| 京都大学 | 博　士（薬科学） | 氏 名 | 吉村　彩 |
|---|---|---|---|
| 論文題目 | がん悪性化を促進する低酸素誘導因子（HIF-1）とアミノ酸代謝を標的にする天然有機化合物の探索と作用機序に関する研究 | | |

がん腫瘍内部でがん細胞は低酸素・低栄養環境に曝されている。生存に必須な酸素とエネルギー源に乏しい過酷な環境を生き延びるためにがん細胞は低酸素誘導因子（hypoxia inducible factor-1; HIF-1）により血管を新生し、改変したアミノ酸代謝機構により限られた栄養源から効果的な代謝システムを構築している。このようながん細胞の生存戦略を標的にする化合物を取得できれば、副作用の少ない抗がん剤創製につながると期待できる。本研究では、がん悪性化に寄与する低酸素誘導因子HIF-1（第一章）とアミノ酸代謝（第二章）に作用する天然有機化合物の探索と作用機序解析を行った。

**第一章　HIF-1阻害剤verucopeptinに関する研究**

HIF-1 は血管新生や浸潤、代謝のリプログラミングに関わる遺伝子の転写を活性化し、がんの悪性化に寄与する。HIF-1 は HIF-1α と HIF-1β からなるヘテロ二量体である。HIF-1α は mTORC1（mammalian target of rapamycin complex-1）経路によって翻訳制御され、低酸素環境下でのみ分解されずに機能する。そのため HIF-1α はがん化学療法の標的分子として注目されている。本章で研究対象とする verucopeptin は、HIF-1 の転写活性を検出するレポーターアッセイで阻害活性が認められた *Streptomyces* 属放線菌培養液抽出物から単離された化合物である。

Verucopeptin は環状デプシペプチド部位と脂肪鎖部位からなる化合物であり、1993 年に抗腫瘍物質として報告されている。しかしその立体構造と作用機序は不明であった。本研究ではまず、verucopeptin の立体化学を決定した。すなわち環状デプシペプチドを構成するアミノ酸残基は Marfey 法により、側鎖 THP 環周辺部位は化学変換物の NMR 解析により決定した。分岐メチルを有する脂肪鎖部位は化学分解物に対する PGME 法と不斉合成した標品との物理化学データの比較によって決定した。その過程で、分岐メチルに挟まれたジェミナルプロトン間のケミカルシフトの差を利用した分岐メチルの相対立体構造予測法の不完全さに気付き、対象とするジェミナルプロトンの近傍にカルボニル基が導入された 2,4-ジメチルおよび 2,4,6-トリメチルカルボン酸化合物群では、分岐メチル基の正確な立体予測が可能であることを示した。

Verucopeptin は低濃度でレポーター活性を阻害し（$IC_{50}$: 0.2 μg/mL）、本化合物は HIF-1 制御下にある遺伝子 GLUT1 と BNIP3 の発現量も濃度依存的に抑制した。本化合物の HIF-1α への影響を検討したところ、HIF-1α タンパク質を減少させること、そこには HIF-1α の分解経路は関与しないこと、HIF-1α の mRNA 量にも影響を与えないことを見出した。これらの結果は、本化合物が HIF-1α の翻訳を阻害する可能性を示唆した。実際、本化合物は mTORC1 の下流に位置する 4E-BP1 や S6 キナーゼのリン酸化を抑制していた。ここで verucopeptin は mTORC1 阻害剤である rapamycin と似た分子サイズを有することから、rapamycin と同様に FKBP12 と mTORC1 との三者複合体を形成し、HIF-1α の翻訳を阻害する可能性が考えられた。この可能性の検証のために FKBP12 の阻害剤 SLF のビオチン化プローブを合成し、verucopeptin と rapamycin の FKBP12 への結合を比較した。その結果、verucopeptin は rapamycin とは異なり SLF と競合しなかった。これは verucopeptin は rapamycin とは異なるメカニズムで mTORC1 経路を阻害し、HIF-1 の転写活性を抑制することを示していた。さらに、verucopeptin を担持したビーズを用いたプルダウン法によって結合タンパク質を探索した。すると heat shock protein 60（HSP60）が候補タンパク質として同定された。実際、verucopeptin は HSP60 の変性 malate dehydrogenase に対するシャペロン活性を抑制した。ここで、HSP60 阻害剤 epolactaene tertiary butyl ester は HIF-1α のタンパク量を減少させることが知られているが、mTORC1 経

