究室では、分裂酵母の形態伸長を引き起こす細胞周期阻害剤レプトマイシン B (LMB) が核外輸送因子 CRM1 による核外移行シグナル (NES) 依存的な核外輸送の特異的阻害剤であることを明らかにしてきた。しかし、LMB 以外には核-細胞質間輸送因子の阻害剤は知られていない。そこで様々なタンパク質を指標にして、核-細胞質間の輸送を阻害する薬剤をスクリーニングすれば、これまで知られていない輸送経路の同定や、輸送機構の解明につながる可能性が高いと思われる。 $\beta$ -カテニンはもともと細胞間の接着に関与する細胞質性蛋白質として同定されたが、この蛋白質は様々な癌細胞において核内に蓄積していることが明らかにされているほか、従来知られている核移行経路とは異なる未知の経路で核移行することが示唆されている。 $\beta$ -カテニンの核内蓄積を抑制する生理活性物質を単離、同定することは様々な癌の治療薬の開発として重要であるばかりでなく、その輸送機構の研究にも有用であると考えられる。そこで、本論文では $\beta$ -カテニンの核-細胞

質間輸送の特異性に着目して、核-細胞質間の輸送を阻害する物質の単離を目的に、蛍光を指標に $\beta$ -カテニンの細胞内局在変化を見るスクリーニング系の構築と探索を行った。

## 1. スクリーニング系の構築

$\beta$ -カテニンを細胞内で可視化できるように N 末端側に EGFP を融合させ、かつ $\beta$ -カテニンを通常細胞質に留めておくために C 末端領域に HIV ウイルス産物である Rev タンパク質の核外移行配列 (Rev NES) を融合した EGFP- $\beta$ -カテニン-Rev NES を Tet-on expression ベクターに導入した。このプラスミドを安定に維持した COS7 細胞で誘導発現された $\beta$ -カテニンは NES による細胞質への保持が長いため細胞質に顆粒状の局在を示すが、LMB 処理によって CRM1 を阻害すると、 $\beta$ -カテニンは核内に局在した。この系を利用して LMB 処理後の観察により $\beta$ -カテニンの核内移行阻害物質を、さらに LMB 処理前の観察により LMB 様の CRM1 依存的な核外移行阻害物質の探索も併せて行った。

## 2. 活性物質の単離・精製および構造解析

作用機構既知の 75 種類の標準薬剤および微生物代謝産物由来の合計 12196 サンプルについてスクリーニングをおこなった。既知標準化合物の中には目的の活性を有する物質は得られず、微生物代謝産物由来のサンプルから得られた活性に対しては細胞毒性、 $\beta$ -カテニン特異的核移行阻害、内在性の $\beta$ -カテニンの局在変化への影響を検査し候補株を選別した。

その中から $\beta$ -カテニンの核外移行および CRM1 依存的な核外移行を阻害する活性候補株として FF8678 株と FP112 株を選択した。FF8678 株の生産する活性物質を 10L の培養濾液から酢酸エチルで抽出後、シリカゲル、ODS, LH-20 による各カラムクロマトグラフィーおよび ODS-HPLC を用いて単離・精製し、精製物質の UV スペクトル、FAB-MS, および $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR よりこれを既知物質である patulin と決定した。また、FF8678 株の生産する活性物質については、5L の培養濾液からブタノールで抽出後、シリカゲルカラム、ODS-HPLC を用い単離・精製し、UV スペクトル、FAB-MS, および $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR より既知物質である terrein と決定した。一方、 $\beta$ -カテニンの核内移行を阻害する活性物質の生産候補株としては FF8181 株を選び、10L の培養液の菌体からアセトン抽出し、減圧濃縮でアセトンを除いて酢酸エチルで 3 回抽出後、シリカゲルカラム、prep-TLC および ODS-HPLC を用い三つの活性物質を単離・精製した。UV スペクトル、FAB-MS, および $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, 2D NMR よりこれらの化合物が drimane sesquiterpene esters であることが判明した。3 つの化合物はいずれも既報であったが、RES-1149-2 以外の二つの物質に関しては名前が付けられていないことから、ODS-HPLC 上の展開時間の順序で FF8181-A と FF8181-B と命名した。

