

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02865

研究課題名(和文) 強力な海洋産抗腫瘍性物質が引き起こすタンパク質間相互作用の解析と応用

研究課題名(英文) Study of Protein-Protein Interaction Induced by Marine Natural Products

研究代表者

木越 英夫 (Kigoshi, Hideo)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90169839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋軟体動物アメフラシから超微量成分として発見されたマクロリドであるアプリロニンAは、細胞骨格タンパク質のアクチンとチューブリンと三元複合体を形成することにより、前例のない強力な抗腫瘍活性を示す。本研究では、この作用機序を明らかにするとともに、この作用機序に基づく高活性アナログを開発することとした。

機能解明に必要なプローブ分子を開発するために、アプリロニンの活性を保持するアナログ分子を設計し、短段階(40段階)で合成した。また、アプリロニンの類似の構造を有し、アクチンと結合するとともに、化学プローブとしての機能が期待できるサイトファイシン誘導体を合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然有機小分子と生体高分子の超分子を精密に解析して得られる知見は、有機小分子による分子認識機構を解明するとともに、天然有機小分子の生物学役割を理解し、医薬学的応用研究に展開する上で必須である。しかも、天然物の持つ構造多様性は、コンビナトリアル化学などの他の手法では入手できないので、天然物創薬分野へのアカデミアの挑戦が期待されている。本研究は、これまでにない型の抗腫瘍性作用機序を明らかにするための基礎的知見となる。この研究が完了すれば、新しい型(ぴか新)の抗がん剤に繋がる情報となる。

研究成果の概要(英文)：Marine macrolide aplyronine A induces protein-protein interaction between two cytoskeletal proteins, actin and tubulin, and exhibits a potent antitumor activity. To clarify the mechanism of action and develop highly active analogs, we have synthesized aplyronine analogs and an analog of scytophycin, which possesses similar structure to aplyronine and binds to actin. As a result, we synthesized in 40 steps an aplyronine analog that exhibits biological activity similar to that of aplyronine. And we synthesized scytophycin macrolactone analog, which possesses a chemically reactive epoxide group, which is expected to be a key functional group as a chemical probe.

研究分野：天然物化学

キーワード：アプリロニンA アクチン チューブリン 高活性アナログ

1. 研究開始当初の背景

近年、天然有機小分子と生体高分子との反応に関する研究が活発に行われている。これら小分子と生体高分子の超分子を精密に解析して得られる知見は、有機小分子による分子認識機構を解明するとともに、天然有機小分子の生物学役割を理解し、医薬学的応用研究に展開する上で必須である。また、創薬化学においては、開発研究戦略の絞り込みが著しいことと抗体医薬がブームとなっていることから、多くの製薬会社が創薬リード化合物となる天然有機小分子の探索・開発を縮小している。しかし、天然物の持つ構造多様性は、コンビナトリアル化学などの他の手法では入手できないので、この分野へのアカデミアの挑戦が期待されている。大村(北里大学)らの駆虫活性天然物アベルメクチンの発見による寄生虫感染症治療に対する貢献は、この分野の成果が創薬研究として成功した例の一つである。

それら天然有機小分子の中でも海洋天然物は、海洋生物の生育環境が陸上生物とは大きく異なっているために、上記の研究を行うための重要な鍵となる特異な生物活性有機化合物を供給している。フグ毒として発見されたテトロドトキシンは、その強力な神経毒性から、ナトリウムチャンネルの遮断薬として、神経生理学に大きな貢献をした。また、クロイソカイメンから単離されたハリコンドリニンにおいて、その誘導体が合成創薬化学の力により医薬品として上市されたことも、天然物を用いるケミカルバイオロジー研究の成果である。

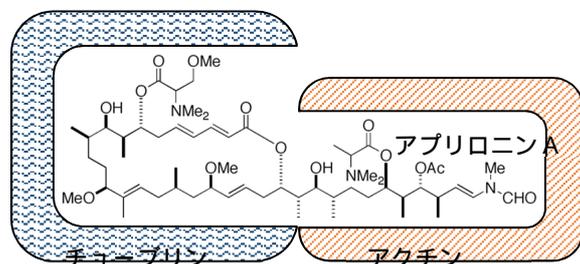
このように、海洋天然物などを対象とする天然物化学には、生物化学や創薬のブレイクスルーとなる新規作用機構を持つシーズの発見が学術界のみならず創薬業界からも求められている。

