

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710250

研究課題名（和文）カリクリンAに基づく選択的タンパク質脱リン酸化酵素阻害物質の創製

研究課題名（英文）Development of selective phosphatase inhibitor based on calyculin A

研究代表者

脇本 敏幸（TOSHIYUKI WAKIMOTO）

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：70363900

研究成果の概要（和文）：海洋天然物には極めて低濃度で強力な細胞毒性物質がこれまで多数報告されてきている。それらは細胞内あるいは細胞膜上に存在する標的分子を極めて選択的に認識し、細胞を死に至らしめる。このような特異的な機能は生化学研究において極めて重要なツールとなってきている。そこで本研究ではタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤として利用されている海綿二次代謝産物であるカリクリンAの高機能化を目指した。カリクリンAの生物活性発現に必要な部分構造に関する知見をもとに、ライブラリー構築へ向けた検討、ならびに蛍光プローブの創製を行った。

研究成果の概要（英文）：Many marine natural products exhibit highly potent cytotoxicity. They selectively inhibit the functions of either intracellular or membrane-bound target molecules, leading to cell death. These specific biological activities can provide valuable information on the biochemical research field. Therefore, we initiated this program aimed at the development of functionalized calyculin A, a protein phosphatase inhibitor, which was originally isolated from the marine sponge, *Discodermia calyx*. Based on the insights into the structural moieties essential for biological activity, the synthetic process toward library construction and fluorescent probe were developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：カリクリン、タンパク質脱リン酸化酵素、チョコガタイシカイメン

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）はリン酸化酵素（キナーゼ）の逆反応を触媒する酵素である。これまで抗がん剤の標的として数多くのキナーゼのサブタイプが阻害剤開発の対象となってきた一方で、ホスファターゼはほとんど開発対象とされていない。PP2B（カルシニューリン）が唯一標的分子として医薬品開発が行われ、タクロリムスやシクロスポリンが免疫抑制剤として臨床応用されている。代表的な4種のサブタイプとして知られているPP1、PP2A、PP2B、PP2C

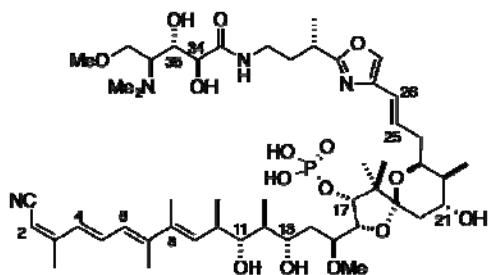
の中で、PP2A 選択的阻害活性が抗腫瘍活性の発現に関与する知見が報告されている。従来、PP2A 選択的な阻害剤は放線菌から見出された fostriecin のみであり、未だ十分に供給されていない。近年になり、上記4種のサブタイプすべてのX線結晶構造が出揃い、既存の阻害剤に基づく選択性向上を目指した構造改変への知見が蓄積されつつある。

一方で、天然物からは複数のセリン・スレオニンホスファターゼ特異的な阻害物質が見出されている。ハンミョウに属する昆虫が産生する cantharidin は阻害剤の中でも最も

低分子量であるが、阻害活性は比較的弱い。一方で海洋天然物として見出された、okadaic acid や calyculin A は極めて低濃度で強力な阻害活性を示すことが知られている。これらの阻害物質はすでに構造活性相関ならびに X 線結晶構造解析による結合様式が明らかにされている。その結果、okadaic acid には左末端のカルボキシル基、右末端のスピロ環が、一方で藍藻由来の microcystin 類には環状ペプチド構造が酵素阻害活性に必須の部分構造であることが明らかにされている。また、okadaic acid が比較的 PP2A 選択性を示すことが知られている。

## 2. 研究の目的

1986 年に伊豆半島沿岸、水深約 20 m 前後の海域に生息するチョコガタイシカイメン (*Discodermia calyx*) より単離、構造決定された calyculin A は極めて強力な細胞毒性として見出された ( $IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$ ; P388 マウス白血病細胞)。その作用機序はリン酸化セリン、スレオニンの脱リン酸化酵素である PP1 および PP2A に対する極めて強力な阻害作用に基づき ( $IC_{50} = 1 \text{ nM}$ )、上記阻害剤の中でも最も強力に PP1 および PP2A を阻害することが知られている。申請者の研究によってその構造活性相関ならびにリコンビナントタンパク質として異種発現可能な PP1 $\gamma$  との複合体における X 線結晶構造を明らかにした。その結果 C1 位~C10 位にかけての tetraene 構造、C11 位および C13 位の 1,3-diol 構造、C17 位水酸基のリン酸エステル基が酵素阻害活性に必須であることを明らかにした。右側ペプチド側鎖は酵素阻害活性には必要ない一方で、細胞膜透過性に関与することが示唆されている。これらの知見は calyculin A が比較的複雑な構造を有するにもかかわらず、酵素阻害活性における活性発現最小単位は比較的シンプルな構造に帰結できることを意味する。つまり、tetraene、1,3-diol、phosphate の 3 つ部分構造を有する最小単位によってホスファターゼの強力な阻害が可能になる。したがって活性発現最小単位を利用したライブラリー構築において calyculin A が okadaic acid や microcystin 等の他の阻害物質よりも適することを示唆している。そこで、本研究では PP1 および PP2A への強力な阻害物質として知られる海洋天然物



