


(様式 5)

指導教員  
承認印



平成 27 年 12 月 10 日

## 学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 平成 25 年度入学 学籍番号 13831207	生命工学 氏名 山田里佳	専攻 
主指導教員 氏名	櫻井香里		
論文題目	抗癌活性化合物 OSW-1 の作用機構解明に向けた蛍光プローブ及びフォトアフィニティープローブの合成と解析		
論文要旨 (2000 字程度)			
<p><b>第 1 章：序論</b></p> <p>OSW-1 はユリ科植物球根から単離及び構造決定されたサポニン化合物である。OSW-1 は、様々な種類の癌細胞に対して選択的かつ強力な抗癌活性を示す。その作用機構は既存の抗癌活性分子とは異なることが示され、未知の作用機構を有している可能性が考えられている。そのため OSW-1 の抗癌作用機構は多くの研究者達の注目を集めてきた。</p> <p>OSW-1 の全合成及び構造活性相関研究結果を応用することで、OSW-1 アフィニティープローブの開発が行われた。Shair らは、OSW-1 アフィニティービーズ及び細胞溶解液を用いたプルダウンにより、結合タンパク質として oxysterol binding protein や ORP4L を同定した。また、細胞生物学的解析によって、OSW-1 の添加によりアポトーシスが誘導されること、膜タンパク質 <math>\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}</math> exchanger 1 の発現量が減少すること、等が明らかにされた。</p> <p>当研究室では、化学的なアプローチによる作用機構解明を目指して、必要量の OSW-1 を、植物試料から効率的に単離する方法を確立していた。また、OSW-1 の三次元構造解析研究結果を受け、OSW-1 の活性に必要な部位が形成している疎水性クラスターが結合タンパク質との相互作用部位ではないかという仮説を立てていた。</p> <p>上述のように、OSW-1 の抗癌作用機構に関しては複数の知見が得られている。しかし、OSW-1 が直接作用する分子は OSBP 及び ORP4L しか同定されておらず、これらのタンパク質が OSW-1 の強力な抗癌活性にどのように関連しているかは不明である。様々な研究結果から、OSW-1 の細胞における作用点は複数あることが明らかになっている。このことから、OSW-1 の結合タンパク質も複数存在する可能性が考えられる。また、OSW-1 自体の細胞における分子レベルでの局在は明らかになっていない。</p> <p>そこで本研究では、当研究室での先行研究を応用して OSW-1 機能性プローブ分子を開発し、細胞における OSW-1 の挙動を分子レベルで解析することを目的とした。</p> <p>分子レベルでの作用解析に向けて、1) OSW-1 の細胞における局在を分子レベルで可視化できる OSW-1 蛍光プローブを合成して、解析を行うこと、2) 生細胞中での結合タンパク質探索が可能な OSW-1 フォトアフィニティープローブを合成することを目的とした。</p>			



## 第2章：OSW-1 蛍光プローブの効率的な合成法の開発

細胞において、OSW-1 の分子レベルでの局在解析を行うことを目指して、OSW-1 蛍光プローブを設計及び合成した。OSW-1 の3次元構造に関する知見を利用して、OSW-1 蛍光プローブを設計した。球根試料より調達した無保護の OSW-1 に蛍光基を導入するため、酸クロライドを有する蛍光基をアシル化剤として用いた。その結果、5つ存在する OSW-1 の水酸基のうち、xylose 3''位及び4''位水酸基がアシル化されたことから、xylose の水酸基の反応性が高いことが示唆された。

そこで、OSW-1 機能性プローブを簡便に合成することを目指し、OSW-1 の効率的な誘導化法の開発を目的とした。検討の結果、 $\text{Me}_2\text{SnCl}_2$  を用いることで、OSW-1 xylose 4''位水酸基を選択的にモノアシル化できることを見出し、望みの OSW-1 蛍光プローブを収率 61% で得た。合成した蛍光プローブは OSW-1 と同等の抗癌活性を保持し、当研究室の仮説を示唆する結果を得た。また、細胞における OSW-1 の分子レベルでの挙動解析が可能になると考えられた。

