

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510278

研究課題名(和文) アスパラギン合成酵素阻害剤を基盤とした医薬品探索

研究課題名(英文) Drug design based on asparagine synthetase inhibitors

研究代表者

平竹 潤 (Hiratake, Jun)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80199075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトアスパラギン合成酵素(hAS)は、急性リンパ性白血病のアスパラギナーゼ療法において、再発や薬剤耐性を引き起こす原因酵素として注目されている。本研究は、hASを特異的に阻害することで、薬剤耐性を獲得した急性リンパ性白血病細胞に対して有効な新しい化学療法剤を開発することを目的としたものである。hASの反応機構にもとづき、その遷移状態アナログとなるN-adenosylsulfoximine およびその誘導体を合成した。その結果、hASを時間依存的に強力に阻害する化合物を得ることに成功し($K_i^* = 7.6$ nM)、アスパラギナーゼ耐性の白血病細胞に細胞死を引き起こすことを、世界で初めて示した。

研究成果の概要(英文)：Human asparagine synthetase (hAS) is responsible for leukemia cells to acquire a resistant phenotype for asparaginase, a currently well-adopted chemotherapy to treat acute lymphoblastic leukemia (ALL). The purpose of this study is to design, synthesis and evaluation of novel and potent inhibitors of hAS for developing a new drug lead for asparaginase-resistant leukemia. According to the catalytic mechanism of hAS, we have developed a series of N-adenosylsulfoximines as transition-state analogue inhibitors of hAS. The N-adenosylsulfoximines were found to inhibit hAS strongly in a time-dependent manner with an overall inhibition constant (K_i^*) of 7.6 nM. Interestingly, the N-adenosylsulfoximine caused cell death as well as inhibition of cell proliferation of asparaginase-resistant leukemia cells. Thus we have shown that hAS is a highly promising target for anti-leukemia chemotherapy in the current clinical settings and that the N-adenosylsulfoximines serves as a promising drug lead.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ヒトアスパラギン合成酵素 遷移状態アナログ阻害剤 急性リンパ性白血病 化学療法 アシルアデニル酸中間体 アデノシンミミック

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類のアスパラギン合成酵素(AS)は、L-Gln を加水分解して得たアンモニアとアスパラギン酸より、アスパラギンを合成するATP 依存性合成酵素である。その反応機構は、アスパラギン酸と ATP を反応させ活性なアシルアデニル酸中間体を生成すると同時に、グルタミンアーゼドメインで L-Gln を加水分解して得たアンモニアを導き、反応中間体と反応させ、四面体型遷移状態を経てアスパラギンを生成する。

(2) ヒト AS (hAS) はガン化学療法と深い関わりがある。急性リンパ性白血病 (ALL)では、血中のアスパラギンを枯渇させることによりガン細胞の増殖を阻止するアスパラギナーゼ療法が 1970 年代から広く行われているが、本療法の適用には、ガン細胞のアスパラギン合成活性が低いこと、アスパラギナーゼ耐性を獲得したガン細胞が一定の割合で発生し、再発が起こるなどの問題がある。

(3) ALL のアスパラギナーゼ耐性獲得機構として、hAS の高発現によってアスパラギン合成能が亢進することが、さまざまな研究により示されている。

(4) ALL だけでなく、固形ガンや多剤耐性のガン細胞株に対しても、hAS 活性をバイオマーカーに、アスパラギナーゼ療法が適用できる可能性があり、他の細胞障害性の抗ガン剤とは異なり副作用の少ない作用機作をもつアスパラギナーゼ療法をガン化学療法に積極的に導入していこうという医療現場のニーズは高い。

