

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23102013

研究課題名（和文）生理活性化合物の標的タンパク質同定

研究課題名（英文）Target Identification of bioactive small molecules

研究代表者

叶 直樹（Kano, Naoki）

東北大学・薬学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：40317293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,300,000 円

研究成果の概要（和文）：生物活性を持つ有機化合物の細胞内標的タンパク質を迅速に同定するための方法論と手法の拡充を図るため、化合物をアフィニティー樹脂に固定化する手法の改良を行い、化合物固定化後に固定化量・固定配向性の定量解析が可能なアフィニティー樹脂を開発できた。一方、興味深い生物活性を持つ天然由来有機化合物である heronamide 類、vicenistatin、FD-891、methyl gerferin、irciniastatin 類の構造活性相関研究と、標的分子探索研究を実施した。

研究成果の概要（英文）：The third-generation small-molecule affinity matrix has been developed to facilitate target protein identification of bioactive small molecules. This newly developed photoactivatable and photocleavable affinity matrix enabled quantification of the amount and distribution of immobilized small molecules prior to the pull-down experiments to identify target protein for the immobilized small molecules. We also performed structure-activity relationship studies and target identification studies of bioactive natural products such as cytotoxic macrolactam natural products heronamides and vicenistatin, cytotoxic macrolide FD-891, osteoclastogenesis inhibitor methyl gerfelin, and anticancer polyketides irciniastatins.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 標的タンパク質 生物活性物質 アフィニティー樹脂 カルベン 全合成 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

生理活性(または生物活性)を有する化合物の分子標的の同定法の確立は、現在のケミカルバイオロジーが抱える最も主要な課題である。これまでに多くの研究者が分子標的の探索研究を行ってきたにも関わらず、平成23年現在でも、分子標的が同定された生物活性化合物の数が飛躍的に増加する状況や、新しく単離された生物活性化合物の標的分子同定が迅速に達成される状況には至っていない。これは、ピオチン-アビジン法など、約四半世紀前に確立された手法に依存するあまり、利用可能な新規技術と方法論開発が十分に進んでいないこと、特に研究初期段階の化合物の構造活性相関に係るボトルネックが解決されていないことが原因だと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではこの状況を打破すべく、物理的相互作用を指標に化合物の標的分子の探索を行うための方法論と手法の拡充を図ることを目的とした。具体的には、研究代表者が平成23年度までに開発を進めてきた、化合物をアフィニティー樹脂に固定化する手法の改良と、新規分子標的探索ツールの開発を計画した。一方、研究代表者は平成23年度までに研究分担者と共同で天然由来生物活性化合物の構造活性相関研究、および標的探索研究を推進してきたが、本研究課題でも各種方法論を用いた天然由来生物活性化合物の標的分子同定の実践を計画した。

3. 研究の方法

(1) 光親和型小分子固定化技術の改良

研究代表者が開発してきた、カルベン種を利用した化合物の固相担体への固定化法は、生物活性化合物の標的分子同定に有用な手法ではあるが、固相上に導入された化合物量が定量できないこと、また、高反応性のカルベン種を利用するが故に、望みの固定化反応以外に多くの副生成物が生じるという問題点が残されていた。この問題点を解決するため、固定化した化合物を固相上から切り出して解析できる新規光親和型小分子固定化樹脂の開発を計画した。また、カルベンとの反応性が極めて低く、タンパク質との非特異的吸着能が低いフッ化炭素をアフィニティー樹脂とジアジリン基を繋ぐリンカー部分などに利用することを計画した。改良した小分子固定化アフィニティー樹脂は、既存の化合物-標的タンパク質ペアを用いて評価することを計画した。

(2) 新規人工ホストゲストペアを利用した生物活性物質の標的探索用ツールの開発

人工ホストゲストペアである hydroxycucurbit[7]uril (HO-CB[7]) と 1-trimethylammoniomethylferrocene (Afc) をアビジン-ピオチンに代わる標的探索用ツールとして利用するため、Afc タグで標識した生物活性化合物を合成し、その化合物と HO-CB[7] 固定化ビーズを用いた標的タンパク質の釣り上げを計画した。

