

神奈川工科大学

生物有機科学研究所

研究報告

第 2 号

2021 年度

目次

- ・新規含窒素ヘテロ環合成法の開発と応用

応用化学科 山口淳一

応用バイオ科学科 野田毅

応用化学科 森川浩

- ・陸上植物の進化を理解するための接合藻類の研究基盤の確立

応用バイオ科学科 村田隆

- ・二酸化炭素を原料とする付加価値の高い物質の合成

応用化学科 森川浩

長崎大学工学研究科 本九町卓

- ・多彩な生物活性を有するマトリンアルカロイドの全合成およびその類縁体の合成

応用バイオ科学科 野田毅

- ・Survivin－HBXIP 複合体形成阻害物質の同定とがん細胞に対する
アポトーシス誘導機構の解明

応用バイオ科学科 飯田泰広

新規含窒素ヘテロ環合成法の開発と応用

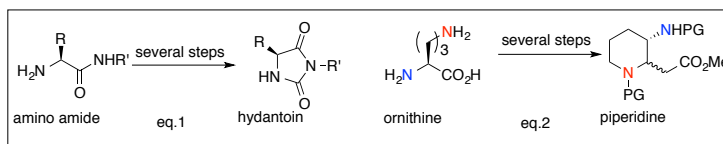
応用化学科・山口 淳一

応用バイオ科学科・野田 毅

応用化学科・森川 浩

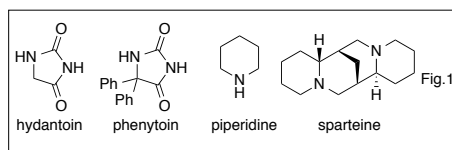
1. 研究の目的 (以下タイトルは、11 ポイント、MS ゴシック)

申請者らは個別に、新しい含窒素ヘテロ環合成の新しい手法を開発している。すなわち、含窒素五員環である光学活性多置換ヒダントインを光学活性アミノ酸アミドから合成する手法を開発している (山口) (eq.1)。一方窒素六員環化合物である光学活性ピペリジン化合物をアミノ酸の一種であるオルニチンから合成する新手法を開発している (野田・森川) (eq.2)。原料となるそれぞれ合成した新規化合物を足がかりとし、新しい光学活性含窒素ヘテロ環のさらなる合成を行っており、これを足がかりに生物活性を示す新規化合物の合成を指向していく。



2. 研究の必要性及び従来の研究

窒素原子を環内に含む化合物は生物活性を示すものがあり、創薬の世界において多くの化合物が医薬品候補化合物として合成されている。その中でも五員環 (ピロリジンあるいはイミダゾリン)、六員環 (ピペリジン) 各誘導体は生物活性を示すものが多く、その構造をベースに生物活性化合物をデザインされることが多い。例えば、イミダゾリン骨格を基本としたヒダントイン(hydantoin)は中枢神経系に作用することが知られており、誘導体であるフェニトイン(phenytoin)は抗てんかん薬の第一選択薬である(Fig.1)。その他、エトトインなど多くの誘導体が知られ抗てんかん薬として知られる。一方、ピペリジン(piperidine)環が形式的に 2 つ縮環しているスパルテイン(sparteine)は天然から単離され、ナトリウムチャネル阻害作用を示す化合物として知られている。このように含窒素ヘテロ環類は医薬品の基本骨格をなすものが多く、現在も新しい化合物の合成が世界中で行われている。新しい化合物を合成するためには、新しい合成手法の開発が不可欠である。

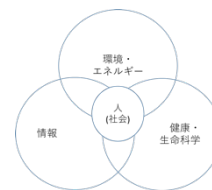


3. 期待される効果

本研究計画では、市販かつ安価な試薬を使用する反応システムの構築を目指し、そこに研究の余地が残されているといえる。さらに本研究は生物活性化合物の新規合成を目

指しており、それらの化合物は、医薬品の候補あるいはリード化合物となる可能性を持っている。

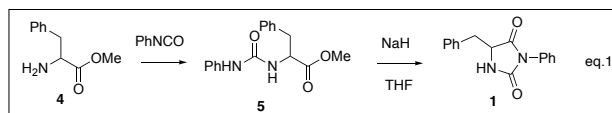
それらの化合物は、医薬品の候補あるいはリード化合物となる可能性を持っている。このことから本研究は、本学が掲げる社会的課題・ニーズにおいては健康・生命科学の分野に該当する。さらに SDG s では 3.3、3.b に相当する研究であるといえる。



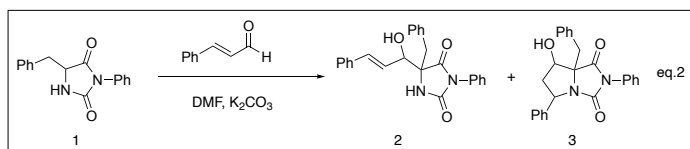
4. 研究の経過及び結果・評価

今年度は、ヒダントインの新規合成法の開発について重点的に検討を行った。

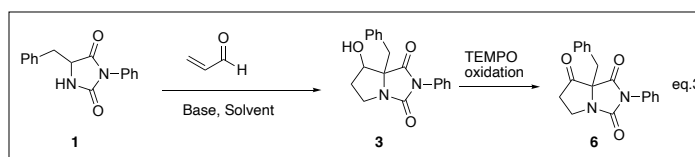
i)原料 **1** の合成：反応の検討には、種々の由からフェニルアラニン由来のヒダントイン誘導体を用いることとした。すなわち、フェニルアラニンのメチルエステルにフェニルイソシアナートを作用後、水素化ナトリウムで環化することにより **3** 位にフェニル基を有するヒダントイン誘導体を合成した(eq.1)。



ii)アクリルアルデヒドとの反応：まず α , β -不飽和アルデヒドとしてアクリルアルデヒドを用い、反応溶媒と塩基について検討した。これまでは DMF および炭酸カリウムの組み合わせが良いとされていたが、溶媒としてアセトニトリル、塩基としてグアニジン系のアミンである MTBD(7-methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene)を用いても反応は十分進行することが分かった。またアクリルアルデヒドの場合、シナムアルデヒドと異なり **2** タイプの化合物は確認できず、選択性はアルデヒドの β 位の構造に依存することも分かった(eq.2)。



iii)アルコールの酸化反応：**3** の構造は ^1H NMR よりジアステレオマーの混合物である事が示唆された。解析を容易にするため、アルコール部分の酸化を行い **6** への誘導を試みた。いくつかの酸化を試みたところ TEMPO を用いる酸化が良いことが分かった(eq.3)。



最終的に、研究成果のまとめを「日本薬学会第 142 年会」に発表することができ、研究を進めることができた。

5. 研究成果の発表

ヒダントイン誘導体の簡便な誘導化法の検討、山口 淳一、○片倉 友弥、岸 栄至、日本薬学会第 142 年会、28P06-pm1-04 (2022.3.名古屋)。

陸上植物の進化を理解するための接合藻類の研究基盤の確立

研究者名：応用バイオ科学科 村田隆

1. 研究の目的

生物は進化の歴史の中で徐々に性質を変えてきた。共通の祖先をもつ生物同士を比較することにより、着目する生物がどのようにして現在の性質を獲得したかを推定することができる。進化研究自体は直接実用研究に結びつくものではないが、過去の生物の姿を再現したり、生物の可塑性とその限界について情報を得ることができる。

