

博士論文要約 (Summary)

平成 25 年 4 月入学
連合農学研究科 生物資源科学専攻
氏 名 上杉 祥太

タイトル	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
<p>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。</p>	
<p>第 2 章では、植物内生糸状菌 <i>Neonectria ramulariae</i> 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。本物質は、薬剤耐性株を含むグラム陽性細菌に対して強力な抗菌作用を示すとともに、極めて特徴的な構造を有するため、生物と化学の両面で研究が行われているが、標的分子は解明されていない。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が知られていることに基づき、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。キナーゼは、がん細胞の増殖や生存に大きく寄与し、実際にこれまでに承認された分子標的抗がん剤の 56% がキナーゼを標的としている事実からも、その有用性は明らかである。そこで、35 種の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 p110α 触媒サブユニットのみを <i>in vitro</i> で直接阻害 (IC₅₀ = 0.93 μM) することを見出した。次に、ヒト肺がん細胞 A549 を用い、細胞レベルでのキナーゼ阻害作用を検討した。Pyrrocidine A は、A549 細胞の増殖を IC₅₀ = 1.7 μM で阻害し、caspase 活性化と核の凝縮を伴うアポトーシスを誘導した。それと同じ濃度範囲において、その下流シグナル伝達経路 (PI3K/Akt 経路) 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、それぞれのリン酸化抗体を用いた western blotting により明らかにした。さらに、pyrrocidine A によるアポトーシス誘導、PI3K/Akt 経路阻害は、いずれも <i>N</i>-acetyl-L-cysteine (NAC) により抑制されたことから、分子内の α,β-不飽和カルボニル構造を介した共有結合による作用であることが示唆された。</p>	
<p>第 3 章では、植物内生糸状菌 <i>Allantophomopsis lycopodina</i> KS-97 が産生す</p>	

る、新規 α -pyrone 化合物である allantopyrone A について解析した。本物質の生物活性としては、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する強い細胞毒性 ($IC_{50} = 0.36 \mu M$) と、A549 細胞におけるがんや炎症に関わる NF- κ B 経路阻害作用を見出している。これらの作用には、分子内の α, β -不飽和カルボニル構造が重要であることが示唆されてきたが、直接結合する標的分子は明らかとなっていない。そこで、上記と同様にプロテオーム解析を行い、タンパク質発現変動に基づく細胞応答を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 5 種のタンパク質 (aldo-keto reductase family 1 member C2、UDP-glucose 6-dehydrogenase、D-3-phosphoglycerate dehydrogenase、glutathione S-transferase P、peroxiredoxin-6) の有意な増加という特徴的な変化を認めた。Nrf2 は、抗酸化酵素や第 II 相解毒酵素の発現調節を担う転写因子であり、その機能は生体防御機構である Keap1-Nrf2 経路で調節される。酸化ストレスは、がんや神経変性疾患を含む多くの疾患に関与していることが知られており、dimethyl fumarate が Keap1-Nrf2 経路の活性化作用を介して、多発性硬化症治療薬として承認されている。そこで、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。Keap1-Nrf2 経路の活性化物質の多くが、 α, β -不飽和カルボニル構造やイソチオシアネート基を介して Keap1 のチオール基に共有結合することから、 α, β -不飽和カルボニル構造をもつ allantopyrone A が、Keap1 に直接結合する可能性が考えられた。実際、イソチオシアネート化合物の報告と同様に、allantopyrone A で処理した細胞の Keap1 を western blotting で検出したところ、高分子領域 (>150 kDa) に allantopyrone A-Keap1 付加体と考えられるバンドを認めた。また、allantopyrone A による HO-1 の増加と Nrf2 の核移行は、チオール基を有する NAC や glutathione の存在下で完全に抑制された。さらに、allantopyrone A と Keap1 が共有結合することを想定し、光親和型固定化法により allantopyrone A を固定化した、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、抗 Keap1 抗体で western blotting により検出することで、これらが直接結合することを示した。Keap1-Nrf2 経路は抗酸化システムであることに注目し、ラット副腎由来褐色細胞腫 PC12 細胞を用いて、細胞レベルでの Keap1-Nrf2 経路活性化作用について検討した。その結果、allantopyrone A で細胞を前処理することで、 H_2O_2 による細胞内 ROS レベルの上昇と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化合物群である、neomacrosporin 類について解析した。Neomacrosporin 類は、産生されなくなった II を除くと、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。HL60 細胞に対する細胞毒性とアポトーシス誘導活性 (caspase-3 活性化、DNA 断片化) は、IV、I、III、V の順に強かった。また、その DNA 断片化はいずれも pan-caspase 阻害剤である

