

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成30年4月26日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所 属 部 局 化学研究所

職 名 助 教

氏 名 渡 辺 文 太

助 成 の 種 類	平成29年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	細胞運動を阻害する新規低分子化合物の作用メカニズムの解明と癌治療への応用			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) なし			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		設備・備品費	557,280	
		消耗品費	442,720	
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 申請した研究課題のみならず、自由な広がり許容し支える研究費として使用できた点が大変ありがたかったです。特定の研究課題に限定されない汎用実験機器として、老朽化により更新が必要であった精密電子天秤とPCR装置を購入させていただきました(設備・備品費として計上)。			

成果の概要

渡辺 文太 (京都大学化学研究所)

【研究の背景と目的】

上皮間葉転換 (EMT) は上皮細胞が間葉系細胞へと形質転換する現象で、個体発生や創傷治癒時に普遍的に見られる。一方、EMT の結果生じた間葉系細胞は活発な運動性を獲得し、この運動能力が癌の浸潤・転移や線維症を惹起する主要因と考えられている。そのため、癌や線維症の初期段階や進行時における EMT は、これらの疾病の治療剤開発の新たな創薬標的として注目を集めている。しかし、EMT には TGF- β 経路をはじめとする多数のシグナル伝達系や細胞を取り巻く微小環境要因などが複雑に絡みあい¹、その一端しか明かされていない。我々はこれまでに、EMT を阻害する化合物の探索と作用機構の解明を目的に研究を行い、CCG-1423 と命名された化合物 (図 1) の標的タンパク質が、癌細胞の運動に重要な役割を果たす転写補助因子 MRTF-A であることを明らかにした²。同時に、CCG-1423 は MRTF-A の核内移行シグナルに結合し、MRTF-A/インポーチン複合体の形成を阻害することで核内移行を阻害することを見出した。さらに CCG-1423 が、MRTF-A による転写活性化によって亢進するメラノーマの運動を実際に阻害することを明らかにした³。この成果を受け、メラノーマに対して運動阻害活性を示す化合物を探索した結果、アシルフェニルウレア構造を基本骨格に持つ新規化合物 **1** (図 1) がメラノーマの運動を阻害することを発見した。

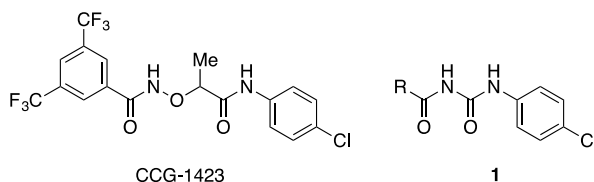


図1. CCG-1423 および化合物 **1** の構造.

化合物 **1** は 1 μ M の濃度でメラノーマの運動能を 40% 阻害したが、同濃度での CCG-1423 の阻害率は 10% であった。一方、CCG-1423 は 3 μ M で 30% のメラノーマ細胞を殺傷したが、同濃度での化合物 **1** の殺傷率は 10% であった。また化合物 **1** は、10 μ M の濃度で癌関連線維芽細胞の運動能を 60% 阻害したが、同濃度での CCG-1423 の阻害率は 30% であった。このように化合物 **1** は、癌の浸潤・転移を阻害し、かつ副作用の無い新しいタイプの抗癌剤のリード化合物として極めて有望であるが、その標的タンパク質や作用メカニズムは不明のままである。そこで本研究では化合物 **1** の作用機構の解明を目的とし、化合物 **1** の構造に基づいた化学プローブの合成、標的タンパク質の同定および機能解明を行なった。

