

## 《農芸化学奨励賞》

## DNA 合成酵素の分子種選択的阻害剤の探索研究



神戸学院大学栄養学部栄養学科 准教授 水品善之

## 1. はじめに

DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ; pol) は、哺乳類など高等真核生物では、pol  $\alpha$ ~ $\sigma$  の 13 種類以上の分子種の存在がゲノム解析の結果などからわかっている。試験管内 (*in vitro*) の生化学的解析から各 pol 分子種は、DNA 複製 (コピー)・修復・組換えを分業していると言われているが、生体内 (*in vivo*) における直接的な証明はなく、各分子種の生物学的機能についてはわかっていない。そこで各分子種に対する選択的阻害剤を見いだして『分子プローブ』として用いることを試みた。この方法は、「遺伝子ノックアウト (Gene Knockout)」に替わる「化学的ノックアウト (Chemical Knockout)」であり、前者よりも非常に簡便でかつ時間的・空間的・量的な調節ができるところから、pol 研究の新しい知見を生み出すと期待できる。さらに応用研究としては、pol 分子種の選択的阻害活性から新しい生理活性を見いだす可能性がある。

哺乳類の pol は通常の生体内では微量しか存在せず、かつ不安定で精製に熟練を要するため市販されていない。そこで世界中の pol 研究者から精製された活性のある pol 分子種を分与してもらった。このような pol 分子種のほぼすべてをそろえているのは世界中でほかになく、pol 阻害剤研究では世界をリードしている。本研究は 14 年間にわたって継続しており、天然材料から各分子種の選択的阻害剤を探索して、現在までに多数の阻害物質を見いだしている。主な研究成果を以下に述べる。

2. pol  $\alpha$  選択的阻害剤: Dehydroaltenusin

## 2.1 Dehydroaltenusin の単離・精製

イチイ (*Taxus cuspidata*) の樹木に寄生（付着）している真菌類・細菌類を分離・同定して、その培養液をスクリーニングしたところ、*Acremonium* 属のカビに pol  $\alpha$  阻害活性があった。そこで、その培養液の塩化メチレン抽出物から活性成分を単離・精製して、化学構造を解析した。その結果、本物質はミオシン L 鎮キナーゼ阻害剤として報告されている既知物質、Dehydroaltenusin であった（図 1）。

## 2.2 Dehydroaltenusin の pol 阻害活性

単離・精製された Dehydroaltenusin は、哺乳類由来の pol 分子種のうち DNA 複製型の pol である pol  $\alpha$ だけを特異的に阻害した（図 1）。既知の pol  $\alpha$  阻害剤は Aphidicolin が有名ではあるが、pol  $\alpha$  だけでなく pol  $\delta$  と pol  $\epsilon$  も同時に阻害してしまう。Dehydroaltenusin の IC<sub>50</sub> 値は 0.68  $\mu\text{M}$  であり、既知の pol  $\alpha$  阻害剤よりも 20 倍以上も強く阻害した。pol  $\alpha$  は分子量の異なる四つのサブユニットから構成されるが、表面プラズモン共鳴センサー (Biacore) による解析から、本物質は pol 活性を有する p180 サブユニットに結合することを見いだした。これらのことから Dehydroaltenusin は、pol  $\alpha$  研究の分子プローブになると考えられる。

## 2.3 Dehydroaltenusin のヒト癌細胞増殖抑制活性

Dehydroaltenusin はヒト子宮癌細胞 (HeLa cells) の増殖を濃度依存的に抑制した（図 1）。その LD<sub>50</sub> 値は Aphidicolin よりも低く (38  $\mu\text{M}$ )、pol  $\alpha$  阻害活性の強さを反映していることが示唆された。また、本物質は添加後 24 時間において、細胞周期を S 期 (DNA 合成期) で停止させ、細胞核の DNA の断片化が観察された。これより、pol  $\alpha$  は DNA 複製の行われる S 期で働いており、その活性が阻害されればアボトーシス (自己細胞死) を誘導すると考えられる。

## 2.4 合成 Dehydroaltenusin の抗腫瘍活性

Dehydroaltenusin の動物実験を実施するにあたり、有機化学的な合成方法を確立して大量合成に成功した。本合成物は天然物と同濃度で pol  $\alpha$  活性を阻害し、HeLa 細胞の増殖を抑制することを確認した。

