

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 UTOMO Didik Huswo

論 文 題 目

Mode of Action Studies on Antitumor Macrolide Aplyronine A and
Development of Actin-affinity Tags

(抗腫瘍性マクロリド・アプリロニン A の作用機序に関する研究
およびアクチン親和性タグの開発)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 北 将樹

委 員 名古屋大学教授 小鹿 一

委 員 名古屋大学教授 柴田 貴広

委 員 名古屋大学教授 大嶋 篤典

委 員 名古屋大学准教授 恒松 雄太

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

タンパク質間相互作用 (PPI) は生命現象を担うシグナル伝達系を調節し、重要な生理的効果を誘導する。近年、PPI を安定化もしくは阻害する有機小分子が多数見いだされており、新たな疾患研究ツールや医薬リードとしても注目されている。アプリロニン A は海洋軟体動物アメフラシから単離・構造決定された 24 員環マクロリドであり、真核細胞の主要な細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンの PPI を誘導することで紡錘体の形成を阻害し、強力な細胞増殖阻害活性を示す。チューブリンの重合・脱重合による微小管ダイナミクスを阻害する天然物はこれまでに多数報告されており、その誘導体は抗がん剤として広く利用されているが、アプリロニン A のようにアクチンとチューブリンの両方に作用し、1:1:1 ヘテロ三元複合体を形成する有機小分子はこれまで報告されていない。本論文では、アプリロニン A の顕著な PPI 制御作用ならびに抗腫瘍活性の発現機構を理解するため、アクチンおよびチューブリンとの結合様式を *in vitro* と *in silico* の両面から解明することを目指した。またアプリロニン A の特異なアクチン脱重合活性に注目して、その活性を保ちつつ構造を簡略化した人工類縁体を開発し、生化学や細胞生物学、薬理学の研究などで利用できる新規ツール分子を創出することを目指した。

第 3 章では、電子顕微鏡を用いた観察によりアクチン-アプリロニン A 複合体が微小管およびチューブリン α,β -ヘテロダイマーと *in vitro* でどのように相互作用するか解析した。アプリロニン A およびアクチンは単独では微小管に作用しないが、両者の 1:1 複合体は微小管を速やかに脱重合させる。ネガティブ染色を用いた電子顕微鏡により、この複合体がタキソールで重合安定化させた微小管をごく短時間で断片化させることを確認した。段階的な超遠心により、フラグメント化した微小管とアクチン-アプリロニン A の会合体を精製して、電子顕微鏡で可視化することに成功した。さらにクライオ電子顕微鏡による観察も検討したが、試料の純度が低く高解像度のデータは取得できなかった。また未重合のチューブリン α,β -ヘテロダイマーとアクチン-アプリロニン A から調製した 1:1:1 ヘテロ三元複合体についてもクライオ電子顕微鏡で直接観測することを試みたが、分子量約 150 kDa の均一な複合体は確認できなかった。

そこで第 4 章では、分子モデリング計算を用いてアクチン-アプリロニン A-チューブリン 1:1:1 ヘテロ三元複合体の構造を *in silico* で解析した。報告されているアクチン-アプリロニン A 複合体とチューブリン α,β -ヘテロダイマーの結晶構造を鋳型に用いて、リガンド部位としてアプリロニン A および近傍のアクチン部分構造を、結合する標的分子としてチューブリンヘテロダイマー全体構造をそれぞれ指定したドッキングシミュレーションを行い、三元複合体の初期構造 100 個を得た。そのうちエネルギー的に安定な 10 個の配座について分子動力学シミュレーションを行い、アクチン-アプリロニン A 複合体が α,β -ヘテロダイマーの中央に結合した妥当な

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

三元複合体モデルを得た。その立体配座を詳しく解析した結果、アプリロニン A の強力な活性発現に重要かつアクチンとの複合体でタンパク質表面から露出している C7 位 *N,N,O*-トリメチルセリンエステル構造が α -チューブリンのヘリックス 12 上の三つのアミノ酸残基 (D396, R422, E429) と特異的に相互作用していた。さらに、アプリロニン A が介在することでアクチン・チューブリンの複数のアミノ酸残基の間で静電的ならびに疎水的相互作用が生じ、直線上に結合しているチューブリン α,β -ヘテロダイマー構造を折り曲げていた。次に、得られた三元複合体モデルにおいてリガンドをアプリロニン A の光親和性プローブに代えて配座探索を行い、反応性官能基の結合位置を解析したところ、アクチン・チューブリン双方が光ラベル化された過去の実験を支持する結果が得られた。続いて、今回得られた三元複合体をクライオ電子顕微鏡で観測されている微小管構造と重ね合わせた解析により、アクチン-アプリロニン A 複合体が微小管の重合末端、もしくは内部の表面に含まれる α,β -ヘテロダイマーと外側から結合して微小管の構造不安定化を引き起こすという新たな作用モデルを提唱した。

第 5 章では、アプリロニン A の構造を簡略化した新規人工類縁体の研究を行った。アプリロニン A はその側鎖部分 (C23-C34 位) でアクチンと 1:1 で結合する。C29-C34 位の側鎖部分に注目した構造活性相関研究により、元の天然物の約 1/6 のアクチン脱重合活性を示し、かつ構造を大幅に簡略化した誘導体を開発した。特に C23 位のアシルオキシ基、C29 位の *N,N*-ジメチル-L-アラニンエステル、および C34 位の *N*-メチルエナミド部分がこの活性に重要であることが判明した。ドッキングシミュレーションにより、この側鎖類縁体はアプリロニン A とほぼ同様にアクチンに結合する (RMSD=1.23 Å) ことを見出した。またバイオレイヤー干渉法を用いた分子間相互作用解析により、ビオチン基を連結した側鎖類縁体が高い親和性・特異性でアクチンと結合できる ($K_D = 10.1 \mu\text{M}$) こと、さらに本化合物をアビジン樹脂に担持したプルダウン実験により、細胞抽出液からアクチンを特異的にアフィニティー精製できることを示した。

今回得られた知見により、実際の細胞において高濃度 (モノマー換算で数 10~100 μM) 存在するアクチンやチューブリンと比べて、なぜアプリロニン A がごく低濃度 (100 pM 以下) で微小管ダイナミクスを阻害し、がん細胞の有糸分裂や増殖を顕著に抑制できるのか、という特異な活性発現機構を説明できる。また今回開発したアプリロニン A の側鎖人工類縁体がアクチン親和性タグとして有用であることが示された。これらの成果には独自性と新規性の観点から高い学術的意義があると認められ、天然物化学・ケミカルバイオロジー及び関連分野の発展に大きく貢献した。よって本学位審査委員会は、本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。