

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07710

研究課題名(和文) γ -tubulin特異的阻害剤 gatastatinを用いた化学生物学的研究

研究課題名(英文) Chemical biological study using gamma-tubulin specific inhibitor, gatastatin

研究代表者

臼井 健郎 (Usui, Takeo)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60281648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内での効率的微小管重合には、主に中心体に存在する γ -tubulin複合体が必要であるが、微小管重合以外の γ -tubulin機能については不明な点が多い。また、 γ -tubulinはがん化学療法の新規標的分子として考えられているが、その標的妥当性は不明のままである。本研究では、我々が世界に先駆けて開発した γ -tubulin特異的阻害剤gatastatinを元に、より活性の強い γ -tubulin阻害剤の開発に成功するとともに、gatastatinと相乗効果を示す既知薬剤を見出すことで、 γ -tubulinの新規細胞内機能を明らかにするための基礎的知見を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

γ -tubulinはがん化学療法の新規標的分子として考えられているが、その妥当性は不明のままである。我々はgatastatinをリード化合物として、より活性の強い γ -tubulin阻害剤の開発に成功するとともに、相乗効果を示す薬剤を見出すことで γ -tubulinの細胞内機能の一端を明らかにすることに成功した。以上の結果は、今後のがん化学療法において γ -tubulinを標的とする場合の基礎的知見を与えるとともに、 γ -tubulinの新規機能を明らかにするための手掛かりとなる情報を提供している。

研究成果の概要(英文)：For efficient microtubule polymerization in cells, the γ -tubulin complex, which mainly localizes in the centrosome, is required. However, γ -tubulin functions other than microtubule polymerization remain to be revealed. Also, γ -tubulin is considered as a novel target molecule for cancer chemotherapy, but its target validity remains unknown. In this study, based on the γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin we developed ahead of the world, we succeeded in developing a more active γ -tubulin inhibitor and found some known compounds that exhibits synergic activity with gatastatin. These results would provide basic knowledge to clarify the novel intracellular function of γ -tubulin.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード： γ -tubulin 構造活性相関 相乗効果 がん分子標的

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

1. 研究開始当初の背景

微小管 (MT) は、 α -tubulin ヘテロ二量体が常に重合と脱重合を繰り返す動的な構造体である。細胞内での効率的微小管重合には主に中心体に存在する β -tubulin を含む複合体 (β -tubulin 複合体) が必要であるが (*Nature*, **356**, 80 (1992)) 重合促進以外の β -tubulin の機能については、不明な点が多い。また、 β -tubulin は細胞分裂期で活性化すること、グリオーマなど癌で過剰発現がみられること (*J Cell Physiol*, **221**, 505 (2009)、その他) さらに siRNA で β -tubulin 発現を阻害すると異常紡錘体が形成されることなどから (*Science*, **328**, 539 (2010)) がん化学療法の新たな分子標的として注目されている。しかしながら、これまで β -tubulin 特異的阻害剤の報告はなく、がん分子標的としての妥当性は不明のままである。

そこで我々は β -tubulin 阻害剤の探索を行い、 β -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin を見出した (*Nat Commun*, **6**, 8722 (2015))。Gatastatin は in vitro で β -tubulin 非依存的微小管重合には影響せず、 β -tubulin 依存的微小管重合を特異的に阻害し、細胞内 MT nucleation を阻害した。さらに gatastatin を動物細胞に処理することで、siRNA や遺伝子破壊では報告されていなかった現象を見出した。

2. 研究の目的

我々は、 β -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin を用いることで、これまで報告されていなかった β -tubulin の機能として、細胞分裂期後期で midzone での微小管束化することで、分裂後期の進行を円滑に行わせることを明らかにした。このように特異的阻害剤を用いることで、分子生物学的な手法で観察することが難しいことを明らかにすることが可能である。 β -tubulin が関わる生物活性はそのほかにも存在すると考えられ、gatastatin を用いた化学生物学的アプローチは、 β -tubulin を標的とした抗癌剤開発への応用のみならず、 β -tubulin の機能解明の端緒となることが期待される。

そこで本研究では gatastatin を用い、 β -tubulin のがん分子標的としての妥当性検討と、より高活性の阻害剤の開発、及び新たな β -tubulin 機能の発見・解明を目的とした。Gatastatin を起点とした研究により、がんなどの β -tubulin 機能異常が原因と考えられる疾病に対する治療薬開発への応用、並びに β -tubulin が関与する生命現象の解明が期待される。

3. 研究の方法

(1) β -tubulin のがん分子標的としての妥当性を検討した。Gatastatin 処理で増殖が強く阻害される細胞と全く阻害されない細胞が存在することから、 β -tubulin 阻害に対する感受性を規定する因子が存在すると考えられる。そこで gatastatin 耐性細胞に対し、併用で増殖阻害(併用効果)を示す薬剤を探索し、gatastatin 感受性規定因子を同定する。さらにその因子の機能と β -tubulin 機能の関連を明らかにすることで、 β -tubulin のがん分子標的としての妥当性を検討する。