次にヌードマウスへ HeLa 細胞を移植することにより固形腫瘍を形成させた後、合成 Dehydroaltenusin を投与（生理食塩水に溶かしてから 20 mg/kg を皮下注射）して、腫瘍の体積変化を測定した。本化合物投与群は生理食塩水を投与したコントロール群と比べて、優位に腫瘍の増大化を抑制したことから、ヒト子宮癌由来の固形腫瘍に対する抗腫瘍活性を見いだした（図 2）。コントロール群マウスの死亡後、各臓器を観察したところ合成 Dehydroaltenusin 投与群の臓器に異常が見られなかったこと、両群のマウス体重の経時変化が一緒であったことから、本化合物投与による副作用はないことが示唆された。さらに、両群の腫瘍組織の切片を作製して形態観察したところ、Dehydroaltenusin 投与群の腫瘍細胞はネクローシス（壊死）を起こしていた。

以上の結果から、pol  $\alpha$  特異的阻害剤は副作用のない抗癌剤になることが期待される。

3. pol  $\lambda$  選択的阻害剤: Petasiphenol

## 3.1 Petasiphenol の単離・精製

食品素材であるふきのとう (*Petasites japonicus*) のメタノール抽出液に pol  $\lambda$  選択的阻害活性が見られた。本活性を指標にして阻害物質を単離・精製、化学構造を解析した結果、フェノール系化合物の Petasiphenol であった（図 3）。本物質は 1994 年に、やはりふきのとうから単離された既知物質であった。

## 3.2 Petasiphenol の pol 阻害活性

単離・精製された Petasiphenol は、哺乳類由来の pol 分子種のうち DNA 修復・組換えに関与する pol  $\lambda$  を特異的に阻害し、その IC<sub>50</sub> 値は 7.8  $\mu\text{M}$  であった（図 3）。pol  $\beta$ ・ $\lambda$ ・ $\mu$  は「pol X ファミリー」と呼ばれ、アミノ酸配列や生化学的機能は類似しているが、本物質が pol  $\beta$  を阻害しないことは極めて興味深い。Biacore 解析から Petasiphenol は C-末側の pol 活性ドメインには結合せず、N-末側の BRCT ドメインに結合すること

