

研究終了報告書

「化学-酵素ハイブリッド合成中分子群による転写制御」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：谷藤 涼

1. 研究のねらい

天然物エクテナサイジン 743 (トラベクテジン) は悪性軟部腫瘍の治療薬として臨床応用されている。本中分子は DNA アルキル化を担う 6 環性母骨格とタンパク質相互作用部位が 10 員環マクロラクトンで連結された特異な構造を有する。マクロラクトン上のユニットを改変した合成誘導体ルルビネクテジンも転移性小細胞肺がんの治療薬として、2020 年に FDA より認可を受けている。本中分子群の開発成功例と活性発現機構を踏まえると、マクロ環構造の多様化により DNA-タンパク質間相互作用を選択的に制御する中分子群の創製が期待される。しかしエクテナサイジン 743 はその構造の複雑さから、合成に多段階変換 (> 20 工程) を要する上に、構造改変部位が限定される。本研究では、エクテナサイジン 743 に着想を得て、より簡便かつ迅速 (≤ 8 工程) に構築可能なマクロ環含有中分子群を設計した。提案者がこれまでに開発した化学-酵素ハイブリッド合成法によって複雑母骨格を迅速に構築し、本骨格へタンパク質相互作用部位を自在に導入する。この分子群を基盤技術とし、DNA-中分子-タンパク質三成分複合体形成を鍵とした転写制御の実現をねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

独自に設計した天然物様マクロ環状中分子群を基盤とし、**1) 化学-酵素ハイブリッド迅速合成**、**2) 核内に到達して DNA-タンパク質間相互作用を標的とする分子群の創出**、**3) 特定の転写系の選択的制御** を研究目的とした。

1) 化学-酵素ハイブリッド迅速合成: 設計した分子群の合成に向け、複雑母骨格化学-酵素ハイブリッド合成の適用範囲拡大を進めた。酵素 SfmC は 2 つの単純なアミノ酸誘導体からエクテナサイジン 743 型の五環性母骨格を一挙に構築する。基質のアミノ酸残基を改変した非天然型基質アナログ 8 種を化学合成し、本プロセスに適用した。いずれの基質アナログからも酵素変換が進行し、対応する 8 種の非天然型骨格の合成に成功した。また、後期修飾酵素を大量発現・精製し、高選択的なピンポイント反応にも成功した。

2) マクロ環状分子群による細胞内 DNA 二重鎖切断誘起: エクテナサイジン 743 の 1-4 位炭素間に架かる 10 員環マクロラクトンを 1-5 位間架橋型へ改変した中分子群を設計した。承認薬であるエクテナサイジン 743 と同一の出発原料からそれぞれ 8 工程以内にて半合成するプロセスを確立した。合成分子を肺がん由来 A549 細胞へと作用させ、DNA 二重鎖切断のマーカーである γ H2AX (リン酸化ヒストンコア)、53BP1 (DNA 修復タンパク質) の免疫蛍光染色を行なった。2 種マーカーの foci 形成と共局在を観察し、設計分子群の核への到達と DNA 二重鎖切断の誘起を実証した。設計分子群による核内現象標的化の実現性が確認された。

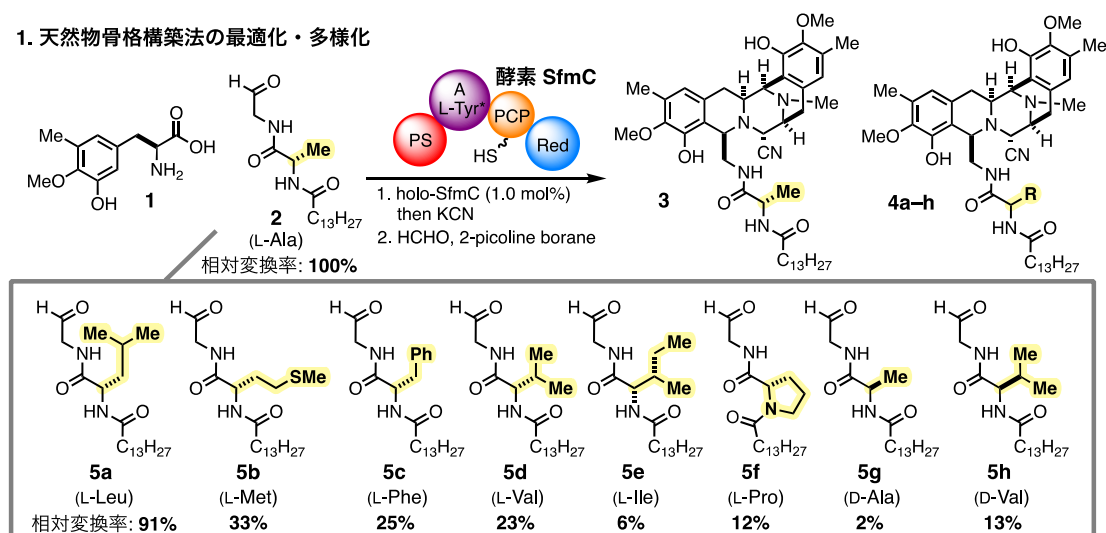
3) 特定の転写系の選択的制御: 合成中分子群は、上市薬に比肩する nM レベルでのがん細胞増殖阻害活性を示した。がん細胞 39 種に対する活性のフィンガープリントの比較から、複数の

