

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07783

研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いたパスウェイ解析に基づく化合物評価システムの開発

研究課題名(英文) Development of compound evaluation system based on pathway analysis using proteome analysis

研究代表者

室井 誠 (Muroi, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：30261168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん代謝に作用する化合物は、がん代謝の制御機構を明らかにすることに役立つ他、新規抗がん剤の創出につながることで期待される。2次元電気泳動によるプロテオーム解析を用いた薬剤作用解析システムであるChemProteoBaseを改良することによって、代謝阻害剤評価解析システムを構築することを目的として研究を行った。解糖系酵素タンパク質など代謝に関するスポットの発現量を解析することによって、阻害剤の代謝に及ぼす作用を評価するシステムを構築し、新規化合物の標的を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なスクリーニングで取得された生理活性物質の標的を同定することは、抗がん剤をはじめ新しい薬の開発につながる他、その過程に関与する新しい生命現象の解析に役立つ。しかし、標的を同定することは容易ではなく、様々な手法が開発されてきた。本研究の2次元電気泳動を用いたプロテオーム解析に基づく代謝阻害剤評価解析システムを用いることによって、がんを標的とした作用未知の化合物の迅速な作用解析が行えることが期待され、薬学、応用微生物学、天然物化学の研究進展にも寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Compounds affecting cancer metabolism are expected to contribute to the elucidation of the mechanism of cancer metabolism and a discover of such compounds may leads to the creation of new anticancer drugs. A study was conducted for the purpose of constructing a metabolic inhibitor evaluation analysis system by improving ChemProteoBase, which is a drug target analysis system using proteomic analysis by 2D-DIGE. An improved system was developed to evaluate the effect of inhibitors on metabolism by analyzing the expression level of the spots relating cancer metabolism such as glycolytic enzyme proteins, and targets of novel compounds were clarified.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：阻害剤 標的分子 代謝 インフォマティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の特徴の1つとして好氣的条件下でも積極的に解糖系を利用する Warburg 効果があげられる。ATP を効率的に合成できる酸化的リン酸化ではなく、解糖系を利用することによって ATP の産生と細胞増殖に必要な生体高分子合成のバランスをとり、それががん細胞の急速な増殖につながっている。また、がん細胞は解糖系だけでなく、その環境によってはグルタミンオリシスなど別の代謝系を巧みに利用してエネルギーを得る。近年の研究において、がん関連遺伝子によって代謝系をリプログラミングすることによって、がん細胞の旺盛な代謝要求に応じていると考えられるようになってきた。がんの代謝制御機序についてはいまだ不明な点が多く、がん代謝に作用する化合物は、がん代謝の制御機構を明らかにすることに役立つ他、新規抗がん剤の創出につながることを期待される。

2. 研究の目的

我々はがんをターゲットとして新たに天然化合物から探索された生理活性物質の作用標的を推定するシステム ChemProteoBase を構築した。ChemProteoBase では、プロテオーム解析に2次元電気泳動をベースとした 2D-DIGE システムを用い、18 時間薬剤で処理した HeLa 細胞についてプロテオーム解析を行い、296 のポットの定量値を既知の標準化合物の定量値と比較し、化合物の標的を推測する。ChemProteoBase において、プロテオーム解析によって得られる薬剤によって変化した個々のタンパク質の情報を利用するために、前述の 296 スポットの同定を進めてきた。その結果、296 スポットには解糖系のタンパク質が 24 スポット (8 タンパク質) 含まれており、これらのスポットを抽出して発現量を解析することによって、解糖系の酵素タンパク質のスポットの発現解析が一度にできる。既知の代謝阻害剤を用いて取得したデータを加え、代謝関連スポットに焦点をしばってデータマイニングシステムを作成することによって、代謝阻害剤評価解析システムを構築する。

3. 研究の方法

(1) ChemProteoBase のデータベース拡張: 代謝阻害剤の解析精度向上のために、代謝阻害化合物についてプロテオーム解析を行い ChemProteoBase のデータベース充実をはかる。

