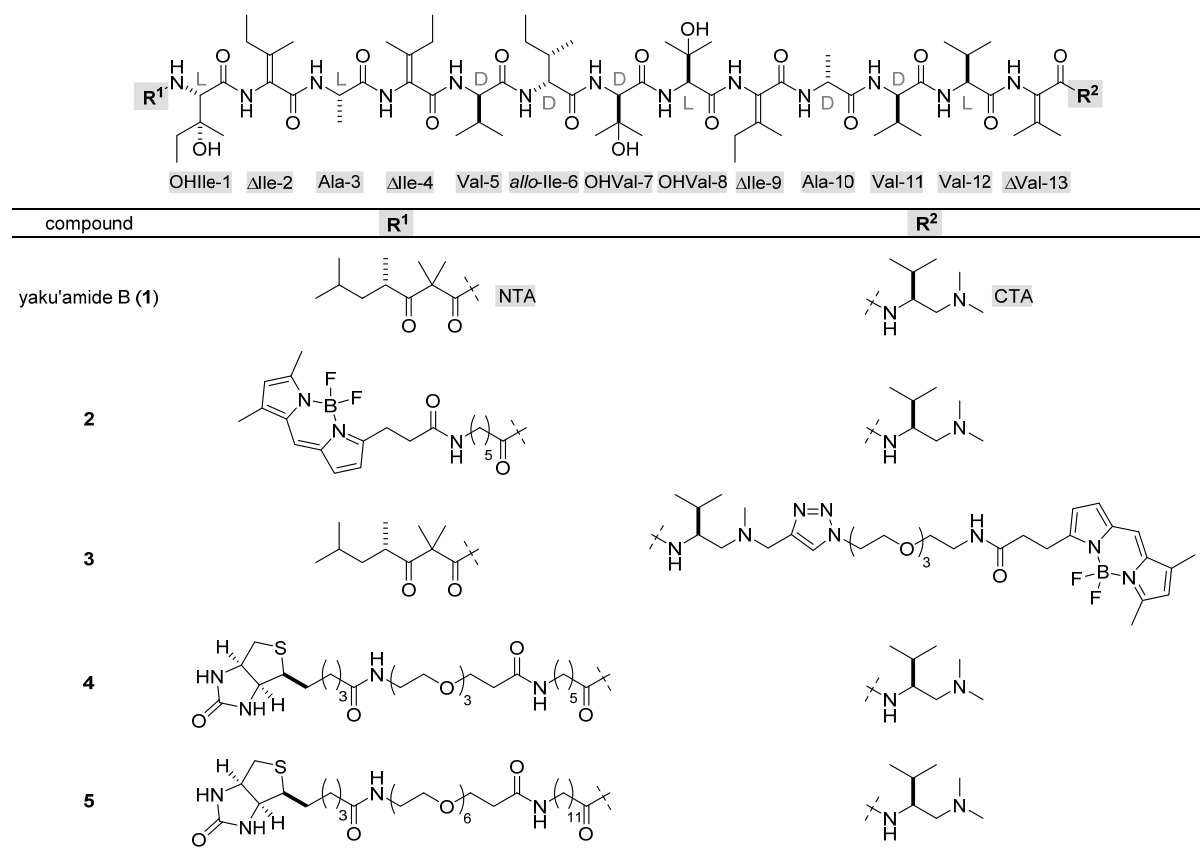


喜多村佳委は、「Elucidation of Mechanism of Action of Yaku'amide B (ヤクアミド B の生物活性発現機構の解明)」のタイトルで、研究を展開した。以下に、その詳細を述べる。

ヤクアミド B (**1**, Figure 1)は、2010年に屋久新曽根産の希少深海海綿 *Ceratopsion* sp.から単離された、複雑な構造を有するペプチド系天然物である。**1**は、4つの不飽和アミノ酸を含む多数の非タンパク質構成アミノ酸および特異な末端構造(N-Terminal Acyl group = NTA, C-Terminal Amine = CTA)を持つ。当研究室では、銅(I)触媒カップリング反応を用いた不飽和アミノ酸ユニットの構築を鍵として、**1**の収束的全合成を世界で初めて達成している。**1**は、JFCR39 ヒトがん細胞パネルに対して、既存の抗がん薬とは異なる、強力な細胞増殖抑制活性を示すことが明らかになっている。このように、**1**はその特異な構造と生物活性特性から、新規抗がん薬のリード化合物として期待できるが、その作用機構は未解明であった。喜多村は、**1**の全合成ルートを基盤として様々なケミカルプローブを調達し、それらを応用することによって**1**の生物活性発現機構を解明することを目的とした。

