

令和元年6月12日現在

機関番号：13901
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2018
課題番号：17K15479
研究課題名(和文) 抗がん剤開発を目指した GST 共有結合阻害剤開発

研究課題名(英文) Development of covalent inhibitor for GST

研究代表者

友池 史明 (Tomoike, Fumiaki)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教

研究者番号：70708586

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)：抗がん剤をはじめとする異物を認識し、グルタチオンを付加する活性をもつグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)はがん細胞における抗がん剤耐性にかかわっている。そのため、GSTの阻害はがん治療において重要である。しかし、GSTの基質であるグルタチオンの細胞濃度は高いため、拮抗阻害剤では十分な阻害はできなかった。そこでGSTと共有結合を形成し、効率的に阻害する化合物としてGS-ESFおよびCNBSFを新たに開発した。CNBSFはGS-ESFと同様に不可逆阻害能を示し、また細胞内におけるGSTの阻害も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)は細胞の抗がん剤耐性にかかわる酵素である。本研究では、細胞内のGSTと共有結合を形成して阻害するという新しいコンセプトのもと、新規の阻害剤を開発した。阻害に必要な濃度はまだ高いものの、共有結合を形成して阻害するというコンセプトは証明できたため、本阻害剤の誘導体を検討することにより、より効果的な阻害剤の実現とそれによるがん治療の前進が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glutathione S-transferase (GST) plays the important role in cellular detoxification. Unfortunately, this mechanism contributes to the resistance of anti-cancer drug. Because of this, GST inhibition is required for cancer therapy. Some competitive inhibitors towards GST has been reported. However, cellular glutathione reduces the effect of the inhibitors. To avoid this, we developed covalent inhibitor towards GST. As first generation, we developed GS-ESF by introducing surfonyl fluoride into glutathione. Though GS-ESF inhibited GST in vitro, its low cellular permeability inhibited the inhibition of cellular GST. As second generation, we developed CNBSF by replacing one of two nitro groups in CDNB, a major substrate of GST. By biochemical and cellular assays, we confirmed that CNBSF inhibited GST both in vitro and in cell.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質科学 阻害剤 GST 抗がん剤

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

1. 研究開始当初の背景

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) は様々な基質に対してグルタチオンを抱合させる活性を有している。グルタチオンが抱合された基質は膜タンパク質に識別されて細胞外に排出されるため、GST は細胞の解毒機構に関わる重要な酵素である (図 1)。GST の基質には抗がん剤も含まれているため、GST の阻害はがん治療において重要である。GST には幅広い基質が結合する H サイトとグルタチオンが結合する G サイトがあり、阻害剤としては、特異性が高い G サイトに結合する化合物が適切と考えられた。研究開始当初の段階ですでに G サイトに結合する拮抗阻害剤がいくつか報告されていた。しかし、細胞内のグルタチオン濃度が高いため、これらの阻害剤では十分な阻害がみられなかった。そこで本研究では、阻害剤が G サイトに結合したのち、GST と共有結合を形成すれば、効率的に GST を阻害できるのではないかと考えた。

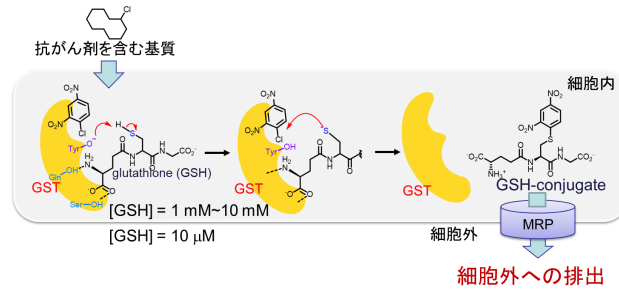


図 1 GST による解毒機構

2. 研究の目的

本研究は、有機合成によって GST と共有結合を形成する新規の化合物を設計・合成し、試験管内および細胞内において GST の活性を不可逆的に阻害する化合物を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 阻害剤の設計

