

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293029

研究課題名(和文) ATR阻害剤ゴミシンNの作用機作の解明とがん治療増感剤への応用

研究課題名(英文) Studies on the interactions between ATR and its inhibitor Gomisin N and its application to a potentiator of antitumor agents.

研究代表者

石黒 正路 (Ishiguro, Masaji)

新潟薬科大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：10280687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：ATRとゴミシンNとの相互作用を部位を検討するための放射性ゴミシンNの調製を行った。また、Phosphokinase DomainにおけるゴミシンNの結合部位および結合様式を検討するためにPhosphokinase Domainの立体構造モデルを構築し、ゴミシンNのドッキングを行った。その結果、ゴミシンNの結合様式を推定し、その結合モデルからゴミシンNに関連した構造を持つ新しいリグナン誘導体をデザインした。

研究成果の概要(英文)：radioactive Gomisin N was prepared for examining the interaction site of Gomisin N in the binding at ATR.

A binding mode of Gomisin N at the substrate-binding site of phosphokinase domain of ATR was examined by constructing the phosphokinase domain using a few crystal structures of phosphokinase-related proteins by homology modeling. Docking study of Gomisin N at the substrate binding site of of the domain suggested a characteristic site and new Gomisin-related new liganan derivatives were designed based on the interactions.

研究分野：生物機能化学

キーワード：グミシンN 五味子 ATR Phosphokinase リグナン 抗がん活性増強 チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

細胞周期は真核細胞の一生の間にかかる一連の出来事で、G<sub>1</sub>,S,G<sub>2</sub>,M の4期に分けられ、これらの周期の各段階において細胞周期の進行や細胞の健康状態をモニターするチェックポイントが存在する。チェックポイントでは DNA 損傷や栄養不足など、細胞周期の過程で何らかの条件が満たされていない場合にセンサータンパク質により細胞周期を G<sub>1</sub>/S、中間 S 期および G<sub>2</sub>/M 期に停止することが知られている。例えば DNA が損傷すると、まず損傷 DNA にセンサータンパク質が結合し、その後 double stranded DNA(dsDNA) 損傷の場合には ataxia-telangiectasia mutated(ATM)が、また single stranded DNA (ssDNA)損傷の場合には ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related (ATR)が主として活性化され、最終的に細胞周期を停止し DNA 修復もしくはアポトーシスへの誘導が開始される。しかし、がん治療に視点を変えると、人為的にがん細胞の DNA を損傷させることを目的とする抗がん剤や放射線治療では、これらの酵素の活性化は治療効果低下の要因となる。そのため、現在がん治療の効率化を目的として ATM や ATR に対する有効的な阻害剤の探索が行われており、dsDNA が修に損傷される放射線治療においては、カフェインなどの ATM 阻害剤の併用が実現化され大きな効果をあげている。しかし、ssDNA が損傷される UV 照射や抗がん剤による治療においては、DNA 損傷チェックポイントシグナル系の最上流に位置するキナーゼ酵素 ATR に対する特異的阻害剤は未だになく、その開発には大きな期待が寄せられている。

我々は培養がん細胞に対する生薬五味子の成分であるシサンドリン B (SchB) の作用を詳細に検討し、SchB がこの ATR の特異的阻害剤である事を初めて見だし、実際

に SchB が培養がん細胞の放射線や抗がん剤感受性を増加させ、動物における抗がん剤の移植がん増殖抑制効果を増強することを見出した。

## 2. 研究の目的

我々は培養がん細胞に対する生薬五味子の成分であるシサンドリン B (SchB) が真核細胞の細胞周期において DNA 修復もしくはアポトーシスへの誘導に関与する ATR の特異的阻害剤である事を初めて見だし、動物における抗がん剤の移植がん増殖抑制効果を増強することを見出している。また、SchB の光学活性体の合成ルートをほぼ確立し、SchB 誘導體や Radio-label 体の合成が可能となっている。そこで、本研究では SchB の ATR への作用機構について詳細な解析を行い、さらに ATR を標的とする新たな抗がん治療増感剤を分子デザインし、がん治療に伴う副作用の軽減を目的とする治療補助医薬品という新たな概念の新規化合物を医療分野に提示することを目的とする。