路は抑制しなかったことから、HSP60 は mTORC1 経路には関与していないことが示唆された。以上の結果から、verucopeptin は mTORC1 経路と HSP60 を阻害し、HIF-1 の活性を抑制することが明らかになった。

**第二章　プロリン資化阻害物質lipopeptide 類に関する研究**

がん細胞は正常細胞と異なる代謝システムを構築しており、がん細胞特異的な代謝経路を阻害することは有望ながん治療戦略とされている。しかしその代謝機構には未解明な点が多く、がん治療の標的分子もほとんど同定されていない。本章ではアミノ酸代謝機構の理解を目的に、特定のアミノ酸代謝を阻害する天然物を探索し、その化学構造の解明と生物活性の検証を行った。まず、特定のアミノ酸を唯一の窒素源とする培地で培養した分裂酵母に対する生育阻害を指標に、約4000の微生物培養液抽出物から特徴的な活性を示すブロスを探索した。これによりプロリンの資化を優先的に阻害する糸状菌培養液抽出物を同定し、各種クロマトグラフィーによって活性成分lipopeptide Aとその類縁体lipopeptide Bを得た。

まず、収量が多く安定なlipopeptide Bの構造決定を行った。各種測定からペプチド性化合物であることが明らかになったため、Marfey法を適用したところlipopeptide Bの構成アミノ酸はα-amino isobutyric acid（AIB）、L-alanine、β-alanineとL-prolineであると判明した。MS/MS解析とNMR解析により本化合物のC末端配列はPBBPBBPABXABBXBBB（B: AIB、X: βAla）と決定できた。さらに、酸加水分解物のLC-MS解析によりN末端部分の長鎖脂肪酸を含むフラグメント構造を決定し、全直鎖ペプチド構造を確定した。Lipopeptide AはMS/MS解析とEdman分解の結果から、lipopeptide BのC末端にβAla-LAlaとβAla-Glyの2種類のペプチドが9:1の割合でそれぞれ伸長した化合物の混合物であることが示唆された。そこでlipopeptide BにβAla-LAlaを縮合させた化合物を合成し、天然由来のlipopeptide Aと比較解析したところ、LC-MS解析において溶出時間とMS/MSパターンが一致し、lipopeptide Aの構造決定を達成した。

Lipopeptide Aはグルタミン酸とセリン、ロイシンの資化に比べてプロリン資化を2倍程度、強く阻害したが、lipopeptide Bは阻害活性を示さなかった。AIBを多く含むペプチドにはヘリックス構造を形成するものが多く知られている。そこでCDスペクトルを測定した結果、lipopeptide Aはヘリックス構造をとる一方でlipopeptide Bは不規則構造であることが示された。さらにlipopeptide Aのみが溶血活性を示したことから、ヘリックス型のlipopeptide Aが細胞膜を損傷させることが明らかとなった。以上の結果から、プロリン資化を阻害するlipopeptide Aはヘリックス構造をとり、膜損傷とプロリン資化の優先的な阻害を示すことが明らかになった。また、その活性発現にはC末端の2つのアミノ酸が重要であることが明らかになった。

**総括**

本研究ではがん悪性化を促進するHIF-1とアミノ酸代謝経路を阻害する物質を探索し、活性成分として二種の天然有機化合物を取得した。Verucopeptinについては立体構造を決定し、1,3-ジメチルの相対立体推測法の改良にも成功した。さらに本化合物がmTORC1経路とHSP60を阻害し、強力にHIF-1を阻害することを見出した。Lipopeptide Aに関する研究ではその化学構造を明らかにし、生物活性発現にC末端の2アミノ酸が必須であることを見出した。また、本化合物が細胞膜障害とプロリン資化の優先的な阻害を示すことから、両作用の関連性が示唆された。これらの化合物について更なる構造活性相関研究と作用機構解析を推進することで、がん細胞に特異的に作用する抗がん剤創製が期待される。

