

機関番号：11401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200037

研究課題名（和文）新規血栓溶解剤の開発を目指したケミカルバイオロジー研究

研究課題名（英文）Chemical biology aimed at the development of new thrombolytics.

## 研究代表者

小泉 幸央 (KOIZUMI YUKIO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80353465

研究成果の概要（和文）：環状ペプタペプチドマルホルミン A<sub>1</sub> (MA<sub>1</sub>) の構造活性相関は、MA<sub>1</sub> の血栓溶解促進活性に分子内ジスルフィド結合の形成および疎水性側鎖の存在が重要なことを示した。また、MA<sub>1</sub> の血栓溶解促進と細胞毒性には相関が観察されなかったことから、両活性の分割が可能であることが示唆された。放射性同位体標識体と蛍光標識体を用いた実験は、MA<sub>1</sub> の細胞内局在を明らかにした。また、マルホルミンアフィニティー担体の使用によって、65 kDa と 22 kDa の細胞内マルホルミン高親和性タンパク質が検出された。

研究成果の概要（英文）：Structure-activity relationships of cyclic pentapeptide, malformin A<sub>1</sub> (MA<sub>1</sub>), showed that the formation of intramolecular disulfide bond and the existence of hydrophobic side-chains were essential for the enhancement of fibrinolysis by MA<sub>1</sub>. In addition, the correlation between enhancement of fibrinolysis and cytotoxicity was not observed, suggesting that the separation of each activity is possible. The studies using radioisotope-labeling and fluorescence-labeling revealed the intracellular localization of MA<sub>1</sub>. Moreover, malformin-affinity beads detected 65 kDa and 22 kDa cellular malformin-high affinity proteins.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー、血栓溶解、微生物二次代謝産物

## 1. 研究開始当初の背景

近年、脳梗塞や心筋梗塞といった血栓性疾患の発症の増加が認められ、その治療ならびに予防がきわめて重要である。抗血栓治療には、血栓形成を抑制する抗凝固剤および抗血小板剤や血栓溶解（線溶）系を亢進させる血栓溶解剤が臨床利用されている。血栓溶解剤として、血栓の主成分であるフィブリンの分

解酵素プラスミンの不活性前駆体プラスミノゲンを活性化するプラスミノゲンアクチベーター（plasminogen activator：PA）が現在用いられているが、血中での短い半減期、大量投与の必要性、全身の出血傾向、緊急治療に限定、長期投与不可能といった問題点を有したタンパク質製剤である。このような問題点の改善を目的とした遺伝子改変型の PA

の開発も進んでいるが、経口投与可能な低分子血栓溶解剤の開発が求められている。

申請者らは、*in vitro* 血栓溶解活性評価系を用いて微生物資源（糸状菌や放線菌）から血栓溶解促進物質の探索を行なった結果、糸状菌 *Aspergillus niger* の F7586 株培養抽出液に活性を見出した。活性成分の単離・精製、構造解析の結果、マルホルミン A<sub>1</sub> (MA<sub>1</sub>) を同定した（研究代表者ら、*J. Antibiot.* 2002; **55**: 78-82）。MA<sub>1</sub> の作用機構を調べた結果、①単球様細胞の uPA を介するプラスミン活性の増加、②不可逆的な活性発現、③血漿タンパク質ビトロネクチンに依存的、④キナーゼ阻害剤ワートマンニンによる賦活化の阻害、⑤タンパク質合成阻害剤サイクロヘキシミドでは賦活化の影響は受けないなどをこれまで明らかとしてきた。しかし、現在までのところ MA<sub>1</sub> の細胞内分子標的はわかっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 構造活性相関：天然型、分子内ジスルフィド結合の還元型、固相合成法により作成した非天然型等のマルホルミンの構造活性相関を行なう。