## 第3章：OSW-1 蛍光プローブの細胞内取り込み及び局在解析

OSW-1 の細胞における分子レベルでの局在解析のために、第2章において合成した OSW-1 蛍光プローブの HeLa 細胞内蛍光イメージング解析を行った。その結果、OSW-1 が細胞に取り込まれることを示した。次に、OSW-1 の活性値(mean  $\text{IC}_{50} = 0.78 \text{ nM}$ , NCI-60 cell *in vitro* screen)に対して過剰量の蛍光プローブ添加しているため、細胞内分布に変化がみられていないかを検証した。その結果、プローブ濃度変化に伴う OSW-1 の細胞内局在の変化はみられなかった。また、低温になると OSW-1 の細胞内への取り込みが停止したことから、OSW-1 がエネルギー依存的に細胞内に取り込まれていることが示唆された。

細胞小器官特異的染色剤との共染色の結果、OSW-1 はゴルジ体や小胞体に主に局在していた。この結果から、OSW-1 は膜成分に濃縮されている可能性が考えられた。

## 第4章：OSW-1 フォトアフィニティープローブの合成及び機能解析

生細胞中での OSW-1 結合タンパク質の探索及び同定を目指し、OSW-1 フォトアフィニティープローブの設計及び合成を行った。

まず第2章において開発した、 $\text{Me}_2\text{SnCl}_2$  を用いた OSW-1 4''位水酸基選択的モノアシル化反応を用いてフォトアフィニティーラベルを1工程で導入する方法を検討した。しかし、良好な収率が得られなかったため、リンカーをアシル化反応により導入した後に、フォトアフィニティーラベルをアミドカップリングする2工程でのプローブ合成を検討した。その結果、目的の OSW-1 フォトアフィニティープローブを収率 61% で得た。

合成したプローブは OSW-1 とほぼ同等の抗癌活性を保持していた。プローブが望みの機能を有しているかを確かめるために、モデル結合タンパク質を用いて解析を行った。その結果、OSW-1 が照射依存的に結合タンパク質を検出できること、光反応生成物に対して CuAAC により任意の検出基を導入できることを明らかにし、フォトアフィニティープローブとしての機能を有していることを示した。

## 第5章：総括

本研究では、OSW-1 機能性プローブを用いて抗癌活性化合物 OSW-1 の分子レベルでの作用機構解明を目指した。第2章では当研究室での先行研究を利用して OSW-1 蛍光プローブの設計及び合成を行った。検討の結果、 $\text{Me}_2\text{SnCl}_2$  を用いることで OSW-1 xylose 残基において、4''位選択的モノアシル化が進行し、収率良く目的の蛍光プローブを得た。合成した蛍光プローブは抗癌活性を保持していた。第3章では第2章において合成したプローブを用いて HeLa 細胞イメージング解析を行った。その結果、OSW-1 が細胞に取り込まれ、小胞体やゴルジ体に局在することを明らかにした。第4章では生細胞中での結合タンパク質の探索に向けて、OSW-1 のフォトアフィニティープローブを合成した。第2章で開発した位置選択的モノアシル化反応を応用することで目的のプローブを収率 61% と比較的良好な収率で得た。合成したプローブは抗癌活性を保持しており、フォトアフィニティープローブとしての機能を有していることが明らかになった。

抗癌活性を保持している OSW-1 フォトアフィニティープローブを用いることで、生細胞中において OSW-1 の活性依存的結合タンパク質の探索が可能であると考えられ OSW-1 の未知結合タンパク質の探索及び同定が期待される。



## 第2章：OSW-1 蛍光プローブの効率的な合成法の開発

細胞において、OSW-1 の分子レベルでの局在解析を行うことを目指して、OSW-1 蛍光プローブを設計及び合成した。OSW-1 の3次元構造に関する知見を利用して、OSW-1 蛍光プローブを設計した。球根試料より調達した無保護の OSW-1 に蛍光基を導入するため、酸クロライドを有する蛍光基をアシル化剤として用いた。その結果、5つ存在する OSW-1 の水酸基のうち、xylose 3''位及び4''位水酸基がアシル化されたことから、xylose の水酸基の反応性が高いことが示唆された。