(3) 生物活性化合物の構造活性相関・標的分子探索の実践

標的分子が未知、または作用機作が完全に解明されていない天然由来生物活性化合物の構造活性相関研究、標的分子同定、作用機作解明の実践を計画した。具体的には、神経成長因子産生促進作用を有するジテルペノイド scabronine G、培養動物細胞に顕著な液胞化を誘導する細胞毒性マクロラクタム化合物 vicenistatin および heronamide C、抗腫瘍性ジヒドロイソクマリン化合物 irciniastatin B、破骨細胞分化阻害活性を有する糸状菌由来ピアリールエーテル誘導体 methyl gerfelin、放線菌由来抗腫瘍性マクロライド FD-891 の構造活性相関を実施し、本計画で開発する小分子-タンパク質相互作用を直接検出する標的分子同定手法と、標的分子を間接的に推測する標的分子同定手法を駆使した標的分子同定を計画した(図1)。

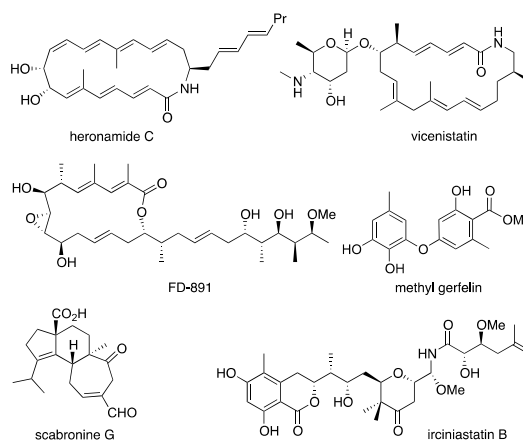


図1 本研究で構造活性相関・作用機作解析を計画した生物活性天然物

4. 研究成果

(1) 光親和型小分子固定化技術の改良：第三世代光親和型アフィニティー樹脂の開発

固定化した化合物を切り出して定量することができる新規アフィニティー樹脂として、2011年に富山大学の畑中らによって開発された *o*-ヒドロキシシンナモイルアミドユニットを有する第三世代光親和型アフィニティー樹脂を開発した(*Bioconjugate Chem.*2015)。本樹脂を用いることにより、光親和型小分子固定化アフィニティー樹脂に固定化された小分子の量が初めて定量でき

るようになったのみならず、光親和型小分子固定化に適した小分子、適していない小分子を判別することが可能となった。

光親和型小分子固定化に適した小分子の一例を挙げると、芳香族化合物はジアジリン由来カルペンとの反応において、Friedel-Craft 型の反応、ベンジル位 C-H 挿入反応、芳香環上二重結合への付加反応、Buchner 型環拡大反応など、様々な反応形式が確認された。光親和型小分子固定化アフィニティー樹脂を用いた標的探索の成功例中で芳香族化合物が多いのは、このようなコンジュゲートの多様性が一因だと考えられた。これに対して、分子内にアミンやチオールを含む小分子は、ジアジリン由来カルペンとこれらの官能基が選択的に反応したコンジュゲートが選択的に得られる傾向が確認された(図2)。