(5) 本研究者らは、hAS と同様の反応機構をもつ ATP 依存性リガーゼについて、その中間体あるいは遷移状態アナログとなる化合物をもとに、強力な阻害剤を開発することに成功してきた。AS についても、四面体型のスルホキシミンが遷移状態アナログとして機能することを見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、hAS の反応機構にもとづき、その遷移状態アナログとなる化合物の分子設計により、hAS を特異的かつ強力に阻害する化合物を開発し、アスパラギナーゼ耐性の ALL 細胞に対する効果を検証し、新しい ALL 治療薬のリードとなる化合物を開発することにある。これまでの研究をふまえ、*N*-ホスホリルスルホキシミン構造を、阻害剤の活性構造 (pharmacophore) と捉え、それ以外の親水性官能基を中心に、細胞膜透過性や体内移行性を考慮した系統的な構造変換を行い、細胞および組織レベルで有効な hAS 阻害剤 (医薬シード) を開発する。これにより、アスパラギナーゼ療法に対応した実用的な hAS 阻害剤開発のための基盤を構築する。

3. 研究の方法 および

4. 研究成果

これまでの研究により、ヒトアスパラギン合成酵素 (hAS) は、保存されたりジン残基 (hAS の Lys449, *E. coli* AS-B では Lys466) を有し、この静電的相互作用により反応中間体および遷移状態アナログ阻害剤 1 のアデノシン部分の 5'-リン酸基の負電荷を厳密に認識することが判明した。そこで、5'-リン酸基を含むアデノシン部分の構造を保持しながら、細胞透過性やバイオアベイラビリティを向上させるため、親水性官能基である -カルボキシ基および -アミノ基を除去したアデニル化スルホキシミン 5 および 6 を合成した (Figure II-1)。これらの化合物の阻害活性を測定することにより、hAS の認識における -カルボキシ基および -アミノ基の相対的寄与が明らかになると同時に、分子全体の正味の電荷が、バイオアベイラビリティや細胞レベルでの活性に及ぼす影響を見積もることができる。

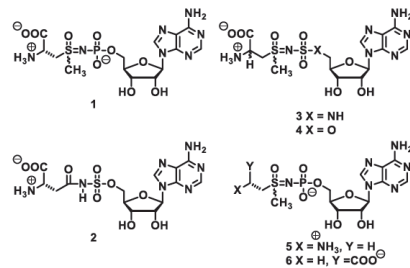
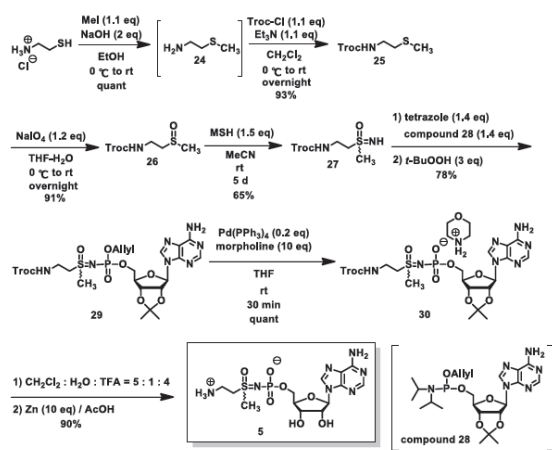


Figure II-1. Chemical structures of the adenylylated sulfoximine derivative 1 and the acylsulfamate 2, sulfonamide 3, sulfamate 4, which are inhibitors of hASNS, together with the target sulfoximine derivatives 5 and 6.

