

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12743

研究課題名(和文)ゲルダナマイシンの神経保護作用の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of neuroprotective activity of geldanamycin

研究代表者

西川 俊夫(NISHIKAWA, Toshio)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：90208158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：HSP-90の強力な阻害剤ゲルダナマイシン(GA)は、低濃度で神経保護作用を示す。我々はHSP-90との結合に重要な7位のカルバモイル基を除去した誘導体(DCGA)がGAと同等の神経保護作用を示す事を見いだした。そこで、DCGAにビオチンを結合させた2種の分子を使って、DCGAが示す神経保護作用の機構を研究した。細胞抽出液から結合タンパクを探索したが、HSP-90以外の有為に結合するタンパクは見つからなかった。また、プロテオーム解析でもGAとDCGA間で有為な差はなかった。以上の結果より、DCGAの示す神経保護作用はHSP-90への結合によって引き起こされていると結論した。

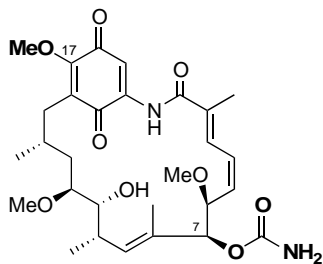
研究成果の概要(英文)：Geldanamycin (GA), a potent inhibitor of HSP-90, shows neuroprotective effect in a low concentration. We found that an analog that removed the carbamoyl group at the 7 position also show a potent neuroprotective activity. Thus the purpose of this research is to elucidate an unknown mechanism of this neuroprotective activity by GA. We synthesized two probe molecules which contains biotin-linker on the basis of SAR of DCGA. However, pull-down assay using this biotin-probes did not give any new proteins. Proteome analysis does not show the difference between GA and DCGA. Thus we concluded that the neuroprotective effect by GA is induced by its binding to HSP-90 although the binding is very weak.

研究分野：有機化学

キーワード：ゲルダナマイシン 神経保護作用 Hsp-90 標的同一 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ゲルダナマイシン(GA)は、抗カビ、抗腫瘍性活性を示す抗生物質で、シャペロンタンパクの一つ Hsp-90(熱ショックタンパク90)の強力な阻害剤である。GA の示す抗腫瘍活性は、複数の腫瘍形成シグナルタンパクの成熟に重要な役割を果たす Hsp-90 の阻害によると考えられ、GA のアナログ 17-AAG や 17-DMAG が、一時 抗癌剤として開発が進められたが、毒性の問題で開発が断念された。現在 GA とそのアナログは Hsp-90 の阻害剤として細胞生物学実験で広く使われている。



GA (1, geldanamycin)

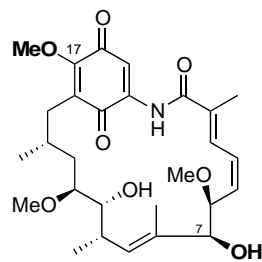
一方で、GA は細胞毒性を示さない極低濃度で神経保護作用を示す事が報告されてきた。現在、この神経保護作用は、GA が Hsp-90 の機能を阻害することによって、Hsp-70 発現が誘導されることによると考えられている(K. A. Gallo, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 115.)。

我々は、S. Tadtong 博士(タイ チュロンコン大学)らと共同で P-19 細胞に対する神経保護作用(抗がん剤タキソールによる細胞毒性軽減)を指標にした GA の構造活性相関を研究している際に、17 位のアルコキシ基(OR)が極めて重要で、抗がん剤として開発された 17-AAG は、弱い神経保護活性しか示さない事に気が付いた(S. Tadtong et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2939.)。GA による Hsp-90 の阻害には、これまでの構造活性相関研究から、7 位カルバメートが必須で、17 位 OMe をアミノ基などの置換基へ変換しても大きな影響はないことが分かっている(Y. L. Janin, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7503.)。従って、GA の示す神経保護作用に 17 位周辺の構造が重要であるという我々の実験結果は、GA の神経保護作用が、通説である Hsp-90 の機能阻害によらない可能性を示唆していると考えた。

