

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 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：15K12751

研究課題名(和文) GSTを標的とする分子プローブの開発

研究課題名(英文) Development of molecular probe for GST

研究代表者

阿部 洋(Abe, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：80415067

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)：ガン細胞で過剰に発現し、抗ガン剤耐性に寄与しているグルタチオン S トランスフェラーゼは複数のサブタイプがあり、ガン細胞によって発現しているサブタイプが異なる。本研究では GST のサブタイプ特異的なプローブの開発を目指し、グルタチオンの誘導体を設計・合成した。アミノ酸と共有結合を形成する誘導体を合成して検証を行ったところ、サブタイプ特異性を示唆する構造が得られた。また、グルタチオンのグリシン残基に蛍光分子またはビオチンをつけた誘導体でも GST に結合することを確認した。

これらの知見は、GST サブタイプ特異的なプローブ開発につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Glutathione S transferase (GST) is one of highly expressed enzymes in cancer cells. The subtype of this enzyme depends on the cancer species. Though the determination of the cancer species by detecting GST subtype is thought to contribute to cancer therapy, the GST probe with subtype specificity remains to be developed. As fundamental step for developing the subtype-specific probe, glutathione derivatives were designed and synthesized and those subtype specificities were evaluated.

We synthesize glutathione derivatives with fluorescent group or the functional group forming covalent bond with amino-acid residue. Using this derivative, we discovered the structure for the subtype-specificity. In addition, we succeeded in a synthesis of derivatives with several chemical groups at glycine residue in glutathione without reduction of GST binding ability. These results are thought to promote the development of probes with GST substrate specificity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：酵素 生理活性 イメージング

1. 研究開始当初の背景

グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) はグルタチオンと様々な基質が結合できるポケットを持っており、結合した基質に対して、チロシン残基がグルタチオンのシステイン残基からプロトンを引き抜くことで、グルタチオンのチオール基が基質を求核攻撃し、共有結合を介して基質にグルタチオンを結合させる酵素である。グルタチオンが付加された基質はトランスポーターによって細胞外に排出されることが知られている (Figure 1)。そのため、グルタチオンが抗がん剤などの薬剤の排出に関わり、がん細胞における抗がん剤耐性に寄与していることが知られている。また、がん細胞に多く発現していることもこれまでの研究で報告されている。GST には α 、 μ 、 π などと複数のサブタイプが存在することが知られている。各サブタイプの立体構造は決定しており、グルタチオン結合部位は共通していることが知られている。また、がん細胞によって発現している GST のサブタイプが異なるため、GST サブタイプからがん細胞の同定が期待できる。しかし、これまで GST のサブタイプ特異的なプローブは報告されていなかった。

2. 研究の目的

前項に記載した通り、GST のサブタイプ特異的なプローブはがん診断等に有用にも関わらず、未だ開発されていない状況である。本研究課題の目的は、GST のサブタイプ特異的なプローブを開発するための基盤を構築することにある。我々は GST に対する特異性を保持するためにグルタチオン骨格を基

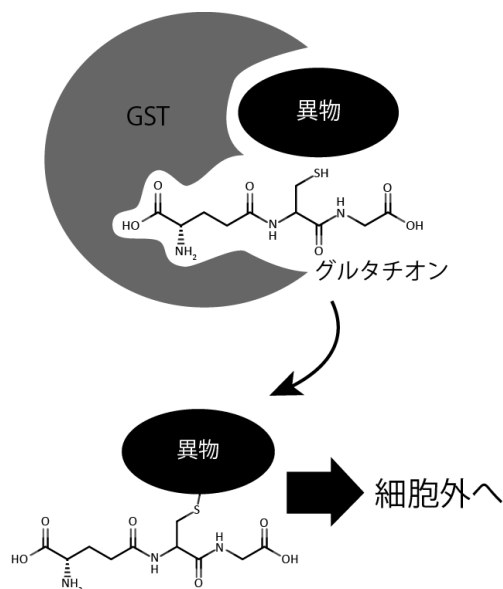


Figure 2 GST の機能

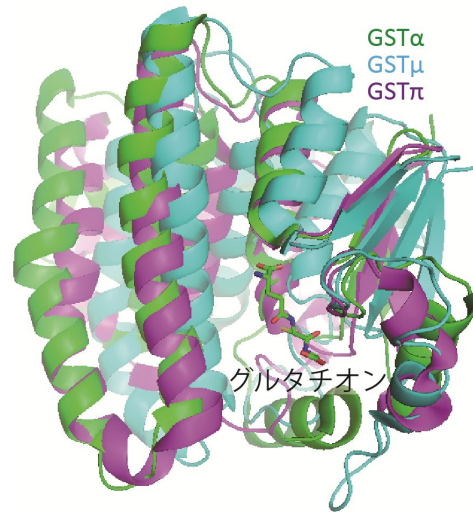


Figure 1 ヒト由来 GST の比較

盤とした各種誘導体を設計・合成した。具体的には蛍光化合物を持つグルタチオン誘導体を開発することとサブタイプ特異性を発揮する構造を決定することである。

3. 研究の方法

本研究課題ではグルタチオンに蛍光物質および共有結合性の官能基を導入したグルタチオン誘導体を設計・合成し、これらの物性を調べるとともに、GST に対する活性を評価した。