(2) ケミカルプローブの作成：構造活性相関の結果を基に、放射線同位体標識体、蛍光標識体、ビオチン標識体を作成。

(3) 分子標的の同定：各種ケミカルプローブを用いて MA<sub>1</sub> 高親和性タンパク質を同定する。高親和性タンパク質が真の標的分子かを確認するため、高親和性タンパク質の機能に対する MA<sub>1</sub> の影響や、抗体や RNAi 等を用いた機能阻害実験から細胞性線溶活性に対する機能解析を行なう。

(4) *in vivo* 評価：構造活性相関から高い活性を示した化合物について、血栓塞栓モデル動物を用いて *in vivo* での効果を確認する。

(5) 同定した標的分子をターゲットとした新規低分子化合物の探索：同定した標的分子の機能阻害をターゲットとした低分子阻害剤のスクリーニングを行なう。

## 3. 研究の方法

### (1) 天然型マルホルミン同族体

構造活性相関に用いた天然型 MA<sub>1</sub> 同族体は *Aspergillus niger* F7586 株の培養抽出液から精製または東京理科大学の菅原二三男先生から恵与された同族体を用いた。

### (2) *in vitro* 血栓溶解活性評価系

96 穴マイクロプレートに [<sup>125</sup>I] 標識フィブリンノーゲンをコートし、乾燥させる。トロンピンで処理することにより不溶性のフィブリンへ反応。プレートをブロッキング後、ヒ

ト血液由来血漿と単球様 U937 細胞を添加し、薬剤有無で 3 時間反応させる。反応上清に分離した [<sup>125</sup>I] フィブリン分解物を γ カウンターを用いて定量する。

### (3) 非天然型マルホルミン類縁体の固相合成

非天然型 MA<sub>1</sub> 誘導体は固相合成法により作成した。MA<sub>1</sub> の合成スキームは図 1 に示す。固相結合塩化 2-クロロトリチルに順次、Fmoc アミノ酸を縮合させ、目的のペプチド鎖の取得後、樹脂から切出し、続いて還元、さらにはジスルフィド結合を形成させる。

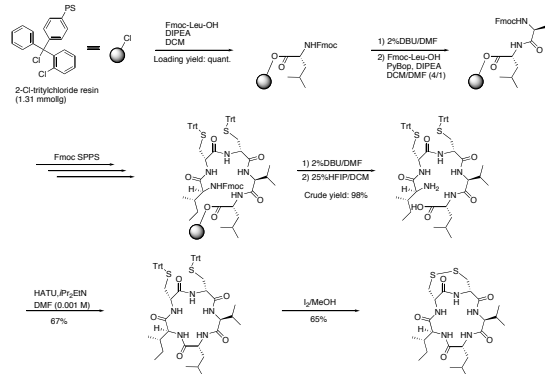


図 1 固相合成による MA<sub>1</sub> 全合成スキーム

### (4) 細胞毒性

細胞毒性は MTT アッセイにより測定。96 穴プレートに  $5 \times 10^4$  cells の U937 細胞と薬剤を添加する。24 時間後、MTT 溶液を添加し、さらに 4 時間反応する。反応後、細胞溶解液を添加し、攪拌溶解後、570 nm の吸光度を測定する。吸光度から細胞生存率を算出し、細胞毒性を計算した。

### (5) 放射性同位体標識体の作成

放射性同位体標識体である [<sup>35</sup>S] 標識 MA<sub>1</sub> は *Aspergillus niger* F7586 株の液体静置培養時に [<sup>35</sup>S] Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加することにより代謝標識を行なった。培養後、溶媒抽出や各種クロマトグラフィーにより精製して、実験に用いた。

### (6) 蛍光標識体の作成

蛍光標識体である 3-LysMA<sub>1</sub>-ローダミンは 3-LysMA<sub>1</sub> と NHS-ローダミンエステルとを pH7.4 で 2 時間反応させ、生成物を HPLC で精製し、実験に用いた。

### (7) MA<sub>1</sub> アフィニティービーズの作成

MA<sub>1</sub> アフィニティービーズである 3-LysMA<sub>1</sub>-アガロースは、3-LysMA<sub>1</sub> と NHS 活性化アガロース担体とを pH7.4 で 2 時間反応後、大過剰の 2-エタノールアミンで処理することによって得た。

