

博士論文

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

2016. 9

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(岩手大学)

上杉 祥太

目次

第 1 章 序論	
1-1. がんの研究と抗がん剤の現状	2
1-2. ケミカルバイオロジー	6
1-3. 微生物二次代謝産物	8
1-4. 生物活性スクリーニングと作用機序解析	12
1-5. 共有結合薬と本研究の概要	14
第 2 章 植物内生糸状菌 <i>Neonectria ramulariae</i> Wollenw KS-246 が産生する pyrrocidine A の PI3K 阻害作用	
2-1. 緒言	
2-1-1. Pyrrocidine 類	18
2-1-2. キナーゼシグナリングと阻害剤	20
2-2. 実験方法	
2-2-1. <i>in vitro</i> キナーゼ阻害アッセイ	24
2-2-2. 細胞培養	26
2-2-3. MTT assay による細胞毒性の測定	26
2-2-4. Trypan blue 色素排除法による細胞生存率の測定	26
2-2-5. タンパク質発現解析	26
2-2-6. 核の形態観察	28
2-3. 結果	
2-3-1. 各種キナーゼに対する <i>in vitro</i> 阻害活性	30
2-3-2. PI3K p110 α 触媒サブユニットに対する阻害活性	31
2-3-3. A549 細胞に対する増殖阻害作用	32
2-3-4. Pyrrocidine A の細胞死誘導作用	33
2-3-5. PI3K 下流のリン酸化シグナルに対する影響	34
2-3-6. アポトーシス誘導に対する NAC の影響	35
2-3-7. PI3K/Akt 経路のリン酸化に対する NAC の影響	36
2-4 考察	37
第 3 章 植物内生糸状菌 <i>Allantophomopsis lycopodina</i> KS-97 が産生する allantopyrone A の Keap1-Nrf2 経路活性化作用	
3-1. 緒言	
3-1-1. Allantopyrone A	44
3-1-2. Keap1-Nrf2 経路	45

3-2.	実験方法	
3-2-1.	プロテオーム解析	48
3-2-2.	細胞培養	49
3-2-3.	タンパク質発現解析	49
3-2-4.	細胞分画 (核タンパク質)	49
3-2-5.	アフィニティークロマトグラフィーによる結合タンパク質の解析	50
3-2-6.	細胞内 ROS 量の測定	51
3-2-7.	酸化ストレスによる細胞死の顕微鏡を用いた検出	51
3-2-8.	酸化ストレスによる細胞死における生存率の測定	52
3-3.	結果	
3-3-1.	プロテオーム解析	53
3-3-2.	抗酸化酵素 heme oxygenase-1 に対する影響	56
3-3-3.	転写因子 Nrf2 の局在	57
3-3-4.	チオール化合物の影響	58
3-3-5.	Allantopyrone A-Keap1 付加体の検出	59
3-3-6.	Allantopyrone A 固定化担体を用いた Keap1 との結合解析	60
3-3-7.	細胞内 ROS レベルに対する抑制効果	62
3-3-8.	H ₂ O ₂ 誘導性細胞死に対する抑制効果	63
3-4.	考察	65

第 4 章 白神山地で分離した糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 が産生する neomacrophorin 類のプロテアソーム阻害作用

4-1.	緒言	
4-1-1.	Neomacrophorin 類	71
4-1-2.	細胞内タンパク質分解系	73
4-2.	実験方法	
4-2-1.	細胞培養	75
4-2-2.	細胞毒性	75
4-2-3.	DNA 断片化解析	75
4-2-4.	タンパク質発現解析	76
4-2-5.	<i>in vitro</i> プロテアソーム阻害アッセイ	76
4-2-6.	NACM との結合実験	77
4-3.	結果	
4-3-1.	細胞毒性と構造活性相関	78
4-3-2.	アポトーシス誘導作用	79
4-3-3.	プロテアソーム阻害作用	81

4-3-4. ユビキチン化タンパク質蓄積作用	84
4-3-5. Neomacrophorin 類の細胞毒性とアポトーシスに対するチオール化合物の影響	85
4-3-6. Neomacrophorin 類のユビキチン化タンパク質蓄積に対するチオール化合物の影響	86
4-3-7. Neomacrophorin 類とチオール化合物の結合性	87
4-4. 考察	95
第5章 総合考察	104
参考文献	111
謝辞	129

第 1 章

序論

1-1. がんの研究と抗がん剤の現状

我が国において、がんは1981年（昭和56年）より死因の第1位であり、平成26年においては死亡総数の28.9%を占め、年間36万8103人が亡くなっている¹⁾。死因の2位である心疾患（15.5%）、肺炎（9.4%）と比較して、がんによる死亡者は圧倒的に多い。また、生涯のうちにがんになる可能性は、男性の2人に1人、女性の3人に1人と推計されている。診断法および治療法が進歩した現在でさえも、残念ながら多くの患者ががんによって命を落としており、がんによる死亡者は高齢化の進行とともに今後も増加していくものと推測されている。

1967年にWillisにより、がんとは「正常組織との協調性を欠いて過剰に増殖し、その変化の原因となった刺激を取り除いても、過剰に増殖を続ける異常な組織の集塊」と定義された²⁾。がん細胞は、遺伝情報の本体である染色体DNAが変異したものであることから、その形質は娘細胞にも受け継がれるため、刺激を取り除いてもその異常は拡大していく。しかも、がん細胞の増殖に必要な酸素や栄養素は宿主個体に依存しているため、宿主の健康状態を悪化させることに加え、協調性を欠くがん細胞は細胞間コミュニケーションを無視し、正常な生命システムを破綻させ、結果として宿主の生命を脅かすことになる。

この恐ろしいがんを理解して治療法を開発するために、分子生物学の台頭と進展により活発な研究が進められ、その結果として1970～80年代の“がん遺伝子”と“がん抑制遺伝子”の発見は、がんの機構解明に対して革命的なインパクトを与えた。*RB* 遺伝子変異による網膜芽細胞腫、*p53* 遺伝子変異によるLi-Fraumeni 症候群、*BRCA1/2* 遺伝子変異による家族性乳がんおよび卵巣がんなど、一部のがんの原因が解明されてきた。その後もがんの生物学が研究され、2000年にはHanahanとWeinbergにより、がんの特徴をまとめた「Hallmarks of Cancer」という総説が発表された³⁾。さらに、2011年にはこの続編として「Hallmarks of Cancer: The next generation」が発表され、がん化過程で起こる変化が示されるとともに、がん研究が目まぐるしいスピードで進行していることが示された⁴⁾。

ここで抗がん剤の歴史について述べるが、抗がん剤の進展は1940年代のナイトロジェンマスタードの開発に始まった。それから約半世紀にわたり、動物がんモデルや培養がん細胞によるスクリーニングが実施され、代謝拮抗薬や微小管阻害剤、白金製剤、抗がん抗生物質、topoisomerase 阻害抗がん剤、タキサン系抗がん剤などの古典的な抗がん剤が開発されてきた。しかし、これらは正常細胞とがん細胞の増殖速度の差などを利用した作用機序であることから、特に細胞増殖が活発な骨髄造血細胞や小腸上皮細胞などの正常組織における重篤な副作用や、投与量の治療域と副作用域が近接していることが問題とされてきた。

このような背景から、1990年代後半になると、がん細胞に特異的な分子や現象を標的とした「分子標的治療薬」が上市されるようになった。これは、正常細胞では働きが盛んでない、あるいは存在しない分子に作用するため、従来の抗悪性腫瘍薬と比較して飛躍的に優れた選択性と安全性が期待できる。分子標的の理想条件としては、がん特異的であること（特異性）、機能修飾によりがんの生育が阻止されること（奏効性）、生命維持に直結する生理機能はもたないこと（安全性）があげられる。がん分子標的治療薬は、rituximab（Rituxan[®]、1997年）、trastuzumab（Herceptin[®]、1998年）、imatinib（Gleevec[®]、2001年）の上市に幕を開け、現在は世界で70種を超えている⁵⁾。この分子標的治療薬の発展は、がんの分子生物学の理解が進んだことによる素晴らしい成果である。ただし、肺がんの有効な gefitinib（Iressa[®]）による重篤な間質性肺炎のように、分子標的治療薬は予期せぬ副作用の出現も報告されている。このリスクは、遺伝子検査を行い有効性が期待できる患者を選別して投与することにより低減できるようになっており、他にもより優れた治療薬の開発が待たれている。

がんの治療法としては、ここまでに述べた化学療法に加え、外科的治療、放射線治療が一般に用いられており、一定の効果が保証されるようになってきた。しかし、それらによる副作用や外科的侵襲が過酷であるために著しい体力の低下をもたらし、治療によってむしろ次第に患者の状態が悪化してしまうケースは、いまだ完全には防げないのが現状であ

る。また、がんは長期の闘病を強いられる場合も多く、心身に及ぼす影響は極めて深刻である。

がんが「国民病」と言われるようになった近年、日本でもがん対策の取り組みが活発になり、様々な研究分野が融合して新たな観点からがんの診断法や治療法の開発が進んでいる。がんは進行に伴い転移し、外科的切除が不能となることから、早期発見が極めて重要となる。診断法としては、がん細胞自体やがん細胞が分泌する物質などを検出するさまざまな方法が開発されている。がん細胞と正常細胞における酵素活性の差を利用し、がん細胞のみを即時に検出可能な *in vivo* 迅速蛍光がんイメージングが開発された。2011年に、がん細胞で活性化している γ -glutamyl transpeptidase 活性を検出する蛍光プローブが開発され⁶⁾、2015年にはより幅広いがん種に利用可能な β -galactosidase 活性を検出する蛍光プローブへの改良に成功している⁷⁾。これらの技術は、手術中にごがん細胞の完全切除を達成するために画期的な方法として期待されている。また、がん細胞と正常細胞の違いとして、細胞が分泌するマイクロ RNA に注目し、血液などに含まれるマイクロ RNA を測定することによる診断法の開発も行われている⁸⁾。この方法では、血液1滴に含まれるマイクロ RNA の種類と量をバイオマーカーとして調べることで、がんの有無、悪性度、進行度を評価できるとされている。特に、これまで早期発見が困難でかつ悪性度の高い膵がんについても、バイオマーカーとなり得るマイクロ RNA が同定されており⁹⁾、高精度で負担の少ない早期発見が今後さらに可能となると考えられている。そして、早期発見されたがんから得られる情報を解析することにより、がんの予防法の確立へとつながる可能性もある。一方、治療法としては、前述の化学療法、外科的治療、放射線治療に加え、第4の治療法として免疫療法が注目されている。その臨床的有効性を証明したのが、免疫チェックポイント阻害薬 nivolumab (Opdivo[®]) であり、「根治切除不能な悪性黒色腫」を効能・効果として、2014年9月に世界に先駆けて日本で発売された。Nivolumab は、ヒト型抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体である。PD-1 (programmed cell death 1、別名 CD279) は、活性化リンパ球や骨髄系

細胞が発現する、免疫反応を負に制御する免疫チェックポイント分子の一つであり、抗原提示細胞が発現する PD-1 リガンド (PD-L1、PD-L2) と結合する¹⁰⁾。種々のがん細胞は PD-1 リガンドを発現しており、そのため T 細胞からの攻撃を回避していると考えられるため、nivolumab により PD-1 と PD-1 リガンドの相互作用が遮断されることで、腫瘍免疫が活性化され、がん細胞に対して抗腫瘍効果を示す¹¹⁾。現在は、さまざまながんに対する nivolumab の臨床試験が行われており、これまで有効な治療法が無かったがんに対して免疫療法が有効であることが明らかとなりつつある。

さらに、近年のオミックス解析技術の発展に伴い、がんの全体像の理解が飛躍的に進むと考えられている。細胞内代謝物を網羅的に定量するメタボローム解析により、長年の謎とされてきたがんにおける Warburg 効果(好氣的条件における解糖系を用いたエネルギー産生)の意義が明らかとなってきた¹²⁾。このように、がんにおける特異な細胞システムを標的とした抗がん剤開発も注目されている。より幸福な生活を実現するため、私たち人類にとって大きな脅威であるがんを克服することが強く求められている。

1-2. ケミカルバイオロジー

病気の予防法並びに治療法を開発するためには、極めて複雑な生命現象を理解し、病気に関わる原因を明らかにすることが重要である。がんを含む多くの疾患は遺伝子異常に起因していることが知られているが、その生命現象の制御を担っている本体は主にタンパク質であり、多種多様なタンパク質の機能を明らかにする必要がある。これまで長い間、タンパク質の機能解析研究は遺伝子変異と表現型の関連性に基づく遺伝学的手法により行われ、多くのタンパク質の機能が明らかにされてきた。2003年にヒトゲノムの全塩基配列解読完了が発表され、ヒトの遺伝子は約22,000個であるとされた一方で、そこから翻訳されるタンパク質は数十万種あると言われている。したがって、それまでの遺伝学ではすべてのタンパク質の機能解明は不可能であることが示された。この問題点を解決するためには、遺伝子を標的とするのではなく、実際に細胞機能の調節を担うタンパク質自体を標的としてコントロールすることが求められる。それを実現する方法として注目されたのが、ケミカルバイオロジーである。1980年代、Harvard大学のS. Schreiber博士らは、免疫抑制剤FK506の作用機序研究を行い、アフィニティークロマトグラフィーを用いることにより、イムノフィリンであるFKBP12を標的タンパク質として同定した¹³⁾。さらに、FK506とFKBP12の複合体と結合するcalcineurinの機能解析を進め、IL-2産生につながるT細胞活性化のシグナル伝達機構を明らかにした¹⁴⁾。このような、低分子プローブを用いてタンパク質を中心とする細胞機能を解析する手法が、それまでの遺伝子操作に基づく古典遺伝学に代わるものとして提唱された¹⁵⁾。ケミカルバイオロジーの利点としては、①化合物の添加・除去や濃度を調節することでタンパク質の機能を容易かつ自在に制御できる、②複数の機能をもつタンパク質において特定のドメインの機能のみを選択的に制御できる、③同じ機能の遺伝子が複数存在しても容易に表現型が観察できる、などが挙げられる¹⁶⁾。一方で、低分子化合物は多様な生物活性を有することから、特定のタンパク質を制御するという優れた特異性を得ることが困難な場合がある。したがって、有機合成化学を駆使した構造展開も

行うことにより、まさに化学と生物学を融合させて、目的の生物活性のみをもつ特異性の高い細胞機能制御物質（バイオプローブ）の創製が盛んに行われている¹⁷⁾。

ケミカルバイオロジー研究において、興味深い生理活性をもつ低分子化合物の標的分子を探すことが非常に重要なプロセスである。ところが、それは時間と労力を要するうえに、その活性にかかわる真の標的分子を同定するのは困難であるとされてきた。そこで、近年では革新的な標的同定法が次々と開発され¹⁸⁻²²⁾、それによりケミカルバイオロジー研究、そしてそれを基盤とした創薬研究、並びに生命現象の解明研究は、今後飛躍的に発展すると考えられている²³⁾（表 1-1）。

表 1-1 バイオプローブを用いたケミカルバイオロジー研究²³⁾

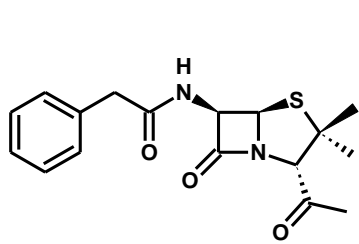
化合物	標的タンパク質	解明された生命現象、重要な生物活性
Chromeceptin	MFP-2	STAT-6を介したIGFシグナルの制御
Cyclosporin A	Cyclophilin	Cyclosporin A-Cyclophilin複合体によるcalcineurin阻害
DX-52-1	Radixin	Actin、CD44阻害による細胞遊走阻害
Fatostatin	SCAP	脂質合成、抗肥満薬への利用可能性
FK506	FKBP12	FK506-FKBP12複合体によるcalcineurin阻害、T細胞活性化機構の解明
FR177391	PP2A	脂肪滴形成
Fumagillin	MetAP2	non-canonical WntシグナルにおけるMetAP2の関与を示唆
Gerdanamycin	Hsp90	Hsp90クライアントタンパク質の解析
Glucopiericidin A	Glucotransporter	Filopodia (糸状仮足) 阻害
ICG-001	CBP	Wnt/ β -Cateninシグナル
Lactacystin	20S Proteasome	タンパク質分解機構
Leptomycin B	CRM1	NES配列をもつタンパク質とCRM1との結合による核外移行メカニズムの解明
Locostatin	RKIP	細胞運動におけるRKIPの関与
Methyl-gerfelin	Glyoxalase I	細胞遊走
Pateamine	eIF4A	翻訳制御機構
Pironetin	α -Tubulin	Tubulin重合阻害の新たな形式
Rapamycin	FKBP12	Rapamycin-FKBP12複合体によるmTOR阻害、オートファジー
Resveratrol	eIF4A	抗酸化活性、寿命延長
Spliceostatin A	SF3b	スプライシング機構、スプライシングとがんの関係
Thalidomide	Cerebron	Thalidomideによる奇形の発生機構
Trapoxin B	HDAC	HDACとがんの関係
Trichostatin	HDAC	エピジェネティック制御機構の解明
Withaferin A	Annexin II	アクチンフィラメント形成におけるAnnexin IIの関与
ZSTK474	PI3K	kinase阻害

1-3. 微生物二次代謝産物

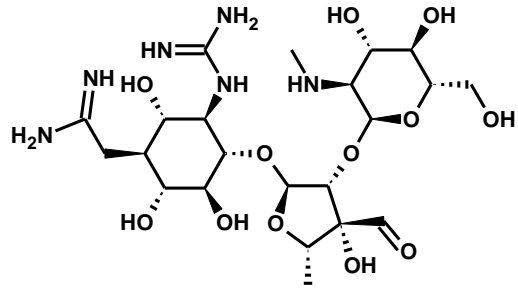
我が国において、微生物発酵は古くから多用され、「日本のお家芸」と言われている。微生物の用途は多岐にわたり、酒、パン、味噌、醤油といった食品加工、アミノ酸生産、環境浄化などにおける利用に加え、微生物が産生する酵素も同様に我々の生活に密接に関わっている。このほかにも、微生物は二次代謝産物として多様な低分子化合物を産生し、医薬品のリード化合物や細胞機能調節物質（バイオプローブ）などが見出されている^{24, 25}。

1942年、Waksmanにより、「微生物によって生産され、微生物の発育を阻止する物質」を抗生物質（antibiotics）と称することが提唱され、現在では、「微生物により生産され、微生物その他の細胞の発育を阻害する物質」を抗生物質と呼んでいる²⁶。その代表例が、2015年ノーベル生理学・医学賞を受賞した大村智博士らにより *Streptomyces avermectinius* より発見された avermectin であり、顧みられない熱帯病（Neglected Tropical Diseases）の寄生虫感染症に分類される、オンコセルカ症やリンパ系フィラリア症から極めて多くの人々を救った²⁷。その他にも、臨床薬としての利用に留まらず、バイオプローブとして生命現象の解明に大きく貢献してきた微生物由来の化合物として、抗生物質 penicillin および streptomycin、コレステロール合成阻害剤 mevalotin、免疫抑制剤 FK506、並びにスプライシング阻害剤 spliceostatin A²⁸ などよく知られている（図 1-1）。

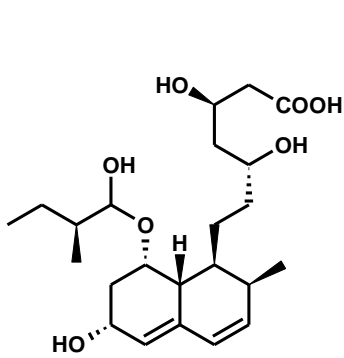
このように微生物二次代謝産物が利用されるのは、そこに複雑かつユニークな構造や生物活性を有する化合物が含まれていることに由来する。微生物代謝産物は、分子内に多数のキラル中心や複素環構造を含むものが多く、また、合成化合物と比較すると酸素原子が多いという特徴が示されている²⁹。このことは、水素結合の donor/acceptor となり得る官能基を多く含んでいるということを表しており、このような低分子化合物は生体高分子と相互作用できる可能性が高いことから、医薬品ならびにバイオプローブの探索源として非常に優れていると考えられている³⁰。さらに、微生物を用いる利点として、培地の組成や培養条件の改変、並びに生合成遺伝子の操作などにより、得られる二次代謝産物の種類や生



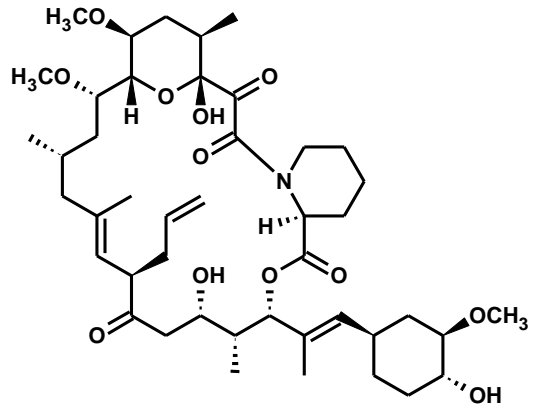
Penicillin G



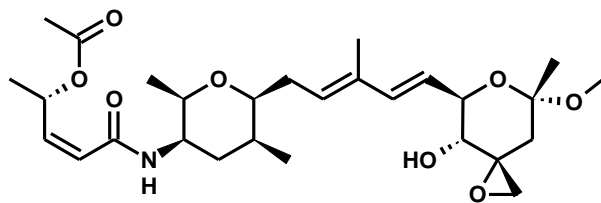
Streptomycin



Mevalotin (Pravastatin)



FK506 (Tacrolimus)



Spliceostatin A

図 1-1. 微生物由来の医薬品、バイオプローブの代表例

産量を制御することが可能な点などが挙げられる^{31, 32)}。近年、糸状菌のタンパク質翻訳後修飾（エピジェネティクス）を調節することにより、産生される化合物がダイナミックに変化することが明らかとなってきた³³⁾。特に、転写調節に大きく関与するヒストンのアセチル化やメチル化は、二次代謝産物の生合成遺伝子の発現にも関わるため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、DNAメチル化酵素阻害剤により転写を活性化することで、糸状菌より多数の新規化合物が単離されている³⁴⁻³⁹⁾。

しかし、天然資源からの単離精製は時間も労力もかかるうえに、既知物質を再単離する危険性があることから、組み合わせを利用して多数の化合物を合成するコンビナトリアルケミストリーがかつて勢力を強めた。ところが、コンビナトリアル合成化合物では、期待していたような構造多様性は得られなかった。化合物の多様性は、近年「ケミカルスペース」という概念で表されることがあり、これは分子量や極性、不斉炭素数、結合の回転自由度などの物理化学的特性を座標軸とした多次元空間である。コンビナトリアル合成化合物と臨床薬のケミカルスペースを比較すると、前者は後者のわずかな部分しか占めず、化合物の多様性が乏しいことが示された。一方で、天然化合物では、臨床薬のケミカルスペースとほぼ一致することが明らかとなり、再び注目を集めるようになった⁴⁰⁾。

このような背景に基づき、既知化合物の再単離を防ぎ、新規性の高い構造を有する化合物の発見の可能性を高める戦略も検討されている。その例として、化合物のスペクトルデータを収集したデータベースの構築が有効であり、利用されてきた。ただし、天然化合物は微量であったり、市販されていないことも多く、データベースの構築は非常に困難を伴う。この問題点を克服する、より優れた方法として、NPPlot (Natural Products Plot) が最近開発された⁴¹⁾。これは、天然資源抽出物の粗精製物について LC-MS 分析を行い、得られた化合物の保持時間（極性）と m/z （分子量情報）をそれぞれ横軸と縦軸に取り二次元にプロットし、加えて UV 吸収スペクトルも収集したデータベースである。この NPPlot を用いて、既知化合物の物性情報と比較しながら精査することにより、精製の早い段階で含まれる化

化合物の新規性に関する情報が得られる。実際、本手法の利用により、 β -ketoamide 構造を含む 16 員環マクロラクタム骨格を有する新規化合物 verticilactam⁴²⁾、6,6-spiroacetal 構造と末端に carboxamide 基を有する新規化合物 spirotoamide A および B の発見に成功している⁴³⁾。

地球上に存在する微生物は、10 億種類と言われている。しかし、培養が可能なものはその 1% に満たないとされており、多くの難培養性微生物が存在する⁴⁴⁾。我々は、その培養可能なわずかな微生物を利用することにより、疾病の治療やケミカルバイオロジー研究に多大な恩恵を受けてきた。したがって、それらの難培養性微生物を培養可能な技術を開発することで、得られる低分子化合物のバリエーションが飛躍的に増加すると期待される。さらに、微生物が教えてくれる新規な構造は、有機合成研究の重要なターゲットとなり、有機合成化学に対して多くの画期的な知見を与える。すなわち、我々は目に見えないものの常に密接に関わっている微生物によって、豊かな生活を営むことができ、健康な人生を享受している。このような計り知れない可能性を秘めた微生物からの生理活性物質の発見や、それを用いたケミカルバイオロジー研究は今後ますます発展していくものと期待される。

1-4. 生物活性スクリーニングと作用機序解析

生物活性物質の探索においては、目的の生物活性を評価するスクリーニング系と、探索源となる化合物または天然資源抽出物のライブラリーが必要となる。そして、そのスクリーニング系は大きく2つに分類され、標的ベースのものと表現型ベースのものがある⁴⁵⁾。標的ベースのスクリーニング系は、疾患に関わる特定の酵素が明らかな場合に有効で、その酵素に対する阻害作用または活性化作用を調べる。ハイスループットで行いやすいことから、多数のサンプルを短時間でスクリーニングすることが可能である。しかしながら、酵素レベルで作用を示しても、細胞レベルや動物レベルでは効果を示さないことも多い。これは、化合物の細胞膜透過性などに起因するものであり、標的ベースで見出された化合物の応用において大きな障壁となる。一方、表現型ベースのスクリーニング系は、細胞死や細胞形態変化など、細胞やモデル生物の疾患に関わる表現型に及ぼす影響を調べる⁴⁶⁻⁴⁷⁾。表現型スクリーニングの場合、細胞やモデル生物の見た目を指標とすることから、機械による評価は難しくハイスループット性は低いため、時間と手間がかかる。加えて、活性の評価には実験者の主観が介入することも問題となる。また、活性を示す化合物の作用機序は、標的ベースのスクリーニング系の場合とは異なり明確でない場合が多く、その応用においては、作用機序の解明が必須となる。この作用機序の解明は、すべての化合物に適用できる一般化された方法はなく、困難を極めるとされており、この段階が表現型ベースのスクリーニング系を用いる場合の大きな障壁となる⁴⁸⁾。しかしながら、標的ベースのスクリーニング系において問題となる、細胞や動物レベルで効かないという現象を避けることができ、実際に利用できる可能性が高い。さらに、表現型スクリーニングを用いる利点としては、新規創薬標的分子の発見がある。表現型スクリーニングで得られた化合物の標的分子を解明する過程で、あるタンパク質と疾患の関連性が明らかになる場合がある。例えば、細胞周期停止などの抗がん活性を示す spliceostatin A の標的分子として、スプライソソーム U2 snRNP の構成成分である SF3b 複合体が同定され、この化合物がスプライシングを

阻害することが明らかにされた²⁸⁾。Spliceostatin A は、世界初のスプライシング阻害剤であり、それまで知られていなかったスプライシングとがんの関連性が初めて示された。こうして見出されたタンパク質は、目的とする疾患に対する治療薬の有効な標的分子となる可能性が高い。薬は長期間の投与による薬剤耐性が生じることも多く、作用点が多様な薬を用意する必要がある。そのために創薬標的にはバラエティーが必要であり、表現型スクリーニングはそれを達成する有力な方法である。そして、このような新規作用機序を有する薬 (first-in-class drugs) の多くは、表現型スクリーニングで見出されており、有効な治療法が無かった疾患に対する治療薬の開発において非常に有効な手法である。実際、1999 年から 2008 年に承認された first-in-class に分類される低分子医薬品を見ると、標的ベースのスクリーニングで見出された化合物 (17 種) と比較して、表現型スクリーニングで見出された化合物 (28 種) が大きく上回っている⁴⁹⁾。以上の背景に基づき、本研究では、がん細胞に対する細胞毒性という表現型に基づいて見出した化合物の作用機序解析を行った。

1-5. 共有結合薬と本研究の概要

医薬品やバイオプローブは、タンパク質などの標的分子と相互作用することにより、その活性を制御する。その相互作用には、水素結合などによる弱い結合と、共有結合などによる強い結合がある。水素結合などによる場合は、その結合が可逆的である場合が多く、その作用を調節しやすい。一方、標的分子に共有結合する化合物（共有結合薬）は、可逆的な場合もあるが、多くは不可逆的で極めて強く結合する。この持続的な強い結合により、重篤な副作用が生じることが危惧されるとともに、一過的な作用には適さないため、臨床における使用は難しいと考えられてきた。しかし近年、共有結合薬の利点が注目されるようになってきた⁵⁰⁾。多くの医薬品は、生体内で目的とする作用を十分に得るために、大量投与を必要とする場合が多く、これにより副作用も出現してしまうことになる。一方、共有結合薬は低用量で作用を発現することから、投与量が少なく副作用の回避につながる。また、効果が長時間持続するため、投与回数を減らすこともでき、これも副作用の低減に貢献する。加えて、共有結合薬はタンパク質の Cys や Thr などの特定のアミノ酸残基に強力に結合することから、タンパク質の立体構造を認識する水素結合などによる非共有結合薬の場合と比較して、浅い結合ポケットにも結合し得る⁵¹⁾。実際、表 1-2 に示す多くの共有結合薬が FDA に認可されている⁵²⁾。よって、これまで使用されてきた非共有結合薬では効果的に作用できなかったタンパク質を標的とした薬剤が、共有結合薬で実現可能になることも期待されている。

これまでに、天然資源から多くの医薬品やバイオプローブが発見され、利用されている。筆者らは、植物、食材、微生物などの天然資源が産生する二次代謝産物から、抗がん作用、抗アレルギー作用を中心とする有用な生物活性を示す化合物を探索し、その作用に関わる分子機構の解明に取り組んできた。その過程で、糸状菌の二次代謝産物より単離された pyrrocidine A、allantopyrone A、neomacrophorin 類が、特徴的な構造と顕著な生物活性を示すことを見出した。本章 1-4 で述べたように、生物活性物質の標的分子、作用機序を解明する

表1-2 FDAに認可されている共有結合薬⁵²⁾

Drug	Biological Target	Therapeutic Domain
Amoxicillin	PBP (penicillin-binding proteins)	Anti-infective
Cefaclor/Ceclor	PBP	Anti-infective
Ceftriaxone/Rocephin	PBP	Anti-infective
Cefuroxime axetil/ceftin	PBP	Anti-infective
Cephalexin/keflex	PBP	Anti-infective
D-cycloserine/seromycin	Alanine racemase	Anti-infective
Fosfomycin/monurol	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine-3-enolpyruvyltransferase	Anti-infective
Isoniazid	Enol-acyl carrier protein reductase	Anti-infective
Meropenem	PBP	Anti-infective
Omnicef	PBP	Anti-infective
Penicillin V	PBP	Anti-infective
Azacytidine	Methyltransferase	Cancer
Bortezomib	Proteasome	Cancer
Decitabine/azadC	Methyltransferase	Cancer
Dutasteride/avodart	5- α -Reductase	Cancer
Exemestane/Aromasin	Aromatase	Cardio-vascular
Floxuridine	Thymidylate synthase	Cardio-vascular
Gemcitabine/gemzar	Ribonucleoside reductatase	Cardio-vascular
Proscar/finasteride	5- α -Reductase	Cardio-vascular
Rasagiline	MAO-B (monoamine oxidase B)	Parkinson's disease
Selegiline	MAO-B	Parkinson's disease
Warfarin	Vitamin K reductase	Cardio-vascular
Vigabatrin/sabril	GABA-Aminotransferase	Anti-epileptic
Nexium/esomeprazole	H ⁺ /K ⁺ ATPase	Gastro-intestinal
Orlistat	Lipase	Gastro-intestinal
Prevacid/lansoprazole	H ⁺ /K ⁺ ATPase	Gastro-intestinal
Prilosec/omeprazole	H ⁺ /K ⁺ ATPase	Gastro-intestinal
Protonix/pantoprazole	H ⁺ /K ⁺ ATPase	Gastro-intestinal
Aciphex/rabeprazol	H ⁺ /K ⁺ ATPase	Gastro-intestinal
Aspirin	Cyclooxygenase	Inflammation
Disulfiram/antabuse	Aldehyde dehydrogenase	Chronic alcoholism
Eflornithine	Ornithine decarboxylase	Hirsutism
Propylthiouracil/procasil	Thyroxine-5-deiodinase	Hyperthyroidism
Saxagliptin/Onglyza	DPP-IV	Anti-diabetic drug
Vildagliptin/Eugreas	DPP-IV	Anti-diabetic drug
Phenoxy-benzamine hydrochloride	α -Adrenoceptor	Cardio-vascular
Mercaptopurine/purinthol	Purine-nucleotide synthesis	Cancer
Carbidopa/lodosyn	DOPA decarboxylase	CNS

ことは重要である。本論文は、これらの化合物が誘導する細胞応答とその作用機序を明らかにすることを目的として行った研究をまとめたものである。その概要を以下に示す。

第2章では、植物内生糸状菌 *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 が産生する、既知の大環状アルカロイド系抗菌物質 pyrocidine A について述べる。プロテオーム解析を用いた既知化合物との比較解析に基づくバリデーションを行い、*in vitro* で PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) のキナーゼ活性を直接阻害することを見出した。さらに、細胞レベルでも PI3K の下流シグナルのリン酸化を阻害することを見出した。

