

ケミカルバイオロジー研究 Chemical Biology Research

代表研究者 長田 裕之
OSADA, Hiroyuki
(長田抗生物質研究室)
(Antibiotics Laboratory)

ゲノム科学、構造生物学の研究の進展に伴い、遺伝子およびタンパク質の機能と構造に関する莫大な情報が蓄積されつつある。当研究では、これらの情報に基づき、生体高分子と低分子有機化合物の相互作用を中心に捉え、化学生物学的手法(ケミカルバイオロジー)・化学遺伝学的手法(ケミカルゲノミクス)で生命現象を解明することを目的とした。全4研究チーム体制で、有機化学的手法で生命機能の新しい調節物質(バイオブローブ)の探索・設計・創製を行い、さらに分子細胞生物学的手法により、その細胞内分子標的を提示することを目的に実施した。化学生物学を武器として、我が国のポストゲノム時代における創薬科学の基盤としての化学・生物学融合領域の創成に資した。

1. 分子探索研究

研究担当者: 長田, 掛谷, 渡辺, 室井, 植木, 清水, 叶 (長田抗生物質研究室); 越野 (RTC 物質構造解析チーム); 中村 (RTC バイオ解析チーム)

最終年度の本年度は、これまでに得られた研究成果を基盤に、複雑な血管新生過程、がん転移・浸潤機構、細胞分裂機構を解明するためのバイオブローブの探索研究ならびに作用機構解析研究、微生物二次代謝産物のゲノム解析研究ならびにメタボローム解析研究、および効率的構造解析法の確立を目指した基盤研究を行った。血管新生抑制剤エボキシキノールBの標的蛋白質の1つとしてVEGFR2を同定し、エボキシキノールBは不可逆的にVEGFR2のシステイン残基を介して結合することを明らかにした。さらに、エボキシキノールBは、VEGFのみならず、EGF, FGF, およびPDGFによって活性化される細胞内情報伝達系を抑制し、*in vivo*においても抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。一方、ポロ関連キナーゼ1(Polo Like Kinase 1; Plk1)のC端側に保存されたポロボックスドメイン(PBD)依存的結合を阻害する小分子を数千化合物からなる化合物ライブラリー(NPDepo)から探索した結果、PBDと標的タンパク質(Wee1)の結合を顕著に阻害する化合物を見出した。本阻害剤を利用して、PBDに依存した結合はPlk1の細胞分裂における種々の役割の中でも、特に分裂中期における染色体の整列に最も重要な役割を有することを明らかにした。また、サイトトリエンAを生産する放線菌のゲノム解析、¹³CNMR化学シフト予測コンピューターシステムCAST/CNMRのデータベースの拡張、2D-DIGEを基盤としたバイオブローブ標的蛋白質の解析システムの拡張、化合物アレイの応用展開等を行った。

2. 分子創製研究

研究担当者: 清水猛, 袖岡, 平井, 闔闔¹, 清水忠², 土屋² (袖岡有機合成化学研究室); 伊藤, 松尾, 眞鍋, 石渡 (伊藤細胞制御化学研究室); 高橋 (RTC物質構造解析チーム); 坂本 (侯有機金属化学研究室)

分子創製研究チームは生命機能の新しい調節物質(バイオブローブ)を精密有機合成化学を基盤として設計、創製するということがスタートした。そのまともめの年に当たり、本年度は腫瘍血管新生阻害剤を始めとする抗腫瘍作用を持ったバイオブローブの創製を目的に研究を行った。まず、昨年度のオバリン不斉合成ルートにおけるエボキサイドへの求核付加反応を改良し、全収率を大幅にアップさせることができた。合成品は、中間体も含めて生物活性試験に供した。さらに、抗腫瘍活性アセトゲニン、モンタナシンの構造決定に向けて、その推定構造式の合成を検討した。その結果、分子内オレフィンメタセシスを鍵段階とするコンバージェントルートにより全炭素骨格を組上げることに成功した。また、リベロマイシンAの三級ヒドロキシ基のヘミサクシニル基をジヒドロピランの酸化的開裂反応を行なうことにより構築するという新しい方法を見いだした。さらに、その三級アルコールのサクシネートとアルキンの反応を経由して6,6-スピロケタールへの変換も行なった。さらに、プロテインホスファターゼの不可逆的阻害剤であるRK-682のエナミド誘導体の蛍光ラベル体を合成し、細胞内局在、細胞内タンパク質ラベリングを検討した。その結果、蛍光ラベル体は細胞質に存在し、様々なタンパク質と細胞内で共有結合を形成することがわかった。また、ユニークな構造を有する天然物フィサリンのDEFGH環部の合成を検討し、EF環部の構築法を確立した。また、細胞死抑制剤インドリルマレイミド(IM)誘導体の作用機序解明を進めた結果、IM誘導体はミトコンドリアに局在していることを見出した。一方、不要糖タンパク質分解に関与し、フォールディング病との関連も指摘されているペプチドN-グリカナーゼ(PNGase)の選択的阻害能を有する糖鎖分子プローブの合成を行った。酵素認識部位と反応部位を持ったハイマンノース型糖鎖ハロアミド体を合成し、PNGaseの阻害実験を行ったところ、現在知られている化合物の中で最強の阻害効果を有していることが明らかとなった。また、蛍光性置換基を導入することにより細胞内への導入が可能となり細胞内PNGase活性の選択的阻害に成功した。以上、ケミカルバイオロジー研究における化学屋と生物屋の連携、協力、融合、一体化に向けて、次に繋がる仕事をなした。