蛍光化合物を持つグルタチオン誘導体の合成には、グルタチオンの基本骨格を合成する際に蛍光化合物が導入可能な反応残基を導入し、蛍光をもつクマリンの誘導体を導入した。

共有結合性のグルタチオン誘導体の合成の際は、グルタチオンに共有結合を形成する官能基を含む炭素鎖を反応させることでグルタチオン誘導体を合成した。また、合成した各化合物の検証は、質量分析計と NMR を用いて行った。

化合物の検証は、精製したヒト由来 GST タンパク質を用いて行った。各サブタイプのヒト由来 GST タンパク質を大腸菌内で過剰発現させ、超音波破碎によって抽出し、グルタチオンを固定した樹脂を用いることで調製した。精製標本の純度は SDS-PAGE による電気泳動で確認した。合成したグルタチオン誘導体と GST との結合能の評価については、天然のグルタチオンに対する競合を見ることを行った。

4. 研究成果

GST にはグルタチオンの結合する G 部位とグルタチオンが付加される基質が結合する H 部位の二つが存在する。このうち、H 部

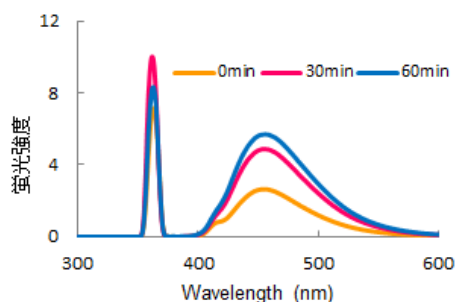


Figure 3 誘導体のリン酸緩衝液における蛍光スペクトル変化

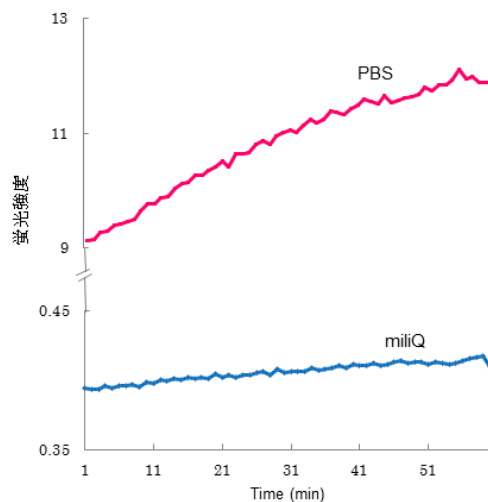


Figure 4 溶媒による蛍光変化の比較

位は基質特異性が低い。そこで本研究課題では、GST 特異的に結合する誘導体を合成するために、特異性の高い G 部位に着目し、グルタチオンを基本骨格とする化合物を設計した。すでに報告されているヒト由来の GST の結晶構造を観察すると、グルタチオン結合部位付近にもサブタイプ毎に違いが見られた (Figure 2)。そこで、本研究では、グルタチオンのシステイン残基およびグリシン残基に目的の化合物を付加したグルタチオン誘導体を設計した。

蛍光化合物を導入したグルタチオン誘導体として、クマリン色素を導入したものを設計・合成した。この誘導体ではグルタチオン部分のチオール基がスルホンリンカーに置換されており、スルホンリンカーを介してクマリン色素が結合している。GST 内において、Tyr によるプロトン引き抜きにより、 β 脱離反応を引き起こし、クマリン色素が脱離することが予想される。クマリン色素はグルタチオン骨格と結合している際は蛍光を発しないが、遊離すると蛍光を発することが予想されるため、GST のプローブになることが期待された。

まず、クマリン色素とグルタチオンをカーボネートで結合させた誘導体を設計・合成し

た。合成した化合物を質量分析計および NMR で検証したところ、設計通りの化合物が合成できたことが確認された。蛍光スペクトルを観測したところ、グルタチオン骨格と結合した状態と遊離した状態で蛍光スペクトルの変化が見られたことから、設計したとおり、反応前後で蛍光が変化するプローブの合成に成功した。これを用いて溶液中での蛍光の変化を計測した。ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液に溶解したグルタチオン誘導体をリン酸緩衝液に希釈し、蛍光を経時変化で測定したところ、精製 GST の非存在下にもかかわらず、蛍光スペクトルの変化が見られた (Figure 3)。また、溶媒をリン酸緩衝液から純水 (milliQ) に変えたところ、安定性の向上が見られた (Figure 4)。

次にクマリン色素とグルタチオンとの結合を安定化させるために、グルタチオン骨格とクマリン色素間のリンカーをカーボネートからカルバメートに変換した化合物を合成した。この誘導体についても、合成後、質量分析計と NMR を用いて設計通りの化合物が得られていることを確認した。こちらの化合物について、カーボネートリンカーを利用したときと同様にリン酸緩衝液中での蛍光スペクトル変化を観察したところ、GST 非存在下でも蛍光スペクトルが変化することが確認された (**エラー! 参照元が見つかりません。**)

次にサブタイプ特異的なグルタチオン誘導体に求められる構造を探索するために、グルタチオンのシステイン残基部分に炭素鎖をのばし、アミノ酸と共有結合を形成する官能基を導入した誘導体を複数設計・合成した。共有結合を形成する官能基は、活性化状態で求電子性が高くなる特徴があり、タンパク質中のチロシン等と反応して共有結合を形成する。そのため、GST のサブタイプと高い親和性を持つ場合は、長く酵素内にとどまるため、GST と共有結合を形成する。本研究で合成する化合物はグルタチオン誘導体であるため、結合部位は基質結合部位となる。よって、共有結合の形成によって不可逆的な阻害が観察される。また、質量分析によって共有結合を形成しているアミノ酸残基を同定することで、サブタイプのどこに結合したかが明らかになる。そのため、結合状態が容易に考察でき、サブタイプ特異的な構造を予想することができる。

共有結合を形成する官能基および炭素鎖が異なる誘導体を設計・合成した後、質量分析計および NMR で合成産物を測定し、設計通りの化合物が得られていることを確認した。

ボロン酸を導入したグルタチオン誘導体を設計・合成した場合、酵素活性の阻害から GST との結合は示唆されたものの、不可逆的

な阻害がみられなかった。この結果から、誘導体の GST 結合能が不十分であったと考えられた。さらに共有結合性の官能基を持つ誘導体を合成したところ、不可逆的な結合を形成する誘導体がえられた。また、GST のサブタイプによって不可逆的な阻害の有無が異なったことから、得られた構造は GST サブタイプ特異性を発揮するものであると期待される。

また、プローブ開発として、グルタチオンのグリシン残基に注目した誘導体を合成した。具体的には、蛍光物質およびピオチンを導入した誘導体を合成した。合成された化合物を質量分析計および NMR で確認した上で、GST との結合を観察したところ、結合能が損なわれていないことが解った。

以上の結果は、GST サブタイプ特異的なプローブを設計する上で必要不可欠な知見であり、本研究が目的とする GST サブタイプ特異的なプローブの開発が大いに促進されたといえる。

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4件)

(1) Marike van Gisbergen, Marcus Cebula, Jie Zhang, Astrid Ottosson-Wadlund, Ludwig Dubois, Philippe Lambin, Kenneth D. Tew, Danyelle Townsend, Guido Haenen, Marie-José Driittij-Reijnders, Hisao Saneyoshi, Mika Araki, Yuko Shishido, Yoshihiro Ito, Elias Arnér, Hiroshi Abe, Ralf Morgenstern, Katarina Johansson, Chemical reactivity window determines prodrug efficiency towards glutathione transferase overexpressing cancer cells, *Molecular Pharmaceutics*, 査読有, 13, 2016, 2010-2025

(2) Marcus Cebula, Ilke Simsek Turan, Birgitta Sjödin, Madhuranayaki Thulasingam, Joseph Brock, Volodymyr Chmyrov, Jerker Widengren, Hiroshi Abe, Bengt Mannervik, Jesper Haeggström, Agnes Rinaldo-Matthis, Engin Akkaya, Ralf Morgenstern, Catalytic Conversion of Lipophilic Substrates by Phase constrained Enzymes in the Aqueous or in the Membrane Phase, *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2016, 38316

(3) Hayato Fukuda, Ryuta Muromoto, Yuuki Takakura, Kohei Ishimura, Ryutaro Kanada, Daichi Fushihara, Makoto Tanabe, Kotaro Matsubara, Toru Hirao, Koki Hirashima, Hiroshi Abe, Mitsuhiro Arisawa, Tadashi Matsuda, Satoshi Shuto, Design and Synthesis of Cyclopropane Congeners of