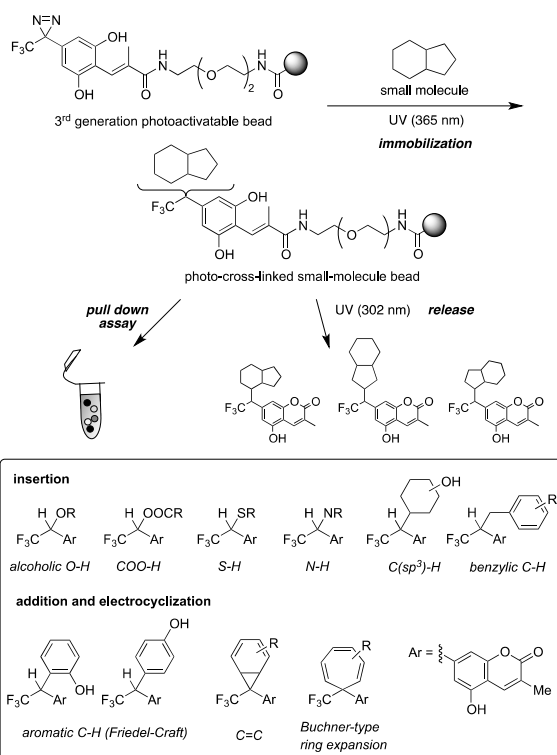


図2 第三世代光親和型小分子固定化ビーズの概要 上段：第三世代ビーズは標的タンパク質のプルダウン実験に用いる前に固定化小分子を切り出して解析が可能となった。下段囲み：第三世代ビーズ上への固定化様式

以上の結果と共に、これまでの光親和型小分子固定化アフィニティー樹脂の成功例、問題点、今後の課題などの詳細を総説(Nat. Prod. Rep. 2016)としてまとめ、報告した。本総説は今後、光親和型アフィニティー樹脂を利用する研究者にとって有用な指針となると考えられる。

一方、フルオロカーボンリンカーを導入した光親和型アフィニティー樹脂の作成と評価を行ったが、フルオロカーボンリンカーの存在が小分子の固定化・標的タンパク質の検出に有利であるという結果は得られなかった。加えて、A01 班の半田先生らが開発され

た FG ビーズとの融合を図ったが、小分子固定化時にビーズを乾固する必要がある光親和型固定化ではビーズの凝集が起きてしまい、再分散が困難であったため、これ以降の検討を中止した。

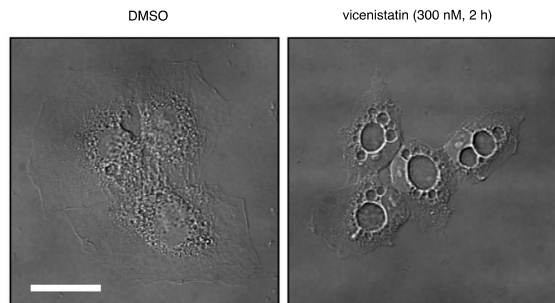
(2) 新規人工ホストゲストペアを利用した生理活性物質の標的探索用ツールの開発

AFc タグを FKBP12 選択的リガンド (Synthetic Ligand of FKBP12: SLF) に導入した AFc-SLF コンジュゲートと CB[7] 固定化ビーズを用いて Jurkat 細胞抽出物から結合タンパク質の検出を行った結果、12 kD 付近に AFc-SLF 特異的なタンパク質を見出したことから、AFc タグと CB[7] 固定化ビーズが新たな生物活性化合物の標的探索ツールになり得ることを確認した。

(3) 生物活性化合物の構造活性相関・標的分子探索

培養動物細胞に顕著な液胞化を誘導する細胞毒性マクロラクタム化合物 vicenistatin の作用機作解析・構造活性相関研究

研究分担者の臼井による生化学・分子生物学的解析により、vicenistatin (図1) が誘導する液胞状構造は初期エンドソームの融合体であることが示された(図3上)。別途合成した細胞外投与可能な合成 PI(3,5)P₂ プロブを用いたレスキュー実験などにより、この液胞化現象は細胞内 PI(3,5)P₂ の欠乏に起因することが示唆されたが、vicenistatin は PI(3,5)P₂ を細胞内で生合成する酵素 (PIKfyve) を全く阻害しなかった。一方、vicenistatin はコレステロール含有リポソームの膜流動性を上昇させたことから、vicenistatin は既存の液胞化誘導剤とは異なる新規な作用を持つ化合物であることが明らかになった (Biosci. Biotech. Biochem.



Vicenistatin induced the formation of early endosome-derived vacuole-like structure in 3Y1 cells. Scale bar = 30 μm.

