

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26242073

研究課題名(和文) 海洋天然物の誘導するタンパク質-タンパク質相互作用の解明

研究課題名(英文) Study on 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)・副学長

研究者番号：90169839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：海洋天然物であるアプリロニンAは、二大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間相互作用を誘導するという新型の作用機序により前例のない強力な抗腫瘍性を示す。本研究では、そのタンパク質間相互作用誘導に必要な構造情報を明らかにするとともに、これらの情報に基づくアナログの開発を行った。その結果、アクチンと結合する側鎖部について、マクロラクトン部との連結部分の置換様式と立体化学が重要であることがわかった。この情報に基づいて、簡略化アナログを開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質間相互作用は、生物活性発言に重要であることが知られている。天然物のような有機小分子が接着剤となつて、通常は相互作用がない2種類のタンパク質をつなぎ合わせる例としては、免疫抑制ポリペプチドであるFK506が知られているが、2大細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンを連結する有機小分子は知られておらず、アプリロニンAは新しい機構による抗腫瘍性物質である。本研究により、アプリロニンAにおけるタンパク質間相互作用を誘導する構造因子のいくつかが明らかになったことにより、新型の作用機序による抗がん剤開発のための基礎的知見が収集できた。

研究成果の概要(英文)：Marine macrolide, aplyronine A exhibits extremely strong antitumor activity by inducing protein-protein interaction (PPI) between two major cytoskeletons, actin and tubulin. In this study, we aimed to clarify structural factors for PPI and to develop the artificial analogs. Because the side-chain moiety binds to actin and the trimethylserine moiety in the macrolactone moiety interacts with tubulin, we design two hybrids from aplyronine A and the other actin-depolymerizing marine macrolides. Among them, hybrid from alyronine A and swinholide A shows same biological activity as aplyronine A, which is a simplified analog of aplyronine A.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：アプリロニンA アクチン チューブリン 細胞毒性 抗腫瘍性 ハイブリッド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、有機化合物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。

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、既存の制がん剤を上回る抗腫瘍活性を示す。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癌剤とは異なり、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、アプリロニンAをアクチンの複合体の結晶構造解析によって、アプリロニンAとアクチンが結合するためにはその側鎖部が必須であることを示したが、その要因のみではアプリロニンAの強力な制がん性を説明できないことも明らかになり、前例のない作用機序が予想された。

2. 研究の目的

これまでの先行研究から、アプリロニンAは、まずアクチンに結合し、それらの複合体がさらにチューブリンに結合すると考えられる(図1)。天然物のような有機小分子が接着剤となって、通常は相互作用がない2種類のタンパク質をつなぎ合わせる例としては、免疫抑制ポリケチドであるFK506が知られている。FK506はタンパク質FKBP

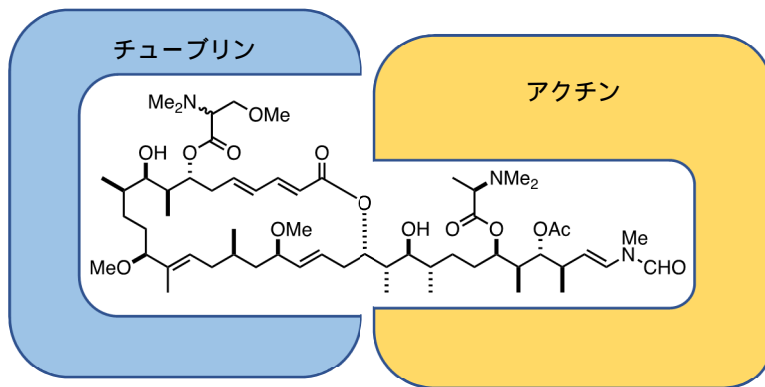


図1. アプリロニンA-アクチン-チューブリン三元複合体の模式図

と結合し、さらにカルシニューリンと三元複合体を作ることにより、免疫抑制作用を発現する。しかし、2大細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンを連結する有機小分子は知られておらず、アプリロニンAは新しい機構による抗腫瘍性物質であることが明らかになってきた。よって、有機合成化学的手法とケミカルバイオロジー手法を駆使して、アプリロニンA-アクチン-チューブリンの複合体の構造と相互作用、アプリロニンAが誘導するタンパク質-タンパク質相互作用の詳細、さらにこの複合体の抗腫瘍性発現における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、研究に必要なアプリロニンAについて、その効率的な合成経路の開発を行った。第1世代の全合成では、合成に多段階を必要とするとともに、収率や選択性の悪い段階があるために、その改良を行った。