**1. 1**を基盤としたケミカルプローブ合成と細胞増殖抑制活性評価

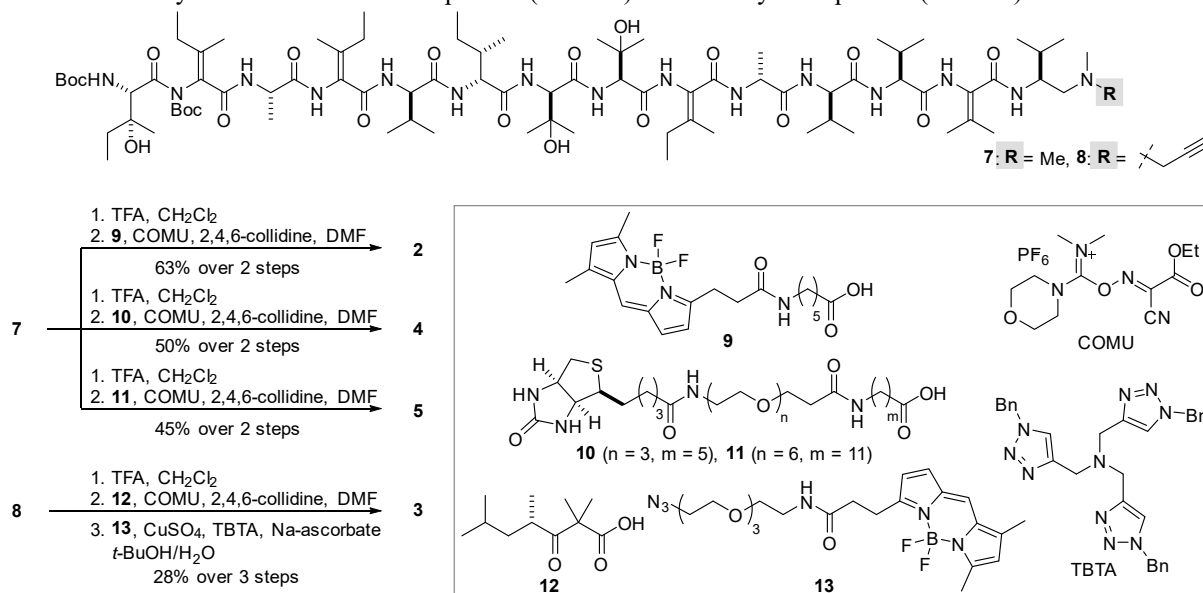


**Figure 1.** Chemical structures of yaku'amide B (**1**), fluorescent probes (**2** and **3**), and biotinylated probes (**4** and **5**).

はじめに喜多村は、**1**の作用機構解明に向けて、**1**のエナンチオマー(*ent-1*)を用いることを計画した。エナンチオマー間の活性を比較することで、作用機構へのキラル分子の介在の有無を評価できる。続いて、蛍光プローブを用いた細胞内挙動の解析を計画した。そのために、**1**のN末端またはC末端に蛍光団 BODIPY を導入したプローブ **2, 3** を設計した。また、**1**の生物活性発現機構に対す

るキラル分子の関与を明確にするため、**2** のエナンチオマー(*ent-2*)を設計した。さらに、その後の標的タンパク質同定に向けて、リンカー長の異なるビオチン化プローブ **4, 5** を設計した。ビオチン化プローブは、アビジンとの強力な相互作用を利用して容易にアビジンレジンに担持することができるため、アフィニティレジンによる標的タンパク質の精製に有用であると考えた。

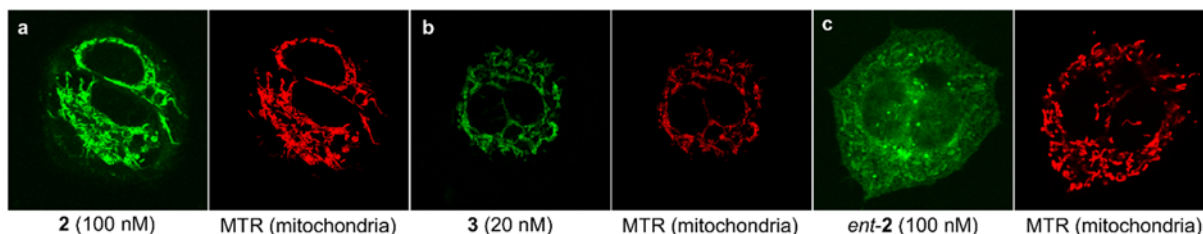
**Scheme 1.** Synthesis of fluorescent probes (**2** and **3**) and biotinylated probes (**4** and **5**).