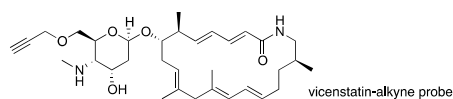


図3 Vicenistatin によるラット胎児由来 3Y1 繊維芽細胞の液胞化(上段)と作用機作解明用アルキン導入プローブ(下段)

2016)、13種類の合成類縁体を用いた構造活性相関から、細胞毒性と液胞化誘導活性は正に相関していること、vicenistatinの糖部分にアルキンを導入した誘導体が今後の標的特定作業のためのプローブとなり得ることを明らかにした(図3下、論文作成中)。

培養動物細胞に顕著な液胞化を誘導する放線菌由来マクロラクタム heronamide C の全合成・構造改訂と構造活性相関研究

京都大学薬学部の掛谷・西村グループにより、Heronamide Cは膜脂質を標的とした新しい抗真菌剤であることが最近明らかにされたが、同グループとの共同研究により、heronamide C およびその類縁体である heronamide B の提唱構造の誤りを見出し構造改訂を行った (Eur. J. Org. Chem. 2014) (図4)。また、heronamide C から heronamide A, B に至る生合成仮説を試験管内で実証した。さらに提唱構造を含めた heronamide 類の構造活性相関研究を実施した結果、heronamide の活性発現にはマクロラクタム構造とジオール部分の立体化学が重要であることを明らかにした (Chem. Eur. J. 2016)。

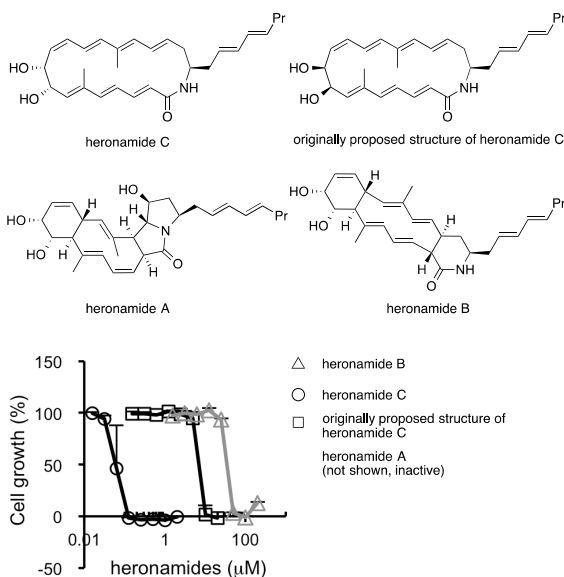
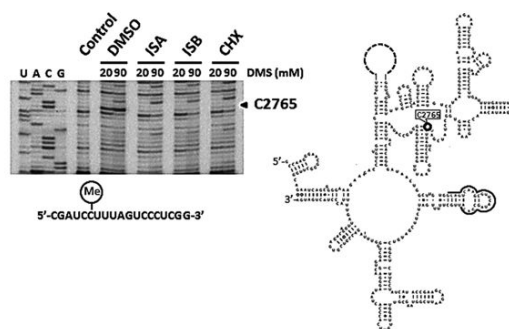


図4 Heronamide 類の構造改訂と構造活性相関 上段: heronamide C の提唱構造と改訂構造、および heronamides A, B の改訂構造 (A の構造改訂は京都大学掛谷・西村グループの成果)。下段: heronamide 類の構造活性相関

抗腫瘍性ジヒドロイソクマリン化合物 irciniastatin B の全合成と標的分子同定

Irciniastatin 類は、ナノモルオーダーの強力ながん細胞増殖阻害活性を示す海綿由来の天然物であるが、天然からの供給が大変困難な化合物であるため、以前に我々が全合成を達成した irciniastatin A の合成経路を応用することにより試料を得て、その活性試験を行った。研究分担者の臼井らによるケミカ

ルフットプリンティング解析(図5)や生化学的解析により、irciniastatin B は類縁化合物であるマイカラミドや irciniastatin A と同様、リボソーム 60S サブユニットの E サイトに結合することによりタンパク質合成阻害を引き起こし、細胞増殖阻害を引き起こすことが強く示唆された (J. Org. Chem. 2015)。Irciniastatin A と B は以前の報告で、感受性の高いがん細胞群が異なっているために、異なる作用機作を持つことが示唆されていたが、今回の結果により一次標的は同じであることが明らかになった。