アプリロニンAと別のアクチン脱重合海洋天然物の構造活性相関研究の結果から、2012年にアプリロニンAのマクロラクトン部とアプリロニンAよりも強くアクチンと結合する海洋天然物であるミカロライドBの側鎖部からなる化合物を設計・合成した。これにより、アクチンに強力に結合することにより、アプリロニンAの持つ抗腫瘍性が増強されると期待した。この化合物は、アクチンには強く結合したが、その腫瘍細胞増殖阻害活性はアプリロニンAよりも大幅に弱かった。化合物の三次元構造を詳細に検討した結果、側鎖部の立体

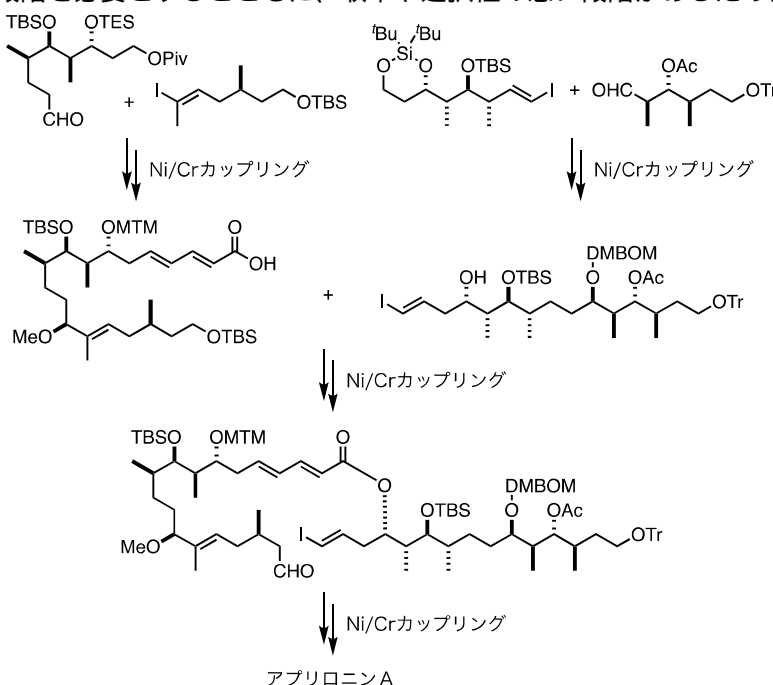


図2. アプリロニンAの第2世代合成経路

化学の相違が、腫瘍細胞増殖阻害活性に重要であると考え、別のアクチン脱重合活性海洋天然物とのハイブリッド化合物を設計した。

また、アプリーロニン A の腫瘍細胞増殖阻害活性に重要である部分構造を抜き出すことにより、新たな簡略化アナログを設計した。アプリーロニン A の全合成には多くの合成過程を含むので、この簡略化アナログにより、合成による供給を容易とし、活性研究を推進できる。

4. 研究成果

天然物自身であるアプリーロニン A の第 2 世代合成では、Ni/Cr を利用するカップリング反応を活用することにより、個々の段階の収率と選択性を向上させるとともに、合成段階の削減に成功した(図 2)。これにより、第 1 世代合成よりも実用的な合成経路を開発することができた。

