

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14790

研究課題名（和文）転写制御中分子群の化学-酵素ハイブリッド合成

研究課題名（英文）Chemo-enzymatic synthesis of medium-sized molecules regulating transcriptions

研究代表者

谷藤 涼 (Ryo, Tanifuji)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教

研究者番号：10866205

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、酵素変換と化学合成を融合し、核酸-タンパク質間相互作用を制御する中分子リガンド群の設計・合成を目的とした。従来使用していた骨格合成酵素に加え、類縁酵素の活用を進めた。また、修飾酵素についても検討を進め、連続酵素変換に成功した。設計したマクロ環状中分子の構造多様化を進めた。構築したマクロ環へ、転写因子の既知リガンドと光親和性標識基を導入した分子量1500程度の中分子も合成した。大量発現、精製した転写因子と合成中分子との共有結合形成を検討した。さらに、合成した中分子群のがん細胞に対する増殖阻害活性も系統的に評価した。マクロ環の微細な構造変化により、作用機序が変調している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸-タンパク質間相互作用の制御は、転写因子を標的とするデコイ核酸に代表されるように、核酸を基盤とした技術が発達している。しかし核酸を標的とする中分子化合物については、如何なる細胞も無差別的に攻撃し得る低い選択性から、精力的な開発が実施されていない。他方で、少数であるがDNAや近傍の核内タンパク質に作用する化合物のADC薬剤がFDAにより認可されている。特定の細胞への低・中分子の選択的送達法の開発が進む現状において、核内作用型分子の多様化は、新規薬剤開発に直結する重要な課題と言える。本研究では、核内現象の選択的制御を実現する新規中分子群の創製につながる知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to design and synthesize a series of mid-sized molecules that regulate nucleic acid-protein interactions by integrating enzymatic transformation and chemical synthesis. Successful cascade enzymatic conversion was achieved by combining enzymatic construction of complex scaffolds with subsequent oxidative modifications. The structural diversification of the designed macrocyclic mid-sized molecules was also explored. Mid-sized molecules incorporating known ligands for transcription factors and photoaffinity labeling units on the constructed macrocycles were synthesized. The covalent bond formation between the overexpressed and purified transcription factors and the synthesized molecules was examined. Additionally, the proliferation inhibitory activity of the synthesized molecules against cancer cells was systematically evaluated. The results indicated that subtle structural changes in the macrocycles potentially modulated their mechanisms of action.

研究分野：天然物化学

キーワード：化学-酵素合成 マクロ環 中分子 DNAアルキル化 DNA-タンパク質間相互作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

天然物エクテナサイジン 743 (トラベクテジン) は悪性軟部腫瘍の治療薬として臨床で使用されている(トラベクテジン、Yondelis®)。本中分子は、DNA アルキル化を担う五環性母骨格と、タンパク質相互作用部位を 10 員環マクロラクトンで連結した特異な構造を持つ。マクロラクトン上のユニットを改変した合成誘導体であるルルビネクテジンは、2020 年に FDA から転移性小細胞肺癌の治療薬として認可された。このような成功例と活性発現の機構を踏まえると、マクロ環構造の多様化により DNA-タンパク質間相互作用を選択的に制御する中分子群の創製が期待される。しかし、エクテナサイジン 743 はその構造の複雑さから、多段階の半合成プロセス (> 20 工程) を必要とし、構造改変の範囲が限られている。本研究では、エクテナサイジン 743 に着想を得て、より簡便かつ迅速 (≤ 8 工程) に構築できるマクロ環含有中分子群を設計した。本分子群を基盤として、DNA-中分子-タンパク質三成分複合体の形成を鍵とする転写制御の実現を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、提案者がこれまでに開発した化学-酵素ハイブリッド合成法によって複雑母骨格を迅速に構築しながら、本骨格へマクロ環構造、タンパク質相互作用部位を自在に導入する。この分子群を基盤技術として、核酸-タンパク質間相互作用の中分子による自在制御を実現する。

