

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18899

研究課題名(和文) ワールブルク効果を標的とした抗がん剤としてのSIRT6活性化剤の開発

研究課題名(英文) Development of SIRT6 activators targeting for Warburg effect

研究代表者

川口 充康 (Kawaguchi, Mitsuyasu)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：10735682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：従来sirtuin活性は酵素を2種類利用することにより検出されてきた。従って、ケミカルスクリーニングを実施する上で操作が煩雑になることに加え、多くの擬陽性化合物が生じる問題点があった。

今回、sirtuinが長鎖脂肪酸を切断する活性を持つという知見に着目し、消光団でもsirtuinによって認識切断され得るとの仮説を立て、それを実証することにより一段階で簡便にsirtuin活性を検出できる系の構築に成功した。また、構築した系を利用したケミカルスクリーニングにより、新たな母核を有するSIRT6阻害剤・活性化剤を見出すことにも成功した。

研究成果の概要(英文)： In general, sirtuin activity is detectable by a protease (eg. trypsin) coupled two-steps method. However, such method has several problems, cumbersome procedure, false-positive compounds on chemical screening.

In this study, focusing on interesting reports showing that sirtuin recognize and hydrolize long-chain fatty acyl groups, we hypothesized that sirtuin can hydrolize acyl groups of large quencher dyes. We exhibited that sirtuin activity is detectable by a FRET based novel fluorescence probe, SFP3, and applied this methodology for chemical screening. We identified novel scaffolds of SIRT6 inhibitor and activator.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：Sirtuin 蛍光プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞は正常細胞と比較して、増殖能が亢進しているため圧倒的に多くのエネルギーを必要としている。一方で、がん細胞ではミトコンドリア酸化的リン酸化と比較して、エネルギー産生効率の悪い好氣的解糖が亢進している。一見矛盾するこの現象は、がんを特徴づける現象“ワールブルク効果”として注目を集めている。ワールブルク効果は1924年に Otto Warburg により発見されたが、がん細胞におけるその制御メカニズム・意義については十分に解明されていなかった。

近年、NAD<sup>+</sup>依存的な脱アセチル化酵素の一種である SIRT6 はがんの代謝、即ちワールブルク効果を制御するがん抑制遺伝子であることが報告された。即ち、i) SIRT6 欠損細胞では HIF-1 $\alpha$  の活性化を介して GLUT1 や LDH を始めとする糖代謝関連遺伝子の発現が増強し、グルコース代謝異常を示す。ii) SIRT6 欠損細胞は増殖能が高く、マウスへの移植により腫瘍を形成するが、グルコース代謝関連遺伝子である PDK1 のノックダウンにより増殖能・腫瘍形成はレスキューされる。この増殖能の獲得は p53 や Ras の変異とは無関係である。iii) ヒトの膵臓がん、大腸がんにおいて SIRT6 の遺伝子発現レベルは低下している。これらの知見を統合すると、SIRT6 はがん細胞において特徴的なワールブルク効果の分子スイッチと考えられ、SIRT6 活性を増強することにより腫瘍形成を抑制できると考えられる。

ところで、元来 SIRT6 のヒストン H3 Lys9 (H3K9) 脱アセチル化活性は非常に弱いことが知られていた。しかしながら興味深いことに、SIRT6 は長鎖脂肪酸に対して比較的強い脱アシル化活性、即ち脱ミリストール化活性、脱パルイストール化活性を示すことが報告された。ただ一方で、SIRT6 は *in vivo* において H3K9, H3K56 を脱アセチル化することで HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B 依存的に解糖系などを始めとする遺伝子の発現制御をすることも知られていた。これらの知見は、SIRT6 が *in vivo* において他のある分子によって

脱アセチル化活性が調節されている可能性を強く示唆するものであるが、実際に最近、生体内濃度の遊離長鎖脂肪酸が SIRT6 の脱アセチル化活性を制御・活性化することが報告された。

以上の知見から、長鎖脂肪酸を基にした SIRT6 活性化剤の開発はワールブルク効果抑制剤として新たな抗がん剤となる可能性があるが、そういった研究はほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では長鎖脂肪酸に着目し、より drug-like な SIRT6 活性化剤を創製することにより、SIRT6 活性化剤が真に抗がん剤として有効か評価することを目的とする。本研究が達成され、SIRT6 活性化剤が抗がん剤として有効であることが示されれば、ワールブルク効果により悪性度を増した非常に多くのがんに対する有効な治療薬のリード化合物を提供できるばかりでなく、汎用性の高い新規抗がん剤の開発指針をも実証することができる。

