

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15457

研究課題名（和文）抗がん剤シースとしてのミトコンドリア複合体-I阻害剤の新しい作用機構

研究課題名（英文）Inhibition mechanism of IACS-010759 on mitochondrial respiratory complex I, a potent inhibitor of hypoxic tumor cells

研究代表者

榎谷 貴洋（Masuya, Takahrio）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80803775

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）：固形がん細胞の低酸素応答を指標とした抗がん剤シースの探索により見出された低分子化合物IACS-010759（以下IACS）は、ミトコンドリア呼吸鎖のNADH-キノン酸化還元酵素（複合体-I）を標的とする。本研究ではIACSの詳細な作用機序を調べた。

独自にIACSを合成し、ミトコンドリア複合体-Iに対する影響を調べた結果、既知複合体-I阻害剤とは異なり、IACSは複合体-Iの順反応よりも逆反応に対してより高い阻害活性を示すことがわかった。さらにIACSを鑄型とした光反応性プローブ分子を合成し、複合体-Iにおける標識部位を調べたところ、既知複合体-I阻害剤とは結合部位が異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複合体-Iは電子伝達系の初発酵素として機能する重要な呼吸鎖酵素であり、基質の酸化還元反応に共役してATP合成（酸化的リン酸化）に必須のプロトン駆動力を形成する。複合体-I阻害剤としてロテノンやピエリシジンなどが知られているが、これら既知阻害剤は培養細胞レベルで高い抗腫瘍活性を示すものの、通常細胞に対しても顕著な毒性を示す。一方、IACSは複合体-I阻害剤であるにも関わらず腫瘍細胞選択的に細胞毒性を示すため、新しいタイプの阻害剤である可能性が高い。本化合物の作用機構を明らかにすることは、複合体-Iの基礎研究の進展に貢献するだけでなく、抗がん剤分子の設計戦略に資するところも大きい。

研究成果の概要（英文）：The small molecule IACS-010759 (IACS), found as an anti-cancer drug seed of hypoxic tumor cells, interferes with the functions of NADH-quinone oxidoreductase (complex I) in the mitochondrial respiratory chain. In this study, we investigated the detailed mechanism of action of IACS.

We synthesized IACS and examined its effect on bovine mitochondrial complex I. We found that inhibition by IACS of reverse electron transfer is more efficient than that of the forward reaction, contrary to the other complex I inhibitors. Furthermore, we synthesized a photoreactive IACS probe and examined the labeling site on complex I. The labeling site differed from that of known complex I inhibitors.

研究分野：農芸化学・生物有機化学

キーワード：ミトコンドリア 呼吸鎖複合体-I 抗がん剤分子 低酸素誘導因子 光親和性標識 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

低酸素状態は固形がんの特徴の一つであり、低酸素状態に対する応答は低酸素誘導性遺伝子を調節する低酸素誘導因子 (HIFs) によって媒介される。特に HIF-1 は、腫瘍の発生および進行に重要な役割を果たしていることから、がんの化学療法の重要な標的の一つとされている。2018 年にテキサス州立大学の研究チームにより、固形がん細胞の低酸素応答を指標とした抗がん剤シーズの探索研究によって、IACS-010759 (図 1A、以下 IACS と略記) という低分子化合物が発見された。報告によれば、IACS の標的分子はミトコンドリア呼吸鎖の NADH-キノン酸化還元酵素 (複合体-I、図 1B) であり、複合体-I を阻害することで、酸化的リン酸化に強く依存している脳腫瘍細胞や急性骨髄性白血病細胞における HIF-1 の産生が抑制される。

