（第５号様式）

学位論文審査の結果の要旨

氏　　　名	芦田　能基
審　査　委　員	主査　川浪　康弘 副査　栁田　　亮 副査　山内　　聡 副査　手林　慎一 副査　西脇　　寿

論　　文　　名　Prediction of Binding Mode of Aplysiatoxin with Protein Kinase C and Development of a Synthetically-accessible Aplysiatoxin Analog
(アプリシアトキシンとプロテインキナーゼ C との結合様式の予測と合成が容易なアプリシアトキシンアナログの開発)

審査結果の要旨

発がんプロモーターは，プロテインキナーゼ C (PKC) の 8 種類のアイソザイム（conventional PKC: α, βI，βII，γ および novel PKC: δ，ε，η，θ）の C1 ドメイン（C1A および C1B）に結合して，これらのアイソザイムを活性化する．PKC は，がんやアルツハイマー病，HIV 治療薬の標的としても注目されている．発がんプロモーターはこういった医薬品開発のシーズとなりうるが，発がん促進および炎症誘導活性のため利用は困難とされてきた．最近，発がんプロモーターの一種 aplysiatoxin (ATX) の単純化アナログ Aplog 類が開発された．特に 10-Me-Aplog-1 は発がん促進および炎症誘導活性を示さないにもかかわらず，ATX と同等のがん細胞増殖抑制活性を示すため，新規抗がん剤シーズとして期待されている．しかし，合理的な化合物設計に必要な ATX と C1 ドメインとの詳細な結合様式が不明であり，また 10-Me-Aplog-1 の合成には最長直線工程数で 20 段階以上が必要である．申請者はこれらの問題を解決するため， ATX と C1 ドメインとの結合様式の推定と，それに基づく Aplog 類の構造のさらなる単純化に取り組んだ．

1)　ATX と PKC C1 ドメインとの結合様式の予測

ATX は C1 ドメインに結合して脂質二重膜に挿入するため，結晶構造解析や NMR による結合様式の解明が困難である．そこで，ドッキングシミュレーションと脂質膜中での分子動力学シミュレーションを行い，ATX の 28 位カルボニル基，31 位水酸基，20 位フェノール性水酸基が C1 ドメインと水素結合を形成しているモデルを得た．2 つの水酸基の結合に対する影響は過去の構造活性相関研究で示されていたものの，28 位と 1 位のカルボニル基の役割は不明であった．そこで，ATX のジヒドロキシペンタン酸部位を抽出した鎖状アナログを合成し，2 つのカルボニル基の役割を調べた．その結果，28 位エステル基を除去すると C1 ドメイン結合活性が消失したのに対して，1 位のカルボニル基を除去しても約 8 倍の活性低下にとどまった．計算で得られた複合体モデルの分子静電ポテンシャル計算と合わせて考えると，28 位エステル基は C1 ドメインと水素結合していること，1 位エステル基は C1 ドメインの結合部位に相補的な形状と静電ポテンシャルの形成に寄与していることが示唆された．

2)　スピロ環の一方を除去した desA-ring アナログの合成と生物活性評価

Aplog 類のスピロケタール部位はマクロラクトン環の配座制御において重要な役割を果たしているが，この部位の単純化はこれまで行われていなかった．そこで，推定した結合モデルを参考にして，18-deoxy-aplog-1 の 4 および 5 位メチレン基を除去したアナログを設計した．本アナログは最長直線工程数 11 段階で合成できた．NMR 実験と量子化学計算から本アナログは 18-deoxy-aplog-1 に近い立体配座を保持していることが明らかとなった．

本アナログは novel PKC に対しては 18-deoxy-aplog-1 と比較して 5–10 倍結合能が低下していたが，conventional PKC に対しては同等の結合能を保持していた．この結合選択性の変化は，分子疎水性度の低下のタンパク質/リガンド/脂質膜複合体の安定化に及ぼす影響が novel PKC では大きく，conventional PKC では無視できるほどなのが原因として考えられる．

次に，本アナログのがん細胞増殖抑制活性を 38 種類のヒトがん細胞株パネル試験により評価した．多くの細胞株に対する本アナログの増殖抑制活性は 18-deoxy-aplog-1 から低下していたものの，肺がん細胞株 HBC-4 および胃がん細胞株 MKN45 に対しては有意な増殖抑制活性を保持していた．この結果は，これらの細胞株に対する aplog 類の増殖抑制活性には novel PKC よりも conventional PKC の関与が大きい可能性を示唆している．

以上のように，ATX と PKC C1 ドメインとの詳細な結合様式を初めて推定し，それに基づく分子設計により，これまでの約半分の直線工程数で合成可能なアナログの開発に成功した．本アナログは肺がん細胞株 HBC-4 に対して若干選択的に増殖抑制活性を示すため，新たな抗がん剤開発のリード化合物として期待される．

本論文の公開審査会は平成 31 年 2 月 9 日愛媛大学農学部で開催され，申請者の学位論文の口頭発表およびこれに関する質疑応答が行われた．引き続いて開催された学位論文審査委員会において，学位論文の内容を慎重に審査した結果，審査委員全員一致して博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した．