## 3. 研究の方法

従来の Sirtuin 活性検出は Sirtuin による脱アセチル化反応に続くトリプシンによるリジン残基の加水分解により行われることが多かった。しかしながら、本手法を大規模なケミカルスクリーニングに適用する場合、操作が煩雑になるばかりでなく、トリプシン阻害剤も擬陽性化合物として得られるため、それらを排除する実験が必須となる。

そこで、操作性に優れた新たな一段階 Sirtuin 活性蛍光検出系の構築を目指した。構築した系を用いて東京大学のケミカルライブラリーを利用したケミカルスクリーニングを実施した。

## 4. 研究成果

背景に記載した通り、Sirtuin は単なる脱アセチル化酵素ではなく、長鎖脂肪酸も含めて脱アシル化酵素活性を示し得ることが報告されている。本知見を基に考察すると、長鎖脂肪酸に限らず消光団色素のアシル基も認識し加水分解し得るのではないかと予想された。もし、Sirtuin が消光団のアシル基を加水分解する活性を持つのであれば、目的とする一段階で Sirtuin 活性を検出する系を

構築することが容易になると考えた (図 1)。

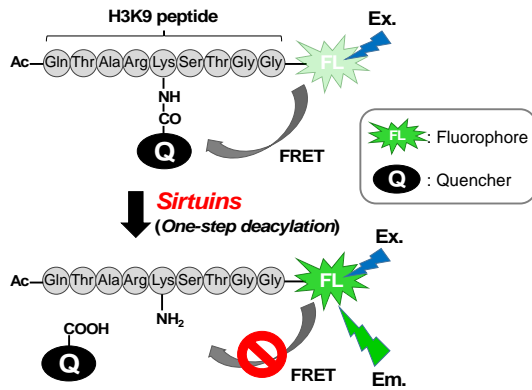


図 1 一段階 Sirtuin 活性検出法

(1) 蛍光プローブの設計・合成・評価

図 1 の蛍光団として FITC、消光団として Dabcyl、また Sirtuin の基質認識配列として H3K9 周辺ペプチドを利用した FRET 型蛍光プローブ SFP3 を設計・合成し Sirtuin との反応性を評価した。その結果、NAD、SIRT6 依存的に蛍光強度上昇を示し、既知阻害剤である NAM によって蛍光上昇が阻害された。この結果より、立案したコンセプトに基づく蛍光プローブ SFP3 を用いて SIRT6 活性を簡便に検出できることが示された (図 2)。SFP3 は SIRT6 に限らず長鎖脂肪酸を認識加水分解する活性を有する SIRT ファミリー (SIRT1, 2, 3) と広く反応することが分かった。特に、SIRT1 との反応性が非常に高いことが分かった。

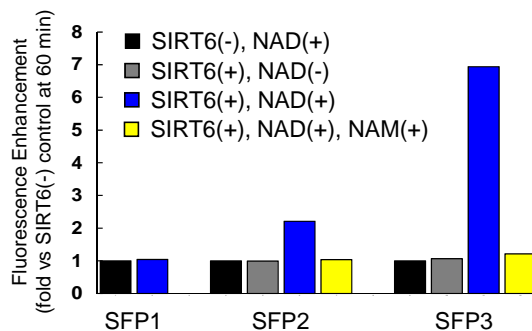


図 2 SFP 類の SIRT6 との反応性

(2) 細胞内 SIRT1 活性検出プローブの開発

一段階で Sirtuin 活性を検出できることは細胞内の Sirtuin 活性を検出できる可能性を示唆すると言える。実際、これまでに細胞内存在性 Sirtuin 活性を検出した例はほぼなかった。

ペプチド性であるが故の不安定性、および

細胞膜透過性の低さを考慮し、ペプチド部分をトリペプチドまで短縮した蛍光プローブ KST-F を合成し invitro での機能評価を行った。その結果、SFP3 と比較し Sirtuin との反応性の低下が認められるものの、細胞溶解液中での安定性が著しく向上することが分かった。そこで、KST-F-DA (細胞への適用は FITC 部位をジアセチル化した後に行った) を用いた細胞イメージングを行った。

その結果、KST-F-DA 添加により細胞内からの蛍光シグナル上昇が認められ、NAM, EX-527 (SIRT1 阻害剤) 前投与により強く抑制された。一方、AGK-2 (SIRT2 阻害剤) 前投与では抑制されなかった。これらの結果から、KST-F-DA は細胞内の SIRT1 活性を検出可能だということが示された。一方、細胞を血清飢餓に付すことで蛍光シグナルが有意に強くなることも分かった。以上の結果から、細胞内の SIRT1 活性を検出できることが示された。

