

いくつかの海洋天然物がアクチンに作用することが明らかとなった。しかし、生物有機化学的研究は限られていた。

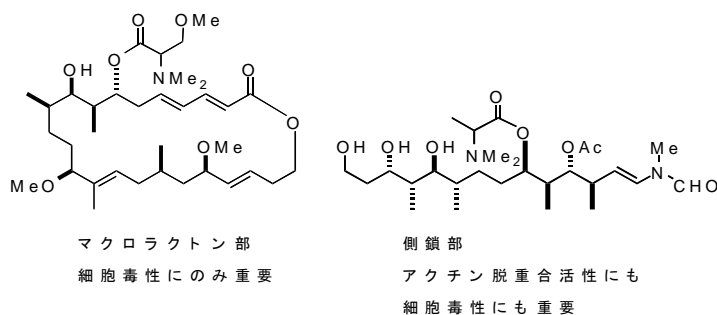
我々は、既に達成したアプリロニンAの全合成の知見をもとに様々な人工類縁体を合成し、これらを用いた化学構造と腫瘍細胞増殖阻害活性やアクチン脱重合活性との相関研究を行った。その結果、以下のことが判明した。

- 1) 強力な腫瘍細胞増殖阻害活性には、分子全体が必要である。
- 2) アクチン脱重合活性には、側鎖部分で十分である。
- 3) 特に、マクロラクトン部のトリメチルセリン基は、腫瘍細胞増殖阻害活性の鍵となる官能基である。

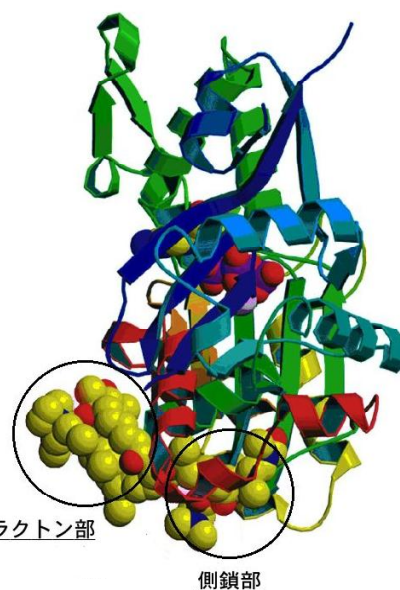
これらの構造活性相関研究と上記の腫瘍細胞増殖阻害活性発現濃度と細胞内のアクチン濃度 (100 μM) を考え合わせると、アプリロニンAの強力な腫瘍細胞増殖阻害活性は、単にアクチン脱重合活性だけでは説明できないことが示唆された。そこで、アプリロニンAの強力な腫瘍細胞増殖阻害活性や抗腫瘍性を説明できる仮説として、以下の機構を提案した。

- 1) アプリロニンAは、細胞内に多量に存在するアクチンと 1 : 1 複合体を形成する ($K_d 0.1 \mu\text{M}$)。
- 2) 細胞内に微量に生成した上記の複合体が、トリメチルセリン基を鍵として細胞の生死に重要な別のタンパク質と複合する (三元複合体の生成)。
- 3) この三元複合体が、細胞増殖阻害に関わるシグナルとして働き、抗腫瘍性などが発現する。

アプリロニンAとアクチンの複合体の構造は、結晶構造解析により明らかとなった。アプリロニンAは、アクチンのサブドメイン1と3の間の疎水性 1,3-クレフトに側鎖部を挿入するように結合しており、マクロラクトン部はアクチンの表面に張り付くように位置している。細胞増殖阻害に重要な官能基であるトリメチルセリン基は、アクチンとは全く相互作用せず、溶媒領域に突き出していることもわかった。この結果からも、トリメチルセリン基は、アクチンとは別のタンパク質との結合に関わっていると考えられる。