別のアクチン脱重合活性天然物としてスウィンホライド A に注目した(図 3)。この化合物は、側鎖部の立体化学がアプリーロニン A と同一であるために、ハイブリッド化合物の側鎖部として適切であると考えた。アプリーロニン A-スウィンホライド A ハイブリッド化合物は、アプリーロニン A 第二世代合成戦略を用いることにより、アプリーロニン A よりも効率的に合成できた。合成したハイブリッド化合物は、アプリーロニン A と同様のアクチン脱重合活性、チューブリン重合阻害活性、腫瘍細胞増殖阻害活性を示した。これにより、これまでの構造活性相関研究で推定されていたアプリーロニン A-アクチン-チューブリン三元複合体形成と腫瘍細胞増殖阻害活性の強い関係とそれらのために必要な化学構造単位を確認することができた。

前述のように、アプリーロニン A の腫瘍細胞増殖阻害活性に重要な部分は、アクチンと結合するための側鎖部分とチューブリンとの相互作用に必須であるトリメチルセリン基である。そこで、それら以外の部分を取り除いた簡略化アナログを設計し、生物活性を評価した。その結果、アクチンとは天然物と同様に結合することがわかったが、強い腫瘍細胞増殖阻害活性は示さなかった。アクチン上での簡略化アナログの立体構造を計算化学を活用して解析した結果、マクロラクトン部を省略したために、トリメチルセリン基がアプリーロニン A での位置と大きくずれていることが分かった。

以上の結果から、アプリーロニン A-アクチン-チューブリン三元複合体を形成するために必要な因子について、これまでよりも詳細に明らかにすることができた。今後は、これらの情報を踏まえた化学プローブの作成と三元複合体の構造解析と機能解明を行って行く予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Synthesis and Biological Activities of Aplyronine A Analogues toward the Development of Antitumor Protein-Protein Interaction Inducers between Actin and Tubulin: Conjugation of the C1-C9 Macrolactone Part and the C24-C34 Side Chain, Futaki, K.; Takahashi, M.; Tanabe, K.; Fujieda, A.; Kigoshi, H.; Kita, M. *ACS Omega* **2019**, 4 (5), 8598-8613. doi: 10.1021/acsomega.9b01099
2. Synthesis of the Trisoxazole Macrolactone of Mycalolides via Template-Directed E-Selective Ring-Closing Metathesis, Kita, M.; Watanabe, S.; Oka, H.; Kigoshi, H. *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59 (41), 3664-3668. doi: 10.1016/j.tetlet.2018.08.058
3. Specific Protein-Labeling and Ligand-Binding Position Analysis with Amidopyrene Probes as LDI MS Tags, Watanabe, R.; Hu, Y.; Iio, K.; Yoneda, K.; Hattori, A.; Arai, A.; Kigoshi, H.; Kita, M. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16 (42), 7883-7890. doi: 10.1039/c8ob02222d
4. Development of a Novel Inducer of Protein-Protein Interactions Based on Aplyronine A, Ohyoshi, Y.; Takano, A.; Namiki, M.; Ogura, T.; Miyazaki, Y.; Ebihara, Y.; Takeno, K.; Hayakawa, I.; Kigoshi, H. *Chem. Commun.* **2017**, 54 (68), 9537-9540. doi: 10.1039/c8cc04613a

