

令和元年6月19日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13261

研究課題名(和文)がんエネルギー代謝を標的とする抗腫瘍化合物の探索および化学生物学的な作用機序解明

研究課題名(英文) Screening for cancer metabolism inhibitor and identification of their mechanisms of action

研究代表者

竹内 倫文 (TAKEUCHI, Toshifumi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40516176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギー代謝を阻害する化合物は、がん特有の代謝経路を利用した抗がん剤の候補として期待される。これまでの、エネルギー代謝阻害化合物の探索研究から、クエン酸回路のフマル酸水和酵素を阻害するピロリジノンを見出している。本ピロリジノンがミトコンドリアに局在し、その断片化を引き起こし、細胞内に活性酸素種を発生させ、そして、アポトーシスを誘導することを明らかとした。また、解糖系を阻害する化合物の探索により新規マクロライドを見出している。各種スペクトル解析により本マクロライドの平面構造を決定し、相対立体配置と絶対立体配置を部分的に決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは、様々な遺伝子変異の蓄積によって解糖系やグルタミン代謝などのエネルギー代謝経路を変化させて生存・増殖を有利にする。近年がん細胞の代謝経路の変化が、正常細胞との差別化が期待できる重要な開発領域として注目されている。例えば、殆どのがん細胞では解糖系が亢進されている(ワーバーグ効果)。したがって、エネルギー代謝を阻害する化合物は、がん特有の代謝経路を利用した抗がん剤の候補として期待される。これまでの、エネルギー代謝阻害化合物の探索研究から、クエン酸回路のフマル酸水和酵素を阻害するピロリジノンと解糖系を阻害する化合物の探索により新規マクロライドを見出している。

研究成果の概要(英文)：Selective energy metabolism inhibitor provides new avenues for studies of cancer metabolomics. We identified an inhibitor of fumarate hydratase. A chemical probe of this inhibitor localized in mitochondria. The inhibitor caused mitochondrial fission and generated reactive oxygen species in cells, which led to cell death by apoptosis. Also, we identified a new macrolide using ATP depletion assay. The planar structure of the compound was identified by interpretation of the spectroscopic data. The relative and absolute stereochemistry were partially determined.

研究分野：化学生物学

キーワード：天然物化学 生理活性物質 エネルギー代謝

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

1. 研究開始当初の背景

がんは、様々な遺伝子変異の蓄積によって解糖系を亢進するなどエネルギー代謝経路を変化させて生存・増殖を有利にする。近年がん細胞の代謝経路の変化が、正常細胞と差別化が期待できる重要な開発領域として注目されている。例えば、殆どのがん細胞では解糖系が亢進されている (Warburg 効果)。この現象は PET(陽電子放射断層撮影)検査として応用されている。エネルギー代謝を阻害する化合物は、がん特有の代謝経路を利用した抗がん剤の候補として期待される。

2. 研究の目的

これまでにクエン酸回路のフマル酸水和酵素を阻害するピロリジノンを見出している。また、解糖系を阻害する化合物の探索により新規マクロライドを見出している。本研究では新規マクロライドの構造を解明、ピロリジノンの作用機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

ピロリジノンの作用機序を解析するため、アルキンタグを導入したプローブを作成することとした。作成したプローブ(図1)で処理した細胞に、アジド基を有する蛍光色素 (FITC-PEG3-azide)を導入し、細胞内クリック反応により結合する。洗浄後、プローブの局在部位を観察し、関連する部位について詳細な解析を行うこととした。

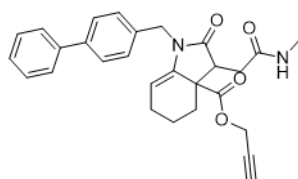


図1. アルキンタグを導入したピロリジノンのプローブの構造

新規マクロライドの平面構造は各種スペクトル測定より決定することとした。相対立体配置については、詳細な NMR 解析により ^1H - ^1H 及び ^1H - ^{13}C スピン結合定数を決定し、ユニバーサル NMR データベース法及び J 基準立体配置解析法を用いて決定することとした。絶対立体配置については、新規マクロライドの部分分解物を得た上で、MTPA エステルへと変換し改良モッシャー法を用いて決定することとした。