3. 標的探索研究

研究担当者: 服部, 安達, 相川, 小川, 間, 後藤¹, 丸山³, 秋山³, 北畑² (辻本細胞生化学研究室); 宮野, 吾郷, 菅原 (宮野構造生物物理研究室); 小林, 石塚 (小林脂質生物学研究室); 伊藤(嘉), 阿部, 和田 (伊藤ナノ医工学研究室)

最終年度の平成19年度は、バイオブローブの細胞内標的分子となりうるタンパク質の機能制御機構及び候補タンパク質の更なる探索を遂行すべく、以下の解析を行った。第一に、新生児由来の絨毛外栄養膜細胞に特異的に発現する細胞表面抗原として単離された新規タンパク質Laeverinのリコンビナントタンパク質をバキュロウイルス発現系を用いて調製した。酵素学的解析により、これが新規のペプチン感受性ロイシナミンペプチダーゼであることを明らかにした。さらにその酵素学的性状は、胎盤に存在する他のM1アミノペプチダーゼのそれとは大きく異なっていることも明らかにした。第二に、喘息などの原因脂質であるロイコトリエンC4を産生するヒト由来膜貫通ロイコトリエンC4合成酵素に関して、そのリコンビナントタンパク質を分裂酵母を用いて大量発現させた。そして、X線結晶解析の手法によりロイコトリエンC4合成酵素の低分子との複合体を含めた構造と機能を世界で初めて明らかにした。第三に、HIV-1Vprと核輸送因子Importin α の結合を介した新規核移行機序がHIV-1複製に必須であり、この過程が抗ウイルス薬の標的になることを見出した。

第四に、細胞のコレステロールレベルが、低分子量GTP結合タンパク質 **rab11** を介して脂質のエンドサイトーシスを制御していることを、コレステロールに富んだ膜ドメインの動態を知る有用なプローブである **PEG-cholesterol** あるいは蛍光標識スフィンゴミエリンを用いることにより明らかにした。第五に、生体内で容易に分解をうけないように分子末端をなくし、その結果持続的な **RNA** 干渉効果を発揮するようなダンベル型 **RNA** の合成に成功した。以上のようにして、標的タンパク質の作用ならびに低分子化合物によるその機能制御のメカニズムの理解を深めることができた。

4. 標的制御研究

研究担当者：小嶋，深谷*⁴（分子細胞病態学研究ユニット）；松本，瀬戸，常泉，本（松本分子昆虫学研究室）；今本，小瀬，高木，水野（今本細胞核機能研究室）；吉田，伊藤，荒井*³，西村*¹（吉田化学遺伝学研究室）

最終年度は、本研究推進グループで研究されてきたバイオプローブが標的分子の機能をどう制御し、血管や腫瘍細胞、肝細胞の増殖・分化・アポトーシスを調節しているかを解明することによって、基本的な細胞機能の解明と同時に薬剤開発のための標的を提示することを目指し、動物モデルや動物細胞、昆虫細胞、分裂酵母を用いた **Reverse Chemical Genetics** を行った。その結果、サンギバマイシンが血管内皮細胞上の **ATPase** を抑制することにより内皮細胞にアポトーシスを誘導し、腫瘍血管形成を抑制することを見出した。また、非環式レチノイドを始めとする薬剤により核での発現が誘導されるタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼによる転写因子 **Sp1** の架橋不活性化反応に基づく増殖因子受容体発現低下による新しいアポトーシス経路とともに、1つの核-細胞質間輸送運搬体分子 (**importin** ファミリー) で複数の基質が認識される機構を結晶構造解析を通して明らかにし、ヒト細胞に存在する21種類の **importin** ファミリーが認識する基質群とこれを制御するバイオプローブを系統的に同定する解析系を新たに樹立した。さらに、ボンビコール (カイコガ性フェロモン) の生合成開始の鍵となる神経ホルモン **PBAN** シグナルによるフェロモン腺細胞内への **Ca²⁺** 流入誘起と脂肪滴膜上に存在し脂質分解を調節する **Lipid storage droplet protein 1 (Lsdp1)** が受けるリン酸化反応、細胞周期を阻害する抗がん活性物質 **FR901464** のメチルケタール体 (**spliceostatin A** と命名) によるスプライシング阻害とそれに伴うイントロン配列の翻訳など、バイオプローブの作用機構を理解すると同時に新たな創薬標的分子を同定することができた。