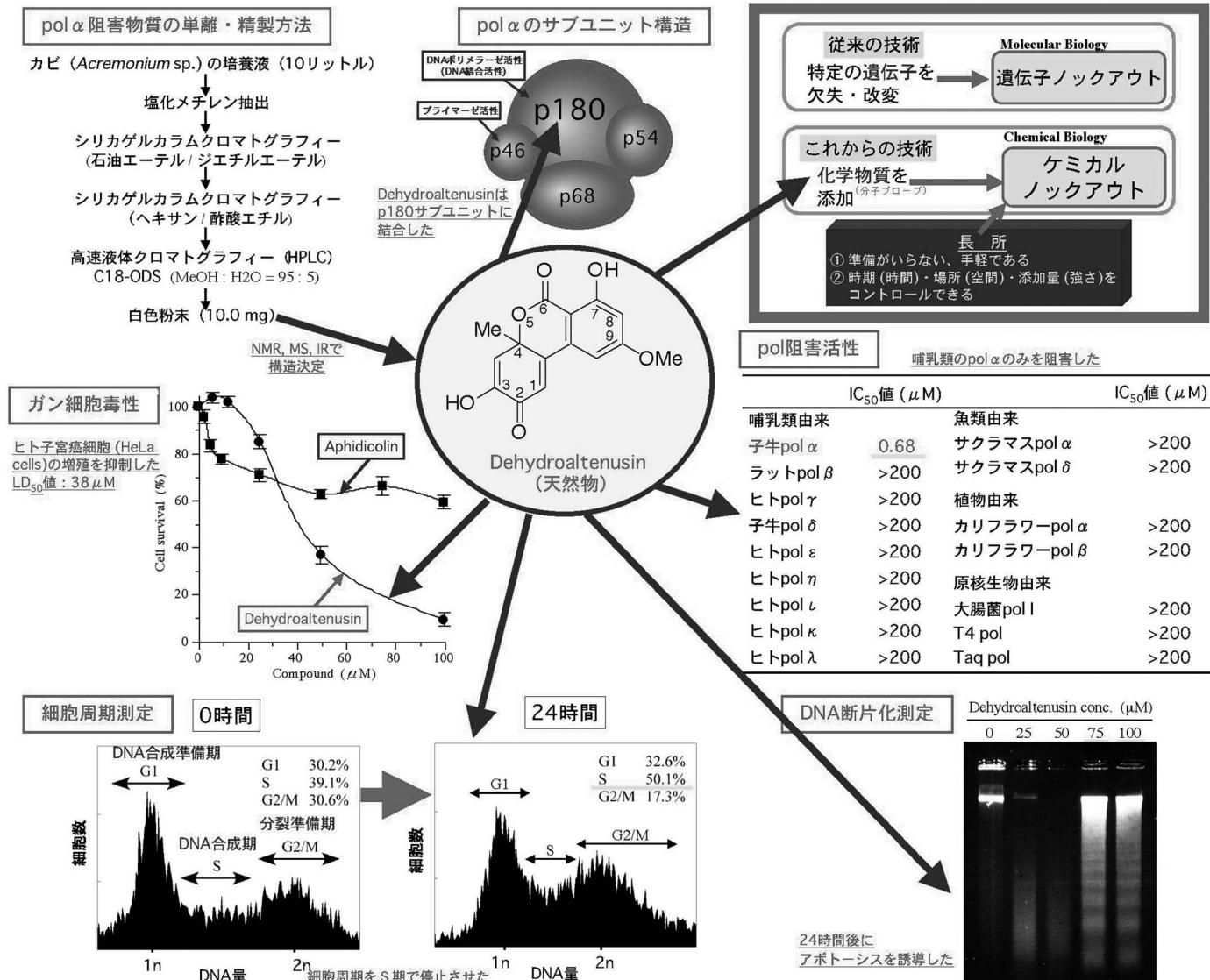


図 1 pol α 選択的阻害活性を有する Dehydroaltenusin の単離と機能解析

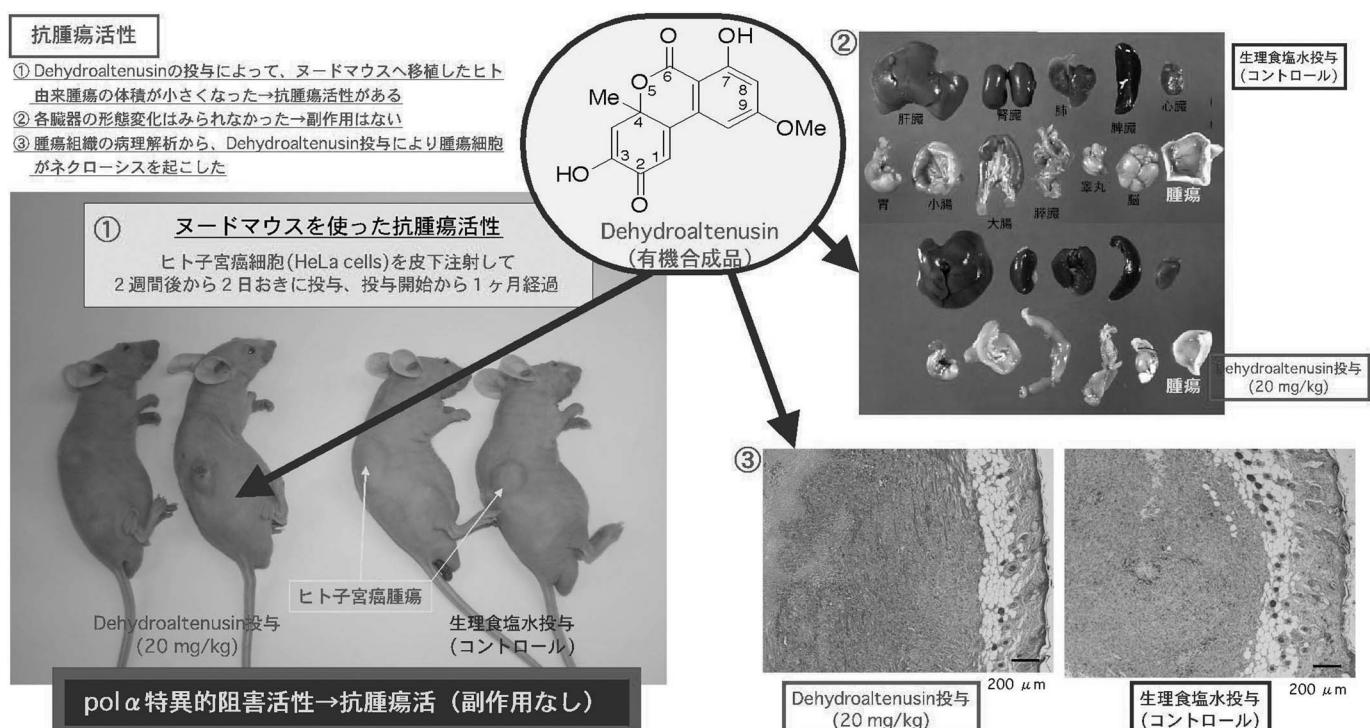


図 2 合成 Dehydroaltenusin による抗腫瘍活性

