

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790007  
 研究課題名（和文） タンパク質の行動制御に基づく新規活性物質の基礎分子医薬化学  
 研究課題名（英文） Basic medicinal chemistry in novel biologically active compounds based on behavioral regulation of protein  
 研究代表者  
 青山 洋史（AOYAMA HIROSHI）  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：40374699

研究成果の概要：本研究ではタンパク質の行動制御という新しい医薬カテゴリーを提案し、その高次標的創薬手法を確立するために、細胞内のプロテアソーム分解、微小管重合阻害、血管新生阻害にターゲットを絞って研究を行った。その結果、3つの標的全てにおいて小分子によるタンパク質の行動制御を達成でき、学術的にも興味深い知見を得ることができた。また、上記標的は全て抗がん剤開発への展開が可能であり、対象分野への応用研究が期待できる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：生理活性、タンパク質、有機化学、光親和性標識

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの創薬は、ゲノム創薬を含めて概ね個々のタンパク分子の機能制御を中心とするものであった。しかし、がんをはじめとした生命現象の複雑な制御を一タンパク分子の機能制御に求めるには限界があり、より高次な標的を捉える必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

上述の高次標的創薬手法の基盤を確立するため、まず、各種がん細胞が有する共通の性質に着目した。具体的には各種がん細胞が持つ過度の細胞分裂や抗アポトーシス、血管

新生などの共通の性質を制御する薬剤の開発である。前述のがん細胞が有する性質は正常細胞では小規模しか見られないため、これを制御できる薬剤の開発を目指せば、がんの種差に左右されない一般性の高い薬剤となる可能性がある。また、これまでの抗がん剤の問題点となっていた副作用の低減も期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) Bestatin 誘導体による抗アポトーシス阻害剤の開発：IAP タンパク質の細胞内寿命の制御

がん細胞は放射線や抗がん剤によってDNA合成や細胞分裂が阻害されると、アポトーシスまたはネクローシスが誘発され、細胞死が導かれる。しかし、がん細胞にはアポトーシスによる細胞死に抵抗する仕組みもある。その一つにIAPファミリータンパク質などのアポトーシス阻害タンパク質の寄与が報告されている。中でもcIAP1は、多くのがん細胞で過剰発現していることが報告され、放射線や抗がん剤に対する治療抵抗性に関与していると考えられている。

我々の最近の研究でbestatin誘導体、特にカルボン酸部位をメチル化したMeBSがcIAP1に作用し、cIAP1自身のユビキチン化を促進してがん細胞でのcIAP1の発現量を低下させることが報告している(図1)。したがってbestatinをリードとして構造展開を行えば、放射線や既存の抗がん剤によって引き起こされるネクローシスとは異なるメカニズムでの制がん作用が期待され、低副作用の抗がん剤開発に繋がるものと期待される。

開発したbestatin誘導体の活性は細胞中のcIAP1の量をウエスタンブロッティング法を用いて定量し、無投薬時のcIAP1の総量と比較した時の減少率で評価することとした。また、bestatin誘導体のメカニズム解析としては蛍光発色団を有する誘導体を別途合成し、蛍光偏光法を用いて作用部位を同定することとした。

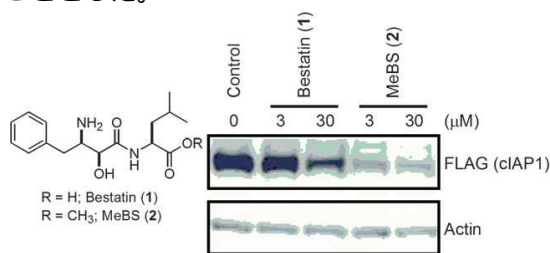


図1.bestatinおよびMeBSのcIAP1分解活性

### (2) Thalidomideをリード化合物とした微小管形成阻害剤の創製：tubulin重合の制御

Thalidomideは20世紀半ばに旧西ドイツで開発された睡眠薬であるが、アザラシ肢症と呼ばれる重篤な副作用を示したことから全面回収された薬剤である。ところが最近、ハンセン病やエイズ、多発性骨髄腫などの難治性疾患に効果があることが報告され、薬剤として再び注目されている。