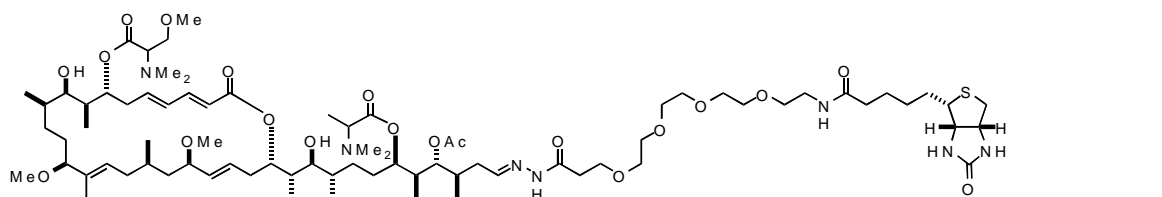
人工類縁体の構造と活性



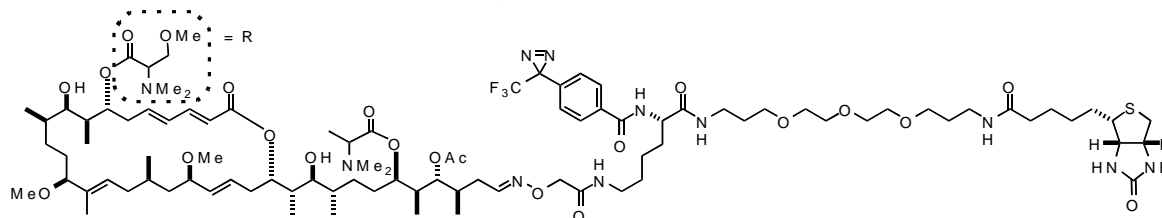
アプリロニンA-アクチン複合体の結晶構造

第2の標的タンパク質の探索

そこで、アプリロニンAをリガンドとするプローブ分子を用いて、第二の標的タンパク質を探索した。プローブ分子の設計では、検出器や光反応基を結合するためのリンカー部をリガンドとなる天然物のどの位置に導入するかが重要となる。アクチンのアプリロニンA結合部位である1,3-クレフトの構造を調べると、溝型の構造であるために側鎖部の末端エナミド部の収まるエリアには、リンカー部を導入できる空間があることがわかった。幸いなことに、アプリロニンAの側鎖部は、温和な酸加水分解により、エナミド構造を反応性の高いアルデヒド基へと変換できることがわかっていたため、このアルデヒドを用いてオキシム結合などにより連結することとした。