阻害剤として、グルタチオンにスルホニルフルオリド基を導入した GS-ESF および 2,4-ジニトロクロロベンゼン(CDNB)のニトロ基をスルホニルフルオリド基に置換した CNBSF を合成した。合成した化合物は NMR および質量分析計 ESI-MS によって確認した。

(2) GST タンパク質の調製

阻害能の評価としてはヒト由来の GST Pi (GSTP) を大腸菌で発現させた。培養した発現菌体を遠心分離で集めた後、20 mM Tris-HCl 溶液に懸濁し、氷上で超音波破碎を行った。細胞破碎液を遠心分離にかけた後、その上清を GE Healthcare 社のグルタチオン・セファロース樹脂と 4°C の環境下で混合した。樹脂をカラムに充てんした後、懸濁に用いた溶液と同じ組成のもので樹脂を洗浄した後、グルタチオンを含む溶液で溶出することで GSTP を精製した。精製後、溶出に用いたグルタチオンを透析で取り除いたのち、活性測定を行った。

(3) 活性測定

活性測定では、CDNB のグルタチオン抱合による吸光度変化を JASCO V-650 吸光測定機を用いて定量した。阻害の不可逆性の評価では、阻害剤と GSTP を反応させた後、グルタチオンと CDNB を添加し、反応初速度を測定した。また、wash out 実験では、阻害剤と反応させた後、遠心を利用する限外ろ過膜である 10kDa cut off の AMICON ULTRA 0.5 mL を利用して反応溶液を交換し、阻害剤を取り除いた後、CDNB とグルタチオンを添加して、反応初速度を計測することで阻害能を評価した。

(4) 円二色性スペクトルによるフォールディングの確認

GSTP を阻害剤と反応させた後、JASCO J-720WN を用いてスペクトルを測定することで二次構造を測定し、阻害剤によって変性が起こらないことを確認した。

(5) 質量分析による共有結合形成の確認

質量分析による GSTP の解析は、GSTP と阻害剤を反応させた後、LC-MS を用いて行った。LC としては Dionex Ultimate 3000 HPLC システムを、質量分析計としては EXACTIVE Plus mass spectrometer を用いた。

(6) 結晶構造解析による共有結合形成の観察

GSTP と阻害剤を反応させた後、100 mM MES (pH 6.0), 40 mM CaCl₂, 20 mM DTT, 17.6% (w/v) PEG8000 を結晶化溶液とし、ハンギングドロップ法で結晶化を行った。得られた結晶由来の回折像は SPring-8 のビームライン BL38B1 を利用して取得し、HKL2000 によってスケーリングを行った。GSTP の報告されている構造 2A2R を用いて CCP4i の MolRep を利用して分子置換を

し、Phenix によって構造の精密化を行った。

(7)細胞内の GST 活性測定

ヒト培養細胞である HeLa 細胞の培地を、阻害剤を含む培地と交換して短時間培養した後、リン酸バッファーで洗浄し、GST の活性に反応して蛍光を発する DNs-Rh を含む培地と交換、その後蛍光顕微鏡で観察、またはトリプシン処理によって細胞を回収してフローサイトメーターで定量的に解析した。

4. 研究成果

(1)第一世代型 GS-ESF の合成と評価

第一世代の GST 共有結合阻害剤としてグルタチオンにスルホニルフルオリド基が導入された GS-ESF を設計・合成した(図 2)。この化合物について生化学的解析を行った。まず、GSTP と反応させた後、活性を測定したところ、反応時間に応じた活性の減少がみられた。この結果から不可逆的な阻害が示唆された。さらに共有結合形成を確認するために GSTP と GS-ESF を反応させた後、限外ろ過で溶液中の阻害剤を除き、基質を加え活性を測定した。その結果、従来の阻害剤では限外ろ過後、活性が復活したのに対し、GS-ESF では限外ろ過後も阻害が継続していることが確認された。このことから、GS-ESF は GSTP と共有結合を形成して阻害していることが示された。また、GS-ESF により GSTP が変性している可能性もあるため、GS-ESF と反応後、GSTP の CD スペクトルを測定したところ、反応前後でスペクトルが変化しなかった。CD スペクトルはタンパク質の二次構造を反映しているため、この結果から GS-ESF は GSTP を変性させることなく、共有結合を形成して不可逆的に GSTP を阻害していることが明らかになった。