我々はこれまでに、thalidomideをリード化合物とした構造活性相関研究を展開しており、COX阻害活性、TNF- $\alpha$ 産生調節作用、androgen拮抗活性、tubulin重合阻害活性、など様々な有用生理活性を示す誘導体の開発に成功している。中でもthalidomideの代謝物群の構造展開によって得られた5HPP-33やFPP-33(図2)には微小管の構成成分であるtubulinに対して強力な重合阻害活性が認

められた。

Tubulinの重合を制御が可能な薬剤はがん細胞の増殖抑制に繋がると期待される。なぜならTubulinの重合抑制は細胞分裂の初期に形成される紡錘体(微小管の束)の形成を抑制することを意味し、一方で脱重合抑制(安定化)は有糸分裂の抑制を意味するからである。本研究では、5HPP-33の水酸基を様々な官能基に変換した化合物の構造活性相関と、5HPP-33とFPP-33とのハイブリッド化を行い、より高活性なtubulin重合阻害剤の開発を目指すこととした。

開発したハイブリッド体の活性はtubulinの重合度を吸光度測定にて評価することとした。TubulinはMg<sup>2+</sup>存在下では室温付近で重合し、氷冷下では脱重合する性質がある。この性質を利用して化合物の存在下/非存在下でのタンパク溶液の濁度(吸光度)を測定することで活性を評価することができる。

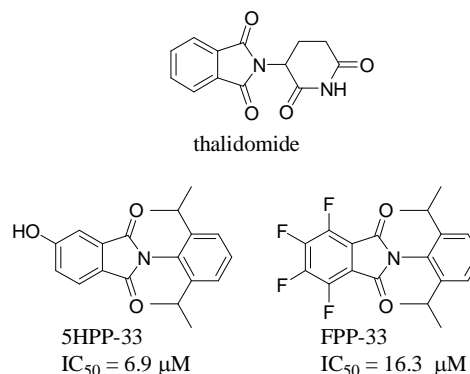


図2. thalidomide、5HPP-33およびFPP-33

### (3) Fusarierin Aをリード化合物とした新規血管新生阻害剤の創製：管腔形成の制御

イネ苗立枯病は*Rhizopus chinensis*が引き起こす病気で、主にイネに感染して成育不良・苗立枯れを引き起こす。その原因毒素であるrhizoxinは微小管タンパク質を標的とする有糸分裂阻害剤であることが見出された。その研究の過程で我々は新規微小管機能阻害化合物の検索方法として高感度・迅速・安価・高再現性のイネいもち病菌*Pyricularia oryzae* P-2bの発芽管形態異常を指標にしたスクリーニング法を確立した。本手法を用いて微小管作用物質などの形態異常を起こす物質の検索を行った結果、*Fusarium* sp. K432株から得られた新規抗カビ抗生物質fusarierin Aがいもち菌に対してrhizoxinと良く似た形態異常を示すことが明らかとなった。しかしfusarierin Aは微小管形成阻害活性を示さなかったために作用メカニズムは不明であった。ところが最近、fusarierin Aの類似化合物であるICM0301Aに血管新生阻害活性が認められたという報告があり、改めてfusarierin Aを用いた血管新生阻害活性評価を行った。その

結果、fusarielin A にも血管新生阻害活性が認められ、抗がん治療薬としての新たなターゲットとして注目した (図 3)。

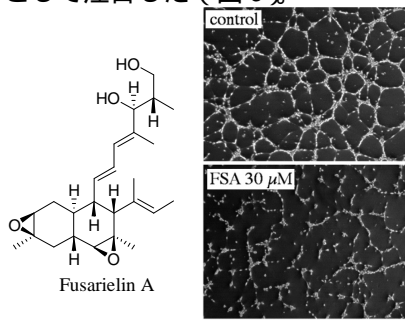


図 3. fusarielin A の管腔形成阻害活性

一方、ヒト前骨髄急性白血病細胞 (HL-60) を fusarielin A で処理したところ、アポトーシス誘導活性を示すことが明らかとなった。以上のことから、がん細胞の増殖抑制に有効な異なる活性を有する fusarielin A は魅力的なツールになり得ると考えられる。

本研究では fusarielin A の未解明な分子メカニズムの解明を目的とし、そのために構造修飾によるプローブ化を行うこととした。開発したプローブ分子の活性は正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成阻害率と HL-60 細胞の細胞増殖抑制率で評価することとした。

