

氏名	ウエスキ ショウタ 上杉 祥太
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 672 号
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
学位論文題目	<b>糸状菌が産生する抗がん物質の作用メカニズムと標的分子（Mode of action and molecular target of anti-cancer compounds derived from fungi）</b>
学位審査委員	主査 岩手大学 教授 木村 賢一 副査 山下 哲郎(岩手 教授),塩野 義人(山形 教授),橋本 勝(弘前 教授)

## 論文の内容の要旨

微生物二次代謝産物を中心とする天然資源由来の化合物は、医薬品として疾病の治療、バイオプローブ（細胞機能調節物質）として生命現象の解明に貢献してきた。化合物が細胞内で直接相互作用する標的分子を明らかにすることは、実用化において必須であるとともに、生物活性に関与する分子機構の解明のみならず、副作用の原因解明と回避にも繋がり得る有益なプロセスである。しかしこれまで、標的分子の同定に至った例は決して多いとは言えない。そこで本研究では、強力な抗がん作用を示す糸状菌由来の化合物について、作用メカニズムと標的分子を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では、植物内生糸状菌 *Neonectria ramulariae* KS-246 が産生する、既知の大環状アルカロイド系抗菌物質である pyrrocidine A について解析した。作用機序が共通の化合物は、細胞に対して類似のタンパク質発現変動を誘導することにに基づき、プロテオーム解析により pyrrocidine A による細胞内タンパク質発現変動を既知化合物と比較したところ、タンパク質リン酸化酵素であるキナーゼとの類似性が示唆された。そこで、各種キナーゼに対する阻害活性を測定した結果、細胞の生存に関与する PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) の p110 $\alpha$  触媒サブユニットを *in vitro* で直接阻害し (IC<sub>50</sub> = 0.93  $\mu$ M)、さらにヒト肺がん細胞 A549 において、その下流シグナルに存在する主要因子である Akt、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を阻害することを明らかにした。

第 3 章では、植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 が産生する、新規  $\alpha$ -pyrone 化合物である allantopyrone A について解析した。第 2 章と同様にプロテオーム解析を行い既知化合物と比較したところ、データベース

に含まれる他の対象化合物との類似性が低く、作用機序の予測が困難であった。一方、allantopyrone A 処理により発現が有意に変動したタンパク質を精査したところ、転写因子 Nrf2 により発現が制御される複数のタンパク質の増加という特徴的な変化を認めた。Nrf2 の機能は Keap1-Nrf2 経路で調節されるため、本経路に対する allantopyrone A の影響を調べた。その結果、Nrf2 により転写誘導される代表的な抗酸化酵素 HO-1 を濃度依存的に誘導し、Nrf2 の核移行も引き起こした。また、allantopyrone A と Keap1 が共有結合することを想定し、リンカー切断型ビーズを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、これらが直接結合することを示した。さらに、Keap1-Nrf2 経路が抗酸化システムであることに注目し、allantopyrone A で細胞を前処理することで、 $H_2O_2$  による酸化ストレス誘導性細胞死が抑制されることを明らかにした。

第 4 章では、白神山地で分離した糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 が産生する新規ドリマン型ジテルペン化合物群である、neomacrophorin 類について解析した。Neomacrophorin 類は、エポキシキノン構造を含む I、IV と、エポキシセミキノールを含む III と V に分類され、さらに、V のみがヒドロキシ酪酸側鎖を持たない類縁化合物であったため、これらの比較により構造活性相関を調べた。ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性とアポトーシス誘導活性は、IV、I、III、V の順に強かった。Neomacrophorin 類と構造的類似性を有する化合物の生物活性に関する情報検索に基づき、タンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームに対する影響を解析した結果、I と IV が酵素レベルと細胞レベルの双方で著しいプロテアソーム阻害活性を示したため、エポキシキノン構造が特に重要であることが示唆された。この I と IV のエポキシキノン部位には、pyrrocidine A や allantopyrone A と同じく  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル構造が存在するため、化学的な反応性の高さが活性に寄与していることを予想した。実際、アポトーシス誘導作用、プロテアソーム阻害作用はチオール基を持つ *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) により完全に抑制され、さらに NAC methyl ester と速やかに反応して付加体を形成した。以上の結果より、neomacrophorin 類は、エポキシキノン構造を介したプロテアソーム阻害剤であることが強く示唆された。

本研究では、既知化合物である pyrrocidine A、新規化合物である allantopyrone A と neomacrophorin 類という、糸状菌より単離された化合物の標的分子を明らかにした。 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和カルボニル構造を介してそれぞれ異なる標的分子に作用することが示唆されたため、この構造を含む共有結合性物質は分子骨格の違いにより、多様かつある程度選択的な細胞応答を強力に誘導し得ることが示された。この有用性に基づき、がんを中心とする様々な疾患に対する共有結合薬の応用が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、東北地方の糸状菌が産生する新規物質 2 種と既知物質 1 種にがん細胞に対する抗がん活性を見出し、それぞれの化合物の標的分子（作用メカニズム）を明らかにしたものである。

既知の大環状アルカロイド系 pyrrocidine A は、PI3K の p110  $\alpha$  触媒サブユニットを  $IC_{50} = 0.93 \mu M$  で阻害し、細胞レベルで PI3K の下流に位置する Akt、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を阻害することを明らかにした。

