

Mode of action studies on pentenediols and tamoxifen with mitochondria

(ペンテンジオール類およびタモキシフェンの ミトコンドリアにおける作用機構研究)

運天 優歩

【緒言】

酸化リン酸化に関与するミトコンドリアタンパク質は、プロトン駆動力を生む呼吸鎖酵素、ATP を合成する ATP 合成酵素、ATP や ADP を含む代謝物の膜輸送を担うミトコンドリア膜輸送体の 3 種類に大別される。これまでに多数の阻害剤が発見され、抗寄生虫薬や殺菌・殺虫剤の創薬標的として注目されている呼吸鎖酵素や ATP 合成酵素とは対照的に、ミトコンドリア膜輸送体に対する特異的阻害剤の報告は極めて限られている。そのため、ミトコンドリア膜輸送体に対する新規阻害剤の発見は新たな作用機序を持つ創薬シーズ化合物となることが期待される。本研究ではペンテンジオール (PTD) 類および抗がん剤タモキシフェン (TAM) の作用機構研究を進め、両化合物ともにミトコンドリア膜輸送体の一つである電位依存性アニオンチャンネル (VDAC) に結合することを明らかにした。

1. Mode of action study of pentenediol-type compounds (PTDs) in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria

(出芽酵母ミトコンドリアにおける PTD 類の作用機構研究)

出芽酵母より単離したミトコンドリアにおける“ADP 取り込み/ATP 排出”を指標として、所属研究室が保有する化合物ライブラリーからミトコンドリア膜輸送体の阻害剤となる候補化合物の探索を行った。その結果、ユニークなペンテンジオール構造を分子左端に持つ化合物群 (PTD 類) が、1 桁 μM レベルで“ADP 取り込み/ATP 排出”を顕著に阻害することを見出した。この阻害メカニズムを明らかにするため、呼吸鎖酵素、ATP 合成酵素に対する影響を精査した。その結果、呼吸鎖酵素や ATP 合成酵素に対する影響は認められなかったため、PTD 類はミトコンドリア膜輸送体を阻害していると予想し、ミトコンドリア内への ^{14}C ADP の取り込みに与える影響を評価した。その結果、PTD 類はミトコンドリア内への ^{14}C ADP の取り込みを抑制したため、ミトコンドリア膜輸送体を標的としていることが強く示唆された。

単離ミトコンドリアにおける PTD 類の標的分子を明らかにするため、分子右端にトシル基を持つ tPTD-023 を合成した。このトシル化学リガンドを単離ミトコンドリアと反応させることで、標的分子へ共有結合による末端アルキンの導入を行い、続くクリックケミストリーを行うことで蛍光タグ (TAMRA) を導入した。SDS-PAGE にてミトコンドリアタンパク質を分離したのちに蛍光検出を行ったところ、30 kDa 付近に単一バ

ンドを検出した。このバンドを切り出して in gel トリプシン消化を行い、MALDI TOF/MSにて定性分析を行ったところ、標識されたタンパク質は VDAC1 であることが強く示唆された。この蛍光標識が PTD-023 によって拮抗阻害を受けること、また VDAC1 欠損酵母より単離したミトコンドリアに対して同様の蛍光検出を行うと、蛍光バンドの完全な消失が確認されたことから、PTD-023 は VDAC1 を標的分子とすることが明らかとなった。

VDAC1 において末端アルキンが導入されるアミノ酸残基を探索するため、プロテアーゼなどを用いたペプチドマッピングを行った。その結果、VDAC1 が有する 2 つのシステイン残基が存在するペプチド断片が標識されており、システイン修飾剤である N-エチルマレイミド (NEM) による前処理で蛍光バンドが消失したことから、末端アルキンはシステインへ導入されている可能性が示唆された。VDAC1 の 2 つのシステイン (C130、C210) をアラニンへと置換した変異株よりミトコンドリアを単離し、同様の蛍光検出を行ったところ、末端アルキンは C130:C210 = 1:5 の比率で導入されていることが明らかとなった。