本研究の目的は細胞分裂の進化について理解することである。動物細胞は細胞膜が陥入してくびれることにより分裂するが、植物細胞は細胞板を作り細胞を仕切ることにより分裂する。この分裂方式は植物が陸上で複雑な形を作るために不可欠なものである。申請者は、陸上植物に近縁の藻類の細胞分裂の仕組みを陸上植物のものと比較することにより、細胞板が獲得された初期の細胞分裂の姿が推定できると着想した。ミカヅキモ、アオミドロなどの接合藻類は陸上植物に最も近縁な藻類であり、多様な細胞分裂の方式を持つため、比較の材料に適している（図1）。目的を達成するための第一歩として、接合藻類で細胞分裂を研究するための基礎的な実験をおこなう。

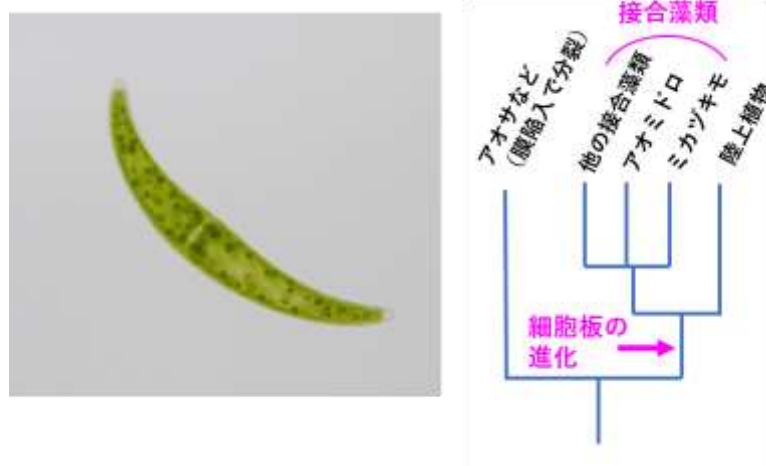


図1：（左）国立環境研究所から分譲を受け、培養しているオオミカヅキモ。（右）接合藻類と陸上植物の関係を示す系統樹（図を見やすくするため主な系統以外は省いた）。細胞板形成は陸上植物、接合藻類、シャジクモ藻類（図では示していない）の共通祖先（矢印）で獲得されたと考えられている。

2. 研究の必要性及び従来の研究

細胞板の進化研究は、陸上に存在する植物の起源を知ることにもつながるため、1990年

代に Graham らによって行われたが、今世紀になってから現代的な生物学の手法として GFP を用いたライブイメージング等が導入された後はほとんど行われていない。大きな理由として考えられるのは、接合藻類において遺伝子導入法が確立されていないことである。接合藻類の基本的な培養法と遺伝子導入法を確立することは細胞板の進化研究にとって必須のことである。

3. 期待される効果

細胞板形成は細胞骨格の重合、膜輸送、多糖の合成が協調しながら進行する複雑なシステムで理解が難しい。細胞板が獲得された初期の細胞分裂の姿から細胞板形成のもっとも単純なシステムが推定でき、現存する生物の細胞板形成の仕組みから基盤的仕組みを抜き出すことが可能になると期待される。

ミカヅキモ、アオミドロは水田などに生息するため、人間活動による環境の変動の影響を受けやすい。これらの藻類の研究基盤を整備することは身近な水環境の変動が生物にどのような影響を及ぼすのか研究するための基盤にもなる。

4. 研究の経過及び結果・評価

1) ミカヅキモへの遺伝子導入

ヒメミカヅキモの遺伝子導入法は共同研究者である日本女子大学の関本教授によって確立された。この方法では、培養した藻と導入する DNA を混合して電気穿孔法を行うことにより、遺伝子が導入できる。そこで、アクチンマーカ遺伝子 (mCitrine-Lifeact) を関本研究室でヒメミカヅキモに導入した。作成した遺伝子導入ヒメミカヅキモを神奈川工科大で培養し、アクチンが標識されるかを本学の設備である共焦点顕微鏡 (オリンパス FV3000) で観察したところ、微弱な蛍光だったが細胞分裂時の陥入部位が標識された。また、細胞質中を走る繊維状構造も希に見られた。そのため、生きているミカヅキモのアクチン標識は成功したと考えられる。しかしながら、ヒメミカヅキモは光照射に敏感であり、継続して共焦点顕微鏡の励起光を照射して観察することができなかった。蛍光標識の変更による励起光波長の変更が必要と考えられた。

一方で、共同研究者の日本女子大学の関本教授の顕微鏡画像取得の技術指導を行った。ヒメミカヅキモの染色体イメージングを行い、ヒメミカヅキモの染色体数を決定することに成功した。この成果により関本研究室の大学院生が日本藻類学会で発表賞を獲得した。

2) オオミカヅキモの培養条件の最適化

サイズが大きく観察しやすいオオミカヅキモの遺伝子導入が最終目標であったが、オオミカヅキモはこれまで使用してきたヒメミカヅキモと比べて増殖が非常に遅かった。そこで、まずオオミカヅキモの増殖速度を上げる条件を探索した。最初に光条件を検討したところ、オオミカヅキモは強光に弱く、最適な光条件は $10\sim 20\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\ \text{sec}$ であることがわか

った。

従来の C 培地と CA 培地を比較したところ、CA 培地では成長が阻害されることがわかった。次に C 培地の pH を変更し、増殖との関係を調べたところ、従来の pH 7.5 よりも pH 8 のほうが良く増殖した。しかしながら、形質転換実験を行うまでには至らなかった。

さらに、明暗周期で同調分裂することが知られているナガミカヅキモを国立環境研究所から分譲受け、安定して増殖させることに成功した。

3) これまで使用されていない接合藻類の適性評価

接合藻類にはミカヅキモ以外にもアオミドロ、ツヅミモ、ヒザオリなど様々な生物グループが含まれる。そこで、従来使われていなかった生物の中に有用な実験生物はいないか探索した。基礎生物学研究所の谷口博士からアオミドロの分譲を受け、培養を試みたが、アオミドロは糸状の多細胞体が絡まった構造を持つためか、無菌化することができなかった。次に、国立環境研究所・微生物系統保存施設のストックからアワセオオギ 2 種類の分譲を受け、培養を行った。アワセオオギは植え替え直後に突然死ぬことがあった。現在、培地の種類の検討中である。また、大学下の水田から別種のアワセオオギの単離培養を行った (図 2)。こちらはよく増殖したので、細胞分裂の解析に有効な可能性がある。