### (8) MA<sub>1</sub> 高親和性タンパク質の検出

MA<sub>1</sub> を担持していない対照アガロースまたは 3-LysMA<sub>1</sub>-アガロースを U937 細胞の抽出液と 2 時間反応させ、緩衝液で洗浄。次に、

還元剤が含まれていない SDS-PAGE サンプルバッファーで洗浄後、還元剤含有 SDS-PAGE サンプルバッファーで抽出し、SDS-PAGE で分析した。高親和性タンパク質は銀染色で検出を行なった。

(9) 二次元電気泳動

MA<sub>1</sub> で処理または無処理の U937 細胞の抽出液を作製し、二次元電気泳動で分析した。一次元目は pI 3-10 の IPG ストリップゲルを用い、二次元目は 12.5% アクリルアミド含有 SDS-PAGE ゲルで分離した。タンパク質は銀染色で検出した。MA<sub>1</sub> 処理により変動したタンパク質はペプチドマスフィンガープリンティング法により同定した。

(10) リン酸化キナーゼアレイ

MA<sub>1</sub> で処理または無処理の U937 細胞の抽出液を作製し、リン酸化キナーゼアレイキット (R&D システムズ社) を用いてリン酸化レベルが増減するキナーゼを分析した。

4. 研究成果

(1) 構造活性相関

MA<sub>1</sub> の構造活性相関として *Aspergillus niger* の液体培養液に含まれる天然型マルホルミン同族体の影響を調べた (図 2)。天然型マルホルミン同族体は MA<sub>1</sub> の構成アミノ酸である D-Leu-L-Ile が異なる分枝アミノ酸に置換され、8 種類存在する。活性測定の結果、天然型マルホルミン同族体はいずれも [<sup>125</sup>I] フィブリン分解を促進した。このことは、D-Leu-L-Ile 部分の他の分枝アミノ酸への置換は活性に影響しないことを示している。

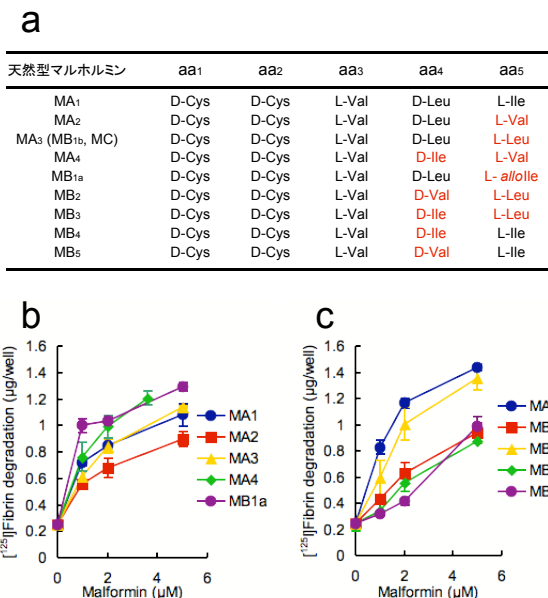


図 2 天然型マルホルミン同族体による [<sup>125</sup>I] フィブリン分解に対する影響

(a) 天然型マルホルミン同族体の構成アミノ酸、(b) マルホルミン A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>、B<sub>1a</sub> による影響、(c) マルホルミン B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub>、B<sub>5</sub> による影響

次に、固相合成ペプチド合成法によって合成した非天然型マルホルミン類縁体の影響を調べた。初めに、MA<sub>1</sub> の分子内ジスルフィド結合を還元したマルホルミン (RedMA<sub>1</sub>) と還元トリチル化マルホルミン (TrtMA<sub>1</sub>) を合成し、[<sup>125</sup>I] フィブリン分解への影響を調べた (図 3)。その結果、いずれの誘導体にも促進活性が見られなかった。これは、MA<sub>1</sub> の活性発現には分子内ジスルフィド結合の存在が重要なことを示している。