4. 研究成果

(1) ピロリジノンの作用機序を解析するため、アルキンタグを導入したプローブを作成した(図1)。本プローブまたは DMSO で SW620 ヒト大腸がん細胞を処理した後、アジド基を有する蛍光色素 (FITC アジド) と細胞内クリック反応により結合し染色した(図2)。その結果、本プローブが細胞内で局在する部位(図2, 中央上)とミトコンドリア存在する部位が完全に一致した。これは、本プローブがミトコンドリアに局在することを示している。

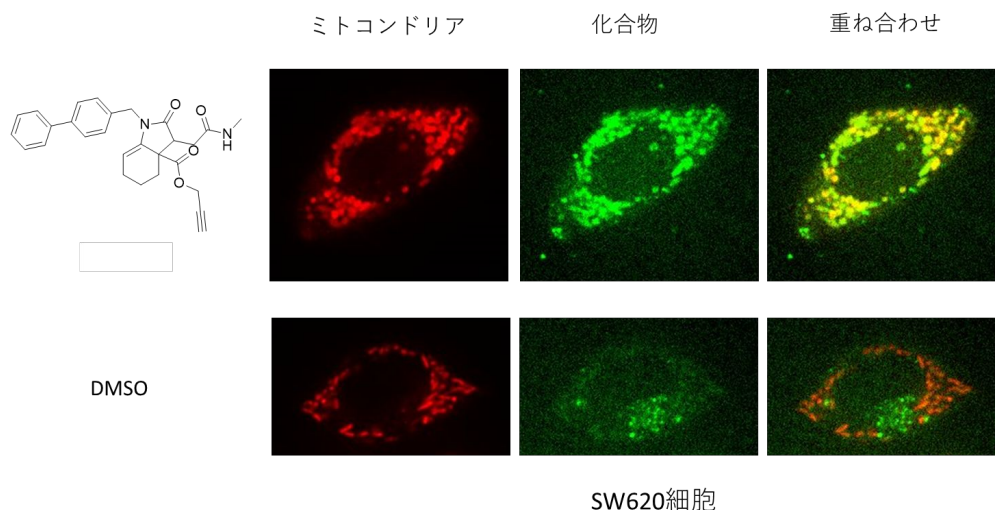


図2. アルキンタグを導入したピロリジノンのプローブで処理した SW620 細胞

本プローブがミトコンドリアに局在したことから、本化合物で処理した SW620 細胞のミトコンドリアを観察したところミトコンドリアの断片化を引き起こしていることが明らかとなった(図3)。

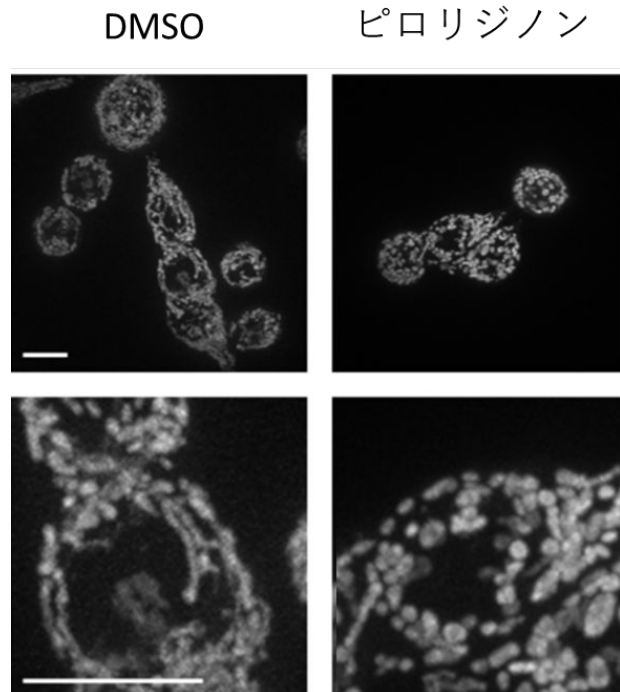


図3．ピロリジノンで処理または未処理の SW620 細胞のミトコンドリア．下段は拡大図．

続いて、ピロリジノンで処理した細胞中で活性酸素種が派生しているかを、フローサイトメーターを用いて観察した．その結果、ピロリジノンで処理した細胞中で活性酸素種が発生していることが明らかとなった（図4）．