2. 研究の目的

1993年に研究代表者の研究グループにおいて海洋軟体動物アメフラシから超微量成分として発見されたマクロリドであるアプリロニンAは、前例のない強力な抗腫瘍活性を示す(*Tetrahedron*, 2007. 担癌マウスの延命率: P388 白血病 545%など)。この値は、既存の抗がん剤(マイトマイシンCによる担癌マウスの延命率: P388 白血病 250%)を上回る。研究代表者らはこの化合物の構造を明らかにし、化学合成による供給法を確立した。次いで、この化合物の生体内標的分子が既存の抗腫瘍剤とは異なり、細胞骨格タンパク質のアクチンであり、アクチンポリマー(F-アクチン)を脱重合することを明らかにした。さらに、有機合成により得た人工類縁体を用いたアクチン脱重合活性に関する構造活性相関研究と(*J. Org. Chem.*, 1996; *Bioorg. Med. Chem.*, 1997; *Tetrahedron*, 2002)、アプリロニンAとアクチンの複合体の結晶構造解析(*J. Mol. Biol.*, 2006)により、アプリロニンAの抗腫瘍性発現のためには、アクチン以外の第2の標的生体分子が存在することが示した。その後、さまざまな生物有機化学的研究を行った結果、もう一つの細胞骨格タンパク質であるチューブリンが第二の標的タンパク質であることがわかった(*J. Am. Chem. Soc.*, 2013)。これまでに分かっている作用機序は、以下の通りである。

- (1) アプリロニンAは、まず細胞内に最も多く存在している細胞骨格タンパク質であるアクチンと結合して、1:1複合体を形成する。
- (2) この複合体がもう一つの細胞骨格タンパク質であるチューブリンヘテロダイマーと結合して、三元複合体を形成する。
- (3) この三元複合体がチューブリンの重合を阻害し、紡錘体形成異常を引き起こす。
- (4) 細胞周期がG2/M期で停止する。
- (5) カスパーゼ3が活性化され、アポトーシスが起る。

本研究においては、海洋天然物によって誘起される、代表的な細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンのタンパク質-タンパク質相互作用に基づく生物活性作用機序を明らかにするとともに、その作用機序を応用した高活性アナログを開発することを目的とする。



アプリロニンA-アクチン-チューブリン三元複合体の模式図

本研究で用いる天然物アプリロニンAは、研究代表者の研究グループで発見された化合物であり、独自の天然物を用いる研究は、国内外の他の研究者の追従を許さない独創的なものとなる。ましてや、アプリロニンAの抗腫瘍性は市販の抗がん剤を上回る強さであり、創薬化学において極めて特徴的な化合物である。本研究により、これまでは知られていなかった抗腫瘍性機構の詳細が明らかになれば、新しい型(ぴか新)の制がん剤開発の重要な基礎的知見となる。

3. 研究の方法

研究代表者らがこれまでに、単離研究や合成研究を行ってきた海洋天然物アプリロニンAについて、海洋生物から単離する天然アプリロニンAおよび天然類縁体、合成研究により供給でき

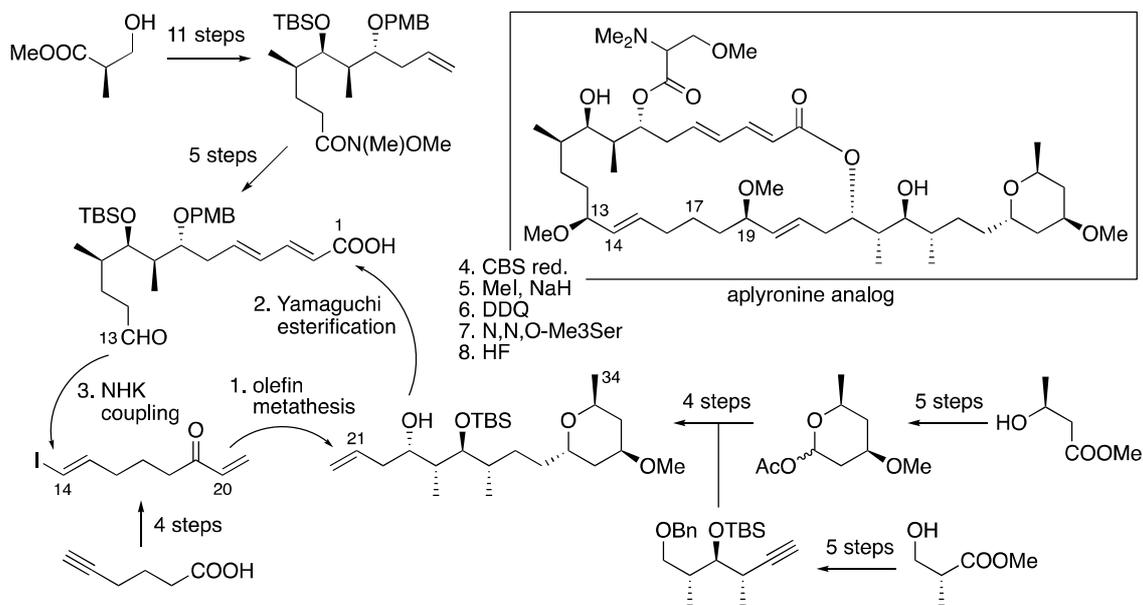
合成品および人工類縁体を用いて、これらの分子が誘起するアクチンとチューブリンの相互作用を解明する。さらに、この相互作用と腫瘍細胞増殖阻害活性との関連を細胞レベルの実験により明らかにする。

まず、アプリーロニン A について、海洋動物アメフラシの採集・抽出と化学合成により供給を行う。得られた天然物を用いた三元複合体の構造解析を行うとともに、三元複合体の構造解析のために化学プローブを開発する。化学プローブ法は、結晶化が困難な複合体の構造解析にも適用できる点が優れている。アプリーロニン A を化学プローブに変換するためには、アプリーロニン A の化学変換が必要であるが、アプリーロニン A の側鎖部エナミド基を用いた化学修飾が高効率で可能であり、こうして調製した誘導体は腫瘍細胞に対する増殖阻害活性とアクチン脱重合活性を維持していることがわかってきた。しかしながら、三元複合体におけるアプリーロニン A とチューブリンとの結合位置を決定するためには、満足すべき活性を持つものが開発できていなかった。これは、側鎖部に化学修飾して光アフィニティ基を導入した化学プローブを設計しているために、光アフィニティ基が目的とするチューブリンに十分に届いていないためと考えられる。新たな化学プローブの設計のためには、さらなる構造活性相関研究と合成経路の見直しが必要になるので、アプリーロニン誘導体とアプリーロニン類似のアクチン結合天然物の化学合成に注力した。

4. 研究成果

アプリーロニンハイブリッド化合物の短工程合成

化学プローブ合成のためには、必要な誘導体を供給できる合成法の開発が不可欠である。これまでに、アプリーロニン A とスウィンホライド A のハイブリッド化合物は、アプリーロニン A の生物活性を再現しつつ、アプリーロニン A よりも短工程で合成できることを示したが、それでも必要な工程数は、70 工程であった。そこで、大幅な工程数の削減を目指して、以下の人工類縁体の合成を計画した。この化合物では、すでに生物活性に不要であることがわかっている 14 位メチル基を除くことにより、この位置での立体選択性と収率の向上が期待できる。また、今回、これまで検討できていなかったマクロラクトン部 17 位メチル基を除去することにより、大幅な工程数の削減を図った。このメチル基は、アクチンとの結合に大きな効果を持っていないと予想できている。

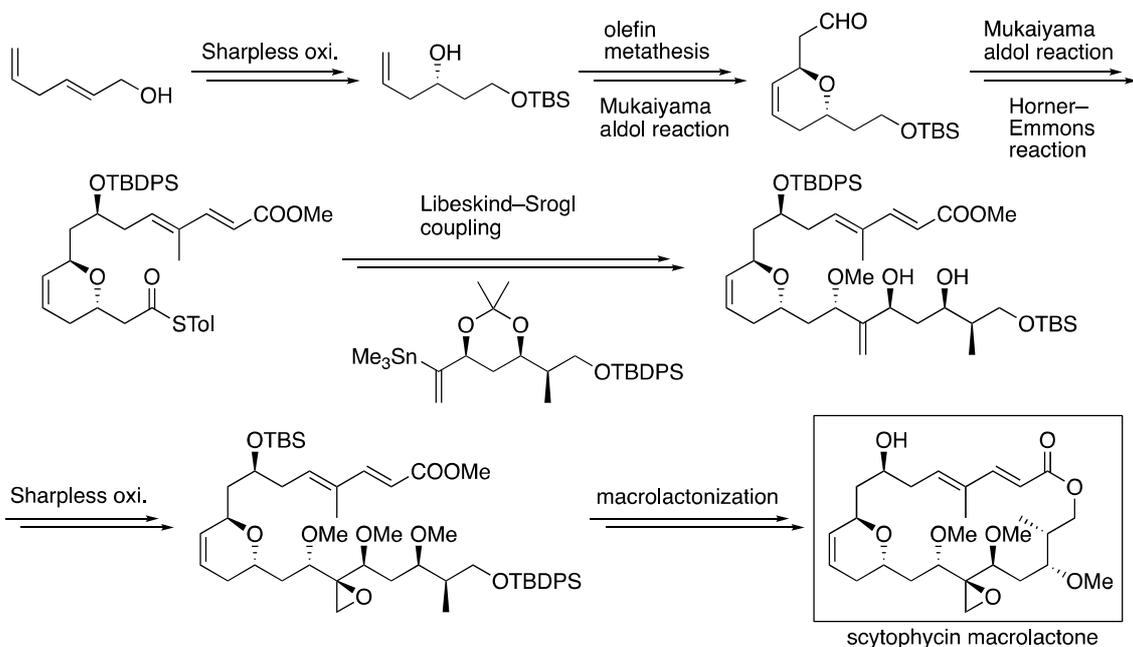


市販の原料から、Marshall 不斉プロパルギル化を鍵反応として、C1-C13 セグメントを 16 段階で、C21-C34 セグメントを 14 段階で合成した。また、C14-C20 セグメントを 4 段階で合成した。これらのセグメントを、オレフィンメタセシス、山口エステル化、NHK カップリングの 3 段階で連結した後、5 段階の官能基の変換により、目的とする簡略化人工類縁体を合成した。アプリーロニン A 自身の合成には、86 段階が必要であったが、今回の合成では、わずか 42 段階（共通の化合物の反応を除くと 40 段階）で行うことができた。合成した化合物について、細胞毒性試験を行ったところ、天然物よりは弱くはなったが、77 nM (HeLa S3) という強い活性を示す類縁体を開発できた。この合成法では、合成終盤に C13 位、C19 位のヒドロキシ基をメチル化するために、この位置にプローブ開発のためにリンカーを導入することができる点で、アプリーロニンの生物有機化学研究に有用な経路といえる。

アクチン脱重合海洋天然物サイトファイシンマクロラクトンの合成

アクチンと結合することにより、強力な細胞毒性を示す海洋天然物に、サイトファイシン類がある。アプリーロニンと類似の側鎖を有するが、マクロラクトン部にアルキル化能を持つと期待さ

れるエポキシ基を有する誘導体が、他の誘導体に比較して強力な活性を示すところから、この化合物の合成研究は、アプリロニンプローブ開発のために有益な知見が得られると期待できる。本研究では、そのマクロラクトン部の合成を行った。