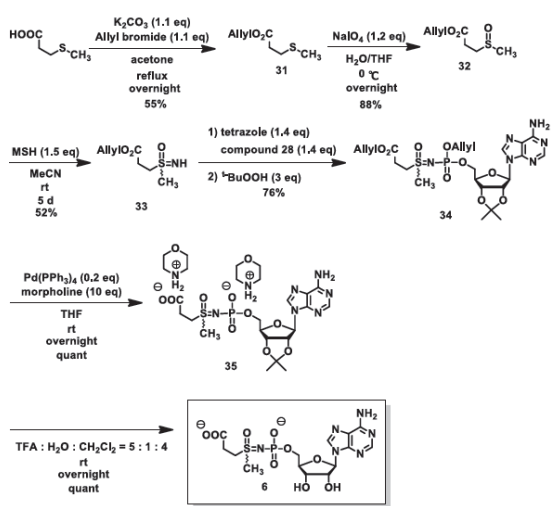
合成. アデニル化スルホキシミン 5 および 6 は、別途合成したスルホキシミン 27 および 33 の S=NH 窒素をアデノシルリン酸化することで合成した (Schemes II-1, 2)。スルホキシミン 27 および 33 は、それぞれ対応するスルホキシド 26 および 32 より *O*-mesitylsulfonylhydroxylamine (MSH) を用いてイミノ化することで合成した。次いで、5'-アデノシルオキシホスフィン 28 を用いたホスホロアミダイト法によって、スルホキシミン 27 および 33 の *N*-アデニル化を行った。酸触媒 tetrazole の存在下、無水条件下でカップリングを行い、引き続いて酸化反応を行うことで、アデニル化スルホキシミン 29 および 34 を良好な収率で得た。スルホキシミン窒素 (S=N) とリン酸基との P-N 結合は、通常ホスホンアミドと異なり、酸性条件下でも加水分解せず安定であった。これは、スルホキシミン窒素の塩基性が低く、プロトン化を受けにくいことによるものと思われる。

アミノ基、カルボキシ基、リボース水酸基の保護基を順次除去することで、目的化合物

4 および 5 を高収率で得た。化合物 4 および 5 ならびに、その前駆体 30 および 35 は、キラルなイオウ原子に由来する立体異性体が存在する。そのジアステレオマーの分離を試みたが、いずれも成功しなかったため、目的化合物 4 および 5 は、1 : 1 のジアステレオマー混合物のまま hAS に対する阻害活性を測定することにした。



Scheme II-1. Synthetic route for compound 5



Scheme II-2. Synthetic route for compound 6

酵素アッセイ. 化合物 5 および 6 の hAS に対する酵素阻害アッセイは、定常状態速度論的方法により行った。C 末端に His₆ タグを結合した野性型組換え hAS を昆虫細胞 *Sf9* 発現系で発現させ、Ni キレーターカラムで精製した。hAS を ATP (0.5 mM)、L-Asp (10 mM) および NH₄Cl (100 mM) を窒素源として反応させる条件下 (NH₃-dependent assay)、スルホキシミン 5 および 6 の阻害効果を測定したところ、両化合物とも、遅延性の高親和性阻害剤 (slow-onset and tight-binding inhibitor) として、見かけ上、酵素を不可逆的に阻害する強い活性を示した (Figures II-2 and 3)。

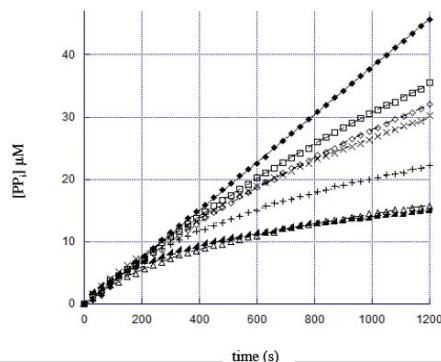


Figure II-2. Ammonia-dependent assay of hASNS for production of PP_i in the presence of inhibitor 5: open diamond, 0 μM; open squares, 0.2 μM; open diamonds, 0.5 μM; tilted crosses, 1 μM; crosses, 2 μM; open triangles, 5 μM; closed triangles 10 μM of inhibitor 5, respectively. Solid lines represent the best fit lines using equation (1-1) (see Experimental Section).