そこで、本研究では以下の研究課題について取り組む。

(1) 我々が確立した合成経路を実用的なリグナン合成法として確立するための合成ステップの改良と各種リグナン類合成へ応用し、生理活性評価に必要なサンプルを調製する。

ATR はキナーゼ酵素ドメインや DNA 認識ドメインなどを有することから、各ドメインへの結合活性を測定することにより SchB が結合するドメインが想定されるキナーゼドメインであることを確認する。

(2) Radio-label 体や Photoaffinity-label 体を確立した合成経路に基づき調製し、酵素結合活性評価や活性部位検索などに用いる。

(3) ATR のキナーゼドメインおよび

DNA 結合ドメインの構造モデルを構築し、複合体形成モデルを作成する。

- (4) 複合体モデルから SchB などリグナン類と相互作用すると予想される ATR の残基の変異体を作成し、結合実験からその部位を特定する。
- (5) 合成された化合物群の評価を行い、より ATR に高い結合活性を有する誘導体を検索する。
- (6) 以上の課題に取り組むことにより、ATR を阻害する SchB の認識機構を分子構造レベルで明らかにし、さらに ATR を標的とする新たな抗がん治療増感剤を分子デザインして、がん治療に伴う副作用の軽減を目的とする治療補助医薬品という新たな概念の新規化合物を医療分野に提示することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は三つの基本的な解析手法 **1)** ATR キナーゼドメインの分子モデリングと阻害剤のドッキングによる分子認識機構解明と新規リグナン関連分子のデザインという分子計算科学的手法、 **2)** すでに新しく開発した合成経路を用いて SchB をはじめとするリグナン関連分子の実用的合成法を確立し、評価系に応用できるラベル誘導体の合成などを行う有機化学的手法 **3)** そして、これらふたつの手法を利用して遺伝子工学的手法を用いた結合活性部位の解析によるドメインの特定や変異体作成による阻害剤認識に関与する残基の解明を行うことを計画の中心に置いている。これらの手法を組み合わせるにより、ATR にたいして特異的な阻害活性を有する分子を検索する。

#### **(1) SchB 関連誘導体のデザインと合成**

複合体構造モデルを基にしてデザインされる誘導体の合成を行う。芳香環上の置換基を修飾した化合物の合成について重点的に検討する。また、種々の構造を変換した誘導体の活性評価結果から得られる相互作用情報から、相互作用に関係が薄い部位を修飾してフォトアフィニティラベルの導入を検討し、誘導体を合成する。これは特にキナーゼドメインが結合部位ではない場合には必須の課題となる。

#### **(2) モデル構造の最適化と阻害剤のデザイン**

先に構築した複合体モデルについて評価結果に基づき修正の必要な箇所が見出された場合には、これまでの経験からは大きく変更が必要な箇所は少ないものと期待されるが、修正を検討し再度リガンドドッキングを行う。得られる結果について最初のステップで得られる複合体構造を比較し、新規阻害剤構造のデザインに考慮する。

#### **(3) ATR の活性部位残基の変異体の作成による相互作用部位の特定**

立体構造モデルから推定された ATR のアミノ酸残基の変異体を作成する。変異体は主として Ala に変換したものを作成する予定であるが、たとえば一般的にタンパク質の構造維持に重要と考えられる TRP 残基などでは Phe 残基とするなど、残基によっては Ala に加えて異なる残基も選択する予定である。変異を行う残基の数はモデルから得られる数に依存するが、少なくとも 5 か所は行う予定である。作成した変異体に対して、トリチウムラベルした SchB または GomN を持いて結合実験を行い、結合能の測定を行う。