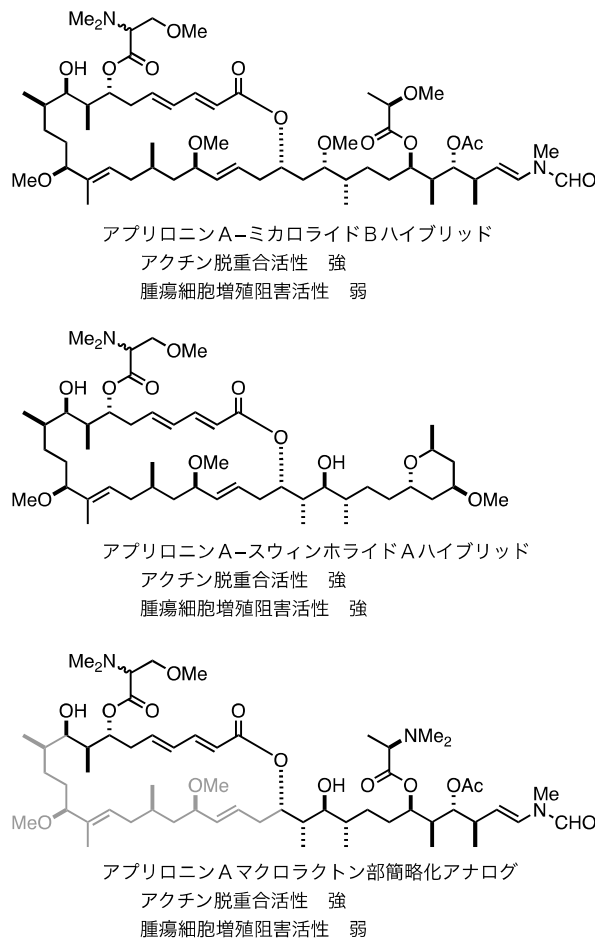


図 3. アプリーロニン A ハイブリッド・アナログの構造と生物活性

5. Development of Photoaffinity Derivatives of the Antitumor Macrolide Aplyronine A, a PPI-Inducer Between Actin and Tubulin, Kita, M.; Yamagishi, K.; Tsuchiya, K.; Seguchi, Y.; Nakane, H.; Kigoshi, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25 (24), 6322-6331. doi: 10.1016/j.bmc.2017.09.044
6. Second-Generation Total Synthesis of Aplyronine A Featuring Ni/Cr-Mediated Coupling Reactions, Hayakawa, I.; Saito, K.; Matsumoto, S.; Kobayashi, S.; Taniguchi, A.; Kobayashi, K.; Fujii, Y.; Kaneko, T.; Kigoshi, H. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (1), 124-31. doi: 10.1039/c6ob02241c
7. Binding Position Analysis of Target Proteins with the Use of Amidopyrene Probes as LA-LDI Enhancing Tags, Yoneda, K.; Hu, Y.; Watanabe, R.; Kita, M.; Kigoshi, H. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14 (36), 8564-69. doi: 10.1039/c6ob01381c
8. Analysis of the aplyronine A-induced protein-protein interaction between actin and tubulin by surface plasmon resonance. Hirayama, Y.; Yamagishi, K.; Suzuki, T.; Kawagishi, H.; Kita, M.; Kigoshi, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24 (12), 2809-2814. doi: 10.1016/j.bmc.2016.04.049
9. 6-Amidopyrene as a label-assisted laser desorption/ionization (LA-LDI) enhancing tag: development of photoaffinity pyrene derivative, Yoneda, K.; Hu, Y.; Kita, M.; Kigoshi, H. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 17853/1-8. doi: 10.1038/srep17853
10. Total Synthesis of Mycalolides A and B through Olefin Metathesis, Kita, M.; Oka, H.; Usui, A.; Ishitsuka, T.; Mogi, Y.; Watanabe, H.; Tsunoda, M.; Kigoshi, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54 (47), 14174-14178. doi: 10.1002/ange.201507795

〔学会発表〕(計19件)