2. 研究の目的

GA の 7 位カルバメートは、GA と Hsp-90 の共結晶の X-線結晶構造から N-末端ドメインにある ATP 結合部位のアミノ酸残基

と水素結合する重要な構造であることが分かっている(例: C. E. Stebbins et al. *Cell* **1997**, *89*, 239.)。そこで、我々は 7 位カルバメートを除去した DCGA を合成して生物活性を調べたところ、DCGA は GA と同等の神経保護作用を示すが、細胞毒性は示さない、すなわち Hsp-90 を阻害しないらしいことを明らかにした(未発表)。本研究では、DCGA 誘導体を使って、神経保護作用発現の新たな分子機構、特に標的タンパクを明らかにする事を目的とした。



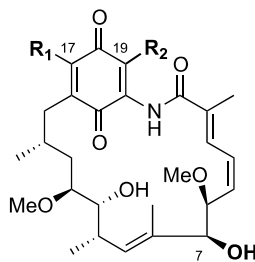
7-decarbonyl-GA(2, DCGA)

3. 研究の方法

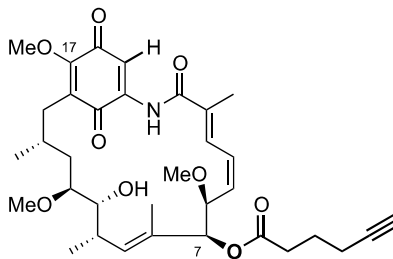
(1) DCGA の構造活性相関研究

DCGA 類縁体の合成

まず、GA を *t*-BuOK で処理することで脱カルバモイル化して得られる DCGA を使って、数種類の化合物を合成した。化合物 3-6 は、キノン部分の構造活性相関をみるために、化合物 8 は 7 位の置換基効果をみるために合成した。



- DCGA (2): R₁ = OMe, R₂ = H
- 化合物 (3): R₁ = NH-CH₂-CH=CH₂, R₂ = H
- 化合物 (4): R₁ = NH-CH₂-CC-H, R₂ = H
- 化合物 (5): R₁ = NH-CH₂CH₂-CCH, R₂ = H
- 化合物 (6): R₁ = OMe, R₂ = OMe



化合物 (8):

生物活性評価

・細胞毒性：PC12D 細胞を使って、合成 DCGA 誘導体を加え、Trypan- Blue dye exclusion assay によって評価した。
・神経保護活性：PC12D 細胞を NGF の添加によって分化させ、48 時間後に細胞死誘導剤として MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) を添加、合成 DCGA 誘導体を共処理し細胞死の回復を見た。評価は、Trypan- Blue dye exclusion assay、Lactose dehydrogenase (LHD) assay、PI stain の 3 つの方法によって行った。

・Hsp-90 の阻害活性評価：NGF によって分化させた PC12D 細胞に、合成 DCGA 誘導体を添加し、Hsp-90 の阻害マーカである Hsp-70 の発現上昇を Western Blot 法にて評価した。

(2) 標的同定

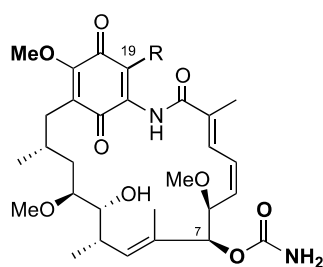
上記生物活性評価によって神経保護活性を示すが Hsp-90 の機能阻害をしない合成 DCGA 誘導体を選んで、ビオチンタグを付けた分子プローブを作成し、標的タンパクの探索を行う。

4. 研究成果

(1) DCGA の構造活性相関

DCGA 類縁体の合成：

研究方法に記した類縁体の他、GA の 19 位に置換基を導入した類縁体 (9, 10) も合成した。



GA (1) R = H
化合物 (9): R = OMe
化合物 (10): R = SCH₂-PhMe

生物活性評価：

・細胞毒性：GA に比べ、合成 DCGA 誘導体はいずれも、10-100 倍以上の濃度でも細胞毒性を示さなかった。特に、化合物 3, 6, 8 が低毒性であった。