図 2 厚木市三田で単離したアワセオオギ

5. 今後の計画

オオミカヅキモ並みに大きく、光で同調分裂することが知られているナガミカヅキモで形質転換の条件決めを継続する。ヒメミカヅキモの細胞分裂におけるアクチンの分布は論文にまとめる。

一方、アワセオオギについては、ミカヅキモやツヅミモとの比較により細胞の形づくりの仕組みがどのように進化してきたか研究する好材料であることに気付いた。アワセオオギとミカヅキモの形態が異なる理由を明らかにしたいと考えている。

本研究の過程で、ヒメミカヅキモの培養には育成用の光の波長が影響することがわかった。そこで、別の研究目標として、植物の成長における光の種類の評価を行う実験系をミカヅキモで確立することを発案した。この研究により、省スペースで植物の培養条件の改良が可能になると考えられる。

6. 研究成果の発表

渡辺実咲, 村田隆, 堤元佐, 大友康平, 根本知己, 西山智明, 土金勇樹, 関本弘之: ヒメミカ

ヅキモにおける蛍光標識 CenH3 タンパク質の発現による染色体可視化. 日本藻類学会第
45 回大会（学生発表賞）2021 年 3 月 17 日 ※共同研究者の関本研の大学院生の受賞

二酸化炭素を原料とする付加価値の高い物質の合成

応用化学科 森川 浩

長崎大学工学研究科 本九町 卓

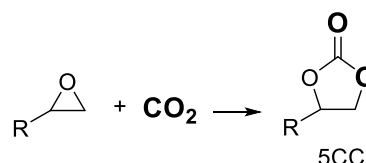
1. 研究の目的

2016 年発効のパリ協定、近年の政府「2050 年カーボンニュートラル宣言」に代表されるように、温室効果ガスとして知られる CO_2 の排出削減の取り組みは世界的規模で行われており、 CO_2 対策は社会的にも重要な解決命題である。一方で、 CO_2 は安価で無尽蔵な炭素資源となる側面がある。したがって、 CO_2 の化学的変換は、環境化学的にも有機化学的にも重要な取り組み課題である。

CO_2 の化学変換は、現在でも精力的に行われており、古くて新しいテーマである。 CO_2 を化学変換させた物質として、エネルギーや燃料として大量消費可能なメタンやメタノールが挙げられる。より一層、付加価値の高い物質への変換が求められている。

2. 研究の必要性及び従来の研究

興味ある化合物として、五員環状カーボネート 5CC がある。5CC は、エポキシドと CO_2 が環化付加することで生成する（図 1）。高選択的な反応、高い原子利用効率（脱離成分がない）の点から、多くの研究者がその合成論や触媒について精力的に取り組んでいる。工場からの排ガスを直接 5CC 化に用いる実用的試みも報告されている。



この 5CC は、ポリウレタンの原料として利用されるが、これ以外の新たな利用が見いだせていない。 CO_2 の有効利用の点から、 CO_2 を化学変換した物質の付加価値を更に上げていくことが求められている。

図 1. CO_2 を利用した 5CC の合成

5CC と芳香族アミンから、オキサゾリドン化合物を合成する研究が報告されている（図 2, 反応 A）。また、エポキシドと CO_2 と芳香族アミンの 3 成分を一度に反応させ、エポキシ

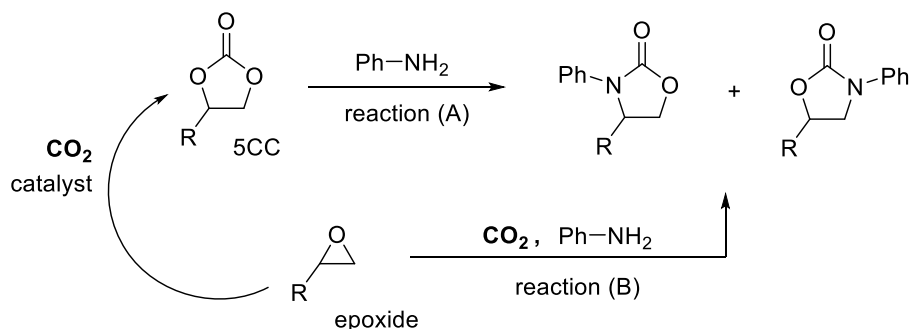


図 2. エポキシドまたは 5CC からのオキサゾリドン合成

ドから直接にオキサゾリドン体を得る研究例も報告されている(図2, 反応B)。オキサゾリドン骨格を有する化合物は、リネゾリド等の抗生物質や不斉助触媒として用いられているため、機能性の高い物質である。これらオキサゾリドンは、置換基 R (図2) の種類やキラリティーに応じて効果を発揮する。

3. 期待される効果

天然資源、特にリモネン誘導体と CO₂ を組み合わせることで、種々の生物活性が期待されるオキサゾリドンを創出することを計画した。これらを通して、CO₂ 反応生成物の付加価値を上げていくことが期待される。母核となるリモネン自身に不斉炭素が 2 つ有るため、本研究で得られる生成物(オキサゾリドン)も特異構造やキラリティーの定まった化学構造を付与できる。

このため、CO₂ を原料とし、生物活性を有する様々なリード化合物を生み出せる。また、リモネンの結果を基にし、他の様々な生物活性テルペン類にも、本系を拡張できる。

4. 研究の経過及び結果・評価

リモネンはシクロヘキサン環を有する。まず、CO₂ との反応の前に、シクロヘキサン構造を有するオキサゾリドン骨格を有する化合物の合成を試みた。この場合、CO₂ の代わりに、CO₂ から誘導合成できる物質(広義に CO₂ 等価物とも考えることができる)を原料とした。

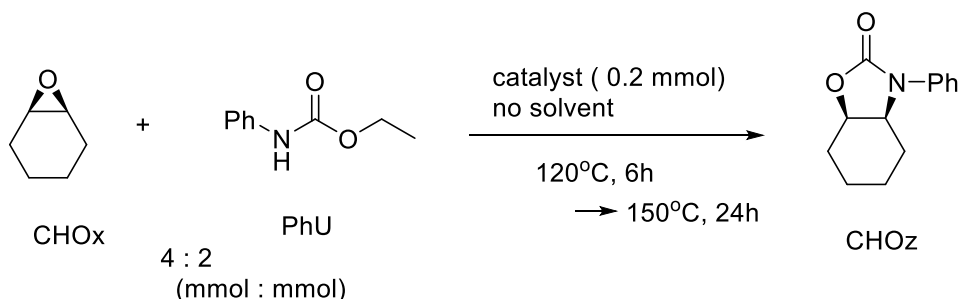


図3. シクロヘキサン由来オキサゾリドン CHOz の合成

シクロヘキセンオキシド CHOx とフェニルウレタン PhU からシクロヘキサン由来オキサゾリドン CHOz の合成を試みた(図3)。この場合、PhU が CO₂ 誘導体である。反応条件として、図3記載の条件を用いた。触媒として3種のアニモニウム塩を用いた。具体的には、テトラブチルアンモニウムブロミド TMAB、テトラブチルアンモニウムクロリド TBAC、1-ブチル-4-メチルイミダゾリウムクロリド IMCl である。