(2) 代謝阻害剤評価解析システムの構築: 296 スポットのうち同定済みのスポットのデータをもとに代謝阻害剤評価・解析システムを構築する。具体的には、ChemProteoBase の解析結果から、スポットの同定情報を利用し、解糖系の酵素タンパク質や TCA サイクルなどに関与するタンパク質のスポットの発現量を迅速に抽出し、比較するシステムを構築する。代謝ごとに関連タンパク質の発現量の変化を定量的に、また、グラフィカルに示すシステムを作成し、データマイニングの精度、効率をあげる。コントロールの薬剤として、解糖系に作用する薬剤ならびに、ミトコンドリア作用薬の解析系をモデルとして検討する。

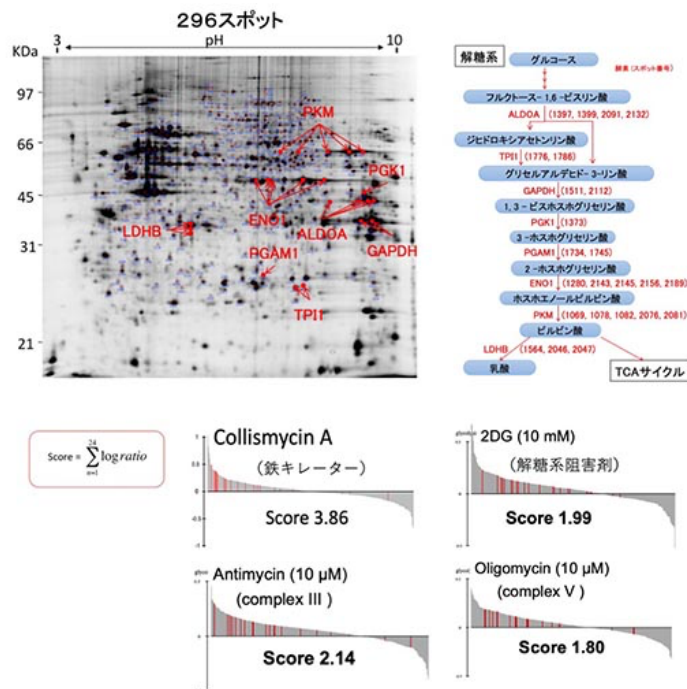
(3) 新規化合物の解析: 構築したシステムの有用性を検証するためには実際に化合物ががん代謝に作用していることを、新規探索化合物の解析を行うことによって示す。

4. 研究成果

(1) ChemProteoBase のデータベース拡張: 解糖系や TCA サイクル、アミノ酸代謝系、脂質代謝系などががんの代謝阻害剤を含む標的既知の阻害剤についてプロテオーム解析を行い ChemProteoBase データベースに登録した。また、スポットの同定情報、ならびに、標準化合物の情報を公開するために、ホームページの整備を行なった

(<http://www.cbgrg.riken.jp/csrs/xtra/ProteomePage/>)。

(2) 代謝阻害剤評価解析システムの構築: ChemProteoBase を用いたプロテオーム解析の結果から、代謝関連タンパク質スポットの発現量を迅速に抽出し、定量的、且つ、グラフィカルに比較するシステム基盤を作成した。これを用いて、解糖系酵素タンパク質の発現誘導をすることが知られている鉄のキレーターならびに呼吸阻害剤を用いて解析したところ解糖系酵素タンパク質の発現誘導が確認された。発現量の変化を数値化することによって、化合物の代謝に及ぼす作用を簡易的に評価するシステムを構築した (図 1, Futamura Y, Biochim Biophys Acta, 1867, 28-37, 2019)。