第3章では、植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 が産生する新規 α -pyrone 化合物 allantopyrone A について述べる。プロテオーム解析により、allantopyrone A が転写因子 Nrf2 を活性化することが示唆されるとともに、Nrf2 の核移行の促進も見られ、Keap1-Nrf2 経路に対する活性化作用を見出した。また、化合物ビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、allantopyrone A が Keap1 と直接結合することが示された。Keap1-Nrf2 経路は抗酸化システムとして知られているが、実際に allantopyrone A が酸化ストレスによる細胞死から細胞を保護することを明らかにした。

第4章では、白神山地で採取した *Daedaleopsis tricolor* (チャカイガラタケ) に寄生する糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 が産生する新規ドリマン化合物群 neomacrophorin 類について述べる。Neomacrophorin 類は、HL60 細胞にアポトーシス誘導作用を示した。また、neomacrophorin I と IV が酵素レベル、細胞レベルの双方でプロテアソームを強く阻害することを見出した。活性が強かった I と IV は、ともにキノン構造を有していたことから、この部分が活性に大きく寄与することが示唆された。I と IV が、求核性チオール基を有する *N*-acetyl-L-cysteine methyl ester (NACM) と高い反応性を示すことを明らかにするとともに、生じる付加体の反応機構について検討した。

第 2 章

植物内生糸状菌 *Neonectria ramulariae* Wollenw **KS-246** が産生する
pyrrocidine A の **PI3K** 阻害作用

2-1. 緒言

2-1-1. Pyrrocidine 類

Pyrrocidine A および B は、He らにより糸状菌 *Cylindrocarpon* sp. LL-Cyan426 から初めて見出され⁵³⁾、その後 Wicklow らにより植物内生糸状菌 *Acremonium zeae* から単離されている⁵⁴⁾。これらの化合物は、*cis,trans*-fused tricyclic decahydrofluorene core と γ -hydroxy- γ -lactam を含む 13 員環からなる、極めて特徴的な構造を有している (図 2-1)。生物活性としては、pyrrocidine A 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活性を示し、その活性は α,β -不飽和カルボニル構造を持たない pyrrocidine B と比較して非常に強い。筆者らは、これまでに植物内生糸状菌 *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 より、pyrrocidine A とその新規類縁体を見出すとともに、pyrrocidine A が α,β -不飽和カルボニル構造の高い反応性を介して、ヒト急性前骨髄性白血病 HL60 細胞に強力にアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた⁵⁵⁻⁵⁷⁾。このように、pyrrocidine A は化学構造と生物活性の双方において興味深い特徴を有していることから、複数のグループで pyrrocidine 類とその類縁化合物の全合成^{58,59)} や生合成機構⁶⁰⁾ に関する研究が進められている。しかし、pyrrocidine A の標的分子は未だ明らかにされていない。JFCR39 がん細胞パネルスクリーニングを用いた作用機序の予測においては、pyrrocidine A は対照化合物と一致せず、既存の抗がん剤とは異なる作用機序を有していることが示唆された⁵⁷⁾。一方、筆者の修士論文研究において、プロテオーム解析を用いた pyrrocidine A の作用機序の予測を行っており、staurosporine などのキナーゼ阻害剤との類似性を見出している (図 2-2)。そこで本章では、この予測に基づき、pyrrocidine A の標的分子を同定することを目的とした。

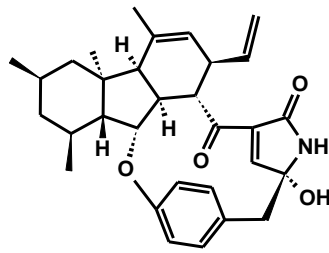


図 2-1 Pyrrocidine A の化学構造

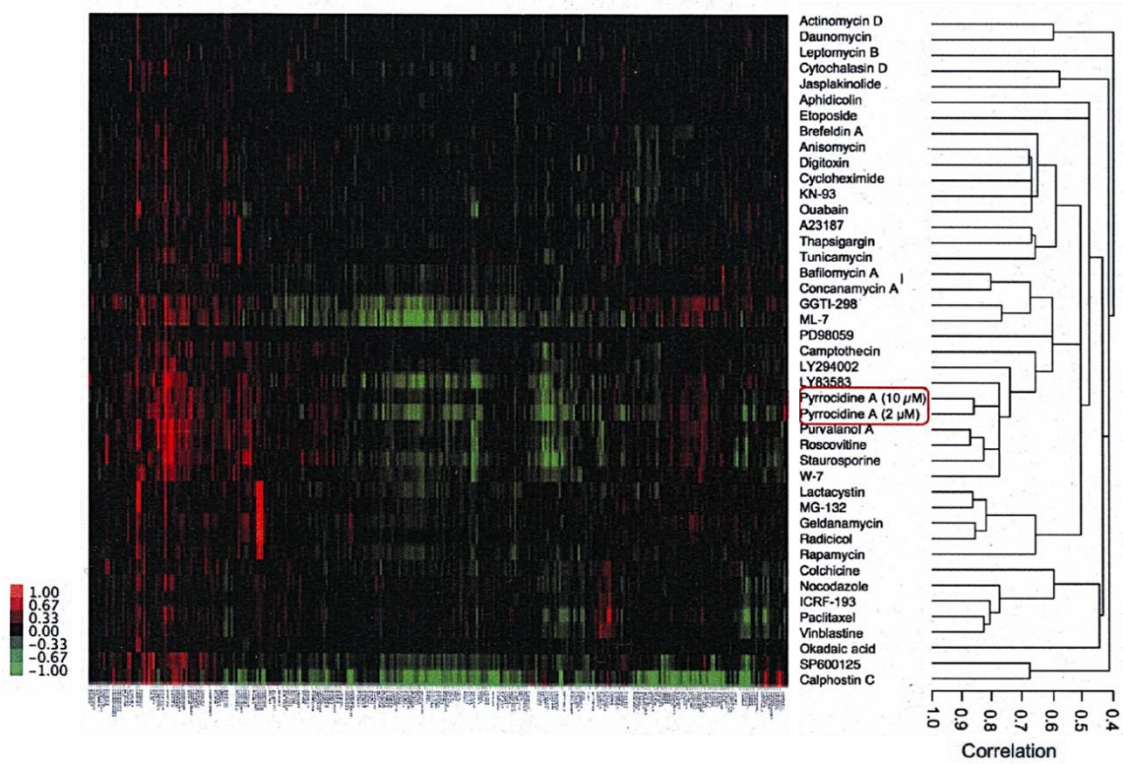


図 2-2. ChemProteoBase を用いたプロテオーム解析による作用機序の推定

HeLa 細胞を用いた 2D-DIGE により、各種化合物で誘導されるタンパク質発現の増減を定量した。階層的クラスタ解析を行い、対照化合物と比較した結果をヒートマップで示した。薬剤処理によって増加したタンパク質は赤色、減少したタンパク質は緑色で表示した。

2-1-2. キナーゼシグナリングと阻害剤

細胞の増殖、生存は、多くの細胞内シグナル伝達を介して行われている。特に、タンパク質のリン酸化は種々のシグナル伝達経路の制御に関わっており、その反応を担うキナーゼの持続的活性化が多くのがんで認められる⁶¹⁾。ヒトにおいては、500種以上のキナーゼが存在するとされており、それらはセリンスレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼ、ヒスチジンキナーゼ、アスパラギン酸グルタミン酸キナーゼなどに分類される。

分子標的薬としての低分子キナーゼ阻害剤の利用は、2001年、チロシンキナーゼ Bcr-Abl 阻害剤である imatinib (Gleevec[®]) が慢性骨髄性白血病 (CML) 治療薬として認可されたのに端を発する⁶²⁾。慢性骨髄性白血病の90%以上でフィラデルフィア染色体と呼ばれる異常染色体が認められ、9番染色体上の *ABL* 遺伝子と22番染色体上の *BCR* 遺伝子が連結した、*BCR-ABL* 融合遺伝子が形成されている。この遺伝子産物である Bcr-Abl タンパク質は、恒常的に活性化しているため、慢性骨髄性白血病の増殖を強力に促進する。慢性骨髄性白血病の多くが Bcr-Abl に依存していることから、その阻害剤である imatinib は、*BCR-ABL* 融合遺伝子陽性の慢性骨髄性白血病に対して極めて高い効果を示すことが明らかとなっている。このような素晴らしい成果に基づき、がんの分子標的治療薬として次々とキナーゼ阻害薬が開発された。これまでに承認された分子標的抗がん剤70剤のうち、半数以上の56%に相当する39剤がキナーゼを標的としている事実からも、キナーゼ阻害剤の臨床的な有効性は確立されていると言える。また、39剤のうち、7剤はモノクローナル抗体医薬品であり、Her2 や EGFR などの受容体に作用する。他の32剤は低分子のキナーゼ阻害剤であり、さらにそのうち9剤は、複数のキナーゼを阻害するマルチキナーゼ阻害剤である (表 2-1)⁵⁾。

がんの異常増殖に直接的に寄与する主要なキナーゼシグナリングとしては、細胞増殖や分化に関わる MEK/ERK 経路、細胞の生存に関わる PI3K/Akt 経路が存在する⁶³⁾。両経路の上流に存在する受容体型チロシンキナーゼとともに、これらの経路を遮断する薬剤は、抗がん剤として非常に有効である。実際、メラノーマ治療薬である MEK 阻害剤 trametinib

(Mekinist[®], JTP-70902) や⁶⁴⁾、慢性リンパ性白血病治療薬である PI3K 阻害剤 idelalisib (Zydelig[®], CAL-101)⁶⁵⁾ が近年承認されていることから、それぞれのがんの異常増殖に関与するキナーゼを阻害することは有効な治療法となる (図 2-3)。

表 2-1 これまでに承認された主要な分子標的抗がん剤 (2016年2月9日時点)⁵⁾

一般名/商品名	標的分子	適応がん種	米国承認年	日本承認年
Rituximab/Rituxan*	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫, MCL	1997年	2001年
Trastuzumab/Herceptin*	Her2 **	乳がん, 胃がん	1998年	2001年
Alemtuzumab/Campath*	CD52	慢性リンパ性白血病	2001年	Phase I
Imatinib/Gleevec	Bcr-Abl/Kit **	CML, GIST, Ph+ALL	2001年	2001年
Gefitinib/Iressa	EGFR **	非小細胞肺癌	2003年	2002年
Bortezomib/Velcade	Proteasome	多発性骨髄腫, MCL	2003年	2006年
Bevacizumab/Avastin *	VEGF	大腸がん, 非小細胞肺癌, 乳がん, グリオブラストーマ, 腎細胞がん, 卵巣がん	2004年	2007年
Cetuximab/Erbix *	EGFR **	大腸がん, 頭頸部がん	2004年	2008年
Erlotinib/Tarceva	EGFR **	非小細胞肺癌, 膵がん	2004年	2007年
Azacitidine/Vidaza	DNMT	骨髄異形成症候群	2004年	2011年
Sorafenib/Nexavar	Multi-kinases **	腎細胞がん, 肝細胞がん	2005年	2008年
Sunitinib/Sutent	Multi-kinases **	GIST, 腎細胞がん, NET	2006年	2008年
Dasatinib/Sprycel	Bcr-Abl/Src **	CML, Ph+ALL	2006年	2009年
Panitumumab/Vectibix *	EGFR **	大腸がん	2006年	2010年
Vorinostat/Zolinza	HDAC	皮膚T細胞性リンパ腫	2006年	2011年
Decitabine/Dacogen	DNMT	骨髄異形成症候群	2006年	Phase VII
Lapatinib/Tykerb	EGFR/Her2 **	乳がん	2007年	2009年
Temsirolimus/Torisel	mTOR **	腎細胞がん	2007年	2010年
Nilotinib/Tasigna	Bcr-Abl **	CML	2007年	2009年
Everolimus/Afinitor	mTOR **	腎細胞がん, SEGA, NET, 乳がん	2009年	2010年
Pazopanib/Votrient	Multi-kinases **	腎細胞がん, 軟部腫瘍	2009年	2012年
Romidepsin/Istodax	HDAC	皮膚T細胞性リンパ腫	2009年	未治験
Denosumab/Ranmark *	RANKL	多発性骨髄腫による骨病変及び固形がん骨転移による骨病変	2010年	2012年
Ipilimumab/Yervoy *	CTLA-4	メラノーマ	2011年	Phase II
Vandetanib/Caprelsa	Multi-kinases **	甲状腺髄様がん	2011年	Phase III
Vemurafenib/Zelboraf	BRAF(V600E) **	メラノーマ	2011年	Phase I
Crizotinib/Xalkori	ALK **	非小細胞肺癌	2011年	2012年
Ruxolitinib/Jakafi	JAK **	骨髄線維症	2011年	2011年
Axitinib/Inlyta	Multi-kinases **	腎細胞がん	2012年	2012年
Vismodegib/Erivedge	Hh signaling	基底細胞がん	2012年	未治験
Mogamulizumab/Poteligeo*	CCR4	成人T細胞白血病リンパ腫	Phase III	2012年
Pertuzumab/Perjeta*	Her2**	乳がん	2012年	申請中
Carfilzomib/Kyprolis	Proteasome	多発性骨髄腫	2012年	Phase VII
Ziv-aflibercept/Zaltrap *1	VEGF	大腸がん	2012年	Phase I
Bosutinib/Bosulif	Bcr-Abl/Src **	CML	2012年	Phase II/III
Regorafenib/Stivarga	Multi-kinases **	大腸がん	2012年	申請中
Cabozantinib/Cometriq	Multi-kinases **	甲状腺髄様がん	2012年	Phase I
Ponatinib/Inclusig	Bcr-Abl(T315I)**	CML, Ph+ALL	2012年	Phase VII
Trastuzumab emtansine/ Kadcyla *2	Her2 **	乳がん	2013年	2013年
Dabrafenib/Tafinlar	BRAF(V600E) **	メラノーマ(BRAF/V600E)	2013年	2016年
Trametinib/Mekinist	MEK**	メラノーマ(BRAF/V600E/K)	2013年	2016年
Afatinib/Gilotrif	EGFR/Her2 **	非小細胞肺癌(EGFR/exon19del, L858R)	2013年	2014年
Obinutuzumab/Gazyva *1	CD20	CLL	2013年	Phase III
Ibrutinib/Imbruvica	Btk **	MCL, CLL, WM	2013年	申請中
Ramucirumab/Cyramza *1	VEGFR2 **	胃がん及び胃食道接合部腺がん, 非小細胞肺癌, 大腸がん	2014年	2015年
Ceritinib/Zykadia	ALK **	非小細胞肺癌(ALK fusion gene)	2014年	Phase III
Belinostat/Beleodaq	HDAC	PTCL	2014年	状況不明
Nivolumab/Opdivo *1	PD-1	メラノーマ, 非小細胞肺癌, 腎がん	2014年	2014年
Alectinib/Alecensa	ALK **	非小細胞肺癌(ALK fusion gene)	2015年	2014年
Idelalisib/Zydelig	PI3K **	CLL, FL, SLL	2014年	Phase III
Pembrolizumab/Keytruda *1	PD-1	メラノーマ, 非小細胞肺癌	2014年	Phase III
Nintedanib/Vargatef	Multi-kinases **	非小細胞肺癌	2014年 ***	2015年
Blinatumomab/Blincyto *5	CD19/CD3	Ph-ALL	2014年	状況不明
Olaparib/Lynparza	PARP	卵巣がん(BRCA遺伝子変異陽性)	2014年	Phase III
Palbociclib/Ibrance	CDK4/6 **	乳がん	2015年	Phase III
Lenvatinib/Lenvima	Multi-kinases **	甲状腺がん	2015年	2015年
Panobinostat/Farydak	HDAC	多発性骨髄腫	2015年	2015年
Dinutuximab/Unituxin *1	GD2	神経芽腫	2015年	未開発
Sonidegib/Odomzo	Hh signaling	基底細胞がん	2015年	状況不明
Cobimetinib/Cotellic	MEK **	メラノーマ(BRAF/V600E/K)	2015年	未開発
Osimertinib/Tagrisso	EGFR **	非小細胞肺癌(EGFR/T790M)	2015年	申請中
Daratumumab/Darzalex *1	CD38	多発性骨髄腫	2015年	Phase III
Necitumumab/Portrazza *1	EGFR **	非小細胞肺癌	2015年	Phase III
Elotuzumab/Empliciti *1	SLAMF7	多発性骨髄腫	2015年	Phase III
Ixazomib/Ninlaro	Proteasome	多発性骨髄腫	2015年	Phase III

*1 非修飾抗体、*2 抗体薬物複合体、*3 放射性物質標識抗体、*4 VEGF受容体/IgG抗体Fc融合タンパク質、*5 二重特異性を有するT細胞誘導抗体
** キナーゼ標的 *** 欧承認年 下線: 日本発の分子標的抗がん剤を示す

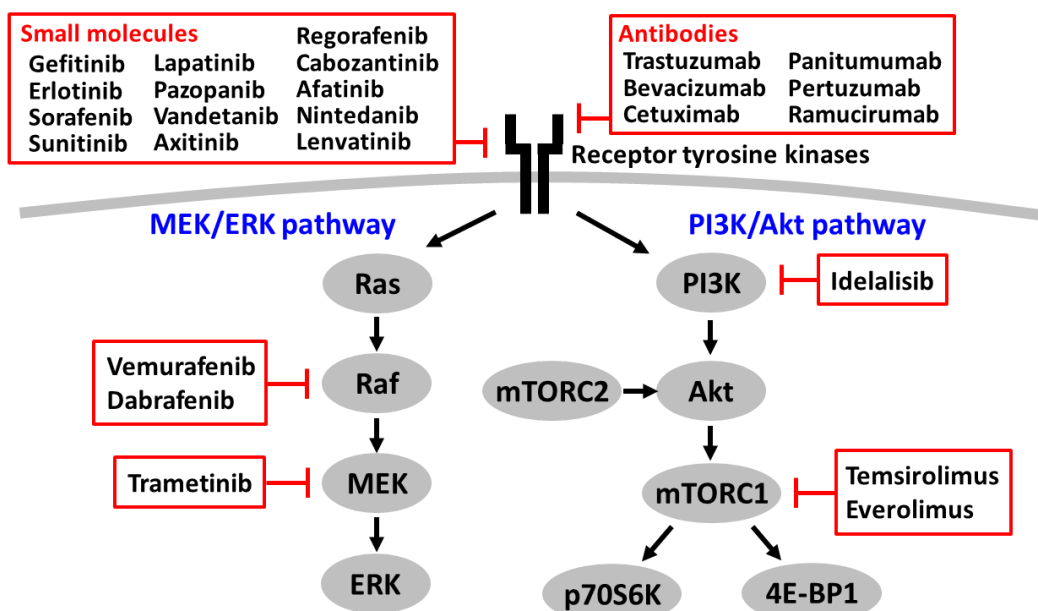


図 2-3. 主要なキナーゼ経路と標的とする臨床薬

2-2. 実験方法

2-2-1. *in vitro* キナーゼ阻害アッセイ⁶⁶⁾

カルナバイオサイエンス（株）に委託して測定を行った。キナーゼ活性は、STK-ELISA法または Off-chip Mobility Shift Assay 法により測定した。測定方法の概略を以下に記した。また、各キナーゼの反応条件を表 2-2 に示した。

STK-ELISA 法：アッセイバッファー（15 mM Tris-HCl、0.01% Tween 20、2 mM DTT、pH 7.5）にて調製したサンプル溶液と基質/ATP/金属溶液を、96 well プレート内で混合し、室温で反応させた。120 μ l の 40 mM EDTA 溶液（pH 7.5）を添加して反応を停止させ、その混合液の 120 μ l を採取して ELISA プレートに移した。反応後、4 回洗浄を行い、0.1% BSA を含むブロッキングバッファーにてブロッキングした。一次抗体溶液を添加して反応させた後、4 回洗浄を行い、二次抗体溶液を添加して反応させた。その後、洗浄し、基質である 100 μ l の TMB（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine）溶液を添加して反応させた後、100 μ l の 0.1 M 硫酸により反応を停止した。450 nm の吸光度により、キナーゼ活性を評価した。

Off-chip Mobility Shift Assay (MSA) 法：アッセイバッファー（20 mM HEPES、0.01% Triton X-100、2 mM DTT、pH 7.5）にて調製したサンプル溶液と基質/ATP/金属溶液を、384 well プレート内で混合し、室温で反応させた。その後、60 μ l の Termination Buffer を添加して反応を停止させた。反応溶液中の基質ペプチドとリン酸化ペプチドを LabChip3000 system にて分離、定量した。基質ペプチドピーク高さ（S）とリン酸化ペプチドピーク高さ（P）から計算される生成物比（P/(P+S)）により、キナーゼ活性を評価した。

表 2-2 キナーゼ反応条件

Kinase	Platform	Substrate		ATP (μM)		Metal		Positive control
		Name	(nM)	Km	Assay	Name	(mM)	
PDGFR α	MSA	CSKtide	1000	28	25	Mg	5	Staurosporine
PDGFR β	MSA	CSKtide	1000	23	25	Mg	5	Staurosporine
AKT1	MSA	Crosstide	1000	31	50	Mg	5	Staurosporine
AKT2	MSA	Crosstide	1000	110	100	Mg	5	Staurosporine
Erk1	MSA	Modified Erktide	1000	34	50	Mg	5	5-Iodotubercidin
Erk2	MSA	Modified Erktide	1000	33	50	Mg	5	5-Iodotubercidin
MAP2K1	STK-ELISA	Erk2	100	11	10	Mg	5	Staurosporine
MAP2K2	STK-ELISA	Erk2	100	13	15	Mg	5	Staurosporine
p70S6K	MSA	S6k2 peptide	1000	14	10	Mg	5	Staurosporine
RAF1	STK-ELISA	MAP2K1	85	0.39	0.5	Mg	40	ZM336372
RSK1	MSA	S6K peptide (N-FL)	1000	21	25	Mg	5	Staurosporine
PIK3CA/PIK3R1	MSA	Phosphatidylinositol	1000	58	50	Mg	5	PI-103
ALK	MSA	Srctide	1000	57	50	Mg	5	Staurosporine
EML4-ALK	MSA	Srctide	1000	43	50	Mg	5	Staurosporine
AXL	MSA	CSKtide	1000	32	50	Mg	5	Staurosporine
EGFR	MSA	Srctide	1000	2.7	5	Mg+Mn	5+1	Staurosporine
EPHB4	MSA	Bik/Lintide	1000	56	50	Mg	5	Staurosporine
FGFR1	MSA	CSKtide	1000	89	100	Mg	5	Staurosporine
FGFR2	MSA	CSKtide	1000	66	75	Mg	5	Staurosporine
FGFR3	MSA	CSKtide	1000	43	50	Mg	5	Staurosporine
FGFR4	MSA	CSKtide	1000	230	250	Mg	5	Staurosporine
FLT1	MSA	CSKtide	1000	140	150	Mg	5	Staurosporine
FLT3	MSA	Srctide	1000	94	100	Mg	5	Staurosporine
FLT4	MSA	CSKtide	1000	72	75	Mg	5	Staurosporine
HER2	MSA	Srctide	1000	9.4	10	Mn	5	Staurosporine
IGF1R	MSA	IRS1	1000	63	75	Mg	5	Staurosporine
KDR	MSA	CSKtide	1000	74	75	Mg	5	Staurosporine
KIT	MSA	Srctide	1000	370	400	Mg	5	Staurosporine
MET	MSA	Srctide	1000	27	25	Mg	5	Staurosporine
RET	MSA	CSKtide	1000	7.5	10	Mg	5	Staurosporine
RON	MSA	Srctide	1000	27	25	Mg	5	Staurosporine
TIE2	MSA	Bik/Lintide	1000	94	100	Mg	5	Staurosporine
TRKA	MSA	CSKtide	1000	65	75	Mg	5	Staurosporine
TRKB	MSA	Srctide	1000	80	75	Mg	5	Staurosporine
TRKC	MSA	Srctide	1000	47	50	Mg	5	Staurosporine

2-2-2. 細胞培養

ヒト非小細胞肺癌細胞 A549 (RCB0098、理研バイオリソースセンター) は、10% 非働化 FBS (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA)、1% penicillin (50 units/ml) - streptomycin (50 µg/ml) (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) を添加した DMEM 培地 (和光純薬工業 (株)) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2-2-3. MTT assay による細胞毒性の測定⁶⁷⁾

A549 細胞の細胞懸濁液 (5×10^4 cells/ml) を、98 µl ずつ 96 well マイクロプレートに播いた。目的の濃度にメタノールで希釈したサンプルを 2 µl ずつ添加し、37°C で 48 時間培養した。48 時間培養した細胞に、DPBS で溶解した 5 mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide、(株) 同仁化学研究所) 溶液を 10 µl ずつ添加し、さらに 37°C で 4 時間培養した。イソプロパノール (0.04 N HCl を含む) を 100 µl ずつ添加し、生成した不溶性ホルマザンをピペッティングにより溶解させた後、マイクロプレートリーダー (Infinite F200 PRO、Tecan, Männedorf, Switzerland) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

2-2-4. Trypan blue 色素排除法による細胞生存率の測定⁶⁸⁾

A549 細胞の細胞懸濁液 (5×10^4 cells/ml) を、980 µl ずつ 24 well マイクロプレートに播いた。メタノールで希釈したサンプルを 20 µl ずつ添加し、37°C で一定時間培養した。一定時間経過後、細胞を回収して、細胞懸濁液と 0.4 w/v% trypan blue 溶液 (和光純薬工業 (株)) と 1:1 の割合で混合し、顕微鏡下で生細胞 (非染色) と死細胞 (染色) をそれぞれ計数することにより、細胞生存率を算出した。

2-2-5. タンパク質発現解析⁵⁷⁾

2-2-5-1. タンパク質抽出

A549 細胞を 60 mm dish に播種し接着させた。その後、pyrrocidine A を添加し、一定時間培養した。培養した A549 細胞を氷上で遠心チューブに回収し、遠心 (3,000 rpm、4°C、3 min) して上清の培地を除いた。DPBS 1 ml を加えて攪拌し、遠心 (3,000 rpm、4°C、3 min) して上清を除く操作を 3 回行い、細胞を洗浄した。プロテアーゼ阻害剤カクテル Complete mini (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) とホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 I (和光純薬工業 (株)) を加えた RIPA buffer (10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mM EDTA、pH 7.5) に細胞を懸濁させ攪拌した後、氷上で 30 min 静置した。軽く攪拌後、遠心 (15,000×g、4°C、30 min) し、上清を全タンパク質抽出液として回収した。このうちの一部を用い、BCA protein assay kit (Pierce、Waltham、USA) を利用して BCA 法によりタンパク質濃度を測定した。残りの上清について、25% 2-mercaptoethanol を直前に添加した 5×SDS sample buffer (312.5 mM Tris-HCl、25% glycerol、25% SDS、0.005% bromophenol blue、pH 6.8) を加えて攪拌後 5 min 煮沸し、タンパク質を SDS 化した。

2-2-5-2. SDS-PAGE

初めに、分離ゲルを作製した。MQ 水、4×Lower buffer (1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、0.4 % SDS)、30 % Acrylamide/Bis、10 % APS、TEMED を混合し、ゲル板に 3.2 ml ずつ流し込み、イソプロパノールで重層した。45 分間静置してゲルを固めた後、イソプロパノールを捨て MQ 水でよく洗浄した。次に、濃縮ゲルを作製した。MQ 水、4×Upper buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、0.4 % SDS)、30 % Acrylamide/Bis、10 % APS、TEMED を混合してゲル板に流し込み、コームを差し込んだ状態で 30 分間静置し、ゲルを固めた。作製したゲルを泳動槽にセットし、SDS 泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS) を入れた。SDS 化したサンプルは 20 µg/lane となるようにそれぞれウェルにアプライした。200 V で 45 分間泳動を行っ

た。

2-2-5-3. Western blotting

電気泳動後ゲル板を外し、分離ゲルのみを回収した。トランスファーバッファー (48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% MeOH) で浸したろ紙 3 枚、MeOH による親水化処理とトランスファーバッファーによる平衡化をした PVDF 膜 (Millipore, Billerica, USA)、ゲル、そしてトランスファーバッファーで浸したろ紙 3 枚を下から順番にブロットイング装置に重ね、トランスファーバッファーで湿潤後、30 min ブロットイングした。PVDF 膜をブロッキングバッファー (20 mM Tris, 125 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 1% polyvinylpyrrolidone, pH 7.6) に浸し、室温で 1 h ブロッキングした。TBS-T buffer (20 mM Tris, 125 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) で 3 回洗浄した後、一次抗体処理 (4°C で over night または室温で 1 h) を行った。一次抗体は、caspase-3、caspase-9、PARP、Akt、p-AKT (Thr308)、p-Akt (Ser473)、p70S6K、p-p70S6K (Thr389)、p-p70S6K (Ser371)、4E-BP1、p-4E-BP1 は Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)、caspase-8、 α -Tubulin は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA) からそれぞれ購入したものをを用いた。TBS-T buffer で 3 回洗浄後、HRP (horse radish peroxidase) 標識二次抗体処理 (室温で 1 h) を行った。二次抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers, USA) より購入した anti-mouse IgG 抗体、anti-rabbit IgG 抗体を用いた。TBS-T buffer で 3 回洗浄後、ECLTM Western Blotting Detection Reagents と ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) を用いて、化学発光法によりタンパク質バンドを検出した。

2-2-6. 核の形態観察⁵⁷⁾

核染色試薬である Hoechst 33342 ((株) 同仁化学研究所) を用い、共焦点レーザー顕微鏡により細胞核の形態を観察した。24 well マイクロプレートに A549 細胞を播種し、一晚培養して接着させた。その後、pyrrocidine A を添加して 4 h 培養した。細胞を PBS で洗浄した後、

trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) で 5 min 処理して細胞をはがし、マイクロチューブに回収した。遠心 (3,000×g、3 min、室温) しながら PBS で 2 回洗浄し、上清を除き DMEM 培地に懸濁させた。Hoechst 33342 を加え、暗所で 37°C、15 min インキュベーションした。遠心 (3,000×g、3 min、室温) により PBS で 2 回洗浄した後、PBS で懸濁させたものをサンプルとした。共焦点レーザー顕微鏡 (C2、(株) ニコン) で細胞核を観察した。

2-3. 結果

2-3-1. 各種キナーゼに対する *in vitro* 阻害活性

プロテオーム解析の結果から、キナーゼを阻害する可能性が示唆された。そこで、既に臨床薬となっている分子標的抗がん剤の標的、または、現在臨床試験が行われている分子標的抗がん剤の標的であるキナーゼのうち、代表的な 35 種を選択し、10 μ M pyrrocidine A により阻害されるキナーゼを探索した。その結果、PIK3CA (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の p110 α 触媒サブユニット) のみに 66.6%の阻害活性を示し、他の 34 種のキナーゼは全く阻害しなかった (表 2-3)。

表 2-3 主要なキナーゼに対する pyrrocidine A の阻害活性

Pyrrocidine A 10 μ M			
Kinase	Inhibition at 10 μ M (%)	Kinase	Inhibition at 10 μ M (%)
PIK3CA	66.6	KDR	-1.3
EML4-ALK	2.7	AXL	-2.0
EPHB4	2.6	RSK1	-2.9
FLT3	2.5	PDGFRb	-3.0
TRKB	1.9	FLT4	-3.0
FGFR3	1.8	TRKA	-3.3
PDGFRa	1.7	AKT2	-3.5
p70S6K	1.2	AKT1	-3.7
FLT1	1.2	TRKC	-3.7
HER2	1.0	TIE2	-4.1
KIT	0.7	MET	-4.3
EGFR	-0.1	MAP2K1	-4.6
FGFR4	-0.5	FGFR1	-6.2
IGF1R	-0.6	Erk2	-6.5
Erk1	-0.7	MAP2K2	-6.7
RET	-1.1	RON	-8.2
ALK	-1.2	RAF1	-10.3
		FGFR2	-11.4

Carna Biosciences(株), n=2

2-3-2. PI3K p110 α 触媒サブユニットに対する阻害活性

2-3-1 で、pyrrocidine A が PI3K p110 α 触媒サブユニットを阻害することが示された。そこで、その再現性と活性の強さを調べるために、濃度依存性試験を行った。その結果、pyrrocidine A は PI3K p110 α 触媒サブユニットを濃度依存的に阻害し、その強さは $IC_{50} = 0.93$ μ M であることが判明した (図 2-4)。

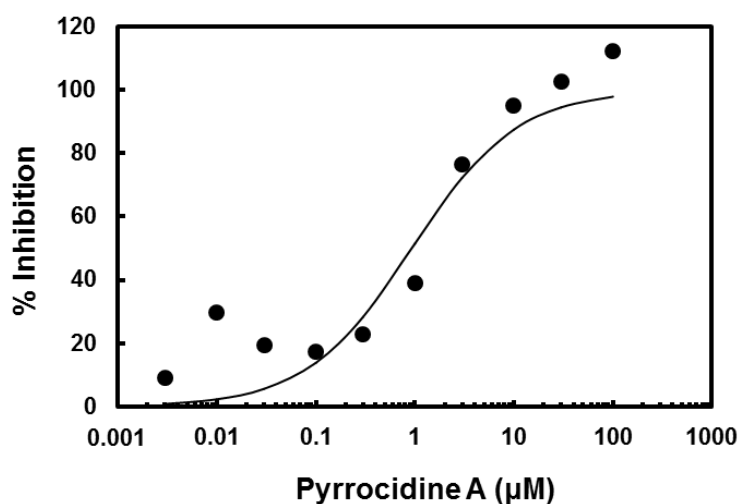


図 2-4. Pyrrocidine A の PI3K p110 α 触媒サブユニットに対する阻害活性

バキュロウイルス発現系を用いて作製した GST-PIK3CA/PIK3R1 を酵素、phosphatidylinositol を基質とし、室温で 5 h 反応させた。反応停止後、Off-chip Mobility Shift Assay により、基質とリン酸化基質を分離、定量し、生成物比から阻害率を求めた ($n=2$)。 IC_{50} 値は、被験物質濃度と阻害率によるプロットを非線形最小二乗法により 4 パラメータのロジスティック曲線に近似させて求めた。