【化学プローブの分子設計】

本研究で合成した、化合物 **1** をベースとした化学プローブ **2a-f** の構造および逆合成解析を図 2 に示す。化合物 **1** はアニリン構造の 4 位に塩素原子を有するが、この塩素原子を *n*-ヘキシル基や 2-ピリジル基に変換した類縁体もメラノーマの運動を抑制したことから、アニリン構造 4 位には多様な構造の置換基が許容されると考えられた。そこで本研究では、化合物 **1** の標的タンパク質を修飾することのできる置換基を、エチレングリコールユニットを介してアニリン構造の 4 位に導入することとした。また、化合物 **1** の標的タンパク質を修飾する置換基としては、Sodeoka らの開発した O-NBD 基⁴を用いることとした。O-NBD 基自体は蛍光を示さないが、タンパク質のリジン残基に対して高い反応性を示す。その結果、標的タンパク質のリジン残基が NBD 基により修飾され、初めて蛍光を発するという特徴を有する。さらに、化合物 **1** と NBD 基との間の距離が標的タンパク質の蛍光ラベル化に及ぼす影響を調べるため、エチレングリコールユニットの数 (*n*) を 1~6 まで変化させた。なお、化学プローブの合成を効率的に進めるため、化合物 **1** の部分構造を含むアルキン **3**、および、エチレングリコールユニットの末端に NBD 基を有するアジド **4a-f** を、Huisgen 反応により縮合することとした。

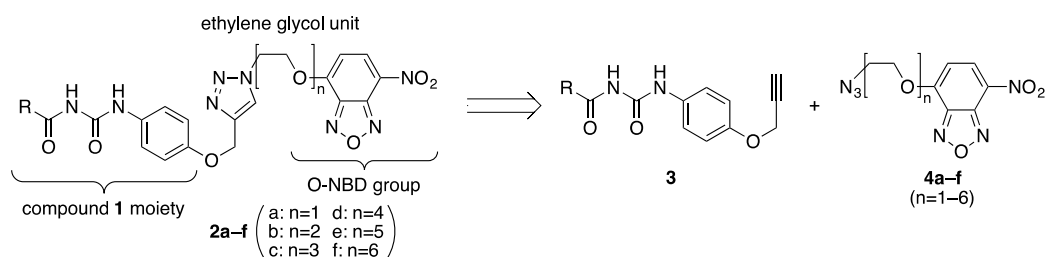


図 2. 化学プローブ **2a-f** の構造および逆合成解析.

【化学プローブの合成】

アルキン **3** の合成経路を図 3 に示す。カルボン酸 **5** から調製したアミド **6** を oxalyl chloride で処理してアシルイソシアネート **7** とした後、4-(2-propynyloxy)aniline (**8**) と反応させてアシルフェニルウレア構造を有するアルキン **3** を得た。

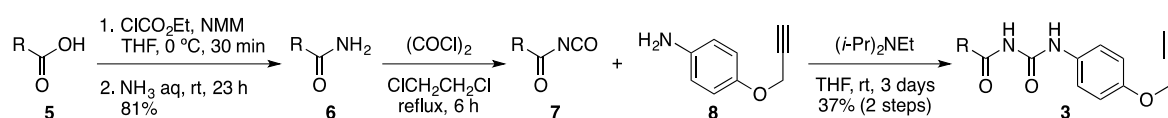


図 3. アルキン **3** の合成経路.

アジド **4a-f** の合成経路を図 4 に示す。**4a** は、市販の 2-azidoethanol (**9a**) と NBD-F (**10**) を *N*-ethyl-diisopropylamine の存在下反応させることにより合成した。**4b** および **4c** は、**11b** および **11c** の塩素原子をアジド基で置換して **9b** および **9c** とした後、**10** と反応させることにより合成した。**4d-f** は、ポリエチレングリコール **12d-f** の片方の水酸基のみをトシル化してモノトシレート **13d-f** とした後でトシル基をアジド基で置換し、得られたアジドアルコール **9d-f** と **10** を反応させることにより合成した。

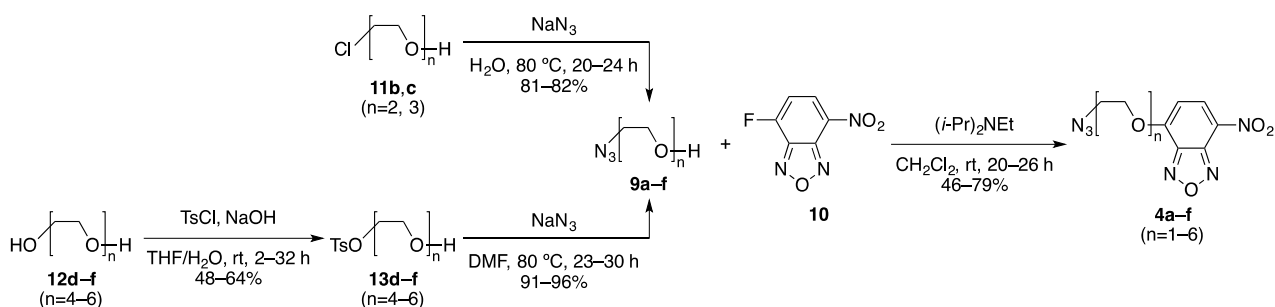


図4. アジド **4a-f** の合成経路.