複合体-I は電子伝達系の初発酵素として機能する重要な呼吸鎖酵素であり、基質の酸化還元反応に共役して ATP 合成 (酸化的リン酸化) に必須のプロトン駆動力を形成する。複合体-I 阻害剤としてはロテノンやピエリシジンなどが知られており、このような典型的複合体-I 阻害剤は、複合体-I のキノン結合ポケットに結合することでキノン還元を阻害すると考えられている。こうした既知の阻害剤は、培養細胞レベルで高い抗腫瘍活性を示すものの、通常細胞に対しても顕著な毒性を示すことから、IACS は腫瘍細胞選択的に細胞毒性を示す新しいタイプの阻害剤である可能性が高い。本化合物の作用機構を明らかにすることは、複合体-I の基礎研究の進展に貢献するだけでなく、抗がん剤分子の設計戦略に資するところも大きい。

2. 研究の目的

IACS が抗がん活性を示す理由として、「固形がん細胞と正常細胞のエネルギー代謝 (酸化的リン酸化と解糖系のバランス) の差」が挙げられている。しかし、これだけでは多様な複合体-I 阻害剤の中で、IACS が正常細胞に対する毒性が低い理由は十分に説明できない。そこで本研究では、IACS と既知阻害剤の作用機序の差異を複合体-I レベルで明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

IACS を合成し、複合体-I の阻害作用について既知阻害剤との差異を精査する。さらに IACS を鋳型とした光反応性プローブ分子を合成し、複合体-I における IACS の結合部位を同定し、既知阻害剤の結合部位との差異を調べる。

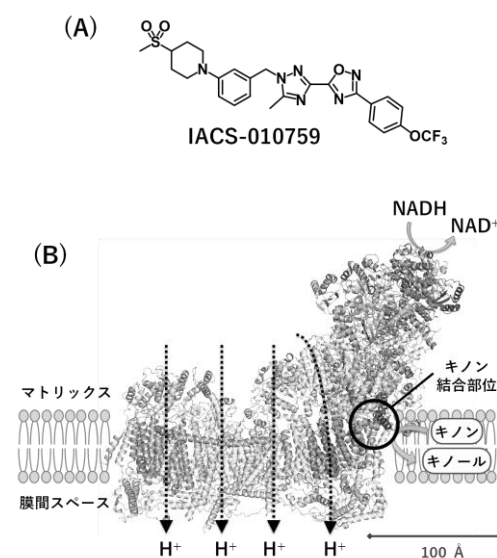


図 1. (A) IACS-010759 の構造 (B) 呼吸鎖複合体-I の構造。

4. 研究成果

(1) IACS の複合体-I 阻害活性

複合体-I は通常の条件下ではキノン還元反応（順反応）を触媒するが、ある特定の条件下ではキノール酸化反応（逆反応）を触媒できる可逆的な酵素である。実験試料としてウシ心筋ミトコンドリアから調製した亜ミトコンドリア粒子（SMPs）を用い、IACS の複合体-I に対する影響を精査したところ、順反応よりも逆反応に対してより高い阻害活性を示すことがわかった（約 10 倍、図 2）。既知阻害剤は順・逆両反応を同程度に阻害することを踏まえると、IACS は既知阻害剤とは異なる作用機序によって複合体-I を阻害していることが示唆された。