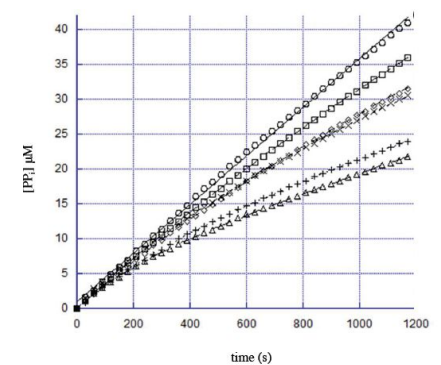


Figure II-3. Ammonia-dependent assay of hASNS for production of PP_i in the presence of the inhibitor 6: open circles, 0 μM; open squares, 0.2 μM; open diamonds, 5 μM; tilted crosses, 8 μM; crosses, 15 μM; open triangle, 20 μM of inhibitor 6, respectively. Solid lines represent the best fit lines using equation (1-1) (see Experimental Section).

同様に、hAS の天然の基質 (窒素源) である L-Gln (10 mM) を用いる条件下 (Gln-dependent assay) においても、スルホキシミン 5 および 6 の阻害活性を測定した。その結果、両化合物とも、遅延性の高親和性阻害剤 (slow-onset and tight-binding inhibitor) として、見かけ上、酵素を不可逆的に阻害する強い活性を示した (Figures II-4 and 5)。

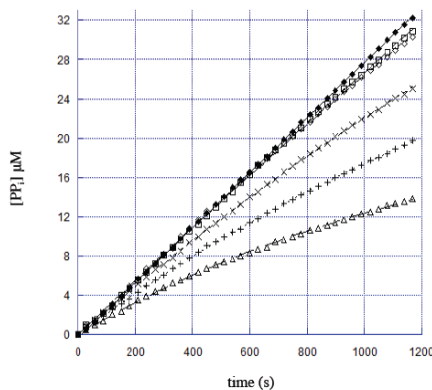


Figure II-4. Glutamine-dependent assay for production of PP_i in the presence of the inhibitor 5: closed diamonds, 0 μM; open squares, 0.2 μM; open diamonds, 0.5 μM; tilted crosses, 1 μM; crosses, 2 μM; open triangles, 5 μM of inhibitor 5, respectively. Solid lines represent the best fit lines using equation (1-1) (see Experimental Section).

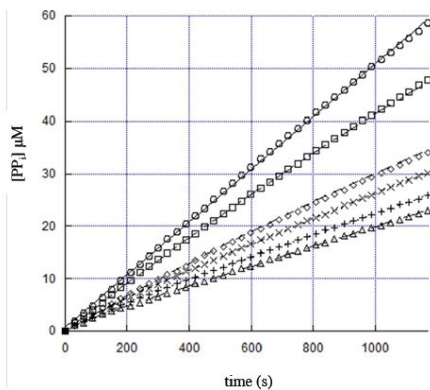


Figure II-5. Glutamine-dependent assay for production of PP_i in the presence of the inhibitor 6: open circles, 0 µM; open squares, 5 µM; open diamonds, 25 µM; tilted crosses, 40 µM; crosses, 60 µM; open triangle, 80 µM of inhibitor 6, respectively. Solid lines represent the best fit lines using equation (1-1) (see Experimental Section).

フリーの酵素が可逆的かつ ATP と拮抗的に阻害剤と結合し、それがゆっくりと強固な結合 (tight binding) に移行するモデルを仮定し、これらのアッセイ曲線から、初期の可逆的阻害定数 (K_i) および、tight binding に至ったオーバーオール阻害定数 (K_i^*) を計算した。その結果を Table II-1 に示す。

Table II-1. Inhibition constants for compounds 1, 5 and 6 toward hASNS

Inhibitor	Gln-dependent assay ^{a)}		NH ₃ -dependent assay ^{b)}	
	K_i (nM)	K_i^* (nM)	K_i (nM)	K_i^* (nM)
<i>N</i> -adenylated sulfoximine 1	985 ^{c)}	24.3 ^{d)}	285 ^{c)}	2.46 ^{c)}
Amino sulfoximine 5	487 ± 25	7.6 ± 1.6	242 ± 74	22.8 ± 9.8
Carboxy sulfoximine 6	2780 ± 460	147 ± 37	262 ± 106	13 ± 2.1

^{a)} Assay conditions: The reaction was initiated by the addition of 4 µg of hASNS into a mixture of 10 mM L-Asp, 20 mM L-Gln, 0.5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, pyrophosphate reagent and varied concentrations of inhibitors (see Experimental Section) in 100 mM EPPS buffer, pH 8.0 at 20°C. The concave progress curves were analyzed as a slow-binding inhibition according to the kinetic equations (1) to (4) (see Experimental Section).