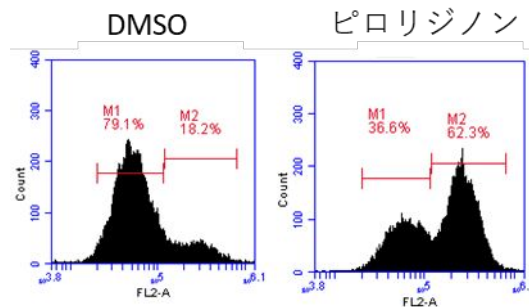


図4．ピロリジノンで処理または未処理の SW620 細胞の活性酸素種の発生

また、ピロリジノンで処理した細胞でカスパーゼ-3の断片化が観察されたことから（図5），ピロリジノンがフマル酸水和酵素を阻害した結果、ミトコンドリア内の活性酸素種の上昇とミトコンドリアの断片化を引き起こし、アポトーシスを誘導する可能性が示唆された．

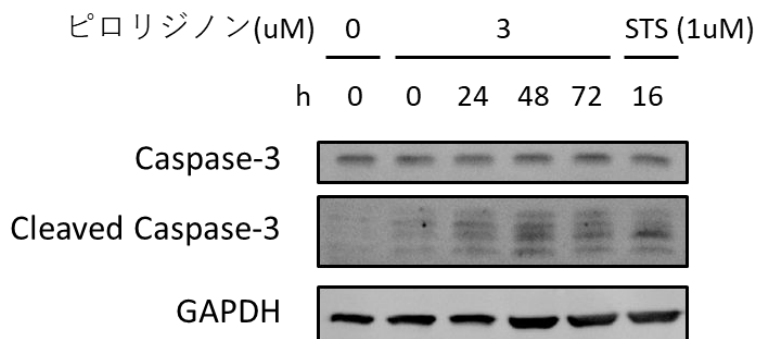


図5．ピロリジノンで処理した SW620 細胞のカスパーゼ-3

(2) Streptomyces MM581-NF15 株の培養液をろ過し、菌体をメタノールで抽出し粗抽出物を得た．粗抽出物をシリカゲルカラム，ゲルろ過カラム(LH-20)，逆相 HPLC で精製し 8mg のディプリライド A を得た．ディプリライド A の組成式を高分解の質量分析により $C_{71}H_{112}O_{29}S$ と決定し

た．本化合物の不飽和度は16であった．IRスペクトルよりヒドロキシ基(3420 cm^{-1})，エステル(1716, 3399 cm^{-1})，硫酸エステル(1066, 1259 cm^{-1})の存在を明らかとした．ディプリライドAの平面構造は主にNMR(DEPT, COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY)スペクトル解析より決定した．高度に重なり合った1.2~1.7 ppmの ^1H NMRスペクトルが多数のメチレン基の存在を示した． ^{13}C NMR, DEPT, HSQCスペクトルの情報から，10個の4級炭素(1個のヘミケタール，2個のエステルカルボニル基，3個のケトンカルボニル基を含む)，35個のメチン(22個の酸素官能基化されたメチンを含む)，15個のメチレン，11個のメチル基の存在を明らかとした．

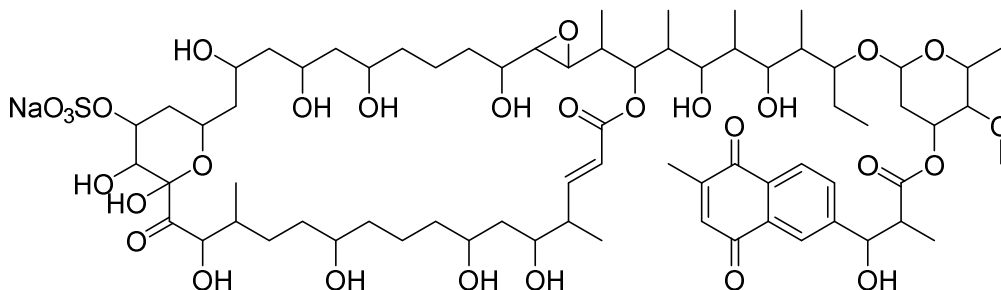


図6．新規マクロライドの平面構造

これらの情報と ^1H - ^1H COSY 相関からA-Fの6個のセグメントの存在が明らかとなった(図6)．これらのセグメントをHMBC 相関・HSQC-TOCSY 相関を用いて接続しディプリライドAの骨格を明らかとした．プロトンH-19及びカーボンC-19の低磁場シフトが硫酸エステルの存在を示した．