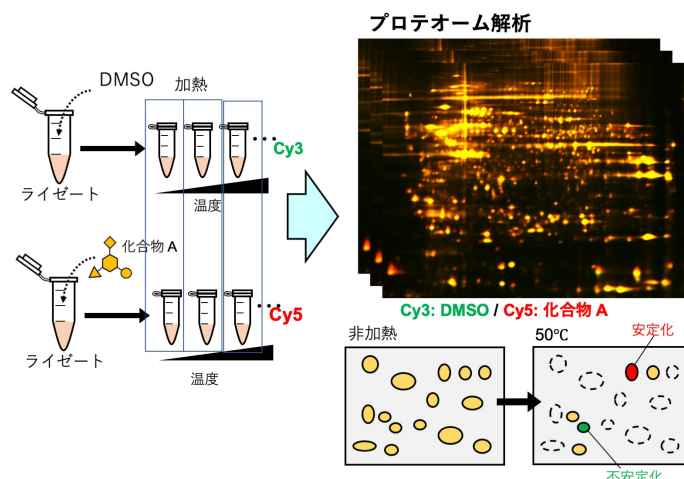


(図1) ChemProteoBase を用いた代謝解析システム (解糖系タンパク質の例)

(3) 新規化合物の解析: (2)の評価システムを用いることによって代謝に影響を及ぼす化合物の解析ができるようになったため、セルベースのスクリーニングで得られた化合物の解析を行った。天然物並びに、化合物バンクから得られた化合物、Unantimycin A、ならびに、NPL40330 がミトコンドリアに作用することを見出し、フラックスアナライザーなどを用いて、その標的がそれぞれミトコンドリア呼吸鎖複合体 III、複合体 I であることを明らかにした (Futamura Y, Biochim Biophys Acta, 1867:28-37, 2019)。さらに、癌幹細胞様細胞を用いたセルベースの薬物スクリーニングによって取得された NPD2381 について解析したところ、セリン合成経路内の酵素の発現量を増加させることを見出し、ミトコンドリアを標的とする新規な選択的癌幹病抑制剤であることが示唆された (Subedi A, FEBS Lett, 593:763-776, 2019)。

この他、データベースが拡張された ChemProteoBase あるいは、既存のシステムを用いて新規化合物の解析を行うことによって、化合物の標的特定あるいは作用の解明に寄与した (Robke L, Angew Chem Int Ed Engl, 56:8153-8157, 2017, Uesugi S, J Antibiot, 70:429-434, 2017, Li J, J Cell Mol Med, 23:6283-6294, 2019, Cheng L, Mol Pharm, 16:1423-1432, 2019)。

(4) 新規解析システムの構築: ChemProteoBase などの方法論については、書籍の Methods in Molecular Biology (1888:127-139, 2019) や医薬品開発におけるオミクス解析技術 (情報機構, pp82-90, 2020) にまとめた。それに加え、化合物が標的タンパク質に結合する時に熱安定性を変化させることを利用したセルサーマルシフトアッセイ法と 2次元電気泳動に基づくプロテオーム解析を組み合わせた新規の標的タンパク質解析法の 2DE-CETSA の開発に着手し、その解析基盤を整えた (Nagasawa I, Cell Chem Biol, 27:186-196e, 2020)。