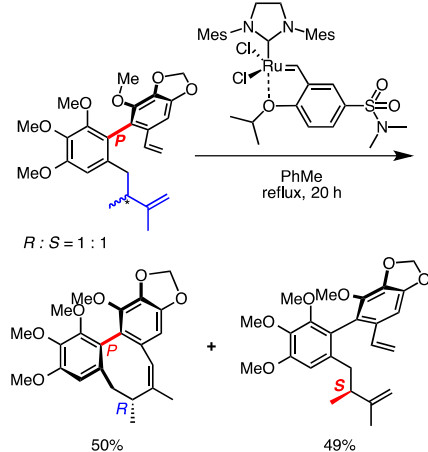
**(4) SchB 類の DNA 損傷の修復阻害による放射線や抗ガン剤の治療補助剤としての評価** (平成 25、26 年度) ヒトの肺ガン細胞 (A549) を用いて作成した SchB と GomN のトリチウムラベル体が実際に細胞

内の内因性 ATR と結合し、DNA 損傷後のリン酸化活性を阻害するか検討する。次いで、ヌードマウスによる Xenograft 実験を行う。A549 細胞を移植後 30 日間の 5-FU 治療中に SchB または GomN を毎日一回静脈注射し、腫瘍組織の成長を観察する。15 日にトリチウムラベルした SchB および GomN の腫瘍組織への移行量を液体シンチレーション計測器で測定する。同時に ATR の酵素活性を確認することで、作成した化合物が抗ガン剤の治療補助剤としての機能を確認する。

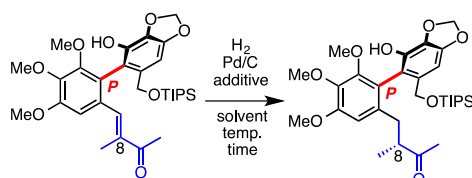
#### 4. 研究成果

##### (1) GomN の実用的合成法の開発と、放射ラベル化 GomN の合成

本研究の申請段階で確立していた GomN の合成経路では、合成の途中で、目的物とは違う立体化学 (C8) を有するジアステレオマー半量を最終目的物へ変換することができなかつたため、合成効率が著しく低下していたことが問題となっていた。

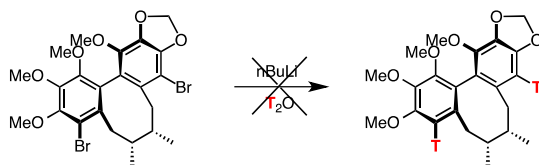


そこで、本研究では立体選択的な合成経路を開発することによる合成効率の向上を課題として設定し、その解決に取り組んだ。その結果、C8 位の立体化学を制御する方法を確立することに成功した。

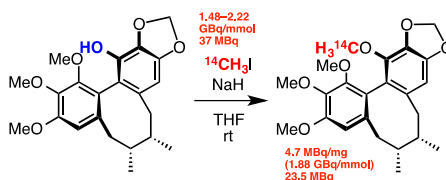


entry	solvent	additive	temp./°C	time/min	yield/%	dr R : S
1	MeOH	—	rt	30	quant.	8.2 : 1.8
2	Et <sub>2</sub> O	—	rt	30	quant.	7.1 : 2.9
3	DMF	—	rt	30	83	8.1 : 1.9
4	MeOH	—	0	30	96	8.3 : 1.7
5	MeOH	AcOH	0	20	98	6.6 : 3.3
6	MeOH	Et <sub>3</sub> N	0	20	95	8.6 : 1.4
7	MeOH	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0	25	quant.	9.2 : 0.8
8	MeOH	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-20	30	93	9.3 : 0.7

