

氏名	神山 洋		
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)		
学位記号番号	博理工甲第 676 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	微生物二次代謝産物 Epoxyquinol B の化学生物学的研究		
論文審査委員	委員長	客員教授	長田 裕之
	委員	客員教授	吉田 稔
	委員	客員教授	辻本 雅文
	委員	客員教授	伊藤 幸成
	委員	教授	円谷 陽一

## 論文の内容の要旨

近年、標的分子を明確にし、その機能を制御する、「分子標的薬」の探索・開発研究が抗癌剤開発において中心的な役割を担うようになってきた。その中でも血管新生増殖因子の受容体チロシンキナーゼ阻害剤である gefitinib や sorafenib 等いくつかの化合物が臨床試験で優位な効果を示したことから、癌特有の現象である腫瘍血管新生を標的とした分子標的薬の探索・開発研究が盛んに行われている。本研究では、血管新生阻害剤として微生物二次代謝産物より抽出された epoxyquinol B (EPQB) の作用機構と反応メカニズムを解析し、癌分子標的薬のドラッグデザインに貢献することを目的とした。

EPQB はヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の遊走阻害物質として見出されたことから、血管新生抑制効果を有することが期待された。そこで、HUVEC を用いて *in vitro* における血管新生抑制効果を検討したところ、細胞毒性を与えない濃度域において HUVEC の遊走および管腔形成を阻害した。次に、マウスを用いた皮下腫瘍モデル (日本化薬との共同研究) において、7 日間の薬剤投与を行ったところ、EPQB 投与群では Control 群に比べて腫瘍増殖および腫瘍血管新生が阻害される傾向が見られた。以上の結果から EPQB は *in vivo*, *in vitro* において血管新生阻害作用を示すことが明らかとなった。血管新生において最も重要な血管新生増殖因子は Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) であることが知られている。そこで VEGF のシグナル伝達に対する EPQB の効果を検討した。HUVEC に EPQB を 2 時間前処理後、VEGF で 5 分間刺激したところ、EPQB 未処理で観察される VEGF 依存的な VEGFR2 およびその下流因子のリン酸化が、EPQB 処理により濃度依存的に抑制された。さらにリコンビナント VEGFR2 キナーゼドメインを用い、*in vitro kinase assay* を行ったところ、DTT 非存在下で VEGFR2 kinase 抑制効果が見られた。これらの結果から、EPQB は VEGFR2 活性化阻害剤であることが明らかとなった。さらに DTT により EPQB の抑制効果がキャンセルされたことから、VEGFR2 キナーゼドメイン内に存在する求核性の高いチオール基を有するシステイン残基に対して EPQB が結合したと推測された。そこで、VEGFR2 ATP binding pocket 内にあるシステイン (Cys) Cys919 と Cys1024 のアラニン置換体を作製し、EPQB の VEGFR2 リン酸化抑制効果に対する耐性を検討した。しかし、いずれの変異体においても EPQB に対する耐性は見られなかった。VEGFR2 キナーゼドメインにはさらに 9 個のシステイン残基が存在するため、この段階での結合部位の同定は困難であると判断された。

一方で、いくつかの epoxyquinoid は Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) シグナル系に作用し、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するという報告がある。そこで、EPQB が他の epoxyquinoid と同様な活性を示すか否かを検討した。cDNA アレイで HUVEC における TNF- $\alpha$  刺激時の遺伝子の増減を検討したところ、薬剤未処理で観察される接着因子 (ICAM、VCAM、E-selectin) 等、NF- $\kappa$ B 依存的発現遺伝子群の発現上昇が、EPQB 処理により抑制されることが明らかとなった。この抑制は NF- $\kappa$ B の核内移行阻害と相関していたことから EPQB は TNF- $\alpha$  シグナル伝達系を阻害し、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害していると考えられた。そこで、ウエスタンブロットにより TNF- $\alpha$  シグナル伝達系における各タンパク質のリン酸化を検討した。これまでに報告されている epoxyquinoid のほとんどは、IKK  $\beta$  あるいは NF- $\kappa$ B を標的分子としていたため、EPQB も同様な活性が推測された。しかし、EPQB は IKK  $\beta$  の上流に位置する TAK1 のリン酸化およびキナーゼ活性を抑制した。この時、TAK1 より上流の因子には影響を与えなかったことから、EPQB は TNF- $\alpha$  シグナル伝達系においては TAK1 を標的としていることが判明した。