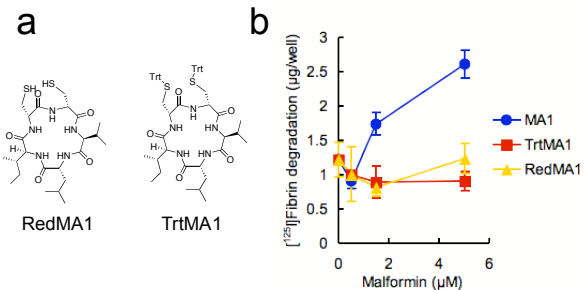


図 3 還元型および還元トリチル型マルホルミンによる [<sup>125</sup>I] フィブリン分解に対する影響

(a) 還元型および還元トリチル型マルホルミンの構造、(b) 還元型および還元トリチル型マルホルミンによる影響

次に、MA<sub>1</sub> のジスルフィド型 D-Cys-D-Cys 部分のみで活性を示すか確認するため、保護化および脱保護化ジスルフィド型 D-Cys-D-Cys (それぞれ、ProCCDS および CCDS) を合成し、活性を調べた (図 4)。その結果、いずれのジペプチドには活性が見られなかった。このことは、ジスルフィド型 D-Cys-D-Cys 部分だけでなく環状ペプチド骨格が活性発現に重要であることを示している。

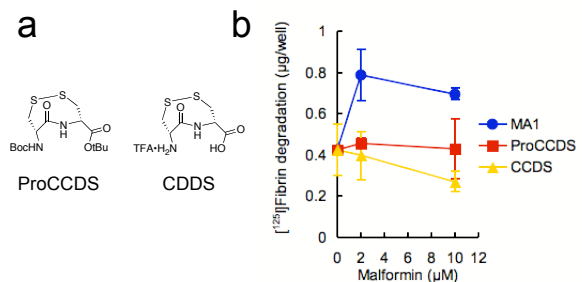


図 4 保護化および脱保護化システインシステインジスルフィド型による [<sup>125</sup>I] フィブリン分解に対する影響

(a) 保護化および脱保護化システインシステインジスルフィド型の構造、(b) 保護化および脱保護化システインシステインジスルフィド型による影響

次に、MA<sub>1</sub> の活性発現に必要なアミノ酸部分を決定するために、MA<sub>1</sub> を構成する L-Val-D-Leu-L-Ile 部分の 1 残基をリジンに置換した 3 種のリジン誘導体の活性評価を行なった (図 5)。いずれのリジン誘導体にも促進活性を見出せなかった。

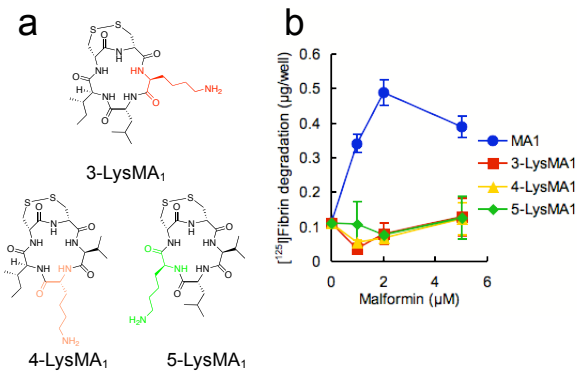


図 5 リジン誘導体による $[^{125}\text{I}]$ フィブリン分解に対する影響  
(a)リジン誘導体の構造、(b)リジン誘導体による影響

上記のリジン誘導体の側鎖  $\epsilon$ -アミノ基を *tert*-ブトキシカルボニル (Boc) 基で保護したリジン誘導体の活性測定の結果 (図 6)、 $[^{125}\text{I}]$ フィブリン分解促進活性がレスキューされた。この結果は、MA<sub>1</sub> の L-Val-D-Leu-L-Ile 部分には疎水性アミノ酸の存在が必須である事を示している。