Calyculin A (1)

calyculin A の構造を基に、ライブラリー構築を行い、サブタイプ選択的なホスファターゼ阻害剤を見出す事を目的とした。天然物の精緻な構造を最大限生かし、酵素側の X 線結晶構造を利用した Focused Library の構築によって選択的なホスファターゼ阻害剤の開発を目指す。また、calyculin A の極めて特異的な酵素阻害活性を維持したまま、蛍光官能基を導入することで蛍光プローブの合成を試みた。

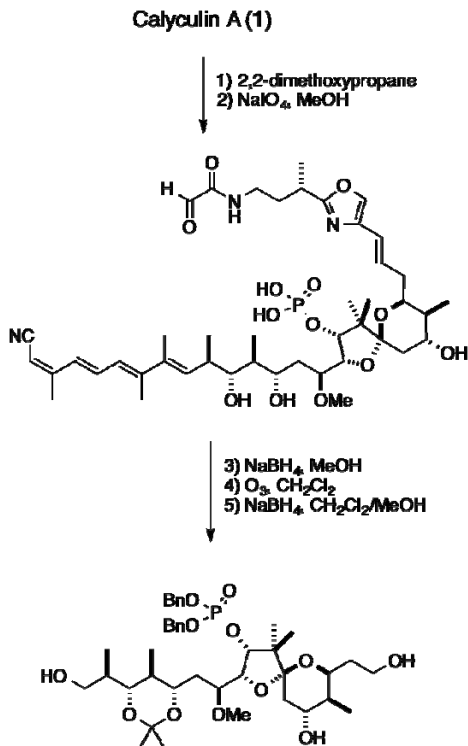
## 3. 研究の方法

本研究では天然物からの半合成的手法と 1,3-ジオールおよびリン酸エステルを含むユニットの合成の 2 通りの手法を試みた。まず、半合成的な手法として、海綿 *D. calyx* より calyculin A を単離、精製し、天然物からの構造変換を試みた。化学変換の過程で得られた中間体を用いて蛍光プローブの合成を試みた。また、(*R*)-(-)-5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid を原料としたユニット合成経路の確立も試みた。