*¹ 基礎科学特別研究員, *² 訪問研究員, *³ 協力研究員, *⁴ 研究補助員

The four teams of the Chemical Biology Research Group are working to establish a new area of research that integrates chemistry and biology. A brief overview of the four teams: (1) Molecular Mining Research Team, (2) Molecular Invention Research Team, (3) Target Discovery Research Team, and (4) Target Regulating Research Team, follows. Their combined research contributed to basic and applied science and technological development, and provoked new era of a post-genome science.

1. Molecular Mining Research Team

The complex mechanisms of angiogenesis, cancer metastasis, and cell cycle have been investigated in order to establish efficient screening systems and identify lead compounds for new drugs. We found that epoxyquinol B, which was isolated from fungal metabolites as an antiangiogenic molecule, covalently bound and inhibited VEGFR2 kinase activated by VEGF. Moreover, epoxyquinol B inhibited antiangiogenic effects *in vitro* and *in vivo* by inhibiting not only VEGFR2 but also EGFR, FGFR, and PDGFR. We have developed a high throughput screening system to identify small molecule inhibitors of Polo box domain (PBD)-dependent binding. We found several hit compounds using a small molecule library in RIKEN NPDepo and one of them inhibited the binding between PBD and Wee1A. We have analyzed metabolites of cytotrienin A-producer, *Streptomyces* sp RK95-74, and cloned the gene cluster responsible for biosynthesis of cytotrienin A. A computer system CAST/CNMR has been developed for highly accurate prediction of ¹³C-NMR chemical shift values and structural determination including stereochemistry of new bioprobes. A proteome profiling system of small molecule-treated cells by 2D-DIGE has been also developed for classification of small molecules and the prediction of a target of small molecules.

2. Target Invention Research Team

In connection with studies on the synthesis of angiogenesis inhibitors, we have reinvestigated a coupling reaction of a terminal epoxide with some nucleophiles, and achieved an efficient synthesis of ovalicin. The synthetic samples were employed to bioassay. In order to determine the structure of an antitumor acetogenin, montanacin, a new method for construction of the carbon backbone have been developed. We have developed the method for novel preparation of the succinates of tertiary alcohols for the synthesis of the derivatives of reveromycin A. Then, the succinates were converted into the 6,6-spiketol via the coupling with an alkyne. Irreversible protein phosphatase inhibitor RK-682 enamide (RE) derivatives were converted to their fluorescent labeled compounds. RE derivatives were found to be localized in cytosol and be able to bind covalently to their target proteins in cells. In the synthetic studies of DEFGH-ring moiety of physalins, which possesses unique structural feature, methodology for constructing its EF-ring part was established. To clarify the cell-death inhibition mechanism of indolylmaleimide (IM) derivatives, various derivatives bearing fluorescent group were prepared. Localization studies in cells suggested that IM derivatives localized in mitochondria. We focused on a Peptide N-glycanase (PNGase) relates to proteasomal protein degradation (ERAD), and developed the glyco-molecular probes having specific inhibitory activity of PNGase. For the fundamental studies on the role of PNGase *in vivo*, specific inhibitor can be beneficial. The inhibitory activities against PNGase were evaluated and chitobiosyl haloacetamide derivatives showed remarkable inhibition activity (4000 fold strong). Moreover, fluorescence labeled probe based on the chitobiosyl haloacetamide derivatives was developed. Specific inhibition of PNGase activity in cell by fluorescence labeled probe was experimentally confirmed.

3. Target Discovery Research Team

We have performed following studies to study regulatory mechanisms of target proteins by bioprobes and identify novel targets for

bioprobes. First of all, we have studied Laeverin/Aminopeptidase Q (APQ), a cell surface protein specifically expressed on human embryo-derived extravillous trophoblasts. Enzymatic analysis of a recombinant human Laeverin expressed by a baculovirus system revealed that Laeverin is a novel bestatin sensitive leucine aminopeptidase and shows different properties from those of other M1 aminopeptidases expressed in the placenta. Second, we have produced a recombinant form of human leukotriene C4 (LTC4) synthetase using a fission yeast. We have shown the atomic structure of human LTC4 synthetase in a complex with glutathione by X-ray crystallography. Third, we have exhibited that the novel mechanism of nuclear import of Vpr promoted by importin α is crucial for human immunodeficiency virus type I replication. Fourth, we have revealed that cholesterol controls endocytic routes of a subset of membrane lipids through rab11, a small GTP-binding protein, by using poly(ethylene glycol)derivatized cholesterol and fluorescent sphingomyelin. Fifth, we have created dumbbell-shaped nanocircular RNAs to perform a prolonged effect in RNA interference. In conclusion, we have obtained profound knowledge about mechanisms of target proteins and regulations of those targets by small molecules.