#### 4. 研究成果

(1) Bestatin 誘導体による抗アポトーシス阻害剤の開発: IAP タンパク質の細胞内寿命の制御

我々の先行研究では、bestatin のカルボン酸部位をエステルへと変換することで cIAP1 の分解促進活性が上昇することと、メチルエステル誘導体 MeBS のメチル基の長さを伸張させても活性が保持されることが分かっていた。そこで、適当な長さのアルキル鎖を有する蛍光団をエステル結合で bestatin と繋いだ誘導体を種々合成して活性を評価した。その結果、ダンシル基およびアジドダンシル基を有する DanBE および ADanBE に活性が保持されていることが分かった (図 4)。

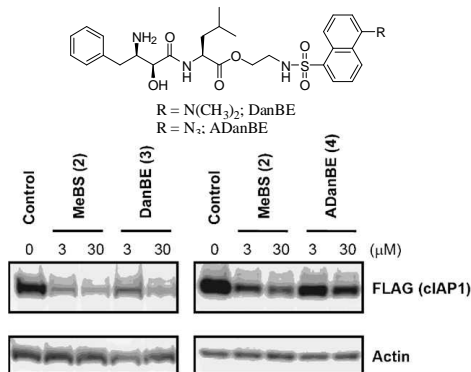


図 4. DanBE および ADanBE の cIAP1 分解活性

cIAP1 の自己分解の鍵を握っているのが cIAP1 中の亜鉛結合モチーフである BIR3 ドメインのコピキチン化であることは我々の先行研究により明らかとなっていた。そこで bestatin の作用部位の解明を目的として DanBE と BIR3 タンパク質を用いた蛍光偏向実験を行った。その結果、DanBE と BIR3 との直接的な相互作用による偏向の変化が観測された (図 5)。

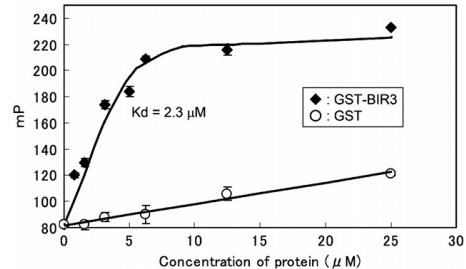


図 5. DanBE と BIR3 タンパク質を用いた蛍光偏向実験

一方、ADanBE は光反応性基であるアジド基を有しており、ダンシル基自身も蛍光性官能基であることから光親和性標識実験を行い BIR3 タンパク質の捕獲を試みた。その結果、ADanBE によって BIR3 タンパク質が標識され、さらに高濃度の MeBS によって標識が阻害されることも確認された (図 6)。

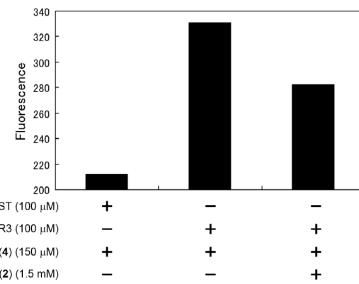


図 6. ADanBE と BIR3 タンパク質を用いた光親和性標識実験

以上の結果より、bestatin およびその誘導体は cIAP1 の BIR3 ドメインに直接結合することで cIAP1 の自己ユビキチン化を促進させていることが強く示唆された。

MeBS の高活性化を目指し、まず MeBS が有する各官能基と立体を種々変換した化合物を合成して cIAP1 の分解促進活性を評価した。しかしながらいずれの化合物も活性が大幅に減弱することが明らかとなった。本問題を解決するために我々は bestatin がアミノペプチダーゼ阻害活性を有していることに着目し、bestatin 以外のアミノペプチダーゼ阻害活性含有化合物の cIAP1 分解促進活性に対するスクリーニングを行った。その結果、actinonin と呼ばれる化合物に cIAP1 分解促進活性があることを見出した (図 7)。