### 3. 研究の方法

独自に設計した天然物様マクロ環状中分子群を基盤とし、1) 化学-酵素ハイブリッド迅速合成法の開発、2) 設計分子群の半合成、核内に到達して DNA に作用しうる概念の実証、3) マクロ環構造に依存した作用機序の変化の実証、4) 特定の転写系の選択的制御を可能とする中分子の設計・合成・機能評価を順次進めた。

### 4. 研究成果

1) について、従来使用していた骨格構築酵素 2 種に加え、類縁酵素の活用を検討した。大量発現と可溶化には成功したが、酵素活性の確認には至っていない。発現手法を変更し、検討を継続している。前述の骨格構築酵素群によって生成する五環性化合物は擬対称構造を取り、2 つのフェノール環を有する。設計した中分子リガンド群の合成には、五環性化合物の一方のフェノール環のみを位置選択的にキノンへと酸化し、非対称化する必要がある。これを達成するため、後期修飾酵素の適用を進めた。酸化酵素群 3 種の発現を検討し、2 種については可溶化、精製に成功した。活性を確認できたのは 1 種のみであるが、目的のモノキノンの生成を確認している。効率の改善を進め、キノンを足掛かりとした、後述の設計マクロ環の構築を目指す。

2) に関して、エクテナサイジン 743 の 1-4 位炭素間に架かる 10 員環マクロラクトンを 1-5 位間架橋型へ改変した中分子群について、半合成した。承認薬であるエクテナサイジン 743 と同一の出発原料から、各設計分子を 8 工程以内で半合成するプロセスを確立した。4 系統のマクロ環構造を合成し、それぞれ X 線結晶構造も取得した。

マクロ環構造と生命現象への干渉能の関連性を解明するため、細胞実験に先駆けて、20 塩基対の DNA オリゴマーを用いて合成分子群の DNA アルキル化能を *in vitro* で解析した。その結果、環のサイズが大きくなるほど DNA アルキル化能が抑制されることが明らかとなった。母骨格を保持しつつマクロ環を構造改変することで、生理活性を調節できる可能性を示唆する結果と言える。

承認薬であるエクテナサイジン 743 は、核内に到達して DNA をアルキル化し、同時に DNA 修復タンパク質を阻害して二重鎖切断 (DSBs: double-strand breaks) を誘起する。設計・合成した中分子群も同様に核内に到達し、DSB を誘起するかどうかを確認するため、これらの分子を肺癌由来 A549 細胞に作用させた。DSB 誘起の指標として、リン酸化ヒストンコア H2AX と DNA 修復タンパク質 53BP1 を選定し、免疫蛍光染色によりこ

これらの共局在を可視化した。その結果、14-17員環を持つ全ての化合物で H2AX と 53BP1 の共局在が確認された。この結果は、骨格改変にもかかわらず、合成中分子群が承認薬エクテナサイジン 743 と同様に DSB を誘起することを示している。また、分子量 846 の比較的大きな中分子も核内に到達可能であることが示唆された。

3) について、がん細胞パネルアッセイ (JFCR39) により、合成分子群が nM レベルの非常に強力な細胞増殖阻害活性を持つことが確認された。最も強力な分子では、39 種のがん細胞に対する  $GI_{50}$  (50%細胞増殖阻害濃度) の平均値が 2 nM 前後であり、同じ実験系でのエクテナサイジン 743 の値と同等であった。比較すると、この骨格改変戦略が新規抗がん剤の開発に有用であることが示唆された。また、39 種類の細胞に対する活性のフィンガープリントの比較により、いくつかの分子がエクテナサイジン 743 と類似した作用機序を持つことが示唆された (ピアソン相関係数  $r > 0.75$ )。一方、比較的大きなマクロ環を持つ化合物群はエクテナサイジン 743 との類似性が低く ( $r < 0.60$ )、他の既知阻害剤との高い類似性を示した ( $r > 0.75$ )。この結果を踏まえ、マクロ環構造に依存した標的タンパク質や標的経路の変化を期待してトランスクリプトーム解析を行ったが、期待に反し全ての化合物で遺伝子発現変動に有意な差は見られなかった。設計分子は全て DNA アルキル化剤として機能するため、DNA・RNA 合成系の関連遺伝子が大きく変動し、その他の遺伝子の変動が解析できなかったと考えられる。現時点では遺伝子からのアプローチは困難であると判断し、DNA-合成分子複合体と核内タンパク質との相互作用解析に重点を移して検討を進めている。

