

## V-ATPase阻害剤とpHと細胞増殖阻害

|       |   |
|-------|---|
| 著者    | 大熊 勝治   |
| 著者別表示 | Ohkuma Shoji  |
| 雑誌名   | 平成15(2003)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B)<br>研究成果報告書  |
| 巻     | 2002-2003   |
| ページ   | 8p.   |
| 発行年   | 2004-03   |
| URL   | <a href="http://doi.org/10.24517/00057173">http://doi.org/10.24517/00057173</a> |



# V-ATPase阻害剤とpHと細胞増殖阻害

研究課題番号：14370741

平成14～15年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成16年 3月

研究代表者 大熊勝治  
(金沢大学薬学部教授)

金沢大学附属図書館



0400-04997-X

KAKEN  
2003  
24

# V-ATPase阻害剤とpHと細胞増殖阻害

(課題番号：14370741)

平成14～15年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成16年 3月

研究代表者 大熊勝治  
(金沢大学大学院薬学部教授)

平成14～15年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

課題番号 14370741

研究課題 V-ATPase阻害剤とpHと細胞増殖阻害

研究組織

研究代表者：大熊勝治（金沢大学・薬学部・教授）

研究分担者：横山 謙（科学技術振興事業団・吉田ATPシステム  
プロジェクト・研究員）

研究分担者：太田哲生（金沢大学・医学部・助教授）

研究分担者：染井正徳（金沢大学・薬学部・教授）

研究分担者：畑中保丸（富山医科薬科大学・薬学部・教授）

|      |        |        |    |
|------|--------|--------|----|
| 研究経費 | 平成14年度 | 7,200  | 千円 |
|      | 平成15年度 | 5,500  | 千円 |
|      | 計      | 12,700 | 千円 |

## はじめに

近年、細胞増殖・癌化・分化・細胞死等に対する空胞系酸性顆粒の役割が注目されているが、その詳細は明らかになっていない。我々は、これまでに、bafilomycin A<sub>1</sub> (V-ATPaseの選択的阻害剤) が各種細胞の増殖を阻害し、細胞死 (アポトーシス) を引き起こすこと、同時に、PC12細胞を神経様細胞に、M1細胞をマクロファージ様細胞に、それぞれ分化誘導することを見いだした。我々はまた、浸潤性悪性膵癌においては、16kDa プロテオリピド (V-ATPaseのサブユニットの一つ) が異常に高発現していること、そしてbafilomycin A<sub>1</sub> はヌードマウスに移植した膵癌細胞の増殖を強力に抑制することを発見した。更に、最近、V-ATPaseのプロトン輸送のみを特異的に阻害する新規脱共役剤として、プロジギオシンprodigiosin類を見出した。驚くべきことに、本化合物はbafilomycin A<sub>1</sub>とは全く異なる構造であるにも関わらず、同様の分化・細胞死誘導作用を示した。H<sup>+</sup>-ATPaseの中でもプロトンポンプ作用が重要であることを示している。細胞内pHは直接その生物作用発現に関与しないので、上記生物活性はV-ATPase (類似) タンパク質固有の機能と考えられる。

本研究においては、(1) V-ATPaseのプロトン輸送機構を分子レベルで明らかにすること、(2) bafilomycin A<sub>1</sub>等のV-ATPase阻害剤の増殖阻害、分化・細胞死誘導機構を明らかにすること、(3) V-ATPaseの細胞増殖機構を、アンチセンスオリゴや抗体等を用いて、明らかにすること、(4) 各種癌細胞を用いて、bafilomycin類やprodigiosin類V-ATPase阻害剤の癌特異性を明らかにすること、等を目指した。

まず、(1) 高度好熱菌V-ATPaseの遺伝子構造を明らかにする (*JBC* (2003) 278, 42686-91) と共に、それを利用して高純度に精製したV-ATPaseの遺伝子変異体を用いて、V-ATPaseが回転していることを示すことができた (*PNAS* (2003) 100, 2312-15)。高度好熱菌内では、V-ATPaseはF-ATPaseのようにATP合成に働いている可能性が強いので、今後、その関係の解明を図る。

(2) bafilomycin A<sub>1</sub>耐性細胞の単離に成功した。しかし、それらの細胞においてもbafilomycin A<sub>1</sub>でリソソームのpHは上昇した (当然NH<sub>4</sub>ClでリソソームのpHは上昇した)。prodigiosin類等によるアポトーシスは起ること等から、アポトーシスの能力に変化はないと思われる。NH<sub>4</sub>Clではアポトーシスは起らないので、bafilomycin A<sub>1</sub>類による細胞増殖阻害はリソソームや細胞質pHの上昇が原因とは考えられない。また、bafilomycin A<sub>1</sub>類がV-ATPase以外にも働いている可能性や、V<sub>o</sub>部分にはpHに関与する以外にもbafilomycin A<sub>1</sub>類等で阻害される別の機能が存在する可能性も考えられる。実際、bafilomycin A<sub>1</sub>類は細胞外からも働きうることを明らかにした (投稿準備中)。現在アフィティープローブを用いて結合分子を同定中である。また、アポトーシスのルートを解明すべく各種阻害剤等を用いて検討している。Caspase 3の活性化は起こっているようである。

(3) さらに、その一環としてV-ATPaseのサブユニットに対するアンチセンスオリゴ

を用いて検討したところ、プロテオリピドのアンチセンスオリゴのみ（主にネクローシスを介して）細胞増殖を阻害し、V<sub>1</sub>構成サブユニットである70 kDaに対するアンチセンスオリゴは殆ど細胞増殖を阻害しなかった（*Gene. Cell.* (2003) 8, 501-13）。現在、V-ATPaseに対する各種抗体を用いて検討中であるが、ほぼ同じ結果を得ている（V<sub>0</sub>サブユニットの抗体のみ細胞死を起こす。但し、細胞死はアポトーシス）。NH<sub>4</sub>Clでもこれらの作用は影響を受けなかったことから、アポトーシスに伴う細胞質pHの低下は、アポトーシスの原因と言うよりも結果である可能性が高いと思われる（投稿中）。また、tambjamineグループのBE-18591もH<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter活性を示し、胃粘膜プロトンポンプ阻害、破骨細胞分化の阻害、免疫細胞の増殖抑制、更にはNOG誘導やアポトーシス誘導作用を示した（*FEBS Lett.* 524, 37-42）。これらのことから、これら多彩な生理作用はH<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter活性によることが示唆された。しかしながら、同じくH<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter活性を示すtetrapyrroleは、増殖阻害や細胞死誘導作用はあるものの、NOG作用は示さなかった。別の空胞系プロトンポンプ阻害剤であるデストラキシンについても検討したところ、デストラキシンEのみNOG活性を示し、デストラキシンBは活性を殆ど示さなかった（投稿準備中）。

(4) パフィロマイシン類だけでなく、prodigiosin類も、ヒト膀胱癌細胞にアポトーシスを誘導するが、ヌードマウスに移植した膀胱癌細胞でもアポトーシスを引き起こすことが分かった。in vivoでもアポトーシスを誘導したことは、臨床応用上、極めて重大な発見であり、今後の研究の伸展が待ち望まれる。現在、各種の有機合成体を用いて、癌細胞抑制効果を見ているが、bafilomycin類やprodigiosin類以上に強い制癌作用を示すものは見い出していない。大腸癌等他の癌に種類を変えてみることも予定している。また、H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter活性もprodigiosin類以外には見い出していない。最近、bafilomycin類以外にもV-ATPaseを阻害する化合物が見い出されているので、それらの細胞増殖抑制効果や制癌効果も見る予定である。

平成16年3月  
金沢大学薬学部  
教授 大熊勝治

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Yokoyama, K., Fukumoto, K., Murakami, T., Harada, S., Hosono, R., Wadhwa, R., Mitsui, Y., and Shoji Ohkuma (2002) Extended longevity of *C. elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homologue of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett.* **516**, 53–57.
2. Arai, K., Yasuda, N., Isohashi, F., Okamoto, K., and Ohkuma, S. (2002) Inhibition of weak-base amine-induced lysis of lysosomes by cytosol. *J. Biochem.* **132**, 529–534.
3. Arai, K., Yoshida, S., Naito, S., and Ohkuma, S. (2002) GTP  $\gamma$  S-stimulated lysosomal lysis dependent on the assembly of adaptor protein on lysosome. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1125–8.
4. Tanigaki, K., Sato, T., Tanaka, Y., Ochi, T., Nishikawa, A., Nagai, K., Kawashima, H., and Ohkuma, S. (2002) BE-18591 as a new  $H^+/Cl^-$  symport ionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis. *FEBS Lett.* **524**, 37–42.
5. Yokogawa, K., Ishizaki, J., Ohkuma, S., and Miyamoto, K. (2002) Influence of lipophilicity and lysosomal accumulation on tissue distribution kinetics of basic drugs: a physiologically based pharmacokinetic model, *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* **24** (2), 81–93.
6. Yokoyama, K., Nagata, K., Imamura, H., Ohkuma, S., Yoshida, M., and Tamakoshi, M. (2003) Subunit arrangement in V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **278**, 42686–91.
7. Kurisu, M., Morita, M., Kashiwayama, Y., Yokota, S., Hayashi, H., Sakai, Y., Ohkuma, S., Nishimura, M., and Imanaka, T. (2003) Existence of catalase-less peroxisomes in Sf21 insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 169–76.
8. Zhan, H., Yokoyama, K., Otani, H., Tanigaki, K., Shirota, N., Takano, S., and Ohkuma, S. (2003) Different roles of proteolipids and 70-kDa subunits of V-ATPase in growth and death of cultured human cells. *Gene. Cell.* **8**, 501–13.
9. Tanigaki, K., Sasaki, S., and Ohkuma, S. (2003) In bafilomycin  $A_1$ -resistant cells, bafilomycin  $A_1$  raised lysosomal pH and both prodigiosins and

concanamycin A inhibited growth through apoptosis. *FEBS Lett.* **537**, 79–84.

10. Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M., and Yokoyama, K. (2003) Evidence for rotation of V<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2312–5.

## (2) 口頭発表

1. 河合昭典、中西珠栄、谷垣佳司、横山謙、高野秀一、大熊勝治（金沢大学・薬・生化学）CHO細胞を用いた酵母APG5及びAPG6のヒトホモログの機能解析 平成14年度 第75回日本生化学会大会、京都、2002年10月14日–17日
2. 谷垣佳司、大熊勝治（金沢大学・薬・生化学）耐性株を用いたBafilomycinA1の作用機序の検討 平成14年度 第75回日本生化学会大会、京都、2002年10月14日–17日
3. Hong Zhan<sup>1</sup>; Ken Yokoyama<sup>1</sup>; Keiji Tanigaki<sup>1</sup>; Hajime Otani<sup>3</sup>; Hiroshi Yamamoto<sup>2</sup>; Shoji Ohkuma<sup>1</sup> (1Fac. Pharmaceuti. Sci. and 2Med. Kanazawa Univ.; 3Kansai Med. Univ.) Cell proliferation and V-ATPase 平成14年度 第122回日本薬学会年会、千葉、2002年3月26日–28日。
4. 谷垣 佳司、Hong Zhan, 内田 和典、大熊 勝治。（金沢大・薬） HeLa細胞に対するBafilomycin A1の作用 平成14年度 第122回日本薬学会年会、千葉、2002年3月26日–28日
5. Hong Zhan<sup>1</sup>; Ken Yokoyama<sup>1</sup>; Keiji Tanigaki<sup>1</sup>; Hajime Otani<sup>3</sup>; Hiroshi Yamamoto<sup>2</sup>; Syuich Takano<sup>1</sup>; Shoji Ohkuma<sup>1</sup> (1Fac. Pharmaceuti. Sci. and 2Med. Kanazawa Univ.; 3Kansai Med. Univ.) Different roles of 16-kDa and 70-kDa subunits of V-ATPase in the proliferation and death of cultured human cells 平成14年度 第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002年12月11日–14日
6. 木村健二、高野秀一、横山謙、大熊勝治（金沢大学・薬・生化学） HSP70F高発現線虫における老化現象の観察 平成15年度 第56回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月14日–16日（ポスター発表）
7. 谷垣佳司、西川あさ子、濱口景子、大熊勝治（金沢大学・薬・生化学） V-ATPase阻害剤によるPC12細胞の分化・細胞死誘導機構 平成15年度 第56回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月14日–16日（ポスター発表）
8. Akinori Kawai, Shuichi Takano, Shoji Ohkuma Investigation of the



organelle degradation in autophagy using fluorescence (Division of Life Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University) 平成15年度 第76回 日本生化学会大会、横浜、2003年10月15日-18日 (ポスター発表、口頭発表)

9. 佐々木智、谷垣佳司、上田恵充 (金沢大・院・自然科学)、畑中保丸 (富山医薬大・薬)、大熊勝治 (金沢大・薬) コンカナマイシンの作用機序の検討 平成15年度 第109回日本薬学会北陸支部会例会、富山医薬大、2003年11月30日 (口頭発表)
10. 占紅1、大谷肇2、横山謙3、代田奈緒美1、蓮元憲祐1、谷垣佳司1、高野秀一3、大熊勝治3 (1金沢大院・自然科学、2関西医大、3金沢大・薬) 細胞増殖、細胞死とV-type H<sup>+</sup>-ATPase 平成15年度 第25回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、金沢、2003年11月13日-14日 (口頭発表)
11. 河合昭典1、高野秀一2、大熊勝治1,2 (1金沢大・自然科学研究科、2金沢大・薬) 蛍光を用いたオートファジーによる各オルガネラ分解の検討 平成15年度 第124年会 日本薬学会、大阪、2004年3月29日-31日 (ポスター発表)
12. 大継力1、占紅1、代田奈緒美1、横山謙3、高野秀一2、大熊勝治1,2 (1金沢大・自然科学研究科、2金沢大・薬、3ERATO) V-ATPaseのVo proteolipidに対する抗体は細胞死を起こす 平成15年度 第124年会 日本薬学会、大阪、2004年3月29日-31日 (ポスター発表)
13. 木村健二1、高野秀一2、大熊勝治1,2 (1金沢大・自然科学研究科、2金沢大・薬) HSP70F高発現線虫における寿命と形態観察 平成15年度 第124年会 日本薬学会、大阪、2004年3月29日-31日 (ポスター発表)