・神経保護活性：

・Trypan-Blue dye exclusion assay の結果：

DCGA 類縁体 3, 4, 5, 8 に有為な細胞死回復活性が見られた。

・Lactose dehydrogenase (LHD) assay の結果：化合物 2, 3, 4, 5, 8 に有為な細胞死回復活性が見られた。

・PI stain の結果：DCGA 類縁体 2, 3, 4, 5, 6, 8 に有為な細胞死回復活性が見られた。

以上の結果から、DCGA 類縁体 3, 4, 5, 8 に大きな神経保護活性があることが分かった。

Hsp-90 の阻害活性評価：GA (1) とその誘導体 9 にその阻害が見られたが、それ以外の化合物にはその阻害が見られなかった。

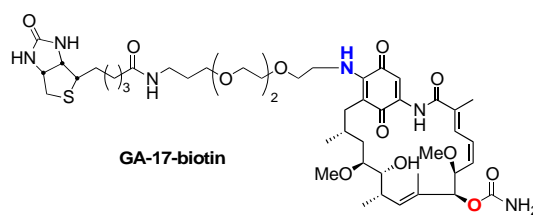
構造活性相関：

以上の結果は、GA とその誘導体の示す神経保護活性と Hsp-90 の阻害活性には関係がないことを示している。従って、GA の神経保護作用は、Hsp-90 を介さない未知の機構によって発現している可能性が高いと考え、次に DCGA の結合タンパクの探索を行うことにした。

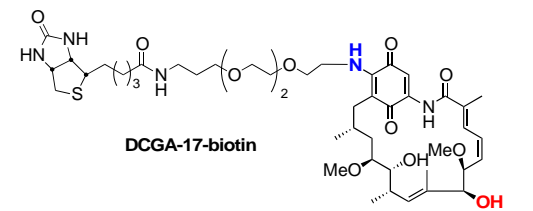
(2) 標的同定

ビオチンプローブの合成

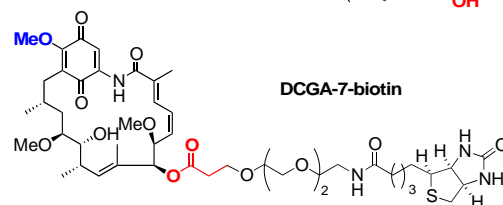
まず、GA と DCGA の 17 位にビオチンリンカーを結合させた 2 つのプローブ分子 GA-17-biotin と DCGA-17-biotin を合成した。また、上記の構造活性相関研究から、DCGA の未知のタンパクとの結合には、HSP-90 との結合に重要とされた 7 位カーバメートが必要ないことが分かったので、この部分にビオチンタグを結合させたプローブ分子 DCGA-7-biotin を合成した。



GA-17-biotin



DCGA-17-biotin



DCGA-7-biotin

プルダウン実験：

上記で合成したプローブ分子を使って、NGF によって分化させた PC12D 細胞の破砕液から DCGA-7-biotin あるいは DCGA-17-biotin に特異的に結合するタンパクを探索した。しかし、プルダウン実験の結果、検出されるタンパクは、Hsp-90 のみであった。

Hsp-90 との結合の評価

そこで、DCGA と Hsp-90 の結合性を直接評価することにした。まず Hsp-90 をクローニングし、大腸菌で GST-Hsp-90 として発現させた。これを使って上記のビオチンリンカーを結合させた分子プローブとの結合を GST-抗体を用いた Western-Blotting によって検出し、その結合性を観測した。その結果、いずれも GA と比べて圧倒的に弱いながら、Hsp-90 に結合することが明らかになった（以上、生物活性評価と標的特定の実験は、慶応大学、井本正哉教授との共同研究）。

プロテオーム解析

HeLa 細胞に GA と DCGA を投与して、蛍光ディフェレンシャルゲル 2 次元電気泳動（2D-DIGE）を使って、蛋白質の発現量の差を網羅的に調べた。また、ChemProteoBase のデータベースを使って解析を行った。その結果、有為な差は認められなかった（以上のプロテオーム解析は、理研、長田裕之博士、室井誠博士との共同研究）。

結論：

以上の結果より、DCGA は弱いながらも Hsp-90 に結合することが明らかになった。この結合の弱さは、7 位のカルバメート基の欠損によるものだが、弱いながらも Hsp-90 に結合することで、Hsp-70 が誘導され、神経保護作用が発現するという従来の機構が再確認されたと考えている。一方で、DCGA 類が神経保護作用を示すという知見は、細胞毒性の弱い神経疾患の治療薬のリードとしての可能性を示すものとして注目される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. Adachi, M.; Miyasaka, T.; Hashimoto, H.; Nishikawa, T. One-step Transformation of Trichloroacetamide into Isonitrile. 査読有 *Org. Lett.* **2017**, *19*, 380-383. (DOI: 10.1021/acs.orglett.6b03583).