化学プローブ **2a-f** の合成経路を図 5 に示す。アルキン **7** とアジド **4a-f** を銅触媒の存在下反応させることにより Huisgen 反応を行なって、目的とする **2a-f** を得た。

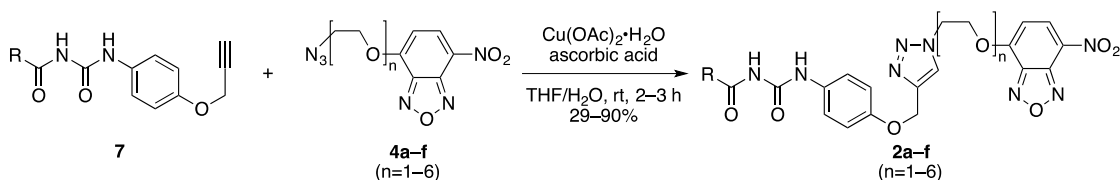


図5. 化学プローブ **2a-f** の合成経路.

本研究では、タンパク質の修飾により NBD 基を失った化学プローブ由来物が細胞運動に与える影響を明らかにするため、NBD 基を持たない類縁体 **14a-f** をアルキン **7** とアジドアルコール **9a-f** から合成した (図 6)。

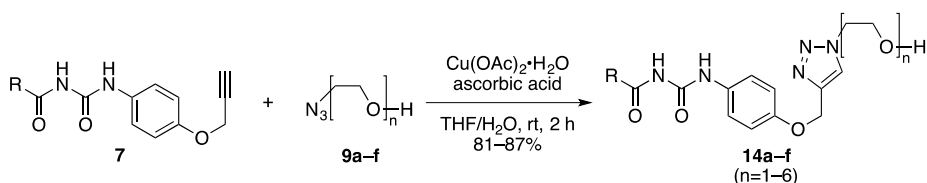


図6. NBD 基を持たない類縁体 **14a-f** の合成経路.

【化学プローブによる化合物 1 の標的タンパク質の同定】

癌関連線維芽細胞を合成した化学プローブ **2a** で処理し、得られた細胞破碎液を SDS-PAGE で分離したところ、70 kD 程度のタンパク質が蛍光標識されていることが明らかとなった (図 7A)。また、この蛍光標識は濃度依存的に化合物 **1** で阻害されたことから (図 7B)、観察されたタンパク質の蛍光標識は、化学プローブ **2a** に存在する化合物 **1** の部分構造に特異的なことが明らかとなった。

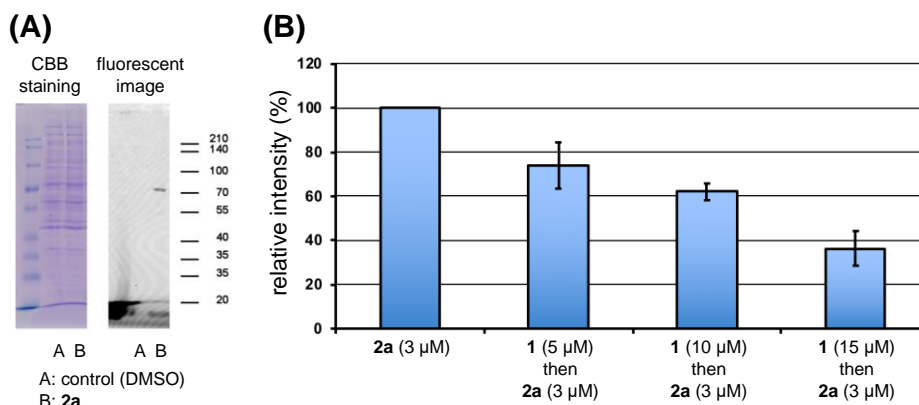


図7. (A) 化学プローブ **2a** によるタンパク質の蛍光標識;(B) 化合物 **1** による標識阻害.