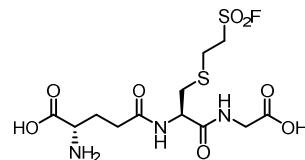


図 2 GS-ESF の構造

共有結合の様式を確認するため、GS-ESF にビオチンを導入し、GSTP と反応後、ストレプトアビジンビーズで回収し、質量分析計で解析した。その結果、分子量の増大がみられ、その増加分から GS-ESF との共有結合が確認された。また、MS/MS 解析により、108 番目のチロシン残基との共有結合が示唆された。共有結合を形成しているアミノ酸残基の確認および他のアミノ酸との相互作用を明らかにするために GSTP と GS-ESF の共結晶を得て、SPRing-8 にて回折像を取り、複合体の構造を決定した。その結果、質量分析から示唆された通り、108 番目のチロシン残基との共有結合が確認された。

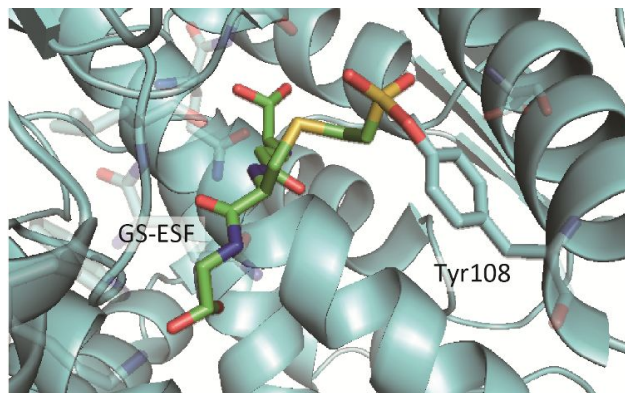


図 3 GSTP と GS-ESF の複合体構造

以上の結果について、Chemical Communication 誌に報告した(業績における文献 3)。

GS-ESF を用いて細胞内の GST の阻害を試みたところ、阻害がみられなかった。これは GS-ESF を構成するグルタチオン骨格が親水性であるため、細胞膜を透過しないためと考えられた。そこで、第二世代として CNBSF を設計・合成した。

(2)第二世代型 CNBSF の合成と評価

G サイトに結合するためには阻害剤はグルタチオン骨格を持つ必要があるが、グルタチオン骨格を有すると膜透過しないという問題点があった。そこで、細胞内に導入するまではグルタ

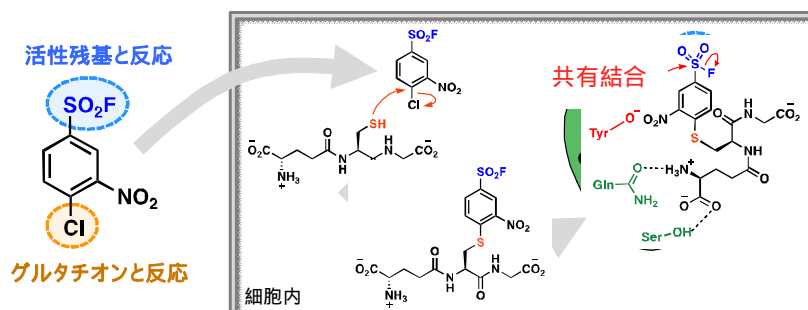


図 4 ビルドアップ型の阻害剤の戦略

チオン骨格を持たず、細胞内でグルタチオンと抱合体を形成し、その後 GST と共有結合を形成するビルドアップ型の阻害剤を考案した。この膜透過性を有する阻害剤の設計において、一般的な GST の基質である CDNB に着目した。この CDNB のもつニトロ基の一つをスルホニルフルオリド基に置換した CNBSF を設計・合成した。

