

## γ-チューブリン特異的阻害剤 gatastatin 類縁体の構造活性相関検討

新谷 佳菜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

### 背景・目的

α/β-tubulin ヘテロダイマーの重合体である微小管は、間期には細胞質全体に広がるネットワークを形成することで、細胞内物質輸送や細胞運動に関わるとともに、細胞分裂期には紡錘体を形成することで染色体分離に必須の機能を果たしている。現在抗がん剤として利用されている taxoid 類や vinca alkaloid 類などの微小管阻害剤は、α/β-tubulin に直接結合して細胞分裂期の紡錘体機能を阻害し、がん細胞の細胞周期進行の停止、細胞死を誘導する。しかしながら、これらの微小管阻害剤は紡錘体形成阻害と同時に間期微小管ネットワーク機能も阻害するため、末梢神経障害等の重篤な副作用を引き起こすことが知られている。そのため、より副作用の少ない化合物の開発が求められている。

細胞内では γ-tubulin を含む γ-tubulin ring complex (γTuRC) を足場として微小管核形成が開始され、続いて微小管が伸長する。我々は、マメ科植物の葉から単離された glaziopianin A (AG1) の構造活性相関検討を行い、*O*-demethylbenzyl AG1 が γ-tubulin に対する特異的阻害剤であることを見出し、これを gatastatin と名付けた (Fig. 1)<sup>1)</sup>。本物質は、間期細胞の微小管ネットワークに対しては形態的影響を示さず、分裂期紡錘体の異常を引き起こすことから、γ-tubulin 特異的阻害剤は副作用の少ない分裂期特異的作用薬となる可能性が考えられる。しかしながら、gatastatin の細胞毒性は他の微小管阻害剤と比較して弱い点が課題であった。そこで本研究では、より強力な γ-tubulin 特異的阻害剤の開発を目的に、gatastatin 類縁化合物の構造活性相関検討を行った。

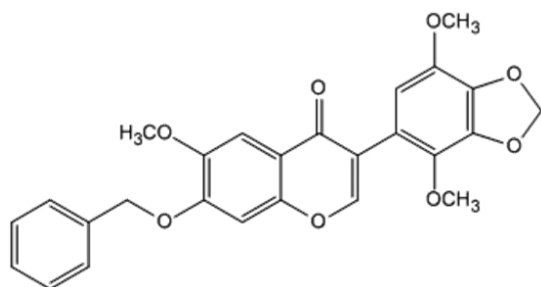


Fig. 1 Gatastatin の構造

### 方法

以下の 3 項目を指標として、gatastatin 類縁体の活性の検討を行った。

#### 1. 細胞増殖阻害試験

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa (3.0 x 10<sup>4</sup> cells/ml) に、gatastatin 類縁体を 48 時間処理した後、WST-8 を 1% (v/v) 添加し、450 nm の吸光度を測定した。薬剤未処理の吸光度を 100% とし、50% 増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を算出した。

#### 2. 紡錘体形態観察

HeLa 細胞 (3.0 x 10<sup>4</sup> cells/ml) に gatastatin 類縁体を 24 時間処理した後、-20°C メタノールで 5 分間固定した。洗浄後、α-tubulin、中心体、及び DNA を、それぞれ抗 α-tubulin 抗体 (DM1A, Santa Cruz, sc-32293)、抗 pericentrin 抗体 (Abcam, ab4448)、Hoechst 33258 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。さらに紡錘体の形態、及び染色体の配向により分類し、割合を算出した。

#### 3. 微小管核形成阻害試験

HeLa 細胞 (3.0 x 10<sup>4</sup> cells/ml) に S-trityl-L-cysteine を 6 時間処理して単極紡錘体を形成させた後、薬剤の入っていない培地に交換し氷上に 1 時間静置することで微小管を脱重合した。さらに、薬剤を 1% (v/v) 添加し氷上に 15 分静置した後、30°C に温めた薬剤を含む培地に交換し、中心体からの微小管伸長を行わせた。-20°C メタノールで固定、洗浄後、α-tubulin、中心体、及び DNA を、それぞれ抗 α-tubulin 抗体、抗 pericentrin 抗体、Hoechst 33258 で染色、観察した。分裂期の細胞について、微小管が伸長した面積を Image J を用いて測定した。

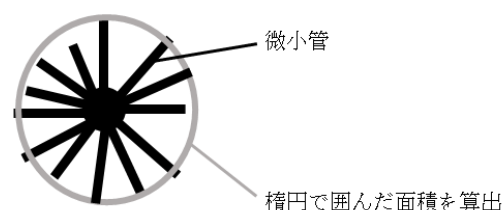


Fig. 2 単極紡錘体の面積の測定

### 結果・考察

詳細は発表会にて報告する。

### 参考文献

- 1) Chinen T. *et. al.*, The γ-tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle, *Nat. Commun.*, **6**, 8722 (2015)