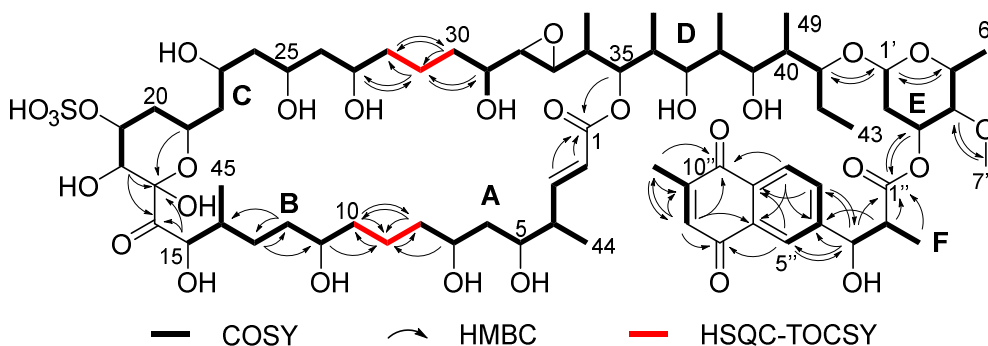


図7．A-Fの6個のセグメントとつながりを示すHMBCやHSQC-TOCSY 相関

続いて，ディプリライドAの相対立体配置の解析に着手した．ユニバーサルNMRデータベース法を用いて，5,7-*syn*，23,25,27-*anti/syn*，37,38,39-*syn/syn*と決定した．次に，*J*基準立体配置解析法を適用するため，詳細な ^1H - ^1H 結合定数，ロングレンジ ^1H - ^{13}C 結合定数を ^1H NMR, DQF-COSY, E.COSY, *J*-分解HMBCまたは，*J*値を分析するためのHMBCテクニックを駆使して決定した．得られた結合定数をNOESY 相関の情報をもとに相対立体配置を部分的に決定した(図8)．