CDNB の誘導体としては、図 5 に示した化合物を設計・合成した。これらの化合物について、X には塩素またはフッ素を導入し、特に化合物 2 については、ヒドロキシル基やメチル基を導入した。合成後、NMR および質量分析計で確認したのち、生化学的解析を行った。合成した化合物について、グルタチオン存在下で GSTP と反応させた後、CDNB を加えて活性を調べたところ、化合物との反応時間に応じて、活性が減少することが確認された。また、GSTP と反応させた後、限外ろ過で未反応の阻害剤を取り除き、再度グルタチオンと CDNB を加えて反応を測定したところ、活性が復活しないことが確認された。このことから、これらの化合物はグルタチオンと抱合体を形成した後、GSTP と共有結合を形成することが確認された。特に化合物 3 はフッ素および塩素が導入された両方の構造で、高い不可逆阻害能を示した。特にフッ素を導入した化合物 3 を CNBSF とした。これについて反応速度を調べたところ、この化合物は GST 非存在下でもグルタチオンと抱合体を形成するが、GST の触媒反応によってはるかに速い速度で抱合体を形成することが明らかになった。また、GSTP との共有結合形成の速度は決定できなかったものの、反応速度から、図 4 で予想した通り、まず、グルタチオンと抱合体を形成したのちに GSTP と共有結合が形成されることが明らかになった。

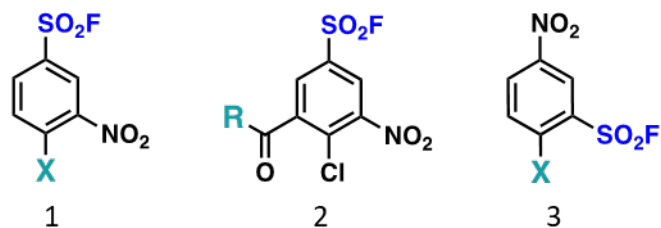


図 5 CDNB の誘導体

次に質量分析によって共有結合形成を確認したところ、グルタチオンとの抱合体の形では、二か所のチロシンと共有結合を形成する可能性が示唆された一方、反応液中で GSTP と化合物、そしてグルタチオンを反応させた場合は、一か所のチロシンと反応することが示唆された。このことから、グルタチオン、化合物、そして GSTP の三者複合体を形成した後、グルタチオンと化合物が抱合体を形成する。その際に GSTP 内でのスルホニルフルオリド基およびチロシン残基の位置が固定され、108 番目のチロシンと相互作用し、共有結合を形成するという機構が示唆された。さらに他のアミノ酸残基との相互作用を調べるために共結晶を調製し、X 線結晶構造解析を試みたところ、GSTP と CNBSF とグルタチオンの抱合体が共有結合を形成しているモデルが得られた。しかし、このモデルは、R 値が高いため、精密化を進めている。

細胞内の GST 阻害を評価するために、DNs-Rh を用いて細胞内 GST の活性を可視化した。DNs-Rh は図 6 に示したように GST の活性によって脱保護が起こり、ローダミンとして蛍光を発する。また、保護基により膜透過性が高く、細胞内に透過するため、細胞内の GST 活性が測定できるプローブである (*J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 14109.)。阻害剤で処理した培養細胞にプローブを導入し、蛍光顕微鏡で観察した。図 7 に示したように、阻害剤 CNBSF で処理した細部では、DNs-Rh が脱保護して生じる蛍光がみられないことが明らかになった。このように細胞の蛍光観察から細胞内の GST が CNBSF で阻害されることが明らかになった。阻害の効果を定量的に評価するために、CNBSF および図 5 の化合物 1-3 の化合物について、塩化物体およびフッ素体の両方を用いて細胞を処理し、その後 DN_s-Rh を添加した後、トリプシン消化によって細胞を回収し、フローサイトメーター