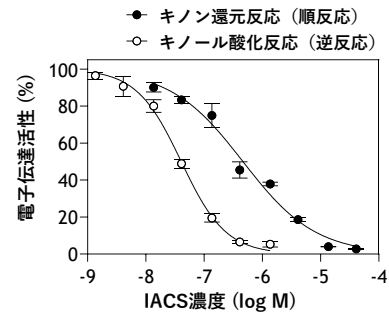


図 2. IACS による順・逆反応の阻害。

(2) キナゾリン型阻害剤^[125I]AzQ に対する IACS の拮抗試験

複合体-I のキノン結合部位に作用する典型的な阻害剤であるキナゾリン型化合物である 6-amino-4-(4-tert-butylphenethylamino)quinazoline (図 3 A、以下 AQ) を鋳型とした光親和性標識プローブ^[125I]AzQ (図 3 A) は、複合体-I のキノン結合ポケットを構成する 49 kDa サブユニットの N 末端領域を特異的に標識する。そこで、^[125I]AzQ による 49 kDa サブユニットの特異的標識を指標として、IACS がキノン結合部位に及ぼす影響を精査した。SMPs 懸濁液に IACS と^[125I]AzQ を加えた後、光照射を行い^[125I]AzQ で SMPs を標識し、各サブユニットを電気泳動により分離し、49 kDa サブユニットの放射活性を比較した。その結果、^[125I]AzQ の 4000 倍量の IACS 加えても、^[125I]AzQ による 49 kDa サブユニット標識を抑制しなかった。キノン結合部位に作用する典型的な阻害剤である AQ や bullatacin は^[125I]AzQ の結合を完全に抑制することから、IACS の結合部位はキノン結合部位に作用する典型的な阻害剤のものとは異なることが強く示唆された。

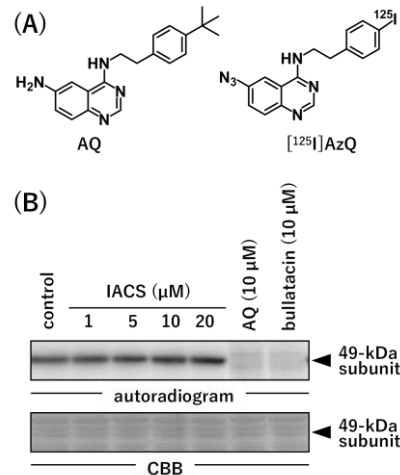


図 3. (A) AQ や^[125I]AzQ の構造。 (B)^[125I]AzQ に対する IACS の拮抗試験

(3) 光反応性 IACS プローブ分子による複合体-I の光親和性標識

IACS の結合部位を調べるために、IACS をテンプレートとしてデザインした光反応性 IACS プローブ分子 (^[125I]IACS-PD1、図 4) を合成した。光反応性基にはトリフルオロメチルジアジリンを採用し、検出基には高感度検出が可能な^{125I}を採用した。複合体-I を^[125I]IACS-PD1 で標識し複合体-I を単離した後、各サブユニット（異なる 45 個のサブユニット）を 2 次元電気泳動 (doubled-SDS-PAGE) により分離し、放射活性を検出することで特異的に標識されるサブユニットを同定した (図 5)。その結果、IACS-PD1 は複合体-I のキノン結合ポケットの入り口を構成する ND1 サブユニットを特異的に標識することがわかった。

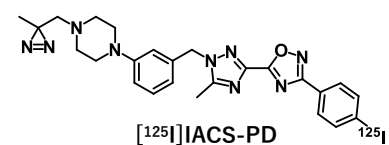


図 4. 光反応性 IACS 類縁体の構造。

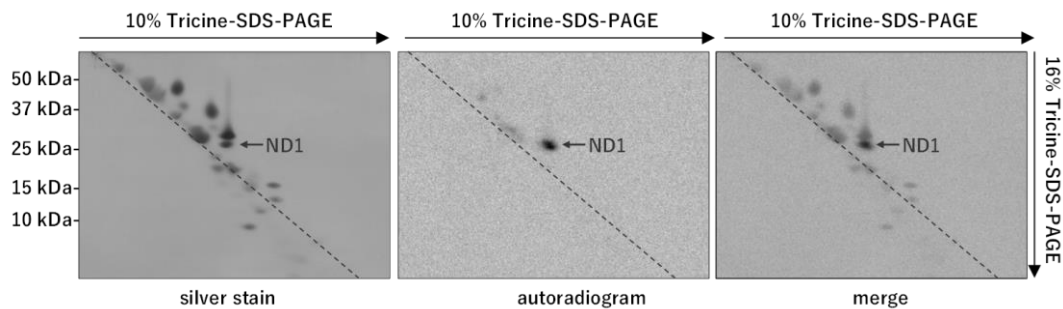


図 5. $[^{125}\text{I}]$ IACS-PD1 の標識サブユニットの同定.