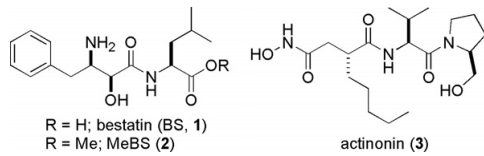


図 7. bestatin, MeBS および actinonin

先に行った bestatin の構造展開では末端にアミノ酸と亜鉛結合能を有するアミノアルコール構造が cIAP1 分解促進活性に対して必須であることが明らかとなった。ここで actinonin の構造に目をむけると、構造は異なるが亜鉛結合能を有するヒドロキサム酸構造を有していることが分かる。そこで我々は bestatin と actinonin のハイブリッド化として種々のアミノ酸の基本骨格を核にして、そこにヒドロキサム酸構造を組み込み活性の向上を目指して種々化合物を合成した。その結果、アミノ酸としてアラニンをも有し、亜鉛結合部位としてヒドロキサム酸を有するハイブリッド体 HAB-5A に MeBS の活性を上回る cIAP1 分解促進活性があることを見出すことに成功した (図 8)。

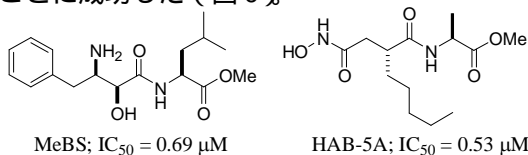


図 8. MeBS と HAB-5A の cIAP1 分解促進活性

(2) Thalidomide をリード化合物とした微小管形成阻害剤の創製：tubulin 重合の制御

我々はまず、5HPP-33 の水酸基部分を水酸基とは性質の異なる 8 種の官能基に変換した化合物を合成し (図 9)、tubulin 重合に対する効果を調べた。その結果、5HPP-33 の活性には届かないものの、TAD-33、TAL-33、TOX-33 が高い tubulin 重合阻害活性を示すことが分かった (図 10)。これら 3 種の化合物と 5HPP-33 には 5 位の官能基が弱い酸性度を有することが共通項目として挙げられる。また、カルボン酸を有する TCA-33 にもある程度の活性が保持されていることから、tubulin 重合阻害活性の発現には少なくとも 5 位近傍に解離性の弱酸官能基が必要であり、カルボン酸よりも酸性度が低いことが活性向上に繋がると示唆された。

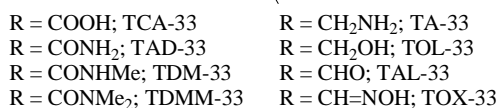
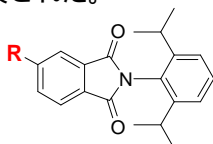


図 9. 5HPP-33 の 5 位変換化合物

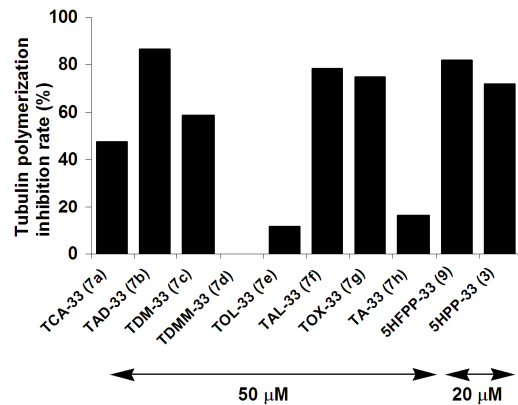
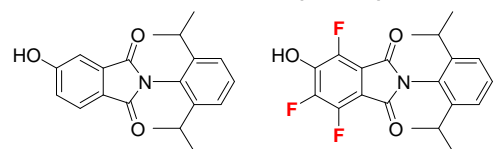


図 10. 5HPP-33 の 5 位変換化合物の tubulin 重合阻害活性

続いて 5HPP-33 と FPP-33 とのハイブリッド化合物 5HFPP-33 を合成し、活性を評価した。その結果、5HPP-33 の活性を上回る tubulin 重合阻害活性を示したとともに、これまで我々が開発したフタルイミド系の tubulin 重合阻害剤の中で最高の活性を示す化合物の創製に成功した (図 11)。