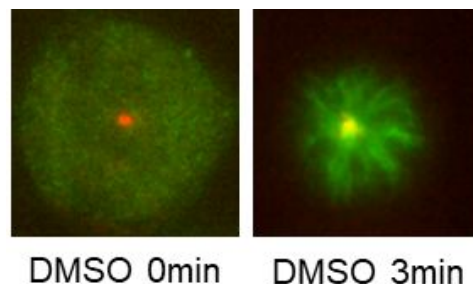
(2) Gatastatin の合成展開による高活性類縁体の創製を行った。Gatastatin をリード化合物として合成展開を行い、構造活性相関を検討することで、 β -tubulin に対する特異性や阻害活性が高い類縁体の創製を試みる。

4. 研究成果

(1) β -tubulin のがん分子標的としての妥当性の検討を行った。Gatastatin と併用した場合に細胞毒性を相乗的に上昇させる薬剤の探索を、既存の細胞周期因子に対する阻害剤ライブラリーを用いて行った。その結果、細胞周期進行に関わるキナーゼを標的とすることが報告されている 2 つの薬剤を得た。このうち一つは相乗効果が弱く、また既知の報告があるものであったが、もう一つの化合物は新規の発見であり、現在分子機構を明らかにするために研究を継続中である。

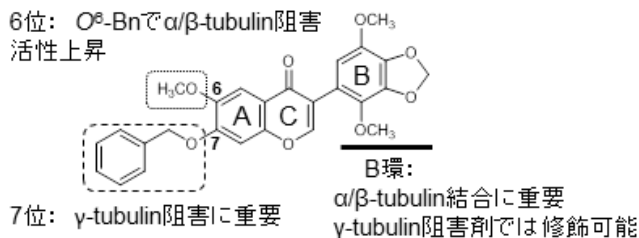
(2) 本研究開始前から PIK1 阻害剤が gatastatin と相乗効果を示すことが明らかとなっていた。そこで作用機構解析を進めたところ、薬剤併用時に単極紡錘体形成による細胞周期停止が引き起こされること、また同時に抗アポトーシスタンパク質である MCL-1 減少を伴ったアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

(3) β -tubulin による微小管核形成阻害活性を定量的に解析する手法を確立した。細胞を KSP 阻害剤である STLC を処理して単極紡錘体を形成させた後、氷上に置くことで微小管を完全に脱重合させた後、gatastatin などの薬剤を処理し、30 度に温度を上げることにより微小管核形成を誘導する。その後、細胞を固定し、中心体マーカーと微小管と抗体染色して観察後、微小管が伸びた範囲を定量することで、微小管核重合を定量化することが可能になった。



(4) Gatastatin の類縁体を多数合成し、構造活性相関検討を行った。その結果、既存の類縁体よりも強い微小管重合阻害活性を示す類縁体である 06-demethylbenzyl glaziovianin A を見出し、特許が成立するとともに論文・学会発表を行った。

(5)(4)と同じく構造活性相関を行い、gatastatinよりも10倍以上も細胞毒性や微小管核形成阻害活性が強い06-demethylbenzyl gatastatin、06-demethylpropargyl gatastatinを見出し、特許として出願した。これらの類縁体であるは、gatastatinよりも有望な γ -tubulin 特異的阻害剤であると考えられる。



Gatastatin/glaziovianin Aの構造活性相関結果
(抜粋、構造はgatastatin)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Structure-activity relationship study of gatastatin based on the topliss tree approach." Hayakawa I, Shioda S, Chinen T, Usui T, and Kigoshi H. *Heterocycles*, **99**, 238-247 (2019) DOI: 10.3987/COM-18-S(F)16

Stimulation of microtubule-based transport by nucleation of microtubules on pigment granules." Semenova I, Gupta D, Usui T, Hayakawa I, Cowan A, and Rodionov V. *Mol. Biol. Cell*, **28**, 1418-1425 (2017) DOI:10.1091/mbc.E16-08-0571

Discovery of 06-benzyl glaziovianin A, a potent cytotoxic substance and a potent inhibitor of γ -tubulin polymerization" Hayakawa I, Shioda S, Chinen T, Hatanaka T, Ebisu H, Sakakura A, Usui T, and Kigoshi H. *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 5639-5645 (2016) DOI:10.1016/j.bmc.2016.09.026

〔学会発表〕(計 4件)

新谷佳菜、恵比須春奈、畑中大成、坂倉彰、早川一郎、南雲陽子、臼井健郎「 γ -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin 類縁化合物の構造活性相関」日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会 2019年

新谷佳菜、恵比須春奈、畑中大成、坂倉彰、早川一郎、南雲陽子、臼井健郎「 γ -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin 類縁化合物の構造活性相関」日本農芸化学会 2019年度大会 2019年

恵比須春奈、早川一郎、木越英夫、臼井健郎「薬剤共処理による γ -tubulin 特異的阻害剤 gatastatin の細胞毒性増強」日本農芸化学会関東支部大会 2017年

知念拓実、恵比須春奈、早川一郎、塩田秀也、木越英夫、臼井健郎「Glaziovianin A 類縁体 06-demethyl benzyl glaziovianin A による微小管重合阻害」第34回メディスナルケミストリーシンポジウム 2016年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: γ -tubulin 阻害剤
発明者: 臼井健郎、早川一郎、坂倉彰、畑中大成
権利者: 国立大学法人筑波大学
種類: 特許
番号: 特願 2018-143346
出願年: 2018年
国内外の別: 国内

取得状況(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: 国立大学法人筑波大学
種類: 特許
番号: 特許 6430246
取得年: 2018
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/usui-lab>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：早川 一郎
ローマ字氏名： Ichiro Hayakawa