2-3-3. A549 細胞に対する増殖阻害作用

以上の結果より、pyrrocidine A が PI3K p110 α 触媒サブユニットを直接阻害することが明らかとなった。そこで、細胞レベルでの PI3K 阻害活性を検証することとした。細胞はヒト非小細胞肺癌由来 A549 細胞を用いた。A549 細胞は、*KRAS* 変異を有している。*KRAS* 変異陽性細胞は PI3K p110 α 触媒サブユニット依存性であること、また、PI3K 阻害剤 ZSTK474 が A549 細胞を用いたマウス異種移植モデルに対して抗腫瘍効果を示すことが報告されていることに基づき、本細胞株を用いることとした。はじめに、A549 細胞の増殖に対する影響を調べた。その結果、pyrrocidine A は $IC_{50} = 1.7 \mu M$ で濃度依存的に A549 の細胞生存率を低下させた (図 2-5)。

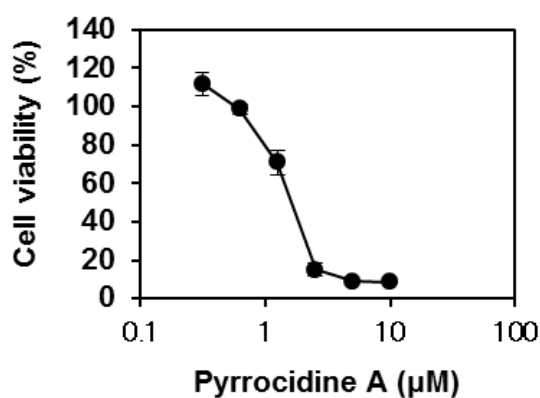


図 2-5. A549 細胞における pyrrocidine A の増殖阻害活性

A549 細胞を pyrrocidine A で 48 h 処理し、MTT assay により細胞生存率を測定した (n=3)。

2-3-4. Pyrrocidine A の細胞死誘導作用

Pyrrocidine A が A549 細胞の増殖を阻害したため、その特徴を明らかにすることとした。HL60 細胞においてアポトーシスを誘導することを明らかにしているため、アポトーシスの特徴である caspase 活性化と核の凝縮、断片化を調べた。その結果、western blotting により、pyrrocidine A の濃度依存的に caspase-8、9、3、並びに PARP の切断が認められた (図 2-6A)。さらに、Hoechst 33342 を用いた蛍光顕微鏡観察により、pyrrocidine A は核の凝縮と断片化を引き起こした (図 2-6B)。これらの結果から、pyrrocidine A は A549 細胞に対してアポトーシスを誘導することが示された。

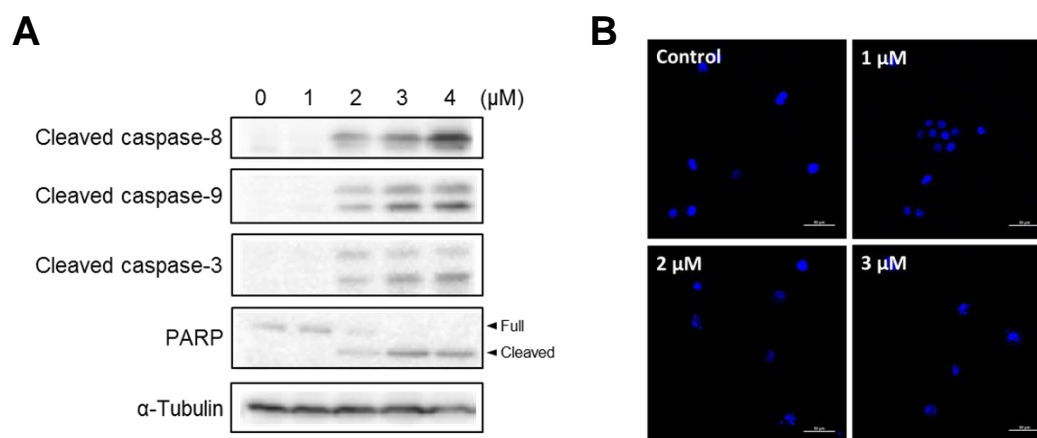


図 2-6. Pyrrocidine A のアポトーシス誘導作用

(A) Caspase 経路に対する pyrrocidine A の影響： A549 細胞を pyrrocidine A で 4 h 処理し、全タンパク質を抽出した。得られたタンパク質を用いて western blotting を行った。

(B) 核の形態に対する pyrrocidine A の影響： A549 細胞を pyrrocidine A で 4 h 処理した後、Hoechst 33342 で細胞を染色した。共焦点レーザー顕微鏡により核の形態を観察した。

2-3-5. PI3K 下流のリン酸化シグナルに対する影響

細胞レベルで PI3K 阻害作用が発揮されるかを検証するため、A549 細胞を用いて PI3K の下流に位置するキナーゼである Akt、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化に対する影響を western blotting で解析した。その結果、アポトーシス誘導と同等の濃度でこれらのキナーゼのリン酸化を阻害した (図 2-7)。このことから、pyrrocidine A は細胞レベルでも PI3K 阻害作用を発揮している可能性が高く、標的分子としての妥当性が示された。

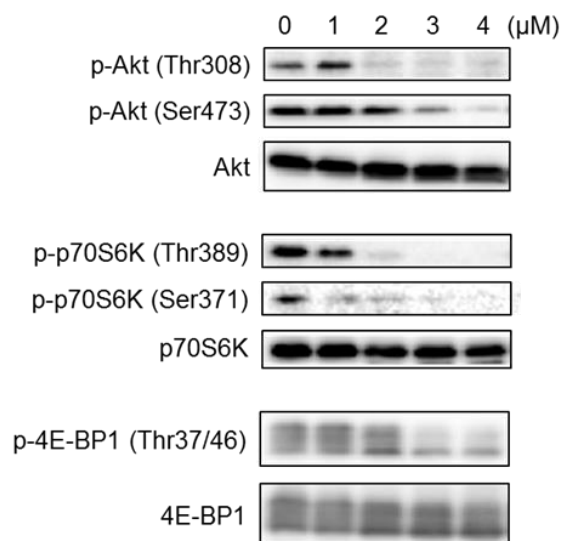


図 2-7. PI3K 下流キナーゼのリン酸化に対する阻害作用

A549 細胞を pyrrocidine A で 4 h 処理し、全タンパク質を抽出した。得られたタンパク質を用いて western blotting を行った。

2-3-6. アポトーシス誘導に対する NAC の影響

Pyrrrocidine A の生物活性には、 α,β -不飽和カルボニル構造が重要であり、HL60 細胞においては、この構造と高い反応性を示す *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) 存在下で活性が消失することを見出している。そこで、A549 細胞での α,β -不飽和カルボニル構造の寄与を明らかにするため、まずアポトーシス誘導作用に対する NAC の影響を調べた。その結果、pyrrrocidine A による細胞生存率の低下 (図 2-8A)、caspase-8、9、3、PARP の切断 (図 2-8B)、核の凝縮と断片化 (図 2-8C) は、いずれも NAC により抑制された。

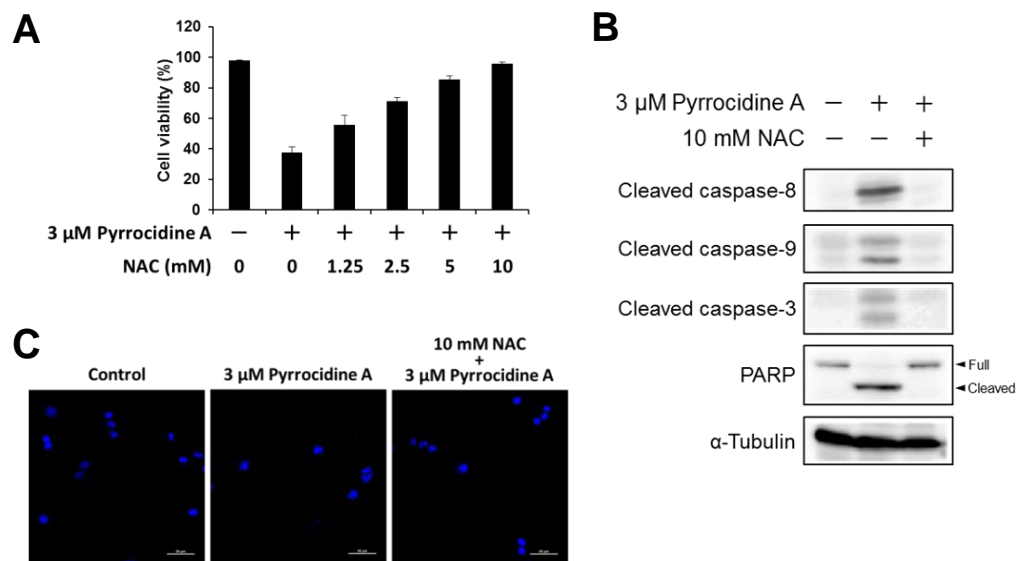


図 2-8. Pyrrrocidine A によるアポトーシスに対する NAC の抑制効果

(A) 細胞生存率に対する NAC の影響: A549 細胞を NAC で 1 h 前処理した後、pyrrrocidine A で 4 h 処理した。細胞生存率を trypan blue 色素排除法により測定した (n=3)。

(B) Caspase 経路に対する NAC の影響: A549 細胞を NAC で 1 h 前処理した後、pyrrrocidine A で 4 h 処理した。全タンパク質を抽出し、western blotting を行った。

(C) 核の形態に対する NAC の影響: A549 細胞を NAC で 1 h 前処理した後、pyrrrocidine A で 4 h 処理した。細胞を Hoechst 33342 で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2-3-7. PI3K/Akt 経路のリン酸化に対する NAC の影響

Pyrrrocidine A によるアポトーシスが NAC によって抑制されたことから、A549 細胞においても α,β -不飽和カルボニル構造が活性に重要であることが示された。そこで、PI3K/Akt 経路のリン酸化にもこの構造が関与しているか否かを明らかにするため、NAC の影響を調べた。その結果、pyrrrocidine A による Akt、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化の阻害は、いずれも NAC により抑制された (図 2-9)。このことから、pyrrrocidine A は、 α,β -不飽和カルボニル構造を介して PI3K p110 α 触媒サブユニットを阻害している可能性が示唆された。

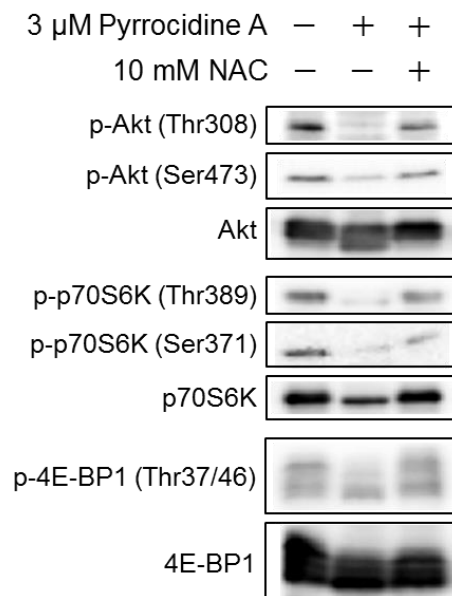


図 2-9. Pyrrrocidine A の PI3K/Akt 経路のリン酸化阻害作用に対する NAC の抑制効果

A549 細胞を NAC で 1 h 前処理した後、pyrrrocidine A で 4 h 処理した。全タンパク質を抽出し、western blotting を行った。

2-4. 考察

近年、植物内生糸状菌から新規化合物が多数見出されていることから、生物活性物質の探索源として注目されている^{69, 70)}。実際、我々も植物内生糸状菌より Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質である anthracobic acid 類、eremoxylarin 類、benzophomopsin A を含む新規化合物を見出してきた⁷¹⁻⁷⁵⁾。Pyrrocidine A は、植物内生糸状菌 *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 などが産生する化合物である⁵³⁻⁵⁵⁾。薬剤耐性株を含むグラム陽性細菌に対して非常に強力な抗菌作用を示すことから、抗菌薬の候補化合物として注目されている。また、構造的にもユニークであり、全合成研究も盛んに行われている^{58, 59)}。我々は、pyrrocidine A ががん細胞に対して強力的にアポトーシスを誘導すること、その活性は分子内の α, β -不飽和カルボニル構造が重要であり、この部分を介して標的分子に共有結合することを示唆する結果を得てきたが、直接作用する標的分子は明らかとなっていない⁵⁷⁾。そこで本章では、pyrrocidine A の標的分子を明らかにすることを目的とした。

一般に、低分子化合物の標的分子の解明は、すべての化合物に適用できる方法は確立されておらず、有機化学と分子生物学の双方の知識と技術を要することから困難を伴う場合が多い。また、標的分子を直接探索する方法として化合物ビーズを用いるアフィニティークロマトグラフィーなどがあるが、構造活性相関の解明、化合物の固定化、化合物とタンパク質の相互作用の強さ、標的タンパク質の発現量など、様々な問題により適用できないことがしばしばある⁷⁶⁾。そこで、標的分子が既知の化合物を細胞に作用させた際に起こる表現型の変化をデータベース化し、目的の化合物をそれと比較することで間接的に標的分子を推測したうえで、それに基づき標的分子としての妥当性をバリデーションするという手法が有効であり、近年実施されている。その1例として、薬剤処理による細胞内タンパク質の発現量変動を 2D-DIGE (2次元ディファレンスゲル電気泳動法) により定量し、それを標的分子が既知の化合物の結果をデータベース化した ChemProteoBase に基づき、階層的クラスター解析により類似度を求める手法が開発された⁷⁷⁾。本手法を用いたプロテオーム

プロファイリングによる作用機序の推定に基づき、これまでに DNA topoisomerase II 触媒阻害剤 BNS-22⁷⁸⁾、プロテアソーム阻害剤 pyrrolizilactone⁷⁹⁾、 tubulin 重合阻害剤 methyl 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoate (GN39482)⁸⁰⁾ などの標的分子が明らかにされており、標的分子の推定手法としての有用性が明らかとなっている。そこで、このプロテオームプロファイリングを利用し、pyrrocidine A による細胞内タンパク質の発現変動をリファレンス化合物と比較した。その結果、pyrrocidine A は、staurosporine などのキナーゼ阻害剤と同じクラスターに分類されることが明らかとなった。キナーゼはタンパク質をリン酸化する酵素であり、細胞の生存や増殖、分化など、多様なシグナル伝達の制御に関与している。疾患との関連性としては、キナーゼはがんと密接に関わっていることがよく知られており、多くのがんにおいてキナーゼシグナリングの恒常的活性化を介して細胞の異常増殖が起こっていると考えられている。細胞増殖に関わる EGFR などの受容体型チロシンキナーゼの活性化や⁸¹⁾、反対に異常増殖を抑制するがん抑制遺伝子である p53 や RB の欠損や失活もがんの原因として知られており⁸²⁾、これらの制御にはいずれもリン酸化が大きく関与している。実際、キナーゼ阻害剤は分子標的抗がん剤として臨床で使用されており、今回示唆されたキナーゼ阻害作用は抗がん作用の分子機構として有用であることは実証されている。そこで本研究ではまず、pyrrocidine A の各種キナーゼに対する *in vitro* での阻害活性を測定し、阻害するキナーゼを探索した。既に承認されている抗がん剤の標的、または現在臨床試験中の抗がん剤の標的となっている 35 種のキナーゼを選択し、それらの酵素活性に対する pyrrocidine A による阻害作用を調べた。その結果、PIK3CA (PI3K の p110 α 触媒サブユニット) のみに対して阻害活性を示し、他の 34 種のキナーゼは全く阻害しなかった (表 2-2)。そこで、PI3K の p110 α 触媒サブユニットに対する阻害活性を再度測定し、pyrrocidine A が IC₅₀ = 0.93 μ M で濃度依存的に阻害することが明らかとなった (図 2-4)。PI3K は、細胞の生存に大きく関与する PI3K/Akt 経路の最上流部に位置するキナーゼであり、多くのがんで変異が起こっていることが知られている⁸³⁾。特に、p110 α をコードす

る *PIK3CA* 遺伝子の変異が高頻度に認められ、肺癌（8～54%）、卵巣がん（50%）、メラノーマ（6%）、すい臓がん（4～8%）で、変異による PI3K/Akt 経路の恒常的活性化が起きている。実際、PI3K 阻害剤 idelalisib は 2014 年に FDA に認可され、日本でも Phase 3 の臨床試験が行われており、PI3K 阻害剤の臨床的な有効性は明らかとなっている。そこで、細胞における PI3K 阻害作用を検討することとした。

PI3K 阻害剤 ZSTK474 が、ヒト肺癌細胞 A549 において Akt のリン酸化を阻害するとともに、A549 細胞を用いたマウス異種移植モデルに対して顕著な抗腫瘍効果を示すこと⁸⁴⁾、また、A549 細胞は *KRAS* に変異があり、*KRAS* 変異陽性細胞は p110 α 依存性であるという報告があることから⁸⁵⁾、A549 細胞を用いて細胞レベルでの作用を解析した。まず、A549 細胞の増殖に対する pyrrocidine A の影響を調べたところ、IC₅₀ = 1.7 μ M でアポトーシスを誘導することが示された（図 2-5、2-6）。A549 の増殖を阻害することが確認されたため、同等の濃度における PI3K の下流シグナル伝達に対する影響を解析した。PI3K の下流には、Akt、p70S6K、4E-BP1 などが存在し、これらはタンパク質合成に主に関与しており、細胞の生存に大きく関わっている⁸⁶⁾。Pyrrocidine A は、これらのすべてのリン酸化を阻害することが明らかとなった（図 2-7）。以上のことから、pyrrocidine A は酵素レベルで示された PI3K の p110 α 触媒サブユニットに対する阻害作用を介して、細胞レベルでもその下流シグナルのリン酸化を阻害することが示唆された。この結果から、A549 細胞の PI3K と pyrrocidine A が直接結合するか否かに興味を持たれた。そこで、A549 細胞のタンパク質を用いてアフィニティークロマトグラフィーを実施したが、pyrrocidine A 固定化ビーズに特異的に結合する明確なタンパク質は検出されなかった。その原因としては、結合したタンパク質が微量で検出限界以下であった可能性と、pyrrocidine A の脂溶性の高さが影響を及ぼした可能性が考えられた。前者については、使用できるビーズの量に制限があったため、今回はビーズとタンパク質をチューブ内で混合して結合タンパク質を精製するバッチ法を利用した。この方法では、カラム法と比較して微量のビーズを用いるため、細胞内での存在量が少ないタンパク

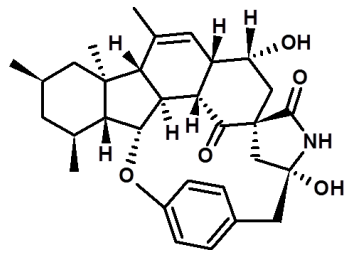
質は十分に得られない可能性がある。後者については、化合物の固定化によりビーズの物性が変化することが知られている。Pyrrocidine Aは、水系の溶媒への溶解性が非常に悪く、脂溶性が高い化合物である。一般に、ビーズは疎水性となることで疎水性相互作用により凝集し、タンパク質との反応効率が低下するとされている。また、ビーズの疎水性が高い場合、非特異的吸着が起これ、特異的な標的分子との結合が妨げられることもある^{87, 88)}。よって、このような物性的な問題により、pyrrocidine Aはアフィニティークロマトグラフィーには適していない可能性もあると考えられる。

我々は以前、pyrrocidine Aの抗がん作用には α,β -不飽和カルボニル構造が重要であることを報告した⁵⁷⁾。そこで、A549細胞において示されたアポトーシス誘導作用とPI3K/Akt経路阻害作用にも、この構造が関与しているか否かを検証した。その結果、これらの作用はいずれもNAC存在下で抑制された(図2-8、2-9)。このことから、pyrrocidine Aは α,β -不飽和カルボニル構造を介してPI3Kを阻害し、その結果A549細胞の生存シグナルを遮断することで増殖を抑制することが示唆された。近年、 α,β -不飽和カルボニル構造を介して標的分子であるキナーゼに共有結合する抗がん剤として、afatinib(Giotrif[®])とibrutinib(Imbruvica[®])の2剤が承認されている。Afatinibは、EGFRのCys797、Her2のCys805に共有結合してそれらの活性を阻害し、非小細胞肺癌治療薬として利用されている⁸⁹⁾。Ibrutinibは、Bruton's tyrosine kinase (Btk)のCys481に共有結合して活性を阻害し、マントル細胞リンパ腫(MCL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症(WM)の治療薬として利用されている⁹⁰⁾。これらの薬剤は、低用量で長時間、がんのキナーゼシグナリングを介した増殖を阻害することが可能である。特に、がんにおいては持続的にがん細胞の増殖を抑制し続ける必要があるため、共有結合薬の利点を有効に活用できると考えられる。共有結合薬は、重篤な副作用が危惧されてきたが、このような有効性が明らかとなったことから、抗がん剤の領域においても今後ますます注目されると考えられる。

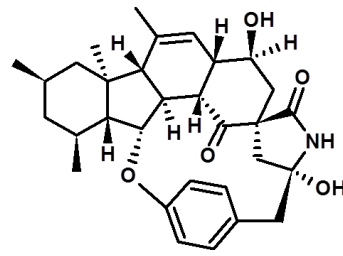
Pyrrocidine A と類似骨格を持つ化合物として、我々が見出した pyrrospirone A、B⁵⁵⁾、bispyrrocidine⁵⁶⁾ の他に、GKK1032 類⁹¹⁾、hirsutellone 類⁹²⁾、embellicine 類⁹³⁾、phomapyrrolidone 類⁹⁴⁾ などが報告されている (図 2-10)。Embellicine 類は TNF α 誘導性の NF- κ B 転写活性を阻害することが明らかになっているが、その標的分子は調べられていない。また、筆者が調べた限りでは、これらの類似骨格をもつ化合物がキナーゼを阻害するという報告は無かった。

これまでの結果から、pyrrocidine A は細胞レベルで強い抗がん作用を示し、抗がん剤として利用されている PI3K 阻害作用を有していたことから、動物レベルでの抗腫瘍効果を調べる意義があると考えられた。そこで、A549 細胞を用いたマウス異種移植モデルにおいて、静脈内投与による抗腫瘍効果の検討を行った。急性毒性試験において顕著な異常を認めない、0.78、1.56、3.125 mg/kg の投与量で、24 日間、3 日おきに投与し、腫瘍体積と腫瘍重量を測定した。その結果、再現性のある有意な抗腫瘍効果は認められなかった。急性毒性試験は、腹腔内投与、経口投与も行ったが、これらでは 50 mg/kg の投与量でも体重等に顕著な異常は確認されないことが示されている。このことは、pyrrocidine A の体内での動態が良好ではないことを示唆しており、効率的に腫瘍部位に薬剤が到達していない可能性がある。したがって、動物レベルでの抗腫瘍効果を発揮するためには、物性の最適化等による体内動態の改善が必要となるのではないかと考えられる。

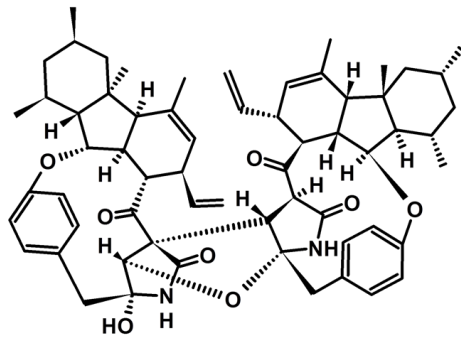
本章では、植物内生糸状菌が産生する pyrrocidine A の標的分子を探索し、がんの生存において重要なキナーゼである PI3K の p110 α 触媒サブユニットを直接阻害すること、そして細胞レベルでその下流シグナルのリン酸化も阻害することを明らかにした。また、キナーゼ阻害剤は多くのキナーゼに非選択的に作用することが多いが、pyrrocidine A は今回解析した他の 34 キナーゼと比較して、PI3K の p110 α 触媒サブユニットのみに高い選択性を示した。したがって、pyrrocidine A と PI3K の p110 α 触媒サブユニットの結合様式を今後明らかにすることで、この選択性が生じる分子機構に関する知見が得られると期待される。



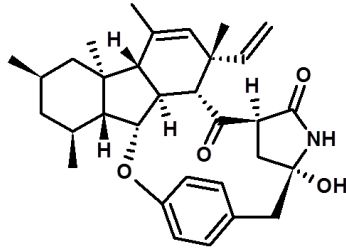
Pyrrospirone A



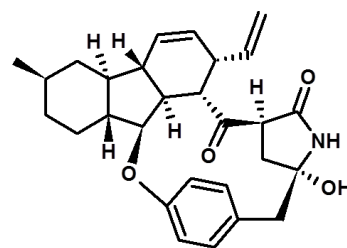
Pyrrospirone B



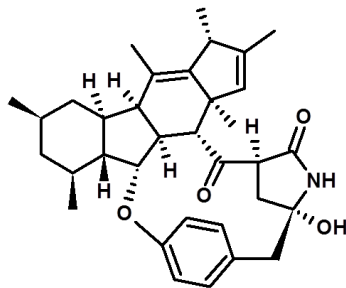
Bispyrrocidine



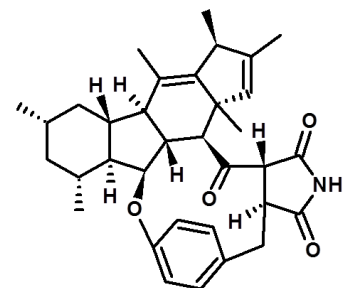
GKK1032A₂



Hirsutellone B



Embellicine A



Phomapyrrolidone A

図 2-10 Pyrrocidine A と類似骨格を有する化合物

第3章

植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* **KS-97** が産生する
allantopyrone A の Keap1-Nrf2 経路活性化作用

3-1. 緒言

3-1-1. Allantopyrone A

Allantopyrone A (図 3-1) は、塩野らにより単離された植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 が産生する新規 α -pyrone 化合物である⁹⁵⁾。本物質の生物活性としては、HL60 細胞に対する強い細胞毒性 ($IC_{50} = 0.36 \mu\text{M}$) や、A549 細胞におけるがんや炎症に関わる NF- κB 経路に対する阻害作用⁹⁶⁾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、allantopyrone A が細胞内で直接結合する標的分子は明らかとなっていない。そこで本章では、2D-DIGE を利用したタンパク質発現の変動解析、アフィニティークロマトグラフィーを利用した結合タンパク質の探索というケミカルバイオロジー的手法により、allantopyrone A の標的分子の解明を目的とした。

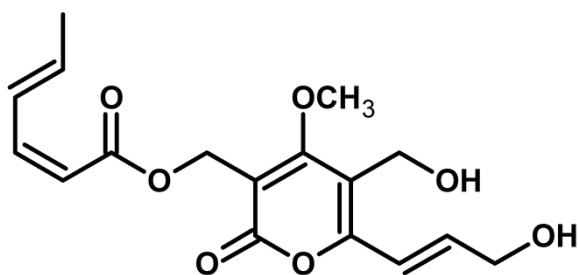


図 3-1. Allantopyrone A の化学構造

3-1-2 Keap1-Nrf2 経路

我々は、酸化ストレスや化学物質などによる環境ストレスに常にさらされている。そのため、これに対抗するための防御システムが備わっている。その1つが Keap1-Nrf2 経路であり、酸化ストレスや親電子物質に暴露した際にセンサーとして機能すると考えられている⁹⁷⁾ (図 3-2)。Keap1 は、転写因子 Nrf2 の分解に関わるユビキチンリガーゼアダプタータンパク質であり、通常は Nrf2 の分解を促進する。一方、Keap1 が酸化ストレスや親電子物質により修飾されると、Nrf2 は遊離して核内に移行し、転写因子として機能する。Nrf2 は、約 250 種以上の抗酸化酵素群や第 II 相解毒酵素群の遺伝子発現を制御していることから (表 3-1)、Keap1-Nrf2 経路の活性化により、種々の環境ストレスに対して「生体防御機構」として機能することが明らかとなっている。Keap1-Nrf2 経路を活性化する化合物としては、sulforaphane⁹⁸⁾、curcumin⁹⁹⁾、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂¹⁰⁰⁾、bardoxolone methyl¹⁰¹⁾ などがあり、肝保護作用や神経保護作用が知られている (図 3-3)。

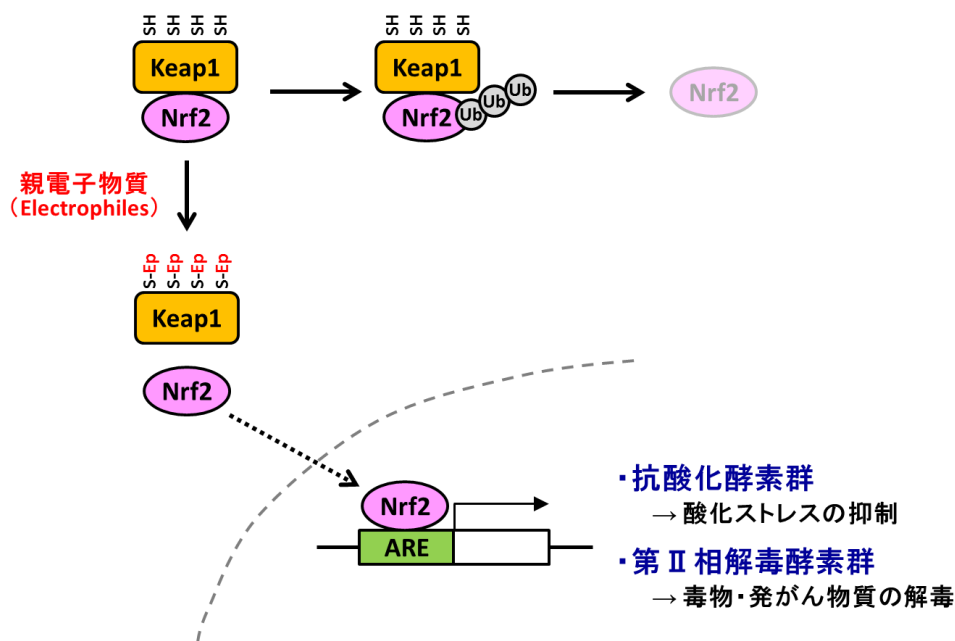
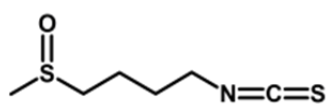


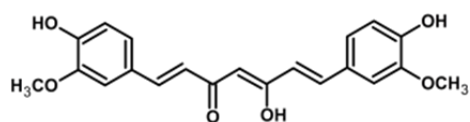
図 3-2. Keap1-Nrf2 経路

表 3-1 Nrf2 により転写が制御されるタンパク質の例

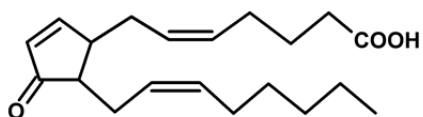
Function	Symbol	Name
Synthesis and conjugation of glutathione	GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
	GSR	Glutathione reductase
	GSTA4	Glutathione S-transferase alpha 4
	GSTM2	Glutathione S-transferase mu 2
	GSTM3	Glutathione S-transferase mu 3
	MGST2	Microsomal glutathione S-transferase 2
Antioxidant	PRDX1	Peroxisredoxin 1
	SRXN1	Sulfiredoxin 1
	TXN	Thioredoxin
	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1
Drug metabolizing enzymes and transporters	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
	EPHX1	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
	AOX1	Aldehyde oxidase 1
	ABCB6	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 6
	ABCC1	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 1
	ABCC5	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 5
	SLC25A25	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25
	SLC44A3	Solute carrier family 44, member 3
	SLC48A1	Solute carrier family 48 (heme transporter), member 1
SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11	
Metabolic enzymes	TKT	Transketolase
	G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
	IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP ⁺), soluble
	ADO	2-Aminoethanethiol (cysteamine) dioxygenase
	LPL	Lipoprotein lipase
Heme and iron metabolism	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
	BLVRB	Biliverdin reductase B [flavin reductase (NADPH)]
	FECH	Ferrochelatase
	FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1
	FTL	Ferritin, light polypeptide
Transcription factors	AHR	Aryl hydrocarbon receptor
	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
	HES1	Hairy and enhancer of split 1
	MAFG	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)
	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
	RYR2	Retinoid X receptor, alpha
YAF2	YY1 associated factor 2	



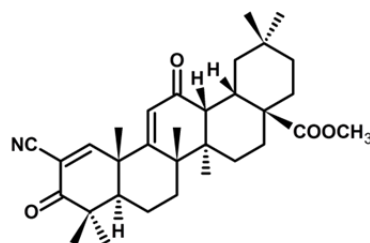
Sulforaphane



Curcumin



15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂



Bardoxolone methyl

図 3-3. Keap1-Nrf2 活性化物質の化学構造

3-2. 実験方法

3-2-1. プロテオーム解析⁷⁷⁾

本実験は、理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループで実施していただいた。以下に実験方法の概略を示す。

3-2-1-1. Cell Growth Assay

DMEM 培地 (10% FBS 添加) で培養したヒト子宮頸がん細胞 HeLa (2×10^3 cells/well) を、96-well マイクロプレートにまき、一晩接着させた後、allantopyrone A を添加し、48 時間培養した。その後、WST-8 solution を 10 μ l 加え、37°C で 1 時間培養し 450 nm の吸光度を測定した。

3-2-1-2. プロテオーム解析のための cell lysate 調製

HeLa 細胞 (3×10^5 cells) を、3 ml の培地とともに 35 mm culture dish にまき、一晩接着させてから、20 μ M allantopyrone A を添加した。18 時間処理後、細胞を氷冷した PBS で洗浄し、ラバーポリスマンを用いて剥がし、4°C、4,000 rpm、3 分間遠心して細胞を集めた。PBS で再度洗浄した後、細胞を sample buffer (7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、30 mM Tris、buffered to pH8.5) に懸濁させて sonication により破碎した。得られた cell lysate は、氷中で 1.25 U/ μ l benzonase により 60 分間処理し、4°C、12,000 rpm、3 分間の遠心による上清を回収した。