(図2) 2DE-CETSA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Subedi A, Muroi M, Futamura Y, Kawamura T, Aono H, Nishi M, Ryo A, Watanabe N, Osada H	4. 巻 593
2. 論文標題 A novel inhibitor of tumorspheres reveals the activation of the serine biosynthetic pathway upon mitochondrial inhibition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Lett	6. 最初と最後の頁 763 ~ 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cheng L, Muroi M, Cao S, Bian L, Osada H, Xiang L, Qi J	4. 巻 16
2. 論文標題 3,23,28-Trihydroxy-12-oleanene 3-O-caffeate from <i>Desmodium sambuense</i> -induced neurogenesis in PC12 cells mediated by ER stress and BDNF-TrkB signaling pathways.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Pharm	6. 最初と最後の頁 1423 ~ 1432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suvarna K, Honda K, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Watanabe N	4. 巻 294
2. 論文標題 A small-molecule ligand of valosin-containing protein/p97 inhibits cancer cell-accelerated fibroblast migration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 2988 ~ 2996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Futamura Y, Muroi M, Aono H, Kawatani M, Hayashida M, Sekine T, Nogawa T, Osada H	4. 巻 1867
2. 論文標題 Bioenergetic and proteomic profiling to screen small molecule inhibitors that target cancer metabolisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Proteins Proteom	6. 最初と最後の頁 28 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2018.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muroi M, Osada H.	4. 巻 1888
2. 論文標題 Proteomic profiling for target identification of biologically active small molecules using 2D DIGE.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Systems Chemical Biology (Ziegler S. and Waldmann H. eds.): Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8891-4_7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Robke L, Laraia L, Carnero Corrales MA, Konstantinidis G, Muroi M, Richters A, Winzker M, Engbring T, Tomassi S, Watanabe N, Osada H, Rauh D, Waldmann H, Wu YW, Engel J	4. 巻 56
2. 論文標題 Phenotypic identification of a novel autophagy inhibitor chemotype targeting lipid kinase VPS34	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angew Chem Int Ed Engl	6. 最初と最後の頁 8153 ~ 8157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201703738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uesugi S, Muroi M, Kondoh Y, Shiono Y, Osada H, Kimura KI	4. 巻 70
2. 論文標題 Allantopyrone A activates Keap1-Nrf2 pathway and protects PC12 cells from oxidative stress-induced cell death.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Antibiot	6. 最初と最後の頁 429 ~ 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ja.2016.99	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Khalid A, Takagi H, Panthee S, Muroi M, Chappell J, Osada H, Takahashi S	4. 巻 6
2. 論文標題 Development of a terpenoid-production platform in Streptomyces reveromyceticus SN-593	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2339 ~ 2349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Li J, Sun K, Muroi M, Gao L, Chang YT, Osada H, Xiang L, Qi J.	4. 巻 23
2. 論文標題 Cucurbitacin B induces neurogenesis in PC12 cells and protects memory in APP/PS1 mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med	6. 最初と最後の頁 6283-6294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5459862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagasawa I, Muroi M, Kawatani M, Ohishi T, Ohba SI, Kawada M, Osada H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Identification of a small compound targeting PKM2-regulated signaling using 2D gel electrophoresis-based proteome-wide CETSA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Chem Biol	6. 最初と最後の頁 186-196.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suvarna K, Honda K, Muroi M, Kondoh Y, Watanabe N, Osada H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of target protein for bio-active small molecule using photo-cross linked beads and MALDI-TOF mass spectrometry.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ikuko Nagasawa, Makoto Muroi, Ayumi Ikeno, Naoko Ogawa, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada
2. 発表標題 Development of 2DE-CETSA as a novel platform by 2- dimensional electrophoresis based-proteomic analysis for target identification of small molecules
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Chemical Communication (ISCC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室井 誠、永澤 生久子、池野 あゆみ、小川 直子、川谷 誠、長田 裕之
2. 発表標題 2次元電気泳動を用いた化合物に相互作用するたんぱく質の解析法（2DE-CETSA）の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室井 誠、川谷 誠、河村 達郎、近藤 恭光、二村 友史、田中 美帆、青野 晴美、本田 香織、長田 裕之
2. 発表標題 ChemProteoBaseを用いたMTH1阻害剤の作用解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 室井 誠、川谷 誠、河村 達郎、近藤 恭光、二村 友史、田中 美帆、青野 晴美、本田 香織、長田 裕之
2. 発表標題 ChemProteoBase を用いた化合物のオフターゲット解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 室井 誠
2. 発表標題 表現型データベースを用いた生理活性物質の標的分子解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2017年度 東北支部 支部大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makoto Muroi, Ikuko Nagasawa, Naoko Ogawa, Harumi Aono, Yushi Futamura, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada
2. 発表標題 Target identification of bioactive small molecules based on proteomic analyses using 2-D DIGE.
3. 学会等名 RIKEN-Max Planck Joint Research Center for System Chemical Biology 7th Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室井 誠、永澤 生久子、小川 直子、川谷 誠、大石 智一、大庭 俊一、川田 学、長田 裕之
2. 発表標題 2DE-CETSAを用いたPKM2制御シグナルに作用する化合物NPD10084の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 http://www.cbrg.riken.jp/csrs/ja/

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----