

機関番号：32659

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790118

研究課題名 (和文) 新規ジケトピペラジン型微小管作用薬を用いた創薬指向型ケミカルバイオロジー研究

研究課題名 (英文) Chemical biology research using diketopiperazine-based anti-microtubule agent.

研究代表者

山崎 有理 (YAMAZAKI YURI)

東京薬科大学 薬学部 助手

研究者番号：70459725

研究成果の概要 (和文)：

ジケトピペラジン型微小管作用薬Plinabulinのチューブリンタンパク質に対する結合様式を光親和性標識の手法を用いて分子レベルで解析するために、ケミカルプローブとしてビオチン導入型 plinabulin誘導体を設計し、複数の化合物を合成した。合成した化合物の活性を評価することでプローブとしての有用性を評価した後、合成したプローブとチューブリンタンパク質を用いて光親和性標識実験を行った。その結果、plinabulinやその誘導体はコルヒチン結合部位周辺の α 、 β -チューブリンサブユニット境界面に作用することで、微小管の脱重合を導いていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In order to understand the precise binding site of diketopiperazine-based anti-microtubule agent 'plinabulin' on tubulin, we designed and synthesized biotin-tagged plinabulin derivatives as chemical probes. Since these derivatives all showed a significant binding ability to tubulin and cytotoxicity, we performed tubulin photoaffinity labeling study. These results suggested that plinabulin derivatives may bind at the boundary region formed between the α - and β -tubulin subunits around the colchicine binding site, but not inside the site, to effectively disrupt the interaction between the two tubulin subunits, thereby producing microtubule depolymerization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

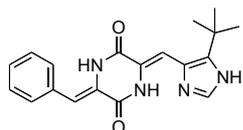
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：分子認識、医薬品化学、癌、生体分子、薬学

1. 研究開始当初の背景

タキサンやビンカアルカロイド等の微小管作用薬は有用な抗癌剤として、患者の生存期間改善など癌治療に貢献している。しかしながら、長期投与においては耐性腫瘍の出現が知られており、癌化学療法において新たな微小管作用薬の開発が望まれている。Plinabulin (NPI-2358/KPU-2, 図 1) は、天然由来の phenylahistin をリード化合物として申請者らのグループが開発したジケトピペラジン骨格を有する強力な微小管作用薬である ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$, HT-29 cells)。本化合物は細胞骨格の一種である微小管を構成するチューブリン蛋白質に作用し、チューブリン重合を阻害することにより G2/M 期で紡錘体形成異常を引き起こし、強力な殺細胞活性を示す。また近年、血管障害剤 (Vascular Disrupting Agent, VDA) として作用することが明らかとなり (*Anti-Cancer Drugs* 2006, 17, 2531)、現在、米国を含む 4 カ国において第 2 相臨床試験が進行中である。VDA とは、がんの「アキレス腱」といわれる新生血管を機能不全にし、がん細胞を兵糧攻めにする薬剤であり、殺細胞活性に基づく従来の微小管作用型抗がん剤と区別されている。国外で、コンプレタスタチンのリン酸プロドラッグが臨床試験段階であるように、VDA のがん化学療法剤への実用化、医療への貢献が注目されている。



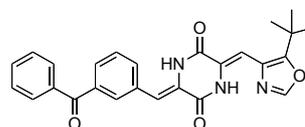
Plinabulin
(NPI-2358/KPU-2)

図 1. Plinabulin の構造

以前から我々は、本化合物の構造活性相関研究を行い、高活性誘導体を複数開発してきた。そして化合物の作用機序に興味を持たれたが、本化合物は、代表的な微小管作用薬であるコルヒチンと同様に微小管を構成するタンパク質のチューブリンに直接相互作用することが分かっているが、コルヒチンと比較したとき立体分子構造や生理活性の特徴が異なっているため、plinabulin の分子レベルでの作用様式・作用機序は明らかではなかった。

Plinabulin の結合様式を分子レベルで解明することは、理論に基づいた創薬研究および臨床応用の観点から重要である。そこで、plinabulin 誘導体をケミカルプローブとして用いた「光親和性標識」というケミカルバイオロジー手法に基づき作用様式の解明研究を行うことにした。