3-2-1-3. Cell lysate の蛍光標識と 2 次元電気泳動

タンパク質濃度を Bradford 法により定量し、50 μ g を 200 pmol CyDye DIGE Fluor minimal dyes を用いて標識した。サンプルを IPG ストリップ (24 cm、pH 3–10、nonlinear gradient) に rehydration によってアプライし、1 次元目の等電点電気泳動を行った。1% DTT を含む

Equilibration Buffer (6 M urea、30% glycerol、2% SDS、50 mM Tris-HCl (pH8.8)) 中で、15 分間ストリップをインキュベーションし、10% polyacrylamide gel の上部に設置し、2 次元目の SDS-PAGE を行った。泳動後、Typhoon 9400 imager を用いてゲルをスキャンし、DeCyder BVA 6.5 により解析した。その結果を、データベースの 41 種の化合物のパターンと比較し、階層的クラスター解析を行った。

3-2-2. 細胞培養

ラット副腎由来褐色細胞種細胞 PC12 (RCB0009、理研バイオリソースセンター) は、10% 非働化 FBS (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA)、10% 非働化 HS (ウマ血清) (Gibco、Invitrogen Corp., Carlsbad, USA)、1% penicillin (50 units/ml) - streptomycin (50 µg/ml) (Gibco、Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) を添加した DMEM 培地 (和光純薬工業 (株)) を用いて、37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

3-2-3. タンパク質発現解析⁵⁷⁾

PC12 細胞の cell lysate について、2-2-5 と同様の手法で行った。一次抗体は、HO-1 は Enzo Life Sciences, Inc. (New York, USA)、 α -Tubulin、Nrf2、Keap1 は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA)、PARP は Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA) からそれぞれ購入したものを用了。二次抗体は、anti-mouse IgG 抗体、anti-rabbit IgG 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, USA)、anti-goat IgG 抗体は Abcam plc (Cambridge, UK) からそれぞれ購入したものを用了。

3-2-4. 細胞分画 (核タンパク質)¹⁰²⁾

細胞を冷 PBS で洗浄し、ペレットを 100 µl の Buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 µM DTT、プロテアーゼ阻害剤カクテル Complete mini、ホ

スファターゼ阻害剤カクテル溶液 I) に懸濁させた。15 分後、10% NP-40 を 10 μ l 加え、15 秒間ボルテックスで攪拌した。その後、遠心 (1,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 min) し、上清を細胞質画分として回収した。ペレットを 100 μ l の Buffer B (20 mM HEPES (pH 7.9)、0.4 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 μ M DTT、プロテアーゼ阻害剤カクテル Complete mini、ホスファターゼ阻害剤カクテル溶液 I) に懸濁させ、2 分おきにボルテックスで攪拌しながら 15 分間氷上でインキュベートした。遠心 (20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 min) し、上清を核画分として回収した。

3-2-5. アフィニティークロマトグラフィーによる結合タンパク質の解析¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾

3-2-5-1. PC12 細胞からのタンパク質抽出

細胞培養後、PC12 細胞を氷上で遠心チューブに回収し、遠心 (3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、3 min) して培地を取り除いた。DPBS 1 ml を加え攪拌し、マイクロチューブに回収した後、遠心 (3,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 min) して上清を取り除いた。この操作を 5 回行い、細胞を洗浄した。細胞を Binding buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2.5 mM EGTA、pH 7.5) (1 mM DTT、0.1 mM MgCl₂、1% NP-40、Complete Mini を含む) に懸濁させ、4 $^{\circ}$ C で 30 min 処理することで細胞を溶解させた。これを遠心し (15,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 min)、上清をタンパク質抽出液とした。また、BCA 法によりタンパク質抽出液のタンパク質濃度を測定した。

3-2-5-2. プルダウンアッセイ

PBS (1 mM NaN₃ を含む) で保存していた、コントロールビーズと allantopyrone A 固定化ビーズを 20 μ l ずつ分注し、800 μ l の PBS を加えて遠心し (6,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、3 min)、上清を除く操作を 2 回行った。次に、600 μ l の Binding buffer (0.1 mM DTT、0.1 mM MgCl₂ を含む) を加えて遠心し (6,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、3 min)、上清を除いた。この操作を 3 回行い、各ビーズを洗浄した。

各ビーズにタンパク質抽出液 (3 mg) を加え、4°Cで 12 h、シェーカーを用いて攪拌した。その後、6,000×g、4°Cで 3 min 遠心し、上清を除いた。ビーズに 1 ml の Binding buffer (0.2% NP-40 を含む) を加えて遠心し (6,000×g、4°C、3 min)、上清を取り除く操作を 6 回行った。最後に、沈殿したビーズに SDS-PAGE sample buffer (140 mM Tris-HCl、22.4% glycerol、6% SDS、10% 2-mercaptoethanol、0.02% bromophenol blue、pH 6.8) を加えて 10 min 煮沸することでタンパク質を SDS 化するとともにビーズから溶出し、抗 Keap1 抗体を用いて western blotting により検出した。

3-2-6. 細胞内 ROS 量の測定¹⁰²⁾

細胞内 ROS 量は、ROS 反応性蛍光プローブである DCFH-DA (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA) を用いて測定した。96 well 白色プレートに PC12 細胞 (2×10^5 cells/ml) を 98 μ l 播種し、一晚培養して接着させた。その後、allantopyrone A を 1 μ l 添加して培養した。18 時間後、20 mM H₂O₂ (和光純薬工業 (株)) を 1 μ l 添加し (終濃度 200 μ M)、1 時間培養した。DCFH-DA を 5 μ M になるように添加し、30 分後、プレートリーダー (Tecan, Männedorf, Switzerland) で蛍光強度 (Ex. 530 nm / Em. 590 nm) を測定した。

3-2-7. 酸化ストレスによる細胞死の顕微鏡を用いた検出¹⁰⁷⁾

24 well マイクロプレートに PC12 細胞 (2×10^5 cells/ml) を 980 μ l 播種し、一晚培養して接着させた。その後、allantopyrone A を 10 μ l 添加して培養した。18 時間後、20 mM H₂O₂ を 10 μ l 添加し (終濃度 200 μ M)、12 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) で 5 分間処理して細胞をはがし、マイクロチューブに回収した。遠心 (3,000×g、room temperature、3 min) しながら PBS で 2 回洗浄し、上清を除いて 40 μ l DMEM 培地に懸濁させた。Hoechst 33342 ((株) 同仁化学研究所) と propidium iodide (和光純薬工業 (株)) を加え、暗所で 37°C、15 分間インキュベーションし

た。遠心 (3,000×g、room temperature、3 min) により PBS で2回洗浄した後、20 µl PBS で懸濁させたものをサンプルとした。共焦点レーザー顕微鏡 (C2、(株) ニコン) で観察することにより、全細胞の細胞核を Hoechst 33342、死細胞を propidium iodide で検出した。

3-2-8. 酸化ストレスによる細胞死における生存率の測定⁶⁸⁾

細胞生存率は、trypan blue 色素排除法により求めた。24 well マイクロプレートに PC12 細胞を 980 µl 播種し、一晚培養して接着させた。その後、allantopyrone A を 10 µl 添加して培養した。18 時間後、20 mM H₂O₂ を 10 µl 添加し (終濃度 200 µM)、12 時間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、trypsin-EDTA で 5 分間処理して細胞をはがし、マイクロチューブに回収した。遠心 (3,000×g、room temperature、3 min) しながら PBS で2回洗浄し、上清を除いて 200 µl DMEM 培地に懸濁させたものをサンプルとした。等量の 0.4w/v% trypan blue 溶液 (和光純薬工業 (株)) と混合し、染色された細胞を死細胞として速やかに顕微鏡下で計数した。

3-3. 結果

3-3-1. プロテオーム解析

はじめに、2D-DIGE を用いてプロテオーム解析を行い、allantopyrone A により誘導されるタンパク質発現変動に基づく細胞応答を調べた。階層的クラスター解析を行い、ヒートマップを作成した結果、allantopyrone A による HeLa 細胞のタンパク質変動は、ChemProteoBase に含まれる作用既知のリファレンス化合物のものと相同性は見られず、作用機序が異なることが示唆された (図 3-4)。そこで、allantopyrone A により有意に発現が変動するタンパク質を詳細に調べた。すると、様々なストレスや薬剤により発現誘導される熱ショックタンパク質群に加え、転写因子 Nrf2 の標的遺伝子産物である、aldo-keto reductase family 1 member C2、UDP-glucose 6-dehydrogenase、D-3-phosphoglycerate dehydrogenase、glutathione S-transferase P、peroxiredoxin-6 が増加するという、特徴的な変化が認められた (表 3-2)。

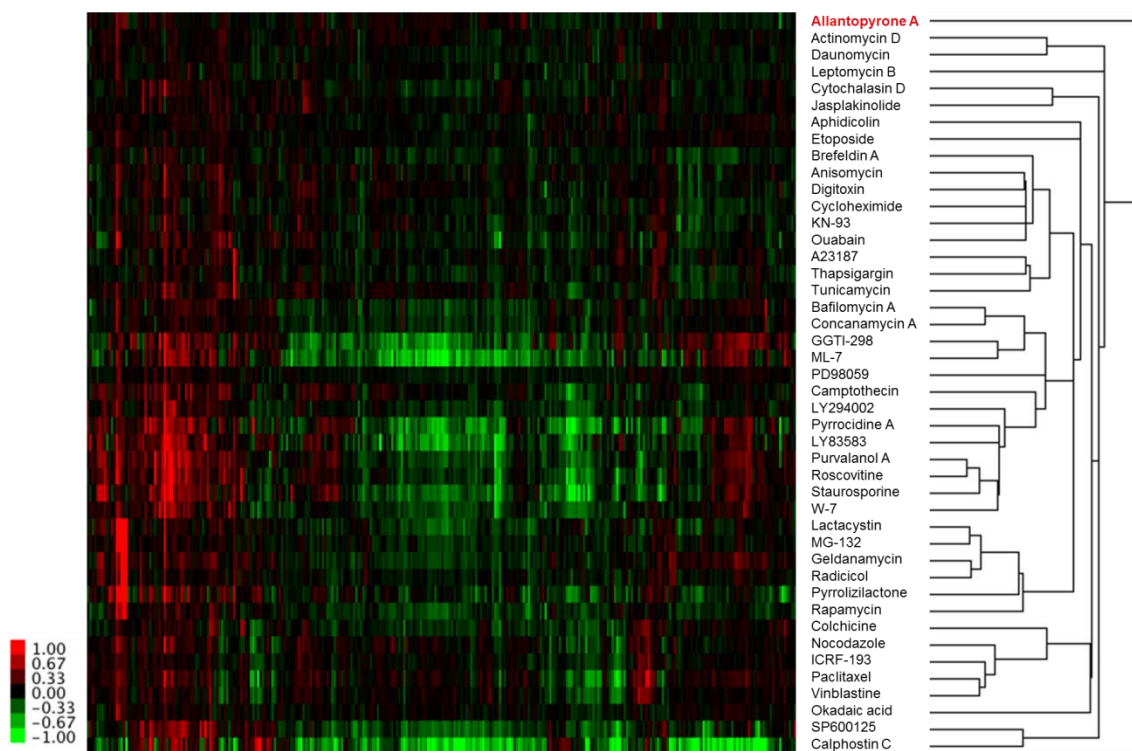


図 3-4. ChemProteoBase を用いたプロテオーム解析による各種阻害剤との比較

HeLa 細胞を用いた 2D-DIGE により、各種化合物で誘導されるタンパク質発現の増減を定量した。階層的クラスタ解析を行い、対照化合物と比較した結果をヒートマップで示した。薬剤処理によって増加したタンパク質は赤色、減少したタンパク質は緑色で表示した。

表 3-2 Allantopyrone A により発現が増加したタンパク質

Spot no	Fold ratio	UniProt Ac	Protein Name
1757	1.74 *	P04792	Heat-shock protein beta-1
949	1.56 *	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
934	1.55 *	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
1499	1.49 **	P52895	Aldo-keto reductase family 1 member C2
1975	1.42 *	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
2164	1.38 *	P41250	Glycyl-tRNA synthetase
1113	1.35 *	O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase
1754	1.35 **	P04792	Heat-shock protein beta-1
1491	1.32 *	P04083	Annexin A1
2168	1.31 **	Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protein
1138	1.21 *	O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
1579	1.18 **	Q15181	Inorganic pyrophosphatase
1756	1.16 *	P04632	Calpain small subunit 1
2242	1.16 **	P09211	Glutathione S-transferase P
1274	1.14 *	P35998	26S protease regulatory subunit 7
1779	1.10 *	P30041	Peroxiredoxin-6

Two-tailed unpaired Student's *t*-test により、タンパク質発現変動の有意差を検定した。

アスタリスクは、control 処理時に対する allantopyrone A 処理時の有意差を示す (* $P < 0.03$ 、** $P < 0.01$)。

3-3-2. 抗酸化酵素 heme oxygenase-1 に対する影響

Nrf2 は、多くの抗酸化酵素、第 II 相解毒酵素の転写調節を担っている転写因子である。

3-3-1 の結果から、allantopyrone A が Nrf2 によるタンパク質発現を促進することが示唆されたため、代表的な抗酸化酵素である heme oxygenase-1 (HO-1) のタンパク質発現に対する影響を調べた。その結果、allantopyrone A は、濃度および時間依存的に HO-1 の発現を増加させることが示された (図 3-5)。

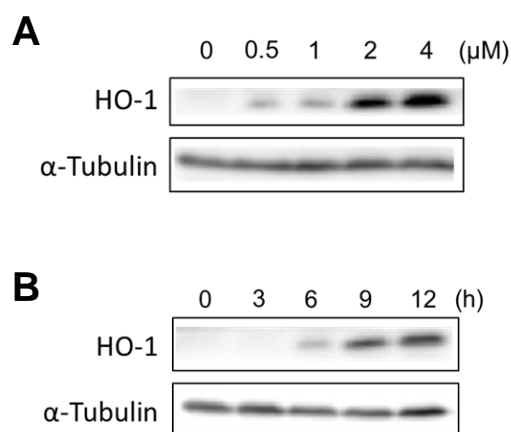


図 3-5. HO-1 のタンパク質発現に対する allantopyrone A の影響

- (A) 濃度依存性： PC12 細胞を示した濃度の allantopyrone A で 12 h 処理した。
 (B) 時間依存性： PC12 細胞を 1 μM allantopyrone A で示した時間処理した。
 それぞれの全タンパク質を抽出し、タンパク質発現量を western blotting で検出した。
 α-Tubulin は、全タンパク質の loading standard として用いた。

3-3-3. 転写因子 Nrf2 の局在

3-3-2 で、HO-1 の誘導を確認した。この HO-1 の発現調節を担う転写因子として、Nrf2 がよく知られている。Nrf2 は、Keap1-Nrf2 経路の活性化において核内に移行し、転写因子として機能する。そこで、核画分における Nrf2 のタンパク質発現量を western blotting により調べた。その結果、濃度依存的な核移行と、6 時間目を最大とした経時的な変化が認められ、allantopyrone A により Nrf2 が核へ移行することが示された (図 3-6)。

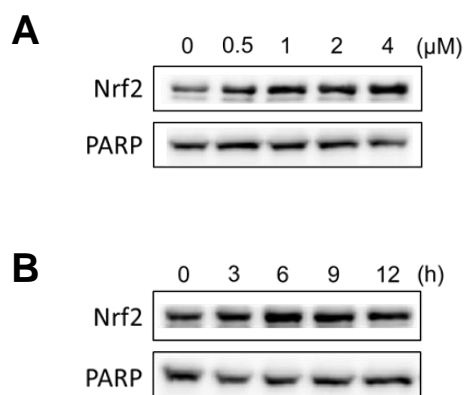


図 3-6. 核画分における Nrf2 の発現量に対する allantopyrone A の影響

- (A) 濃度依存性： PC12 細胞を示した濃度の allantopyrone A で 12 h 処理した。
 (B) 時間依存性： PC12 細胞を 1 μM allantopyrone A で示した時間処理した。
 それぞれの核タンパク質を抽出し、タンパク質発現量を western blotting で検出した。
 PARP は、核画分タンパク質の loading standard として用いた。

3-3-4. チオール化合物の影響

これまでの結果より、allantopyrone A が Keap1-Nrf2 経路を活性化することが示された。本経路の活性化剤の多くは、Keap1 を修飾することにより活性を発現することが報告されている。Keap1 は、25 個のチオール基を有する特徴的なタンパク質であり、そのチオール基が酸化される、あるいは親電子物質により修飾されると、ダイナミックな構造変化を起こし Nrf2 を解離する。Allantopyrone A は、親電子性を示すことが知られる α,β -不飽和カルボニル構造を有していることから、Keap1 のチオール基に直接結合する可能性が考えられた。そこで、allantopyrone A の作用におけるチオール基の関与を検証することを目的とし、チオール基を有する低分子化合物である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) または glutathione (GSH) を培地に添加した際の、HO-1 発現と Nrf2 局在への影響を調べる競合実験を行った。その結果、NAC と GSH は、いずれも allantopyrone A による HO-1 発現誘導と Nrf2 核移行を完全に抑制した (図 3-7)。

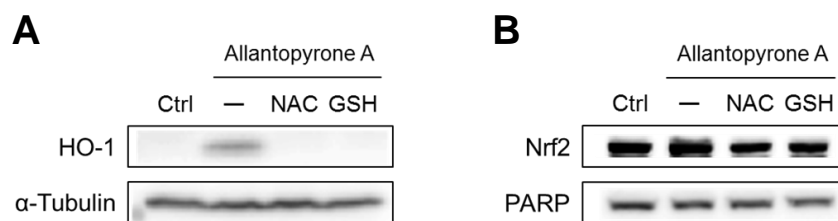


図 3-7. Allantopyrone A の作用に対する NAC と GSH の影響

PC12 細胞を 5 mM NAC または 5 mM GSH で 1 h 処理した後、1 μ M allantopyrone A で 12 h 処理した。全タンパク質(A)と核タンパク質(B)をそれぞれ抽出し、タンパク質発現量を western blotting で検出した。

3-3-5. Allantopyrone A-Keap1 付加体の検出

3-3-4 の結果から、allantopyrone A の Keap1-Nrf2 経路活性化作用には、チオール基が重要であることが示された。Keap1 に直接結合して本経路を活性化する化合物として、isothiocyanate 化合物が良く知られている。それらは、isothiocyanate 基を介して Keap1 のチオール基に共有結合するため、処理細胞の cell lysate 中の Keap1 を抗 Keap1 抗体を用いて western blotting で検出すると、高分子領域 (> 150 kDa) に付加体と考えられるバンドが出現することが報告されている^{108, 109)}。そこで、allantopyrone A 処理細胞の Keap1 を western blotting で調べた。その結果、isothiocyanate 化合物で報告されているものと同様に、150 kDa より高分子領域に、allantopyrone A の濃度依存的に生じるバンドを認めた (図 3-8)。

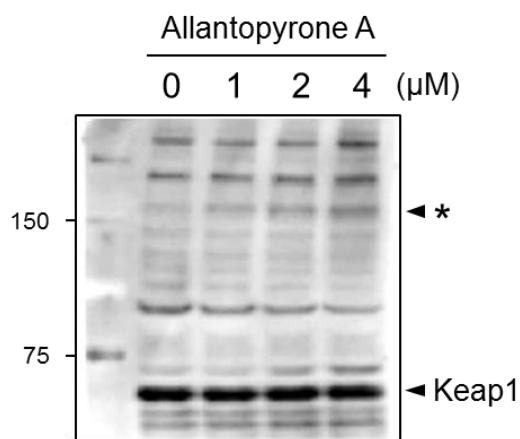


図 3-8. Allantopyrone A-Keap1 付加体の検出

PC12 細胞を示した濃度の allantopyrone A で 1 h 処理した。
全タンパク質を抽出し、western blotting により Keap1 を検出した。
アスタリスクは、Allantopyrone A-Keap1 付加体と考えられるバンドを示す。

3-3-6. Allantopyrone A 固定化担体を用いた Keap1 との結合解析

3-3-5 の結果から、allantopyrone A が Keap1 と結合すること、その結合が共有結合であることが強く示唆された。そこで、allantopyrone A 固定化担体を作成し、アフィニティークロマトグラフィーにより Keap1 との結合を検証することとした。ただし、低分子リガンドとタンパク質が共有結合する場合、担体からのタンパク質の溶出が困難であり検出できない場合が多いため、リンカー切断型ビーズを利用した (図 3-9)¹⁰⁵⁾。この担体は、リンカー部分にジスルフィド結合が導入されており、2-mercaptoethanol や dithiothreitol などの還元剤で処理することにより、タンパク質を解離させることができる。この担体に allantopyrone A を固定化し、PC12 細胞の cell lysate に対して pull down 実験を行い、抗 Keap1 抗体を用いた western blotting に供することで、結合タンパク質に Keap1 が含まれるか否かを調べた。その結果、allantopyrone A 固定化担体においてのみ Keap1 との結合が示された。さらに、遊離の allantopyrone A 存在下における競合実験ではそのバンドが消失したことから、確かに allantopyrone A と Keap1 が結合することが確認された (図 3-10)。

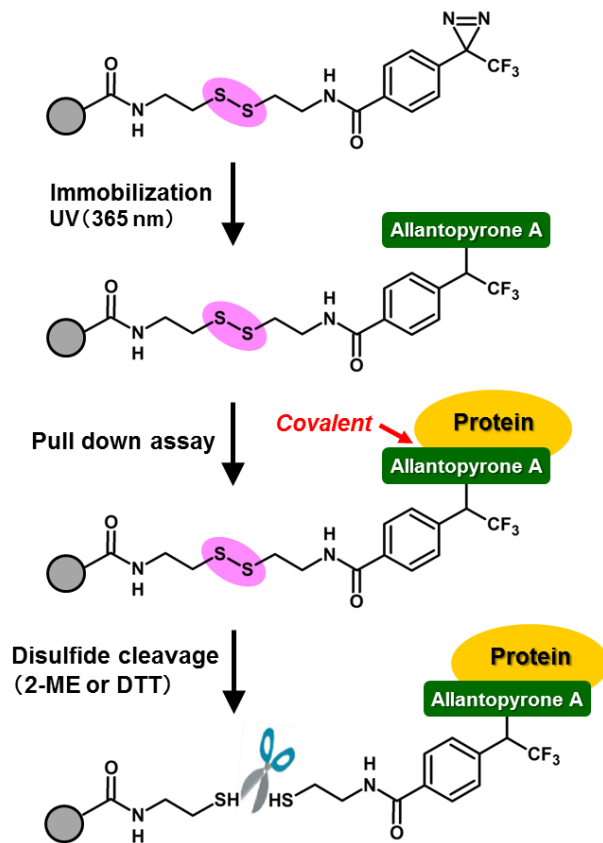


図 3-9. リンカー切断型ビーズの概略

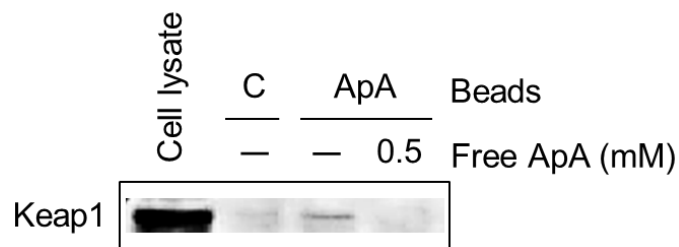


図 3-10. Allantopyrone A と Keap1 の結合

PC12 細胞の全タンパク質から、allantopyrone A 固定化担体を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、結合タンパク質を精製した。担体から溶出させた結合タンパク質について、抗 Keap1 抗体を用いて western blotting を行い Keap1 との結合を検出した。

3-3-7. 細胞内 ROS レベルに対する抑制効果

ここまでの結果から、allantopyrone A は Keap1 と直接共有結合することにより、Keap1-Nrf2 経路を活性化することが示された。Keap1-Nrf2 経路は、多くの抗酸化酵素の発現を誘導することで、酸化ストレスを抑制することが知られている¹¹⁰⁾。そこで、ROS 応答性蛍光プローブである DCFH-DA を用い、H₂O₂ による細胞内 ROS レベルの上昇に対する allantopyrone A の効果を検討した。その結果、allantopyrone A で前処理をすることにより、H₂O₂ による細胞内 ROS レベルの上昇が有意に抑制されることを確認した (図 3-11)。

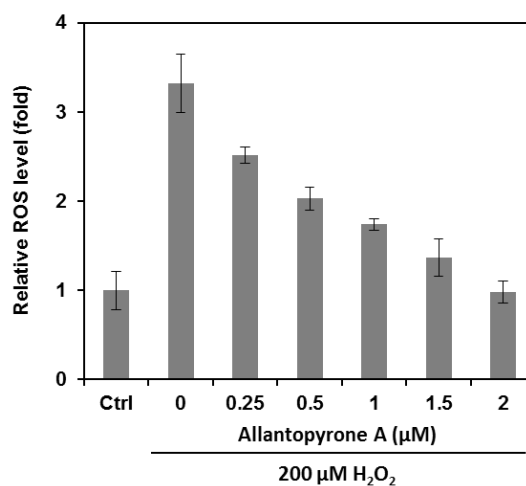


図 3-11. 細胞内 ROS レベルに対する影響

PC12 細胞を、示した濃度の allantopyrone A で 18 h 前処理した。その後、200 μM H₂O₂ を添加した。1 h 後、5 μM DCFH-DA を加えて 30 min 静置し、プレートリーダーで蛍光強度 (Ex./Em. = 530/590 nm) を測定した。

3-3-8. H_2O_2 誘導性細胞死に対する抑制効果

3-3-7の結果から、allantopyrone A で前処理をすると H_2O_2 による細胞内 ROS レベルが抑制されることが示された。酸化ストレスは細胞死を誘導することから、allantopyrone A の前処理により H_2O_2 誘導性の細胞死も抑制されることが予想された。そこで、共焦点レーザー顕微鏡による propidium iodide (PI) 陽性の死細胞の検出と trypan blue 色素排除法による生存率の測定を行った。その結果、 H_2O_2 単独処理では PI 陽性の死細胞が多く見られるが、allantopyrone A の濃度に依存して死細胞が減少した (図 3-12A)。このことは trypan blue 色素排除法でも示され、 H_2O_2 による細胞生存率の低下は、allantopyrone A により抑制された (図 3-12B)。この作用が、直接的な抗酸化作用であるか否かを確認するために、 H_2O_2 との共処理も行った。抗酸化剤である NAC は共処理でも H_2O_2 による細胞死を完全に抑制したが、allantopyrone A は前処理を行ったときのみ細胞死を抑制した。このことから、allantopyrone A の酸化ストレス抑制作用は間接的であることが確認された (図 3-12C)。

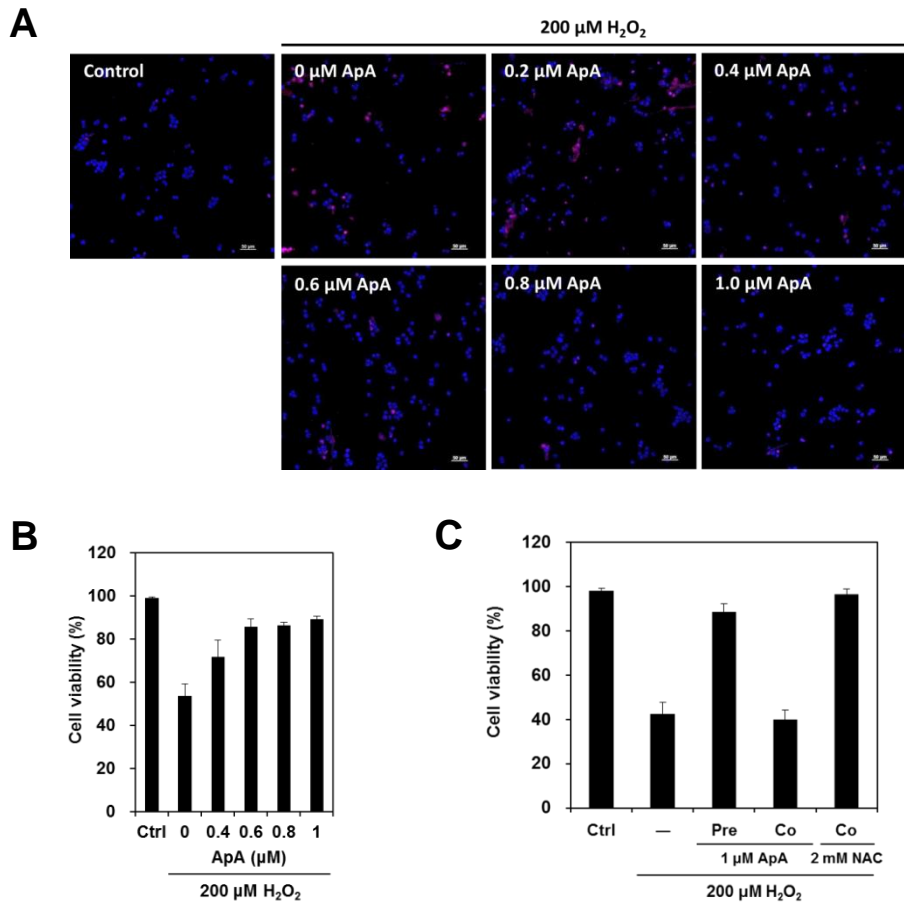


図 3-12. H_2O_2 誘導性細胞死に対する抑制効果

(A) 核の形態観察：PC12 細胞を、示した濃度の allantopyrone A で 18 h 前処理した。その後、200 μM H_2O_2 を添加した。12 h 後、Hoechst 33342 (細胞核)、propidium iodide (死細胞) で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(B) 細胞生存率：(A)と同じ処理を行い、trypan blue 色素排除法により細胞生存率を測定した。

(C) 前処理と共処理による作用の比較：PC12 細胞を、allantopyrone A で 18 h 前処理した後に H_2O_2 を添加して 12 h 培養したもの (Pre) と、allantopyrone A または NAC と H_2O_2 を同時添加したもの (Co) について、trypan blue 色素排除法により細胞生存率を測定した。

3-4. 考察

Allantopyrone A は、塩野らにより植物内生糸状菌 *Allantophomopsis lycopodina* KS-97 株から単離された新規 α -pyrone 化合物である⁹⁵⁾。我々はこれまでに、HL60 細胞に対する強力な細胞毒性や、A549 細胞における NF- κ B 阻害作用⁹⁶⁾ を報告してきた。Allantopyrone A は、分子内に α,β -不飽和カルボニル構造を有しており、この構造は種々の細胞内タンパク質と高い反応性を示すことが知られている¹¹¹⁾。しかし、allantopyrone A が直接結合して作用する標的分子は明らかとなっていなかったため、標的分子の解明を目的とした。

まず、プロテオーム解析を行い、allantopyrone A により引き起こされる HeLa 細胞のタンパク質の発現変動を指標に細胞応答を調べた。その結果、allantopyrone A の処理により、HSP70 などの熱ショックタンパク質群と、転写因子 Nrf2 の標的遺伝子産物が増加するという明らかな傾向を認めた。熱ショックタンパク質群は、高温ストレスや種々の化学物質によるストレスに応答して、発現が誘導されることが知られている¹¹²⁾。一方、Nrf2 の転写標的遺伝子産物の増加は特徴的であったため、Keap1-Nrf2 経路に及ぼす影響を詳細に解析することとした。Nrf2 は、約 250 種以上の抗酸化酵素、第 II 相解毒酵素の遺伝子発現を調節している転写因子であり、酸化ストレスを中心とする種々のストレスから細胞を保護するシステムとして認識されている⁹⁷⁾。酸化ストレスは、特に神経変性疾患に関わることが知られるため、神経細胞のモデルとして用いられるラット副腎由来褐色細胞腫 PC12 細胞を用いて、Keap1-Nrf2 経路に対する allantopyrone A の作用を解析した。まず、Nrf2 により発現誘導される代表的な抗酸化酵素で、Keap1-Nrf2 経路の活性化作用の指標として用いられる heme oxygenase-1 (HO-1) のタンパク質発現量を解析した。その結果、allantopyrone A により、濃度依存的、時間依存的に HO-1 のタンパク質レベルが増加することがわかった。そこで、HO-1 の発現誘導を担う Nrf2 の局在を調べたところ、細胞質から核へ移行していることが示された。これらのことから、allantopyrone A は、Nrf2 の核移行を誘導し、その結果 HO-1 の発現が増加したものと考えられ、Keap1-Nrf2 経路を活性化していることが強く示唆され