## 4. 研究成果

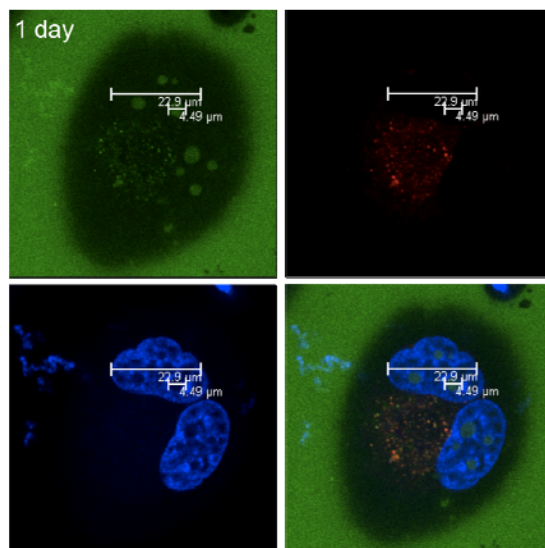
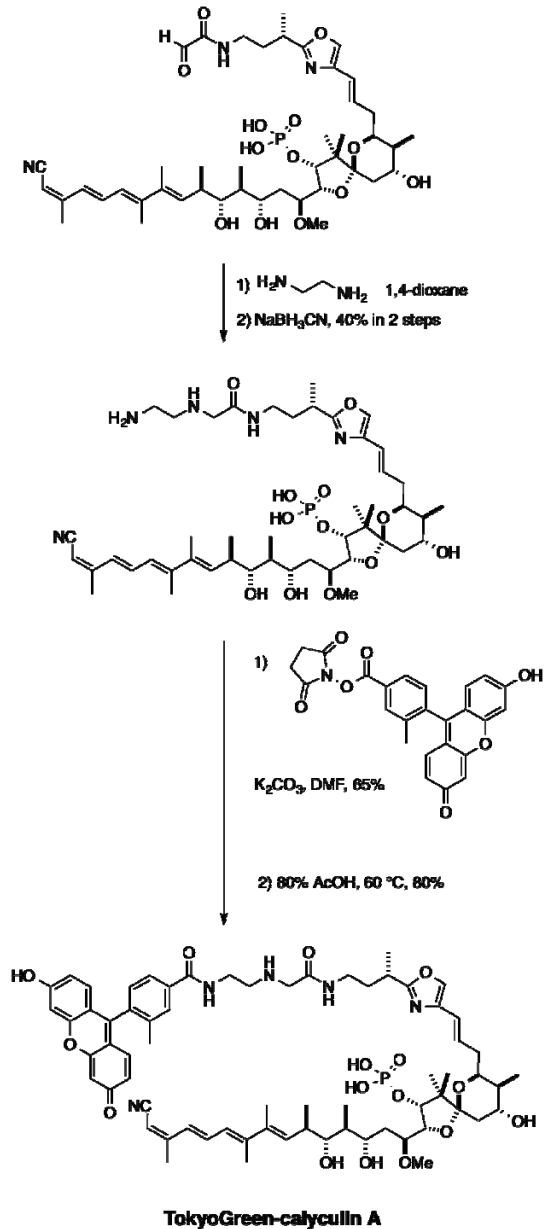
Calyculin A のリン酸エステル基と 1,3-diol を含む分子中央のユニットは二重結合に挟まれており、二重結合の選択的な開裂反応によってこの部位を取り出すことができる。しかし calyculin A は、ジメチルアミノ基とリン酸エステル基との静電的相互作用によって偽サイクリックなコンフォメーションを形成する。このコンフォメーション形成が化学変換において障害となることから、ジメチルアミノ基を有するペプチド部分をまず切除することとした。1,2-diol を過ヨウ素酸ナトリウムによって酸化的開裂を行うために、まず 1,3-diol をアセトナイドで保護する。ジメチルアミノ基を有するアミノ酸側鎖を過ヨウ素酸ナトリウムで切り出した後に、得られたアルデヒドを還元し、アルコールを得た。この段階でリン酸エステル基が露出されることによって、リン酸エステル基の効率的な保護が可能となる。リン酸エステル基をベンジル基で保護した後に、オゾン酸化によって、8,9 位、ならびに 25,26 位の二重結合を酸化的開裂する事によって、中央部のスピロケタール部分を効率的に得ることができた。半合成法によって得られたスピロケタール環を含むトリオール体に対して後の側鎖導入のために、様々な保護基を用いて水酸基の選択的な保護を試みた。しかしながら、十分な選択性を見出すことはできなかった。

Calyculin A の構造活性相関の詳細な解析によって酵素阻害活性および細胞毒性の発現に必須な部分構造が明らかにされていることから、酵素への親和性を維持した誘導体設計に基づき、化学変換による蛍光標識化を

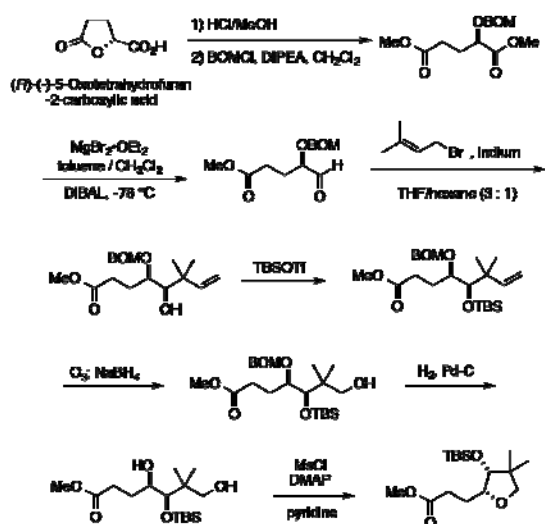


試みた。Calyculin A の 1,3-ジオール部位をアセトナイド保護した後、NaIO<sub>4</sub> を用いて 1,2-ジオール部位を切断し、アルデヒドを得た。得られたアルデヒドと ethylenediamine を反応させ生じたイミンを NaBH<sub>3</sub>CN によって還元し (還元的アミノ化)、末端アミン誘導体を得た。得られた末端アミンに Fluorescein 誘導体の一つである TokyoGreen を用いて蛍光官能基を導入した。今回、我々は蛍光官能基を有する calyculin A (TokyoGreen-calyculin A, TG-calyculin A) の合成に成功した。

