

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390026

研究課題名(和文)天然物・生物有機化学を基盤とする創薬標的タンパク質同定効率化法の開拓と応用展開

研究課題名(英文)Development and application of efficient identification method for drugable proteins based on natural products and bioorganic chemistries

研究代表者

宍戸 宏造 (SHISHIDO, Kozo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：20006349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍活性を持つ海洋産天然物であるアスパーギライドA, B, Cの両エナンチオマーを新しい方法論に基づき効率的に合成する方法の確立に成功し、併せて広範な類縁体の合成を可能にした。この知見を基に新たな高活性分子の探索を行なった結果、天然物を凌ぐ活性を持つ分子を見出すことができた。さらに、新規抗ガン剤の創製をめざし、標的タンパク質の同定に有効な新しい方法論の開発を検討した。その結果、標的タンパク質捕捉のための投げ縄分子(リアット分子)の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Novel and highly efficient methodology for the synthesis of marine-derived natural products aspergillides A, B and C with antitumor activity was developed. It can also be applied to the synthesis of a wide variety of related compounds and we were able to have a unique compounds library, from which a new molecule with higher biological activity than the natural products was obtained. In addition, a lariat molecule that enables enrichment and selective labeling of target proteins of the bioactive compounds for efficient identification of the target proteins was successfully invented.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：天然物 不斉合成 創薬 標的タンパク ケミカルバイオロジー ペイト分子 プルダウン法 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

本研究は、天然物合成化学、特に生物活性微量天然物の全合成研究を推進している宍戸（研究代表者）が、在籍している徳島大学薬学部で発見された3種の海洋産抗腫瘍活性天然物アスパーギライド A, B, C の全合成を完成させたことに端を発する。これら天然物は、これまでに類例を見ない新規な炭素基本骨格と抗腫瘍活性を有することから、新たな創薬シーズとしての可能性を秘めている。そこで、天然物合成化学分野と生物有機化学分野の大高（分担者）との密な連携により、ケミカルバイオロジーの手段を駆使し、ターゲットタンパク質の捕捉法の開発を行ない、さらに、細胞生物学分野の伊藤（分担者）の協力を得て創薬リード化合物のターゲット探索へと応用展開したいと考えた。

2. 研究の目的

生物活性天然物、小分子有機化合物等の作用標的に迫る Forward Chemical Genetics において、標的タンパク質の同定は極めて重要な課題である。本研究ではこの課題に、標的の同定のために汎用されるプルダウン法の効率化に有機化学的側面から取り組み、さらに応用展開を図ることを目的とする。

- (1) 抗腫瘍活性を有するアスパーギライド A, B, C の高効率化学合成法の確立を目指す。特に、活性評価とケミカルバイオロジー研究への展開を考慮し、両エナンチオマーを効率的に合成でき、且つ多様な誘導体合成が可能なルートの探索を行なう。
- (2) ターゲットタンパク質のアビジンビーズを用いた濃縮、ビーズからの効率的溶出、および化学的直交性の高い反応を利用した溶出ターゲットタンパク質のタグ分子による修飾（効率的溶出と化学選択的修飾）を可能にする、ターゲットタンパク質捕捉のための投げ縄分子（ラリアット分子）を設計、創製する。
- (3) アスパーギライド骨格中に光親和性標

識部位とクリック反応部位を含むミミック分子を合成し、そのヒト白血病細胞等のがん細胞株に対する細胞毒性やアポトーシス誘導活性を評価する。さらにラリアット分子を用い、細胞内のアスパーギライド標的タンパク質を分離、同定し機能解析を行なう。

3. 研究の方法

- (1) 対象天然物として選択した3種のアスパーギライド類の高効率合成ルートの探索を行なった。ルート開拓のポイントとなる渡環型オキシマイケル反応の触媒化をめざし検討を行なう。さらに、多様な類縁体を効率良く得るため、合成工程の短縮と各工程の収率向上をめざす。
- (2) 外部刺激応答型アミド結合切断機能を有する人工アミノ酸を利用し、アビジンビーズからの効率的溶出と、引き続き化学選択的修飾を可能とするターゲットタンパク質捕捉用ラリアット分子の設計と合成を行う。続いて、本ラリアット分子をモデルタンパク質の捕捉、濃縮および選択的ラベル化に適用し、その有用性についてまず検証を行う。
- (3) 宍戸グループが合成するアスパーギライド A, B 及び C、また大高らが合成する光親和性標識とクリック反応部位を併せもつアスパーギライド A, B 及び C 誘導体の、ヒト白血病細胞等のがん細胞株に対する細胞毒性やアポトーシス誘導活性をセルファンクションイメージャーにより評価する。さらにこれら化合物を用いて細胞内標的タンパク質を標識し、大高グループが合成するラリアット分子を用いて濃縮する。その後、電気泳動法により分離しゲル内消化を行い、得られるペプチド断片を Q-TOF-MS/MS を用いるプロテオミクス的手法により同定する。さらに同定されたタンパクの生物機能からアスパーギライドの作用機構を解明する。