5HPP-33; IC<sub>50</sub> = 6.9 μM      5HFPP-33; IC<sub>50</sub> = 5.0 μM

図 11. 5HPP-33 および 5HFPP-33 の tubulin 重合阻害活性

(3) Fusarierin A をリード化合物とした新規血管新生阻害剤の創製：管腔形成の制御

FSA への官能基導入と活性評価

我々はこれまでに Fusarierin A (FSA) が管腔形成阻害とアポトーシス誘導の 2 つの活性を有していることを明らかにした。しかしその作用機序は不明のままであったため、FSA のプローブ化を目的として FSA へ官能基を導入した場合の活性に及ぼす影響について評価することとした。導入する官能基と位置は後のプローブ化を視野に入れてベンジル基とし、導入が比較的容易と考えられる 2 つの水酸基とした。2 種のベンジル基導入 FSA 誘導体 3-Bn-FSA と 1,3-Bn<sub>2</sub>-FSA を合成して HUVEC の管腔形成阻害活性を評価したところ、3-Bn-FSA が FSA と同様に管腔形成阻害活性を有していることが明らかとなった (図 12)。また、アポトーシス誘導活性の指標として 3-Bn-FSA の HL-60 細胞に対する増殖抑制活性を評価した。その結果、3-Bn-FSA の IC<sub>50</sub> 値は 15.3 μM となり、細胞増殖抑制活性に関しては FSA (IC<sub>50</sub> = 23.6 μM) を上回る活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、FSA の 3 位水酸基上への官能基導入は FSA そのものが有する活性にほとんど影響を与えない

ことが明らかとなった。

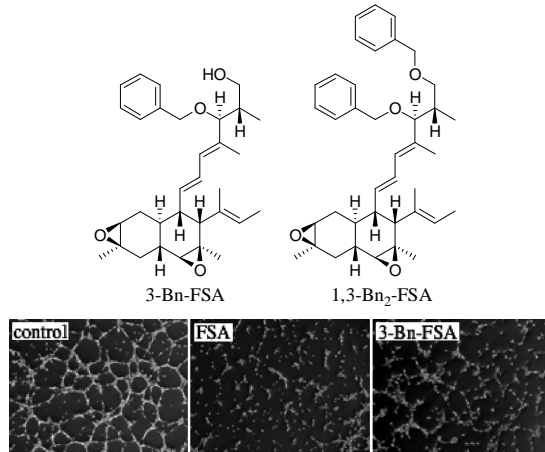


図 12. FSA および 3-Bn-FSA の管腔形成阻害活性

#### FSA の標的分子の同定

活性物質の標的分子の同定に用いる手段としては光親和性標識と呼ばれる手法がしばしば用いられる。これは活性物質に光反応基と検出用の官能基（蛍光性官能基、放射性同位元素等）を組み込むことで直接標的分子を同定する手法である。本研究でもこの手法を活用することとした。実際の実験に先立ち、細胞中における標的分子の局在を調べることとした。まず、FSA を放射性同位元素である <sup>3</sup>H で標識し、HL-60 細胞における局在を調べた。その結果、<sup>3</sup>H で標識された FSA は核や膜にはほとんど存在せず、細胞質の可溶性画分に存在することが明らかとなった（図 13 A）。さらに可溶性画分を硫酸アンモニウムで沈殿させたところ、<sup>3</sup>H が示す放射活性がほとんど沈殿から検出されたことから標的分子がタンパク質であることも明らかとなった（図 13 B）。

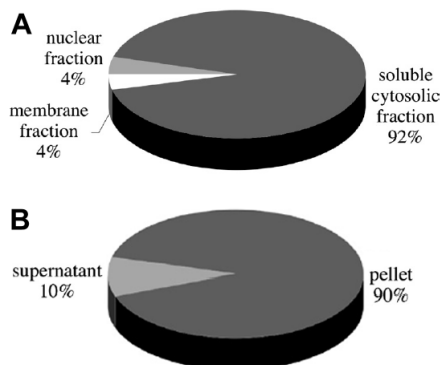


図 13. <sup>3</sup>H 標識 FSA の HL-60 中での局在

上述のように FSA の集積箇所が確認されたことから、実際に光親和性標識プローブの開発を行った。その結果では FSA の 3 位水酸基へのベンジル基の導入が可能であること

が分かっているので、この知見を参考にして CAFSA を設計した（図 14）。CAFSA は光反応性基としてアジド基を有し、また標的分子合を検出するために蛍光性のクマリンを導入した化合物である。