4) について、設計・合成したマクロ環構造の二級アミンのアルキル化、または 1,3-ジエンに対する付加環化による迅速な修飾法を確立した。これらの手法を用いて、光親和性標識基と既存の転写因子リガンドを導入したマクロ環構造を持つ中分子群の合成に成功した。また、これらの中分子を用いたタンパク質捕捉のモデル実験も実施した。転写因子のモデルとして選定したタンパク質を合成遺伝子から大腸菌発現系を用いて大量発現し、精製タンパク質として得ることができた。反応条件の詳細な検討が必要であるが、光親和性標識基の励起による中分子とタンパク質間の共有結合形成を進めている。モデル実験系にて特定のタンパク質を複雑な系から捕捉する手法を確立しつつ、設計した中分子に核内タンパク質の低分子リガンドを導入し、転写をはじめとする核酸-タンパク質間相互作用の合理的制御を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 谷藤 涼、大栗 博毅
2. 発表標題 中分子アルカロイド群の化学 酵素ハイブリッド合成 Ecteinascidin 743 マクロ環骨格多様化
3. 学会等名 学術変革領域研究 (A) 生体反応の集積・予知・創出を基盤としたシステム生物合成科学 第2回公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Tanifuji, Naoto Haraguchi, Hiroki Oguri
2. 発表標題 Chemo-enzymatic synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids
3. 学会等名 TATESHINA CONFERENCE ON ORGANIC CHEMISTRY 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷藤 涼
2. 発表標題 サフラマイシン群の化学-酵素ハイブリッド合成とその後
3. 学会等名 令和5年度日本薬学会東北支部主催 第21回化学系若手研究者セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷藤 涼, 村松 由起子, 清宮 啓之, 旦 慎吾, 大栗 博毅
2. 発表標題 エクテナサイジン類のマクロ環状骨格多様化による抗腫瘍性中分子群創出と細胞内DNA二重鎖切断
3. 学会等名 2023年度 文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷藤 涼
2. 発表標題 エクテナサイジン類のマクロ環状骨格多様化による抗腫瘍性中分子群創出と細胞内DNA二重鎖切断
3. 学会等名 第2回 有機合成を基盤とした自由な天然物若手勉強会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原口 尚人、谷藤 涼、大栗 博毅
2. 発表標題 合成基質群の酵素変換による サフラマイシン類側鎖の構造多様化
3. 学会等名 学術変革研究領域(A) 「予知生合成科学」 第一回若手シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷藤 涼, 細野 絵里奈, 大栗 博毅
2. 発表標題 ピステトラヒドロイソキノリンアルカロイド 化学-酵素ハイブリッド全合成・マクロ環多様化
3. 学会等名 第55回天然物化学談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Tanifuji, Erina Hosono, Hiroki Oguri
2. 発表標題 Systematic Diversification of Macrocyclic Framework of Ecteinasidins
3. 学会等名 The 22nd Tateshina Conference on Organic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷藤 涼, 村松 由起子, 清宮 啓之, 旦 慎吾, 大栗 博毅
2. 発表標題 エクテナサイジン類のマクロ環状骨格多様化による抗腫瘍性中分子群創出と 細胞内 DNA 二重鎖切断
3. 学会等名 2022年度 AdAMS成果発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷藤 涼
2. 発表標題 Ecteinasidin 743 マクロ環状骨格多様化
3. 学会等名 ポストコロナ第1回 有機合成を基盤とした自由な天然物若手勉強会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷藤 涼, 細野 絵里奈, 村松 由起子, 清宮 啓之, 大栗 博毅
2. 発表標題 エクテナサイジン類のマクロ環状骨格多様化による抗腫瘍性 中分子群創出と細胞内DNA二重鎖切断
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------