合成分子はエクテナサイジン 743 と類似の作用機序が示唆された。一方で、いくつかの分子は他の阻害剤と最も高い類似性を示した。マクロ環構造に依存した標的タンパク質・標的経路の変化を期待し、高い類似性を示した既知阻害剤と合成分子群のトランスクリプトーム解析を実施した。しかし期待に反し、全ての化合物で遺伝子発現変動に有意な差は見られなかった。”合成中分子群による DNA-タンパク質間相互作用の制御”の実証について、遺伝子からのアプローチは現時点では困難と判断した。そこで、DNA-合成分子複合体と核内タンパク質との相互作用解析に重点を移し、現在検討を進めている。

(2) 詳細

1) 化学-酵素ハイブリッド迅速合成: 設計した中分子群の核酸アルキル化部位に相当する、五環性母骨格の化学-酵素ハイブリッド合成法の拡充を行なった。生合成酵素 SfmC による酵素変換と続く 2 段階の化学変換により、基質 **1** と **2** から五環性骨格 **3** が合成される (下図)。**2** の L-アラニン残基を改変した 8 種の基質アナログ **5a-h** を合成し、本系に適用した。SfmC は非常に広い基質許容能を示し、全ての基質アナログから対応する五環性骨格 **4a-h** が得られた。LC 分析における吸光度の面積比から、天然型基質 **2** の変換率を 100%とした相対的な変換効率を算出し、SfmC による酵素変換の基質構造と活性の相関を見出した。L-メチオニンを導入した **5b** については、1 度の反応で 2.2 mg の五環性骨格 **4b** の化学-酵素ハイブリッド合成も達成した。本成果は *Tetrahedron Chem* 誌の創刊号へ詳報として公表した (*Tetrahedron Chem* **2022**, 1, 100010.)。SfmC の類縁酵素についても同様の検討を進めながら、スケール・効率の向上を進めている。また、ごく最近報告された、生合成経路において SfmC の下流の変換を担う修飾酵素についても検討を開始した。本酵素を活用したワンポット *in vitro* 連続酵素変換により、SfmC に対する生成物阻害を回避でき、効率向上が期待される。既に連続酵素変換に成功し、修飾酵素も比較的広い基質許容性を有することを明らかにしている。

1. 天然物骨格構築法の最適化・多様化

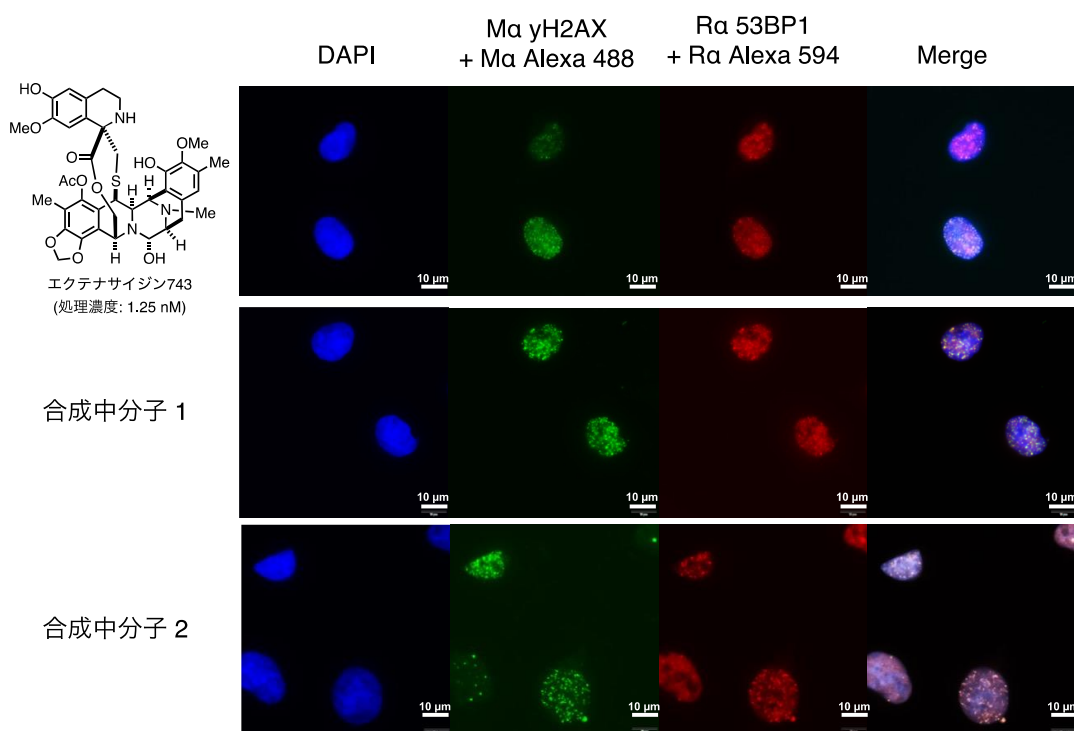


2) DNA-タンパク質間相互作用を標的とする分子群の創出: 承認薬エクテナサイジン 743 の 1-4 位間に架橋しているマクロラクトンを 1-5 位間架橋型へと改変した分子群を設計し、半合成し