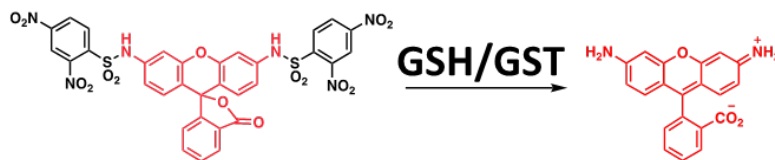


図 6 DN_s-Rh の構造と働き

細胞内の GST 阻害を評価するために、DN_s-Rh を用いて細胞内 GST の活性を可視化した。DNs-Rh は図 6 に示したように GST の活性によって脱保護が起こり、ローダミンとして蛍光を発する。また、保護基により膜透過性が高く、細胞内に透過するため、細胞内の GST 活性が測定できるプローブである (*J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 14109.)。阻害剤で処理した培養細胞にプローブを導入し、蛍光顕微鏡で観察した。図 7 に示したように、阻害剤 CNBSF で処理した細部では、DN_s-Rh が脱保護して生じる蛍光がみられないことが明らかになった。このように細胞の蛍光観察から細胞内の GST が CNBSF で阻害されることが明らかになった。阻害の効果を定量的に評価するために、CNBSF および図 5 の化合物 1-3 の化合物について、塩化物体およびフッ素体の両方を用いて細胞を処理し、その後 DN_s-Rh を添加した後、トリプシン消化によって細胞を回収し、フローサイトメーター

DNs-Rh は図 6 に示したように GST の活性によって脱保

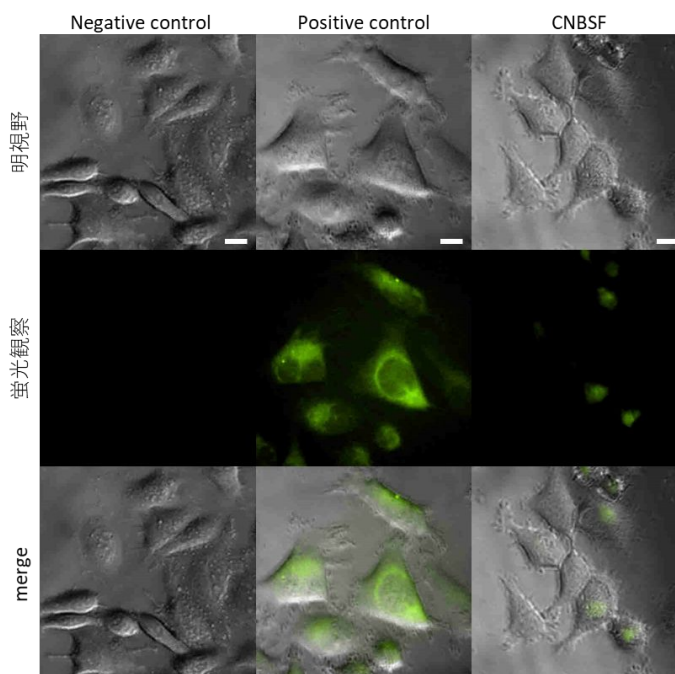


図 7 細胞内 GST の阻害

スケールバーは 20 μm を示す

を用いてローダミン由来の蛍光強度を測定した。その結果、1 mM という高濃度では、ほとんどの化合物で細胞当たりの蛍光が弱いことが示された。この結果は、細胞内の GST 活性が阻害されることを示唆している。その中でも CNBSF は最も強い阻害能を示すことが示唆された。また、抗 GST 抗体を用いて細胞内の GST を回収し、質量分析で解析したところ、細胞内の GST と阻害剤が共有結合を形成していることも確認された。

以上の成果を ChemBioChem 誌に報告した（業績における文献 2）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Zhaoma Shu, Iku Tanaka, Azumi Ota, Daichi Fushihara, Naoko Abe, Saki Kawaguchi, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe (2019) Disulfide-unit conjugation enables ultrafast cytosolic internalization of antisense DNA and siRNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press (査読あり)
2. Yuko Shishido, Fumiaki Tomoike, Keiko Kuwata, Haruka Fujikawa, Yoshitaka Sekido, Yuko Murakami-Tonami, Tomoshi Kameda, Naoko Abe, Yasuaki Kimura, Satoshi Shuto, Hiroshi Abe (2019) A Covalent Inhibitor for Glutathione S-Transferase Pi (GSTP1-1) in Human Cells. *ChemBioChem*, 20, 900-5 (査読あり)
3. Yuko Shishido, Fumiaki Tomoike, Yasuaki Kimura, Keiko Kuwata, Takato Yano, Kenji Fukui, Haruka Fujikawa, Yoshitaka Sekido, Yuko Murakami-Tonami, Tomoshi Kameda, Satoshi Shuto, Hiroshi Abe (2017) A covalent G-site inhibitor for glutathione S-transferase Pi (GSTP1-1). *Chem. Commun.* 53, 11138-41. (査読あり)

〔学会発表〕(計 45 件)

1. 友池 史明, 宍戸 裕子, 藤川 遥加, 木村 康明, 桑田 啓子, 村上 優子, 福井 健二, 関戸 好孝, 矢野 貴人, 亀田 倫史, 周東 智, 阿部 洋, 膜透過性を有する GST 共有結合性阻害剤の開発, 日本薬学会 第 139 年会, 2019 年
2. Chang Jun Shi, Hideo Katatsuma, Yushi Niimi, Kousuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, 抗ウイルス剤および抗ガン剤としての 2'-修飾ヌクレオシド誘導体の開発, 日本薬学会 第 139 年会, 2019 年
3. 野村 昌輝, 伏原 大地, 中本 航介, 友池 史明, 木村 康明, 原口 一広, 阿部 洋, 4'-修飾ヌクレオシドアナログの合成, 日本薬学会 第 139 年会, 2019 年
4. 木村 康明, 新美 結士, 片倉 秀雄, 友池 史明, 鈴木 哲朗, 村上 努, 児玉 栄一, 阿部 洋, 2'-β セレノ核酸アナログによるウイルス逆転写酵素の不可逆阻害, 日本化学会 第 99 回, 2019 年
5. 小久保 建吾, 山岡 和樹, 中本 航介, 木村 康明, 友池 史明, 阿部 洋, 新規核酸ケミカルライゲーション反応の開発, 日本化学会 第 99 回, 2019 年
6. Haruka Fujikawa, Yuko Shishido, Keiko Kuwata, Yasuaki Kimura, Fumiaki Tomoike, Hiroshi Abe, "A Covalent Inhibitor for Glutathione S-Transferase Pi (GSTP1-1) in Human Cells", 統合物質創製化学研究推進機構第 2 回国際シンポジウム, 2019 年
7. Fumiaki Tomoike, Noriko Nakagawa, Seiki Kuramitsu, Ryoji Masui, Nucleoside salvage pathways in *Thermus thermophilus*, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 発見 50 周年記念研究会, 2018 年
8. Yasuaki Kimura, Yushi Niimi, Hideo Katakura, Fumiaki Tomoike, Tetsuro Suzuki, Tsutomu Murakami, Eiichi, Kodama, Hiroshi Abe, Development of 2'-β Seleno Nucleoside Analogs as Irreversible Inhibitors for Viral Polymerases, ISNAC2018, 2018 年
9. 田辺 航, 友池 史明, 村上 優子, 木村 康明, 阿部 洋, リン酸フロリド基の医薬化学への応用, IRCCS The 4th Symposium, 2018 年
10. 今枝 昭裕, 笠川 涼太, 浅井 潔, 桜庭 俊, 岩切 淳一, 阿部 奈保子, 友池 史明, 木村 康明, 阿部 洋, N6-メチルアデノシンの導入位置を制御した mRNA の開発とその翻訳能, 「細胞を創る」研究会 11.0, 2018 年
11. 木村 康明, 富田 貴志, 友池 史明, 阿部 奈保子, 鬼塚 和光, 阿部 洋, mRNA のトポロジカル捕捉による遺伝子発現抑制, 第 12 回バイオ関連化学シンポジウム, 2018
12. Shu Zhaoma, 太田 杏摘, 田中 育, 伏原 大地, 阿部 奈保子, 友池 史明, 木村 康明, 多田 誠一, 坂田 飛鳥, 西村 智, 阿部 洋, 膜透過性分子を結合したオリゴ核酸による遺伝子発現抑制, 第 34 回日本 DDS 学会学術集会, 2018 年
13. 太田 杏摘, 田中 育, 伏原 大地, Shu Zhaoma, 阿部 奈保子, 友池 史明, 木村 康明, 多田 誠一, 坂田 飛鳥, 西村 智, 阿部 洋, 潜在性カチオン分子を利用したオリゴ核酸の膜透過性向上, 日本核酸医薬学会第 4 回年会, 2018 年
14. 今枝 昭裕, 笠川 涼太, 浅井 潔, 桜庭 俊, 岩切 淳一, 阿部 奈保子, 友池 史明, 木村 康明, 阿部 洋, N6-アルキルアデノシン導入による mRNA の翻訳能向上, 第 20 回日本 RNA 学会年会, 2018 年
15. 山岡 和樹, 笠川 涼太, 早川 真由, 丸山 豪人, 阿部 奈保子, 友池 史明, 木村 康明, 周東 智, 松田 彰, 南川 典明, 阿部 洋, ホスホロチオエステル基を用いたケミカ