(4) 複合体-I における IACS の詳細な結合部位の同定

$[^{125}\text{I}]$ IACS-PD1 の ND1 サブユニットにおける詳細な標識部位を同定するために、標識した ND1 サブユニットを単離し、Lys-C や Asp-N といったタンパク質消化酵素を用いて限定消化を行い、生成した消化ペプチドを Tricine-SDS-PAGE に供したところ、両者ともに約 15 kDa のバンドに強い放射活性が観察された (図 6A)。これをウシ ND1 サブユニットのペプチド配列と照らし合わせると、Lys-C、Asp-N による最終切断断片はそれぞれ、Tyr127-Lys262 (15.2 kDa)、Asp199-Thr318 (13.8 kDa) に該当すると予想された (図 6B)。以上のことから、 $[^{125}\text{I}]$ IACS-PD1 の ND1 サブユニットにおける結合領域は Asp199-Lys262 であると結論付けた。本標識部位はこれまでに報告のあるアミノキナゾリンなどの既知複合体-I 阻害剤とは結合部位が異なることを示している。

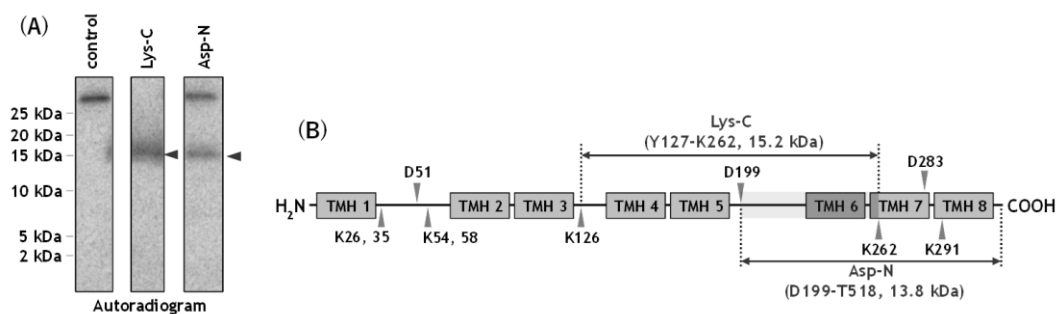


図 6. ND1 サブユニットにおける $[^{125}\text{I}]$ IACS-PD1 の標識部位.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masuya Takahiro, Uno Shinpei, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto	4. 巻 60
2. 論文標題 Pinpoint Dual Chemical Cross-Linking Explores the Structural Dynamics of the Ubiquinone Reaction Site in Mitochondrial Complex I	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 813 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00991	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 Masuya Takahiro, Sano Yuki, Tanaka Hinako, Butler Nicole L., Ito Takeshi, Tosaki Tatsuhiko, Morgan Joel E., Murai Masatoshi, Barquera Blanca, Miyoshi Hideto	4. 巻 295
2. 論文標題 Inhibitors of a Na ⁺ -pumping NADH-ubiquinone oxidoreductase play multiple roles to block enzyme function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12739 ~ 12754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra120.014229	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 該当する
1. 著者名 Tsuji Atsuhito, Akao Takumi, Masuya Takahiro, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto	4. 巻 295
2. 論文標題 IACS-010759, a potent inhibitor of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells, inhibits mitochondrial respiratory complex I through a unique mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7481 ~ 7491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra120.013366	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 Uno Shinpei, Masuya Takahiro, Shinzawa-Itoh Kyoko, Lasham Jonathan, Haapanen Outi, Shiba Tomoo, Inaoka Daniel Ken, Sharma Vivek, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto	4. 巻 295
2. 論文標題 Oversized ubiquinones as molecular probes for structural dynamics of the ubiquinone reaction site in mitochondrial respiratory complex I	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2449 ~ 2463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.ra119.012347	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 Asai Shihori, Tsunematsu Yuta, Masuya Takahiro, Otaka Junnosuke, Osada Hiroyuki, Watanabe Kenji	4. 巻 73
2. 論文標題 Uncovering hidden sesquiterpene biosynthetic pathway through expression boost area-mediated productivity enhancement in basidiomycete	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 721 ~ 728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-0355-9	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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 榎谷 貴洋、宇野 晋平、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 呼吸鎖複合体-Iユビキノン結合部位の構造解明に向けたサブユニット間クロスリンク