(3) SIRT6 阻害剤・活性化剤のスクリーニング

SFP3 は一段階で SIRT6 活性を検出可能であり、既知阻害剤である NAM やレスベラトロールにより蛍光強度上昇が阻害されることが分かった。従って、ケミカルスクリーニングにより SIRT6 阻害剤・活性化剤を探索することとした。ケミカルライブラリーとしては東京大学創薬機構の所有する 9600 化合物を利用した。

スクリーニングの結果、SIRT6 による脱アシル化活性を阻害或いは活性化する化合物が数種あり、それを市販の脱アセチル化活性検出キットにかけることにより脱アセチル化を評価した。その結果、興味深いことに一部の化合物では脱アシル化活性を阻害する一方で、脱アセチル化活性を阻害しないことが分かった。現在、これらの化合物の構造活性相関情報を得るために合成展開を行っている。

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7件)

1) Okuno H, Ieda N, Hotta Y, Kawaguchi M, Kimura K, Nakagawa H. Org Biomol Chem. 2017, 15, 2791-2796. doi: 10.1039/c7ob00245a.

2) Kawaguchi M, Ikegawa S, Ieda N, Nakagawa H. *Chembiochem*. 2016, 17, 1961-1967. doi: 10.1002/cbic.201600374.

3) Ieda N, Yamada S, Kawaguchi M, Miyata N, Nakagawa H. *Bioorg Med Chem*. 2016, 24, 2789-2793. doi: 10.1016/j.bmc.2016.04.042.

4) Kitamura K, Kawaguchi M, Ieda N, Miyata N, Nakagawa H. *ACS Chem Biol*. 2016, 11, 1271-1278. doi: 10.1021/acscchembio.5b00962.

5) Nakagawa H, Seike S, Sugimoto M, Ieda N, Kawaguchi M, Suzuki T, Miyata N. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015, 25, 5619-5624. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.10.033.

6) Yoshioka K, Komatsu T, Nakada A, Onagi J, Kuriki Y, Kawaguchi M, Terai T, Ueno T, Hanaoka K, Nagano T, Urano Y. *J Am Chem Soc*. 2015, 137, 12187-12190. doi: 10.1021/jacs.5b05884.

7) Ieda N, Hishikawa K, Eto K, Kitamura K, Kawaguchi M, Suzuki T, Fukuhara K, Miyata N, Furuta T, Nabekura J, Nakagawa H. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015, 25, 3172-3175. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.095.

〔学会発表〕(計8件)

1) 川口充康, 池川祥平, 家田直弥, 中川秀彦  
簡便かつ高感度な Sirtuin 活性蛍光検出系の構築 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 25-29 日, 横浜

2) 川口充康, 池川祥平, 家田直弥, 中川秀彦  
Sirtuin 活性検出蛍光プローブの開発と細胞イメージング 第 14 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2016 年 5 月 27-28 日, 東京

3) 川口充康, 池川祥平, 家田直弥, 中川秀彦  
Sirtuin 活性検出蛍光プローブの開発と生細胞応用 日本ケミカルバイオロジー学会第 11

回年会, 2016 年 6 月 15-17 日, 京都

4) Mitsuyasu Kawaguchi, Shohei Ikegawa, Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa  
Development of one-step sirtuin activity fluorescence probe and living cell imaging ACS National Meeting, Aug. 21-25, 2016, Philadelphia

5) 池川祥平, 川口充康, 家田直弥, 中川秀彦  
SIRT6 活性検出プローブの開発と modulator の探索 日本薬学会東海支部 合同学術大会 2016, 2016 年 10 月 30 日, 岐阜

6) 川口充康, 池川祥平, 家田直弥, 中川秀彦  
Sirtuin 蛍光プローブの開発と生細胞イメージングへの応用 第 14 回 がんハイボキシア研究会, 2016 年 11 月 4-5 日, 岐阜

7) 川口充康, 池川祥平, 家田直弥, 中川秀彦  
Sirtuin 蛍光プローブの開発と生細胞イメージング 日本酸化ストレス学会東海支部 第 5 回学術集会, 2017 年 2 月 18 日, 名古屋

8) 川口充康, 池川祥平, 家田直弥, 中川秀彦  
SIRT6 活性検出蛍光プローブの開発とケミカルスクリーニング 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24-27 日, 仙台

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

川口 充康 (KAWAGUCHI Mitsuyasu)  
名古屋市立大学大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：10735682

(2)研究分担者

中川 秀彦 (NAKAGAWA Hidehiko)  
名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：80281674

家田 直弥 (Ieda Naoya)  
名古屋市立大学大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：00642026

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )