

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 30 年 4 月 29 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所 属 機 関・部 局 名 兵庫医療大学・薬学部  
職 名 講師  
研 究 代 表 者 名 清水 忠

下記のとおり平成29年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:291004)

|                  |                                                                                                   |        |                        |       |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------|-------|
| 1. 共同利用研究<br>課題名 | アリピプラゾールおよび生体内代謝物の新規神経膠芽腫抑制作用のメカニズム解析                                                             |        |                        |       |
| 2. 共同利用研究<br>目的  | 本研究目的において、申請代表者の経験が浅い分子生物学アプローチの実験に関して、バイオシグナル総合研究センターの研究者が有する卓越した技術を活用することで目的とする成果を研究期間内に達成するため。 |        |                        |       |
| 3. 共同利用研究<br>期間  | 平成 29 年 4 月 1 日    ～    平成 30 年 3 月 31 日                                                          |        |                        |       |
| 4. 共同利用研究組織      |                                                                                                   |        |                        |       |
| 氏 名              | 所属部局等                                                                                             | 職名等    | 役 割 分 担                |       |
| (研究代表者)<br>清水 忠  | 兵庫医療大学薬学部                                                                                         | 講師     | 研究統括、化合物合成・評価、細胞イメージング |       |
| (分担研究者)          |                                                                                                   |        |                        |       |
| 5. センター内受入研究者    | 研究部門・<br>分野名                                                                                      | 分子薬理分野 | 氏 名                    | 斎藤 尚亮 |

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号::291004)

#### 6. 共同利用研究計画

本研究では、ARP および主代謝物 OPC の細胞増殖抑制活性発現に関わる周辺蛋白質を明らかにすることを目的としている。予備的検討において、ARP はドーパミン D<sub>2</sub> 受容体のパーシャルアゴニスト活性を有するが、D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬や種々の細胞死シグナル抑制剤による減弱効果が確認されないため、ARP および OPC の抗癌作用は、D<sub>2</sub> 受容体や細胞死シグナルが関与しないことが示唆されている。さらに、ARP および OPC は増殖抑制のみならず走化抑制作用を示すことも見出している。

申請代表者は、形態学的な特徴および走化抑制作用などから、ARP および OPC の作用は細胞骨格系蛋白質の関与があると考え、本共同研究では、抗体染色により F-actin と G-actin の重合もしくは脱重合などを中心に絞り込みを行う。絞り込みが終わった後は、細胞周期および細胞骨格系蛋白質のリアルタイム変化を観察する。

さらに、申請代表者のこれまでの合成研究経験を活かし、ケミカルバイオロジー手法による結合蛋白質の同定を行う。具体的には、ARP と同等の活性を持つ蛍光プローブを合成し、誘導体の細胞内局在を明らかにする。

#### 7. 共同利用研究の成果

本研究開始時は、ARP の膠芽腫細胞 U251 での細胞増殖抑制活性のみのデータしか得られていなかったが、29 年度の研究で膠芽腫細胞 U87 および T98G に対しても同様な増殖抑制活性を確認した。まずは、U251 細胞において、増殖抑制活性に対する細胞周期の影響を検討したところ、コントロール群と ARP 群で細胞周期の変化に差は見られなかった。そこで次に、細胞骨格タンパク質の影響をアクチンフィラメントおよび単量体アクチンに対する蛍光染色を検討した結果、コントロール群に比べ、ARP 処理群の細胞において、アクチンフィラメントの割合が低下していることを見出した。この結果から、細胞骨格に関与するシグナル伝達系のタンパク質の発現もしくはリン酸化蛋白質の増減に関して、7 種類関連蛋白質を選定し、ウェスタンブロッティングを試みた。しかしながら、現時点ではコントロールと大きく変化のある蛋白質は見出されておらず、引き続き検討を行う予定である。

一方、ケミカルバイオロジー手法からのアプローチでは、ARP 蛍光およびビオチンプローブを合成するにあたり、活性を減弱しないリンカー接続部位を見出すため、構造活性相関研究を行った。ARP を 3 つのパートに分け、20 化合物程度を合成して、U251 細胞に対する活性を検討したところ、ARP の活性を 3 倍程度上回る誘導体 HUHS2009 を見出した。そこで、HUHS2009 の構造を基に、プローブ化化合物をデザインし、現在、7 工程を経て合成可能なプローブ化誘導体の合成ルートを確立し、5 段階目までの合成を完了している。引き続き、ARP 蛍光およびビオチンプローブ合成を進め、細胞内局在等の検討を行っていく予定である。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

なし。

#### 9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

なし。