**1** のエナンチオマー(*ent-1*)は、確立された方法により全合成した。N 末端修飾プローブ(**2**, *ent-2*, **4**, **5**)は、**1** の合成中間体 **7** (または *ent-7*)を TFA で処理して Boc 基を脱保護した後に、縮合剤 COMU を用いてアシル基(**9**, **10**, **11**)を導入することで合成した(Scheme 1)。一方、C 末端修飾プローブ(**3**)の合成に向け、全合成法を応用して、**7** の C 末端プロパルギル誘導体 **8** を合成した。**8** に対し、先と同様の方法で NTA (**12**)を縮合した後に、銅触媒アジド-アルキン付加環化反応で C 末端に BODIPY を導入し、**3** の合成を達成した。

合成した全ての化合物のヒト乳がん細胞株 MCF-7 に対する増殖抑制活性を評価した(Table 1)。**1** (GI<sub>50</sub> = 10.7 nM)と *ent-1* (GI<sub>50</sub> = 29.2 nM)の間には 3 倍の活性差が見出され、この差は蛍光プローブ **2** (GI<sub>50</sub> = 202 nM), *ent-2* (GI<sub>50</sub> = 1260 nM)にも反映された。また N 末端を修飾した **2** は、**1** に比して活性が 1/20 倍に低減したが、C 末端修飾プローブ **3** は活性を完全に維持した(GI<sub>50</sub> = 12.6 nM)。ビオチン化プローブに関しては、短鎖リンカーを有する **4** が全く活性を示さない(GI<sub>50</sub> = >9000 nM)一方、長鎖リンカーを有する **5** は活性を示し(GI<sub>50</sub> = 149 nM)、リンカー長の違いによる顕著な活性差が見出された。

## 2. 蛍光プローブによる細胞内作用部位解析



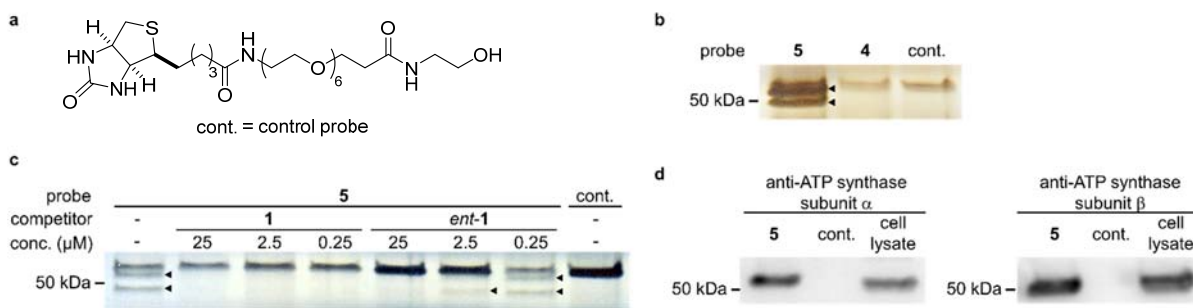
**Figure 2.** Confocal microscopic images of fluorescent probes in MCF-7 cells, compared with mitochondrial indicator, MitoTracker Red CMXRos (MTR). (a) Images for probe **2**. (b) Images for probe **3**. (c) Images for probe *ent-2*.

続いて喜多村は、合成した蛍光プローブ(**2**, *ent-2*, **3**)の MCF-7 細胞内における局在を、共焦点走査型蛍光顕微鏡によって観察した。**2** の緑色蛍光は、ミトコンドリア染色試薬 MitoTracker Red CMXRos の赤色蛍光と良い一致を示した(Figure 2a)。また活性を完全に維持した蛍光プローブ **3** は、GI<sub>50</sub> 付近の濃度(20 nM)でミトコンドリアに局在することが明らかとなった(Figure 2b)。これらの結果は、ミトコンドリアへの局在が **1** の生物活性発現に重要であることを示唆した。一方で、*ent-2* は細胞

内全体に分布し、ミトコンドリア染色試薬の局在とは一致しなかった(Figure 3c)。すなわち、**2**と *ent-2*の間には、細胞増殖抑制活性の差に加えて、細胞内局在にも違いがあることが示された。以上の生細胞イメージングの結果から、**1**がミトコンドリアに存在するキラル分子を認識し、細胞増殖抑制活性を発現していることが強く示唆された。