5 ケミカルフットプリンティング法を用いた irciniastatin B のリボソームへの結合部位の同定 ISB(irciniastatin B)は ISA(irciniastatin A)と同様に、メチル剤(ジメチルスルフィド:DMS)処理時にリボソーム中の 2765 番目シトシン (C2765) のメチル化を阻害するため、この領域に結合していることが示された。

破骨細胞分化阻害活性を有する糸状菌由来ピアリールエーテル誘導体 methyl gerfelin の多次元的構造活性相関研究

Methyl gerfelin (M-GFN) の標的タンパク質は、光親和型小分子固定化ビーズを用いた解析と、その後の構造生物学・生化学・分子生物学的解析により、解毒代謝酵素 glyoxalase 1 (GLO 1) であることが明らかにされていた。一方、M-GFN は GLO 1 以外に 2 種の主要な結合タンパク質が同定されており、その結合が破骨細胞分化阻害活性に与える影響は検討されていなかった。我々はこれら 3 種類のタンパク質との結合と、M-GFN の破骨細胞分化阻害活性との相関を調べるために、tri(ethylene glycol)ユニット (TEG) を M-GFN の分子周辺部に網羅的に導入した多数の誘導体を調製して(図6左) これらの TEG 化誘導体を用いた構造活性相関を精査した。TEG ユニットは構造活性相関を行うための置換基(突起)としての役割のみならず、タンパク質との結合活性を調べる際にビーズに連結するリンカーとしての役割を有する。構造活性相関の結果、まず GLO 1 高選択的結合プローブ TMG3 (TEGylated methyl gerfelin probe 3) を見出した(図6右)。更に、得られたプローブ群を用いることで、GLO 1 以外のタンパク質と M-GFN との結合は、M-GFN の破骨細胞分化阻害活性には影響しないことが確認された (Bioconjugate Chem. 2013)。

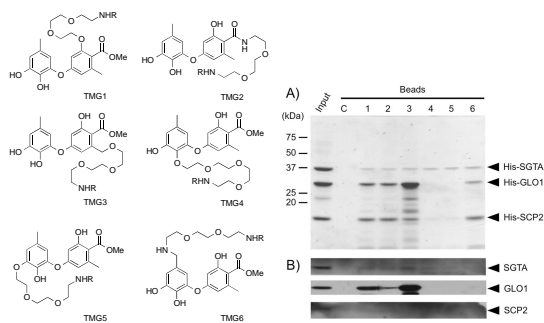


図6 Methyl gerfelin と3種の結合タンパク質群との構造-結合活性相関 左: 網羅的に合成したTEG化 methyl gerfelin 誘導体 (TMG)。右: TMG 誘導体群と3種の結合タンパク質を用いた構造-結合活性相関 (A)はHis タグ付き精製タンパク質群を用いた結合実験、(B)は細胞内在性タンパク質を用いた結合実験の結果。

放線菌由来抗腫瘍性マクロライド FD-891 の構造活性相関と作用機作解析

研究分担者の臼井による生化学的解析、および酵母を用いた遺伝学的解析により、FD-891 は F-アクチンに作用して、細胞内に大きなアクチン凝集体を形成し、腫瘍細胞の増殖を阻害することが明らかになった (図7上)。更なる解析により、FD-891 はアクチンとアクチン結合タンパク質の結合を阻害することが示唆された。

次に、自在な構造活性相関とプローブ合成を行うために、FD-891 の効率的な全合成経路を開発した (*Org. Lett.* 2014)。合成化学および生合成遺伝子変異株を利用して得た計 13 種類の FD-891 類縁体を用いた構造活性相関研究により、FD-891 のがん細胞増殖阻害活性には C8-9 エポキシドと C16-C26 側鎖の全長が必須であること、一方 C10 位水酸基の有無は活性に全く影響しないことを明らかにした (図7下、*J. Antibiot.* 2016)。