^{b)} Assay conditions: Same as Gln-dependent assay except that 100 mM NH₄Cl was used in place of 20 mM L-Gln.

^{c)} Gutierrez, J.A.; Pan, Y.-Xiang; Koroniak, L.; Hiratake, K.; Kilberg, M.S.; Richards, N.G.J. *Chem. Biol.* 2006, 13, 1339-1347 (Ref. 15).

-カルボキシ基を除いた場合(アミノスルホキシミン 5) は、NH₄Cl を窒素源とする NH₃-dependent assay 条件下では、これまでの阻害剤 1 より 1 オーダー大きな K_i^* 値 ($K_i^* = 23$ nM) を示したが、驚いたことに、より生理的条件下に近く酵素本来の基質である L-Gln を用いる Gln-dependent assay においては、 K_i^* 値が 8 nM まで低下し、きわめて強い阻害活性を示した。遅延性結合 (slow-binding) による高親和性阻害 (tight-binding inhibition) の様相を反映し (Figures II-4)、スルホキシミン 5 の初期の阻害定数 $K_i = 490$ nM に比べて、高親和性阻害に移行したあとのオーバーオールの阻害定数 $K_i^* = 8$ nM は著しく小さく、hAS の N-末端領域にあるグルタミナーゼドメインに L-Gln が結合することにより酵素のコンフォメーション変化が起こり、C-末端領域にあるアスパラギン合成ドメインの親和性が高まるという本酵素の触媒モデルと一致する結果が得られた。同様の効果は、大腸菌の asparagine synthetase B 酵素でも観測されており、L-Gln を窒素源とするアスパラギン合成酵素に共通の酵素学的性質と思われる。

それに対し、-アミノ基を除去したカルボキシスルホキシミン 6 は、NH₃-および L-Gln-dependent assay のいずれにおいても、 K_i^* 値が大幅に低下した。すなわち、アスパラギン酸の -アミノ基の酵素による認識は、-カルボキシ基よりはるかに重要である。-カルボキシ基を除去しても阻害剤の親和性がそれほど低下しないことは、hAS の活性中心におけるスルホキシミン型阻害剤の結合のコンピューターモデリングからすると予想外の結果であったが、酵素アッセイ条件下 (pH 8.0) において、アミノスルホキシミン 5 が正味の電荷がゼロであるのに対し、カルボキシスルホキシミン 6 は-2 価の電荷を持っていること、また、酵素の活性中心の静電ポテンシャルが負に帯電していることを反映した結果と思われる。hAS の本来の基質である L-Gln を窒素源とする glutamine-dependent assay での阻害剤の K_i^* 値は、生理的条件下における hAS の阻害をより忠実に反映していると考えられることから、細胞レベルでの hAS の阻害を考えたとき、アミノスルホキシミン 5 はより有望な化合物である。そこで、アミノスルホキシミン 5 を、アスパラギナーゼ耐性白血病細胞 MOLT-4 の生育阻害アッセイに供し、hAS 阻害が MOLT-4 細胞の増殖に与える影響を調べた。

