



## Effects of hydroxy groups in the A-ring on the anti-proteasome activity of flavone

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-05-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山崎(中村), 佳寿美 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/3006">http://hdl.handle.net/10271/3006</a>

博士(医学) 山崎(中村) 佳寿美

論文題目

Effects of hydroxy groups in the A-ring on the anti-proteasome activity of flavone

(フラボンの抗プロテアソーム活性における A 環のヒドロキシル基の効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ユビキチン-プロテアソーム系は細胞内蛋白質分解の調節に重要な働きを担い、多くの細胞機能制御機構の一部を担い、その異常は細胞がん化やがん細胞の増殖に深く関係する。近年、ボルテゾミブ等のプロテアソーム阻害剤は新型の抗腫瘍薬として注目されており、多発性骨髄腫をはじめ、非ホジキンリンパ腫及び一部の固形腫瘍の治療に効果を示している。しかし、臨床に使用されているプロテアソーム阻害剤にはいくつかの副作用が認められ、より効果的ながん治療をするためには、副作用が少ないプロテアソーム阻害剤を開発することが必要である。

フラボノイド化合物は多くの植物に存在している。最近の研究で、一部のフラボノイドがプロテアソーム活性を抑制し、フラボノイドのプロテアソーム阻害剤としての可能性が示唆された。しかし、全てのフラボノイドが強くプロテアソームの活性を抑制するわけではない。どの様なフラボノイドが著明なプロテアソーム阻害効果を示すかは不明であった。そこで我々はフラボンに注目し、フラボンの化学的構造と抗プロテアソーム活性との構造活性相関について検討した。

[材料ならびに方法]

フラボンのうちアピゲニン、バイカレイン、クリシン、ルテオリン、スクテラレインについて検討した。プロテアソーム活性測定には蛍光標識された特異的なペプチド基質を使用した。プロテアソームの 3 つのプロテアソーム活性(キモトリプシン様、トリプシン様、ペプチジル-グルタミルペプチド加水分解様)それぞれに対応する特異的な基質は Succ-LLVY-AMC、Z-ARR-AMC、および Z-LLE-AMC を使用した。

マウスの肝臓や HCT-116 細胞(ヒト大腸がん由来細胞株)や Jurkat T 細胞(ヒト白血病 T 細胞株)から粗精製したプロテアソーム(50  $\mu$ g)に様々な濃度のフラボンを加え、反応させた。さらに上記のペプチド基質を反応液に加え、全量 200  $\mu$ l とし、基質の加水分解により遊離された蛍光色素(AMC)をモニタリングして、エンドポイントアッセイ方式でプロテアソーム活性の測定を行った。各種フラボンのプロテアソーム活性に対する抑制率(IC<sub>50</sub>)を算出した。対照群は MG-132(プロテアソーム抑制剤)を用いて、実験結果と比較し、検討をした。次に、プロテアソーム標的タンパク質であるユビキチン化 I $\kappa$ B- $\alpha$  の蓄積の有無について検討をした。各種フラボンを用いて、培養細胞と反応させ(24 時間)、細胞内ユビキチン化 I $\kappa$ B- $\alpha$  の変化をウエスタンブロットで分析した。また、別のプロテアソーム標的タンパク質であるサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質 p27 の蓄積についても同様に解析した。培養細胞を各種フラボンで処理し、以上

の実験結果を基に各種フラボンの構造とプロテアソーム阻害活性の関係を解析した。(マウスは浜松医科大学の実験動物委員会の承認のもと実験を行った。)

#### [結果]

アピゲニン、クリシン、ルテオリンは共にマウス肝臓と培養細胞由来のプロテアソームのキモトリプシン様活性とトリプシン様活性を著しく阻害した。一方、バイカレインとスクテラレインにおいては、抑制率 IC50 はいずれのプロテアソーム活性に対しても 500  $\mu$ M 以上であり、抗プロテアソーム効果は見られなかった。

各種フラボンが培養細胞内でプロテアソームの標的タンパク質(I $\kappa$ B- $\alpha$ とp27)の蓄積を示すか否かについて検討をした結果、Jurkat T 細胞においてルテオリン、アピゲニン、クリシンは、ユビキチン化 I $\kappa$ B- $\alpha$ タンパク質の蓄積効果を示し、細胞内でプロテアソームの阻害活性を持つことが確認できた。一方、バイカレインやスクテラレインではユビキチン化 I $\kappa$ B- $\alpha$ の蓄積は見られず、プロテアソーム阻害効果がないことがわかった。また、別のプロテアソームの標的タンパク質である p27 についても同様に、ルテオリン、アピゲニン、クリシンを Jurkat T 細胞に作用した場合、p27 の増加が確認されたが、バイカレインやスクテラレインではその効果は見られなかった。

これらのデータにより、他のフラボンとは異なり、バイカレインとスクテラレインはユビキチン-プロテアソーム経路に対して阻害効果を示さないことが判明した。

#### [考察]

これまでの研究より、ヒドロキシル化された B 環のフラボンはより強力なプロテアソーム阻害があることが報告されている。しかし、A 環のヒドロキシル基と抗プロテアソーム活性との間の関係は明らかにされていなかった。本研究では、同じフラボンに属するが異なる構造式を示すアピゲニン、バイカレイン、クリシン、ルテオリン、スクテラレインについて構造活性相関を解析した。プロテアソーム阻害活性を示さなかったバイカレインとスクテラレインは A 環の 5 位、6 位、7 位に 3 つの水酸基を持つ一方、阻害活性を示すルテオリン、アピゲニン、クリシンは、A 環の 5 位、7 位に 2 つの水酸基を持つ。以上の結果より、A 環の 5、6、7 位に 3 つのヒドロキシル基を有するフラボンは他のフラボンと違い、抗プロテアソーム活性機能が欠如していることが判明した。

#### [結論]

A 環の 5、7 位に 2 つのヒドロキシル基を持つフラボンは抗プロテアソーム活性機能を持つ一方、A 環の 5、6、7 位に 3 つのヒドロキシル基を持つフラボンは抗プロテアソーム活性機能が欠如している。A 環内の水酸基の数と位置は抗プロテアソーム機能に関係していると示唆された。これらの結果は、プロテアソーム阻害剤の開発に有益と考えられる。