（論文審査の結果の要旨）

著者は、副作用の少ない抗がん剤創製に向けて、がん悪性化に寄与する低酸素誘導因子HIF-1とアミノ酸代謝に作用する天然有機化合物の探索と作用機序解析を行った。

すなわち、著者は、*Streptomyces* 属放線菌培養液抽出物から単離された HIF-1 阻害剤である化合物である verucopeptin の立体化学を各種 NMR 法、分解フラグメントの不斉合成による比較などにより決定した。その過程で、分岐メチルに挟まれたジェミナルプロトン間のケミカルシフトの差を利用した分岐メチルの相対立体構造予測法の不完全さに気付き、対象とするジェミナルプロトンの近傍にカルボニル基が導入された 2,4-ジメチルおよび 2,4,6-トリメチルカルボン酸化合物群では、分岐メチル基の正確な立体予測が可能であることを示した。また、verucopeptin は低濃度で HIF-1 活性を阻害し HIF-1 制御下にある遺伝子 GLUT1 と BNIP3 の発現量も濃度依存的に抑制すること、HIF-1α タンパク質を減少させること、そこには HIF-1α の分解経路は関与しないこと、HIF-1α の mRNA 量にも影響を与えないことを見出した。これらの結果は、verucopeptin が HIF-1α の翻訳を阻害する可能性を示唆し、verucopeptin は mTORC1 の下流に位置する 4E-BP1 や S6 キナーゼのリン酸化を抑制すること、この阻害機構は rapamycin とは異なることを明らかにした。さらに、verucopeptin を担持したビーズを用いたプルダウン法によって結合タンパク質を探索し、heat shock protein 60（HSP60）を結合タンパク質の一つとして同定した。これらの結果から、verucopeptin は mTORC1 経路と HSP60 を阻害して、HIF-1 活性を抑制することを明らかにした。

一方著者は、アミノ酸代謝機構の理解を目的に、分裂酵母を用いて特定のアミノ酸代謝を阻害する天然物を探索し、その化学構造の解明と生物活性の検証を行った。その過程で、プロリンの資化を優先的に阻害する糸状菌培養液抽出物を同定し、各種クロマトグラフィーによって活性成分lipopeptide Aとその類縁体lipopeptide Bを得た。まず、収量が多く安定なlipopeptide Bの構造決定を行った結果、構成アミノ酸はα-amino isobutyric acid（AIB）、L-alanine、β-alanineとL-prolineであることを明らかにした。続いて、MS/MS解析とNMR解析により本化合物のC末端配列はPBBPBBPABXABBXBBB（B: AIB、X: βAla）と決定した。さらに、酸加水分解物のLC-MS解析によりN末端部分の長鎖脂肪酸を含むフラグメント構造を決定し、全直鎖ペプチド構造を確定した。Lipopeptide AはMS/MS解析とEdman分解の結果から、lipopeptide BのC末端にβAla-LAlaとβAla-Glyの2種類のペプチドが9:1の割合でそれぞれ伸長した化合物の混合物であることを明らかにした。そこで、lipopeptide BにβAla-LAlaを縮合させた化合物を合成し、天然由来のlipopeptide Aと比較解析したところ、LC-MS解析において溶出時間とMS/MSパターンが一致し、lipopeptide Aの構造決定を達成した。Lipopeptide Aはグルタミン酸とセリン、ロイシンの資化に比べてプロリン資化を2倍程度、強く阻害したが、lipopeptide Bは阻害活性を示さなかった。AIBを多く含むペプチドにはヘリックス構造を形成するものが多く知られている。そこでCDスペクトルを測定した結果、lipopeptide Aはヘリックス構造をとる一方で、lipopeptide Bは不規則構造であることが示された。一方、lipopeptide Aのみが溶血活性を示したことから、ヘリックス型のlipopeptide Aが細胞膜を損傷させることが明らかとなった。以上の結果から、プロリン資化を阻害するlipopeptide Aはヘリックス構造をとり、膜損傷とプロリン資化の優先的な阻害を示すことを明らかにし、その活性発現にはC末端の2つのアミノ酸が重要であることを明らかにした。

以上のように、著者は、がん悪性化を促進する HIF-1 とアミノ酸代謝経路を阻害する物質を探索し、活性成分として二種の天然有機化合物を取得した。Verucopeptin については立体構造を決定し、1,3-ジメチルの相対立体推測法の改良にも成功した。さらに verucopeptin が mTORC1 経路と HSP60 を阻害し、強力に HIF-1 を阻害することを見出した。一方、lipopeptide A に関する研究

ではその化学構造を明らかにし、生物活性発現にC末端の2アミノ酸が必須であることを見出した。また、本化合物が細胞膜障害とプロリン資化の優先的な阻害を示すことから、両作用の関連性が示唆された。これらの化合物について更なる構造活性相関研究と作用機構解析を推進することで、がん細胞に特異的に作用する抗がん剤開発が期待される。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成29年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第１４条第２項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：2017年 6月 22日以降