触媒を変えた時、各反応での CHOz 生成率を次表に示す。いずれの場合でも、120°C では反応はほとんど進行しなかった。150°C ではオキサゾリドン CHOz が生成し、触媒が TBAC のときの生成率が一番高かった。また、原料の CHOx の沸点が 130°C であるため、150°C の反応

温度では CHOx がかなり蒸発した。

表. 触媒による反応率の違い

触媒	120°C, 6h	120°C, 6h → 150°C, 24h
	生成率 (%)	生成率 (%)
TBAB	0	3
TBAC	4	23
IMCl	0	22

上記では 2 割程度の生成率にとどまったため、フェニルウレタン PhU の代わりに、フェニルイソシアネート PhNCO を用いた（この場合、CO₂ 等価物とは異なるが、反応率向上の点から試薬変更した）。具体的に、図 3 と同様な反応温度と時間で、シクロヘキセンオキシド CHOx と PhNCO から CHOz の合成を試みた。その結果、生成率は 42% に上昇することが分かった。

この結果を踏まえ、リモネンオキシド LmO と PhU からリモネン由来オキサゾリドン LmOz の合成を試みた（図 4）。触媒として TBAC を用いた。しかし、図 3 と同様な反応条件を用いたが、反応は全く進行しなかった。

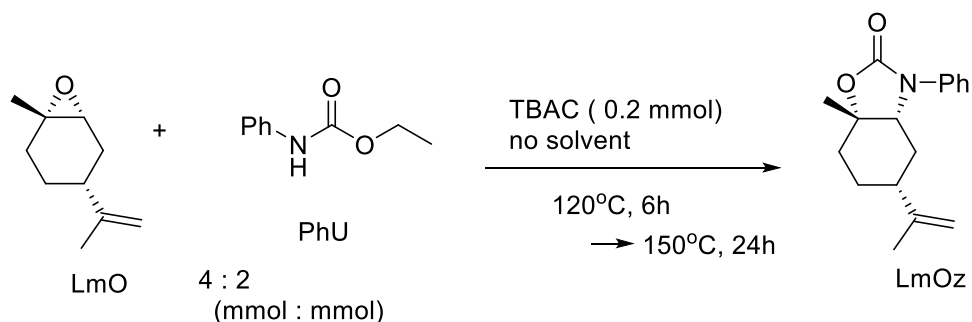


図 4. リモネンオキシド LmO を用いた反応の試み

さらに、PhU を、PhNCO に変えて同様なオキサゾリドン化反応を行ったが、反応は全く進行しなかった。この結果は、図 3 のシクロヘキセンオキシド CHOx とは対照的である。LmO は高沸点のため、150°C ではほぼ蒸発していない。したがって、シクロヘキセンオキシド CHOx より置換基が増えたリモネン誘導体 LmO では、立体障害のため反応が進行しないと考えられる。

そこで、一旦 LmO をアニリンと反応させ、開環させることにし、2 段階の反応で LmOz の合成を目指した（図 5）。

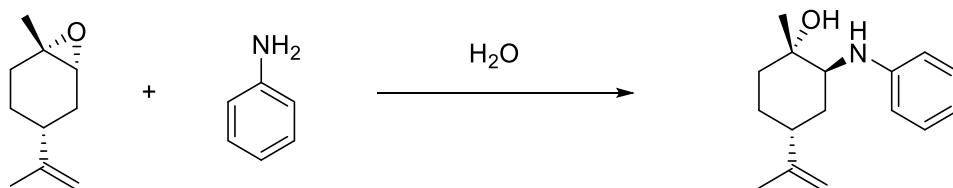


図 5. リモネンオキシド LmO とアニリンの反応

リモネン骨格のアミノアルコールの合成時（図 5）、LmO とアニリンと水の比率をいろいろ変えて行ったところ、1 : 5 : 5（モル比）のときの反応率が一番高かった（反応率 85%、単離収率 62%）。 ^1H NMR 及び ^{13}C NMR によって生成物を同定した。

5. 今後の計画

直前の図 5 で得られたリモネン由来のアミノアルコール体を原料として、 CO_2 または炭酸ジメチル (CO_2 誘導化物) と反応させ、リモネン由来オキサゾリドン LmOz の合成を試みる予定である（図 6）

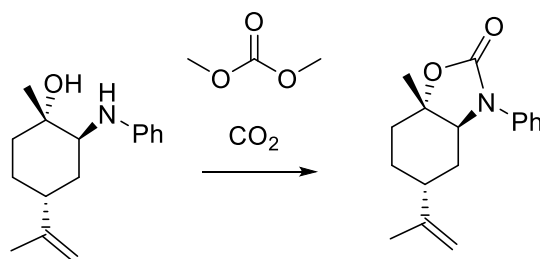


図 6. リモネン由来アミノアルコールからオキサゾリドン LmOz の合成ルート計画

6. 研究成果の発表

今後の計画で示した実験の進捗状況を踏まえ、まずは学会発表を検討している。

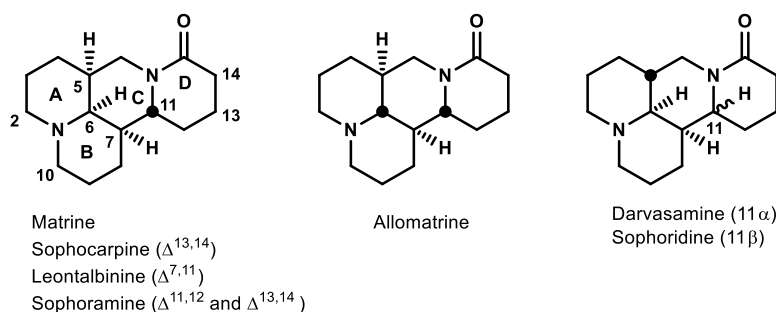
「多彩な生物活性を有するマトリンアルカロイドの全合成およびその類縁体の合成」

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・応用バイオ科学科 野田 毅

1. 研究の目的

生命現象の解明と創薬など、人類に貢献できる生物活性を有する新規な化合物の創出を狙っている。ターゲットとなる化合物は、生物活性天然物の骨格を有するもしくはその構造上の類似性有する化合物である。天然物の中でも、アルカロイドに代表される生物活性天然物は、医薬品などへの応用が期待される化合物群であり、合成研究が世界的に盛んである。これらの化合物を医薬品へと応用するためには、毒性・体内動態・活性を改良のための化合物の最適化が不可欠となるが、最終化合物の実用的な合成法の確立や最適化のための誘導体の合成が困難な場合が多い。本研究では、2-置換-3-アミノピペリジンの合成法を基盤として、誘導体の合成を念頭に入れた多彩な生物活性を有し注目されているマトリン類の全合成およびその類縁体の合成を目的とする。

マトリン類はその生物活性にもかかわらず合成例は少なく、その誘導体の供給は天然物からの誘導



体にはほぼ限定されている。マトリンアルカロイドの一例を示す (Figure 1)。4つの環構造 (A, B, C, D 環)、4つの不斉中心を持ち、3次元構造上、多様性を有している。

