

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15454

研究課題名(和文) 核酸-タンパク質相互作用を制御するマクロ環含有リガンド群の創製

研究課題名(英文) Generation of macrocyclic molecules regulating DNA-protein interactions

研究代表者

谷藤 涼 (Tanifuji, Ryo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：10866205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNA-中分子-タンパク質の三成分複合体形成を鍵とした転写制御に向け、悪性軟部腫瘍の治療薬として臨床応用されている天然物エクテナサイジン743に着想を得たマクロ環含有中分子群を設計・合成した。合成困難な五環性の天然物母骨格については、生合成酵素SfmCを活用した化学-酵素合成の開発を進めた。8種の基質アナログを合成し、酵素変換を検討したところ、当初予想していた以上の基質許容能を示し、全ての基質アナログが対応する五環性骨格を変換されることを明らかにした。また、設計したマクロ環含有中分子群について、半合成によるマクロ環構造の構築・多様化とコンセプト実証を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で設計・合成した中分子群は、母骨格にてDNAを可逆的にアルキル化しながら、マクロ環とそれに連結したユニットで核内タンパク質とも相互作用が可能と考えられる。各ユニットを多様化した中分子群の構造と活性の相関を取得は、未だ発展途上と言えるDNA-タンパク質間相互作用の選択的制御法の開発に向けた、合理的な分子設計を可能とする。生合成酵素を活用したハイブリッド合成法により、構造の複雑性に起因する供給における課題も解決可能である。

研究成果の概要(英文)：To modulate DNA-protein interactions selectively, novel macrocyclic mid-sized molecules have been designed inspired by natural product ecteinascidin 743 (ET-743) which is clinically utilized as an anticancer agent for soft tissue sarcoma. Integration of organic synthesis with enzymatic conversions enabled rapid access to the pentacyclic core scaffold of ET-743. To explore the utility of biosynthetic enzyme, SfmC, 8 types of substrate variants were synthesized and treated with the enzyme. SfmC has highly wide substrate tolerance and converted all of the substrate analogs to the corresponding unnatural type pentacyclic scaffolds. Designed mid-sized molecules bearing 14-17 membered macrocycles were semi-synthesized from natural product, cyanosafraicin B. All of macrocyclic compounds showed DNA alkylation abilities and potent anti-tumor activities as we expected. Further, fine tuning of macrocyclic structure brought about the significant changes in those activities.

研究分野：天然物化学、有機合成、酵素合成

キーワード：化学-酵素ハイブリッド合成 マクロ環 エクテナサイジン743 中分子 核酸-タンパク質間相互作用

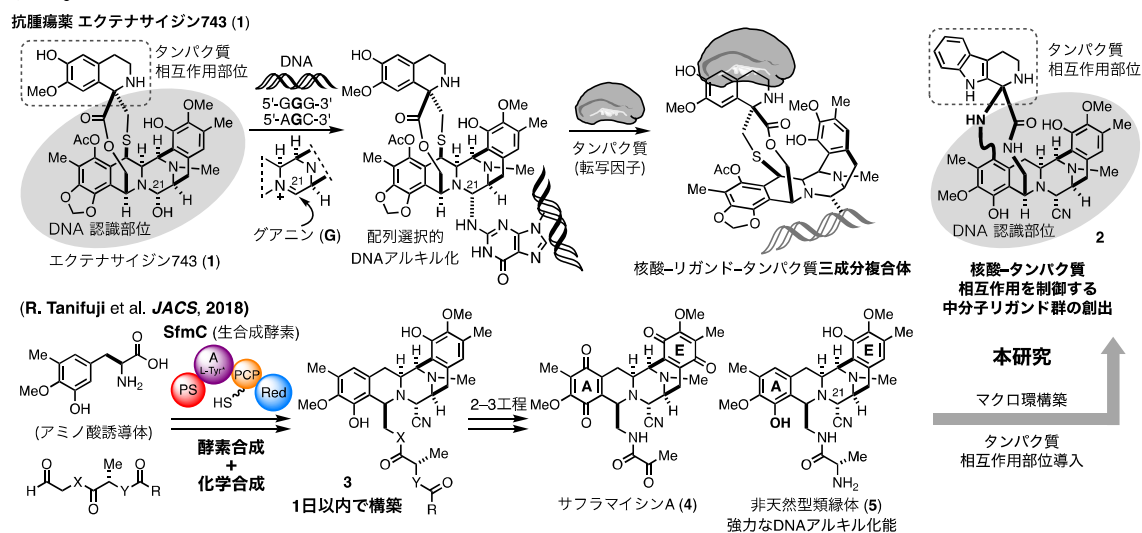
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然物エクテナサイジン 743 (1, 下図) は悪性軟部腫瘍の治療薬である (Yondelis®)。1 は DNA アルキル化を担う五環性母骨格とタンパク質相互作用部位がマクロ環で連結された構造を有する。マクロ環構造の多様化により DNA-タンパク質間相互作用を選択的に制御する中分子群の創製が期待されるが、1 はその構造の複雑さから、合成に多段階変換 (> 20 工程) を要する上に、構造改変部位が限定される。