VDAC1 における PTD-023 の結合部位を明らかにするため、ヒト VDAC1 の構造を鋳型とした出芽酵母 VDAC1 のモデル構造を作成した。阻害活性に必須の構造であるジオール部は VDAC1 がもつ酸性アミノ酸残基と水素結合を形成すると予想し、tPTD-023 が修飾した 2 つのシステインの位置と PTD-023 の分子長 (約 23 Å) から結合可能な酸性アミノ酸残基 (D139、E152) を選抜した。VDAC1 の D139、E152 をアラニン残基に置換した変異株より単離したミトコンドリアを用いて、“ADP 取り込み/ATP 排出”に対する PTD-023 の感受性変化を調べたところ、二重変異株 (D139A/E152A) から単離したミトコンドリアでは、PTD-023 による阻害活性が約 30%程度軽減した。以上より PTD-023 は VDAC1 の D139 および E152 と水素結合により結合し、ミトコンドリア内外への ADP/ATP 輸送を阻害することが強く示唆された。

2. Mode of action study of tamoxifen in rat liver mitochondria

(ラット肝臓ミトコンドリアにおける TAM の作用機構研究)

TAM はエストロゲン受容体 (ER) のアンタゴニストとして見出され、ER 陽性乳がんに対する治療薬として長年用いられてきた。しかし最近になって、ER の有無に関わらず、その他のがん細胞に対しても細胞死を誘導し抗がん活性を示すことが報告されている。細胞死誘導の要因としてミトコンドリアにおける標的分子の存在が示唆されているが、そのメカニズムについては統一的な見解が得られていない。特に、細胞死誘導の初動鍵反応とされるミトコンドリア膜透過性亢進を抑制することが報告されており、がん細胞において細胞死を誘導するという見解と矛盾が生じる。そこで、ラット肝臓より単離したミトコンドリアに対する TAM の効果を再検証した。

はじめに、TAMがミトコンドリアのATP生産に与える影響を明らかにするため、ラット肝ミトコンドリアを用いて酸素消費、ADP取り込み/ATP排出、膜電位の形成を精査した。その結果、TAMはミトコンドリアのATP生産を阻害しないことが明らかになった。次に、膜透過性亢進に与える影響を明らかにするため、過剰の Ca^{2+} が誘導するミトコンドリアの膨潤とシトクロム *c* の漏出に対する効果を調べた。その結果、TAMはミトコンドリアの膨潤を抑制し、シトクロム *c* の漏出も抑制することが明らかになった。ミトコンドリアマトリックス内への Ca^{2+} 取り込みは、膜電位依存的にカルシウムユニポーターによって行われるため、TAMがカルシウムユニポーターを標的とすることで Ca^{2+} 輸送を阻害している可能性が考えられた。そこで、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込み活性を評価したところ、 Ca^{2+} の取り込み阻害は認められなかった。

ミトコンドリアマトリックス内に取り込まれた Ca^{2+} はリン酸カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) の形態で保持されることが知られており、リン酸によって保持されないフリー Ca^{2+} が増大すると膜透過性亢進が生じると考えられている。TAMはリン酸の輸送を促進することで、マトリックス内のフリー Ca^{2+} を減少させることにより膜透過性亢進を阻害していると仮説を立て、マトリックス内へのリン酸取り込みに与える影響を評価した。その結果、TAMはリン酸取り込みをわずかに促進することが明らかになり、TAMはリン酸輸送を促進することで膜透過性亢進を抑制すると結論した。

TAMがミトコンドリア膜透過性亢進を抑制することから、ミトコンドリアにおける標的分子の存在が示唆された。そこで、単離ミトコンドリアにおけるTAMの標的分子の同定を光親和性標識法によって行った。光反応性タモキシフェン pTAM1を合成し、ラットミトコンドリアを用いて光親和性標識実験を実施した結果、pTAM1はVDAC1およびVDAC3を特異的に標識した。この結果から、TAMはVDAC1およびVDAC3に結合することでミトコンドリア内部へのリン酸輸送を促進していることが示唆された。

【要約】

1. ユニークなペンテンジオール構造を持つPTD類が出芽酵母ミトコンドリアVDAC1のD139およびE152と水素結合し、ミトコンドリア内外へのADP/ATP輸送を阻害することを明らかにした。
2. 抗がん剤タモキシフェンはラット肝臓ミトコンドリアVDAC1およびVDAC3に結合し、ミトコンドリア内へのリン酸輸送を促進することで、過剰な Ca^{2+} が誘導するミトコンドリア膜透過性亢進を抑制することを明らかにした。