ルライゲーション反応による機能性核酸の合成,日本ケミカルバイオロジー学会 第 13 回
年会,2018 年

16. 伏原 大地,太田 杏摘,田中 育,今枝 昭裕,永井 貴広,星野 真一,木村 康明,
友池 史明,阿部 洋,新規抗ウイルス薬を志向した修飾 2-5A の合成,日本薬学会第 138
回年会,2018 年
17. Zhaoma Shu,太田 杏摘,田中 育,伏原 大地,阿部 奈保子,友池 史明,木村 康
明,阿部 洋,膜透過性核酸の開発,日本薬学会第 138 年会,2018 年
18. 藤川 遥加,宍戸 裕子,木村 康明,友池 史明,村上 優子,青木 正博,阿部 洋,
共有結合型 GST 阻害剤の開発,日本化学会 第 98 春季年会,2018 年
19. 宍戸 裕子,藤川 遥加,友池 史明,木村 康明,桑田 啓子,村上 優子,福井 健
二,関戸 好孝,矢野 貴人,周東 智,阿部 洋,グルタチオン S-トランスフェラーゼ
を標的とした共有結合性阻害剤の開発,ConBio2017,2017
20. 友池 史明,宍戸 裕子,藤川 遥加,木村 康明,柴田 綾,周東 智,阿部 洋,細
胞内グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性を検出するためのプローブ開発,日本分析化
学会第 66 年会,2017 年
21. 藤川 遥加,宍戸 裕子,木村 康明,友池 史明,村上 優子,青木 正博,福井 健
二,矢野 貴人,阿部 洋,共有結合性 GST 阻害剤の開発,第 48 回中化連秋季大会,2017
年
22. 宍戸 裕子,藤川 遥加,木村 康明,友池 史明,桑田 啓子,福井 健二,村上 優
子,亀田 倫史,周東 智,阿部 洋,共有結合性グルタチオン S-転移酵素阻害剤の開発,
第 11 回バイオ関連化学シンポジウム,2017 年

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

該当なし

○取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

1. 研究室ホームページ

<http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp/>

2. 研究室広報用動画

<https://www.youtube.com/watch?v=xrZoYpl6HDk>

3. プレスリリース

http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20181212_sci.pdf

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:宍戸裕子

ローマ字氏名:(SHISHIDO, Yuko)

※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。