2. 研究の目的

より簡便かつ迅速 (< 10 工程) に構築可能なマクロ環含有中分子 (2 等) を設計した。本研究では、提案者がこれまでに開発した化学-酵素ハイブリッド合成法によって複雑母骨格 (3-5 等) を迅速に構築しながら、本骨格へマクロ環構造、タンパク質相互作用部位を自在に導入する。この分子群を基盤技術として、核酸-タンパク質間相互作用の中分子による自在制御を実現する。



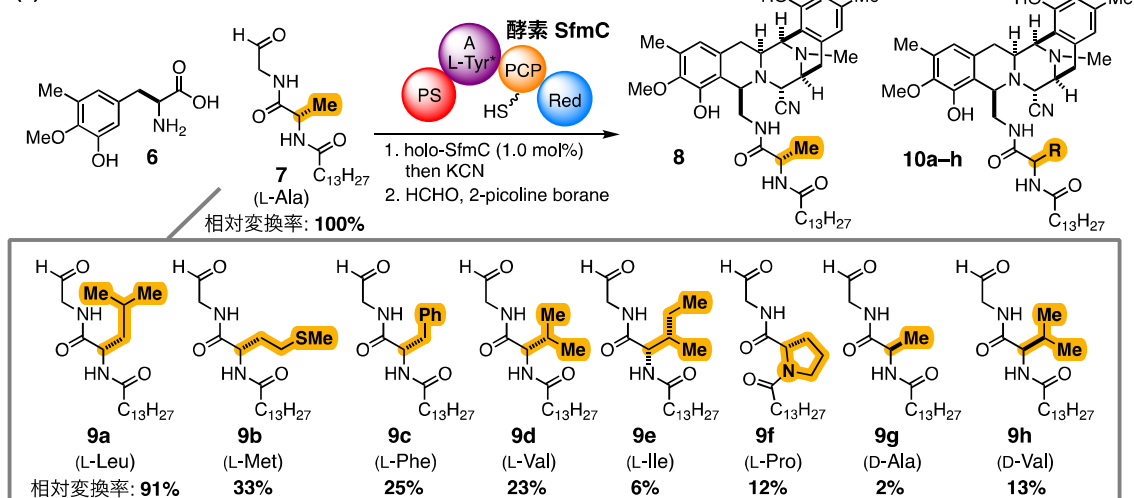
3. 研究の方法

核酸-タンパク質間相互作用を制御する中分子リガンドの創出に向け、(1) テトラヒドロイソキノリン (THIQ) アルカロイド群五環性母骨格構築法の最適化、(2) マクロ環の構築、(3) 核酸との相互作用の評価、(4) タンパク質相互作用部位導入・機能評価を行った。