た。Keap1 は、Nrf2 のユビキチンリガーゼアダプタータンパク質として機能しており、常に分解を促進しているため Nrf2 の発現量は低く保たれている。一方、Keap1 は分子内に 25 個のチオール基を持つ特徴的なタンパク質で、このいずれかが酸化または化学修飾を受けると、Keap1 の立体構造はダイナミックに変化し、Nrf2 との結合能を喪失する。その結果、Nrf2 は分解を免れるとともに核移行が可能となり、転写因子として機能する。多くの Keap1-Nrf2 活性化物質は、Keap1 のチオール基に直接結合することで作用を発現していることが知られている。その反応機構は、主に親電子性の官能基である α,β -不飽和カルボニル構造やイソチオシアネート基などとチオールと基の、Michael 付加反応による共有結合である。Allantopyrone A も α,β -不飽和カルボニル構造を有していることから、同様の反応を介して Keap1 に直接結合している可能性が考えられた。そこで、チオール基を持つ N-acetyl-L-cysteine (NAC) または glutathione (GSH) を共存させて、Keap1 のチオール基と競合させることで、allantopyrone A の作用が打ち消されるか否かを検討した。その結果、allantopyrone A による HO-1 の誘導と Nrf2 の核移行は、いずれも NAC または GSH の存在下で完全に打ち消された。よって、allantopyrone A は Keap1 のチオール基に直接結合している可能性が強く示唆された。Keap1 に直接結合することが知られている、6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MSITC)¹⁰⁸⁾ と 6-methylthiohexyl isothiocyanate (6-MTITC)¹⁰⁹⁾ において、処理細胞の Keap1 を western blotting にて検出すると、高分子領域 (> 150 kDa) にイソチオシアネート類との付加体と考えられるバンドが出現することが報告されている。そこで、allantopyrone A も Keap1 に直接結合した場合、同様のバンドが見られると考えられたため、allantopyrone A で処理した PC12 細胞の Keap1 を western blotting で検出した。その結果、予想通りに 150 kDa より高分子側の位置に、allantopyrone A の濃度に依存して濃く現れるバンドを認めた。通常、タンパク質と薬剤の結合が水素結合のような弱い結合の場合、その結合はサンプルの SDS 化の段階でタンパク質の立体構造が失われることにより解離する。一方、このバンドは SDS-PAGE で電気泳動したサンプルで検出されていることから、イソチ

オシアネート類の場合と同様に共有結合的な強い結合であることが示唆された。以上の結果から、allantopyrone A は Keap1 と直接結合する可能性が高いと判断し、アフィニティークロマトグラフィーを用いて allantopyrone A と Keap1 との結合を検証することとした。薬剤とタンパク質が共有結合する場合、一般にその結合は極めて強固であるため、担体からの溶出が困難であり検出されないことが多い。そこで本研究では、担体のリンカー部分（樹脂と固定化リガンドの間のスペーサー部分）にジスルフィド結合を導入した、リンカー切断型ビーズを利用した¹⁰⁵⁾。この担体は、還元剤存在下でジスルフィド結合が切断されるため、タンパク質、リガンド、リンカーの一部が結合したまま、担体から解離・溶出させることができ、タンパク質とリガンドの結合が共有結合で解離できない場合でも検出が可能となる（図 2-9）。この担体を用いて、PC12 細胞の cell lysate から結合タンパク質を精製し、抗 Keap1 抗体を用いた western blotting を行うことで、結合タンパク質中に Keap1 が含まれるか否かを検討した。その結果、allantopyrone A を固定化していないコントロールビーズと比較して、固定化ビーズのみで Keap1 のバンドが検出された。さらに、結合反応の際に、遊離の allantopyrone A を高濃度（0.5 mM）で共存させることで、その結合が競合され妨害されるかを調べた。その結果、競合実験では結合が消失したことから、確かに allantopyrone A と Keap1 が結合していることが示された。Keap1 のチオール基のうち、Cys151、Cys273、Cys288 は特に反応性が高く、その機能に大きく寄与していることが知られている¹¹³⁾。また、Keap1-Nrf2 経路の活性化物質は、それぞれ修飾するチオール基が異なることが報告されている。例えば、sulforaphane は Cys151、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ は Cys273/288 を主に修飾する。Allantopyrone A がどのチオール基を標的とするかという点については、本研究では明らかになっておらず、今後さらに詳細な解析が必要となる。

Keap1-Nrf2 経路は、多くの抗酸化酵素の発現に関わることから、内因性の抗酸化システムとしても重要な役割を担っている。酸化ストレスは、がんや神経変性疾患を含むさまざまな疾患に深く関与している。酸化ストレスが関与する疾患として、多発性硬化症（multiple

sclerosis) があり、中枢神経(脳、脊髄、視神経)に繰り返し炎症がおきる病気で、視力障害、感覚障害、運動麻痺、平衡障害などの症状を呈し、再発・寛解を繰り返す¹¹⁴⁾。この疾患において生じる脱ミエリン化という現象は、酸化ストレスが原因となると考えられている。この発症メカニズムを標的として開発された多発性硬化症治療薬が dimethyl fumarate (Tecfidera[®])であり、本薬剤は Keap1-Nrf2 経路を活性化することで酸化ストレスを抑制し、脱ミエリン化を阻害する¹¹⁵⁾。現在までに承認されている Keap1-Nrf2 経路活性化薬は dimethyl fumarate のみであるが、加齢黄斑変性、緑内障、糖尿病性腎症、さらには難聴など、酸化ストレスが関与する非常に多様な疾患に対して Keap1-Nrf2 活性化剤の有効性が明らかとなりつつある¹¹⁶⁾。このような背景に基づき、allantopyrone A の Keap1-Nrf2 経路活性化作用が細胞レベルで機能しているかを検証することを目的とし、酸化ストレス抑制効果について解析を行った。まず、allantopyrone A で前処理することによる H₂O₂ 暴露後の細胞内 ROS レベルを測定した結果、allantopyrone A の濃度に依存して抑制された。H₂O₂ は、酸化ストレスを介して細胞死を誘導する。そこで、H₂O₂ による細胞死に対する抑制効果を検討した。その結果、H₂O₂ 単独処理では顕著な細胞死が誘導されるが、前処理した allantopyrone A の濃度に依存して、その細胞死は抑制されることが認められた。H₂O₂ による細胞死は、H₂O₂ 自体を消去するような抗酸化剤でも当然抑制される。そこで、allantopyrone A による細胞死の抑制が直接的な抗酸化作用によるものか、あるいは、Keap1-Nrf2 経路活性化作用による間接的な作用によるものかを検証するため、H₂O₂ との同時処理を行い細胞生存率を測定した。その結果、直接的な抗酸化剤である NAC は H₂O₂ との同時処理でも細胞死を完全に抑制した。一方、allantopyrone A は、H₂O₂ との同時処理では細胞死を抑制せず、前処理の場合のみ抑制効果を示すことが判明した。このことから、酸化ストレスに対する allantopyrone A の細胞保護効果は、Keap1-Nrf2 経路活性化作用と矛盾しない間接的な抗酸化作用であることが強く示唆された。

以上の結果から、植物内生糸状菌が産生する allantopyrone A は、Keap1 と直接結合するこ

とにより生体防御機構 Keap1-Nrf2 経路を活性化すること、さらに、酸化ストレスから細胞を保護することを明らかにした。Keap1-Nrf2 経路は、第 II 相解毒酵素を誘導することにより、化学発がんを抑制することが知られている。したがって、allantopyrone A は、HL60 細胞において見られるがん細胞に対する細胞死誘導作用と、本研究で示唆された化学発がん抑制作用を介して、治療と予防の双方から多面的な抗がん作用を有している可能性が期待される。

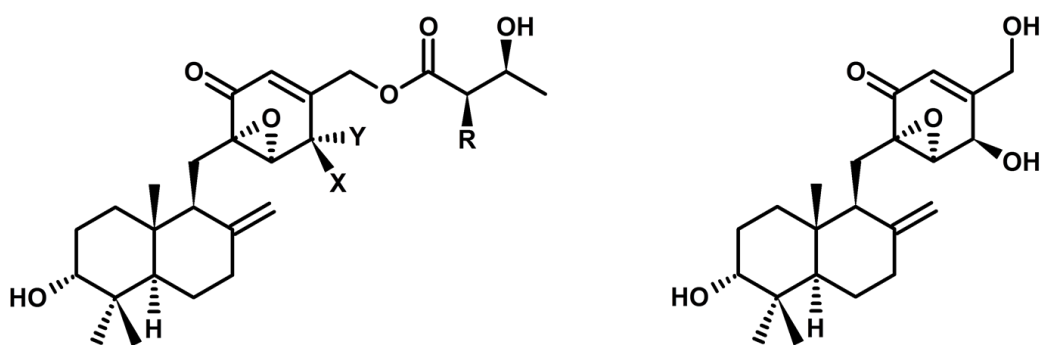
第4章

白神山地で分離した糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 が産生する
neomacrophorin 類のプロテアソーム阻害作用

4-1. 緒言

4-1-1. Neomacrophorin 類

環境中には多様な微生物が存在しており、気温等の違いにより構成する微生物が異なることが知られている。我々は、調査があまりなされていない微生物からの新規生物活性物質の探索を目的とし、青森県と秋田県にまたがる地域に位置する世界遺産である白神山地に注目し、そこで分離した微生物から得られる化合物の新たな機能性の探索研究を行ってきた。白神山地はブナに覆われている寒冷な地域であり、特徴的な気候である。特徴的な環境に存在する微生物は独自の化合物を産生することが知られており、実際、白神山地で分離した *Trichoderma crassum* の培養物からは、新規物質である 7- β -hydroxy CAF-603 並びに 10- β -hydroxy CAF-603 も見出されている¹¹⁷⁾。最近、弘前大学白神自然観察園で採取した *Daedaleopsis tricolor* (チャカイガラタケ) に寄生する糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 より、新規物質 neomacrophorin I - V の構造が明らかにされた¹¹⁸⁾ (図 4-1)。これらの化合物は、drimenyl cyclohexane 骨格を共通して持ち、I - IV はヒドロキシ酪酸、I、IV は epoxyquinone、II、III、V は epoxysemiquinone を分子内に含んでいる。Neomacrophorin 類の生物活性については、I のヒト大腸がん細胞 COLO201 に対する弱い細胞毒性が明らかとなっているのみであり、I - V の構造活性相関や標的分子に関する比較検討は行われていない。今回、neomacrophorin 類の HL60 細胞に対する細胞毒性の結果から、それぞれの構造的特徴に基づき活性に大きな差異があることを見出したため、構造活性相関とともに標的分子を明らかにすることを目的とした。



Neomacrophorin I (1) : R = OH, X = Y = O
 Neomacrophorin II (2) : R = X = OH, Y = H
 Neomacrophorin III (3) : R = H, X = OH, Y = H
 Neomacrophorin IV (4) : R = H, X = Y = O

Neomacrophorin V (5)

図 4-1. Neomacrophorin 類の化学構造

4-1-2. 細胞内タンパク質分解系

細胞は、絶えずタンパク質の合成と分解を繰り返しながら、正常な生命機能を維持しており、タンパク質の合成と分解のバランスが適切に保たれることが極めて重要となる。細胞内における異常タンパク質の蓄積は、神経変性疾患を中心とする種々の疾患に関与していることが知られ、タンパク質分解系の異常が発症につながると考えられている¹¹⁹⁾。主要な細胞内タンパク質分解機構としては、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系がある。これらを中心とするタンパク質分解系により、細胞内のタンパク質ホメオスタシス（プロテオスタシス）は適切に保たれる¹²⁰⁾。

本研究で扱うユビキチン・プロテアソーム系について、詳細に述べる。ユビキチンは、76 アミノ酸からなる小さなタンパク質である。ユビキチン化はタンパク質翻訳後修飾の1種であり、E1（活性化酵素）、E2（結合酵素）、E3（ユビキチンリガーゼ）という3種の酵素を介して、ユビキチンがタンパク質に結合する。このユビキチン化においてユビキチンリガーゼが基質特異性を識別するため、特定のタンパク質の分解を促すことができる。そして、ユビキチンは脱ユビキチン化酵素により基質タンパク質から取り除かれて再利用される¹²¹⁾。ユビキチン化には多様な機能が存在することが近年明らかとなってきたが、主要な機能はタンパク質分解の識別シグナルである^{122, 123)}。ユビキチン化されたタンパク質は、タンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームに認識され、分解される。このタンパク質分解を担うのは、26S プロテアソームと呼ばれる、66 個のサブユニットから構成される2.5 MDa の巨大なタンパク質複合体である。26S プロテアソームは、20S プロテアソームと19S 調節因子が会合したもので、前者はタンパク質分解、後者は基質タンパク質の認識に関与している。20S プロテアソームは、 $\alpha 1 \sim \alpha 7$ サブユニットで構成される α リングと、 $\beta 1 \sim \beta 7$ サブユニットで構成される β リングが $\alpha\beta\alpha$ の順に積み重なった樽状の構造をとっている。そして、内部に露出している $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ サブユニットにより、プロテアソーム内を通過するタンパク質が分解される¹²⁴⁾（図 4-2）。

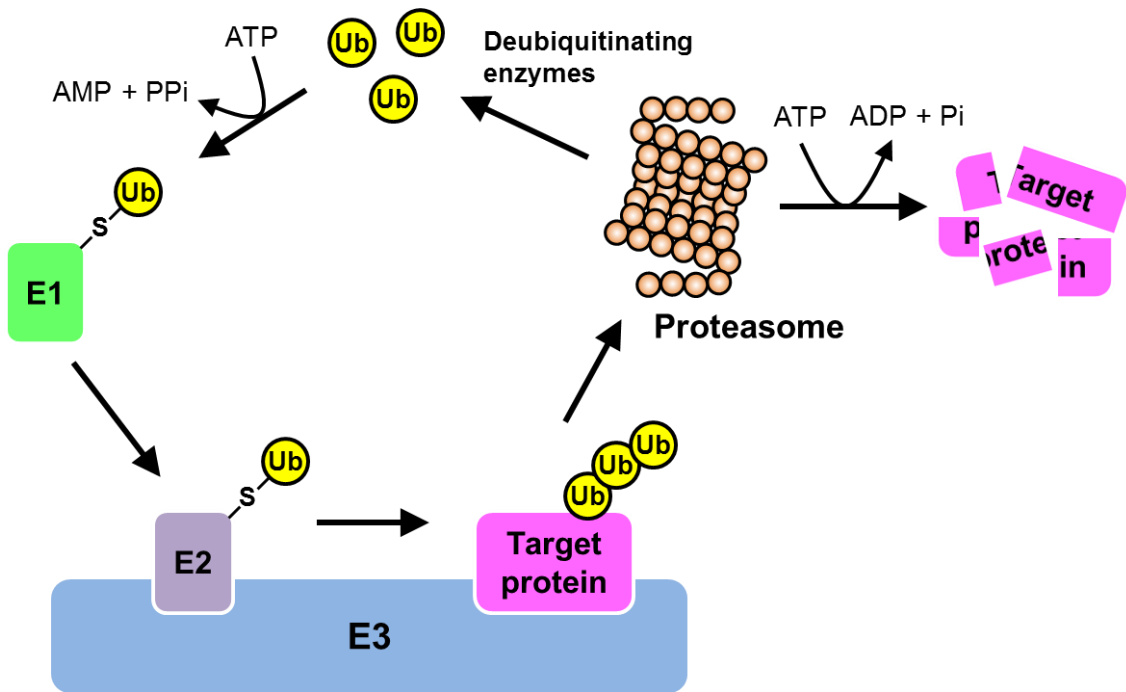


図 4-2. ユビキチン・プロテアソーム系

4-2. 実験方法

4-2-1. 細胞培養

ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 (RCB0041, 理研バイオリソースセンター) は、10% 非働化 FBS (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA)、1% penicillin (50 units/ml) - streptomycin (50 µg/ml) (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) を添加した RPMI1640 培地 (和光純薬工業 (株)) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

4-2-2. 細胞毒性^{67,68)}

MTT assay または trypan blue 色素排除法により測定した。方法は、それぞれ 2-2-3、3-2-8 に記載した通りに行った。

4-2-3. DNA 断片化解析⁵⁷⁾

HL60 細胞を 24 well マイクロプレートに播き、neomacrophorin 類を添加し、37°C で一定時間培養した。培養した HL60 細胞を氷上でマイクロチューブに回収し、遠心 (3,000 rpm、4°C、3 min) して培地を除いた。DPBS 500 µl を加えて攪拌し、遠心 (3,000 rpm、4°C、3 min) して上清を除き、細胞を洗浄した。細胞ペレットに DNA 抽出用 Lysis buffer (100 mM Tris-HCl、25 mM EDTA、0.2% SDS、0.1% RNase A、pH 8.0) を 180 µl 加え攪拌後、50°C で 1 h インキュベーションした。次に、10 mg/ml proteinase K (和光純薬工業 (株)) を 20 µl 加え攪拌後、再度 50°C で 1 h インキュベーションした。5M NaCl を 87 µl 加えてよく攪拌し、氷上で 30 min 静置した後、遠心 (15,000×g、4°C、20 min) し、上清 220 µl を回収した。この上清に -20°C の 100% エタノール 220 µl を加え、転倒混和することで DNA を沈殿させた。再び遠心 (15,000×g、4°C、10 min) して上清を除き、-20°C の 70% エタノールを 500 µl 加え、遠心 (15,000×g、4°C、10 min) して上清を除いた。DNA を乾燥させた後、TE buffer (pH 8.0) 40 µl に溶解し、アガロースゲル電気泳動用のサンプルとした。アガロースゲル電気泳動は、

以下の方法で行った。Agarose III ((株) 同仁化学研究所) 1 g に TBE (Tris-Borate-EDTA) バッファー (タカラバイオ (株)) を 50 ml を加え、電子レンジで加熱溶解して泳動槽内に流し入れ、室温で固めることにより 2% アガロースゲルを作成した。電気泳動用サンプル 5 μ l に、6 \times Loading Buffer Triple Dye (和光純薬工業 (株)) 1 μ l を加えた各サンプル 6 μ l と、DNA 分子量マーカー (和光純薬工業 (株)) 1 μ l をそれぞれウェル内にアプライし、50 V で 90 分間泳動した。電気泳動後、10 mg/ml ethidium bromide (和光純薬工業 (株)) 10 μ l を MQ 水 100 ml に加え、溶解したエチジウムブロマイド水溶液にゲルを浸し、シェーカー上で攪拌しながら 2 時間染色した。TBE バッファーで 2 時間脱色を行った後、UV (254 nm) 照射条件下で撮影した。

4-2-4. タンパク質発現解析⁵⁷⁾

HL60 細胞の cell lysate について、2-2-5 と同様の手法で行った。一次抗体は、Ub、caspase-3 は Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)、 α -Tubulin は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA) からそれぞれ購入したものをを用いた。二次抗体の anti-mouse IgG 抗体、anti-rabbit IgG 抗体は、Cell Signaling Technology (Danvers, USA) から購入したものをを用いた。

4-2-5. *in vitro* プロテアソーム阻害アッセイ^{125, 126)}

プロテアソーム阻害活性は、市販のヒト赤血球由来 20S プロテアソーム (Boston Biochem, Cambridge, MA, USA) と、3 種の酵素活性に対する各蛍光基質 (chymotrypsin 様活性 : Suc-LLVY-MCA、trypsin 様活性 : Boc-LRR-MCA、caspase 様活性 : Z-LLE-MCA) ((株) ペプチド研究所) を用いて測定した。96 well 白色マイクロプレートに MQ 水 36 μ l、assay buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 mM EDTA、0.035% SDS (trypsin 様活性はなし)) 50 μ l、5 μ g/ml proteasome、サンプル 2 μ l を入れ、30 $^{\circ}$ C で 10 分間プレインキュベーションした。その後、各蛍光基質 2 μ l を添加して 30 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベーションし、プレートリーダー (Infinite

F200 PRO、Tecan、Männedorf、Switzerland) で遊離した MCA の蛍光強度を測定 (Ex. 360 nm / Em. 460 nm) することにより、プロテアソーム活性を求めた。

4-2-6. NACM との結合実験¹²⁷⁾

PBS : MeOH = 7 : 3 の溶媒中 (PBS には neomacrophorin 類が完全に溶解しないため) で、それぞれ終濃度 1 mM neomacrophorin 類と 10 mM NACM になるように混合し、反応液を速やかに HPLC (880-PU、MD-910、日本分光 (株)) で分析した (カラム: CAPCELL PAK C18 (4.6 mm ϕ \times 150 mm)、流速: 1.0 ml/min、移動相: 65% MeOH、波長: 205 nm、注入量: 10 μ l)。

また、同様に調製したサンプルを、LC-MS により解析した。分析機器は、Prominence UFLC system ((株) 島津製作所) と、LTQ Orbitrap XL (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)) を利用した。カラムは Hypersil GOLD (2.1 mm ϕ \times 50 mm) を用い、それぞれ 5 μ l 注入し、55% MeOH を移動相として流速 0.2 ml/min で分析した。質量分析は、ESI 法の positive モードでイオン化し、以下の条件で測定した (Capillary temperature: 275°C、Sheath gas flow: 8、Source voltage: 5 kV、Source current: 100 μ A、Capillary voltage: 49 V)。

4-3. 結果

4-3-1. 細胞毒性と構造活性相関

HL60 細胞に対する、neomacrophorin 類の細胞毒性を MTT アッセイにより測定した。Neomacrophorin I、III、IV、V はいずれも濃度依存的に細胞生存率を低下させ、それぞれの IC_{50} 値は、2.12、11.30、0.92、22.99 μM であった (図 4-3)。

この細胞毒性活性に基づき、構造活性相関を検討した。活性の強かった I と IV は、共通してキノン型であった。特に、III と IV は、前者がセミキノール型、後者がキノン型の違いのみであり他の部分は同じであるが、IV のほうが III より約 12 倍強いことから、キノン型であることが活性に重要であることが示された。また、同じセミキノール型である III と V を比較すると、V の方が約 2 倍活性が弱かった。このことから、両者の差はヒドロキシ酪酸の有無によることが示唆された。

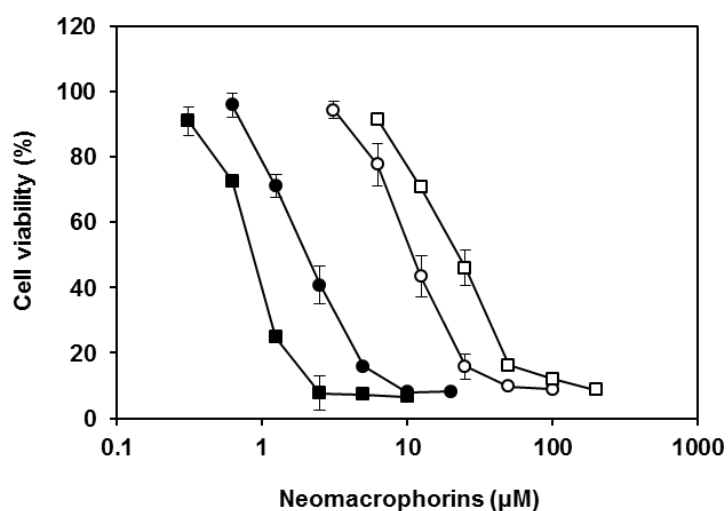


図 4-3. Neomacrophorin 類の HL60 細胞に対する細胞毒性

HL60 細胞に neomacrophorin 類を作用させ、48 h 培養した。
その後、MTT assay により細胞毒性を測定した (n=3)。

4-3-2. アポトーシス誘導作用

Neomacrophorin 類による、HL60 細胞に対する細胞毒性の特徴を明らかにすることとした。顕微鏡観察下で、neomacrophorin 類がいずれもアポトーシスに特徴的なアポトーシス小体を誘導したことから、アポトーシスを誘導することが示唆された。そこで、他のアポトーシスの特徴である DNA 断片化と caspase-3 の切断を調べた。まず、DNA 断片化をアガロースゲル電気泳動により検出したところ、neomacrophorin 類はいずれも濃度依存的に DNA 断片化を誘導することが示された (図 4-4A)。また、caspase-3 の断片化も同様に誘導した (図 4-4B)。また、それらの濃度は、細胞毒性と一致するパターンであり、IV、I、III、V の順番で強かった。Caspase-3 の切断が見られたが、アポトーシスには caspase を介さない経路も存在する。そこで、pan-caspase 阻害剤である z-VAD-fmk との併用による DNA 断片化への影響を解析した。その結果、neomacrophorin 類による DNA 断片化は、z-VAD-fmk 存在下では顕著に抑制された (図 4-4C)。したがって、neomacrophorin 類は、HL60 細胞に対して caspase 依存的なアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

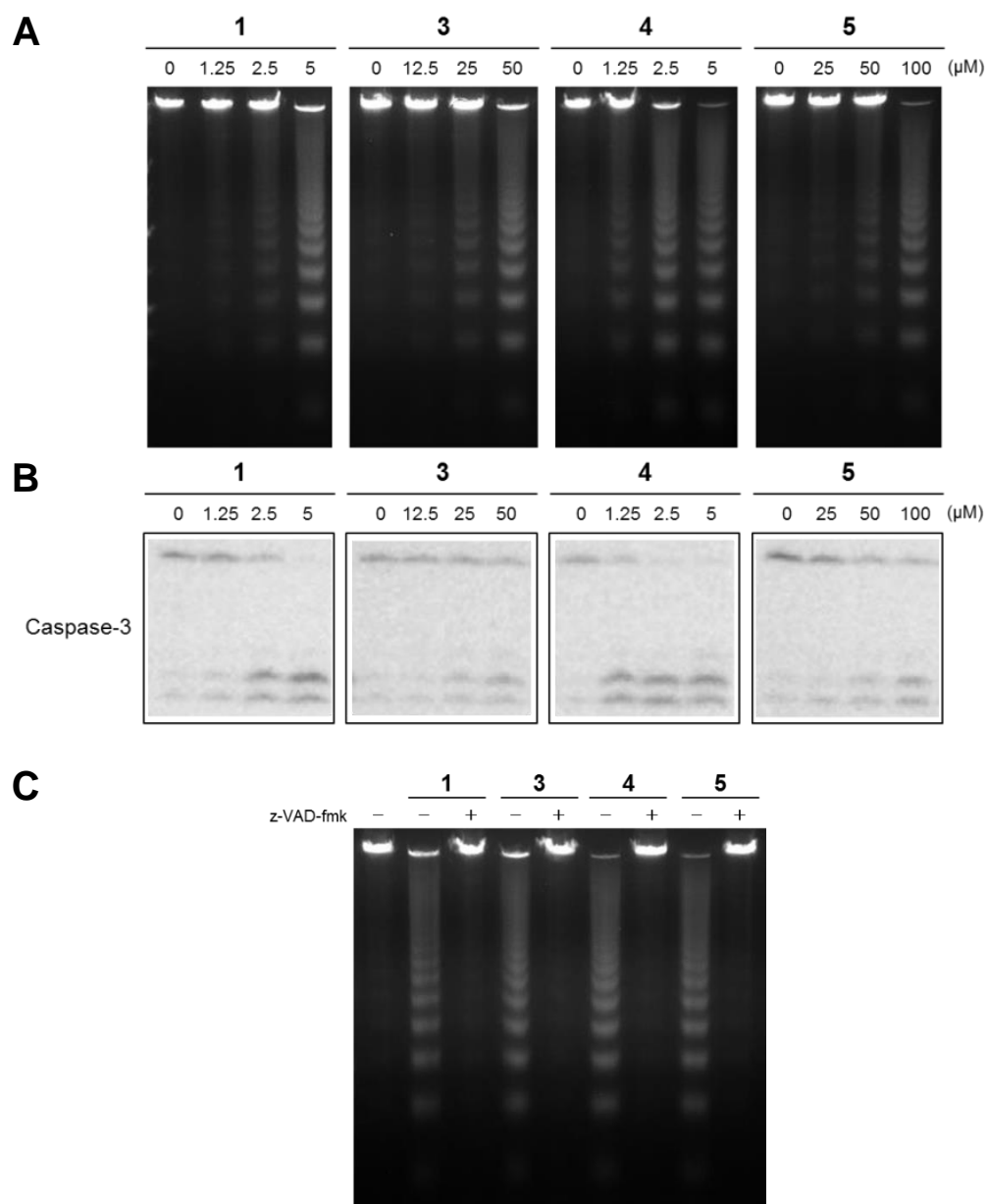


図 4-4. Neomacrophorin 類のアポトーシス誘導作用

(A) DNA 断片化作用：HL60 細胞を、neomacrophorin 類で 4 h 処理した。細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片化を検出した。

(B) Caspase-3 活性化作用：HL60 細胞を、neomacrophorin 類で 4 h 処理した。細胞から全タンパク質を抽出し、western blotting により caspase-3 を検出した。

(C) DNA 断片化に対する pan-caspase 阻害剤 z-VAD-fmk の影響：HL60 細胞を、50 μM z-VAD-fmk で 1 h 前処理した後、neomacrophorin 類で 4 h 処理した。細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片化を検出した。

4-3-3. プロテアソーム阻害作用

Neomacrophorin 類は、特に I と IV が HL60 細胞に対して比較的強い細胞毒性を示すことが判明した。そこで、作用機序の解明を行うこととした。Neomacrophorin 類と側鎖は異なるが類似の骨格を有する epoxyphomalin A、B において、プロテアソーム阻害作用が報告されているため、neomacrophorin 類のプロテアソームに対する作用を解析した¹²⁸⁾。プロテアソームは、細胞内タンパク質分解酵素複合体であり、chymotrypsin 様、trypsin 様、caspase 様の 3 種の酵素活性を有している。そこで、それぞれに対する neomacrophorin 類の作用を測定した。その結果、neomacrophorin I、III、IV は、chymotrypsin 様活性と caspase 様活性を濃度依存的に阻害することが判明した。一方、neomacrophorin V は、いずれも阻害活性を示さなかった。これらの結果を図 4-5 に、また、IC₅₀ 値を表 4-1 に示した。

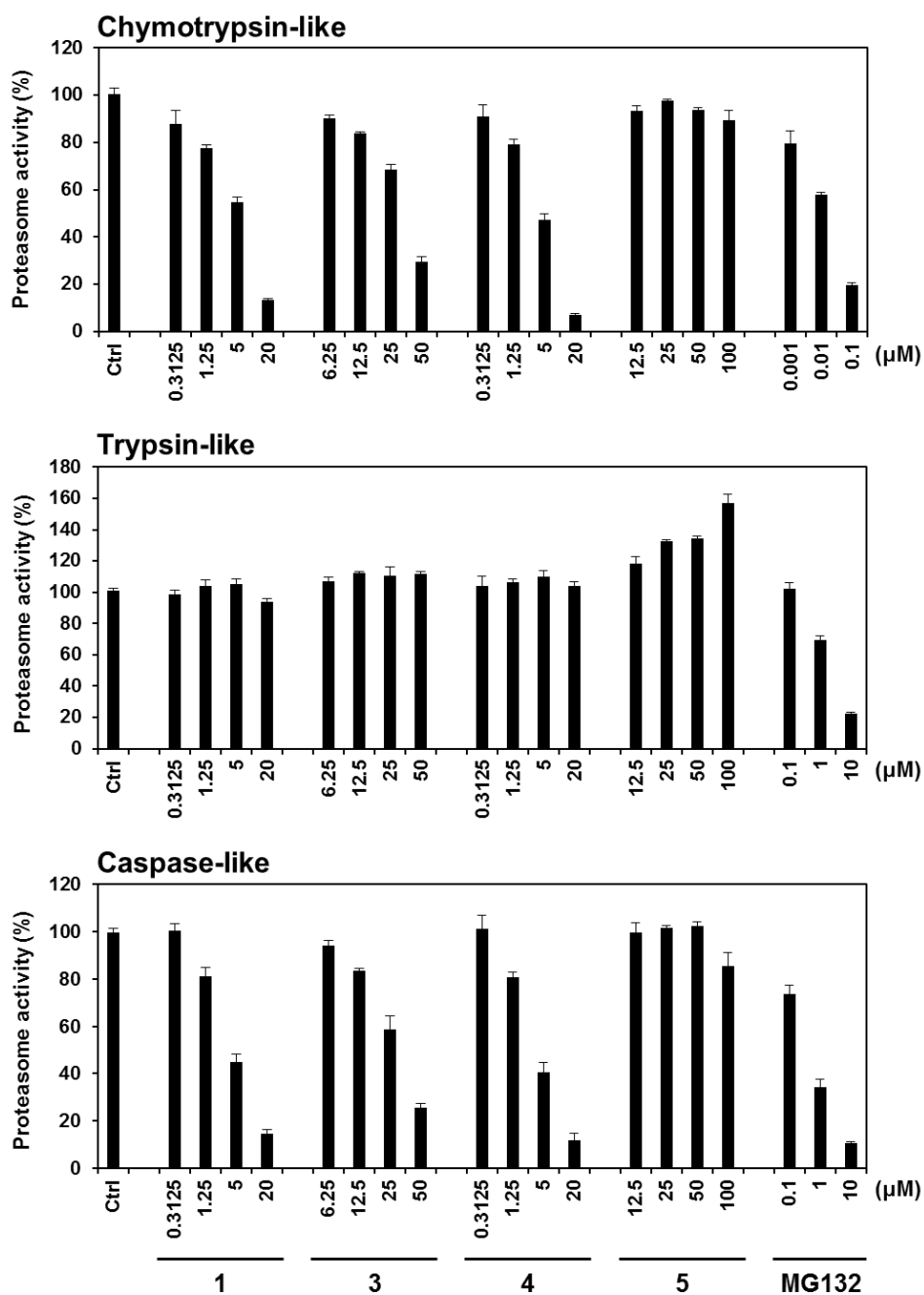


図 4-5. Neomacrophorin 類のプロテアソーム阻害活性

ヒト赤血球由来の 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、プレートリーダーで蛍光強度 (Ex. 360 / Em. 460 nm) を測定し、neomacrophorin 類によるプロテアソーム阻害活性を求めた。プロテアソーム阻害剤である MG132 は、ポジティブコントロールとして用いた。

表 4-1 Neomacrophorin 類のプロテアソーム阻害活性の IC₅₀

	IC ₅₀ (μM)		
	Chymotrypsin-like	Trypsin-like	Caspase-like
1	6.7	>20	4.5
3	36.8	>50	31.5
4	4.7	>20	4.1
5	>100	>100	>100
MG132	0.03	1.9	0.6