新規  $\alpha$ -pyrone 化合物である allantopyrone A は、酸化ストレスに対する生体応答として重要な Keap1-Nrf2 経路の Keap1 と共有結合する結果、Nrf2 により転写誘導される代表的な抗酸化酵素 HO-1 を濃度依存的に誘導し、Nrf2 の核移行も引き起こした。その結果、allantopyrone A で細胞を前処理することで、 $H_2O_2$  による酸化ストレス誘導性細胞死が抑制されることを明らかにした。

新規ドリマン型ジテルペン化合物群である neomacrophorin 類は、エポキシキノン構造を含む I、IV とエポキシセミキノールを含む III と V に分類され、さらに V のみがヒドロキシ酪酸側鎖を持たない。ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性とアポトーシス誘導活性は、IV、I、III、V の順に強く、それは、I と IV が酵素レベルと細胞レベルの双方で、不要となったタンパク質を分解する、ユビキチン-プロテアソーム系におけるプロテアソーム活性を著しく阻害することに基づく。この阻害作用はチオール基を持つ *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) により完全に抑制され、さらに、NAC methyl ester と速やかに反応して付加体を形成したことで確認できた。

本研究では、既知化合物である pyrrocidine A、新規化合物である allantopyrone A と neomacrophorin 類という、糸状菌より単離された化合物の標的分子を明らかにした。 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル構造を介してそれぞれ異なる標的分子に作用することが示唆されたため、この構造を含む共有結合性物質は、分子骨格の違いにより多様かつある程度選択的な細胞応答を強力に誘導し得ることが示された。この有用性に基づき、がんを中心とする様々な疾患に対する共有結合薬の応用が期待される。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

<主論文>

1. Uesugi, S., Muroi, M., Kondoh, Y., Shiono, Y., Osada, H., Kimura, K. (2016)  
Allantopyrone A activates Keap1-Nrf2 pathway and protects PC12 cells from oxidative stress-induced cell death. *The Journal of Antibiotics*, in press (掲載証明書)

<参考論文>

1. Shiono, Y., Kosukegawa, A., Koseki, T., Murayama, T., Kwon, E., Uesugi, S., Kimura,

- K. (2012)  
A dimeric pyrrocidine from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase, *Phytochemistry Letters*, **5**, 91-95.
- 2 . Kimura, K., Sakamoto, Y., Fujisawa, N., Uesugi, S., Aburai, N., Kawada, M., Ohba, S., Yamori, T., Tsuchiya, E., Koshino, H. (2012)  
Cleavage mechanism and anti-tumor activity of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from edible wild plants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 3887-3897.
- 3 . Shiono, Y., Hayasaka, S., Murayama, T., Koseki, T., Uesugi, S., Kimura, K. (2012)  
A polyketide metabolite from the fungicolous *Nodulisporium* sp. SH-1. *Phytochemistry Letters*, **5**, 549-552.
- 4 . Uesugi, S., Watanabe, D., Kitajima, M., Watanabe, R., Kawamura, Y., Ohnishi, M., Takagi, H., Kimura, K. (2014)  
Calcineurin inhibitors suppress the high-temperature stress sensitivity of the yeast ubiquitin ligase Rsp5 mutant: a new method of screening for calcineurin inhibitors. *FEMS Yeast Research*, **14**, 567-574.
- 5 . Takahashi, S., Yoshida, A., Uesugi, S., Hongo, Y., Kimura, K., Matsuoka, K., Koshino, H. (2014)  
Structural revision of kynapcin-12 by total synthesis, and inhibitory activities against prolyl oligopeptidase and cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **24**, 3373-3376.
- 6 . Yokoigawa, J., Morimoto, K., Shiono, Y., Uesugi, S., Kimura, K., Kataoka, T. (2015)  
Allantopyrone A, an  $\alpha$ -pyrone metabolite from an endophytic fungus, inhibits the tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway. *The Journal of Antibiotics*, **68**, 71-75.
- 7 . Shiono, Y., Shibuya, F., Koseki, T., Harizon, Supratman, U., Uesugi, S., Kimura, K. (2014)  
A new  $\alpha$ -pyrone metabolite from a mangrove plant endophytic fungus, *Fusarium* sp. *Journal of Asian Natural Products Research*, **17**, 403-408.
- 8 . Uesugi, S., Fujisawa, N., Yoshida, J., Watanabe, M., Dan, S., Yamori, T., Shiono, Y., Kimura, K. (2016)  
Pyrrocidine A, a metabolite of endophytic fungi, has a potent apoptosis-inducing activity against HL60 cells through caspase activation *via* the Michael addition. *The Journal of Antibiotics*, **69**, 133-140, *Tetrahedron*, **72**, 1031-1035.
- 9 . Arayama, M., Uesugi, S., Tanaka, K., Maeda, H., Nehira, T., Kimura, K., Hashimoto, M. (2016)  
Homojesterones: vinylogous analogs of jesterone from *Helminthosporium velutinum* TS28. *Tetrahedron*, **72**, 1031-1035.
- 10 . Honmura, Y., Uesugi, S., Maeda, H., Tanaka, K., Nehira, T., Kimura, K., Okazaki, M., Hashimoto, M. (2016)  
Isolation, absolute structures, and biological properties of cyclohelminthols I-IV from *Helminthosporium velutinum* yone96. *Tetrahedron*, **72**, 1400-1405.