4. Target Regulating Research Team

We presented novel drug targets through uncovering molecular mechanisms by which bioprobes exert their biological functions. We found inhibition of tumor angiogenesis by sangivamycin through suppression of endothelial cell surface ATPase and a novel pathway for hepatic cancer apoptosis by acyclic retinoid via transglutaminase-mediated crosslinking and inactivation of transcription factor Sp1 followed by reduced expression of growth factor receptors. We developed the system for identification of nuclear transport pathway, using importins-depleted cytosol and recombinant protein of importins in an *in vitro* transport assay. It has been suggested that a series of phosphorylation events are involved in the PBAN-mediated intracellular signal transduction. We found that PBAN signaling induced phosphorylation of Lipid storage droplet protein 1 (Lsdp1), which associates exclusively with the surface of the lipid droplet and regulates lipolysis. Identification of target molecules is important for not only understanding how drugs act in cells but also developing more effective drugs. We identified the SF3b complex, an important component of the spliceosome, as the target of the methyl ketal derivative of FR901464 named the compound spliceostatin A, an antitumor cell cycle inhibitor. As the result of SF3b inhibition, splicing of pre-mRNA was inhibited, and the translation of the p27 pre-mRNA occurred to produce p27*, thereby inhibiting the cell cycle.

Staff

Group Head

Dr. Hiroyuki OSADA

Vice-Group Head

Dr. Masafumi TSUJIMOTO

1. Molecular Mining Research Team

Team leader

Dr. Hideaki KAKEYA (*Visiting Member*)

Members

Dr. Nobumoto WATANABE

Dr. Makoto MUROI

Dr. Masashi UEKI

Dr. Shiro SIMIZU

Dr. Naoki KANOH

Dr. Hiroyuki KOSHINO

Dr. Takemichi NAKAMURA

Visiting Members

Dr. Masaya IMOTO (Fac. Sci. Technol., Keio Univ.)

Dr. Daisuke UEMURA (Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ.)

Dr. Kazuo UMEZAWA (Fac. Sci. Technol., Keio Univ.)

2. Molecular Invention Research Team

Team leader

Dr. Takeshi SHIMIZU

Members

Dr. Mikiko SODEOKA

Dr. Go HIRAI

Dr. Kosuke DODO*¹

Dr. Tadashi SHIMIZU*²

Dr. Ayako TSUTIYA*2
Dr. Yukishige ITO
Dr. Ichiro MATSUO
Dr. Shino MANABE
Dr. Akihiro ISHIWATA
Dr. Shunya TAKAHASHI
Dr. Yasuharu SAKAMOTO

Visiting Members

Dr. Nobutaka FUJII (Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)
Dr. Jun'ichi KOBAYASHI (Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido Univ.)
Dr. Tadashi NAKATA (Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido Univ.)

3. Target Discovery Research Team

Team leader

Dr. Akira HATTORI (*Visiting Member*)

Members

Dr. Hideki ADACHI
Dr. Jun-ichi AIKAWA
Dr. Kenji OGAWA
Dr. Yoko AIDA
Dr. Yoshikuni GOTO*1
Dr. Masato MARUYAMA*3
Dr. Nobuko AKIYAMA*3
Dr. Nobutaka KITAHATA*2
Dr. Masashi MIYANO
Dr. Hideo AGO
Dr. Mitsuaki SUGAHARA
Dr. Toshihide KOBAYASHI
Dr. Reiko ISHITSUKA
Dr. Yoshihiro ITO
Dr. Hiroshi ABE
Dr. Akira WADA

Visiting Member

Dr. Akira TAKATUKI (Fac. Eng., Hosei Univ.)

4. Target Regulating Research Team

Team leader

Dr. Soichi KOJIMA

Members

Ms. Yayoi FUKAYA*4
Dr. Syogo MATSUMOTO
Dr. Hideharu SETO
Dr. Kazuhide TSUNEIZUMI
Dr. Kenich MOTO
Dr. Naoko IMAMOTO
Dr. Shingo KOSE
Dr. Masatoshi TAKAGI
Dr. Takeshi MIZUNO
Dr. Minoru YOSHIDA
Dr. Akihiro ITO
Dr. Ritsuko ARAI*3
Dr. Shinichi NISHIMURA*1

Visiting Members

Dr. Fumio HANAOKA (Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ.)
Dr. Kaoru SUGASAWA (Biosignal Research Center., Kobe Univ.)

*1Special Postdoctoral Researcher, *2Visiting Researcher, *3Contract Researcher, *4Technical Staff