4. 研究成果

- (1) 3種のアスパーギライドの高効率エナ

ンチオ制御合成法を確立することができた。本合成法は、両エナンチオマーの合成を可能にするものであり、工程数の短縮と総収率の大幅な向上も併せて達成した。特に、宍戸グループが独自に開発した本合成の鍵となる「渡環型オキシマイケル反応」の触媒化に成功したことは特筆に値する。極めて効率性の高いルート開発が達成できたことから、多様な類縁体合成が可能になり、「質の高い独創的な化合物ライブラリー」を構築できたことも大きな成果である。この合成研究は、国内外で高い評価を受けており、ケミカルバイオロジー研究の基盤となる重要な成果を挙げることができた(図1)。



図1 アスパーギライド類の構造

(2) ラリアット分子の設計および合成に成功するとともに、タンパク質混合物中に含まれるターゲットタンパク質の濃縮および選択的ラベル化を達成した。さらに、ラリアット分子の鍵骨格である刺激応答型アミノ酸の保護基を変えるのみで、任意の刺激でのタンパク質溶出が可能であることを実証した。これら成果は生物系研究者の間でも高い関心を集めており、例えば現在、依頼を受け生物系書籍に本ラリアット分子の解説記事を執筆しているところである。

(3) 高効率新規合成法により全合成された3種のアスパーギライドのうち、アスパーギライドCがヒトがん細胞株に対し細胞増殖抑制及びアポトーシス誘導作用を示すことを世界初で明らかにし、さらに構造活性相関研究から活性発現に必要な化学構造を解明した(図2)。

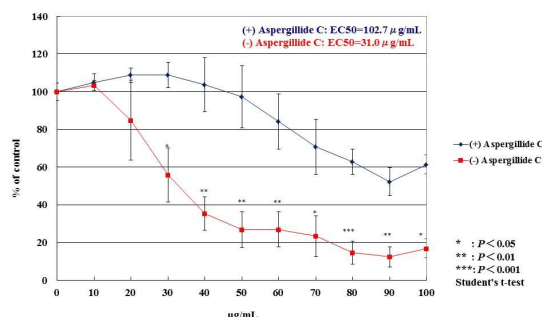


図2 ヒト大腸がん細胞株HCT116に対するアスパーギライドC(-)の細胞傷害性

またアスパーギライドCをがん細胞株の培養液に添加し、細胞形態のタイムラプス観察を行ったところ、初期には細胞間接着制御に基づく増殖抑制効果が現れ、後期にはアポトーシスが誘導された。さらに大高らが合成したラリアット分子を用い、アスパーギライドC誘導体と特異的に結合する細胞内ターゲットタンパクをプロテオミクスの手法により解析した結果、細胞接着及びアポトーシス関連分子が候補分子として同定された。今後は、アスパーギライドCをシードとし、抗ガン剤としての選択性とアポトーシス誘導の増強作用を指標にしたリード化合物の合成展開につなげていく。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計46件)

- 1 J. Yamamoto, N. Maeda, C. Komiya, T. Tanaka, M. Denda, K. Ebisuno, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otaka, Development of a fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker, *Tetrahedron* (査読有)印刷中, 2014. DOI:10.1016/j.tet.2014.05.110
- 2 J. Yamamoto, M. Denda, N. Maeda, M. Kita, C. Komiya, T. Tanaka, W. Nomura, H. Tamamura, Y. Sato, A. Yamauchi, A. Shigenaga, A. Otaka, Development of a traceable linker containing a thiol-responsive amino acid for the