2. Adachi, M.; Miyazawa, Y.; Nishikawa, T. Improved Syntheses of (+)-Iridomyrmecin and (-)-Isoiridomyrmecin, Major Components of Matatabilactone. 査読有 *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 883-886.

3. Nakazaki, A.; Mori, A.; Kobayashi, S.; Nishikawa, T. A Divergent Approach to the Diastereoselective Synthesis of 3,3-Disubstituted Oxindoles from Atropisomeric *N*-Aryl Oxindole Derivatives. 査読有 *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 3267-3274. (DOI: 10.1002/asia.201601183)

4. Adachi, M.; Torii, M.; Nishikawa, T. Stereocontrolled Synthesis of ABC-Tricycle of Solanoclepin A. 査読有 *Synlett* **2015**, 965-969. (DOI:10.1055/s-0034-1380399)

5. Nakazaki, A.; Miyagawa, K.; Miyata, N.; Nishikawa, T. Synthesis of a C-N Axially Chiral *N*-Aryl Isatin through Asymmetric Intramolecular *N*-Arylation. 査読有 *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 4603-4606. (DOI: 10.1002/ejoc.201500593)

6. Kimura, R.; Sawayama, Y.; Nakazaki, A.; Miyamoto, K.; Uchiyama, M.; Nishikawa, T. Unexpected Metal-Free Transformation of gem-Dibromomethylenes to Ketones under Acetylation Conditions. 査読有 *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 1035-1041. (DOI: 10.1002/asia.201403277)

〔学会発表〕（計 7 件）

1. Toshio Nishikawa, Yushi Hirata, Atsuo Nakazaki: Biomimetic Synthesis & Structure Determination of Biologically Active Steroidal Natural Products. The 1st A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub (Fukuoka, Japan) 2016.9.22-2016.9.24.

2. Toshio Nishikawa: Synthesis of Biologically Active Natural Products by Means of Cascade Reactions. ACP Lectureship Tour (invited by China), 1) Sichuan University, Sichuan; 2) Yunnan University, Yunnan; 3) Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai, China. 2016.10.31-2016.11.5.

3. 西川俊夫: 連続環化反応を使った天然物合成。「静岡発のケミカルバイオロジー研究」静岡三大学連携講義（フロンティア科学特論 II）B-nest（静岡）2016.12.27.

4. 西川俊夫: 天然物合成と構造決定。静岡大学講演会（静岡）2015.4.24.

5. Toshio Nishikawa: Biomimetic Synthesis of Biologically Active Steroidal Natural Products. Kick-off Symposium on Advanced Research

Network for Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (Tohoku University, Japan) 2015.8.25-2015.8.26.

6. Toshio Nishikawa : Syntheses of Biologically Active natural products by Means of Cascade Reactions. The 6th Japanese-Sino Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists (Sendai, Japan) 2015.9.6-2015.9.9.

7. Toshio Nishikawa : Syntheses of Guanidine-containing Natural Products Aiming at development of Ion-channel Blockers. 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2015) (JEJU, KOREA) 2015.10.18 -2015.10.21.

〔図書〕(計2件)

1. 西川俊夫 : 「フグ毒の科学」天然物の化学—魅力と展望—(上村大輔編) 東京化学同人 2016, pp 83-90.

2. 西川俊夫 : 官能基の保護。第2版有機合成実験法ハンドブック(有機合成化学協会編)。丸善出版株式会社 2015, pp 315-319.

〔その他〕

研究室ホームページ:

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~organic/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 俊夫 (NISHIKAWA, Toshio)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号 : 9 0 2 0 8 1 5 8

(2)連携研究者

井本 正哉 (IMOTO, Masaya)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号 : 6 0 2 1 3 2 5 3

(3)研究協力者

長田 裕之 (OSADA, Hiroyuki)

理化学研究所 環境資源科学研究センター
ケミカルバイオロジー研究グループ・グループディレクター

研究者番号 : 8 0 1 6 0 8 3 6

室井 誠 (MUROI, Makoto)

理化学研究所 環境資源科学研究センター
ケミカルバイオロジー研究グループ・専任研究員

研究者番号 : 8 0 1 6 1 1 6 8