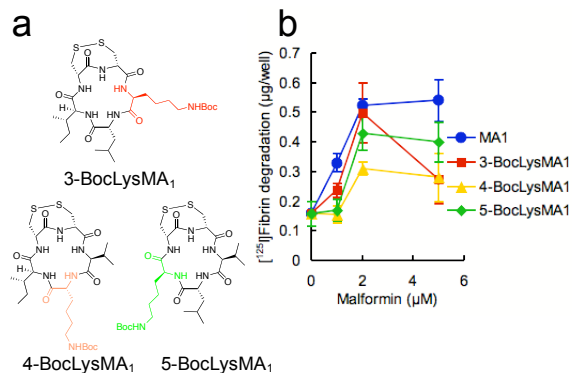


図 6 Boc 化リジン誘導体による $[^{125}\text{I}]$ フィブリン分解に対する影響  
(a)Boc 化リジン誘導体の構造、(b)Boc 化リジン誘導体による影響

さらに、MA<sub>1</sub> の L-Val-D-Leu-L-Ile 部分をフェニルアラニンに置換した3種類のフェニルアラニン誘導体からも促進活性が検出された (図 7)。この結果は、Boc 化リジン誘導体同様、MA<sub>1</sub> 側鎖が疎水性であることが活性発現に重要であることを示している。以上の結果から、MA<sub>1</sub> の活性発現には分子内ジスルフィド結合および疎水性側鎖の存在が重要なこと、さらに $[^{125}\text{I}]$ フィブリン分解促進活性を示す誘導体の活性濃度領域はいずれも 1 - 5  $\mu\text{M}$  で変動が見られないことがわかった。

次に、MA<sub>1</sub> 類縁体の細胞毒性を評価した (図 8)。細胞毒性の強さは、Phe 誘導体 > BocLys 誘導体 > MA<sub>1</sub> >> 還元体 > Lys 誘導体 の順番となり、 $[^{125}\text{I}]$ フィブリン分解促進活性と細胞毒性には相関が観察されなかった。この結

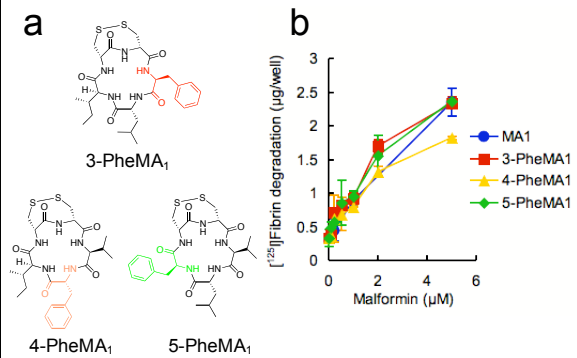


図 7 フェニルアラニン誘導体による $[^{125}\text{I}]$ フィブリン分解に対する影響  
(a)フェニルアラニン誘導体の構造、(b)フェニルアラニン誘導体による影響

果は MA<sub>1</sub> の *in vitro* 血栓溶解促進活性は細胞毒性に依存しておらず、両活性の分割が可能であることを示している。今後、さらなる構造活性相関により毒性の低い MA<sub>1</sub> 誘導体の合成を目指す。

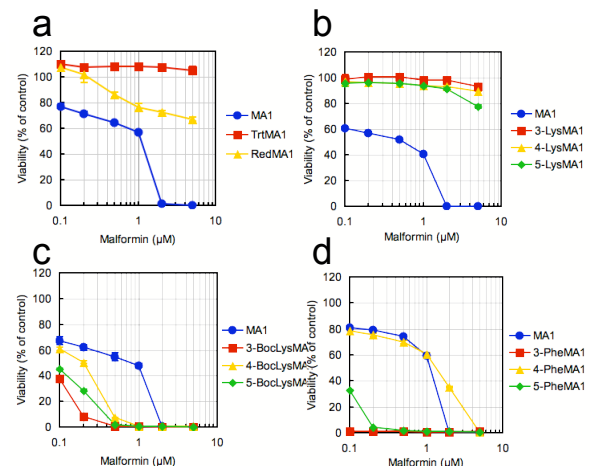


図 8 各種 MA<sub>1</sub> 誘導体による細胞毒性  
(a)還元型および還元トリチル型、(b)リジン誘導体、(c)Boc 化リジン誘導体、(d)フェニルアラニン誘導体