Figure 1

2. 研究方法と結果

1. 合成計画

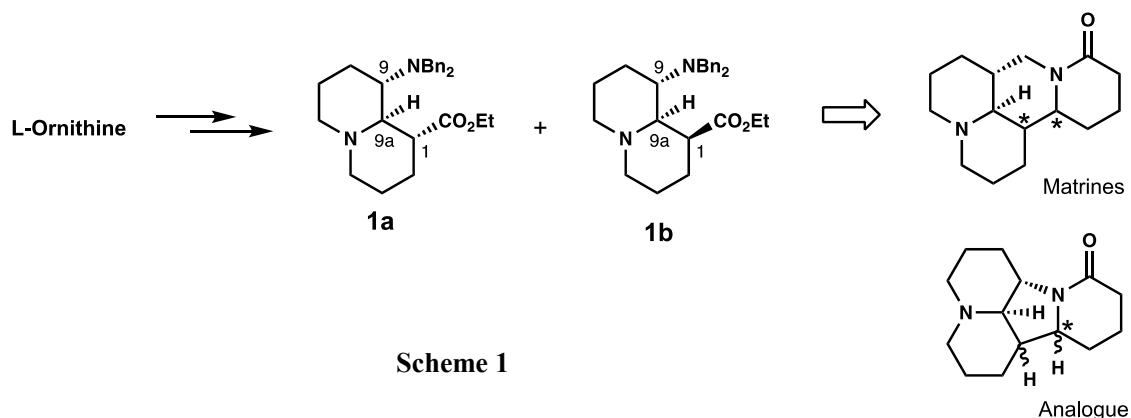
当研究室で開発した方法に基づき L-オルニチンより数工程を経て合成した化合物 **1a, 1b** を出発原料として、2回の環化反応を経て目的物 **matrines** およびそのアナログの合成を検討した。すでに **1a, 1b** では目的の化合物が持つ不斉中心4つのうち3つ有しているため、残る1つの不斉中心の立体制御と環構築が課題となる。**matrines** では **1a, 1b** の9位における炭素鎖を伸長する必要がある (Scheme 1)。

2. アナログの合成研究

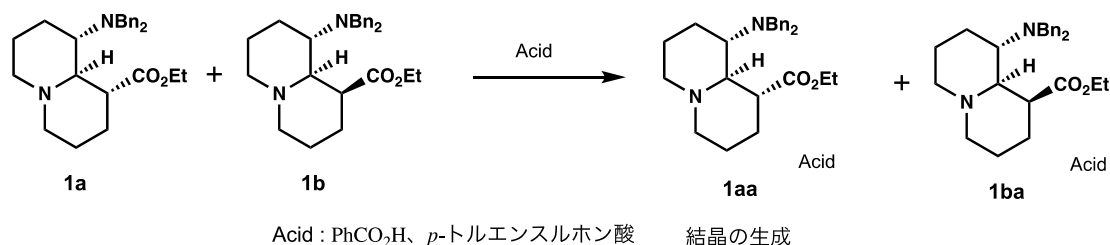
1) キノリチジン **1a, 1b** の分離精製法の検討

キノリチジン **1a, 1b** の合成では、条件によってその生成比が変化するものの混合物として得られており、その分離方法の検討が必要であった。現状では、展開溶媒として CHCl_3 , MeOH , NH_3 を用いたシリカゲルカラムクロマト (シリカゲル 60) により分離している。ハロゲン系

の溶媒の使用の回避、精製法の簡略化が課題。

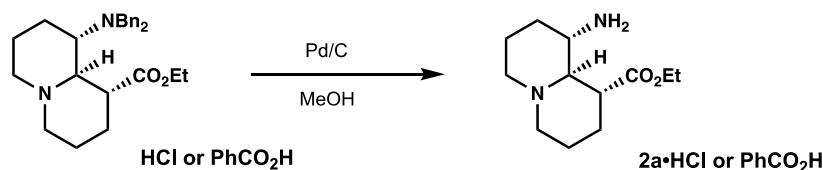


この化合物は二つのアミノ基を有し、塩基性が強い傾向が見られ、精製作業に困難が伴っていた。カラムクロマトグラフィーによる分離方法として、通常のシリカゲルタイプ 60 ではなく、表面が修飾されたシリカゲルによる分離を試みた。比較的安価で得られる富士シリシア製のアミノシリカゲルでの分離を試みたところ、ヘキサン-酢酸エチルの展開溶媒で分離できることがわかった。さらに、2 種の異性体を結晶化による分離方法を検討した。両異性体とも油状物質なため、各種酸との塩による結晶の生成を行ったところ、エーテル中で *p*-TsOH, PhCO₂H で **1a** のみが粉末として得られた。**1a**、**1b** の 3 : 1 の混合物からは 80% で **1a** の PhCO₂H 塩が得られることがわかった。カラムクロマトグラフィーによる分離法以外で、**1b** のみを分離できる条件は、見出せていない (Scheme 2)。



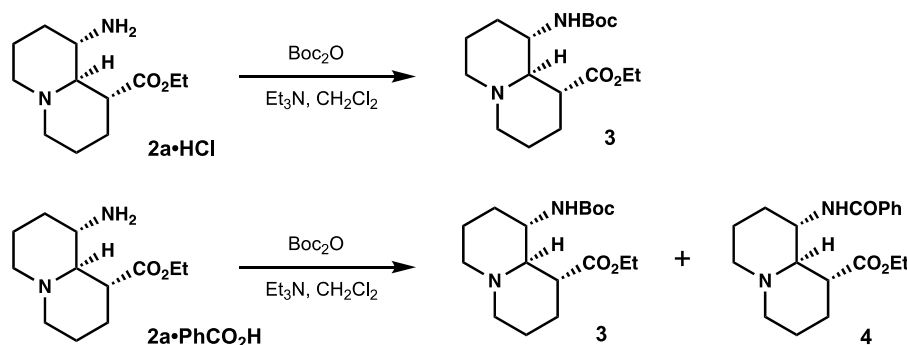
2) キノリチジン **1a**, **1b** の脱ベンジル化の検討

キノリチジン **1a** の 9 位のアミノ基のベンジル保護基の除去は、アルコール溶媒中、Pd/C で行なっていたが、何度も触媒を取り替える必要が生じていた。そこで、HCl を加えて反応を行なったところ、反応がスムーズに進行した。**1a** の安息香酸塩での水素添加による脱ベンジル化も加圧条件下、問題なく反応が進行することが確認できた (Scheme 3)。