1. 荒井厚志、服部篤紀、渡邊 礼、胡 亜萍、飯尾啓太、米田耕三、木越英夫、北 将樹、リガンド解離型ピレンプローブを用いた標的分子の結合位置解析、2019年3月、日本化学会第99春季年会(神戸市)
2. 高野敦弘、並木真悠、宮崎悠斗、小倉寛敬、大好孝幸、早川一郎、木越英夫、天然物のハイブリッド化によるアプリロニンAの構造活性相関、第59回天然有機化合物討論会、2017年9月、札幌市市民ホール(札幌市)
3. 胡 亜萍、飯尾啓太、渡邊 礼、米田耕三、北 将樹、木越英夫、タンパク質-リガンド相互作用を解析するリガンド解離型アミドピレンプローブの開発、2017年3月、日本化学会第97春季年会(横浜市)
4. 渡邊 礼、胡 亜萍、米田耕三、飯尾啓太、北 将樹、木越英夫、タンパク質-リガンド相互作用を解析するピレンプローブの開発、2017年3月、日本化学会第97春季年会(横浜市)
5. 高橋桃子、二木健太郎、田邊健太、北 将樹、木越英夫、構造簡略化を指向したアプリロニンAの人工類縁体の設計、合成と生物活性、2017年3月、日本化学会第97春季年会(横浜市)
6. 高野敦弘、並木真悠、宮崎悠斗、小倉寛敬、早川一郎、大好孝幸、木越英夫、天然物のハイブリッド化によるアプリロニンAの構造活性相関研究、2017年3月、日本化学会第97春季年会(横浜市)
7. 二木健太郎、高橋桃子、田邊健太、米田耕三、北 将樹、木越英夫、タンパク質間相互作用を誘導するアプリロニンAの人工類縁体の合成と生物活性、2016年3月、日本化学会第96春季年会(京田辺市)
8. 高野敦弘、並木真悠、小倉寛敬、早川一郎、大好孝幸、木越英夫、アプリロニンA-スウィンホライドAハイブリッド化合物の合成研究、2016年3月、日本化学会第96春季年会(京田辺市)
9. 胡 亜萍、米田耕三、渡邊 礼、北 将樹、木越英夫、タンパク質-リガンド相互作用を解析するリガンド解離型アミドピレンプローブの開発、2016年3月、日本化学会第96春季年会(京田辺市)
10. 米田耕三、胡 亜萍、渡邊 礼、北 将樹、木越英夫、タンパク質-リガンド相互作用を解析する新しいケミカルプローブの開発、2016年3月、日本化学会第96春季年会(京田辺市)
11. 瀬口由宇、山岸航大、北 将樹、木越英夫、蛍光プローブを用いたアプリロニンAの標的タンパク質における結合位置解析、2016年3月、日本化学会第96春季年会(京田辺市)
12. 米田耕三、胡亜萍、北 将樹、木越英夫、タンパク質-リガンド相互作用を解析する新しいケミカルプローブの開発、第57回天然有機化合物討論会、2015年9月、神奈川県民ホール(横浜市)
13. 山岸航大、土屋幸太、知念拓実、臼井健郎、北 将樹、木越英夫、遺伝学的手法を用いたアプリロニンAのチューブリンにおける結合位置に関する研究、2015年3月、日本化学会第95春季年会(船橋市)
14. 土屋幸太、山岸航大、平山裕一郎、瀬口由宇、北 将樹、木越英夫、光親和性蛍光プローブを用いたアプリロニンAの標的タンパク質における結合位置解析、2015年3月、日本化学会第95春季年会(船橋市)
15. 小倉寛敬、竹埜弘一、海老原佑太、早川一郎、木越英夫、アプリロニンA-スウィンホライドAハイブリッド化合物の合成研究、2015年3月、日本化学会第95春季年会(船橋市)
16. 齊藤啓太、松本幸子、小林真一、金子貴裕、谷口綾香、小林 健一、藤井勇介、早川一郎、木越英夫、アクチン脱重合活性物質アプリロニンAの第二世代合成研究、2015年3月、日本

化学会第 95 春季年会 (船橋市)

17. 二木健太郎、田邊健太、米田耕三、北 将樹、木越英夫、タンパク質間相互作用を誘導するアプリロニン A の人工類縁体の設計と合成、2015 年 3 月、日本化学会第 95 春季年会 (船橋市)
18. 木越英夫、海洋産抗腫瘍性物質アプリロニン A の生物有機化学、第 40 回反応と合成の進歩シンポジウム(招待講演)、2014 年 11 月、東北大学川内萩ホール(仙台市)
19. 木越英夫、海洋産抗腫瘍性物質アプリロニン A と細胞骨格タンパク質、第 26 回万有札幌シンポジウム(招待講演)、2014 年 7 月、北海道大学工学部オープンホール(札幌市)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：北 将樹

ローマ字氏名：(KITA, masaki)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：数理物質系

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 30335012

研究分担者氏名：大好 孝幸

ローマ字氏名：(OHYOSHI, takayuki)

所属研究機関名：筑波大学

部局名：数理物質系

職名：助教

研究者番号 (8 桁) : 90639303

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。