アプリロニンA ビオチンプローブ



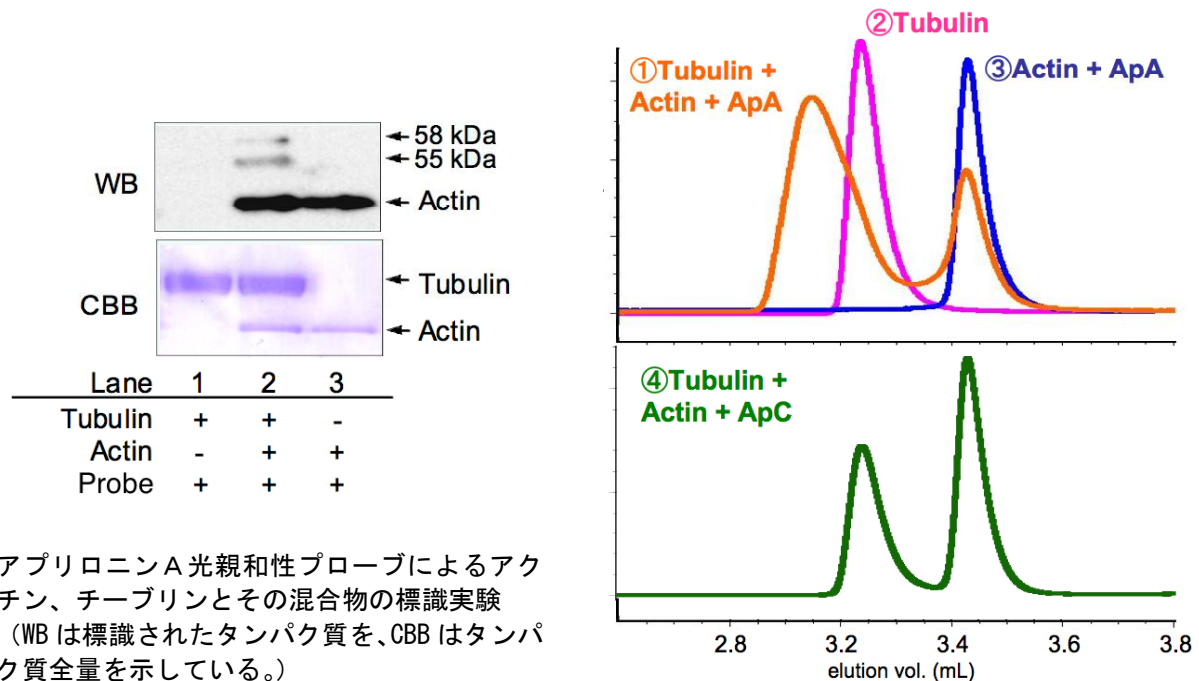
アプリロニンA 光親和性ビオチンプローブ R = トリメチルセリンエステル

アプリロニンC 光親和性ビオチンプローブ R = H

いくつかのプローブ分子を試した結果、リンカー部にポリエチレングリコール、検出器にビオチン、連結官能基としてヒドラジドを用いたアプリロニンA ビオチンプローブにおいて、アプリロニンAをリガンドとする良好なアフィニティークロマト実験を行うことができた。この実験では、細胞抽出物からアプリロニンAに親和性をもつタンパク質として、アクチンとともに少量のアクチン結合タンパク質 **Arp2**, **Arp3** が単離できた。アクチン結合タンパク質 **Arp2**, **Arp3** は、F-アクチンの分岐や架橋において重要な役割をもつ。そこで、アプリロニンAの1/1000の増殖阻害活性しかもたない天然誘導体であるアプリロニンCをリガンドとするプローブ分子を用いたところ、**Arp2**, **Arp3** がアプリロニンAの場合と同じように検出されたため、これらはアプリロニンAの強力な増殖阻害活性には関係のないタンパク質であることがわかった。

アプリロニンAとチューブリン

目的とする標的タンパク質が不安定なことを考慮して光標識実験を行ったところ（生細胞中での光標識、緩衝液の検討）、アクチン以外の親和性を示すタンパク質として、チューブリンを単離できた。チューブリンも細胞骨格タンパク質として重要な役割を演じており、多くの抗腫瘍性物質の標的となっている。



アプリロニンA光親和性プローブによるアクチン、チューブリンとその混合物の標識実験
 (WBは標識されたタンパク質を、CBBはタンパク質全量を示している。)

ゲル濾過 HPLC (TSKgel super SW3000)

そこで、精製したチューブリンに対して、アプリロニンA光親和性ビオチンプローブを用いて標識実験を行ったが、チューブリンは全く標識されなかった。しかし興味深いことに、アクチンを共存させると、アクチン、チューブリン共に標識された。

さらに、ゲル濾過 HPLC を用いた分析を行った。アプリロニンAとアクチンとチューブリンを共注入すると、いずれよりも大きな分子量を示す位置 (右図、①) に溶出された。溶出位置から分子量を見積もると 150 kDa となり、ちょうどアプリロニンA (1 kDa) とアクチン (43 kDa) とチューブリン $\alpha\beta$ ヘテロダイマー (50 + 50 kDa) の合計によく対応した。また、スカッチャードプロットからアプリロニンA-アクチン複合体とチューブリンの結合定数を算出すると、 $1.9 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ とわかった。

次に、チューブリンの重合に対する効果を検討した。重合するチューブリンにアプリロニンAやアクチンを単体で加えてもほとんど重合には影響しなかったが、アプリロニンAとアクチンを混合して加えると (アプリロニンA-アクチン複合体)、濃度依存的に重合が阻害された。

以上のゲル濾過 HPLC やチューブリン重合阻害活性試験を前述の低活性アナログであるアプリロニンCについて行くと、三元複合体の形成は観察されず、アクチンが共存してもチューブリンの重合を阻害しなかった (右図、④)。

