序論

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。HIF-1 阻害剤探索のため所属研究室では HIF-1 の転写活性を検出するルシフェラーゼレポーターアッセイを構築している。本アッセイ系を用いて約 5000 株の微生物培養液抽出物をスクリーニングした結果、*Streptomyces* 属放線菌培養液抽出物がルシフェラーゼ活性を阻害した。本糸状菌培養液抽出物から二層分配と各種クロマトグラフィーにより活性本体として verucopeptin を単離していた。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（Fig. 1）。しかしその立体構造と作用機序は不明であった。

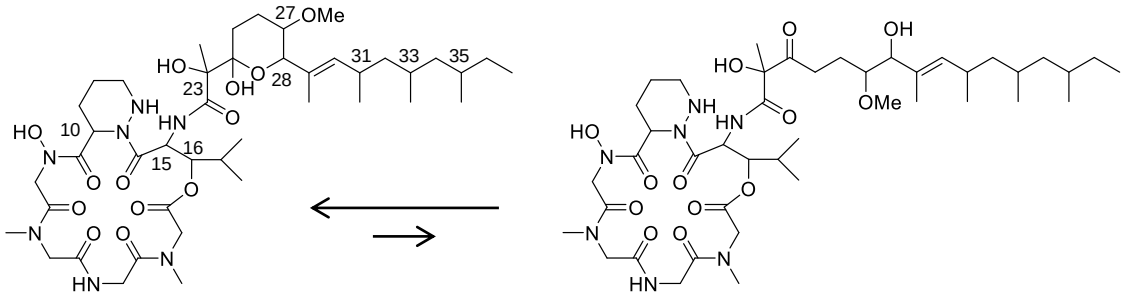

Figure 1. Chemical structure of verucopeptin.

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 解析と改良 Mosher 法により決定した。分岐メチルを有する

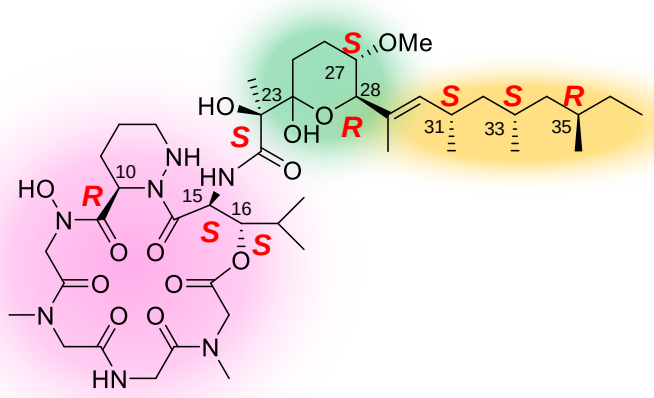

Figure 2. The absolute configuration of verucopeptin.

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。以上の結果から verucopeptin の立体化学を 10*R*, 15*S*, 16*S*, 23*S*, 27*S*, 28*R*, 31*S*, 33*S*, 35*R* と決定できた（Fig.2）。

側鎖脂肪酸部位の 1,3-dimethyl 構造の立体化学を決定するためには考えられる立体化学を有する全ての標品を合成する必要があり、verucopeptin の脂肪鎖部位の立体決定では全標品の合成に 1 年以上を要した。そのためより簡便で合理的な立体化学の推測方法が必要であると考えた。最近、2 つのメチル基の間に挟まれたメチレンプロトンのケミカルシフトの差を利用することで 1,3-dimethyl 構造の相対立体配置の推測ができる方法が報告された。しかし本手法では 1,3-dimethyl 構造周辺の置換基によってメチレンプロトンのケミカルシフト差が影響を受けるという欠点があった。そこで verucopeptin の立体化学決定に使用した全標品のメチレンプロトンのケミカルシフト差を検証した結果、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 複合体の下流に位置する 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 複合体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 を用いて 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。以上の結果から、verucopeptin は mTORC1 経路を阻害し、HIF-1 の活性を抑制することが明らかになった（Fig.3）。

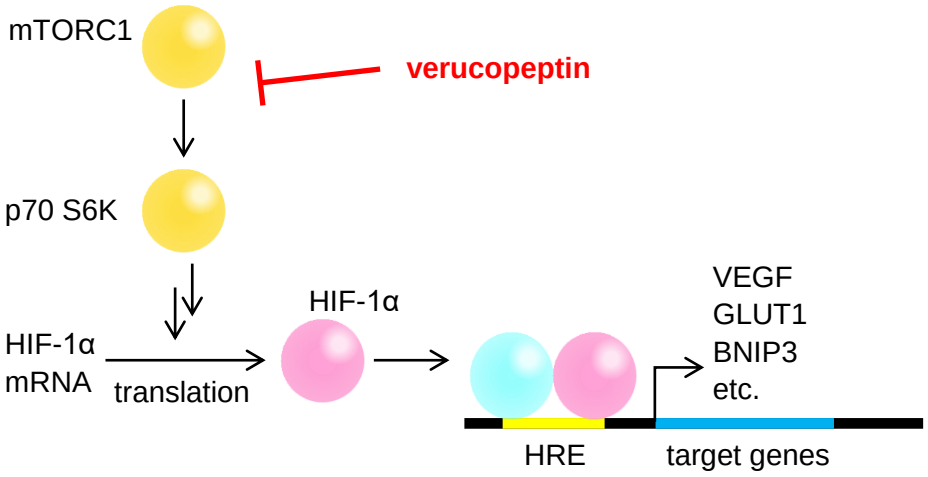

Figure 3. Verucopeptin inhibited HIF-1 transcriptional activity by suppressing mTORC1 pathway.

第二章　プロリン資化阻害物質lipopeptide 類に関する研究

アミノ酸代謝経路ではアミノ酸が中間体を介してエネルギーを産生し、細胞の生存を可能

にする。近年、アミノ酸や中間体が他の代謝経路に影響を及ぼすことで複雑なアミノ酸代謝ネットワークが存在することが明らかになってきた。さらに、がん細胞は正常細胞と異なるアミノ酸代謝ネットワークを構築しており、それががんの悪性化と関連していることも示されてきた。そのため、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株の微生物培養液抽出物から特徴的な活性を示す微生物培養液抽出物を探索した。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の構造を決定し、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が伸長したlipopeptide A_1とβAla-Glyが伸長したlipopeptide A_2の混合物であることが示唆された。さらにlipopeptide A_1とA_2の存在比は約9:1だった。Lipopeptide A_1とA_2は分離不可能だったため、lipopeptide BにβAla-LAlaを縮合させたlipopeptide A_1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_1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。最後にlipopeptide A_1の生物活性を評価したところ、lipopeptide Aと同様にプロリン資化阻害活性を示し、ヘリックス構造を形成することで膜障害活性を持つ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-dimethyl 構造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

経路を阻害し、強力に HIF-1 を阻害することを見出した。mTORC1 複合体はロイシンによって活性化され、その下流では多くの因子が制御されていることからアミノ酸代謝ネットワークのハブ分子の 1 つと提唱されている。そのため、verucopeptin は HIF-1 阻害剤としてだけでなく mTORC1 複合体の制御下のアミノ酸代謝ネットワークを解明するツールとしても利用できる可能性を秘めている。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。

今後、両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。