以上の結果より、EPQB は他の epoxyquinoid と異なり、VEGFR2 や TAK1 に対する活性化抑制効果を有する事を見出した。次にこれらの標的に対する結合を詳細に検討するために、ビオチン標識した EPQB (Bio-EPQB) を作製した。リコンビナント VEGFR2 および TAK1 に対して Bio-EPQB を 1 時間反応させ、ウエスタンブロットによりビオチン結合タンパク質を検出すると、Bio-EPQB は VEGFR2 および TAK1 と共有結合し、その結合は EPQB によって拮抗することが判明した。次に、培養細胞に Bio-EPQB を処理し、細胞内における EPQB の結合タンパク質を確認したところ、Bio-EPQB 処理により複数のビオチン結合タンパク質が検出された。この結果から、EPQB は VEGFR2 および TAK1 に共有結合するが、さらに複数の標的タンパク質を有すると考えられた。そのため、全ての結合タンパク質の同定は困難であると考え、EPQB の化学構造に着目し、EPQB の反応機構を解明することとした。

EPQB は 2 つのエポキサイドと  $\alpha$ ,  $\beta$  - 不飽和ケトンを有するため、システイン残基のチオール基のような求核性の高い分子とマイケル付加やエポキサイドの開環によって共有結合することが可能である。実際に、VEGFR2 や TAK1 に対して Bio-EPQB を結合させる際にシステインやグルタチオンを competitor として加えると競合反応が見られたことから、EPQB はタンパク質のシステイン残基に結合していることが考えられた。そこで、L-システインと EPQB を反応させ、LC/MS で EPQB とシステインの結合生成物の解析を行った。その結果、まず EPQB+Cys のピークが検出され、その後、時間依存的に EPQB+2Cys のピークが増加していくことが明らかとなった。これら生成物の UV スペクトルでは 220-240 nm の不飽和カルボニル系の UV 吸収ピークが確認されたため、反応後も EPQB の  $\alpha$ ,  $\beta$  - 不飽和ケトン構造は残っていることが示された。以上の結果から EPQB の反応点は 2 つのエポキサイドであり、1 分子の EPQB が 2 分子のシステインと結合し得ることが判明した。さらに、反応生成物の水素原子の環境を NMR 法にて測定し、EPQB のシステインとの反応部位の特定を試みた。生成物が分取できなかったため、EPQB と L-システインを 1 時間および 4 時間反応させた後、直接に  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定した。その結果、それぞれのサンプルで未反応 EPQB の  $^1\text{H}$  ピークの他に生成物と推定される  $^1\text{H}$  ピークが確認され、各ピークの積分値の比較から、それらの  $^1\text{H}$  ピークは生成物のものであることが判明した。さらに、DQF-COSY スペクトルによって各水素原子の帰属を試みたところ、 $^1\text{H}$  ケミカルシフトから C-4,5 位のエポキサイドが最初に開環し、C-4 位に L-システインが結合したことが示唆された。しかし、システインや未反応 EPQB の  $^1\text{H}$  ピークとオーバーラップしていたため、完全な帰属には至らず、2 目目のシステイン結合部位を同定することはできなかった。以上より、EPQB は 2 つのエポキサイドが順次システインと反応して共有結合することが明らかとなった。

一方で、TAK1 を過剰発現させた HeLa 細胞に EPQB を処理してウエスタンブロットを行うと、EPQB で前処理したサンプルでは TAK1 のバンドとは別に高分子量にバンドシフトが見られ、*in vitro* でリコンビナント TAK1 に EPQB を処理すると TAK1 分子量のほぼ正数倍にバンドシフトが見られた。これまでの結

果から、EPQBはタンパク質のシステイン残基と結合するエポキサイドを2つ有することから、EPQBが結合タンパクを架橋していることが推測された。そこで、Cys/Ser変異体VHRを用いて、この仮説を検討したところ、EPQBの2つのエポキサイドがそれぞれタンパク質のシステイン残基と結合する結果、結合タンパク質同士を架橋していることが示唆された。タンパク質同士を架橋することでそのタンパク質の活性およびシグナル伝達に影響を与えるという仮説を持つ化合物はいくつか報告があるが、その機構は明らかになっておらず、本研究結果は、この仮説を支持する重要なデータであると考えられる。