アプリロニンAで処理した HeLa 細胞を観察すると、分裂期の細胞で紡錘体が多核化するという形態異常が見られた。また、その細胞周期は、分裂 (G2/M) 期で停止していることが明らかとなった。この活性は、チューブリン作用薬として知られているビンブラスチンとほぼ同等の活性である。最終的には、アプリロニンAで処理した細胞は、アポトーシスを起こすこともわかった。

まとめ

以上の結果から、アプリロニンAの活性発現機構を以下のようにまとめることができる。

- 1) 細胞内に入った微量のアプリロニンAは、大量に存在するアクチンと1 : 1複合体を形成する。
- 2) アプリロニンA-アクチン複合体は、細胞内のチューブリンと結合して三元複合体を形成する。
- 3) 三元複合体がチューブリンの重合を阻害し、紡錘体の形態異常を引き起こす。
- 4) 細胞周期がG2/M期で停止し、細胞がアポトーシスが起る。

天然小分子が2種類のタンパク質にサンドイッチの様に複合体を作る例として、FK506とFK結合タンパク質とカルシニューリンの三元複合体形成による免疫阻害活性などが知られているが、二大細胞骨格タンパク質のアクチンとチューブリンと三元複合体を形成する例は報告されていない。アプリロニンA-アクチン-チューブリン三元複合体の構造、この三元複合体によるチューブリン重合阻害活性や紡錘体形態異常の機構などまだ明らかにしなくてはいけないことが多いが、この発見により、アクチンのようなユビキタスなタンパク質に適当なリガンドが結合することにより、元のタンパク質には見られない顕著な生物活性が誘導されるという機構が注目されることを期待している。

謝辞

この研究は、名古屋大学山田静之名誉教授が始められたものであり、テーマのみならず、数々の励ましをいただきましたことに感謝いたします。名古屋大学時代と筑波大学に移ってからの小鹿一教授（名古屋大学）、坂倉彰教授（岡山大学）、末永聖武准教授（慶應義塾大学）、早川一郎准教授（岡山大学）、北将樹准教授（筑波大学）などの共同研究者と献身的に生物試料採集や実験を行ってくれました多くの学生さんに感謝いたします。生物系の研究において、実験指導やご助言いただきました宝谷弘一名誉教授（名古屋大学）、唐木英明名誉教授（東京大学）、上杉志成教授（京都大学）、臼井健郎准教授（筑波大学）とそれぞれの研究室の皆様感謝いたします。

参考文献

総説：

Yamada, K.; Ojika, M.; Kigoshi, H.; Suenaga, K. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 27-43.

Yamada, K.; Ojika, M.; Kigoshi, H.; Suenaga, K. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2010**, *86*, 176-189.

その後の生物有機化学研究：

Kobayashi, K.; Fujii, Y.; Hayakawa, I.; Kigoshi, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 900-903.

Kita, M.; Hirayama, Y.; Sugiyama, M.; Kigoshi, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9871-9874.

Ojika, M.; Kigoshi, H.; Suenaga, K.; Imamura, Y.; Yoshikawa, K.; Ishigaki, T.; Sakakura, A.; Mutou, T.; Yamada, K. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 982-987.

Kobayashi, K.; Fujii, Y.; Hirayama, Y.; Kobayashi, S.; Hayakawa, I.; Kigoshi, H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1290-1293.

Kita, M.; Yoneda, K.; Hirayama, Y.; Yamagishi, K.; Saito, Y.; Sugiyama, Y.; Miwa, Y.; Ohno, O.; Morita, M.; Suenaga, K.; Kigoshi, H. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1754-1758.

Kita, M.; Hirayama, Y.; Yamagishi, K.; Yoneda, K.; Fujisawa, R.; Kigoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20314-20317.

Ohno, O.; Morita, M.; Kitamura, K.; Teruya, T.; Yoneda, K.; Kita, M.; Kigoshi, H.; Suenaga, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1467-1471.

Kita, M.; Hirayama, Y.; Yoneda, K.; Yamagishi, K.; Chinen, T.; Usui, T.; Sumiya, E.; Uesugi, M.; Kigoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18089-18095.