4. 研究成果

(1) THIQ アルカロイド群五環性母骨格構築法の最適化: 設計した中分子群の核酸アルキル化部位に相当する、五環性母骨格の化学-酵素ハイブリッド合成法の拡充を行なった。生合成酵素 SfmC による酵素変換と続く 2 段階の化学変換により、化学合成基質 6 と 7 から五環性骨格 8 が合成される (下図)。7 の L-アラニン残基を改変した 8 種の基質アナログ 9a-h を合成し、本系に適用した。SfmC は非常に広い基質許容性を示し、全ての基質アナログから対応する五環性骨格 10a-h が得られた。LC 分析における吸光度の面積比から、天然型基質 7 の変換率を 100%

(1) THIQ アルカロイド群五環性母骨格構築法の最適化



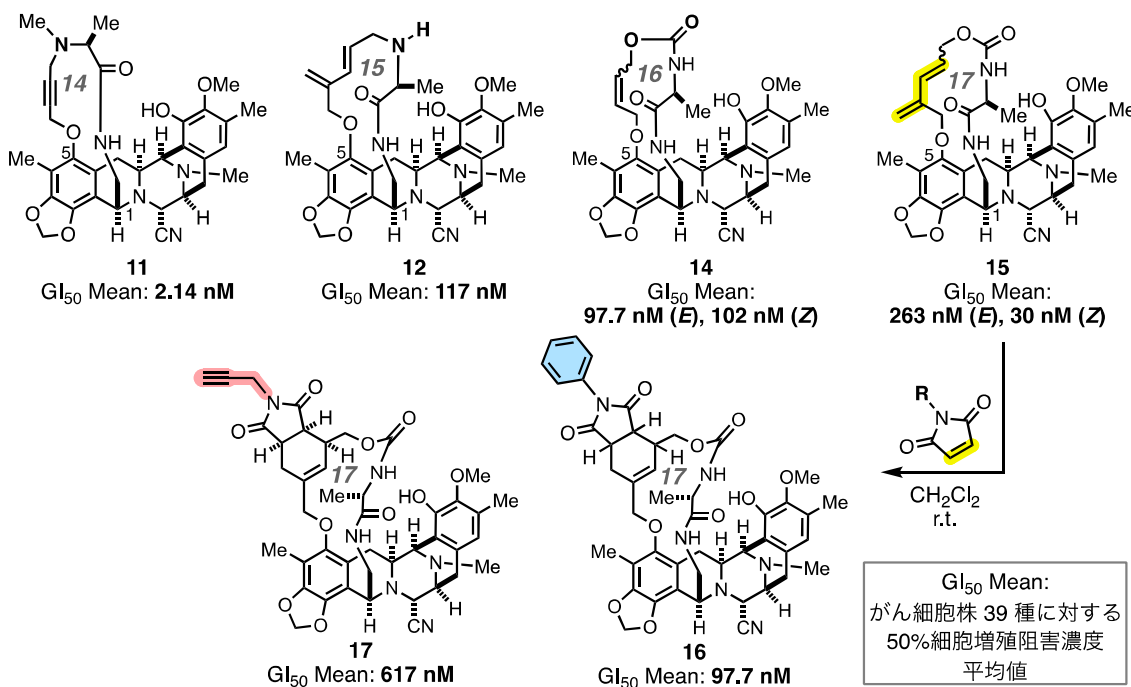
とした相対的な変換効率を算出し、SfmC による酵素変換の基質構造と活性の相関を見出した。

L-メチオニンを導入した **9b** については、1度の反応で 2.2 mg の五環性骨格 **10b** の化学-酵素ハイブリッド合成も達成した。本成果は *Tetrahedron Chem* 誌の創刊号へ詳報として公表した (*Tetrahedron Chem* **2022**, *1*, 100010)。SfmC の類縁酵素 SacC についても同様の検討を進めながら、スケール・効率の向上を進めている。