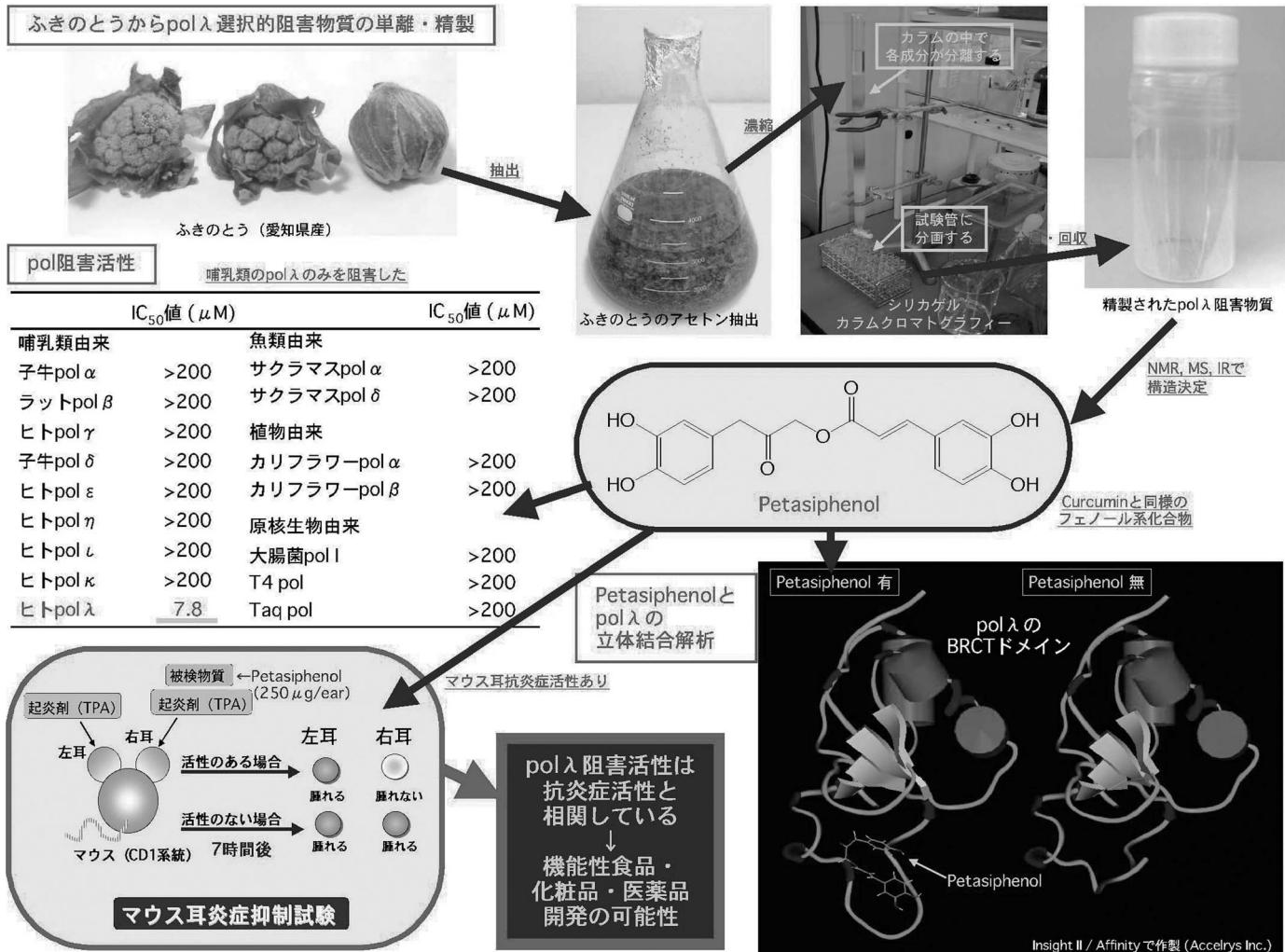


図3 pol λ選択的阻害活性を有する Petasiphenol の単離と機能解析

がわかった。pol λ-BRCT ドメインと Petasiphenol の立体結合シミュレーションによって、本物質は自由度の高いループに結合して pol λ 活性を非拮抗的に阻害することが示唆された。