化合物 **1** の部分構造と NBD 基を架橋するエチレングリコールユニットの長さ (n) に着目すると、化学プローブ **2b** (n=2) は **2a** (n=1) よりもおおよそ 2.5 倍強く 75 kD のタンパク質を蛍光標識することが明らかとなった (図 8)。

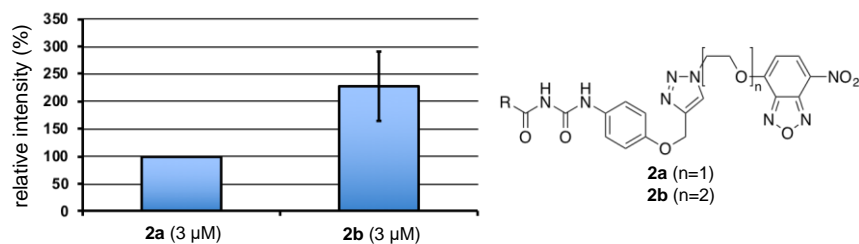


図8. 化学プローブ **2a** および **2b** の蛍光標識能の違い.

次に、化学プローブ **2b** で処理した癌関連線維芽細胞の破碎液からを蛍光標識されたタンパク質を抽出・精製し、質量分析により一次配列を解析した。その結果、**2b** により蛍光標識されたタンパク質 (以降、タンパク質 **X** と表記する) は約 600 アミノ酸残基から成り、特定のリジン残基に蛍光発色団 (NBD 基) が結合していることが明らかとなった。タンパク質 **X** は核酸生合成に関与する酵素であり、細胞骨格系タンパク質との相互作用が知られているが、EMT への関与についてはこれまで報告されていない。また、化合物 **1** が EMT

を阻害する濃度では細胞の核酸合成は影響を受けないことから、タンパク質 X の核酸合成関連酵素としての機能は EMT に関与しないことが明らかとなった。

【タンパク質 X の機能阻害が細胞運動に与える影響】

前述のように化合物 **1** は、メラノーマおよび癌関連線維芽細胞の運動能を阻害する。そこで本研究では、化合物 **1** の部分構造を有する化学プローブ **2b** およびその誘導体 **14b** の細胞運動阻害活性を、癌関連線維芽細胞を用いて評価した (図 9)。**2b** および **14b** は、3–6 μM の濃度で癌関連線維芽細胞の細胞運動を 50%以上阻害し、同濃度における阻害活性は親化合物 **1** よりも強いものであった。このことから化合物 **1** のアニリン構造 4 位への置換基導入は、当初の予想通り細胞運動阻害活性に悪影響を与えないことが明らかとなった。

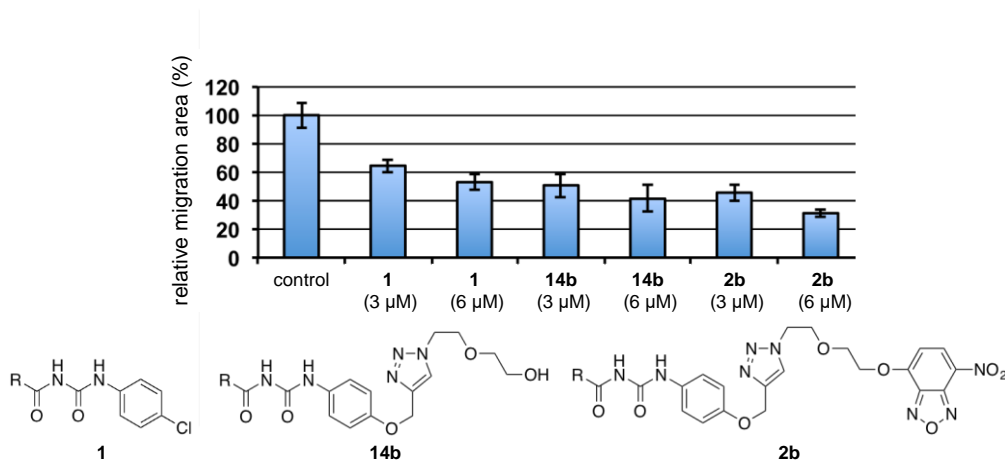


図9. **1**、**14b**、および **2b** が細胞運動に及ぼす影響.