z-VAD-fmkにより顕著に抑制され、caspaseを介したアポトーシスを誘導することを明らかにした。Neomacrophorin類と構造的類似性を有するepoxyphomalin類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作用に注目した。がんにおいては、異常増殖に伴うタンパク質合成の亢進が認められるため、プロテアソーム阻害剤に対して高い感受性を示し、実際に多発性骨髄腫などに対する治療薬として用いられている。ヒト赤血球由来20Sプロテアソームと、chymotrypsin様、trypsin様、caspase様活性に対するそれぞれの蛍光基質(Suc-LLVY-MCA、Boc-LRR-MCA、Z-LLE-MCA)を用いた*in vitro*プロテアソームアッセイを行った結果、I、III、IVが酵素レベルでchymotrypsin様活性とcaspase様活性を阻害することを見出した。プロテアソーム阻害剤は、ユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導することが知られている。そこで、抗ユビキチン抗体を用いたwestern blottingにより、HL60細胞におけるユビキチン化タンパク質を検出することで、細胞レベルでのプロテアソーム阻害活性を調べた。その結果、IとIVが著しくユビキチン化タンパク質を蓄積させたため、エポキシキノン構造が活性に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 α,β -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、IとIVによる細胞死、caspase-3活性化、ユビキチン化タンパク質蓄積は、いずれもチオール基を持つNACにより完全に抑制された。そこで、HPLCを用いて、neomacrophorin類とNAC methyl ester (NACM)の化学的反応性を解析した結果、生物活性が強いIとIVがNACMと速やかに結合し、付加体を形成することが示唆された。さらに、LC-MSにより付加体の構造を調べたところ、IとIVは共通して保持時間7.9 minと28.0 minに、それぞれ分子量710.3、533.2のNACM付加体を形成することが示された。IとIVの構造の違いが側鎖2'位の水酸基の有無であることと、LC-MSの結果を考慮し、2通りの反応機構を推測した。第1の機構は、側鎖部分が S_N2 求核置換反応によりNACMに置換された後、2'位または5'位にNACMが1分子付加するものである。第2の機構は、側鎖部分が加水分解により脱離したものの5'位にNACMが1分子付加し、さらに2'位にNACMが1分子付加するものである。この反応機構については、今後NMR等による詳細な解析を行うことで、生物活性の発現機構の解明につながることを期待される。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。

近年、がんの治療においては、がんの原因となる特定の因子に作用する分子標的薬が次々と開発されている。したがって、原因が多様ながんに対してより有効な治療薬を創出するためには、それぞれのがんにおける優れた創薬標的の発見と、抗がん物質の標的分子の解明が極めて重要となる。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。それぞれ、PI3K阻害作用、Keap1-Nrf2経路活性化作用、プロテアソーム阻害作用を見出し、これらはいずれも臨床薬の作用機序となっている臨床的に重要な作用機序であったと言える。また、 α,β -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。共有結合薬は、生体高分子に対する極めて強固に結合するため、重篤な副作用の出現が危惧されてきたが、近年、効果が長時間持続することや低用量で使用可能という利点が注目されている。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。