(4) その他の成果

Vicenistatin のプローブ合成 (*Chem. Asian J.* 2012) の途上、Stille カップリングの異常反応を見出した (*Synlett* 2013)。研究分担者の臼井は、遺伝学的解析能を落とさずに多剤超感受性を示す酵母株の作製を行った (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2014)。また、微小管阻害剤として見出していた天然由来イソフラボン類縁体 glaziovianin A (AG1) の構造展開を行い (*Bioorg. Med. Chem.* 2012)、高活性類縁体 σ -demethylpropargyl AG1 を見出した。さらにこれらの微小管・細胞に対する作用を検討したところ、微小管動態を阻害することで紡錘体異常を引き起こすことを明らかにした (*ACS Chem. Biol.* 2013)。また、 σ -demethylbenzyl AG1 が γ -チューブリン特異的な阻害を引き起こすこと (*Nat. Commun.* 2015) 及び σ -demethylbenzyl AG1 が強力な微小管重合阻害活性を有するこ

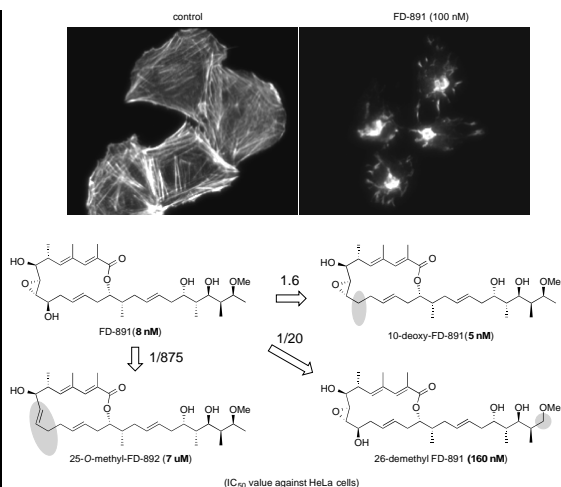


図7 FD-891 の作用機作解析と構造活性相関 上段: FD-891 はアクチンの凝集体を形成させる。下段: FD-891 のがん細胞増殖阻害活性に対する構造活性相関

と (特願 2014-267073 微小管重合阻害剤) を明らかにした。更に微生物由来微小管阻害剤 phenylahistin 誘導体 (*J. Med. Chem.* 2012, *Bioorg. Med. Chem.* 2012, *ACS Med. Chem. Lett.* 2014) の一つが微小管重合と γ -チューブリン活性の二つを阻害する dual inhibitor であることを見出した (*Nat. Commun.* 2015)。その他、種々の V-ATPase 阻害剤の解析 (*Chem. Lett.* 2014, *Biol. Pharm. Bull.* 2014, *Chem. Asian J.* 2015, *J. Antibiot.* 2015)、アクチン阻害剤や KPS 阻害剤 terpendole E、リードスルー薬 negamycin 類縁体、アクチン-チューブリン阻害剤 aplyronine A の解析を行った。

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 28 件)

N. Kanoh, S. Itoh, K. Fujita, K. Sakanishi, R. Sugiyama, Y. Terajima, Y. Iwabuchi, S. Nishimura, H. Kakeya, Asymmetric Total Synthesis of Heronamides A-C: Stereochemical Confirmation and Impact of Long-range Stereochemical Communication on the Biological Activity, *Chem. Eur. J.*, accepted (2016), DOI: 10.1002/chem.201600569, 査読有。

N. Kanoh, Photo-Cross-Linked Small-Molecule Affinity Matrix as a Tool for Target Identification of Bioactive Small Molecules, *Nat. Prod. Rep.*, 33, 709-718 (2016), DOI: 10.1039/C5NP00117J, 査読有。

T. Itagaki, A. Kawamata, M. Takeuchi, K. Hamada, Y. Iwabuchi, T. Eguchi, F. Kudo, T. Usui, N. Kanoh, Synthesis and

Structure-Activity Relationship Study of FD-891: Importance of the Side Chain and C8-C9 Epoxide for Cytotoxic Activity against Cancer Cells, *J. Antibiot.*, 69, 287-293 (2016), DOI: 10.1038/ja.2015.148, 査読有.