これまで、光反応基であるベンゾフェノン構造を有する高活性な誘導体 KPU-244 ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$, HT-29 cells, 図 2) を開発すると共に、KPU-244 を基本構造としてビオチン導入型ケミカルプローブ (KPU-244-B1, KPU-244-B2) を合成し、これらの化合物を用いてチューブリンフォトアフィニティーラベリングを行った。その結果、合成したプローブは plinabulin と同様の様式で特異的にチューブリンを認識していることが示唆され、plinabulin の結合様式を解析するための有効なプローブを開発することに成功した (*ChemBioChem* 2008, 9, 3074–3081)。すなわち、ケミカルプローブの合成、プローブの生物活性評価 (チューブリン結合アッセイ、*in vitro* 細胞毒性試験)、チューブリン光親和性標識を含む本研究に必要な実験系を確立した。



KPU-244

図 2. ベンゾフェノン誘導体 KPU-244 の構造

2. 研究の目的

本研究は、ケミカルプローブとしてビオチン化 plinabulin 誘導体を合成し、これらの誘導体を用いてチューブリン光親和性標識を行うことで、plinabulin のチューブリンに対する結合様式 (結合部位) を分子レベルで解明し、理論に基づいた新規抗がん剤の創薬研究の実現を目指すものである。

より詳細に、多角的に結合様式を解析するために、以前合成したケミカルプローブ KPU-244-B2 を改良した新規ケミカルプローブを設計・合成し、光親和性標識実験に供することで、化合物の結合のチューブリンサブユニットに対する選択性など、更なる詳細な

結合様式解析を目指す。そのためにケミカルプローブにおけるビオチンリンカーの長さおよび導入位置の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ケミカルプローブ (ビオチン化光親和性誘導体) の設計および合成

過去に開発したプローブ KPU-244-B2 を用いたチューブリン光親和性標識の検出結果では、アビジン-ビオチンシステムを利用したウエスタンブロットによる検出系の感度および解像度の低さが結合様式解析の妨げとなっていた。この問題を解決すべく、プローブ中のビオチンと活性本体とを繋ぐリンカーの長さを検討することとし、長鎖ビオチンリンカーを有する光親和性ビオチン化誘導体 KPU-244-B3 (図3) を設計した。リンカーはペプチド性のものを設計し、長鎖ビオチンリンカーをペプチド固相合成法にて合成した。そして、ペプチド液相合成にてビオチンリンカー部分を *plinabulin* 誘導体とつなぎ、プローブ KPU-244-B3 を合成した。

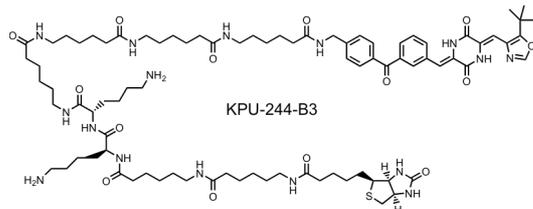


図3. KPU-244-B3 の構造

また、*plinabulin* の結合様式をより詳細にかつ多角的に解析するため、*plinabulin* のヘテロ環部位にビオチン構造を導入したケミカルプローブを新たに開発することにした。オキサゾール環へのビオチンタグの導入には、Sharpless らが開発した Cu^I 触媒 Huisgen 1,3-双極子環化付加反応 (クリックケミストリー) を利用することとし、新規ケミカルプローブとして KPU-252-B1 (図4) を設計した。

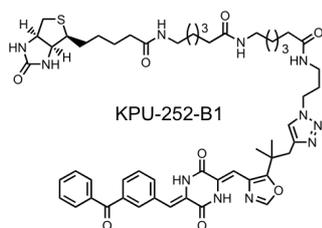


図4. KPU-252-B1 の構造

化合物の合成は、末端アルキン構造を有する *plinabulin* 誘導体とビオチニルアジドをそれぞれ合成し、最後にこれらの中間体を Huisgen 環化付加反応により結合させ、プローブ KPU-252-B1 を合成した。