細胞アッセイ. アスパラギナーゼ耐性 MOLT-4(R) 細胞は、1 U/mg のアスパラギナーゼ存在下で継続的に培養し、アスパラギナーゼ耐性の分子機構を検証した細胞株を実験に用いた。MOLT-4(R) 細胞をアミノスルホキシミン 5 を 0.01–1 mM 含む培地に移し培養した。阻害活性 ($K_i^* = 8$ nM) から予想される有効濃度より高い濃度設定にしたのは、多数の解離基や親水性置換基をもつ化合物 5 の細胞透過性に難がある可能性を考慮したものである。阻害剤 5 の存在下で細胞を 48 時間培養し、細胞増殖に及ぼす阻害剤 5 の影響を、色素染色 (WST-1) による MOLT-4(R) 生細胞をカウントすることにより行った。その結果、アミノスルホキシミン 5 は、濃度依存的に MOLT-4(R) 細胞の増殖を阻害し、その 50%阻害濃度 (IC₅₀ = 0.1 mM) は、これまでの阻害剤 1 (IC₅₀ = 1 mM) の 1/10 であった。細胞増殖阻害活性が増大したことは、アミノスルホキシミン 5 が生理的 pH 条件下で正味の電荷がゼロであることから細胞透過性が増大し、バイオアベイラビリティが向上したことによるものと考えられる。

さらに重要なことに、化合物 5 は、アスパラギナーゼの有無に関わらず、MOLT-4(R) 細胞の細胞死を引き起こすことが判明した (Figure II-9)。すなわち、アスパラギナーゼの有無に関わらず、0.25 mM 以上のアミノスル

ホキシミン 5 の存在下で、生細胞の数が顕著に減少していることが判明したのである。

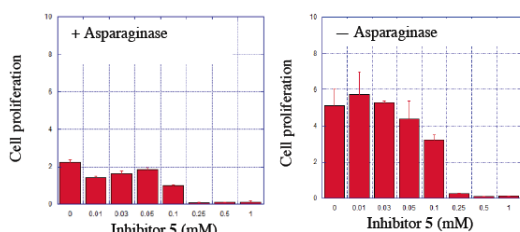


Figure II-9. Effect of the inhibitor 5 on MOLT-4 (R) proliferation in the presence and absence of 1 U L-asparaginase. Cell proliferation is defined as the number of viable cells after 48 h expressed as the ratio to the initial number of cells ($t = 0$). Error bars represent the standard deviation of triplicate

これまで、アスパラギナーゼ投与による L-Asn の枯渇は白血病細胞の増殖を阻害するが、細胞死は引き起こさないと考えられてきた。しかし、本研究の結果は、hAS の阻害が、それだけで白血病細胞の細胞死を引き起こすことを示しており、hAS がガン化学療法における有望な標的酵素となることを示唆するきわめて重要な発見である。現在、アスパラギナーゼ療法は、固形ガンの化学療法としては使われていない。また、急性リンパ性白血病の治療においても、もともと AS 活性の高い細胞種には適用できず、アスパラギナーゼ耐性の発現や再発には、AS の高発現が関与している。他の多くの細胞障害性の抗ガン剤とは異なり、増殖能の旺盛なガン細胞を兵糧攻めにすることでその増殖を抑制するユニークな作用機序をもつアスパラギナーゼ療法は、副作用の少ないガン化学療法として医療現場のニーズは高い。しかし、これまでの研究では、AS の阻害が細胞死を引き起こすことは知られていなかった。その最大の要因は、hAS を阻害する活性の高い阻害剤がなかったためである。今回の研究により、hAS の強力な阻害剤であるアミノスルホキシミン 5 を開発し、はじめて細胞レベルでの hAS 阻害の影響を調べることが可能になった。その結果、hAS の阻害が細胞死を引き起こすことが明らかになり、ガン化学療法における hAS の位置づけに画期的な知見をもたらした。hAS のガン化学療法における標的酵素としての重要性に鑑み、今後、アスパラギナーゼとともに hAS 阻害剤を併用する新しいガン化学療法が開発されるものと期待される。

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 2 件)