以上より、EPQBは血管新生や炎症系を含む複数の標的を持つ multiple target inhibitor であり、その作用機構は、結合タンパク質同士を架橋することでタンパク質の機能や立体構造に影響を与えてシグナル伝達を阻害するという興味深いものであることが判明した。これらの知見は今後、構造活性相関や動物実験などの更なる解析により、新たな分子標的薬開発の基礎データとして貢献できるのではないかと考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 20 年 1 月 29 日（火）13:30-14:30 に埼玉大学理学部 3 号館第 3 会議室で論文発表会を行った。神山氏は、微生物二次代謝産物 epoxyquinol B (EPQB) が、腫瘍増殖において重要である血管新生やおよび NF- $\kappa$ B 活性化に密接に関与するシグナル伝達系を阻害することを明らかにした。さらに、EPQB の化学構造に着目する事として、これまで報告されている epoxyquinoid とは異なる作用機構でシグナル伝達に影響を与える可能性を明らかにした。学位論文の詳細内容はに関して、以下に述べるの通りである。

第 1 章では、序論としてケミカルバイオロジー研究から癌に対する分子標的薬への展開を論じ、分子標的薬開発基礎研究として、低分子化合物とその標的タンパク質との相互作用解析を行う意義を説明している。

第 2 章では、癌に対する分子標的の一つとして腫瘍血管新生の重要性について論じ、血管新生阻害剤として当理研抗生物質研究室でより発見された低分子化合物を示したの特長について論じた。その中で、epoxide や  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンなど特異的な構造を有する epoxyquinol B (EPQB) に着目し、EPQB の作用機構と標的分子の解析を行う事を明示した。EPQB の血管新生抑制機構は血管内皮細胞やマウスを用いた解析で明らかにし、さらに生化学的な解析から VEGFR2 (血管内皮細胞増殖因子の受容体) の活性化を抑制する事でこれらの血管新生抑制効果が得られる可能性を示唆した。

第 3 章では、血管内皮細胞の活性化と腫瘍細胞における NF- $\kappa$ B (核内転写因子) 活性化の関連性、類似構造を有する他の epoxyquinoid が NF- $\kappa$ B シグナル系に作用している点に着目し、EPQB の NF- $\kappa$ B シグナル系における解析を行っている。cDNA アレイや細胞免疫染色等を用いた解析から、EPQB が NF- $\kappa$ B シグナル系に作用している事を明らかにし、その結果を元に、同経路における重要な kinase であるシグナル伝達因子 TAK1 (リン酸化酵素) が標的であることを明らかにした。TAK1 を標的とする低分子化合物はこれまでにほとんど報告されておらず、類似構造を持つ他の epoxyquinoid とは異なる作用点を有する可能性を示唆した。

第 4 章では、EPQB とその標的分子との相互作用を検討している。これまでの結果を元にビオチン標識した EPQB を用いて、EPQB がリコンビナント VEGFR2 (血管内皮細胞増殖因子の受容体) および TAK1 のシステインを介して共有結合することを示した。また、動物細胞を用いた解析から、EPQB は VEGFR2 や TAK1 以外にも標的分子を有する multiple target inhibitor である可能性を考え、単なる標的分子の解析に終わることなく、視点を変えて EPQB のシステイン結合部位の解析を化学的に行っている。液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC/MS) や核磁気共鳴装置 (NMR) を用いた解析から、EPQB の 2 つの epoxide 部位が結合タンパク質表面のシステインと共有結合し、結合タンパク質同士を架橋することを示した。さらに、結合試験モデルタンパク質としてシステインをセリンに置換したりコンビナントタンパク質を作製し、EPQB の結合アミノ酸がシステインである点、システインを介して結合タンパク質を架橋する点を生化学的にも証明した。

第 5 章では、本研究内容の総括として、EPQB が結合タンパク質を架橋することで腫瘍血管新生や NF- $\kappa$ B シグナル系に影響を与えている可能性を述べ、今後更なる解析を行う事で、腫瘍血管新生や腫瘍悪性化に対する新たな分子標的薬開発の重要な基礎データとなりうることを論じている。

以上、本審査委員会は神山氏の研究成果は博士課程として十分な内容を有すると判断した。また、本論文の内容は、査読制度のある国際誌 (Oncology Research および Journal of Antibiotics) に神山氏を筆頭著者として報告しているためおり、外部の専門家からも高い評価を受けている。

以上のことを総合的に判断し、審査を合格とした。