4-3-4. ユビキチン化タンパク質蓄積作用

4-3-3 で、neomacrophorin 類がプロテアソームを酵素レベルで阻害することを見出した。プロテアソームは、ユビキチン-プロテアソーム系を介して、ユビキチン化された細胞内の不要タンパク質や異常タンパク質の分解を担っている。したがって、プロテアソームの阻害は、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、neomacrophorin 類が細胞レベルでプロテアソームを阻害しているか検証することを目的とし、抗ユビキチン抗体を用いた western blotting により、細胞内のユビキチン化タンパク質量を測定した。その結果、neomacrophorin I と IV が濃度依存的に顕著なユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導し、III もわずかながら濃度依存的に蓄積させた。一方、酵素レベルでプロテアソームを阻害しなかった V は、細胞レベルでもユビキチン化タンパク質を全く蓄積させなかった (図 4-6)。この結果は、細胞毒性、酵素レベルでのプロテアソーム阻害活性の強さと平行であった。また、neomacrophorin V のみがプロテアソームを阻害しなかったことから、側鎖のヒドロキシ酪酸が活性に重要であることが明らかとなった。

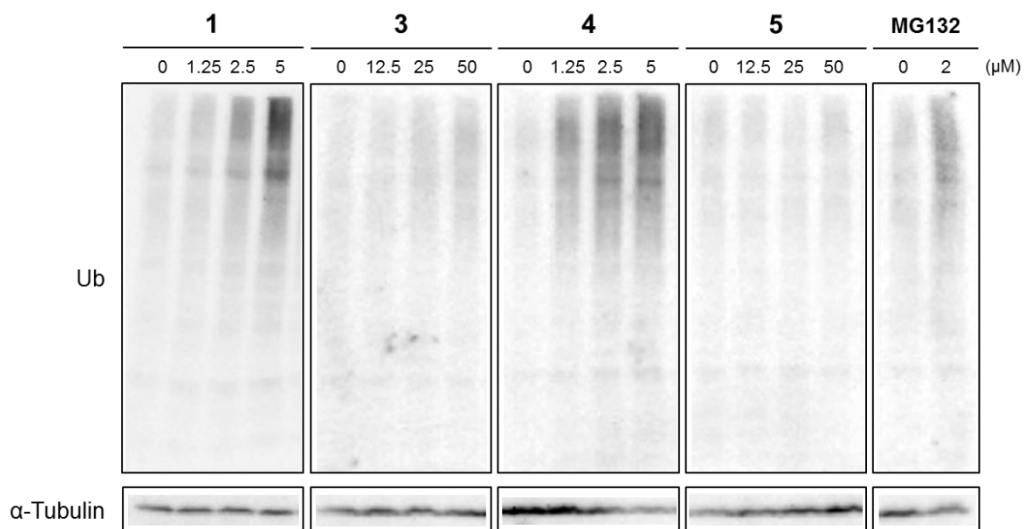


図 4-6. Neomacrophorin 類のユビキチン化タンパク質蓄積作用

HL60 細胞を neomacrophorin で 4 h 処理し、全タンパク質を抽出した。ユビキチン化タンパク質と α -tubulin の発現量を western blotting にて検出した。

4-3-5. Neomacrophorin 類の細胞毒性とアポトーシスに対するチオール化合物の影響

4-3-1 で示した neomacrophorin 類の構造活性相関の結果から、細胞毒性の強かった I と IV に共通して存在するキノン構造が、活性に重要であることが示された。この部分には、 α,β -不飽和カルボニル構造とエポキシケトン構造が存在しており、これらの構造は有機化学的に親電子性、すなわちチオール基等の求核基による共有結合による付加反応を示すことが知られている。そこで、これらの部位が生物活性に寄与しているかを調べるため、チオール化合物である NAC との併用による細胞毒性と、アポトーシスに対する影響を解析した。その結果、5 mM NAC との併用により、neomacrophorin I、IV が誘導する HL60 細胞に対する細胞毒性と caspase-3 の切断は、いずれも完全に抑制された (図 4-7)。

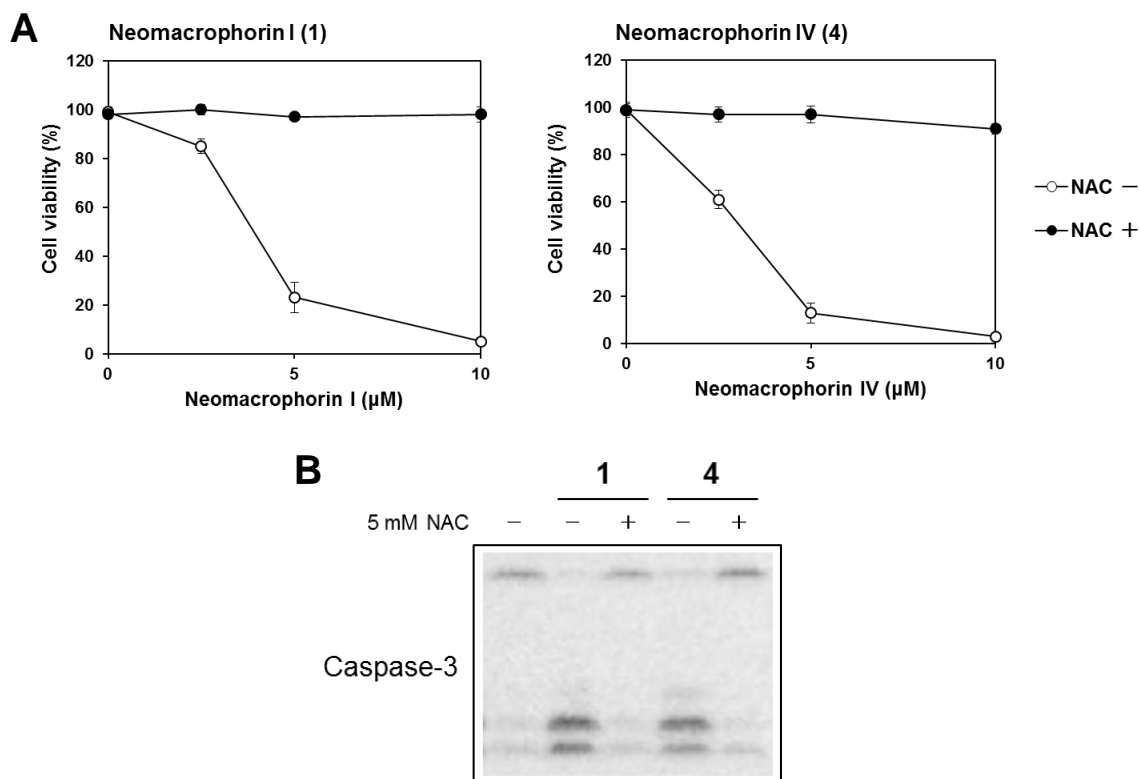


図 4-7. Neomacrophorin 類の細胞毒性とアポトーシスに対する NAC の影響

(A) 細胞生存率: HL60 細胞を 5 mM NAC で 1 h 前処理した後、neomacrophorin で 4 h 処理した。細胞生存率を trypan blue 色素排除法で測定した (n=3)。

(B) Caspase-3 の切断: HL60 細胞を 5 mM NAC で 1 h 前処理した後、neomacrophorin 類で 4 h 処理した。細胞から全タンパク質を抽出し、western blotting により caspase-3 を検出した。

4-3-6. Neomacrophorin 類のユビキチン化タンパク質蓄積に対するチオール化合物の影響

4-3-5 で、NAC により neomacrophorin 類の細胞毒性が著しく抑制されることが明らかとなった。プロテアソーム阻害作用も同様に親電子性を介したものであれば、ユビキチン化タンパク質の蓄積も NAC で抑制されることになる。そこで、NAC との併用によるユビキチン化タンパク質の蓄積に及ぼす影響を western blotting で調べた。その結果、細胞毒性や caspase-3 の切断と同様に、ユビキチン化タンパク質の蓄積も、5 mM NAC の存在下で完全に抑制されることが明らかとなった (図 4-8)。

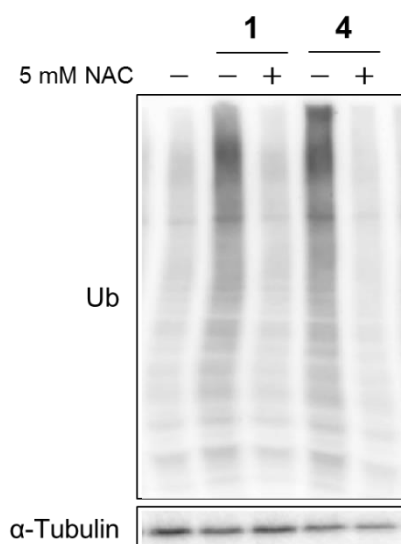


図 4-8. ユビキチン化タンパク質の蓄積に対する NAC の影響

HL60 細胞を 5 mM NAC で 1 h 前処理した後、neomacrophorin で 4 h 処理した。全タンパク質を抽出し、タンパク質発現量を western blotting で検出した。

4-3-7. Neomacrophorin 類とチオール化合物の結合性

4-3-5 および 4-3-6 の結果から、neomacrophorin 類の生物活性はチオール化合物である NAC の存在下では消失することが判明した。Neomacrophorin 類は分子内に α,β -不飽和カルボニル構造とエポキシケトン構造を有することから、求核性官能基を有するチオール化合物と直接結合することにより、活性が消失した可能性が考えられた。そこで、neomacrophorin 類と NAC methyl ester (NACM) との結合性を LC-MS で調べた。

Neomacrophorin I は、HPLC 分析において保持時間 17.9 min に検出されたが、NACM と混合した直後に分析したところ元のピークは消失し、保持時間 9.0 min、28.1 min に新たな 2 つのピークが生じた(図 4-9)。MS 解析により、元の neomacrophorin I は total ion chromatogram の保持時間 16.2 min に分子量 476.2 ($[M+H^+]=477.24$ 、 $[M+Na^+]=499.23$ 、 $[M+K^+]=515.20$) のピークを認めた(図 4-10、4-11)。NACM と混合することにより新たに生じた生成物の分子量を解析した結果、total ion chromatogram (図 4-12) の保持時間 7.9 min のピーク A は 710.3 ($[M+H^+]=711.30$ 、 $[M+Na^+]=733.28$ 、 $[M+K^+]=749.25$) (図 4-13)、保持時間 28.0 min のピーク B は 533.2 ($[M+H^+]=534.25$ 、 $[M+Na^+]=556.23$ 、 $[M+K^+]=572.21$) (図 4-14) であることが示された。

一方、neomacrophorin IV は、保持時間 28.4 min に検出された。NACM と混合した直後に分析したところ、保持時間 9.0 min に新たなピークが生じるとともに、元の neomacrophorin IV の保持時間より少し早い 28.1 min にピークが認められた(図 4-9)。MS 解析により、元の neomacrophorin IV は total ion chromatogram の保持時間 27.5 min に分子量 460.2 ($[M+H^+]=461.25$ 、 $[M+Na^+]=483.23$ 、 $[M+K^+]=499.21$) のピークを認めた(図 4-15、4-16)。NACM と混合することにより新たに生じた生成物の分子量を解析した結果、total ion chromatogram (図 4-17) の保持時間 7.8 min のピーク C は 710.3 ($[M+H^+]=711.30$ 、 $[M+Na^+]=733.28$ 、 $[M+K^+]=749.25$) (図 4-18)、保持時間 27.6 min のピーク D は 533.2 ($[M+H^+]=534.25$ 、 $[M+Na^+]=556.23$ 、 $[M+K^+]=572.21$) (図 4-19) であることが示された。

これらの結果から、neomacrophorin I と IV を NACM と反応させた際に生じた付加体は、HPLC の保持時間と MS スペクトルが一致したことから、共通のものであることが強く示唆された。また、I および IV と比較して活性が弱かった III および V については、NACM と混合した際に元のピークが顕著に減少するような明確な変化は認められなかった(図4-8)。したがって、生物活性の強さと NACM との化学的反応性の高さが同じ傾向であることが示された。

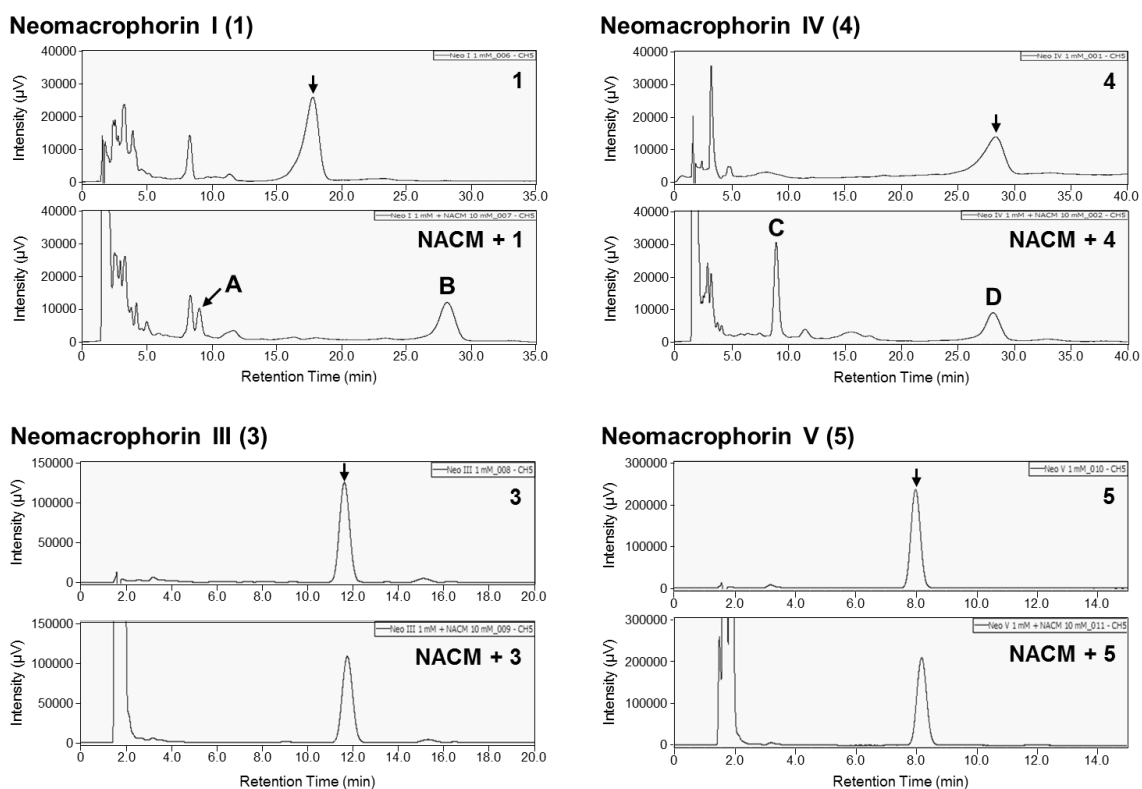


図4-9. Neomacrophorin 類と NACM の反応における HPLC 分析結果

PBS:MeOH = 7:3 の溶液中で、1 mM neomacrophorin と 10 mM NACM になるように混合し、すぐに HPLC で分析した (Capcell pak C18, 4.6 ϕ \times 150 mm, 65% MeOH, 1 ml/min)。それぞれの元のピークに矢印を付した。