さらに、本研究により化合物 **1** の標的タンパク質として同定されたタンパク質 X の機能を siRNA により抑制したところ、細胞運動が顕著に阻害されることが明らかとなった (図 10)。これらの結果から、化合物 **1** がタンパク質 X の機能を阻害することで細胞運動阻害活性を示すことが明らかとなった。

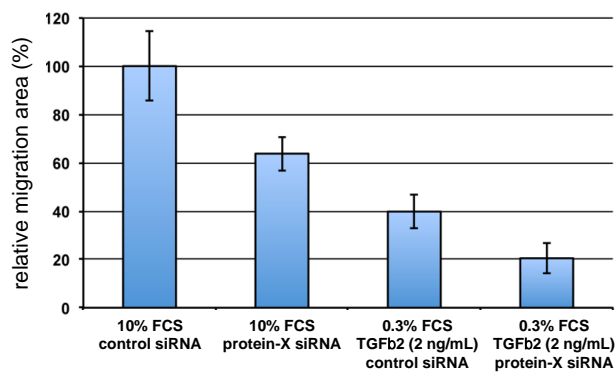


図10. タンパク質 X の siRNA によるノックダウンが細胞運動に及ぼす影響.

【まとめ】

本研究では、細胞運動阻害活性を示す化合物 **1** の作用メカニズムの解明を目的とし、化合物 **1** の標的タンパク質を蛍光標識することのできる化学プローブ **2a-f** を設計・合成した。合成した化学プローブ **2a** および **2b** で癌関連線維芽細胞を処理したところ、およそ 70 kD の核酸合成関連酵素であるタンパク質 X が蛍光発色団により修飾されたことが明らかとなった。また、化学プローブ **2b** は親化合物 **1** よりも強く癌関連線維芽細胞の運動能を阻害した。さらに、タンパク質 X の機能を siRNA により抑制することによっても、癌関連線維芽細胞の運動能が顕著に低下した。以上の結果から、化合物 **1** はタンパク質 X の機能を阻害することで、細胞運動阻害活性を示すことが明らかとなった。なお、小麦胚芽抽出液をベースとした方法により発現したタンパク質 X は化学プローブ **2b** により蛍光標識されなかった。このことから、化合物 **1** や化学プローブ **2** の化合物 **1** 部分はタンパク質 X ではなく、*in vitro* でタンパク質 X と相互作用するパートナータンパク質に結合することで、タンパク質 X の機能を阻害するものと考えられる。現在、タンパク質 X のパートナータンパク質の探索を行なっている。

【謝辞】

ここに述べた成果は、林 謙一郎 准教授(大阪大学大学院医学系研究科)ならびに中川 好秋 准教授(京都大学大学院農学研究科)との共同研究によるものです。また、研究の実施には、京都大学化学研究所共同利用・共同研究拠点の共通設備・研究機器 (Bruker AVANCE III600 および JEOL JNM-ECA600 NMR 装置 ; JEOL JMS-MS 700V 質量分析装置) を使用しました。

【引用文献】

1. Gonzalez, D. M.; Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* **2014**, *7*, re8.
2. Hayashi, K.; Watanabe, B.; Nakagawa, Y.; Minami, S.; Morita, T. RPEL proteins are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e89016.
3. Watanabe, B.; Minami, S.; Ishida, H.; Yoshioka, R.; Nakagawa, Y.; Morita, T.; Hayashi, K. Stereospecific inhibitory effects of CCG-1423 on the cellular events mediated by myocardin-related transcription factor A. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0136242.
4. Yamaguchi, T.; Asanuma, M.; Nakanishi, S.; Saito, Y.; Okazaki, M.; Dodo, K.; Sodeoka, M. Turn-ON fluorescent affinity labeling using a small bifunctional *O*-nitrobenzoxadiazole unit. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1021–1029.

以上