

## γ-チューブリン阻害剤と相乗効果を示す化合物の作用機構解析

SU YIWEI (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)

## 【背景と目的】

微小管は細胞骨格の一種であり、 $\alpha/\beta$ -tubulin ヘテロダイマーにより構成される直径 25 nm の管状構造である。In vitro では、 $\alpha/\beta$ -tubulin ヘテロダイマーは一定濃度以上で自発的に重合できるが、in vivo での重合には、 $\gamma$ -tubulin を主要構成成分とする  $\gamma$ -tubulin ring complex ( $\gamma$ -TuRC) による微小管核形成が必要なことが知られている。しかしながら  $\gamma$ -TuRC の制御機構についてはほとんどわかっていない。我々は、世界初となる  $\gamma$ -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin<sup>1)</sup>、及び gatastatin より約 10 倍強い細胞毒性を示す gatastatin G2 (*O*-propargyl gatastatin) を開発し<sup>2)</sup>、報告してきた (Fig.1)。Gatastatin 及び gatastatin G2 は、共に間期微小管ネットワーク形態に影響を及ぼさず、分裂期紡錘体異常を引き起こし、アポトーシスに誘導する<sup>1,2)</sup>。

$\gamma$ -TuRC の細胞内機能や機能的相互作用を解析する方法の一つに、 $\gamma$ -TuRC 阻害時にさらにその細胞毒性を促進する薬剤を用いる方法 (合成致死) が考えられる。これまでに細胞分裂期進行に重要なリン酸化酵素である Mps1, Plk1, Cdk1 等に対する特異的阻害剤を用いたところ、Plk1 阻害剤である BI2536 が gatastatin と相乗的に細胞毒性を亢進させることを見出し、その時の形態などの詳細を報告してきた<sup>3)</sup>。そこでさらに gatastatin と相乗的な細胞毒性を示す薬剤を、標的分子が既知の阻害剤ライブラリーを用いて探索したところ、いずれもリン酸化酵素に対する阻害剤が 2 つ見出された。今回、この 2 つの阻害剤が、より  $\gamma$ -tubulin に対する特異性、及び阻害活性が高い gatastatin G2 との共処理でも相乗効果が得られるのか、また共処理時にどのような細胞形態が観察されるか、について検討を行った。

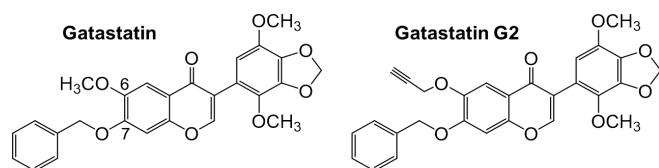


Fig.1 gatastatin と gatastatin G2 の構造

## 【材料と方法】

## (1) 細胞、及び培養条件

ヒト網膜色素上皮細胞 RPE-1 (Retinal Pigment Epithelial Cells) を用いた。10%FBS 含有の DMEM/Ham's F12 培地で、5% CO<sub>2</sub>、37°C 下で培養した。

## (2) 細胞増殖阻害試験

対数増殖期にある RPE-1 細胞を  $3.0 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L/well の細胞密度で 96 well plate に播種し、24 時間後に薬剤を 1% (v/v) 添加した。48 時間後、WST-8 を 10  $\mu$ L 添加して、1 時間 37°C で

インキュベートした後、450 nm の吸光度を測定した。薬剤未処理の細胞の吸光度を生存率 100% とし、薬剤処理を施した細胞の生存率を算出した。薬剤の共処理による効果の判別は、CompuSyn を用いて Combination Index (CI) を算出して行った<sup>4)</sup>。CI < 0.8 の場合に薬剤は相乗効果を、CI = 0.8~1.2 の場合は相加効果を、CI > 1.2 の場合は拮抗効果をそれぞれ示すと判断した。

## (3) 細胞形態観察

対数増殖期にある RPE-1 細胞を  $3.0 \times 10^4$  cells/mL/well の細胞密度で、12 well plate 内に予め置いた 15 mm  $\phi$  カバーガラス上に播種し、24 時間後に薬剤を 0.1% (v/v) 添加した。薬剤添加 24 時間後に細胞を -20°C メタノールで 7 分間固定した後、PBS で洗浄した。一次抗体 (anti- $\alpha$ -tubulin antibody 及び anti-pericentrin antibody) を 37°C で 60 分間処理した後、PBS 洗浄し、二次抗体を同様に 40 分間処理した。PBS 洗浄後、DNA 染色試薬を含むマウント剤で封入して、蛍光顕微鏡下で分裂期細胞を観察した。

## 【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する

## 【参考文献】

- 1) Chinen T., *et al.*, The  $\gamma$ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle. *Nat. Commun.*, **8722** (2015)
- 2) Shintani K., *et al.*, Structure optimization of Gatastatin for the development of  $\gamma$ -tubulin-specific inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.*, **11**, 1125-1129 (2020)
- 3) Ebisu H., *et al.*, Dual inhibition of  $\gamma$ -tubulin and Plk1 inhibitor induces mitotic cell death. *Front. Pharmacol.*, **11**, 620185 (2021)
- 4) Chou. T. C, and Talalay P., Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effect of multiple drugs on enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55 (1984)