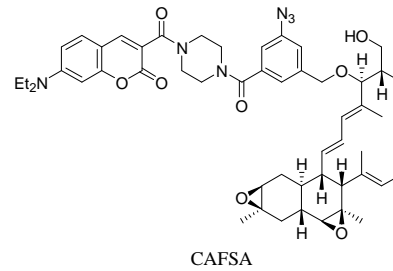
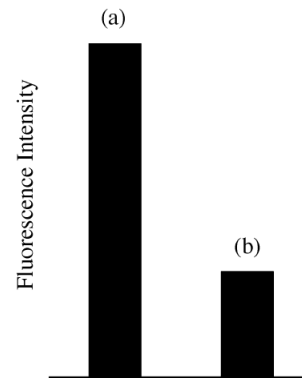


図 14. 光親和性標識プローブ CAFSA

まず、CAFSA を合成し、HUVEC に対する管腔形成阻害活性と HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、管腔形成阻害は FSA と同等、細胞増殖抑制に関しては FSA より弱いながらも半分程度の活性を保っていることが確認された。本結果を受け、我々は CAFSA が光親和性標識プローブとして活用できると判断し、HL-60 細胞の可溶性画分を用いて光親和性標識実験を行った。その結果、光照射による蛍光強度の増加が観測され、CAFSA と標的タンパク質との間に結合が形成されたことが示唆された（図 15 a）。また、高濃度の FSA 存在下では蛍光強度の減弱が見られたことから、CAFSA と FSA の結合部位は同一であることも明らかとなった（図 15 b）。



HL-60 protein	+	+
CAFSA	+	+
FSA	-	+
UV irradiation	+	+

図 15. CAFSA を用いた光親和性標識実験

今回の研究では FSA の標的分子の完全な特定までは至らなかったが、標的分子の捕獲実績が得られたとともに、FSA の分子機構解明に向けた有用な知見が得られた。



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)

Shinichi Sato, Hiroshi Aoyama, Hiroyuki Miyachi, Mikihiro Naito, Yuichi Hashimoto; Demonstration of Direct Binding of cIAP1 Degradation-promoting Bestatin Analogs to BIR3 Domain: Synthesis and Application of Fluorescent Bestatin Ester Analogs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 3354-3358 (2008), 査読有  
Shinichi Sato, Masashi Tetsuhashi, Keiko Sekine, Hiroyuki Miyachi, Mikihiro Naito, Yuichi Hashimoto, Hiroshi Aoyama; Degradation promoters of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 Based on Bestatin and Actinonin, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 4685-4698 (2008), 査読有  
Haruka Fujimoto, Hiroshi Aoyama, Tomomi Noguchi-Yachide, Yuichi Hashimoto, Hisayoshi Kobayashi; Fusarielin A as an Anti-angiogenic and Anti-proliferative Agent: Basic Biological Characterization, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 298-304 (2008), 査読有  
Hiroshi Aoyama, Tomomi Noguchi, Takashi Misawa, Takanori Nakamura, Hiroyuki Miyachi, Yuichi Hashimoto, Hisayoshi Kobayashi; Development of Tubulin polymerization Inhibitors Based on the Thalidomide Skeleton, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 944-949 (2007), 査読有

[学会発表](計5件)

佐藤伸一、青山洋史、鉄橋正士、宮地弘幸、内藤幹彦、橋本祐一、タンパク質寿命制御に立脚した新規アポトーシス誘導剤創製研究、日本薬学会 第128年会、2008年3月27日、横浜  
藤本悠、青山洋史、谷内出(野口)友美、橋本祐一、小林久芳、Fusarielin Aの生物活性とその分子基盤、日本薬学会 第128年会、2008年3月26日、横浜  
佐藤伸一、青山洋史、棚谷綾、内藤幹彦、宮地弘幸、橋本祐一、cIAP1減少を介した新規アポトーシス誘導剤創製研究、第26回メディシナルケミストリーシンポジウム、2007年11月28日、相模原  
佐藤伸一、青山洋史、内藤幹彦、宮地弘幸、橋本祐一、棚谷綾、cIAP1減少を介した新規アポトーシス誘導剤の合成研

究、第33回反応と合成の進歩シンポジウム、2007年11月5日、長崎

藤本悠、青山洋史、谷内出(野口)友美、橋本祐一、小林久芳、Fusarielin Aの生物活性とその分子基盤、第49回天然有機化合物討論会、2007年9月19日、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

青山 洋史 (AOYAMA HIROSHI)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号: 40374699

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし