

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05726

研究課題名(和文) 解糖系やグルタミン代謝を標的とする抗腫瘍化合物の探索と化学生物学的な作用機序解明

研究課題名(英文) Screening of glutaminolysis or glutamine metabolism inhibitors

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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・増殖を有利にすることから、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。微生物化学研究所が所有する放線菌培養液ライブラリより、グルタミン代謝補償試験を用いグルタミン代謝を標的としうる化合物を探索した。探索の結果、グルタミン依存的に細胞毒性を示す培養液を見出した。本株培養液の抽出物を各種クロマトグラフィーで精製し、新規アシルジペプチドマイクロモノスポラミド A を得た。

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・増殖を有利にすることから、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アシルジペプチドマイクロモノスポラミド A を見出しその構造を決定するとともに合成経路を確立した。

研究成果の概要(英文)：In the metabolism modulator screening program, screening was performed using a glutamine compensation assay to target glutaminolysis, which measures the cytotoxicity of cells cultured in media with glutamine or dimethyl ketoglutarate. In the glutaminolysis pathway, glutamine enters the cell and is converted into glutamic acid and  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG), which enters the TCA cycle. Thus, dimethyl ketoglutarate (DMKG), a pro-drug of  $\alpha$ -KG, can compensate for glutamine. This study identified an active n-BuOH extract from *Micromonospora* sp. MM609M-173N6 with glutamine dependent cytotoxicity. An acyldipeptide micromonosporamide A was isolated by bioassay-guided fractionation. The compound exhibited glutamine-dependent antiproliferative activity against the A549 and HCT116 cell lines.

研究分野：天然物化学

キーワード：ペプチド エネルギー代謝 全合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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。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

これまでに放線菌培養液ライブラリからグルタミン代謝補償試験を用いて新規天然物を得ている。本天然物は分子量約 500 の化合物で細胞増殖抑制活性を示す。NMR, MS, UV スペクトルと SciFinder などのデータベースとの比較から、本化合物は新規化合物であるが、構造・作用機序は完全には解明できていない。本研究では本天然物の構造決定及び合成を進める。

3. 研究の方法

新規天然物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。各種スペクトル測定より本天然物マイクロモノスポラミド A はアシルジペプチドであった。本天然物は微量しか得られず誘導化による立体配置の解析が困難であった。2つのアミノ酸の絶対立体配置は改良マーフィー法を用いて決定することとした。各アミノ酸が有する8つ及び2つの相対配置については、各アミノ酸のすべてのジアステレオマーを合成し、標品と LCMS-MS 保持時間を比較することで絶対立体配置を決定することとした。

4. 研究成果

微生物化学研究所が所有する放線菌培養液ライブラリより、グルタミン代謝補償試験を用いグルタミン代謝を標的としうる化合物を探索した。グルタミン代謝補償試験は、グルタミンまたは  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) を含む培地中での細胞毒性を比較評価する。グルタミンは細胞に取り込まれると、グルタミン酸や  $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換されてクエン酸回路に取り込まれる。したがって、ジメチルケトグルタル酸 (DMKG,  $\alpha$ -KG のプロドラッグ) はグルタミン代謝を補償しうる。探索の結果、グルタミン依存的に細胞毒性を示す *Micromonospora* sp. MM609M-173N6 株の培養液を見出した。本株培養液の抽出物を各種クロマトグラフィーで精製し、新規アシルジペプチド マイクロモノスポラミド A を得た。

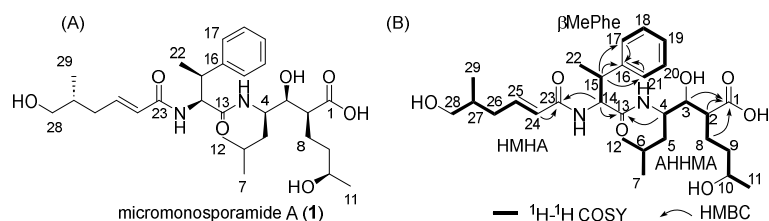


図1 マイクロモノスポラミド A の構造 (A) と、COSY 及び HMBC 相関 (B)

*Micromonospora* sp. MM609M-173N6 株の培養液の培養液 (10 L) を *n*-ブタノールで抽出し粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC を用いて精製しマイクロモノスポラミド A を 0.5 mg 得た。高分解能質量分析計を用いて本化合物の分子式を  $C_{29}H_{46}O_7N_2$  と決定した ( $[M+H]^+$   $m/z$  535.3384,  $\Delta$  0.6 mDa)。赤外吸収スペクトルはヒドロキシ基 ( $3419\text{ cm}^{-1}$ ) とアミド基 ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ) の存在を示唆した。NMR を用いた各種スペクトル解析により本天然物の平面構造を決定した。

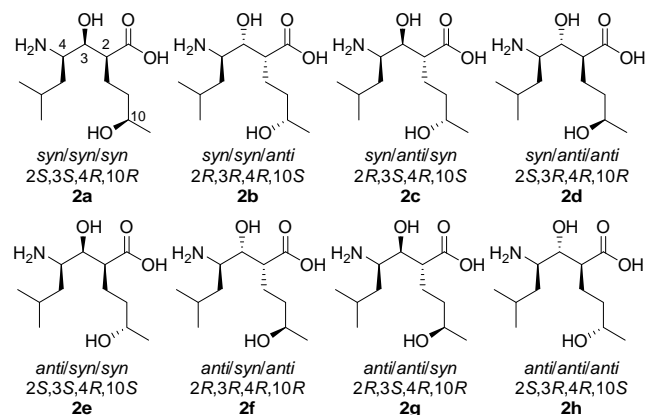
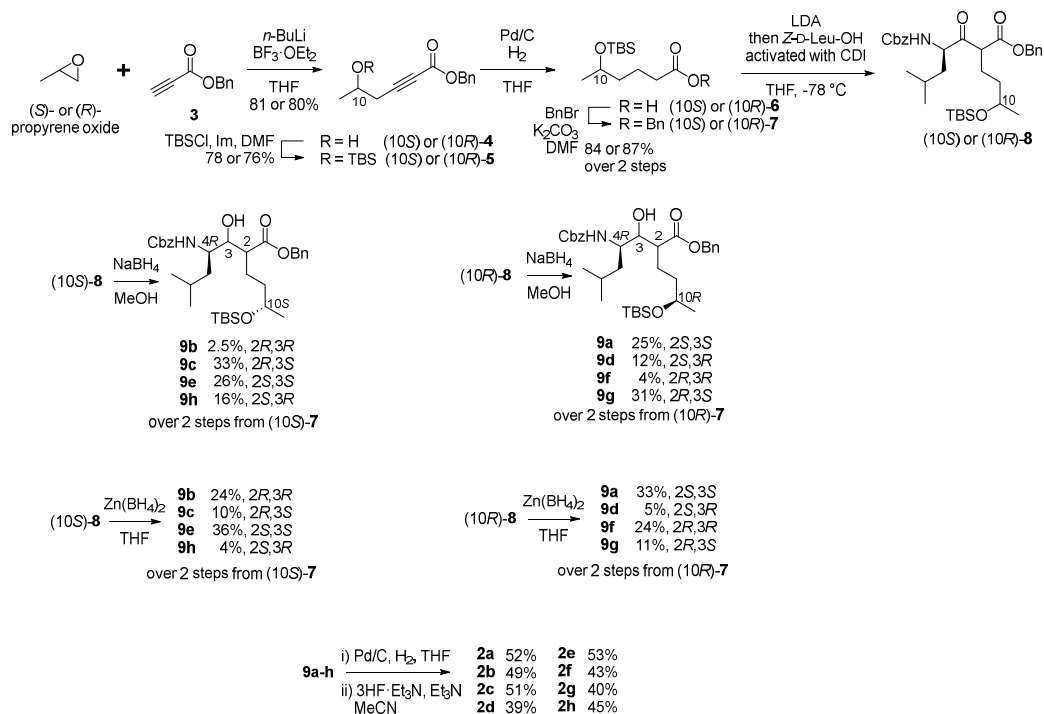


図2 置換スタチン (AHHMA) が取りうる立体異性体

本天然物は微量しか得られず、誘導化による立体配置の解析が困難であった。マイクロモノスポラミド A は 置換スタチン (AHHMA)、 $\beta$ -メチルフェニルアラニン ( $\beta$ -MePh) 及びアシル基 (HMMA) から構成される (図 1 B)。AHHMA は 4 つの立体中心 (C-2, 3, 4 及び 10) を有し、8 種のジアステレ

オマーを生じうる(図2)．これらの標品があれば天然物の酸加水分解物と LCMS 保持時間を比較することで AHHMA の相対立体配置を決定できる．そこでこれら 8 種の AHHMA のジアステレオマーを合成することとした．



#### スキーム 1 AHHMA 2a-h の合成

(S)-または(R)-プロピレンオキシドを原料として AHHMA の 8 種のジアステレオマー 2a-h を合成した．2a-h の LCMS 保持時間(3.2, 6.6, 5.7, 5.1, 5.1, 5.4, 5.3, 2.9分)と天然物由来 AHHMA フラグメントの LCMS 保持時間(3.2 分)を比較することにより，相対立体配置を *syn/syn/syn* と決定した．改良マーフィーを用いて天然物由来 AHHMA フラグメントの C-4 の絶対立体配置を *R* と決定した．したがって，AHHMA の絶対立体配置を 2S,3S,4R,10R と決定した．

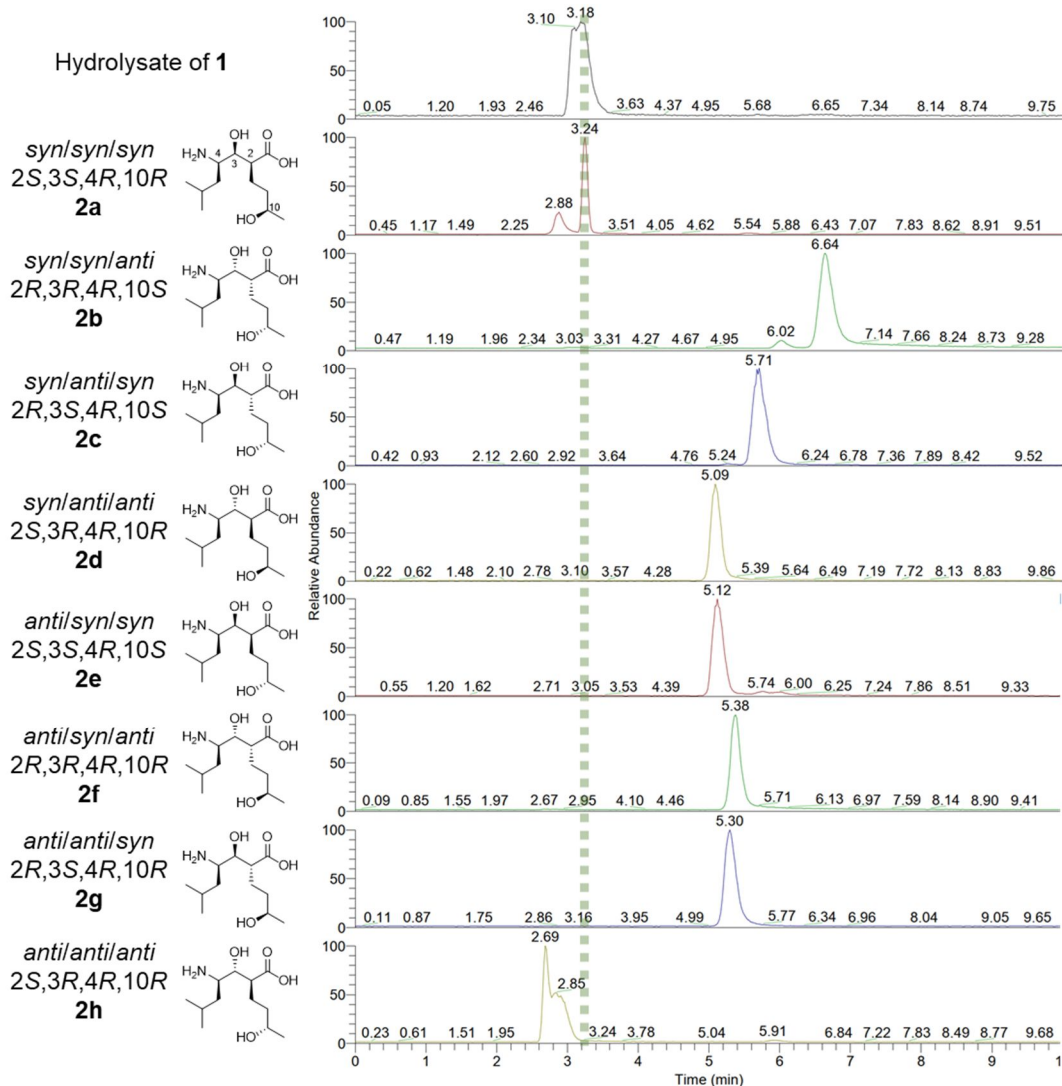


図3 AHHMA 部位の相対立体配置の決定

MePh 部位は *syn* または *anti* のジアステレオマーを取りうる。 *Syn*-または *anti*- MePh の LCMS 保持時間(6.8または7.4分)と天然物由来 MePh フラグメントの LCMS 保持時間(7.3分)を比較し MePh の相対立体配置を *anti* と決定した。改良マーフィーを用いて天然物由来 MePh フラグメントの C-14 の絶対立体配置を *S* と決定した。したがって, MePh の絶対立体配置を 14*S*,15*S* と決定した。

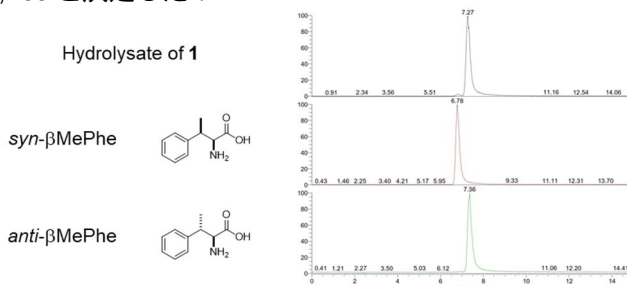
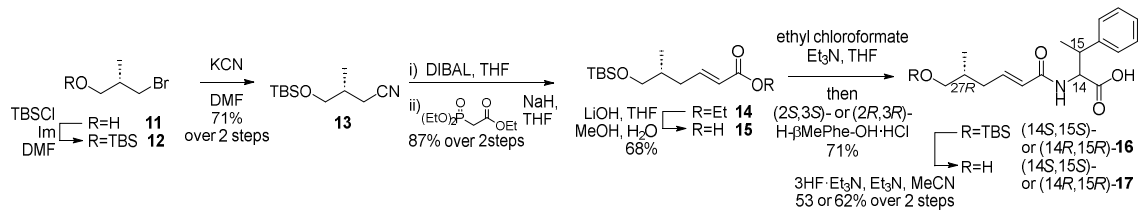


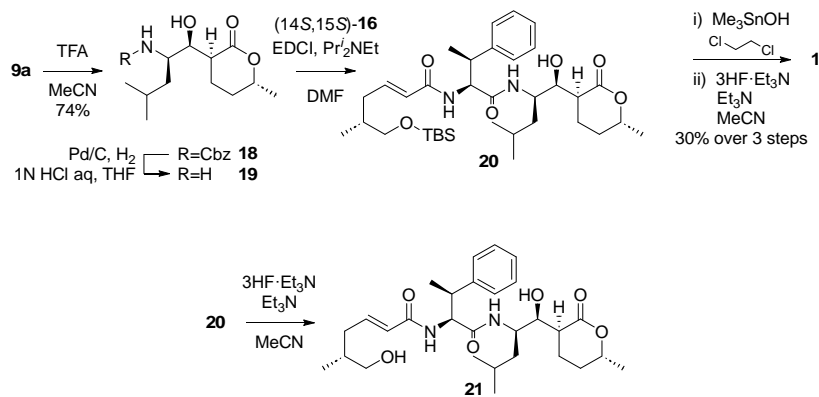
図4 MePh 部位の相対立体配置の決定

アシル基の C-27 の絶対立体配置を決定するため標品(14*S*,15*S*,27*R*)-及び(14*R*,15*R*,27*R*)-**17**を合成した(スキーム2)。得られた標品の LCMS 保持時間(9.4及び10.2分)及び天然物由来フラグメントの LCMS 保持時間(9.4分)を比較しアシル基の C-27 の絶対立体配置を *R* と決定した。したがって, 本天然物の絶対立体配置を 2*S*,3*S*,4*R*,10*R*,14*S*,15*S*,27*R* と決定した。