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 萌、田中 比奈子、榎谷 貴洋、村井 正俊、BARQUERA Blanca、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素のNqrB サブユニットの位置特異的的化学修飾法の確立
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井正俊、辻諄人、赤尾拓海、榎谷貴洋、三芳秀人
2. 発表標題 抗がん剤候補化合物IACS-010759の呼吸鎖複合体-I に対する作用機構研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇野 晋平、榎谷 貴洋、新澤-伊藤 恭子、志波 智生、稲岡 健 ダニエル、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いた複合体-Iのキノン結合ポケットの構造特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 運天 優歩、村井 正俊、坂井 克行、浅見 行弘、榎谷 貴洋、三芳 秀人
2. 発表標題 出芽酵母ミトコンドリアを標的とする天然テトラミン酸誘導体Fusaraminの作用機構研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永岡 千草、村井 正俊、榎谷 貴洋、三芳 秀人
2. 発表標題 ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iを阻害するManassantinの作用機構研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 萌、榎谷 貴洋、田中 比奈子、村井 正俊、BARQUERA Blanca、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素のNqrB サブユニットの位置特異的修飾法の確立
3. 学会等名 第46回日本農薬学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇野 晋平、榎谷 貴洋、新澤-伊藤 恭子、志波 智生、稲岡 健 ダニエル、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いた呼吸鎖複合体-Iのキノン結合ポケットの構造特性の解明
3. 学会等名 第46回日本農薬学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎谷 貴洋、宇野 晋平、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 呼吸鎖複合体-Iユビキノン結合部位の構造解明に向けたサブユニット間クロスリンク
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第46回討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻 諄人、赤尾 拓海、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 抗がん剤候補化合物IACS-010759のミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iにおける作用機構
3. 学会等名 第45回日本農薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎谷 貴洋、佐野 裕樹、田中 比奈子、伊藤 剛、BARQUERA Blanca、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤コロルミシンの結合部位の同定
3. 学会等名 第45回日本農薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇野 晋平、榎谷 貴洋、新澤-伊藤 恭子、志波 智生、稲岡 健 ダニエル、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iのキノン結合ポケットの構造特性の解明
3. 学会等名 第45回日本農薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻 諒人、赤尾 拓海、榎谷 貴洋、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 抗がん剤候補化合物IACS-010759のミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iにおける作用機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇野 晋平、榎谷 貴洋、新澤-伊藤 恭子、志波 智生、稲岡 健 ダニエル、村井 正俊、三芳 秀人
2. 発表標題 人工キノン類を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iのキノン結合ポケットの構造特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 萌、榎谷 貴洋、村井 正俊、BARQUERA Blanca、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送型NADH-キノン酸化還元酵素の特異的修飾法の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野 裕樹、榎谷 貴洋、村井 正俊、BARQUERA Blanca、三芳 秀人
2. 発表標題 コレラ菌Na ⁺ 輸送性NADH-キノン酸化還元酵素の阻害剤オーラシンの結合部位の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室ホームページ http://www.biofunc-chem.kais.kyoto-u.ac.jp Researchmap https://researchmap.jp/t_masuya/?lang=japanese Google Scholar https://scholar.google.co.jp/citations?user=AyNAzrUAAAAJ&hl=ja

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