- enrichment and selective labelling of target proteins, *Org. Biomol. Chem.* (査読有) vol. 12, 2014, pp. 3821-3826. DOI: 10.1039/C4OB00622D
- 3 K. Shishido, Stereocontrolled total synthesis of natural products with characteristic molecular structures and biological activities, *Chem. Pharm. Bull.* (査読有) vol. 61, 2013, pp.781-798. DOI:10.1248/cpb.c13-00417
- 4 K. Sato, A. Shigenaga, K. Kitakaze, K. Sakamoto, D. Tsuji, K. Itoh, A. Otaka, Chemical synthesis of biologically active monoglycosylated GM2-activator protein analog using N-sulfanylethylanilide peptide, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読有) vol. 52, 2013, pp. 7855-7859. DOI:10.1002/anie.201303390
- 5 M.M. Rahman, S. Kitao, D. Tsuji, K. Suzuki, K. Matsuoka, F. Matsuzawa, S. Aikawa, K. Itoh, Inhibitory effects and specificity of synthetic sialyldendrimers toward recombinant human cytosolic sialidase 2 (NEU2), *Glycobiol.* (査読有) vol.23, 2013, pp.495-504. DOI:10.1093/glycob/cws221
- 6 Y. Kikuchi, N. Yamazaki, N. Tarashima, K. Furukawa, Y. Takiguchi, K. Itoh and N. Minakawa, Gene suppression via U1 small nuclear RNA interference (U1i) machinery using oligonucleotides containing 2'-modified-4'-thionucleosides, *Bioorg. Med. Chem.* (査読有) vol.21, 2013, pp.5292-5296. DOI:10.1016/j.bmc.2013.06.023
- 7 T. Harada, S. Ozaki, A. Oda, D. Tsuji, A. Ikegame, M. Iwasa, K. Udaka, S. Fujii, S. Nakamura, H. Miki, K. Kagawa, Y. Kuroda, S. Kawai, K. Itoh, H. Yamada-Okabe, T. Matsumoto, M. Abe, Combination with a defucosylated anti-HM1.24 monoclonal antibody plus lenalidomide induces marked ADCC against myeloma cells and their progenitors, *PLoS One.* (査読有) vol.26;8(12), 2013, e83905. DOI:10.1371/journal.pone.0083905
- 8 M. Kanematsu, K. Shishido, Total synthesis of aspergillides using a transannular oxy-Michael strategy, *J. Synth. Org. Chem. Japan* (査読有) vol. 70, 2012, pp. 1196-1205. DOI:10.5059/yukigoseikyokaishi.70.1196
- 9 H. Kobayashi, M. Kanematsu, M. Yoshida, K. Shishido, Efficient access to a dihydropyran containing macrolide via a transannular oxy-Michael reaction: total synthesis of (+)-aspergillide C, *Chem. Commun.* (査読有) vol. 47, 2011, pp. 7440-7442. DOI:10.1039/C1CC12114F
- 10 M. Kanematsu, M. Yoshida, K. Shishido, Total synthesis of the aspergillides A and B based on the transannular oxy-Michael reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読有) vol. 50, 2011, pp. 2618-2620. DOI:10.1002/anie.201007327
- [学会発表](計 138 件)
- 1 伊藤孝司、ネオバイオロジクスの創製とリソソーム病治療薬開発へのアプローチ、第 5 回全国共同利用・共同開発「酵素学研究拠点」シンポジウム、2013 年 11 月 23 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)
- 2 穴戸宏造、生物活性アルカロイドの合成

研究、第 31 回メディシナルケミストリー
シンポジウム、2013 年 11 月 21 日、アス
テルプラザ（広島県）

- 3 山本 純（大高 章） Development of
thiol-responsive traceable linker for
efficient enrichment and selective
labeling of target proteins、4th
Asia-Pacific International Peptide
Symposium、50th Japanese Peptide
Symposium、2013 年 11 月 7 日、ホテル阪
急エキスポパーク（大阪府）
- 4 井上敦詞（宍戸宏造） (+)-アスペルマイ
チン A の全合成、第 10 回次世代を担う
有機合成化学シンポジウム、2012 年 5 月
11 日、大阪大学銀杏会館（大阪府）
- 5 小林久剛（宍戸宏造） (+)-アスパーギラ
イド C の全合成、第 100 回有機合成シン
ポジウム、2011 年 11 月 10 日、早稲田大
学国際会議場（東京都）

〔図書〕(計 1 件)

1. 重永 章、山本 純、大高 章、刺激応
答型アミノ酸の開発と生命科学分野への
応用、遺伝子医学 MOOK 21 号 最新ペプ
チド合成技術とその創薬研究への応用
(木曾良明 編)、メディカルドゥ、2012、
309 (168-172) .

〔その他〕

ホームページ等

大高研ウェブサイト：

[http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty
/labo/otaka/](http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/otaka/)

伊藤研ウェブサイト：

[http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty
/labo/btc/](http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/btc/)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宍戸宏造 (SHISHIDO, Kozo)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・非常勤講師

研究者番号：20006349

(2)研究分担者

大高 章 (OTAKA, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：20201973

伊藤孝司 (ITO, Kohji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：00184656

(3)連携研究者

重永 章 (SHIGENAGA, Akira)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師

研究者番号：10423394

辻 大輔 (TSUJI, Daisuke)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00423400