## スキーム 2 標品 17 の合成

本天然物 **1** の絶対及び相対立体配置を確認するため本天然物を合成した。合成した **1** と天然物の  $^1\text{H}$ -及び  $^{13}\text{C}$ -NMR を比較したところ残念ながら微妙に一致しないことがわかった。繰り返し  $^1\text{H}$  NMR を比較した濃度や温度によりスペクトルが変化することが明らかとなった。これは **1** のカルボン酸の影響と考えられる。そこで天然及び合成品をそれぞれラクトン **21** へと変換し各種スペクトルを比較したところ、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$ -NMR と旋光度は完全に一致した。したがって、**1** の全合成を達成するとともに、**1** の立体が  $2S, 3S, 4R, 10R, 14S, 15S, 27R$  であることを確認することができた。



## スキーム 3 マイクロモノスポラミド A (**1**)及びラクトン **21** の合成

本天然物(天然品及び合成品)はグルタミン依存的な細胞増殖抑制活性(A549 細胞,  $\text{IC}_{50}$   $0.6 \mu\text{M}$ )を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi Toshifumi, Hatano Masaki, Muramatsu Hideyuki, Kubota Yumiko, Sawa Ryuichi, Igarashi Masayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Micromonosporamide A with Glutamine-Dependent Cytotoxicity from Micromonospora sp. MM609M-173N6: Isolation, Stereochemical Determination, and Synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 7981 ~ 7985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c02974	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamata Mai, Takeuchi Toshifumi, Hayashi Ei, Nishioka Kazane, Oshima Mizuki, Iwamoto Masashi, Nishiuchi Kota, Kamo Shogo, Tomoshige Shusuke, Watashi Koichi, Kamisuki Shinji, Ohruji Hiroshi, Sugawara Fumio, Kuramochi Kouji	4. 巻 84
2. 論文標題 Synthesis of nucleotide analogues, EFdA, EdA and EdAP, and the effect of EdAP on hepatitis B virus replication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 217 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1673696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi Toshifumi, Sriwilaijaroen Nongluk, Sakuraba Ayako, Hayashi Ei, Kamisuki Shinji, Suzuki Yasuo, Ohruji Hiroshi, Sugawara Fumio	4. 巻 24
2. 論文標題 Design, Synthesis, and Biological Evaluation of EdAP, a 4'-Ethynyl-2'-Deoxyadenosine 5'-Monophosphate Analog, as a Potent Influenza A Inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2603 ~ 2603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24142603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Myobatake Yusuke, Kamisuki Shinji, Tsukuda Senko, Higashi Tsunehito, Chinen Takumi, Takemoto Kenji, Hachisuka Masami, Suzuki Yuka, Takei Maya, Tsurukawa Yukine, Maekawa Hiroaki, Takeuchi Toshifumi, Matsunaga Tomoko M., Sahara Hiroeki, Usui Takeo, Matsunaga Sachihiro, Sugawara Fumio	4. 巻 27
2. 論文標題 Pyrenocine A induces monopolar spindle formation and suppresses proliferation of cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115149 ~ 115149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹内 倫文、村松 秀行、波多野 和樹、久保田 由美子、澤 竜一、五十嵐 雅之
2. 発表標題 グルタミン依存的な細胞増殖抑制活性を示すマイクロモノスポラミドAの単離・構造決定及び合成
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 ATP枯渇活性を有する36員環ポリオール系マクロライド deplelide A及びBの単離・同定
3. 学会等名 第7回がんと代謝研究会 in 仙台
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshifumi Takeuchi
2. 発表標題 Screening of Cancer Metabolism Inhibitor
3. 学会等名 The Joint Symposium of "10th Korea-Japan Chemical Biology Symposium" and "30th Meeting for New Drug Discovery" in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

IMC 微生物化学研究所 <a href="https://www.bikaken.or.jp/">https://www.bikaken.or.jp/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------