### 3.3 Petasiphenol の抗炎症活性

マウス耳抗炎症活性は、起炎剤として TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 用いて急性炎症に対する抑制を測定した。その結果、Petasiphenol は 250 μg の塗布で有意な抗炎症活性を示した。

### 4. Curcumin 誘導体の合成と pol λ 阻害活性

#### 4.1 Curcumin 誘導体の有機合成

Petasiphenol と同じフェノール系化合物であり、構造が類似する Curcumin (クルクミン) に注目した。試薬として市販されている Curcumin から各種誘導体のデザインと化学合成を試みて、13 物質 (Compound 3~15) の合成に成功した (図 4)。

#### 4.2 フェノール系化合物の pol λ 阻害活性と抗炎症活性

ふきのとうから単離・精製した Petasiphenol (Compound 1), 市販品の Curcumin (Compound 2) と Curcumin 誘導体 (Compound 3~15) の pol λ 阻害活性と抗炎症活性を調査した。その結果、これらフェノール系化合物 15 物質の pol λ 阻害活性と抗炎症活性には正の相関が見られた (図 4)。特に Curcumin は Petasiphenol よりも強い活性を示した。さらに Curcumin よりも活性の強い誘導体をいくつか見いだし、その中で

Compound 13 (Monoacetyl curcumin) が最強であった。

以上の結果から、pol λ 阻害剤は抗炎症剤になりうる可能性が示唆される。また、Monoacetyl curcumin は抗炎症医薬品としての開発が期待できる。

### 5. おわりに

哺乳類由来の活性のある各 pol 分子種を準備することにより、pol 分子種に選択的な阻害物質を見出すことができた。今後もこのような低分子有機化合物、すなわち『分子プローブ (化学の言葉)』を用いることにより、各 pol 分子種の生体内における機能・役割を解明していくたい。

これまでの pol 阻害剤は、抗癌剤や抗ウイルス剤として開発されているが、すべての pol 分子種を nM (ナノ・モル) オーダーで阻害するため毒性 (副作用) が強く、いわゆる『阻害剤 [Inhibitor]』であった。一方、pol 分子種の選択的阻害剤は、副作用はないが酵素阻害剤としてはやや濃度が高く、『調節物質 [Suppressor]』と言える。今後は、pol 分子種選択的阻害剤が従来の pol 阻害剤の概念を覆して、新規でかつ有用な医薬品・化粧品の開発につながることが期待される。

本研究は、学部生・大学院生・助手として所属していた東京理科大学理工学部応用生物科学科において開始し、現在の所属である神戸学院大学栄養学部栄養学科において発展的に継続しています。本研究が多くの方がたのご支援を賜ったことに深く

