

平成 22 年度修士論文

抗腫瘍性色素ヴィオラセインのプロテインキナーゼへの作用

Effects of an antitumor pigment violacein on protein kinases

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻

物質・環境システム工学コース

1135001 梶原 亜紀

## 概要

本研究室では、「室戸海洋深層水」より青紫色素 ヴィオラセイン産生細菌 *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 株を分離した。ヴィオラセインは、抗生作用や抗原虫作用をもつ色素として知られており、最近ではヒト白血病細胞に対するアポトーシス誘導作用が報告されている。さらに本研究室の細川らは、ヴィオラセインによって誘導される白血病細胞のアポトーシスが、細胞内シグナル伝達酵素プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化剤 (ホルボールエステル) によって抑制されることを示した。これはヴィオラセインによる直接的または間接的な PKC 活性の抑制がアポトーシスを引き起こす可能性を示唆するものである。そこでヴィオラセインが PKC をはじめとするプロテインキナーゼに及ぼす作用を検証するため、精製プロテインキナーゼに直接ヴィオラセインを添加したときの酵素活性の変化を測定した。

プロテインキナーゼとして組換え型精製酵素であるプロテインキナーゼ A (PKA) 触媒サブユニット、PKC 触媒サブユニット、チロシンキナーゼ (PTK)、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaM Kinase) を用いた。基質として  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と各酵素の特異的ペプチド基質を使用し、ペプチドのリン酸化を測定することによって酵素活性を測定した。その結果、ヴィオラセインは PKA、PKC の酵素活性に対しそれぞれ  $\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$ 、 $\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$  の阻害作用を示した。しかし、PTK、CaM Kinase に対する阻害作用はほとんどないか、わずかであった。

またヴィオラセインによる PKA の阻害作用とアポトーシスの関係を明らかにするため、PKA 活性化剤である dibutyl-cAMP をヴィオラセインと共に白血病細胞 U937 に添加し、アポトーシスの指標である DNA 断片化を調べた。その結果、dibutyl-cAMP によるアポトーシス抑制効果は見られなかった。このことから、PKA 活性の阻害はアポトーシスの直接的な原因ではないと考えられた。以上の結果より、ヴィオラセインによる白血病細胞のアポトーシスは、PKC の阻害が端緒となり引き起こされる可能性

が考えられた。

ヴィオラセインは、その生合成経路と化学構造が PKC の強力な阻害剤であるスタウロスポリンと類似している。両者ともトリプトファンから合成が始まり、共通の中間体を経てヴィオラセイン又はスタウロスポリンが合成される。また、インドール環を2つ併せ持つという構造上の共通点もある。本研究によって、生合成と化学構造の類似性に加え、ヴィオラセインはスタウロスポリンと同様に PKC 阻害作用を持つことが見いだされた。