### 3. patulin と terrein の作用機構に関する研究

patulin は mycotoxin として知られ、最近になって腸の上皮細胞間の接着を破壊する活性により細胞毒性を示すことが示唆された。一方、terrein はプロスタグランジンの中間体または類似体として知られ、細胞活性に関しては報告されていない。本スクリーニング系で patulin と terrein は  $\beta$ -カテニンの核外移行を阻害する活性物質として単離されたが、核内での局在パターンは patulin は核全体、terrein は LMB と同様、点状の局在を示したことから異なる活性ではないかと考えられた。これらの物質による  $\beta$ -カテニンの核内蓄積が  $\beta$ -カテニン特異的な核内移行の阻害か、あるいは人工的に付与した Rev NES の核外移行を LMB と同じように阻害するのかどうかを調べるため、HeLa 細胞で NES 依存的に細胞質に局在する MEK1 の局在変化と大腸がん由来の APC 機能不全細胞である SW480 細胞における内在性の  $\beta$ -カテニンの局在変化を観察したところ、patulin, terrein の両方とも MEK1 の核移行を促進したことから、 $\beta$ -カテニンに特異的なものではなく、CRM1 依存的な核移行の阻害であることが明らかになった。



図1. PatulinとTerreinの構造

しかし、patulin は分裂酵母を用いた実験において、NES の阻害よりも酸化ストレスに反応して核内へ移行する Pap1 核移行を強く引き起こしたことから、CRM1 阻害活性より酸化ストレス誘導剤に近いと考えられた。さらに、patulin は細胞接着が緊密な MDCK 細胞において細胞間の接着を失わせるとともに内在性の  $\beta$ -カテニンの局在変化を誘導した。この活性はグルタチオンによって阻害されることから、他の酸化ストレスを誘導する親電子性物質と同様にシステインの修飾を介して細胞接着を破壊するものと考えられる。一方、terrein は分裂酵母を用いた実験において NES 活性の阻害、Pap1 の核移行促進に必要な濃度が同程度であった。また、terrein は LMB の結合部位である CRM1 の Cys-529 を Ser に置換した突然変異体においては核外移行を阻害できないことから LMB と同じ機構で CRM1 依存的な核外移行を阻害するものと考えられる。

#### 4. FF8181-A, FF8181-B, RES-1149-2 の作用機構に関する研究

FF8181-A, FF8181-B, RES-1149-2 はエンドセリン B 型受容体に対する非ペプチド性の拮抗物質で、エンドセリンとエンドセリン B 型受容体との結合を阻害する活性を持つことが報告されているが、 $\beta$ -カテニンとの関連した細胞活性は知られてない。単離した FF8181-A, FF8181-B, RES-1149-2 による EGFP- $\beta$ -カテニン-Rev NES の核移行阻害はあまり顕著ではなかったが、APC の機能不全によって $\beta$ -カテニンを安定に発現し、核局在が観察される SW480 を用い、間接免疫染色を通して内在性 $\beta$ -カテニンの局在変化を観察すると、これらの化合物の処理によって核内の $\beta$ -カテニンが著しく減少したことから、当初は $\beta$ -カテニンの核内移行を阻害するものと考えられた。ところが興味深いことに、FF8181-A 処理による $\beta$ -カテニンの細胞内レベルをウエスタンブロットにより検討した結果、SW480 細胞において 20  $\mu$ g/ml 以上の濃度で $\beta$ -カテニンの分解を著しく促進することが明らかになった。したがって、本物質は核内の $\beta$ -カテニンの分解を促進することで見かけ上核内の $\beta$ -カテニンを減少させるものと考えられる。SW480 ではプロテアソームによる分解に必要とされる APC の機能が欠損し、 $\beta$ -カテニンが安定に発現しているが、興味深いことに、FF8181-A はプロテアソーム阻害剤存在下でも $\beta$ -カテニンの分解を促進したことから、FF8181-A はプロテアソーム非依存的または APC 非依存的な $\beta$ -カテニンの分解系に関与する可能性が考えられる。本物質による $\beta$ -カテニンの分解促進機構に大変興味を持たれる。

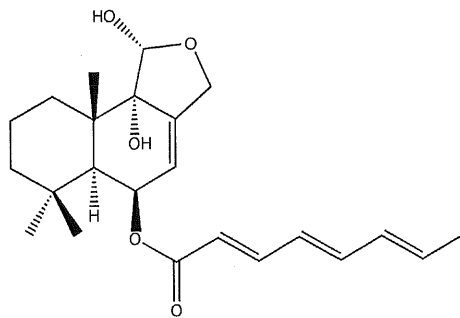


図2. FF8181-Aの構造

#### まとめ

$\beta$ -カテニンの核-細胞質間輸送に影響を与える新しい生理活性物質の探索を行ったところ、カビ由来の代謝産物から patulin, terrein, FF8181-A を見出した。patulin と terrein は CRM1 依存的な核外移行を阻害する LMB 様の活性を示し、それは両化合物がマイケル付加反応の受容体となりうる構造を持つことに起因すると考えられる。terrein は LMB 活性を持つ初めてのカビ由来の活性物質で、patulin は細胞接着影響を与えることで内在性 $\beta$ -カテニンの局在変化も引き起こした。FF8181-A は $\beta$ -カテニンの核移行阻害ではなく $\beta$ -カテニンの分解を促進する新しい活性物質であることが示唆された。