そこで、OSW-1 機能性プローブを簡便に合成することを目指し、OSW-1 の効率的な誘導化法の開発を目的とした。検討の結果、 $\text{Me}_2\text{SnCl}_2$  を用いることで、OSW-1 xylose 4''位水酸基を選択的にモノアシル化できることを見出し、望みの OSW-1 蛍光プローブを収率 61% で得た。合成した蛍光プローブは OSW-1 と同等の抗癌活性を保持し、当研究室の仮説を示唆する結果を得た。また、細胞における OSW-1 の分子レベルでの挙動解析が可能になると考えられた。

## 第3章：OSW-1 蛍光プローブの細胞内取り込み及び局在解析

OSW-1 の細胞における分子レベルでの局在解析のために、第2章において合成した OSW-1 蛍光プローブの HeLa 細胞内蛍光イメージング解析を行った。その結果、OSW-1 が細胞に取り込まれることを示した。次に、OSW-1 の活性値(mean  $\text{IC}_{50} = 0.78 \text{ nM}$ , NCI-60 cell *in vitro* screen)に対して過剰量の蛍光プローブ添加しているため、細胞内分布に変化がみられていないかを検証した。その結果、プローブ濃度変化に伴う OSW-1 の細胞内局在の変化はみられなかった。また、低温になると OSW-1 の細胞内への取り込みが停止したことから、OSW-1 がエネルギー依存的に細胞内に取り込まれていることが示唆された。

細胞小器官特異的染色剤との共染色の結果、OSW-1 はゴルジ体や小胞体に主に局在していた。この結果から、OSW-1 は膜成分に濃縮されている可能性が考えられた。

## 第4章：OSW-1 フォトアフィニティープローブの合成及び機能解析

生細胞中での OSW-1 結合タンパク質の探索及び同定を目指し、OSW-1 フォトアフィニティープローブの設計及び合成を行った。

まず第2章において開発した、 $\text{Me}_2\text{SnCl}_2$  を用いた OSW-1 4''位水酸基選択的モノアシル化反応を用いてフォトアフィニティーラベルを1工程で導入する方法を検討した。しかし、良好な収率が得られなかったため、リンカーをアシル化反応により導入した後に、フォトアフィニティーラベルをアミドカップリングする2工程でのプローブ合成を検討した。その結果、目的の OSW-1 フォトアフィニティープローブを収率 61% で得た。

合成したプローブは OSW-1 とほぼ同等の抗癌活性を保持していた。プローブが望みの機能を有しているかを確かめるために、モデル結合タンパク質を用いて解析を行った。その結果、OSW-1 が光照射依存的に結合タンパク質を検出できること、光反応生成物に対して  $\text{CuAAc}$  により任意の検出基を導入できることを明らかにし、フォトアフィニティープローブとしての機能を有していることを示した。

## 第5章：総括

本研究では、OSW-1 機能性プローブを用いて抗癌活性化合物 OSW-1 の分子レベルでの作用機構解明を目指した。第2章では当研究室での先行研究を利用して OSW-1 蛍光プローブの設計及び合成を行った。検討の結果、 $\text{Me}_2\text{SnCl}_2$  を用いることで OSW-1 xylose 残基において、4''位選択的なモノアシル化が進行し、収率良く目的の蛍光プローブを得た。合成した蛍光プローブは抗癌活性を保持していた。第3章では第2章において合成したプローブを用いて HeLa 細胞イメージング解析を行った。その結果、OSW-1 が細胞に取り込まれ、小胞体やゴルジ体に局在することを明らかにした。第4章では生細胞中での結合タンパク質の探索に向けて、OSW-1 のフォトアフィニティープローブを合成した。第2章で開発した位置選択的なモノアシル化反応を応用することで目的のプローブを収率 61% と比較的良好な収率で得た。合成したプローブは抗癌活性を保持しており、フォトアフィニティープローブとしての機能を有していることが明らかになった。

抗癌活性を保持している OSW-1 フォトアフィニティープローブを用いることで、生細胞中において OSW-1 の活性依存的な結合タンパク質の探索が可能であると考えられ OSW-1 の未知結合タンパク質の探索及び同定が期待される。