## (2) ケミカルプローブの作成

### ①放射線同位体標識体

放射性同位体標識体である $[^{35}\text{S}]$ 標識 MA<sub>1</sub> は代謝標識により作成した (図 9a,b)。 $[^{35}\text{S}]$ MA<sub>1</sub> を用いて細胞への結合実験を行なったところ、 $[^{35}\text{S}]$ MA<sub>1</sub> を示す放射活性は緩衝液による細胞の洗浄後にも保持されていることがわかった (図 9c)。この結果は、MA<sub>1</sub> の作用標的が細胞にあるという以前の結果と一致している。

### ②蛍光標識体

構造活性相関の結果から、MA<sub>1</sub> の L-Val 部位の側鎖長の変化が比較的活性に対して冗長性を有していることがわかったので、L-Val 部位への導入を行なうことにした。蛍光標識体合成には側鎖に NH<sub>2</sub> 基を有している

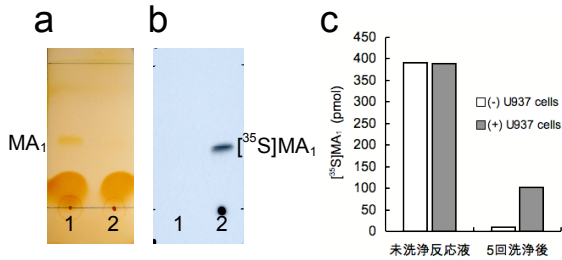


図9 U937細胞による $[^{35}\text{S}]\text{MA}_1$ の保持  
(a)TLC分析の $\text{I}_2$ 検出、(b)(a)のフルオログラフィー、1;  $\text{MA}_1$ 、2;  $[^{35}\text{S}]\text{MA}_1$ 、(c) $[^{35}\text{S}]\text{MA}_1$ のU937細胞への局在

3-Lys $\text{MA}_1$ を用いた。蛍光色素としてN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)-ローダミンを用いて、ローダミン-3-Lys $\text{MA}_1$ を合成した(図10a)。合成した蛍光標識 $\text{MA}_1$ を用いて細胞内局在を調べた結果、核を染色するDAPIとは異なる局在を示した(図10b)。今後、細胞小器官特異的のマーカとの比較によって、蛍光標識 $\text{MA}_1$ の正確な細胞内局在を調べる。

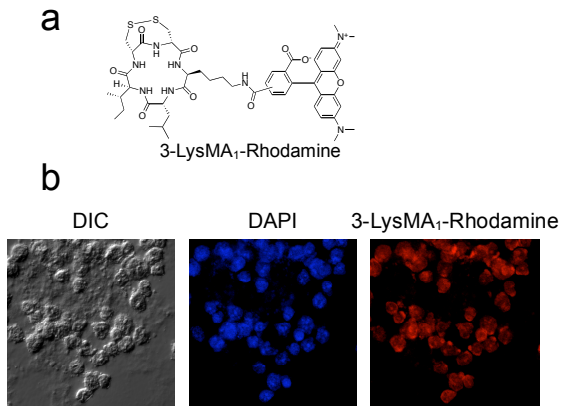


図10 蛍光 $\text{MA}_1$ によるU937細胞の細胞内局在  
(a)蛍光 $\text{MA}_1$ の構造、(b)蛍光 $\text{MA}_1$ の細胞内局在

### ③ $\text{MA}_1$ アフィニティービーズ

次に、 $\text{MA}_1$ 標的分子の同定を行なうことを目的に、 $\text{MA}_1$ アフィニティービーズの作成を行なった。蛍光標識体と同様に、側鎖に $\text{NH}_2$ 基を有している3-Lys $\text{MA}_1$ を用いた。ビーズ部分にはNHS-活性化アガロース担体を用い、3-Lys $\text{MA}_1$ -アガロースを作製した(図11a)。 $\text{MA}_1$ を担持していない対照アガロースとの比較によって、 $\text{MA}_1$ 特異的に抗親和性を示すU937細胞由来のタンパク質の検出を試みた(図11b)。65kDaと22kDaに $\text{MA}_1$ 特異的に検出されるバンドが確認された。今後、これらのタンパク質の同定を進めていく。