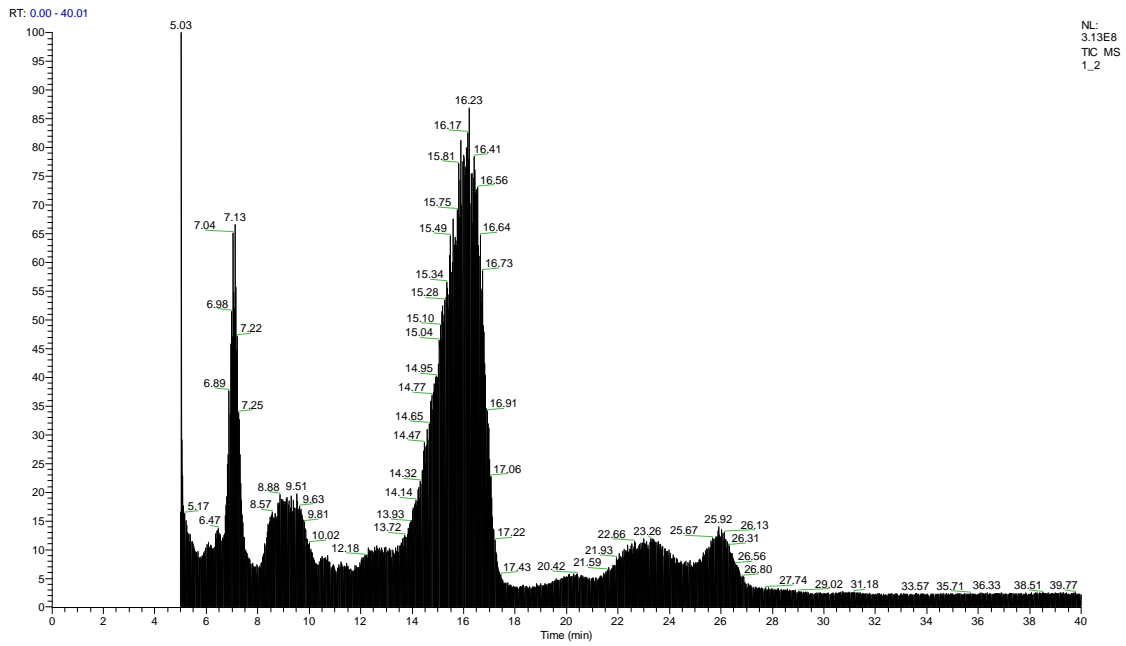


図 4-10. Neomacrophorin I の total ion chromatogram

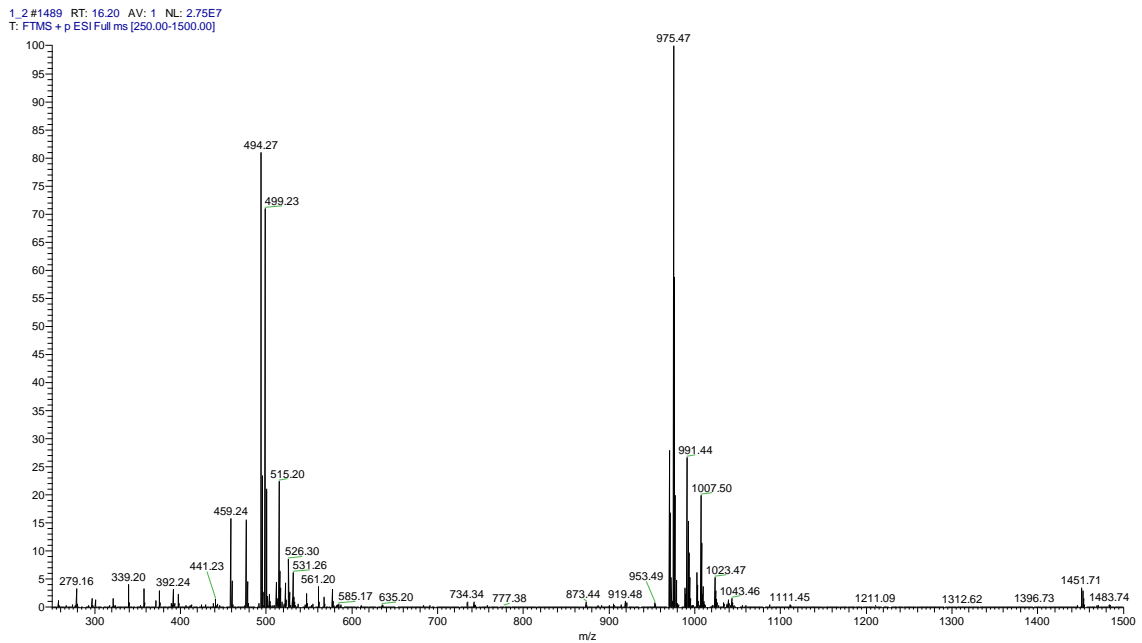


図 4-11. Neomacrophorin I の MS スペクトル

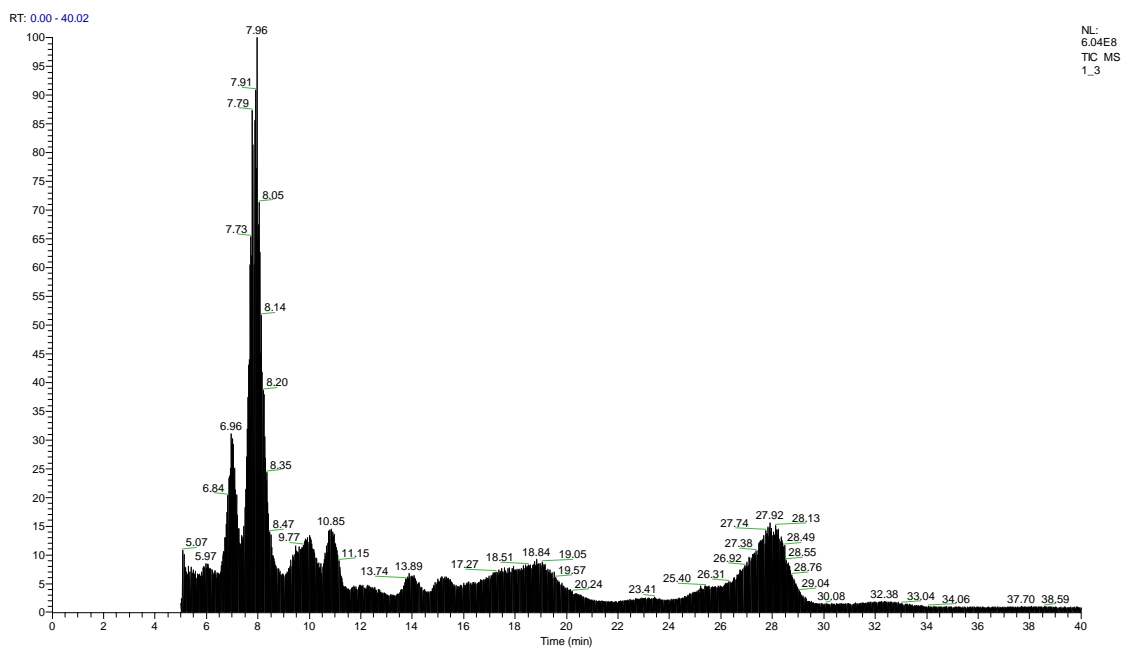


図 4-12. Neomacrophorin I + NACM 混合液の total ion chromatogram

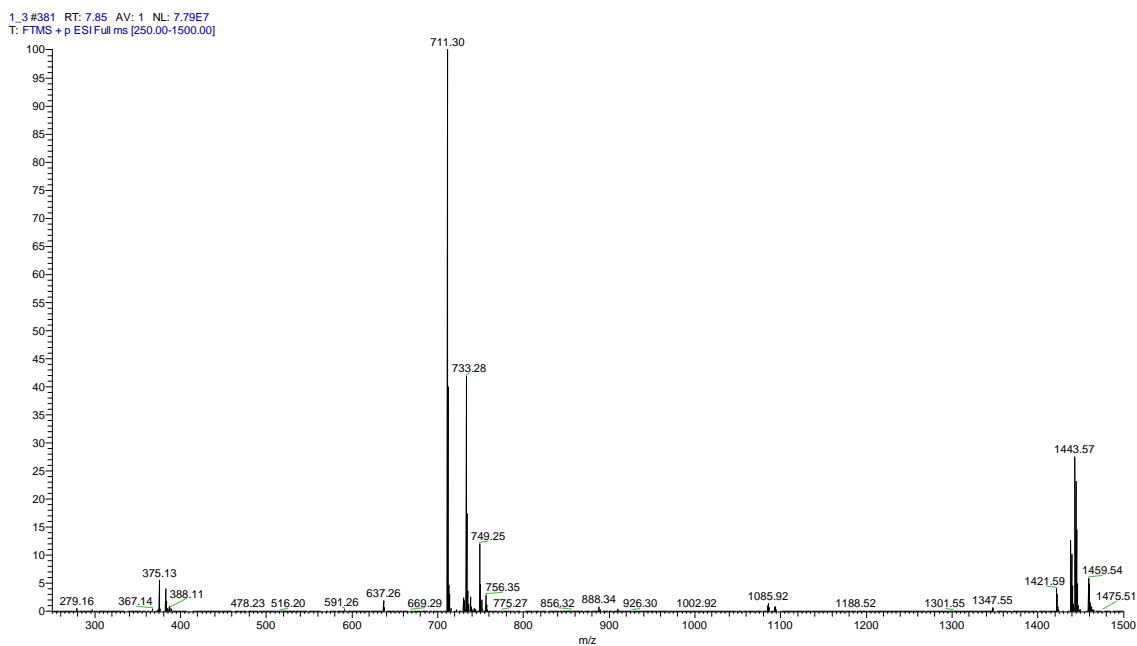


図 4-13. Neomacrophorin I + NACM 混合液 (Rt = 7.85 min) の MS スペクトル

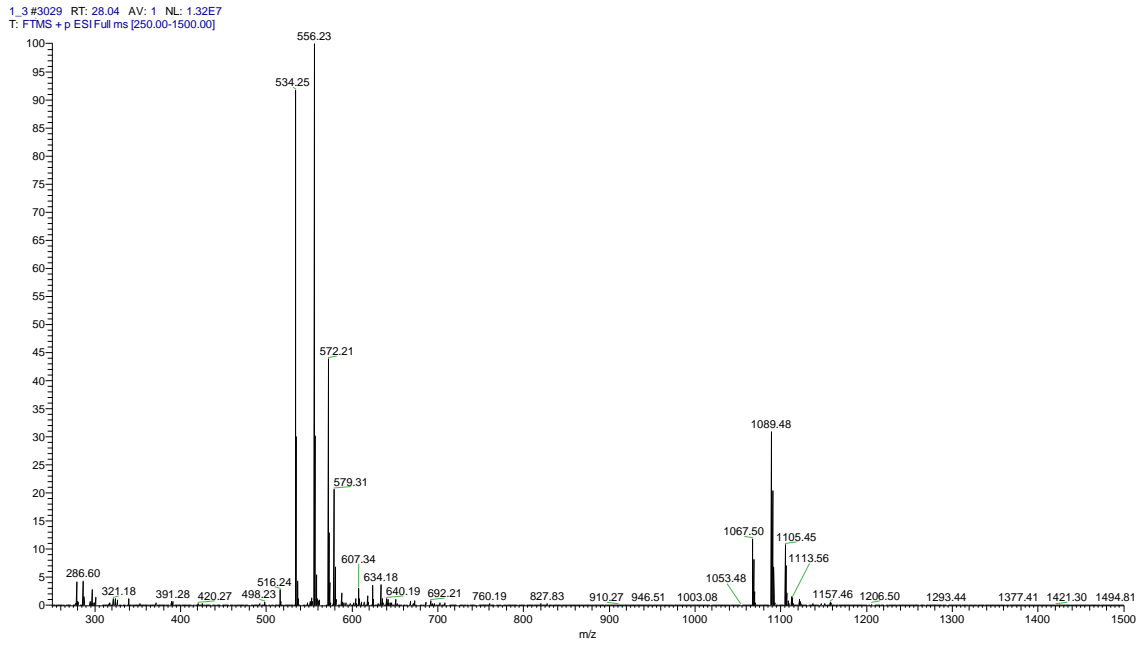


図 4-14. Neomacrophorin I + NACM 混合液 (Rt = 28.04 min) の MS スペクトル

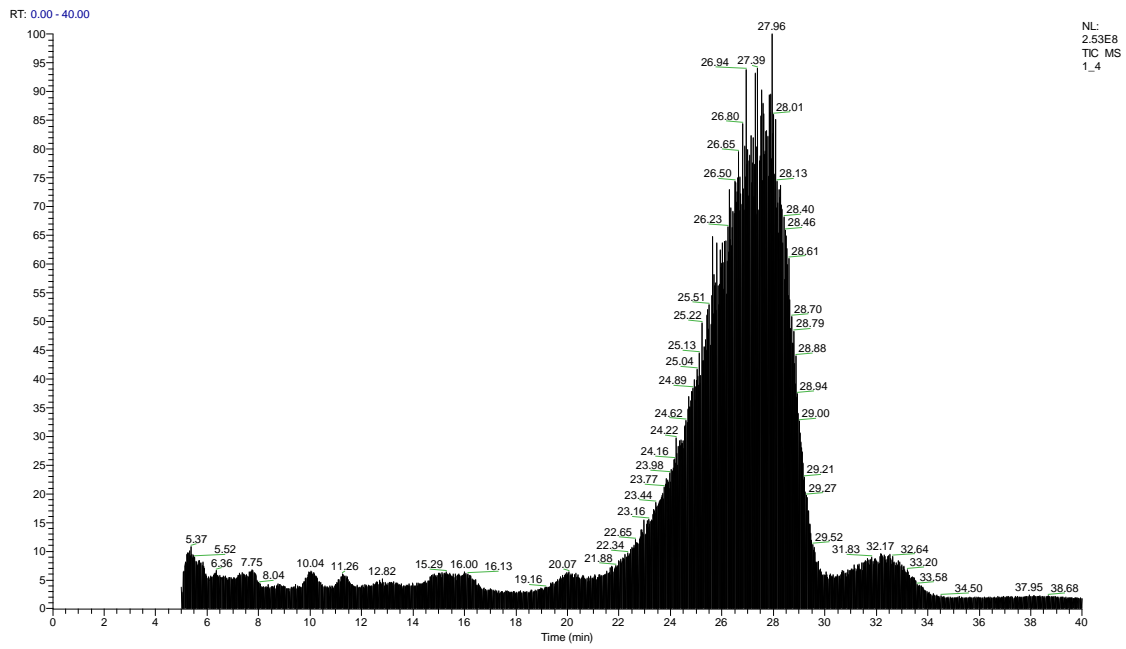


図 4-15. Neomacrophorin IV の total ion chromatogram

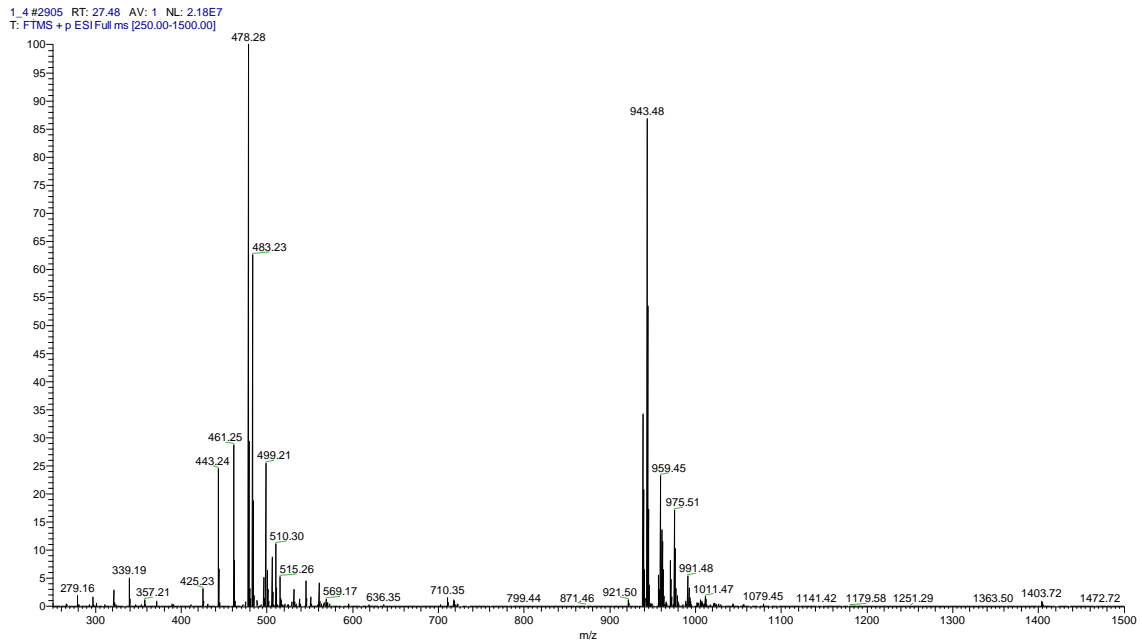


図 4-16. Neomacrophorin IV の MS スペクトル

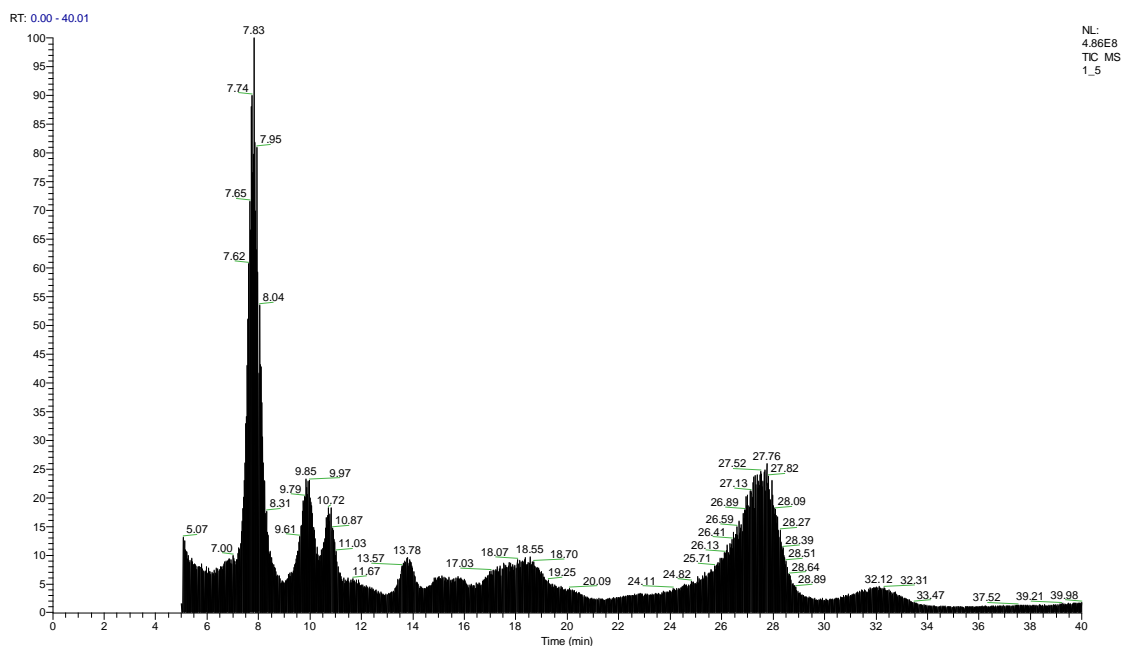


図 4-17. Neomacrophorin IV + NACM 混合液の total ion chromatogram

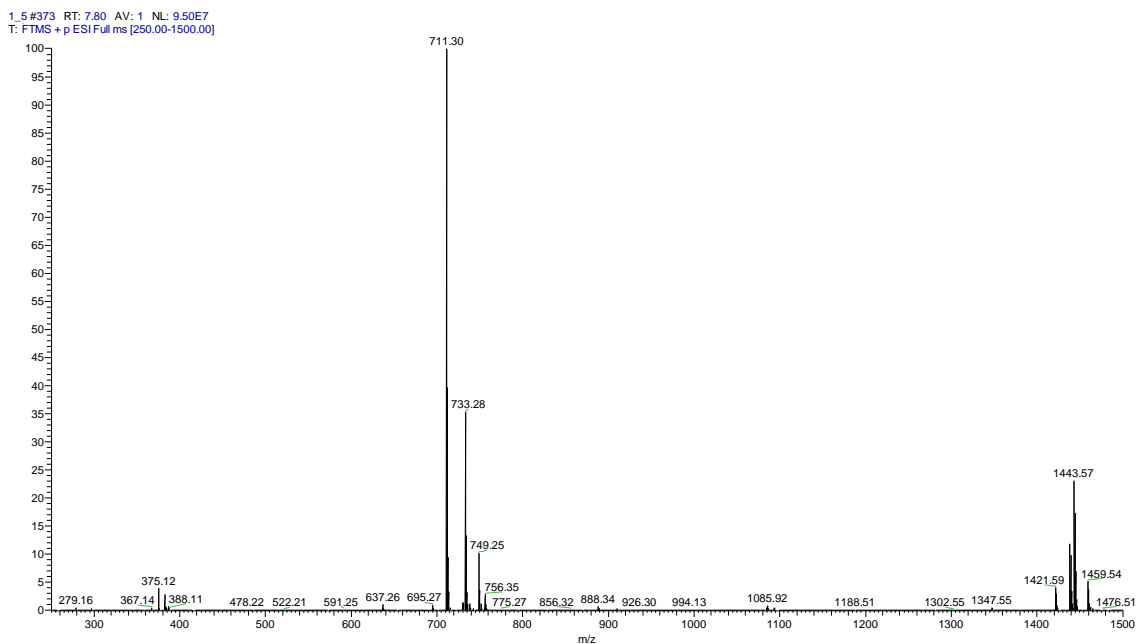


図 4-18. Neomacrophorin IV + NACM 混合液 (Rt = 7.80 min) の MS スペクトル

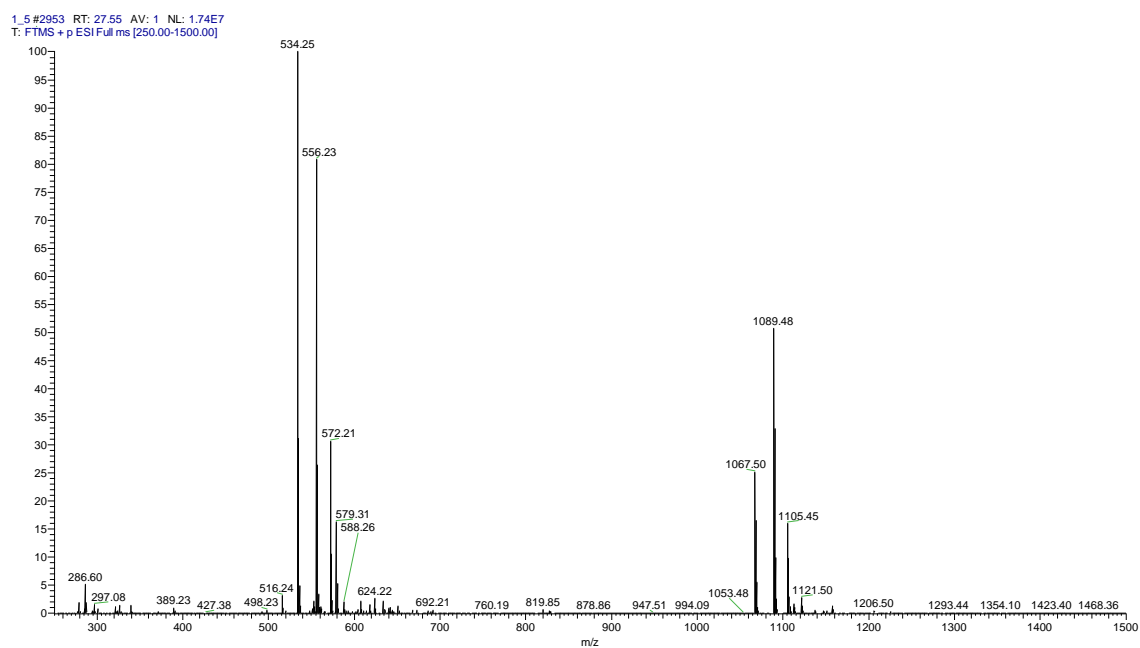


図 4-19. Neomacrophorin IV + NACM 混合液 (Rt = 27.55 min) の MS スペクトル

4-4. 考察

Neomacrophorin 類は、弘前大学白神自然観察園で採取した *Daedaleopsis tricolor* (チャカイガラタケ) に寄生する糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 より単離された、新規化合物群である¹¹⁸⁾。当初単離されていた neomacrophorin I -III については、I のみが COLO 201 細胞に対して弱い細胞毒性 ($IC_{50} = 96.6 \mu\text{M}$) を示すことが報告されていたが、生物活性に関する詳細な解析は行われていなかった。最近、類縁化合物である neomacrophorin IV、V が単離されたことから、本章では neomacrophorin 類の構造活性相関と標的分子を明らかにすることを目的とした。

まず、産生されなくなってしまった II を除く、I、III、IV、V の HL60 細胞に対する細胞毒性を比較したところ、それぞれの IC_{50} は 2.1、11.3、0.9、23.0 μM であり、活性に大きな差があることが認められた。キノン型である I と IV の活性がセミキノール型である III と V より強かったことから、キノン型の重要性が示唆された。また、III と比較して V の活性が 2 倍程度弱いことから、ヒドロキシ酪酸側鎖も活性に関与していることが示唆された。

細胞毒性は、細胞周期阻害、アポトーシス、ネクローシスなどの様々な現象に基づいているため、neomacrophorin 類による細胞毒性の特徴を明らかにすることとした。Neomacrophorin 類を作用させた HL60 細胞を観察したところ、アポトーシスに特徴的なアポトーシス小体の形成を認めた。そこで、アポトーシスの生化学的特徴である DNA 断片化と caspase-3 活性化を調べたところ、neomacrophorin 類はいずれもこれらの現象を誘導することがわかった。さらに、pan-caspase 阻害剤である z-VAD-fmk 存在下では、neomacrophorin 類による DNA 断片化が抑制された。これらの結果から、neomacrophorin 類は HL60 細胞にアポトーシスを誘導することで細胞毒性を示すことが明らかとなった。

次に、neomacrophorin 類の作用機序を明らかにするために、標的分子の解明を試みた。

Neomacrophorin 類と類似の骨格を有する化合物としては、macrophorin 類^{129, 130)}、craterellin 類^{131, 132)}、epoxyphomalin 類¹³³⁾、myrothecol 類^{134, 135)} が報告されている。それらの化合物に

ついて生物活性の情報を調べた結果、海洋糸状菌 *Phoma* sp.より単離された epoxyphomalin A、B が、プロテアソームを阻害することが報告されていた¹²⁸⁾ (図 4-20)。

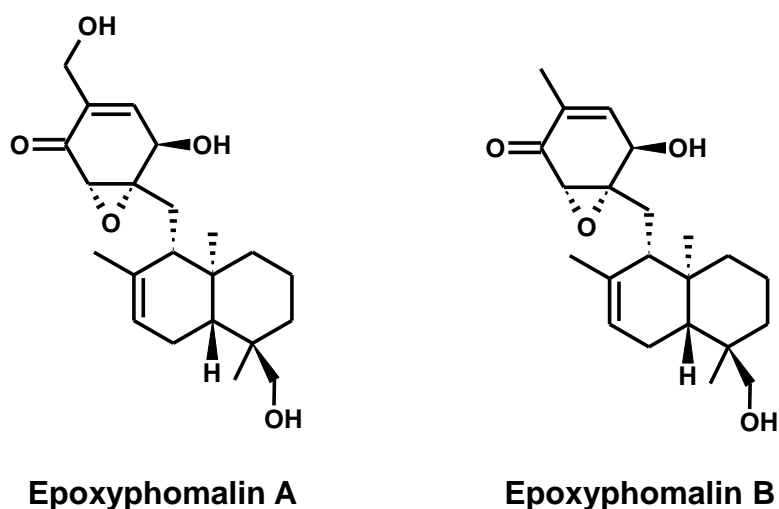


図 4-20. Epoxyphomalin 類の構造

しかし、構造活性相関や細胞レベルでの作用については解析が行われていなかったことから、本骨格によるプロテアソーム阻害活性への関与と細胞レベルでの有効性を検証する必要があると考えた。そこで、ヒト赤血球由来のプロテアソームに対する、neomacrophorin 類の酵素レベルでの阻害活性を測定した。その結果、neomacrophorin I、III、IV が、プロテアソームの chymotrypsin 様活性と caspase 様活性を濃度依存的に阻害する一方で、V は全く阻害しないことを見出した。細胞毒性の結果と同じく、特に neomacrophorin I と IV の活性が強かった。プロテアソームは、細胞内で不要となったユビキチン化タンパク質の分解を担っていることから、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。そこで、このユビキチン化タンパク質の量を調べることで、細胞レベルでもプロテアソ-

ム阻害作用を發揮しているかを検証した。すると、酵素レベルの結果と一致し、neomacrophorin I と IV がユビキチン化タンパク質を顕著に増加させ、III も弱いながら増加させた。V は酵素レベルでも細胞レベルでも作用しなかったことから、プロテアソーム阻害作用にはヒドロキソ酪酸側鎖が関与することが示唆された。20S プロテアソームの $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ サブユニットは、それぞれプロテアソームの caspase 様、trypsin 様、chymotrypsin 様活性を触媒する。Neomacrophorin 類が caspase 様、chymotrypsin 様活性を阻害したことから、 $\beta 1$ サブユニットと $\beta 5$ サブユニットに結合してそれぞれの活性を阻害することが示唆された。臨床応用されているプロテアソーム阻害薬の阻害部位を見ると、bortezomib (Velcade[®])、ixazomib (Ninlaro[®])、carfilzomib (Kyprolis[®]) は、いずれも $\beta 5$ サブユニットに特に強く結合し阻害することが知られている^{136, 137)} (図 4-21)。一方、多発性骨髄腫治療におけるプロテアソーム阻害剤耐性が近年大きな問題となっており、解決策の開発が望まれている。ホモピペラジン誘導体 K-7174 (*N,N'*-bis-(*E*)-[5-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-4-pentenyl] homopiperazine) は、多発性骨髄腫の bortezomib 耐性を克服し、3つのサブユニットすべてを阻害する新たなタイプのプロテアソーム阻害剤であることが明らかとなった^{138, 139)} (図 4-22)。また、trypsin 様活性を有する $\beta 2$ サブユニット選択的な阻害剤として、LU-102 (azido-Phe-Leu-Leu-4-aminomethyl-Phe-methyl vinyl sulfone) が見出され、bortezomib または carfilzomib との併用により相乗的に作用し、多発性骨髄腫のプロテアソーム阻害剤耐性を克服することも報告されている^{140, 141)} (図 4-22)。多発性骨髄腫治療薬としてのプロテアソーム阻害剤における、各サブユニットに対する選択性の意義は明らかとなっていないが、その多様性が重要であると考えられるようになってきている。

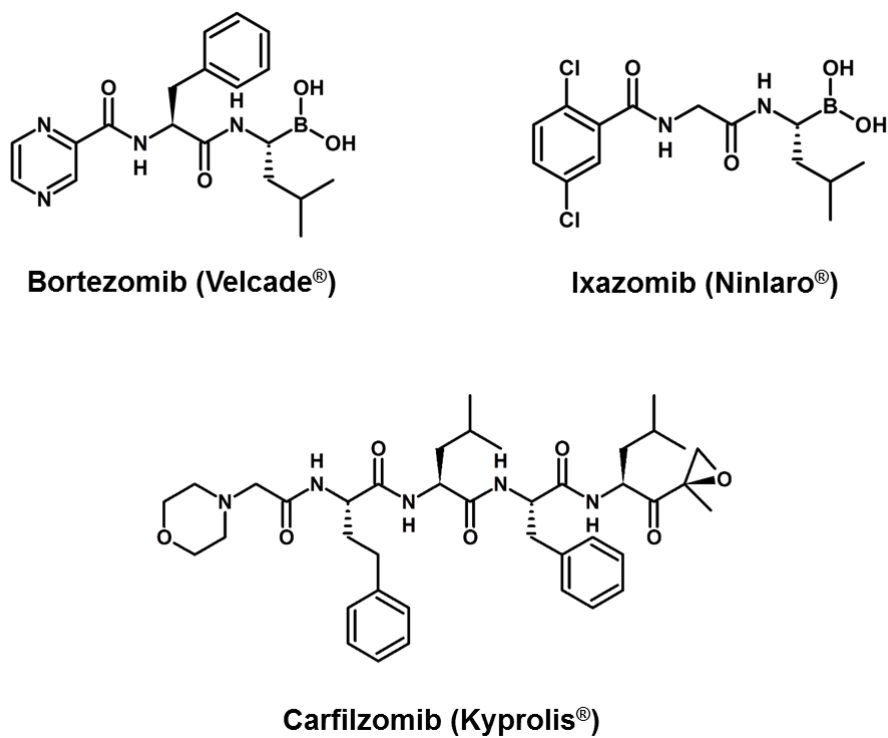


図 4-21. 臨床で利用されているプロテアソーム阻害薬の構造

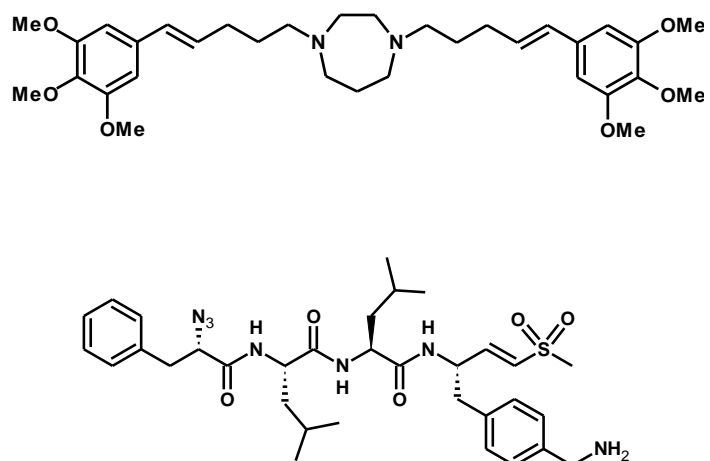
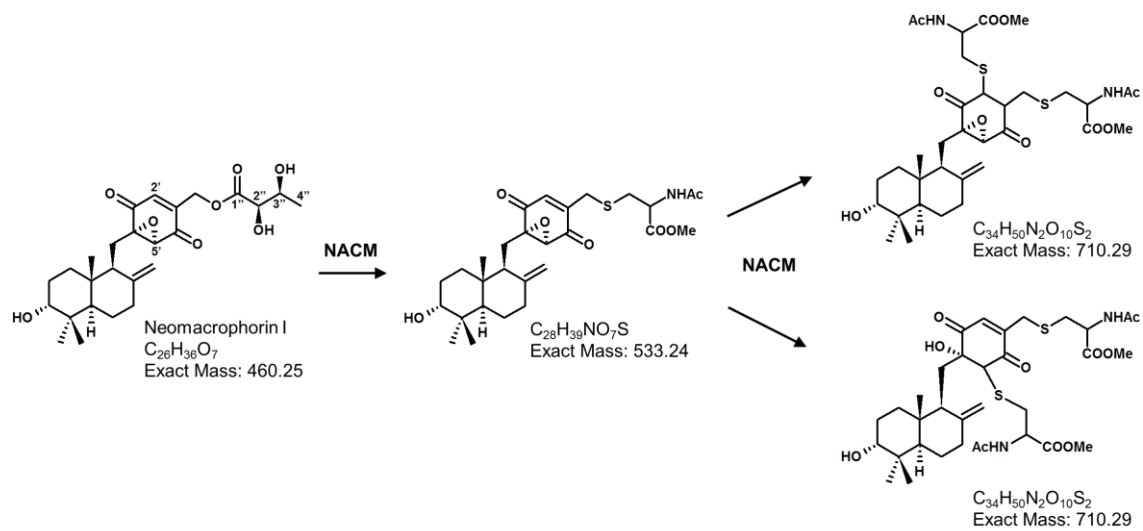


図 4-22. K-7174 (上) と LU-102 (下) の構造

本研究で neomacrophorin 類の比較解析を行い、I と IV の細胞毒性とプロテアソーム阻害活性が顕著に強かったことから、これらに共通して存在するキノン構造が生物活性に重要であると考えられた。この部分には、pyrrocidine A と allantopyrone A の生物活性においても重要な α,β -不飽和カルボニル構造があるため、それに起因する親電子性の関与に興味を持たれた。そこで、求核性チオール基を有する NAC との併用実験を行った。その結果、予想通りに neomacrophorin I と IV による細胞死誘導と caspase-3 の活性化がともに抑制された。NAC により、ユビキチン化タンパク質の蓄積も完全に抑制されたことから、これらの化合物によるプロテアソーム阻害作用の発現には、neomacrophorin I と IV が示す高い親電子性が関与していることが強く示唆された。

そこで、neomacrophorin I、IV の活性がキノン構造に起因するものであるかを検証するため、NACM と直接結合するか否かを解析した。活性の強い I と IV は、NACM と混合した直後に付加体と考えられる新たなピークの出現を認めた。一方、活性の弱い III と V は、明確な変化は見られなかった。よって、I と IV は化学的に反応性が高いことが示され、生物活性に寄与することが示唆された。そこで、付加体の構造に関する情報を得ることを目的とし、LC-MS 解析を行った。その結果、I と IV を NACM と反応させた際に生じたピークの分子量は、いずれも共通で 710.3、533.2 であった。これらの分子量は、neomacrophorin I または IV に NACM が単純に付加した構造では成立せず、異なる反応も同時に起こっている可能性が示唆された。この結果は化学的にも興味深く、付加体を単離して NMR による解析により構造を明らかにすることが理想であるが、保有する neomacrophorin 類の量が少量であるため困難であった。付加体の構造については、今後 NMR 等を用いたさらなる解析が必要であるが、neomacrophorin I と IV の構造の違いは側鎖にある 2'位の OH 基の有無であることと、今回得られた質量分析の結果を考慮し、考えられる 2通りの反応機構と付加体の構造を図 4-23 に示した。第 1 の機構は、1"-4"位の側鎖部分に S_N2 求核置換反応により NACM が 1分子付加（分子量 533.24）し、さらに 2'位または 5'位に NACM が 1分子付加（分

仮説 1



仮説 2

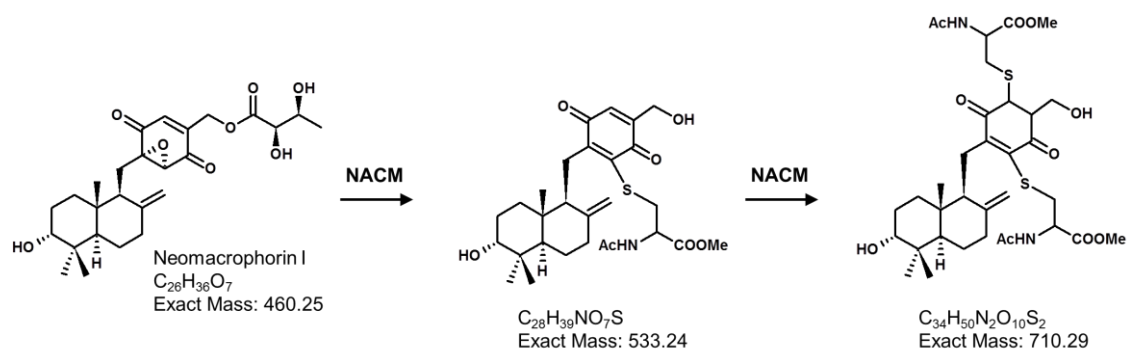


図 4-23. Neomacrophorin I と NACM による付加反応の機構の仮説

分子量 710.29) するものである (仮説 1)。第 2 の機構は、1''-4''位の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 (分子量 533.24) し、さらに 2'位に NACM が 1 分子付加 (分子量 710.29) するものである (仮説 2)。このように、NACM 付加の反応機構として複数の可能性が示唆され、今回得られたデータでは残念ながら絞り込むことができなかった。今後、さらなる詳細な解析を行い、neomacrophorin 類の化学的反応性を明らかにすることで、生物活性の発現に関わる分子機構の解明に貢献することが期待される。

親電子性に基づくプロテアソーム阻害剤としては、植物病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* より単離された syringolin A が知られている¹⁴²⁾ (図 4-24)。Syringolin A は、14 員環の中に vinyl ketone 構造を有しており、この部分がプロテアソームの活性部位にある Thr1 のヒドロキシ基と、Michael 付加反応により共有結合する。また近年、インドネシアで採取された海綿 *Xestospongia* sp. から単離された halenaquinone と 1-hydroxyethylhalenoquinone が、プロテアソーム阻害作用を示すことが報告された¹⁴³⁾ (図 4-25)。これらのキノン構造が失われた 3-ketoadociaquinone A、B は活性を示さないことから、halenaquinone と 1-hydroxyethylhalenoquinone はキノン構造を介して、syringolin A と同様に Michael 付加反応によりプロテアソームと共有結合すると考えられている。

これまで、プロテアソーム阻害剤は抗がん剤として臨床応用されてきたが、近年、抗体依存性疾患である全身性エリテマトーデス (SLE: systemic lupus erythematosus) や、腎移植時の抗体関連型拒絶 (AMR: antibody-mediated rejection) に対する有効性が報告されている¹⁴⁴⁾。これらの疾患の治療には、高用量のステロイド剤や免疫抑制剤が使用されるが、十分な効果が得られないことが臨床的に問題となっている¹⁴⁵⁾。抗体依存性疾患はその名称の通り、自身の形質細胞が産生する抗体によって惹起される免疫疾患である。よって、この疾患の克服には、形質細胞による抗体産生を抑制することが重要となる。プロテアソーム阻害剤が有効な多発性骨髄腫は、形質細胞ががん化により異常増殖した疾患であり、M タンパク質と呼ばれる単クローン性免疫グロブリンを過剰に産生している¹⁴⁶⁾。そのため、がん

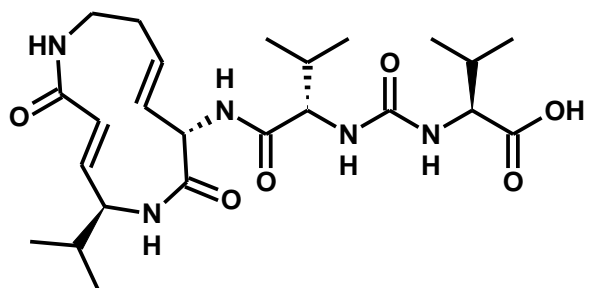


図 4-24. Syringolin A の構造

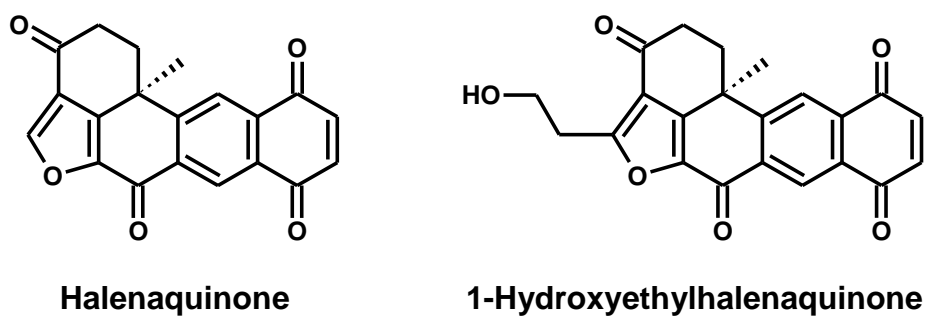


図 4-25. Halenaquinone 類の構造

の中でも特に多発性骨髄腫はタンパク質が過剰に合成されており、恒常的に異常タンパク質が蓄積しやすい状態に曝されている。プロテアソーム阻害剤は、多発性骨髄腫のこのような高いタンパク質産生能を標的としており、プロテアソームを阻害することで細胞内に異常タンパク質を蓄積させて細胞を死に至らしめると考えられている。このように、プロテアソーム阻害剤は高いタンパク質産生能を有する形質細胞を選択的に除去することが可能であることから、同じく形質細胞による抗体産生を原因とする免疫依存性疾患への効果が期待されている。

本章では、白神山地で分離した糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 より単離された新規化合物群 **neomacrophorin** 類の構造活性相関と、標的分子の1つがプロテアソームであることを明らかにした。標的分子が明らかになったことから、プロテアソーム阻害剤が有効な多発性骨髄腫に対する有効性や、*in vivo* における抗腫瘍効果について、今後さらに詳細な解析が行われることが期待される。

第 5 章

総合考察

抗生物質の発見による感染症の克服を発端に、人類を脅かす疾病は大きく変化している。日本人の死因として圧倒的に高いがんについては、未だ克服は困難であるものの、がんの生物学の解明に基づく診断法と治療法の進歩により治療成績は向上している。近年、がんの治療を目的とした分子標的薬が次々と開発されており、微生物二次代謝産物を中心とする天然化合物も大きく貢献してきた。がんは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子などの特定の遺伝子変異による細胞の異常増殖を主な要因とすることから、その原因遺伝子産物またはそれが関与する経路をピンポイントで狙う分子標的薬の発展により、従来の古典的な細胞傷害性抗がん剤と比較して副作用が少なくかつ有効な治療が可能となってきた。したがって、それぞれ原因が異なるがんに対してより有効な治療薬を開発するためには、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り、ケミカルバイオロジーの手法を駆使することで、これらの双方を達成できる可能性がある。また、細胞や動物レベルでの機能性評価に基づく表現型スクリーニングで見出された、食品成分を含む天然資源からの有用な生物活性物質の同定に関する報告は多数存在するが、多くは現象論にとどまっており、それらの作用機序、特に標的分子の解明に至った例は決して多いとは言えないのが現状である。さらに、標的分子を明らかにすることは、その化合物に潜む生物活性が一挙に明らかとなることや、副作用の原因解明と回避にもつながるため、多くの有益な情報を得られることが期待できるプロセスである。実際、緑茶に含まれる機能性成分である(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の標的分子 67kDa laminin receptor (67LR) の発見による多機能性のメカニズム解明や¹⁴⁷⁾、鎮静剤 thalidomide の標的分子 cereblon の発見による催奇形性のメカニズム解明は¹⁴⁸⁾、低分子化合物の機能解析研究に大きなインパクトを与えた例として知られている。我々は、HL60 細胞に対する強い細胞毒性という表現型を示す化合物として、pyrrocidine A (第2章)、allantopyrone A (第3章)、neomacrophorin 類 (第4章) をこれまでに糸状菌二次代謝産物より見出してきたが、これらの化合物が誘導する細胞応答とそれに関与する分子機構および標的分子についての

詳細は不明であった。序論でも述べたように、標的分子の同定においては、あらゆる化合物に適用できる汎用性の高い方法論が確立されていないことにより、困難を極める場合が多い。そこで本研究では、この問題を解決するために、それぞれ以下に示す異なるアプローチにより生物活性に関与する作用機序を絞り込み、検証実験を行うことで標的分子を明らかにした。

第2章では、植物内生糸状菌 *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 が産生する既知の抗菌物質である、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の阻害剤との類似性が示唆されていた。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 α 触媒サブユニットを *in vitro* で直接阻害し、さらに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 が産生する新規化合物である、allantopyrone A について解析した。Pyrrocidine A の場合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うことで、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、H₂O₂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¹⁴⁹⁾。

第4章では、白神山地で分離した糸状菌 *Trichoderma* sp. 1212-03 が産生する新規化合物群である、neomacrosporin 類について解析した。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。まず、HL60 細胞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。Neomacrosporin 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より、作用機序の候補を絞り込み、タンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームに注目した。その結果、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非常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、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 NAC により完全に抑制され、さらに NACM と速やかに反応して付加体を形成した。この付加体については構造を明らかにすることができていないが、以上の結果より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る結果を得た。

標的分子としては、そのタンパク質が druggable (薬剤標的分子として適正) な疾患関連タンパク質であるか否かが重要となる¹⁵⁰⁾。本研究で見出した標的分子を見ると、PI3K 阻害薬である idelalisib (Zydelig[®]) は、慢性リンパ性白血病、濾胞性 B 細胞性非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫の治療薬、Keap1-Nrf2 経路活性薬である dimethyl fumarate (Tecfidera[®]) は、多発性硬化症の治療薬、プロテアソーム阻害薬である bortezomib (Velcade[®])、carfilzomib (Kyprolis[®])、ixazomib (Ninlaro[®]) は多発性骨髄腫、マントル細胞リンパ腫の治療薬として利用されている。したがって、今回見出した標的分子はいずれも druggable なタ

ンパク質であり、臨床的に見ても重要な作用機序であったと言える。

一方、薬剤としては、**drug-like**（医薬品として適正）であることが必要となる¹⁵⁰。本研究で解析した活性の強い化合物に共通する点として、分子内に α,β -不飽和カルボニル構造を有しているということが挙げられる。この構造は、高い親電子（求電子）性を示すことがよく知られており、チオール基のような求核性の官能基と **Michael** 付加反応により共有結合する。細胞内タンパク質は活性部位にチオール基をしばしば含んでおり、それらのタンパク質に対して非特異的かつ強固に結合することにより、重篤な副作用につながるものが危惧されている。また一方で、細胞内にはチオール基を有する内因性抗酸化物質である **GSH** が mM オーダーという高濃度で存在することから、薬剤と **GSH** が結合することで薬剤の作用が失われてしまう可能性も指摘される。これらの問題点から、 α,β -不飽和カルボニル構造を介してタンパク質に共有結合する薬剤は、*in vivo* において目的とする標的分子に特異的に作用できず、抗がん剤としての臨床応用が難しいと考えられてきた。しかし、経口 **EGFR/Her2** 阻害薬で、「**EGFR** 遺伝子変異陽性の手術不能又は再発非小細胞肺癌」に対する治療薬として 2014 年に日本でも承認された **afatinib** (**Giotrif**[®]) が、その定説を覆した¹⁵¹。本剤は α,β -不飽和カルボニル構造を有しており、**EGFR** や **Her2** を含む **ErbB** 受容体ファミリーの細胞内チロシンキナーゼ領域における **ATP** 結合部位のシステイン残基に共有結合することにより、不可逆的にそれらの活性を阻害する。実際、**afatinib** の *in vivo* における主な代謝物は、非酵素的な **Michael** 付加反応による抱合体類であるとされている。また、**afatinib** は様々なタンパク質と結合しやすく、ヒトにおける血漿蛋白結合率は 95% で比較的高いものの、臓器や身体深部区画への分布は制限されないということである。**Afatinib** の有効性としては、臨床試験において、プラチナ製剤をベースとした標準化学療法と比較して、無増悪生存期間 (**PFS: progression free survival**) の有意な延長と肺がん関連症状の改善効果を示した。一方、**afatinib** による有害事象としては、下痢、発疹、爪囲炎、口内炎が高頻度で認められるが、休薬または減量、積極的な支持療法により管理が可能な程度のものである。したがってこの **afatinib**

の例から、従来は **drug-like** ではないと考えられていた α,β -不飽和カルボニル構造を介した阻害剤は、有効性と安全性を備えた抗がん剤として臨床応用が可能であることが実証されており、本研究で解析した共有結合性化合物の有用性について、今後さらに詳細な解析を行う意義があると考えられる。

本研究は、細胞レベルでの実験によりそれぞれの化合物の生物活性と作用機序を解析したものであり、動物レベルでの有効性に関しては今後の検討課題である。動物レベルでの抗腫瘍効果の評価においては、適切ながん種を選択する必要があるが、標的分子が明らかでない場合は選択しやすいという大きな利点がある。すなわち、被験化合物の標的分子として見出されたタンパク質が、過剰発現または異常活性化しているがん細胞株が存在すれば、その化合物に対して高い感受性を示す可能性がある。また、そのタンパク質を標的とする薬剤が既に臨床薬として用いられている場合は、その適応疾患となっているがん種を選択することが望ましい。したがって、PI3K 阻害作用を有する **pyrrocidine A** は、PI3K 阻害薬である **idelalisib** が有効な慢性リンパ性白血病、濾胞性 B 細胞性非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫を対象として、また、プロテアソーム阻害作用を有する **neomacrophorin** 類は、プロテアソーム阻害薬である **bortezomib** などが有効な多発性骨髄腫、マントル細胞リンパ腫を対象として動物試験を行うことで、標的分子に基づく適切な効果を検証できると考えられる。