得られた TokyoGreen-calyculin A の P388 マウス白血球細胞を用いた細胞毒性試験を行ったところ、calyculin A と比較して 6 千分の 1 程度の細胞毒性の低下が認められた。また、合成中間体より調製したアミン中間体の IC<sub>50</sub> 値も同様に 3 万分の 1 程度であった。当初予想していた通り、細胞毒性に必要な部分構造 (末端ペプチド部分) を蛍光官能基に変換することで、その細胞毒性は著しく低下した。一方で、タンパク質脱リン酸化酵素 2A に対する酵素阻害活性試験を行ったところ、TokyoGreen-calyculin A の IC<sub>50</sub> 値は 4.0 nM であり、calyculin A と同等の阻害活性を維持していた。そこで HeLa 細胞を用いたイメージングを試みた。TokyoGreen-calyculin A (5 μM) で HeLa 細胞を処理、経時的に蛍光顕微鏡下、観察を行った結果、数時間の経過では蛍光強度の局在は認められなかった。しかし 24 時間後、核内の核小体に蛍光強度の局在が認められた。また、LysoTracker との蛍光二重染色によってリソソームへの局在も認められた。



また、(R)-(-)-5-Oxotetrahydrofuran-2-carboxylic acid を出発原料として、リン酸エステル、1,3-diol を含むユニットの合成を試みた。まず塩酸メタノールでメチルエステル体を得た後に、生じた水酸基を BOM 基で保護、位置選択的な DIBAL 還元を MgBr<sub>2</sub> 存在下で行った。得られたアルデヒドに対してアリルインジウムを用いたアリル化を行い、ジェミナルジメチル基を導入した。末端オレフィンのオゾン酸化、還元を経て、生じた一級水酸基へ Ms 基を導入し、分子内環化を経て calyculin 類の 5,6-スピロケタール環の 5 員環に相当するテトラヒドロフラン環を構築した。得られたテトラヒドロフラン骨格へ 1,3-diol とリン酸エステル基を導入し、テトラエン骨格に代わる各種側鎖を導入し、ライブラリーを構築するとともに、酵素阻害活性試験を行っていく。



## 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 10 件)

- (1) M. Kimura, T. Wakimoto, I. Abe, Alloshemicalcalyculin A, a photochemically converted calyculin from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron Lett* 54, 2013, 114-116. 査読有 DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.10.130.
- (2) R. He, T. Wakimoto, Y. Egami, H. Kenmoku, T. Ito, Y. Asakawa, I. Abe, Heterologously expressed  $\beta$ -hydroxyl fatty acids from a metagenomic library of a marine sponge. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 22, 2012, 7322-7325. 査読有 DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.10.082.
- (3) R. He, T. Wakimoto, Y. Takeshige, Y. Egami, H. Kenmoku, T. Ito, B. Wang, Y. Asakawa, I. Abe, Porphyrins from a

metagenomic library of the marine sponge *Discodermia calyx*. *Mol. BioSyst* 8, 2012, 2334-2338. 査読有 DOI: 10.1039/C2MB25169H

- (4) M. Kimura, T. Wakimoto, Y. Egami, K. C. Tan, Y. Ise, I. Abe, Calyxamides A and B, cytotoxic cyclic peptides from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Nat. Prod.* 75, 2012, 290-294. 査読有 DOI: 10.1021/np2009187.
- (5) T. Wakimoto, I. Abe, Labile natural products. *MedChemComm*, 3, 2012, 866-870. 査読有 DOI: 10.1039/C2MD20016C
- (6) T. Wakimoto, H. Morita, I. Abe, Engineering of plant type III polyketide synthases. *Methods in Enzymology*, 515, 2012, 337-358. 査読有 DOI: 10.1016/B978-0-12-394290-6

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 脇本敏幸: 「Calyculin A 生合成遺伝子クラスターの探索」日本薬学会第 132 年会 (札幌) シンポジウム、2012 年 3 月 30 日
- (2) 脇本敏幸: "Search for the biosynthetic gene cluster of the cytotoxic polyketide calyculin A from the marine sponge *Discodermia calyx*" University of Bristol (Bristol, UK), Nov. 22, 2011.
- (3) 脇本敏幸: "Search for the biosynthetic gene cluster of the cytotoxic polyketide calyculin A from the marine sponge *Discodermia calyx*" University of Bonn (Bonn, Germany), Nov. 11, 2011.
- (4) 脇本敏幸: "Search for the biosynthetic gene cluster of the cytotoxic polyketide calyculin A from the marine sponge *Discodermia calyx*" University of Tübingen (Tübingen, Germany), Oct. 27, 2011.
- (5) 脇本敏幸: "Chemistry and biology of calyculin A" The 6th Korea-Japan Young Scientists Symposium (Seoul, Korea), June 24, 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

脇本 敏幸 (Toshiyuki Wakimoto)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授  
研究者番号: 70363900