### (3) 分子標的の同定

$\text{MA}_1$ の分子標的を同定することを目的に、 $\text{MA}_1$ 処理細胞で起こる細胞内変化を検出する。

#### ①二次元電気泳動

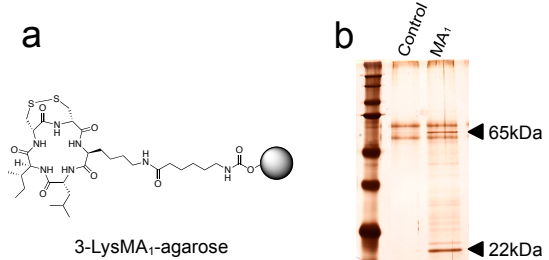


図11  $\text{MA}_1$ アフィニティー担体による $\text{MA}_1$ 抗親和性タンパク質の検出

(a)3-Lys $\text{MA}_1$ -アガロース、(b) $\text{MA}_1$ -アガロース高親和性タンパク質のSDS-PAGE分析

$\text{MA}_1$ と反応したU937細胞の抽出液を調製し、無処理細胞の抽出液との間で増減するタンパク質を二次元電気泳動によって調べた(図12)。その結果、 $\text{MA}_1$ 処理によってHSP27およびnm23-H1のタンパク質量が増加することがわかった。今後、両タンパク質の変動が血栓溶解にどう影響を与えるか調べる。

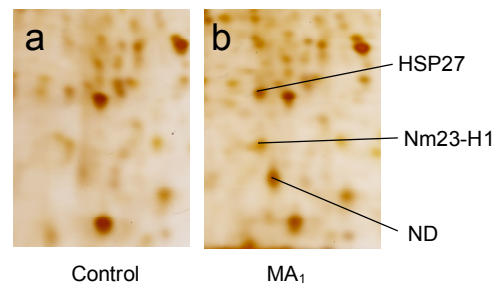


図12  $\text{MA}_1$ 処理によるU937細胞内タンパク質変動  
(a)control、(b) $\text{MA}_1$ 処理細胞、ND; Not detected

#### ②リン酸化キナーゼアレイ

$\text{MA}_1$ と反応したU937細胞のlysateを調製し、無処理細胞のlysateとの間でリン酸化レベルが増減するキナーゼの検出をリン酸化キナーゼアレイによって調べた(図13)。その結果、 $\text{MA}_1$ 処理によってRSK1が2倍、Akt2が1.3倍のリン酸化が上昇した。今後、両タンパク質のリン酸化の変動が血栓溶解にどう影響を与えるか調べていく。

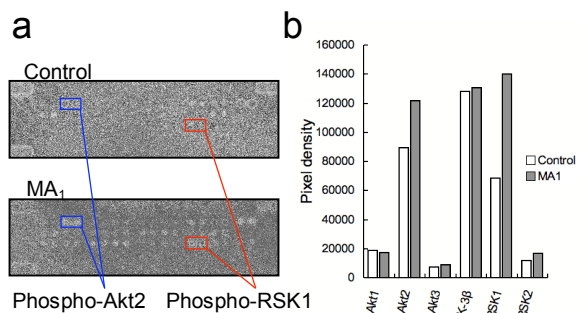


図13  $\text{MA}_1$ 処理によるU937細胞内キナーゼのリン酸化レベルの変動

(a)リン酸化キナーゼアレイ、(b)(a)の数値化データ

## 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7件)

① Koizumi Y, Fukudome H, Hasumi K. Fibrinolytic activation promoted by the cyclopentapeptide malfornin: Involvement of cytoskeletal reorganization. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1426-1431 (2011). 査読有