本研究において、それぞれの化合物について 1 つの標的分子を明らかにした。しかし、一般に低分子化合物は多くの生体高分子と相互作用することが知られている。そのため、低分子化合物を細胞や動物に作用させたときに観察される応答は、複数の標的分子に作用する結果として細胞システムが極めて複雑に攪乱された状態となり、このことも細胞応答解析や標的分子同定を難しくしている¹⁵²⁾。したがって、本研究ではあくまでもそれぞれの化合物が作用する複数の標的分子の 1 つを明らかにしたと考えるべきで、化合物が細胞に及ぼす影響を正しく評価するためには他の標的分子も今後明らかにしていくことが重要と

なり、さらなる有望な生物活性の解明につながるかもしれない。

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。 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。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。

参考文献

- 1 厚生労働省, 結果の概要, 平成26年人口動態統計月報年計(概数)の概況(2016)
- 2 Willis, R. A., The unusual in tumour pathology, *Can. Med. Assoc. J.*, **97**, 1466-1479 (1967)
- 3 Hanahan, D. & Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer, *Cell*, **100**, 57-70 (2000)
- 4 Hanahan, D. & Weinberg, R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, **144**, 646-674 (2011)
- 5 水上 民夫, 承認された分子標的抗がん剤一覧 2016, *JAMTTC News Letter*, **20-1**, 8-9 (2016)
- 6 Urano, Y., Sakabe, M., Kosaka, N., Ogawa, M., Mitsunaga, M., Asanuma, D., Kamiya, M., Young, M. R., Nagano, T., Choyke, P. L., Kobayashi, H., Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 110-119 (2011)
- 7 Asanuma, D., Sakabe, M., Kamiya, M., Yamamoto, K., Hiratake, J., Ogawa, M., Kosaka, N., Choyke, P. L., Nagano, T., Kobayashi, H., Urano, Y., Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo. *Nat. Commun.*, doi: 10.1038/ncomms7463 (2015)
- 8 Kosaka, N., Iguchi, H., Ochiya, T., Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.*, **101**, 2087-2092 (2010)
- 9 Ho, A. S., Huang, X., Cao, H., Christman-Skieller, C., Bennewith, K., Le, Q. T., Koong, A. C., Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl. Oncol.*, **3**, 109-113 (2010)
- 10 Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T., Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887-3895

- (1992)
- 11 Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12293-12297 (2002)
 - 12 江角浩安, Warburg 効果, 実験医学増刊, Vol.35-No.15, 23-29 (2012)
 - 13 Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., Schreiber, S. L., A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase, *Nature*, **341**, 758-760 (1989)
 - 14 Liu, J., Farmer, J. D. Jr, Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L., Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes, *Cell*, **66**, 807-815 (1991)
 - 15 別府輝彦, 大村智, 瀬戸治男, 山崎真狩, 蛋白質 核酸 酵素 細胞機能研究のための低分子プローブ, Vol. 38, No. 11 (1993)
 - 16 吉田 稔, 細胞工学 ケミカルジェネティクス 化学が教えてくれる生命機能, 28, 326-331 (2009)
 - 17 Osada, H., *Bioprobes: Biochemical Tools for Investigating Cell Function*, 1-13 (2000)
 - 18 Tashiro, E., Imoto, M., Target identification of bioactive compounds, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 1910-1921 (2012)
 - 19 Ueda, M., Chemical Biology of Natural Products on the Basis of Identification of Target Proteins, *Chem. Lett.*, **41**, 658-666 (2012)
 - 20 Sakamoto, S., Hatakeyama, M., Ito, T., Handa, H., Tools and methodologies capable of isolating and identifying a target molecule for a bioactive compound, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 1990-2001 (2002)
 - 21 Futamura, Y., Muroi, M., Osada, H., Target identification of small molecules based on chemical

- biology approaches. *Mol. Biosyst.*, **9**, 897-914 (2013)
- 22 Kawatani, M. & Osada, H., Affinity-based target identification for bioactive small molecules. *Med. Chem. Commun.*, **5**, 277-287 (2014)
- 23 井本正哉, 微生物由来天然化合物の探索とケミカルバイオロジー, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **132**, 26-30 (2008)
- 24 市村通朗, 微生物代謝物からの医薬品探索研究, *有機合成化学協会誌*, **64**, 94-103 (2006)
- 25 A. L. Demein, S. Sanchez, Microbial drug discovery: 80 years of progress, *J. Antibiot.*, **62**, 5-16 (2009)
- 26 田中信男, 中村昭四郎, *抗生物質大要—化学と生物活性 [第4版]*, 3-4 (1992)
- 27 Burg, R. W. *et al.* Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 361-367 (1979).
- 28 D. Kaida, H. Motoyoshi, E. Tashiro, T. Nojima, M. Hagiwara, K. Ishigami, H. Watanabe, T. Kitahara, T. Yoshida, H. Nakajima, T. Tani, S. Horinouchi, M. Yoshida, Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 576-583 (2007)
- 29 F. E. Koehn, G. T. Carter, The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 206-220 (2005)
- 30 C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, Protein-Reactive Natural Products, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 5788-5809 (2005)
- 31 田代 悦, 井本 正哉, 微生物生理活性物質のケミカルバイオロジー, *化学と生物*, Vol. 47, No. 3, 193-201 (2009)
- 32 尾仲宏康, 生合成遺伝子覚醒—外部刺激による新規天然物生産の活性化 共培養法を中心に, *化学と生物*, Vol. 52, No. 10, 685-692 (2014)
- 33 浅井禎吾, 大島吉輝, 糸状菌二次代謝のエピジェネティック制御と天然物探索, *化学*

- と生物, Vol. 51, No. 1, 13-19 (2013)
- 34 Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Joyner, P. M., Cichewicz, R. H., A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org. Biomol. Biochem.*, **7**, 435-438 (2009)
- 35 Wang, X., Sena Filho, J. G., Hoover, A. R., King, J.B., Ellis, T. K., Powell, D. R., Cichewicz, R.H., Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *J. Nat. Prod.*, **73**, 942-948 (2010)
- 36 Asai, T., Yamamoto, T., Oshima, Y., Aromatic polyketide production in *Cordyceps indigotica*, an entomopathogenic fungus, induced by exposure to a histone deacetylase inhibitor. *Org. Lett.*, **14**, 2006-2009 (2012)
- 37 Asai, T., Morita, S., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Sakurai, H., Ozeki, T., Oshima, Y., Structural diversity of new C13-polyketides produced by *Chaetomium mollipilium* cultivated in the presence of a NAD(+)-dependent histone deacetylase inhibitor. *Org. Lett.*, **14**, 5456-5459 (2012)
- 38 Asai, T., Otsuki, S., Sakurai, H., Yamashita, K., Ozeki, T., Oshima, Y., Benzophenones from an endophytic fungus, *Graphiopsis chlorocephala*, from *Paeonia lactiflora* cultivated in the presence of an NAD⁺-dependent HDAC inhibitor. *Org. Lett.*, **15**, 2058-2061 (2013)
- 39 Chung, Y. M., Wei, C. K., Chuang, D. W., El-Shazly, M., Hsieh, C. T., Asai, T., Oshima, Y., Hsieh, T. J., Hwang, T. L., Wu, Y. C., Chang, F. R., An epigenetic modifier enhances the production of anti-diabetic and anti-inflammatory sesquiterpenoids from *Aspergillus sydowii*. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 3866-3872 (2013)
- 40 Dobson, C. M., Chemical space and biology, *Nature*, **432**, 824-828 (2004)
- 41 野川俊彦, 長田裕之, NPPlot (Natural Products Plot) を活用した天然化合物の探索, 化学と生物, Vol. 52, No. 6, 395-402 (2014)

- 42 Nogawa, T., Okano, A., Takahashi, S., Uramoto, M., Konno, H., Saito, T., Osada, H., Verticilactam, a new macrolactam isolated from a microbial metabolite fraction library. *Org. Lett.*, **12**, 4564-4567 (2010)
- 43 Nogawa, T., Takahashi, S., Okano, A., Kawatani, M., Uramoto, M., Saito, T., Osada, H., Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.*, **65**, 123-128 (2012)
- 44 鎌形洋一, 難培養微生物とは何か?, *環境バイオテクノロジー学会誌*, **7**, 69-73 (2007)
- 45 荒井雅吉, 活性天然物の標的分子解析による新規薬剤標的の探索, *YAKUGAKU ZASSHI*, **136**, 669-676 (2016)
- 46 長田裕之, 天然物に適したフェノティピックスクリーニング, *化学と生物*, Vol. 54, No. 1, 32-36 (2014)
- 47 Futamura, Y., Kawatani, M., Kazami, S., Tanaka, K., Muroi, M., Shimizu, T., Tomita, K., Watanabe, N., Osada, H., Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. *Chem. Biol.*, **19**, 1620-1630 (2012)
- 48 Ziegler, S., Pries, V., Hedberg, C., Waldmann, H., Target identification for small bioactive molecules: finding the needle in the haystack. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 2744-2792 (2013)
- 49 Swinney, D. C. & Anthony, J., How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 507-519 (2011)
- 50 Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A., Whitty, A., The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **10**, 307-317 (2011)
- 51 Bauer, R. A., Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today*, **20**, 1061-1073 (2015)
- 52 Kumalo, H. M., Bhakat, S., Soliman, M. E., Theory and applications of covalent docking in

- drug discovery: merits and pitfalls. *Molecules*, **20**, 1984-2000 (2015)
- 53 He, H., Yang, H. Y., Bigelis, R., Solum, E. H., Greenstein, M., Carter, G. T., Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. *Tetrahedron Lett.* **43**, 1633-1636 (2002).
- 54 Wicklow, D. T. & Poling, S. M., Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. *Phytopathology* **99**, 109-115 (2009).
- 55 Shiono, Y., Shimanuki, K., Hiramatsu, F., Koseki, T., Tetsuya, M., Fujisawa, N., Kimura, K., Pyrrospirones A and B, apoptosis inducers in HL-60 cells, from an endophytic fungus, *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6050-6053 (2008)
- 56 Shiono, Y., Kosukegawa, A., Koseki, T., Murayama, T., Kwon, E., Uesugi, S., Kimura, K., A dimeric pyrrocidine from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochem. Lett.*, **5**, 91-95 (2012)
- 57 Uesugi, S., Fujisawa, N., Yoshida, J., Watanabe, M., Dan, S., Yamori, T., Shiono, Y., Kimura, K., Pyrrocidine A, a metabolite of endophytic fungi, has a potent apoptosis-inducing activity against HL60 cells through caspase activation via the Michael addition. *J. Antibiot.*, **69**, 133-140 (2016)
- 58 Uchiro, H., Kato, R., Arai, Y., Hasegawa, M., Kobayakawa, Y., Total synthesis of hirsutellone B via Ullmann-type direct 13-membered macrocyclization. *Org. Lett.*, **13**, 6268-6271 (2011)
- 59 Tanaka, R., Ohishi, K., Takanashi, N., Nagano, T., Suizu, H., Suzuki, T., Kobayashi, S., Synthetic study of pyrrocidines: first entry to the decahydrofluorene core of pyrrocidines. *Org. Lett.* **14**, 4886-4889 (2012).
- 60 Li, X. W., Ear, A., Nay, B., Hirsutellones and beyond: figuring out the biological and synthetic logics toward chemical complexity in fungal PKS-NRPS compounds. *Nat. Prod. Rep.*, **30**, 765-782 (2013)

- 61 Cohen, P., The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5001-5010 (2001)
- 62 Cohen, M. H., Williams, G., Johnson, J. R., Duan, J., Gobburu, J., Rahman, A., Benson, K., Leighton, J., Kim, S. K., Wood, R., Rothmann, M., Chen, G., U, K. M., Staten, A. M., Pazdur, R., Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **8**, 935-942 (2002)
- 63 Jokinen, E., Laurila, N., Koivunen, J. P., Alternative dosing of dual PI3K and MEK inhibition in cancer therapy. *BMC Cancer*, **12**:612, doi: 10.1186/1471-2407-12-612 (2012)
- 64 Yamaguchi, T., Yoshida, T., Kurachi, R., Kakegawa, J., Hori, Y., Nanayama, T., Hayakawa, K., Abe, H., Takagi, K., Matsuzaki, Y., Koyama, M., Yogosawa, S., Sowa, Y., Yamori, T., Tajima, N., Sakai, T., Identification of JTP-70902, a p15(INK4b)-inductive compound, as a novel MEK1/2 inhibitor. *Cancer Sci.*, **98**, 1809-1816 (2007)
- 65 Lannutti, B. J., Meadows, S. A., Herman, S. E., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A. J., Byrd, J. C., Tyner, J. W., Loriaux, M. M., Deininger, M., Druker, B. J., Puri, K. D., Ulrich, R. G., Giese, N. A., CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*, **117**, 591-594 (2011)
- 66 Kitagawa, D., Yokota, K., Gouda, M., Narumi, Y., Ohmoto, H., Nishiwaki, E., Akita, K., Kirii, Y., Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells*, **18**, 110-122 (2013)
- 67 Aburai, N., Yoshida, M., Ohnishi, M., Kimura, K., Pisiferdiol and pisiferic acid isolated from *Chamaecyparis pisifera* activate protein phosphatase 2C *in vitro* and induce caspase-3/7-dependent apoptosis via dephosphorylation of Bad in HL60 cells. *Phytomedicine*, **17**, 782-788 (2010)

- 68 Yamamoto, K., Makino, M., Watanapokasin, R., Tashiro, E., Imoto, M., Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation on the cell surface. *J. Antibiot.*, **65**, 295-300 (2012)
- 69 Debbab, A., Aly, A. H., & Proksch, P., Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Divers.*, **49**, 1-12 (2011)
- 70 Chandra, S., Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 47-59 (2012)
- 71 塩野義人, 木村賢一, 植物内生糸状菌類から創薬リード分子を探す, *化学と生物*, Vol. 47, No. 6, 390-396 (2009)
- 72 Shiono, Y., Anthracobic acids A and B, two polyketides, produced by an endophytic fungus *Anthracobia* sp. *Chem. Biodivers.*, **3**, 217-223 (2006)
- 73 Shiono, Y. & Murayama, T., New eremophilane-type sesquiterpenoids, eremoxylarins A and B from *Xylariaceous* endophytic fungus YUA-026. *Z. Naturforsch.*, **60b**, 885-890 (2005)
- 74 Ogasawara, Y., Yoshida, J., Shiono, Y., Miyakawa, T. & Kimura, K. New eremophilane sesquiterpenoid compounds, eremoxylarins A and B directly inhibit calcineurin in a manner independent of immunophilin. *J. Antibiot.*, **61**, 496-502 (2008)
- 75 Shiono, Y., Nitto, A., Shimanuki, K., Koseki, T., Murayama, T., Miyakawa, T., Yoshida, J., Kimura, K., A new benzoxepin metabolite isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. *J. Antibiot.*, **62**, 533-535 (2009)
- 76 Osada, H., *PROTEIN TARGETING WITH SMALL MOLECULES: Chemical Biology Techniques and Applications*, 39-56 (2009)
- 77 Muroi, M., Kazami, S., Noda, K., Kondo, H., Takayama, H., Kawatani, M., Usui, T., Osada, H., Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem. Biol.*, **17**, 460-470 (2010)

- 78 Kawatani, M., Takayama, H., Muroi, M., Kimura, S., Maekawa, T., Osada, H., Identification of a small-molecule inhibitor of DNA topoisomerase II by proteomic profiling. *Chem. Biol.*, **18**, 743-751 (2011)
- 79 Futamura, Y., Kawatani, M., Muroi, M., Aono, H., Nogawa, T., Osada, H., Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems. *Chembiochem*, **14**, 2456-2463 (2013)
- 80 Minegishi, H., Futamura, Y., Fukashiro, S., Muroi, M., Kawatani, M., Osada, H., Nakamura, H., Methyl 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoate (GN39482) as a tubulin polymerization inhibitor identified by MorphoBase and ChemProteoBase profiling methods. *J. Med. Chem.*, **58**, 4230-4241 (2015)
- 81 Hynes, N. E., Lane, H. A., ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 341-354 (2005)
- 82 Burkhart, D. L., Sage, J., Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 671-682 (2008)
- 83 Yap, T. A., Bjerke, L., Clarke, P. A., Workman, P., Drugging PI3K in cancer: refining targets and therapeutic strategies. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **23**, 98-107 (2015)
- 84 Yaguchi, S., Fukui, Y., Koshimizu, I., Yoshimi, H., Matsuno, T., Gouda, H., Hirono, S., Yamazaki, K., Yamori, T., Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**, 545-556 (2006)
- 85 Schmit, F., Utermark, T., Zhang, S., Wang, Q., Von, T., Roberts, T. M., Zhao, J. J., PI3K isoform dependence of PTEN-deficient tumors can be altered by the genetic context. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6395-6400 (2014)
- 86 Gao, B., Roux, P. P., Translational control by oncogenic signaling pathways. *Biochem. Biophys. Acta*, **1849**, 753-765 (2015)

- 87 半田宏, 川口春馬, ケミカルバイオロジーの新戦略 ナノアフィニティービーズのすべて (2003)
- 88 Yamamoto, K., Yamazaki, A., Takeuchi, M., Tanaka, A., A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins. *Anal. Biochem.*, **352**, 15-23 (2006)
- 89 Solca, F., Dahl, G., Zoephel, A., Bader, G., Sanderson, M., Klein, C., Kraemer, O., Himmelsbach, F., Haaksma, E., Adolf, G. R., Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **343**, 342-350 (2012)
- 90 Pan, Z., Scheerens, H., Li, S. J., Schultz, B. E., Sprengeler, P. A., Burrill, L. C., Mendonca, R. V., Sweeney, M. D., Scott, K. C., Grothaus, P. G., Jeffery, D. A., Spoerke, J. M., Honigberg, L. A., Young, P. R., Dalrymple, S. A., Palmer, J. T., Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem*, **2**, 58-61 (2007)
- 91 Koizumi, F., Hasegawa, K., Ando, K., Ogawa, T., Hara, A., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 2001147574 A2 200109 (2001)
- 92 Isaka, M., Rugseree, N., Maithip, P., Kongsaree, P., Prabpai, S., Thebtaranontha, Y., Hirsutellones A–E, antimycobacterial alkaloids from the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *Tetrahedron*, **61**, 5577-5583 (2005)
- 93 Ebrahim, W., Aly, A. H., Wray, V., Mándi, A., Teiten, M. H., Gaascht, F., Orlikova, B., Kassack, M. U., Lin, W., Diederich, M., Kurtán, T., Debbab, A., Proksch, P., Embellicines A and B: absolute configuration and NF- κ B transcriptional inhibitory activity. *J. Med. Chem.*, **56**, 2991-2999 (2013)
- 94 Wijeratne, E. M., He, H., Franzblau, S. G., Hoffman, A. M., Gunatilaka, A. A., Phomapyrrolidones A-C, antitubercular alkaloids from the endophytic fungus *Phoma* sp. NRRL 46751. *J. Nat. Prod.*, **76**, 1860-1865 (2013)

- 95 Shiono, Y., Yokoi, M., Koseki, T., Murayama, T., Aburai, N., Kimura, K., Allantopyrone A, a new alpha-pyrone metabolite with potent cytotoxicity from an endophytic fungus, *Allantophomopsis lycopodina* KS-97. *J. Antibiot.*, **63**, 251-253 (2010)
- 96 Yokoigawa, J., Morimoto, K., Shiono, Y., Uesugi, S., Kimura, K., Kataoka, T., Allantopyrone A, an α -pyrone metabolite from an endophytic fungus, inhibits the tumor necrosis factor α -induced nuclear factor κ B signaling pathway. *J. Antibiot.*, **68**, 71-75 (2015)
- 97 Suzuki, T., Yamamoto, M., Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 93-100 (2015).
- 98 Guerrero-Beltrán, C. E. , Calderón-Oliver, M., Pedraza-Chaverri, J., Chirino, Y. I., Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **64**, 503-508 (2012)
- 99 García-Niño, W. R. & Pedraza-Chaverri, J., Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food Chem. Toxicol.*, **69**, 182-201 (2014)
- 100 Kansanen, E., Kivelä, A. M., Levonen, A. L., Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy-Delta^{12,14}- prostaglandin J₂. *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1310-1317 (2009)
- 101 Dinkova-Kostova, A. T., Liby, K. T., Stephenson, K. K., Holtzclaw, W. D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G. W., Sporn, M. B., Talalay, P., Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: Correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4584-4859 (2005)
- 102 Yao, J., Zhang, B., Ge, C., Peng, S., Fang, J., Xanthohumol, a polyphenol chalcone present in hops, activating Nrf2 enzymes to confer protection against oxidative damage in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 1521-1531 (2015)
- 103 Kanoh, N., Honda, K., Simizu, S., Muroi, M., Osada, H., Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. *Angew. Chem. Int. Ed.*

- Engl.*, **44**, 3559-3562 (2005)
- 104 Kawatani, M., Okumura, H., Honda, K., Kanoh, N., Muroi, M., Dohmae, N., Takami, M., Kitagawa, M., Futamura, Y., Imoto, M., Osada, H., The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11691-11696 (2008)
- 105 Kanoh, N., Takayama, H., Honda, K., Moriya, T., Teruya, T., Simizu, S., Osada, H., Iwabuchi, Y., Cleavable linker for photo-cross-linked small-molecule affinity matrix. *Bioconjug. Chem.*, **21**, 182-186 (2010)
- 106 Sasazawa, Y., Kanagaki, S., Tashiro, E., Nogawa, T., Muroi, M., Kondoh, Y., Osada, H., Imoto, M., Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. *ACS Chem. Biol.*, **18**, 892-900 (2012)
- 107 Park, J.-H., Choi, J. W., Ju, E. J., Pae, A. N., Park, K. D., Antioxidant and anti-inflammatory activities of a natural compound, shizukahenriol, through Nrf2 activation. *Molecules*, **20**, 15989-16003 (2015)
- 108 Hou, D. X., Korenori, Y., Tanigawa, S., Yamada-Kato, T., Nagai, M., He, X., He, J., Dynamics of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by wasabi 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate. *J. Agric. Food. Chem.*, **59**, 11975-11982 (2011)
- 109 Korenori, Y., Tanigawa, S., Kumamoto, T., Qin, S., Daikoku, Y., Miyamori, K., Nagai, M., Hou, D. X., Modulation of Nrf2/Keap1 system by Wasabi 6-methylthiohexyl isothiocyanate in ARE-mediated NQO1 expression. *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**, 854-864 (2013)
- 110 Cardozo, L. F., Pedruzzi, L. M., Stenvinkel, P., Stockler-Pinto, M. B., Daleprane, J. B., Leite, M. Jr, Mafra, D., Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie*, **95**, 1525-1533 (2013)

- 111 Martyniuk, C. J., Fang, B., Koomen, J. M., Gavin, T., Zhang, L., Barber, D. S., Lopachin, R. M., Molecular mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by α,β -unsaturated carbonyl derivatives. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 2302-2311 (2011)
- 112 Brandvold, K. R. & Morimoto, R. I., The Chemical Biology of Molecular Chaperones - Implications for Modulation of Proteostasis. *J. Mol. Biol.*, **427**, 2931-2947 (2015)
- 113 Suzuki, T., Motohashi, H., Yamamoto, M., Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol. Sci.*, **34**, 340-346 (2013)
- 114 Milo, R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **15**, 714-718 (2016).
- 115 Scannevin, R. H., Chollate, S., Jung, M. Y., Shackett, M., Patel, H., Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Yamamoto, M., Lukashev, M., Rhodes, K. J., Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **341**, 274-284 (2012)
- 116 Lu, M. C. Ji, J. A., Jiang, Z. Y., You, Q. D., The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med. Res. Rev.*, doi: 10.1002/med.21396 (2016)
- 117 Yasumura, R., Ashtekar, K. D., Tonouchi, A., Nehira, T., Borhan, B., Hashimoto, M., 7- β - and 10- β -Hydroxylated congeners of CAF-603; elucidation of absolute configuration of CAF-603 family, and their SAR studies in the anti-fungal activity. *Tetrahedron*, **69**, 9469-9474 (2013)
- 118 Hirose, A., Maeda, H., Tonouchi, A., Nehira, T., Hashimoto, M., Neomacrophorin I, II, and III, novel drimenyl cyclohexanes with hydroxylated butanoates from *Trichoderma* sp. 1212-03. *Tetrahedron*, **70**, 1458-1463 (2014).
- 119 Dai, C. & Sampson, S. B., HSF1: Guardian of proteostasis in cancer. *Trends Cell Biol.*, **26**, 17-28 (2016)

- 120 Tanaka, K. & Matsuda, N., Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1843**, 197-204 (2014)
- 121 McClurg, U. L. & Robson, C. N., Deubiquitinating enzymes as oncotargets. *Oncotarget*, **6**, 9657-9668 (2015)
- 122 Ikeda, F. & Dikic, I., Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep.*, **9**, 536-542 (2008)
- 123 Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., Iwai, K., Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 123-132 (2009)
- 124 Sahara, K., Kogleck, L., Yashiroda, H., Murata, S., The mechanism for assembly of the proteasome. *Adv. Biol. Regul.*, **54**, 51-58 (2014)
- 125 Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C. M., Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10403-10408 (1999)
- 126 Tsukamoto, S., Yamanokuchi, R., Yoshitomi, M., Sato, K., Ikeda, T., Rotinsulu, H., Mangindaan, R. E., de Voogd, N. J., van Soest, R. W., Yokosawa, H., Aaptamine, an alkaloid from the sponge *Aaptos suberitoides*, functions as a proteasome inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 3341-3343 (2010)
- 127 Krishnamurthy, P., Tsukamoto, C., Takahashi, Y., Hongo, Y., Singh, R. J., Lee, J. D., Chung, G., Comparison of saponin composition and content in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) before and after germination. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 1988-1996 (2014)
- 128 Mohamed, I. E., Kehraus, S., Krick, A., König, G. M., Kelter, G., Maier, A., Fiebig, H. H., Kalesse, M., Malek, N. P., Gross, H., Mode of action of epoxyphomalins A and B and

- characterization of related metabolites from the marine-derived fungus *Paraconiothyrium* sp. *J. Nat. Prod.*, **73**, 2053-2056 (2010)
- 129 Sassa, T. & Yoshikoshi, H., New Terpene-linked Cyclohexenone Epoxides, Macrophorin A, B and C, Produced by the Fungus Caused *Macrophoma* Fruit Rot of Apple. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 187-189 (1983)
- 130 Fujimoto, H., Nakamura, E., Kim, Y. P., Okuyama, E., Ishibashi, M., Sassa, T., Immunomodulatory constituents from an Ascomycete, *Eupenicillium crustaceum*, and revised absolute structure of macrophorin D. *J. Nat. Prod.*, **64**, 1234-1237 (2001)
- 131 Zhang, L., Shen, Y., Wang, F., Leng, Y., Liu, J. K., Rare merosesquiterpenoids from basidiomycete *Craterellus odoratus* and their inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Phytochemistry*, **71**, 100-103 (2010).
- 132 Zheng, C. J., Shao, C. L., Chen, M., Niu, Z. G., Zhao, D. L., Wang, C. Y., Merosesquiterpenoids and ten-membered macrolides from a soft coral-derived *Lophiostoma* sp. fungus. *Chem. Biodivers.*, **12**, 1407-1414 (2015)
- 133 Mohamed, I. E., Gross, H., Pontius, A., Kehraus, S., Krick, A., Kelter, G., Maier, A., Fiebig, H. H., König, G. M., Epoxyphomalin A and B, Prenylated Polyketides with Potent Cytotoxicity from the Marine-Derived Fungus *Phoma* sp. *Org. Lett.*, **11**, 5014-5017 (2009)
- 134 Fu, Y., Wu, P., Xue, J., Wei, X., Cytotoxic and Antibacterial Quinone Sesquiterpenes from a *Myrothecium* Fungus. *J. Nat. Prod.*, **77**, 1791-1799 (2014)
- 135 Fu, Y., Wu, P., Xue, J., Li, H., Wei, X., Myrothecols G and H, two new analogues of the marine-derived quinone sesquiterpene penicilliumin A., *Mar. Drugs*, **13**, 3360-3367 (2015)
- 136 Kupperman, E., Lee, E. C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., Bolen, J., Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in

- preclinical models of human cancer. *Cancer Res.*, **70**, 1970-1980 (2010)
- 137 Parlati, F., Lee, S. J., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J. B., Micklem, D. R., Ruurs, P., Sylvain, C., Lu, Y., Shenk, K. D., Bennett, M. K., Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood*, **114**, 3439-3449 (2009)
- 138 Kikuchi, J., Shibayama, N., Yamada, S., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., Akutsu, M., Kano, Y., Sugiyama, K., Ohki, M., Park, S. Y., Furukawa, Y., Homopiperazine derivatives as a novel class of proteasome inhibitors with a unique mode of proteasome binding. *PLoS One*, **8**, e60649 (2013)
- 139 Kikuchi, J., Yamada, S., Koyama, D., Wada, T., Nobuyoshi, M., Izumi, T., Akutsu, M., Kano, Y., Furukawa, Y., The novel orally active proteasome inhibitor K-7174 exerts anti-myeloma activity *in vitro* and *in vivo* by down-regulating the expression of class I histone deacetylases. *J. Biol. Chem.*, **288**, 25593-25602 (2013)
- 140 Geurink, P. P., van der Linden, W. A., Mirabella, A. C., Gallastegui, N., de Bruin, G., Blom, A. E., Voges, M. J., Mock, E. D., Florea, B. I., van der Marel, G. A., Driessen, C., van der Stelt, M., Groll, M., Overkleeft, H. S., Kisselev, A. F., Incorporation of non-natural amino acids improves cell permeability and potency of specific inhibitors of proteasome trypsin-like sites. *J. Med. Chem.*, **56**, 1262-1275 (2013)
- 141 Kraus, M., Bader, J., Geurink, P. P., Weyburne, E. S., Mirabella, A. C., Silzle, T., Shabaneh, T. B., van der Linden, W. A., de Bruin, G., Haile, S. R., van Rooden, E., Appenzeller, C., Li, N., Kisselev, A. F., Overkleeft, H., Driessen, C., The novel β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 synergizes with bortezomib and carfilzomib to overcome proteasome inhibitor resistance of myeloma cells. *Haematologica*, **100**, 1350-1360 (2015)
- 142 Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A. S., Archer, C. R., Huber, R., Powell, T. K., Lindow,

- S., Kaiser, M., Dudler, R., A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*, **452**, 755-758 (2008)
- 143 Yamakuma, M., Kato, H., Matsuo, K., El-Desoky, A. H., Kawabata, T., Losung, F., Mangindaan, R. E. P., de Voogd, N. J., Yokosawa, H., Tsukamoto, S., 1-Hydroxyethylhalenaquinone: A new proteasome inhibitor from the marine sponge *Xestospongia* sp. *Heterocycles*, **89**, 2605-2610 (2014)
- 144 Neubert, K., Meister, S., Moser, K., Weisel, F., Maseda, D., Amann, K., Wiethe, C., Winkler, T. H., Kalden, J. R., Manz, R. A., Voll, R. E., The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat. Med.*, **14**, 748-755 (2008)
- 145 Filler, G., Huang, S. H., Sharma, A. P., Steroid-resistant acute allograft rejection in renal transplantation. *Pediatr. Nephrol.*, **26**, 651-653 (2011)
- 146 Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orłowski, R. Z., San Miguel, J. F., Palumbo, A., Harousseau, J. L., Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, **120**, 947-959 (2012)
- 147 Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., Yamada, K., A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380-381 (2004)
- 148 Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y., Handa, H., Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, **327**, 1345-1350 (2010)
- 149 Uesugi, S., Muroi, M., Kondoh, Y., Shiono, Y., Osada, H., Kimura, K., Allantopyrone A activates Keap1-Nrf2 pathway and protects PC12 cells from oxidative stress-induced cell death. *J. Antibiot.*, in press (2016)
- 150 浅井章良, 小郷尚久, 創薬研究における点と線 ドラッグライクとドラッグブルの接

- 点を探る, *細胞工学*, Vol. 32, No. 6, 644-648 (2013)
- 151 高橋希, 鈴木忍, 酒井兼司, 東久弥, アファチニブ (ジオトリフ[®]錠 20 mg/ 30 mg/ 40 mg/ 50 mg) の薬理学的特徴および臨床試験成績, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **145**, 100-106 (2015)
- 152 上田実, 源治尚久, 生理活性天然物の標的タンパク質をいかに捕まえるか?, *化学と生物*, Vol. 51, No. 2, 90-97 (2013)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、主指導教員として御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻、木村賢一教授に謹んで感謝の意を表します。副指導教員を務めていただきました、岩手大学農学部、山下哲郎教授、山形大学農学部、塩野義人教授には、各年度における中間審査において有益な御助言を賜るとともに、それぞれ LC-MS 解析、pyrrocidine A および allantopyrone A の御供与においても御協力頂きました。心より感謝申し上げます。

Neomacrophorin 類の御供与と、構造解析に関する有機化学的な御助言を賜るとともに、本研究の審査委員を務めていただきました、弘前大学農学生命科学部、橋本勝教授に深謝致します。

プロテオーム解析、アフィニティー担体の作成等を実施していただき、作用機序解析において多大なる御協力を賜りました、理化学研究所環境資源科学研究センター、ケミカルバイオロジー研究グループ、長田裕之グループディレクター、室井誠専任研究員、近藤恭光専任研究員、二村友史研究員に心より感謝申し上げます。

動物試験を実施していただきました、微生物化学研究所沼津支所、川田学支所長、大庭俊一研究員、LC-MS 解析において御指導いただきました、岩手大学農学部、塚本知玄准教授、国際学会発表や英語論文投稿の際に英語を御指導いただきました、La Trobe University 生化学部、Don R. Phillips 名誉教授に感謝申し上げます。

学部時代に配属されて以来、様々な面で研究室生活を支えていただきました、大野美紗助教、天然物生化学研究室の先輩、同期、後輩の多くの皆様に感謝致します。

最後に、博士課程への進学を理解し、常に支えとなってくれた家族に心から感謝します。

平成 28 年 9 月 上杉 祥太