Resolvin E2, an Endogenous Proresolving Lipid Mediator, as Its Stable Equivalents, *Organic Letters*, 査読有, 18, 2016, 6224-6227

(4) Hiroki Kumamoto, Misato Fukano, Tomohiko Nakano, Keito Iwagami, Chiaki Takeyama, Satoru Kohgo, Shuhei Imoto, Masayuki Amano, Nobuyo Kuwata-Higashi, Manabu Aoki, Hiroshi Abe, Hiroaki Mitsuya, Kiyoshi Fukuhara, Kazuhiro Haraguchi, Diastereoselective Synthesis of 6⁻(Z)- and (E)-Fluoro Analogues of Anti-hepatitis B Virus Agent Entecavir and Its Evaluation of the Activity and Toxicity Profile of the Diastereomers, *Journal of Organic Chemistry*, 査読有, 81, 2016, 2827-2836

[学会発表](計12件)

戸田 直宏、伊藤 美香、石田 綾乃、鬼頭 宏任、横川 大輔、Stephan Irle、木村 康明、友池 史明、西村 智、阿部 洋、Nile Blue を基本骨格とした脂肪滴検出プローブの創製、第 31 回生体機能関連化学シンポジウム、金沢、2016 年 9 月 7 日-9 日

伊藤 真央、金田 龍太郎、木村 康明、周東 智、阿部 洋、Si-Si 結合の特性を利用した光分解性保護基の開発、金沢、2016 年 9 月 7 日-9 日

笈川 涼太、丸山 豪斗、早川 真由、阿部 奈保子、木村 康明、阿部 洋、Development of novel chemical ligation reaction for RNA strands、第 43 回 国際核酸化学シンポジウム、熊本、2016 年 9 月 27 日-29 日

早川 真由、笈川 涼太、丸山 豪斗、阿部 奈保子、木村 康明、周東 智、松田 彰、阿部 洋、細胞内ビルドアップ型 SiRNA を指向した新規核酸連結反応、日本核酸医薬学会第二回年会、東京、2016 年 11 月 15 日-17 日

六戸 裕子、藤川 遥加、木村 康明、友池 史明、桑田 啓子、矢野 貴人、福井 健二、関戸 好孝、村上 優子、周東 智、阿部 洋、共有結合型グルタチオン S-転移酵素阻害剤の創薬研究、第 34 回 メディカルケミストリーシンポジウム、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

児玉 亜有実、阿部 奈保子、友池 史明、伊藤 嘉浩、松本 健、吉田 稔、清水 義宏、亀田 倫史、阿部 洋、合成環状 RNA からのタンパク質発現、第 39 回 分子生物学会、横浜、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日

吉永 静也、辻 巖一郎、阿部 奈保子、友池 史明、木村 康明、阿部 洋、ビルドアップ型核酸分子の開発、統合物質創製化学研究推進機構 第 2 回国内シンポジウム、北海道、2017 年 1 月 26 日-27 日

辻 巖一郎、笈川 涼太、早川 真由、木村 康明、阿部 洋、光解除性保護基を有するヌ

クレオシドを利用した長鎖 RNA のケミカルライゲーション、統合物質創製化学研究推進機構 第 2 回国内シンポジウム、北海道、2017 年 1 月 26 日-27 日

木村 康明、丸山 豪斗、笈川 涼太、早川 真由、阿部 奈保子、松田 彰、周東 智、伊藤 嘉浩、阿部 洋、求電子的ホスホロチオエステルによる核酸の化学的連結反応、日本化学会第 97 春季年会、横浜、2017 年 3 月 16 日-19 日

伊藤 真央、柴田 綾、阿部 奈保子、木村 康明、阿部 洋、高効率な核酸検出を可能にする核酸鋳型反応の開発、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 24 日-27 日

伏原 大地、福田 隼、阿部 洋、周東 智、糖部三員環型ヌクレオシドアナログの創成、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 24 日-27 日

宍戸 裕子、藤川 遥加、木村 康明、友池 史明、桑田 啓子、矢野 貴人、福井 健二、関戸 好孝、村上 優子、周東 智、阿部 洋、共有結合型グルタチオン S-転移酵素阻害剤の創薬研究、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 24 日-27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：グルタチオン S-トランスフェラーゼ阻害剤

発明者：阿部 洋、宍戸 裕子

権利者：阿部 洋、宍戸 裕子

種類：特許

番号：2016-133272

出願年月日：2016 年 7 月 5 日

国内外の別：国外

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 洋 (ABE HIROSHI)

名古屋大学・大学院・物質理学専攻 (化学系)・教授

研究者番号：80415067

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：