Y. Nishiyama, T. Ohmichi, S. Kazami, S. Iwasaki, K. Mano, Y. Nagumo, F. Kudo, S. Ichikawa, Y. Iwabuchi, N. Kano, T. Eguchi, H. Osada, T. Usui, Vicenistatin Induces Early Endosome-derived Vacuole Formation in Mammalian Cells, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 80, 902-910 (2016), DOI: 10.1080/09168451.2015.1132152, 査読有.

S.-i. Uesugi, T. Watanabe, T. Imaizumi, Y. Ota, K. Yoshida, H. Ebisu, T. Chinen, Y. Nagumo, M. Shibuya, N. Kano, T. Usui, Y. Iwabuchi, Total Synthesis and Biological Evaluation of Irciniastatin A (a.k.a. Psymberin) and Irciniastatin B, *J. Org. Chem.*, 80, 12333-12350 (2015). DOI: 10.1021/acs.joc.5b02256, 査読有.

T. Suzuki, T. Okamura, T. Tomohiro, Y. Iwabuchi, N. Kano, Third Generation Photo-Cross-Linked Small-Molecule Affinity Matrix: Photoactivatable and Photocleavable System Enables Quantitative Analysis of the Photo-Cross-Linked Small Molecules and Their Target Purification, *Bioconjugate Chem.*, 3, 389-395 (2015). DOI: 10.1021/bc500559e, 査読有.

N. Kano, A. Kawamata, T. Itagaki, Y. Miyazaki, K. Yahata, E. Kwon, Y. Iwabuchi, A Concise and Unified Strategy for Synthesis of the C1-C18 Macrolactone Fragments of FD-891, FD-892 and Their Analogues: Formal Total Synthesis of FD-891, *Org. Lett.*, 16, 5216-5219 (2014). DOI: 10.1021/ol502633j, 査読有.

H. Fukuda, Y. Nishiyama, S. Nakamura, Y. Ohno, T. Eguchi, Y. Iwabuchi, T. Usui, N. Kano, Synthesis and Structure-Activity Relationship of Vicenistatin, a Cytotoxic 20-Membered Macrolactam Glycoside, *Chem. Asian. J.* 7, 2872-2881 (2012). DOI: 10.1002/asia.201200615, 査読有.

〔学会発表〕(計 45 件)

抗腫瘍性マクロライド FD-891 およびその類縁体合成と構造活性相関研究(口頭発表)
板垣友宏, 川又綾乃, 叶直樹, 岩瀬好治, 日本薬学会第 136 年会(横浜 2016 年 3 月

27-30 日)

Synthetic Study of FD-891 and FD-892 (Poster presentation) Ayano Kawamata, Tomohiro Itagaki, Yuta Miyazaki, Kenzo Yahata, Naoki Kano, and Yoshiharu Iwabuchi, *Pacificchem 2015* (Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15 日 - 20 日)

Third Generation Photo-cross-linked Small-molecule Affinity Matrix enabling Quantitative Analysis of the Photo-cross-linked Small Molecules and Their Target Purification (oral presentation) Naoki Kano, *Pacificchem 2015* (Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15 日 - 20 日)

〔図書〕(計 2 件)

標的同一の迅速化を目指した生物活性リガンドの非古典的修飾・固相担持法, 叶直樹, *CSJ カレントレビュー 19* 「生物活性分子の標的同一と機能解明 生命科学の基盤技術としてのアプローチ」化学同人, 2015, 48-56.

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: 微小管重合阻害剤
発明者: 臼井健郎、木越英夫、早川一郎、知念拓実、塩田秀也
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-267073
出願年月日: 2014 年 12 月 29 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~gousei/synthetic/index.html>

<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~usui/topix.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

叶直樹 (KANOH, Naoki)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 40317293

(2) 研究分担者

臼井健郎 (USUI, Takeo)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 60281648