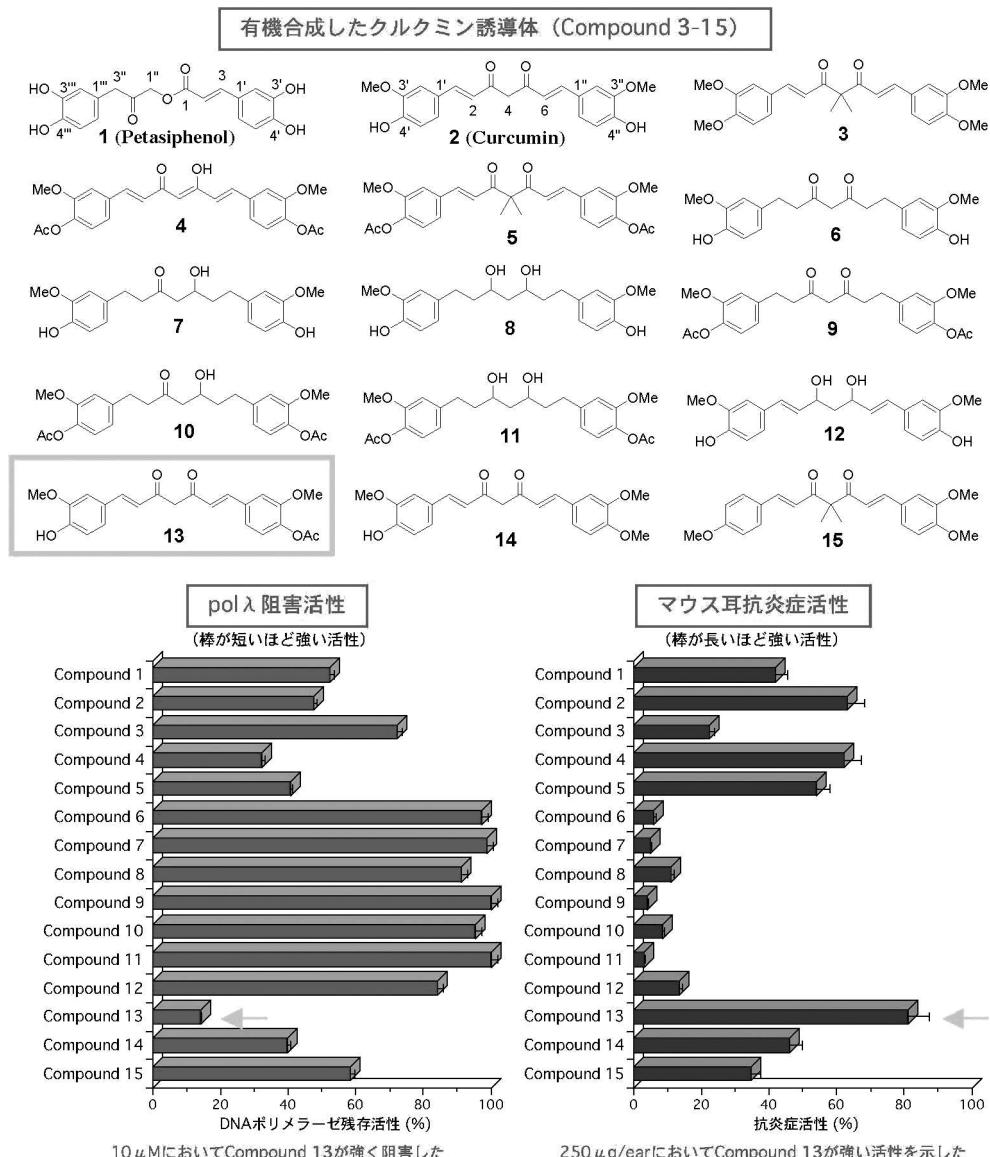


図 4 Curcumin 誘導体の pol λ 阻害活性と抗炎症活性

敬意を表し、謝辞を述べさせていただきます。まずは本研究課題と機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻を賜りました恩師であり現在の共同研究者でもある東京理科大学・坂口謙吾教授に深謝いたします。次に本研究の継続にあたり、現在の所属である神戸学院大学栄養学部食品栄養学研究室の吉田弘美教授には、より良い研究環境の提供や数多くの励ましを賜りました。心より御礼を申し上げます。本研究の実質的な指導者であり現在の共同研究者でもある東京理科大学の菅原二三男教授、小林進教授、倉持幸司助教の先生方には、化学構造の決定や有機合成でたいへんお世話になりました。甚大なる感謝の意を表します。そして東京理科大学・菅原研究室の大学院生であった紙透伸治博士(現 京都大学化学研究所・博士研究員)と竹内倫文博士(現 富山化学工業(株))には多大なるご援助を賜りましたこ

と深謝いたします。神戸学院大学栄養学部食品栄養学研究室で実験助手をしていた中井(村上)智嘉子博士(現 国立国際医療センター研究所・博士研究員)ならびに現在の実験助手である熊本(米澤)裕子氏、研究室の卒業生・在校生には、忍耐強く研究を推進していただき精一杯の感謝をいたします。また神戸学院大学の岡田芳男学長ならびに溝口史郎理事長には、特別に研究推進のための研究費を計上していただきました。家庭を顧みることなく研究活動に没頭することを容認して、いつも献身的に支援・協力してくれた妻・ゆみに心から感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長・山本憲二先生ならびに諸先生方に厚く御礼申し上げます。