本研究申請段階では、まず購入可能な GomN の臭素化を行い、続いて、nBuLi を用いたハロゲンリチウム交換反応後に、トリチウム水で反応を停止させ放射活性体を合成しようと試みた。ところが、この方法では、1) 入手できるトリチウム水の T<sub>2</sub>O 含有量が低い、2) 重原子効果により、H<sub>2</sub>O の方が T<sub>2</sub>O より反応性格段に高い、という二つの理由から、目的の放射ラベル化 GomN を合成することができないことが問題として生じた。



そこで、別の方法で、放射ラベル化 GomN を合成することを課題として設定し、その解決に取り組んだ。その結果、で確立した合成法を応用することにより、<sup>14</sup>C を導入した放射ラベル化 GomN を合成することができた。



#### 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 2 件)

1. Ohkubo T, Tamiya M, Abe K, Ishiguro M. Structural Basis of pH Dependence Neoculin, a Sweet Taste-Modifying Protein. PLoS One. 2015, 10, e0126921

2. Isaka N, Kawada S, Ishiguro M, Tamiya M. Synthesis of the Aglycone of Pentalinoside. Heterocycles. 2015, 91, 1715-1721.

〔学会発表〕(計 6 件)

田宮 実: 特殊な骨格をもったセコプレグチンの合成に関する研究 第 70 回

有機合成化学協会東支部新潟シンポジウム (長岡科学技術大学、2015年11月21日)

Tamiya, M., Isaka, N., Kitazawa, T., Ishiguro, M.: Total syntheses of the nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonist velutinol A and its derivatives, the *seco*-pregnanes with cage-like moiety, (Poster) *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, USA, December 15<sup>th</sup>–20<sup>th</sup>, 2015)*

Saida-Tamiya, K., Tamiya, M., Sekiya, G., Ishiguro, M.: Structural-activity relationship of cholic acid derivatives as the LXR ligands (Oral), *The 43<sup>rd</sup> Symposium on Structural Activity Relationship 2015 & The 10<sup>th</sup> Japan–China Joint Symposium on Drug Discovery and Development (Niigata, Japan September 27<sup>th</sup>–29<sup>th</sup>, 2015)*

Ishiguro, M., Ohokubo, T., Tamiya, M., Abe, K.: Structural Basis of pH Dependence of Neoculin, a Sweet Taste-Modifying Protein (Oral), *The 43<sup>rd</sup> Symposium on Structural Activity Relationship 2015 & The 10<sup>th</sup> Japan–China Joint Symposium on Drug Discovery and Development (Niigata, Japan September 27<sup>th</sup>–29<sup>th</sup>, 2015)*

Tamiya, M., Isaka, N., Kitazawa, T., Hasegawa, A., Ishizawa, K., Ishiguro, M.: Total syntheses of the non-peptide bradykinin B1 receptor antagonist velutinol A and its derivatives, the *seco*-pregnanes with cage-like moiety (Poster), *The 43<sup>rd</sup> Symposium on Structural Activity Relationship 2015 & The 10<sup>th</sup> Japan–China Joint Symposium on Drug Discovery and Development (Niigata, Japan September 27<sup>th</sup>–29<sup>th</sup>, 2015)*

Tamiya, M., Magara, R., Ishiguro, M.: Enantioselective Syntheses of radio-active gomisin N (Poster), *The 43<sup>rd</sup> Symposium on Structural Activity Relationship 2015 & The 10<sup>th</sup> Japan–China Joint Symposium on Drug Discovery and Development (Niigata, Japan September 27<sup>th</sup>–29<sup>th</sup>, 2015)*

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石黒 正路 (ISHIGURO, Masaji)  
新潟薬科大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：10280687

### (2)研究分担者

西田 浩志 (NISHIDA, Hiroshi)  
新潟薬科大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：60322541

高久 洋暁 (TAKAKU, Hiroaki)  
新潟薬科大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：70350717

田宮 実 (TAMIYA, Minoru)  
新潟薬科大学・応用生物科学部・助教  
研究者番号：10468960

山崎 晴丈 (YAMAZAKI, Harutake)  
新潟薬科大学・応用生物科学部・助教  
研究者番号：20456776