2) 9位のアミノ基の Boc 基への保護の検討

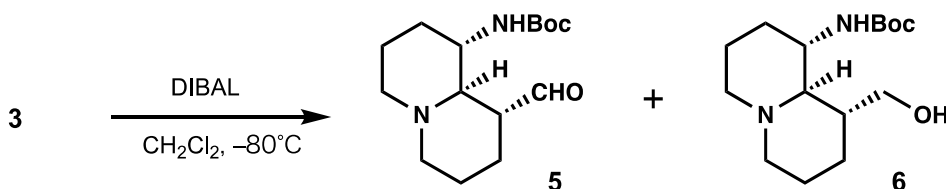
脱ベンジル化されたキノリチジン **2a** の塩酸塩、安息香酸塩について Boc 基の保護を行なったところ塩酸塩については、目的とする **3** のみが得られたが、安息香酸塩では **3** のほかに、ベンゾイル化された化合物 **4** が生じた。安息香酸が Boc 無水物と反応したのち、**2a** と反応した結果と考えられた。**2a** の安息香酸塩を経由する場合には、安息香酸を除去する必要があることがわかった(Scheme 4)。



Scheme 4

3) エステルのアルデヒドへの還元

キノリチジン **2a** のエステルの還元は、低温下 (-80℃) で DIBAL を用いて行うことで、得られた。DIBAL は、NH の H と反応するため、2 当量以上の試薬が必要であった。また、水素ガスの発生が起きることを考慮する必要がある。アルデヒド **5** が、さらに還元されたアルコール **6** もわずかではあるが得られている (Scheme 5)。

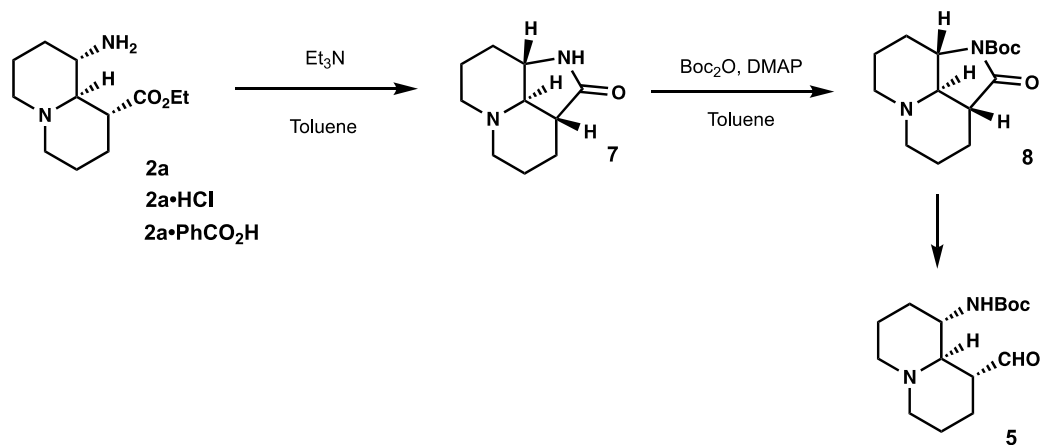


Scheme 5

4) アルデヒド **5** の別法の合成法の検討

アルデヒド **5** の別法の合成法として、3 環性アミド **7** を経由する方法を検討した。脱ベンジル化した **2a**、**2a·HCl**、**2a·PhCO₂H**、3 つについて環化を検討した。トリエチルアミン存在下、トルエン中で加熱したところ、**2a·HCl** のみが、ほとんど反応が進行しなかった。**2a**、**2a·PhCO₂H** については、環化体 **7** が得られた。反応時間が 2 日以上必要なため、反応時間短縮のための検討が必要である。環化体 **7** の Boc 化は高収率で **8** が得られた。**8** の DIBAL 還元により容易に **5** に還元することができた。副生成物としてアルコール **6** は見られなかった (Scheme 6)。

2つの合成法を比べると、第一の方法では DIBAL 還元の際に、アルコールへと還元されたものが生じたため、分離操作が必要となるが、第二の方法では、この点が改良されているため、精製作業が簡便になる。環化体 **7** の反応が改良されれば、この方法で反応を進めることが良い。



Scheme 6

5. 今後の計画

Matrine 類、およびその類縁体に向けた合成について、検討を進め、収率の向上、生成物の立体構造などを明らかにする。

Survivin-HBXIP 複合体形成阻害物質の同定とがん細胞に対する アポトーシス誘導機構の解明

研究者名：所属学科 応用バイオ科学科 氏名 飯田泰広

1. 研究の目的

がん細胞に高発現する Survivin はアポトーシス阻害因子 IAP (Inhibitor of Apoptosis) の 1 つであり、他の補助因子と結合することによりアポトーシス抑制機能を発揮している。したがって、これらの結合を阻害すればがん細胞にアポトーシスを誘導できると考えられる。

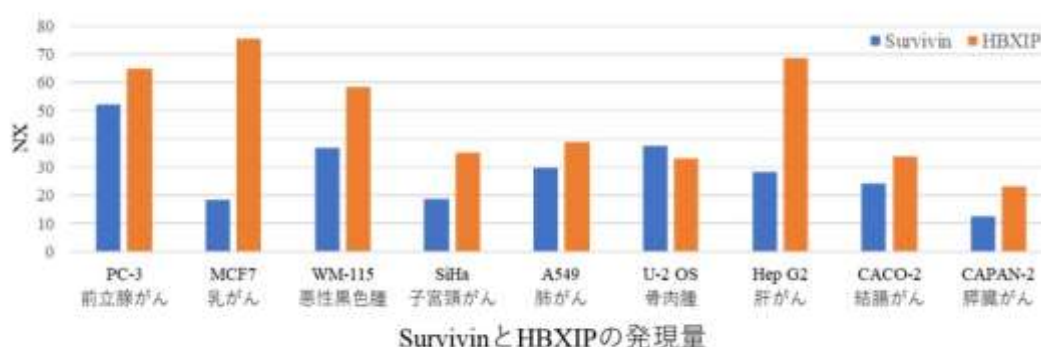
申請者は補助因子として HBXIP (Hepatitis B virus X-interacting protein) に着目し、生薬エキスのスクリーニングによる Survivin と HBXIP の複合体形成阻害物質の探索に取り組んだ結果、8 種の候補が得られ、それらがアポトーシスを誘導する物質を含んでいる可能性を見出している。本研究では、この生理活性を有する物質を単離し構造解析を行うとともに、アポトーシス誘導機構の解明を目指す。構造決定された生理活性物質は新規抗がん剤のリード化合物となる可能性があり、さらに Survivin と補助因子の結合阻害によるアポトーシス誘導メカニズムの解明が、新たながん治療法の開発に貢献することが期待される。

本研究の最終的な目的は、「Survivin と HBXIP の結合を阻害する物質はどのような構造か、また、Survivin と HBXIP の結合領域がどこであり、得られた阻害物質がどのように阻害しているのか。その物質が細胞内でのアポトーシス誘導にどのように関わっているのか」、を明らかにすることである。