(2) 合成したプローブの生物活性評価

合成した誘導体がプローブとして有効に機能するためには、親化合物である *plinabulin* が有する活性を維持している必要がある。この点を評価するため、蛍光消光法に基づくチューブリン結合アッセイおよび *in vitro* 殺細胞活性評価を行った。

(3) チューブリン光親和性標識実験

合成したプローブを用いたチューブリン光親和性標識実験として、プローブの存在下あるいは非存在下、精製したウシ由来チューブリンを MES バッファー中で 37°C でインキュベートした後、UV 照射機 (200W, Hamamatsu Photonics) を用いて 365 nm の UV を照射した。フォトラベルの進行は、ストレプトアビジン-HRP を用いたウエスタンブロットングで確認した。また、光標識の特異性の検討として、競合実験を行った。Competitor には親化合物である *plinabulin*、代表的なチューブリン重合阻害剤であるコルヒチンを、またネガティブコントロールとしてビオチンを用いた。

(4) 光親和性標識実験の結果に基づく分子モデリング

光親和性標識実験で得られた結果をもとに *plinabulin* 誘導体のコルヒチン結合部位周辺の詳細な結合様式を考察するため、チューブリンと *plinabulin* 誘導体のドッキングスタディを行った。分子モデリング計算には、カナダ CCG 社製 Molecular Operating Environment modeling package (MOE 2008.10, Chemical Computing Group, Inc., Montreal, Canada) を用い、モデリングのもととなるチューブリンの X 線結晶構造データには、チューブリン-コルヒチン複合体として得られた PDB データの 1SA0 を使用した。そして、*Plinabulin* 誘導体をコルヒチン結合部位周辺にドッキング (適合) した後、エネルギー最小化計算と分子動力学 (MD) シミュレーションを実行した。

4. 研究成果

(1) 長鎖ビオチンリンカーを有するケミカルプローブの合成

アビジン-ビオチンシステムを利用したウエスタンブロットによる検出系の感度および解像度を改善すべく、ケミカルプローブとして長鎖ビオチンリンカーを有する光親和性ビオチン化誘導体 KPU-244-B3 を合成した。そして、チューブリンに対するプローブの結合能力をブタ由来チューブリンを用いた結合アッセイと、HT-1080 細胞ライセートを用いたプルダウンアッセイにて評価し、プローブはブタ由来チューブリンに対して有意な結合を示し、ヒト由来のチューブリンに対しても選択的に結合することが示唆された。さらにこのプローブを用いて光親和性標識実験を行ったところ、プローブは光照射時間依存的にチューブリンを光標識した。また、リンカーを長くした効果としてウエスタンブロットにおけるアビジン-ビオチン検出の解像度が向上し、このプローブはチューブリンの α , β -両方のサブユニットを光標識していることが示唆された。この光標識は、両方のサブユニットとも *plinabulin* やコルヒチンと濃度依存的に競合した。よってプローブはコルヒチン結合部位周辺の α , β -両方のサブユニットに近接した領域に結合していることが示唆された。光親和性標識実験の結果はコンピューターを用いたモデリング実験においても支持され、*plinabulin* 誘導体は、コルヒチン結合部位全体を占めているのではなく、部分的に占めた状態で α , β -チューブリンサブユニット境界面に作用していることが示唆された (図 5)。

(2) オキサゾール側にビオチンタグを導入したケミカルプローブの合成

Plinabulin の結合様式をさらに精査するため、*plinabulin* のヘテロ環部位にビオチン構造を導入したケミカルプローブ KPU-252-B1 を合成した。このプローブの生物活性をチューブリン結合アッセイ、細胞毒性アッセイで確認した結果、弱いながらも有意な活性を示した。さらに、プローブの結合様式を検討するためにチューブリン光親和性標識実験を行ったところ、このプローブは光照射時間依存的にチューブリンを光標識し、またプローブによるフォトラベルは *plinabulin* やコルヒチンと競合した。新規プローブはケミカルプローブとして KPU-244-B2, -B3 と同様、有効に機能した。

以上のように、ビオチンリンカーの長さあるいは導入部位の異なる 4 種類のケミカルプローブを設計・合成し、それらを用いてフォトアフィニティーラベル実験を行い、*plinabulin* の作用メカニズムを考察した。それらの結果、*plinabulin* やその誘導体はコルヒチン結合部