市販のアリルアルコール化合物に対して、Sharpless 不斉エポキシ化を利用して、キラルアルコールを合成した。この化合物に対して、オレフィンメタセシスと向山アルドール反応を利用して、アルデヒドを合成した。さらに、2 回目の向山アルドール反応と Horner-Emmons 反応を利用して、チオエステルを合成した。これと、別途合成したビニルスズ化合物を Libeskind-Srogl カップリングを利用して連結し、アリルアルコールを合成した。次いで、Sharpless 不斉エポキシ化とマクロラクトン化を利用して、目的とするサイトファイシンマクロラクトン部を合成した。今後、この化合物の生物活性を検定するとともに、今回得られた知見をもとに、未だ合成されていないサイトファイシン B の合成を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Ohyoshi Takayuki, Namiki Mayu, Miyazaki Yuto, Sato Shusei, Noguchi Tomonari, Kigoshi Hideo | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 Toward the total synthesis of scytophycins: Synthesis of the C7-C21 fragments of scytophycins A, B, and C | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Tetrahedron Letters | 6. 最初と最後の頁 154250 ~ 154250 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2022.154250 | 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 Ohyoshi Takayuki, Takano Atsuhiko, Kikuchi Imari, Ogura Tomotaka, Namiki Mayu, Miyazaki Yuto, Hirano Takahiro, Konishi Shota, Ebihara Yuta, Takeno Koichi, Hayakawa Ichiro, Kigoshi Hideo | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Structure-activity relationship studies on an antitumor marine macrolide using aplyronine A-swinholide A hybrid | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry | 6. 最初と最後の頁 2922 ~ 2938 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2ob00118g | 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 Utomo Didik Huswo, Fujieda Akari, Tanaka Kentaro, Takahashi Momoko, Futaki Kentaro, Tanabe Kenta, Kigoshi Hideo, Kita Masaki | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 The C29-C34 parts of antitumor macrolide aplyronine A serve as versatile actin-affinity tags | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Communications | 6. 最初と最後の頁 10540 ~ 10543 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1cc04259a | 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 Ohyoshi Takayuki, Kigoshi Hideo | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Recent Progress in Structure-Activity Relationship Studies on Antitumor Macrolide Aplyronine A by Using Hybridization of Actin-depolymerizing Natural Product | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 580 ~ 584 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200866 | 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 Arai Atsushi, Watanabe Rei, Hattori Atsunori, Iio Keita, Hu Yaping, Yoneda Kozo, Kigoshi Hideo, Kita Masaki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 N,N-Dimethylaminopyrene as a fluorescent affinity mass tag for ligand-binding mode analysis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 7311 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64321-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計11件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木 麻戸香、吉田 将人、木越 英夫 |
| 2. 発表標題 プローブ合成を指向したAplyronine Aの合成研究 |
| 3. 学会等名 日本化学会第103春季年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平野 貴大、小西 翔太、大好 孝幸、木越 英夫 |
| 2. 発表標題 アブリロニンAの構造活性相関研究を見据えた簡略型ハイブリッドの開発研究 |
| 3. 学会等名 日本化学会第103春季年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hideo Kigoshi |
| 2. 発表標題 Marine Natural Product Chemistry: Isolation, Structural Determination, Synthesis, and Molecular Mechanism of Biological Action |
| 3. 学会等名 Nakanishi Symposium 2022 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ウトモ ディディック フスオ、藤枝 あかり、田中 健太郎、_橋 桃子、二木 健太郎、田邊 健太、木越 英夫、北 将樹 |
| 2. 発表標題 アクチンアフィニティータグの開発を志向したアプリロニン A 側鎖類縁体 の合成と機能評 |
| 3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小西 翔太、菊池 いまり、大好 孝幸、木越 英夫 |
| 2. 発表標題 アプリロニンAを基にした抗腫瘍性ハイブ リッド化合物の合成研究 |
| 3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 吉田 将人 (Yoshida Masahito) (80511906) | 筑波大学・数理物質系・准教授 (12102) | |
| 研究分担者 | 大好 孝幸 (Ohyoshi Takayuki) (90639303) | 筑波大学・数理物質系・助教 (12102) | |

| | 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 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 北 将樹 (Kita Masaki) | 名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授 | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|