DOI: 10.1248/bpb.34.1426

② Kuhara M, Wang J, Flores MJ, Zhiwei Q, Koizumi Y, Koyota S, Taniguchi N, Sugiyama T. Sexual dimorphism in LEC rat liver: Suppression of carbonic anhydrase III by copper accumulation during hepatocarcinogenesis. *Biomed. Res.*, **32**, 111-117 (2011). 査読有

DOI: 10.2220/biomedres.32.111

③ Hasegawa T, Kondo Y, Koizumi Y, Sugiyama T, Takeda A, Ito S, Hamada F. A highly sensitive probe detecting low pH area of HeLa cells based on rhodamine B modified beta-cyclodextrins. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6015-6019 (2009). 査読有り

DOI: 10.1016/j.bmc.2009.06.046

④ Iwatsuki M, Koizumi Y, Gouda H, Hirono S, Tomoda H, Omura S. Lys17 in the 'lasso' peptide lariatin A is responsible for anti-mycobacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2888-2890 (2009). 査読有り

DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.03.033

⑤ Wang J, Koyota S, Zhou X, Ueno Y, Ma L, Kawagoe M, Koizumi Y, Okamoto H, Sugiyama T. Expression and localization of regenerating gene I in a rat liver regeneration model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 472-477 (2009). 査読有り

DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.126

⑥ Yanagimoto C, Harada M, Kumemura H, Koga H, Kawaguchi T, Terada K, Hanada S, Taniguchi E, Koizumi Y, Koyota S, Ninomiya H, Ueno K, Sugiyama T, Sata M. Niemann-Pick C1 protein transports copper to the secretory compartment from late endosomes where ATP7B resides. *Exp. Cell Res.*, **315**, 119-126 (2009). 査読有り

DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.10.022

⑦ Koizumi Y, Tomoda H, Kumagai A, Zhou XP, Koyota S, Sugiyama T. Simaomicin  $\alpha$ , a Polycyclic Xanthone, Induces G1 Arrest with Suppression of pRb Phosphorylation. *Cancer Sci.*, **100**, 322-326 (2009). 査読有り

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.01033.x

[学会発表] (計7件)

① 小泉幸央、長井賢一郎、蓮見恵司、小代田宗一、杉山俊博、血栓溶解を促進するマルホ

ルミンの構造活性相関、日本農芸化学会 2010 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都

② 明円 悠、小代田宗一、馬 莉、小泉幸央、杉山俊博、Cosmc 阻害による乳ガン細胞の増殖・転移抑制、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸

③ Ma L, Koyota S, Myoen Y, Koizumi Y, Sugiyama T, Generation and characterization of intracellular single chain fragment variable (scFv) antibodies against ppGalNacTs、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸

④ 小代田宗一、小代田理恵、堀川彩夏、牧野晃大、遊佐和之、小泉幸央、杉山俊博、マウスエナメル芽細胞前駆細胞と象牙芽細胞前駆細胞の共培養による石灰化促進、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸

⑤ 小泉幸央、周 小平、濱田文男、近藤良彦、小代田宗一、杉山俊博、チアカリックス[4]アレーンテトラスルホン酸-Cd(II)錯体による抗腫瘍効果、2010 年 3 月 29 日 日本農芸化学会 2009 年度大会、東京

⑥ 小泉幸央、鄒 暁元、濱田文男、杉山俊博、4',6,7-トリヒドロキシソフラボンによる細胞周期 G1 期停止作用とアポトーシス誘導、日本生化学会東北支部 第 75 回例会・シンポジウム、2009 年 5 月 9 日、仙台

⑦ 熊谷彩子、長岡康夫、小泉幸央、飯田和樹、小代田宗一、上里新一、杉山俊博、ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 に対する緑茶カテキン類の細胞増殖抑制効果、日本薬学会 第 129 年会、2009 年 3 月 28 日、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小泉 幸央 (KOIZUMI YUKIO)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80353465

### (2) 研究分担者

長井 賢一郎 (NAGAI KENICHIRO)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30321649