位周辺の α , β -チューブリンサブユニット境界面に作用することで微小管の脱重合を導いていることが示唆された (図 5)。本研究は、これまで未着手であったジケトピペラジン型微小管作用薬の作用メカニズム解析の一戦略と、作用様式に関する新たな知見を提供するものである。近年の創薬研究において特に必要性が高まっている低分子化合物の作用機序解析研究の発展に大きく貢献する

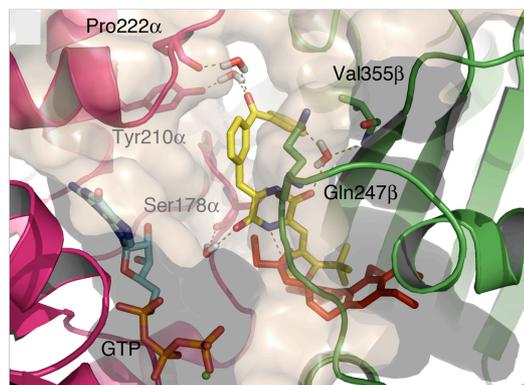


図 5. 光親和性標識実験の結果から得られたチューブリン (α サブユニット: magenta, β サブユニット: green) と KPU-244 (yellow stick) の分子モデル. 橙色で示した分子はコルヒチン.

ことが期待される。

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 7 件)

① Yuri Yamazaki, Yui Kido, Koushi Hidaka, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi: Tubulin photoaffinity labeling study with a *plinabulin* chemical probe possessing a biotin tag at the oxazole. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 595-602. (査読有)

② Yuri Yamazaki, Makiko Sumikura, Koushi Hidaka, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi: Anti-microtubule 'plinabulin' chemical probe KPU-244-B3 labeled both α - and β -tubulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*, 3169-3174. (査読有)

③ Shigenobu Nishiguchi, Magne O. Sydnnes, Akihiro Taguchi, Thomas Regnier, Tetsuya Kajimoto, Manabu Node, Yuri Yamazaki,

Fumika Yakushiji, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi: Total synthesis of (+)-negamycin and its 5-*epi*-derivatives. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 314-320. (査読有)

④ Yuri Yamazaki, Yuki Mori, Akiko Oda, Yuka Okuno, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi: Acid catalyzed monodehydro-2,5-diketopiperazine formation from *N*- α -ketoacyl amino acid amides. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 3688-3694. (査読有)

⑤ Akihiro Taguchi, Mayuko Ina, Yuri Yamazaki, Fumika Yakushiji, Yoshikazu Takahashi, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi: Synthesis and antimicrobial activity of (+)-negamycin derivatives focused on the hydrazine amide moiety. *Peptide Science*, **2010**, *46*, 317-318. (査読有)

⑥ Makiko Sumikura, Yuri Yamazaki, Tomoko Yoshida, Yuki Mori, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, G. Kenneth Lloyd, Yoshio Hayashi: Synthesis and structure-activity relationship study of cyclic dipeptide-based microtubule depolymerization agents with a benzophenone structure. *Peptide Science*, **2010**, *46*, 315-316. (査読有)

⑦ Yuri Yamazaki, Yuki Mori, Akiko Oda, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi: Acid catalyzed monodehydro-2,5-diketopiperazine formation toward natural productsynthesis. *Peptides Breaking Away: Proc. 21st Amer. Peptide Symp.* (Ed. Michal Lebl), **2009**, pp. 54-55. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① Yuri Yamazaki, Yui Kido, Koushi Hidaka, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi: Development of chemical probes towards the elucidation of binding mechanism of plinabulin, a cyclicdipeptide based anti-microtubule agent. 5th International Peptide Symposium in conjunction with 47th Japanese Peptide Symposium, 2010 年 12 月 4 日 (Kyoto)

② 林良雄: 新生血管を障害するチューブリン重合阻害剤の創製. 日本放射線腫瘍学会第 23 回学術大会, 2010 年 11 月 18 日 (千葉)