Survivin は細胞分裂制御とアポトーシス抑制の機能をもつタンパク質であり、胎生期の胚組織には発現が認められるが、正常な成体では細胞再生や修復に関与する組織以外では発現していない。しかしながら、悪性腫瘍では造血組織を含め大部分のがん組織で高発現しており、その発現量のがんの悪性度や予後と相関し、抗がん剤耐性機構にも関与している可能性が示唆されている。そのため Survivin はがん治療の標的分子として注目されている。アポトーシスのシグナル経路には、内因性経路 (Intrinsic pathway) と外因経路 (Extrinsic pathway) があり、いずれもタンパク質分解酵素 Caspase がカスケード的に活性化することにより細胞死を誘導する。Survivin は直接 Caspase には結合せず、他の補助因子と結合し複合体を形成することによって Caspase9 の活性化を阻害し、アポトーシスを抑制している。そこで申請者は、Survivin と補助因子の 1 つである HBXIP の結合を阻害すれば、がん細胞にアポトーシスを誘導することができると考えた。

この HBXIP は申請者らがデータベース (Human Protein Atlas) を参考に調査したところ、肺がんやすい臓がん、前立腺がんなどをはじめとして化学療法に耐性を示す難治性の腫瘍

においても多く発現していることが確認された（下図）。



すでに酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法を用いた Survivin-HBXIP 複合体形成阻害物質のスクリーニングシステムを構築し、これまでに 250 種以上の生薬エキスを対象に探索を行った結果、8 種の候補が得られた。しかしながら、この作用をもつ生薬成分の精製、同定には至っていない。この生理活性物質の単離・構造決定を行うことは、難治性のがんに対する新たなリード化合物を獲得する可能性を有していると考えている。また、Survivin が正常細胞にはほとんど発現していないことから、がん細胞に対し選択的に作用する薬剤となることが期待され、また、survivin と複合体を形成するタンパク質は IAP ファミリーの有する BIR ドメインであることが報告されているが、HBXIP は当該ドメインを持っておらず、また、機能がほとんど知られていないため、本研究で取り組むアポトーシス誘導機構の解明は、がん化に伴うアポトーシス耐性機序の新たな知見を得ることに貢献できると考えられる。

2. 研究の必要性及び従来研究

本研究の目的は、生薬スクリーニングから得られた Survivin-HBXIP 複合体形成阻害物質の構造解析およびがん細胞に対するアポトーシス誘導機構の解明である。複合体形成阻害物質の探索のため、これまでに Y2H 法を利用したスクリーニングシステムを開発したが、この手法は申請者独自のものであり現在特許出願中である。このシステムを Survivin の他の補助因子 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) についても構築すれば、同様のスクリーニング系を樹立することも可能となる。

Survivin を標的とした抗がん剤の研究としては Survivin 自体の発現抑制剤に関するものが多いが、Survivin はアポトーシス抑制のほかに細胞分裂制御といった重要な生理的機能をもつため、発現自体を抑制すると予期せぬ副作用が生じる危険性がある。これに対して申請者の着目する Survivin-HBXIP 複合体はアポトーシス抑制のみに働くと考えられるので、本研究により両者の結合を阻害する物質の単離・構造決定を行えば、より副作用の少ない薬剤のリード化合物となる可能性が高い。

3. 期待される効果

Survivin と IAP ファミリーのタンパク質の複合体がアポトーシス誘導を阻害する機構は詳細に調べられているが、本研究で扱う HBXIP は IAP ファミリーには属しておらず (Survivin と結合する BIR ドメインも有していない)、その機能やドメインのどの部位が結合しているのかが全く分かっていない。本研究により結合情報ならびに結合阻害剤によるアポトーシス誘導機構が明らかとなれば、Survivin と補助因子の結合を解除する分子標的薬の設計や、抑制を解除してがん細胞にアポトーシスを誘導する治療法の開発など、新たな展開が期待できる。

4. 研究の経過及び結果・評価

1) Survivin-HBXIP 複合体形成阻害物質の構造解析、2) Survivin と HBXIP のサブクローニング、3) メラノーマと肺がん細胞へのアポトーシス誘導能評価

2021 年度は 3 年計画の 2 年目であり、当初の予定は 1) において複合体形成阻害物質の構造解析、2) においてはサブクローニングと活性の評価、3) においては、肺がん A549 細胞とすいがん細胞でのアポトーシスの評価であった。

1) に関しては、Survivin-HBXIP 複合体形成阻害物質の候補として Y2H 法を用いた生薬エキスクリーニングにより得られた 8 種のうち、特に阻害効果の高かった遠志に含まれる阻害物質の特定を試みた結果、カジレンかカウレンのいずれかである可能性が示唆された。2)に関しては、Survivin のアポトーシス阻害部位 (BIR 領域) と有糸分裂の際の auroraB 結合領域の 2 つに分けて Y2H 用のベクターを構築し、HBXIP との結合を評価した。なお、サブクローニングを行うに先立ち、Survivin のサブクローニングにより作られるドメイン構造に関しては、AlphaFold2 によりモデリングし、その品質評価を VERIFY3D を用いて行った。サブクローニングしたベクターを用いて Y2H を行った結果、図 1 に示すよう

に、BIR 領域を持たない (アポトーシス抑制に関与しない) 部位では HBXIP と結合しないことが予測された。一方、BIR 領域を持つ

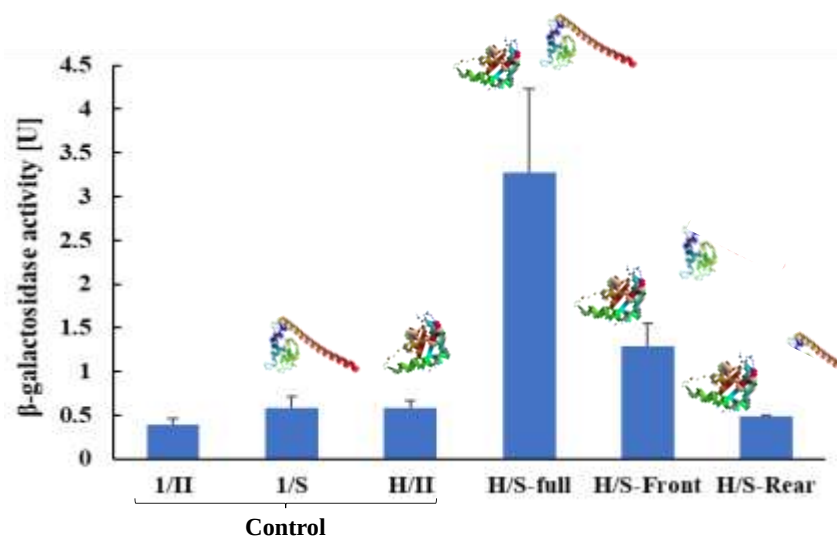


図1 サブクローニングしたSurvivinとHBXIPとのY2H法を用いた結合評価

ドメインとは、HBXIP が結合することが予測された。ただし、その結合に関しては、いずれに関しても Survivin 全長を用いた場合と比べると結合が弱いことも予測された。3) に関しては、2020 年度にメラノーマ細胞での結果を報告した。2021 年度は、肺がん細胞 (A549 細胞) と 2 種類の膵がん細胞を用いてアポトーシスの誘導評価を行った。評価に先立ち、それぞれの細胞において、Survivin および HBXIP がどの程度発現しているかをリアルタイム PCR を用いて評価を行った。その結果、ヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF) ではほとんど発現していないが、肺がん、悪性黒色腫では多く発現していることが示された。しかし、膵がんの細胞ではそれほど多く発現していない結果が得られた。しかし、アポトーシス誘導の評価には、発現量に限らずすべての細胞を対象として評価することとした。

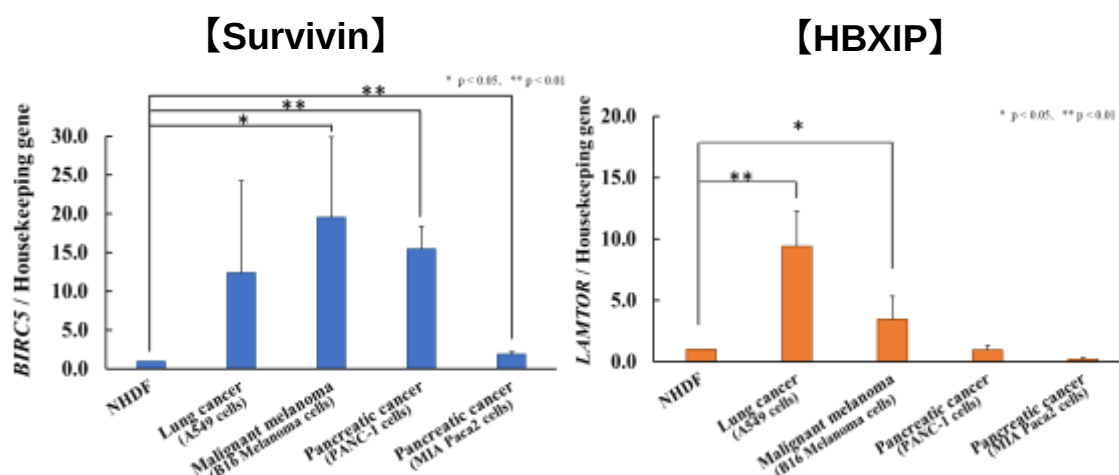


図2 SurvivinおよびHBXIPの各種細胞における発現量の評価

生薬抽出物のアポトーシス誘導能の評価を行った結果、もともとのスクリーニングで評価された生薬抽出産物はあくまでも酵母を用いた複合体結合阻害であるため、実際にアポトーシスを誘導できるかは未知であったが、メラノーマ、肺がん、膵がんいずれの細胞でも、すべての生薬抽出物においてアポ

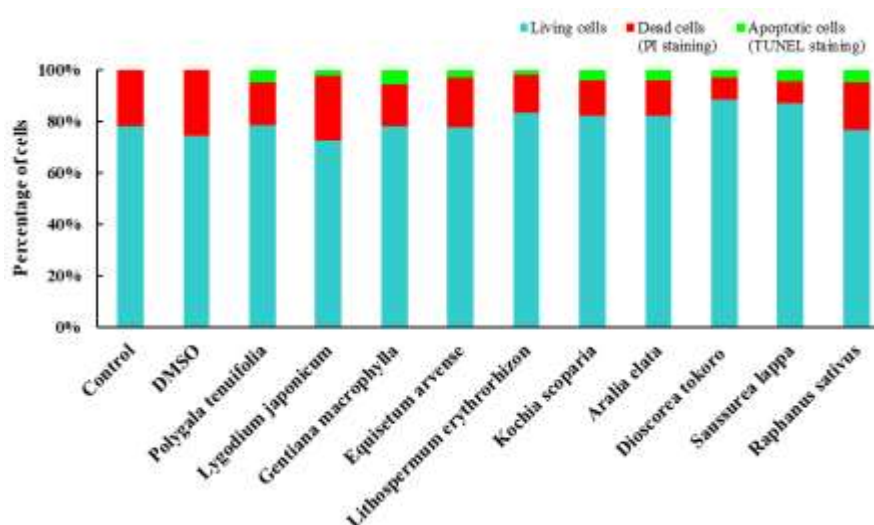


図3 肺がん細胞 (A549)に対する生薬抽出物のアポトーシス誘導能の評価

ーシスを誘導できることが示された(肺がん細胞 (A549) の結果を図3に示す)。一方、ヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF) においては、いずれの生薬抽出物においても、アポトーシスを誘導することはなかった (図4)。

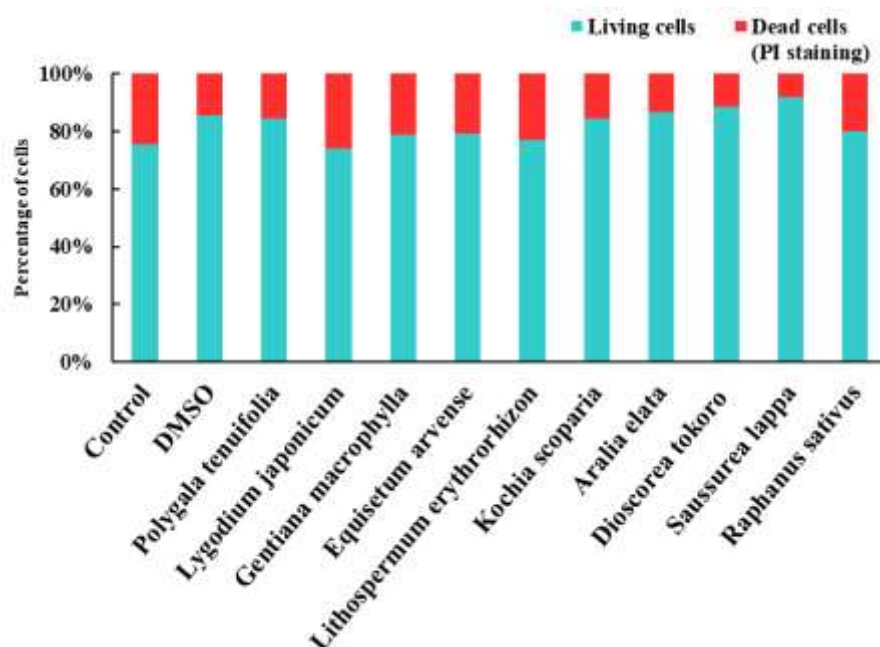


図4 NHDFに対する生薬抽出物のアポトーシス誘導能の評価

5. 今後の計画

Survivin-HBXIP 複合体形成阻害物質に関して、阻害活性が得られている他の生薬から、その阻害物質の単離と構造解析に取り組む。また、アポトーシスの評価は TUNEL 染色のみでしか行っていないため、カスパーゼ活性を含む他の複数の評価法で検討する予定である。得られた阻害剤の阻害メカニズムの解明に関しても同様に取り組んでいく予定である。更に、HBXIP の Survivin への結合領域は未解明であるため、HBXIP に対するサブクローニングと Survivin への結合能評価を行う予定である。

6. 研究成果の発表

学会発表および論文発表を行う予定である。