### 3. ビオチン化プローブによるアフィニティプルダウンアッセイと標的タンパク質同定

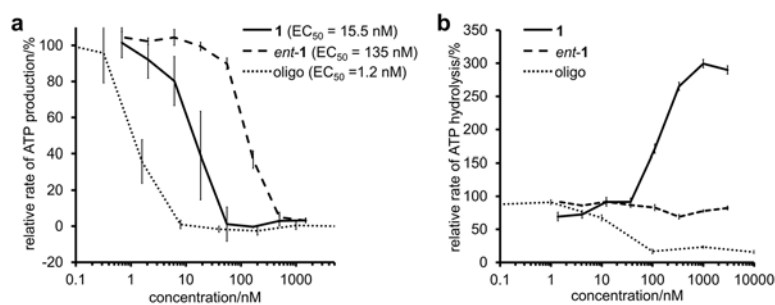
さらに喜多村は、ビオチン化プローブ(**4**, **5**)およびコントロールプローブ(cont., Figure 3a)を用いてアフィニティレジンを作成し、アフィニティプルダウンアッセイを実施した。結果として、活性を示したプローブ **5** 選択的に、50 kDa 付近に2つのバンドが見出された(Figure 3b)。続いて、**5**によるプルダウンに際し、**1**および *ent-1*を用いて競合を行った。すると、**5**とタンパク質の結合は**1**の存在によって完全に阻害されるが、*ent-1*によっては弱くしか阻害されないことが明らかとなった(Figure 3c)。これらの結果は、2つのバンドが**1**の結合タンパク質であることを示し、*ent-1*との親和性は比較的小さいということを示唆した。さらに、検出された2つのバンドを切り出し、*in-gel*トリプシン消化後にLC-MS/MSにより解析することでタンパク質の同定を行い、見出された2つのバンドが、それぞれミトコンドリア F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素のサブユニットαおよびβであることを明らかにした。この結果は、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素サブユニットαおよびβの特異的抗体を用いたウェスタンブロットによっても確認した(Figure 3d)。



**Figure 3.** (a) Structure of control probe (cont.). (b) Affinity pull-down assay with probe **4** and **5**. (c) Competitive study with **1** and *ent-1*. (d) Western blot analysis of pull-downed proteins using anti-ATP synthase subunits α and β antibodies. Bands indicated by arrows are mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase subunits α (upper) and β (lower).

### 4. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素に対する機能評価

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素はミトコンドリア内膜に存在し、膜内外のプロトン濃度勾配を駆動力として ATP を産生する。一方、精製された状態では ATP 加水分解酵素として機能することが知られている。そこで、**1**および *ent-1* のミトコンドリア ATP 産生に対する作用および精製した F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素による ATP 加水分解に対する作用の双方を評価した。既知の阻害剤である oligomycin A (oligo)と比較した結果、**1**と *ent-1*はそれぞれの GI<sub>50</sub> (Table 1)付近の濃度(EC<sub>50</sub> = 15.5 nM for **1**, 135 nM for *ent-1*)で ATP 合成を阻害することがわかった (Figure 4a)。以上より、ミ



**Figure 4.** Enzymatic coupling assay for evaluation of (a) mitochondrial ATP production rate and (b) ATP hydrolysis rate. A F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/synthase inhibitor oligomycin A (oligo) was used as a control compound in the both experiments. The ATP production rate was normalized against the rates obtained by adding vehicle (DMSO) as 100% and 5 μM oligomycin A as 0%. The ATP hydrolysis rate was normalized against the rate obtained by adding vehicle (DMSO) as 100%.

トコンドリア ATP 産生阻害が **1** の細胞増殖抑制機構であることが強く示唆された。一方、oligo が ATP 加水分解も阻害するのに対し、興味深いことに **1** は ATP 加水分解を 3 倍程度活性化し、*ent-1* は効果を示さなかった(Figure 4b)。これらの結果は、**1** が oligo と異なる作用機序を有し、**1** と *ent-1* が異なる様式で F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素に結合することを示唆した。

以上のように喜多村佳委は、確立された全合成ルートを基盤とした各種プローブの合成と応用により、抗がん活性天然物 **1** の生物活性発現機構の解明を行った。合成した蛍光プローブを用いた生細胞イメージングの結果は、**1** のミトコンドリアへの作用と、キラル標的分子の存在を示唆した。続いて、ビオチン化プローブを活用したアフィニティプルダウンアッセイを実施し、**1** の結合タンパク質として F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素サブユニット $\alpha$ および $\beta$ を見出した。さらに、F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の機能として知られる、ミトコンドリア ATP 合成および ATP 加水分解に対する **1** の作用を、酵素カップリングアッセイによって評価した。その結果、**1** が GI<sub>50</sub> 付近の濃度でミトコンドリア ATP 合成を阻害することが明らかとなり、これが **1** の生物活性発現機構であることが強く示唆された。また、**1** が精製された同酵素による ATP 加水分解を亢進することを明らかにした。この亢進作用を示す有機化合物は今までに報告されておらず、本研究は F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素に対する **1** の特異な作用を初めて発見した。これらの成果は、薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬科学)の学位を授与するに値するものと認めた。