③ 山崎有理, 城戸結衣, 日高興士, 安井裕之, 木曾良明, 薬師寺文華, 林良雄: 微小管作用薬 Plinabulin の作用様式解明を目指したケミカルプローブの開発. 第 29 回メディスナ

ルケミストリーシンポジウム, 2010 年 11 月 17 日 (京都)

④ 山崎有理, 林良雄: Plinabulin ケミカルプローブの開発とプローブの機能評価. 第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2010 年 7 月 6 日 (東京)

⑤ 林良雄, 山崎有理: 新生血管内皮細胞を障害するジケトピペラジン型微小管脱重合剤の創製. 第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2010 年 7 月 6 日 (東京)

⑥ 山崎有理, 角倉真紀子, 河野享子, 日高興士, 安井裕之, 木曾良明, 薬師寺文華, 林良雄: ジケトピペラジン型微小管作用薬 Plinabulin を基盤としたケミカルプローブの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第 5 回年会, 2010 年 5 月 18 日 (東京)

⑦ 山崎有理, 森雄樹, 小田暁子, 奥野友香, 木曾良明, 林良雄: 酸触媒環化反応を用いたモノデヒドロ-2,5-ジケトピペラジン化合物の合成研究. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 28-30 日 (岡山)

⑧ Yoshio Hayashi, Yuri Yamazaki, Makiko Sumikura, Tomoko Yoshida, Yuki Mori, Hiroyuki Yasui, Kyoko Kohno, Yoshiaki Kiso, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, and G. Kenneth Lloyd: 'Plinabulin' a diketopiperazine-type vascular targeting anti-cancer agent based on microtubule depolymerization activity. ACS Spring 2010 National Meeting & Exposition, 2010 年 3 月 21-25 日, San Francisco, USA

⑨ 角倉真紀子, 山崎有理, 吉田智子, 森雄樹, 安井裕之, 木曾良明, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, G. Kenneth Lloyd, 林良雄: ベンゾフェノン構造を有するジケトピペラジン型微小管脱重合剤の開発. 第 28 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 2009 年 11 月 25-27 日 (東京)

⑩ Yoshio Hayashi, Yuri Yamazaki, Makiko Sumikura, Tomoko Yoshida, Yuki Mori, Hiroyuki Yasui, Kyoko Kohno, Yoshiaki Kiso, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, G. Kenneth Lloyd: "Plinabulin" a cyclic dipeptide-based vascular targeting anti-cancer agent based on microtubule depolymerization activity. 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium / 13th Korean Peptide and Protein Symposium, 2009 年 11 月 8-11 日, Jeju Island, Korea

⑪ Makiko Sumikura, Yuri Yamazaki, Tomoko Yoshida, Yuki Mori, Hiroyuki Yasui, Yoshiaki Kiso, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, G. Kenneth Lloyd, Yoshio Hayashi: Synthesis and structure-activity relationship study of cyclic dipeptide-based microtubule depolymerization agents with a benzophenone structure. 46th Japanese Peptide Symposium, 2009年11月4-6日, Kitakyusyu

⑫ Yuri Yamazaki, Makiko Sumikura, Tomoko Yoshida, Yuki Mori, Hiroyuki Yasui, Kyoko Kohno, Yoshiaki Kiso, Gordafaried Deyanat-Yazdi, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, G. Kenneth Lloyd, Yoshio Hayashi: Cyclic dipeptide-based microtubule depolymerization agents as vascular targeting anti-cancer drugs. 2009年8月23-27日, Chains, Australia

⑬ Yuri Yamazaki, Yuki Mori, Akiko Oda, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi: Acid catalyzed monodehydro-2,5-diketopiperazine formation toward natural product synthesis. 21st American Peptide Symposium: Breaking Away, 2009年6月7-12日, Bloomington, USA

[その他]

ホームページ等

http://www.toyaku.ac.jp/departments/phaarmacy04_03_05_j.html

(東京薬科大学ホームページ、研究室紹介)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 有理 (YAMAZAKI YURI)
東京薬科大学・薬学部・助手
研究者番号：70459725

(2) 研究分担者

該当無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当無し ()

研究者番号：