Nakajima M, Watanabe B, Han L, Shimizu B, Wada K, Fukuyama K, Suzuki H, Hiratake J. Glutathione-analogous peptidyl phosphorus esters as mechanism-based inhibitors of γ -glutamyl transpeptidase for probing cysteinyl-glycine

binding site. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 1176-1194 (2014). DOI: 10.1016/j.bmc.2013.12.034 (査読有)

Ikeuchi, H.; Ahn, Yong-Mo; Otokawa, T.; Watanabe, B.; Hegazy, L.; Hiratake, J.*; Richards, Nigel, G. J. A Sulfoximine-Based Inhibitor of Human Asparagine Synthetase Kills L-Asparaginase-Resistant Leukemia Cells. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 5915-5927 (2012). DOI: 10.1016/j.bmc.2012.07.047 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

Jun Hiratake, Chunjie Li, Akiko Kojima-Yuasa, Isao Maatsui-Yuasa, Takao Koeduka. γ -Glutamyl transpeptidase and its inhibition for cellular redox modulation. Enzyme Engineering XXII (招待講演) 2013 年 9 月 22 日～9 月 26 日、富山

平竹 潤, γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ阻害剤の分子設計と阻害活性、第 30 回藤田カンファレンス(招待講演)、2013 年 9 月 7 日～2013 年 9 月 8 日、大津(滋賀)

平竹 潤. 反応機構依存型 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ阻害剤の開発と応用. 第 342 回 CBI 学会研究会講演会(招待講演). 2013 年 9 月 5 日(東京大学)

平竹 潤, グルタチオン代謝の制御と抗酸化ストレス応答、京都産業大学 生命科学セミナー(招待講演)、2013 年 7 月 26 日(京都産業大学)

平竹 潤, 切替宏彰、肥塚崇男、渡辺文太. 4-クマル酸:CoAリガーゼ阻害剤の合成と阻害活性の評価、日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会、2013年03月24日～2013年03月27日、東北大学(仙台)

Kanako Terakado, Ryosuke Yoshimune, Keiko, Gomi, Naoki Kajiyama, Hideyuki Ikeuchi, Jun Hiratake, Hiroaki Kato and Toru Nakatsu. Structural basis for the mechanism of color modulation of firefly luciferase bioluminescence. 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2012), 2012 年 05 月 28 日～2012 年 06 月 02 日, Guelph, ON, Canada

平竹 潤, アスパラギン合成酵素の新規阻害剤設計と生物活性 —白血病化学療法への新しいアプローチ—. 酵素工学会 第67回講演会(招待講演)、2012年4月27日、テルサホール(京都)

池内秀幸、Yong-Mo Ahn、音川拓哉、渡辺文太、Nigel G. J. Richards、平竹 潤
アスパラギン合成酵素の新規阻害剤の創製—
ガン化学療法への新展開—、日本農芸化学会
2012年度大会、2012年3月25日(京都女子大学)

池内秀幸、Yong-Mo Ahn、音川拓哉、渡辺文太、Nigel G. J. Richards、平竹 潤
アスパラギン合成酵素の新規阻害剤の創製 —
ガン化学療法への新展開—
京都大学化学研究所 第111回研究発表会
2011年12月9日 (京都大学化学研究所)

池内秀幸、Yong-Mo Ahn、音川拓哉、渡辺文太、Nigel G. J. Richards、平竹 潤
アスパラギン合成酵素阻害剤の合成 -急性
リンパ性白血病の新規治療剤を目指して-
日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会
2011年10月1日 (京都大学農学部)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ヒトアスパラギン合成酵素の新規阻
害

発明者：平竹 潤、池内秀幸、Nigel G. J.

Richards, Yong-Mo Ahn

権利者：京都大学、フロリダ大学

種類：特許

番号：US, 61/540,864

出願年月日：2011年09月29日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~hiratake/\(2\).pdf](http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~hiratake/(2).pdf)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平竹 潤 (HIRATAKE, Jun)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80199075

(2)研究分担者

渡辺 文太 (WATANABE, Bunta)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：10544637