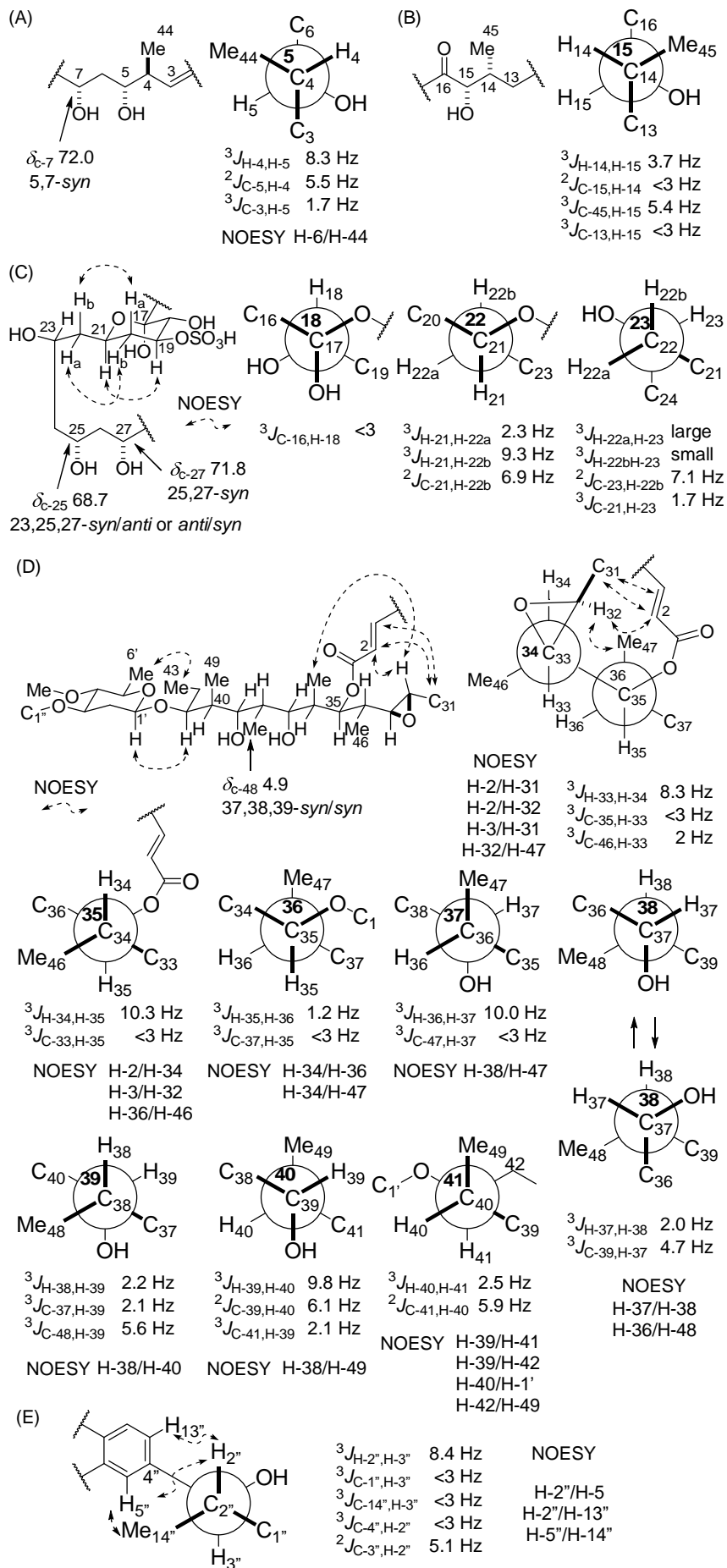
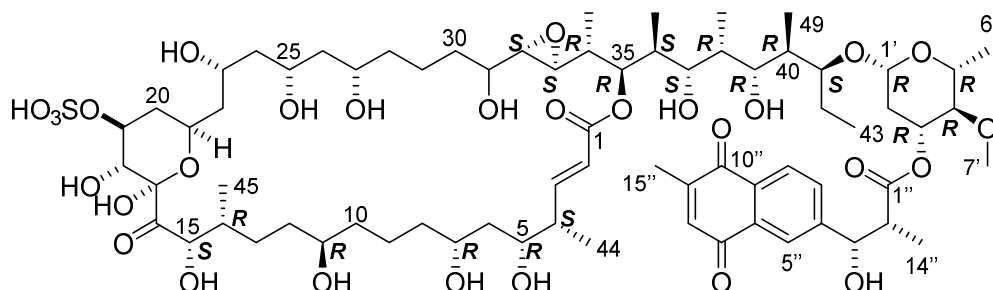


図8 . C-4 から C-7(A) , C-14 から C-15(B) , C-17 から C-27(C) , C-32 から C-41 と C-1' から C-5' (D) , C-2'' から C-3'' (E)の相対立体配置の決定

ディプリライド A の絶対立体配置を決定するためディプリライド A の部分分解を検討した。その結果、C-1 から C-15 フラグメント、C-32 から C-43 と C-1' から C-6' のフラグメントを得た。これらのフラグメントを MTPA エステルへと変換し、改良モッシャー法を適用することで、これらフラグメントの絶対立体配置を決定した (図 9)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeuchi T,* Hatano M, Umekita M, Hayashi C, Wada SI, Nagayoshi M, Sawa R, Kubota Y, Kawada M, Igarashi M, Shibasaki M. ATP Depletion Assay Led to the Isolation of New 36-Membered Polyol Macrolides Deplelides A and B from *Streptomyces* sp. MM581-NF15. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4207-4210.

〔学会発表〕(計 2 件)

竹内 倫文, 波多野 和樹, 梅北 まや, 林 千草, 和田 俊一, 永吉 美穂, 澤 竜一, 久保田 由美子, 川田 学, 五十嵐 雅之, 柴崎正勝
ATP 枯渇活性を有する 36 員環マクロライド deplelide A 及び B の単離・同定
日本薬学会 第 138 年会 138
2018 年

竹内 倫文

ワークショップ(疾患関連分子の認識技術の革新): がんのエネルギー代謝を標的とする化合物の探索
2017 年度生命科学系学会合同年次大会[3AW23-1]
2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名: 竹内倫文

ローマ字氏名: TAKEUCHI Toshifumi

所属研究機関名: 微生物化学研究所

部局名: 創薬化学研究部

職名: 研究員

研究者番号(8桁): 40516176