(2) マクロ環構築、(3) 核酸との相互作用の評価、(4) タンパク質相互作用部位導入・機能評価: 化学-酵素ハイブリッド合成に先駆け、購入可能な天然物シアノサフラシン B から半合成でマクロ環含有中分子群を供給し、コンセプト実証を進めた。14-17 員環を有する中分子群 (**11-17** 等、下図) を合成し、がん細胞に対する強力な増殖阻害活性を確認している。本年度は、17 員環を有する **15** に対し、各種マレイミドを作用させて分子間 Diels-Alder 反応を進行させた。*N*-フェニルマレイミドから得られた **16** は、39 種類のがん細胞株に対する 50%細胞増殖阻害濃度 (GI_{50}) の平均値が 97.7 nM であった。一方、*N*-プロパルギルマレイミドから合成した **17** は 617 nM であり、マクロ環構造の微細な変化により活性を大幅に変調可能であることが示唆された。**17** については X 線結晶構造の取得にも成功し、絶対立体配置の決定に至った。

また、合成したマクロ環含有中分子について、DNA 二重鎖との相互作用能をゲルシフトアッセイにて評価した。GC リッチな配列に対し、配列に依存して DNA をアルキル化することを明らかにした。14 員環を有する **11** が最も強いアルキル化能を発現し、マクロ環のサイズが大きくなるほどアルキル化率が低下したが、17 員環を構築した **15** と比して、修飾を施した **16** がより強い活性を示した。これらの結果から、マクロ環の排除体積が DNA アルキル化に大きく影響することが示唆される。

(2) マクロ環構築、(3) 核酸との相互作用の評価:



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ryo Tanifuji, Naoto Haraguchi, Hiroki Oguri	4. 巻 1
2. 論文標題 Chemo-enzymatic Hybrid Process Enabling the Expeditious Total Syntheses of Jorunnamycin A, Saframycin A, and Their Variants Employing Designed Substrate Analogs for NRPS SfmC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tetrahedron Chem	6. 最初と最後の頁 100010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tchem.2022.100010	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 Ryo Tanifuji, Atsushi Minami, Hiroki Oguri, Hideaki Oikawa	4. 巻 37
2. 論文標題 Total synthesis of alkaloids using both chemical and biochemical methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Product Reports	6. 最初と最後の頁 1098-1121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9np00073a	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryo Tanifuji, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa, Hiroki Oguri
2. 発表標題 Chemo-enzymatic rapid syntheses of tetrahydroisoquinoline alkaloids
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷藤 涼, 大栗 博毅
2. 発表標題 エクテナサイジン類のマクロ環骨格多様化による抗腫瘍性中分子群の創出
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究・学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Tanifuji, Erina Hosono, Hiroki Oguri1
2. 発表標題 Generation of Mid-sized Alkaloidal Scaffolds Exhibiting Potent Anti-cancer Activities: Systematic Diversification of Macrocyclic Framework of Ecteinasidins
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原口 尚人、谷藤 涼、大栗 博毅
2. 発表標題 合成基質群の酵素変換によるサフラマイシン類側鎖の構造多様化
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷藤 涼, 細野 絵里奈, 大栗 博毅
2. 発表標題 エクテナサイジン類のマクロ環骨格多様化による中分子群創出と抗腫瘍活性評価
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細野 絵里奈・谷藤 涼・大栗 博毅
2. 発表標題 シアノサフラシン骨格へのマクロ環構築と機能評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥野 裕仁・谷藤 涼・白石 太郎・浅野 竜太郎・葛山智久・大栗博毅
2. 発表標題 サブライミン型骨格の化学酵素合成と1,2位窒素置換基変化による核酸アルキル化能制御
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高桑 玖留実・谷藤 涼・大栗 博毅
2. 発表標題 テトラヒドロイソキノリン骨格4位への官能基導入法の開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 マクロ環含有新規テトラヒドロイソキノリンアルカロイド化合物	発明者 大栗博毅、谷藤涼	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/008664	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 マクロ環含有新規テトラヒドロイソキノリンアルカロイド化合物	発明者 大栗博毅、谷藤涼	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、52100471383	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------	---------