た。最終的に 14–17 員環を有する中分子群を天然物シアノサフラシン B から 6–8 工程で合成するプロセスを確立した。また、6 段階で合成した化合物からの環縮小反応を開発した。合成した 14–17 員環の全てについて X 線結晶構造の解析に成功し、マクロ環拡張型の骨格改変に成功していることを明らかにした。

マクロ環構造と生命現象への干渉能との相関を取得するため、細胞実験に先駆けて、20 塩基対の DNA オリゴマーを用いて合成分子群の DNA アルキル化能を *in vitro* で解析した。前述の環サイズに比例し、DNA アルキル化能を抑制できることが明らかとなった。母骨格を保持しながらマクロ環を構造改変することで、生理活性が調節できる可能性を示唆する結果と言える。

承認薬エクテナサイジン 743 は核内へと到達して DNA をアルキル化すると同時に、DNA 修復タンパク質を阻害して二重鎖切断 (DSBs: double-strand breaks) を誘起する。設計・合成した中分子群が同様に核内へと到達し、DSB を誘起可能であることを精査するため、合成分子群を肺がん由来 A549 細胞へと作用させた。DSB 誘起の指標として、リン酸化ヒストンコア γ H2AX と DNA 修復タンパク質 53BP1 を選定し、これらの共局在を免疫蛍光染色により可視化した。結果として、14–17 員環を有する全ての化合物について、 γ H2AX・53BP1 の共局在が確認された。この結果から、骨格改変に関わらず、合成中分子群が同様に DSB を誘起することを明らかとした (下図)。分子量 846 の比較的大きな中分子も核内へと到達可能であることが示された。



3) 特定の転写系の選択的制御: がん細胞パネルアッセイ (JFCR39) から、合成分子群が nM レベルでの非常に強力な細胞増殖阻害活性を示すことを明らかにした。もっとも強力なもので、39 種のがん細胞に対する GI_{50} (50%増殖阻害濃度) の平均値が 2.14 nM となった。同実験系でのエクテナサイジン 743 の値が 2.24 nM であることから、本骨格改変戦略が新規抗がん剤の開発に有用であることが示された結果と言える。また、活性のフィンガープリントの比較から、いくつかの分子はエクテナサイジン 743 と類似の作用機序 (ピアソン相関係数 $r > 0.75$) が示唆さ

れた。一方で、比較的大きなマクロ環を有する化合物群はエクテナサイジン 743 と類似性が低下し ($r < 0.60$)、他の既知阻害剤と高い類似性を示した ($r > 0.75$)。マクロ環構造に依存した標的タンパク質・標的経路の変化を期待し、トランスクリプトーム解析を実施した。しかし期待に反し、全ての化合物で遺伝子発現変動に有意な差は見られなかった。DNA アルキル化剤であるため、DNA・RNA 合成系の関連遺伝子が強く変動してしまい、その他の遺伝子の変動が解析できていないものと考えられる。遺伝子からのアプローチは現時点では困難と判断した。そこで、DNA-合成分子複合体と核内タンパク質との相互作用解析に重点を移し、現在検討を進めている。

3. 今後の展開

【短期的展開: 2-3 年程度】 研究期間内にて、天然物 エクテナサイジン 743 の構造に着想を得た 14-17 員環を有するマクロ環状中分子群の系統的合成、生理活性評価を進めた。マクロ環のサイズに応じて DNA アルキル化能に差が見られ、異なる生理活性発現機構が示唆されている。中分子群の更なる構造展開により、DNA アルキル化能を調節しながら、DNA-核内タンパク質間相互作用を制御する分子群の一挙合成が可能と考えられる。また、研究期間内にモデル分子として、特定の既存阻害剤とのコンジュゲート分子等を合成している。これらも核内へと到達し、DNA 二重鎖切断を誘起できることも確認できている。今後は実際に核内タンパク質を標的化可能であることを実証していく。さらに、既存リガンドとのコンジュゲート中分子群を創出し、核内現象にアクセスするケミカルツールの創製を展開する。

【長期的展開】: タンパク質間相互作用を標的とする分子ツールの開発は *in silico* 技術の発展もあり、設計法が確立されつつある。また、分子糊や PROTAC 等のタンパク質分解誘導剤など、タンパク質を人為的に近接させる技術が長足の進歩を遂げている。核酸-タンパク質間相互作用の制御については、転写因子を標的とするデコイ核酸に代表されるように、核酸を基盤とした技術が発達している。しかし核酸を標的とする中分子化合物については、如何なる細胞も無差別的に攻撃し得る低い選択性から、精力的な開発が実施されていない。他方で、少数であるが DNA や近傍の核内タンパク質に作用する化合物の ADC 薬剤が FDA により認可されている (Trastuzumab Deruxtecan, Loncastuximab tesirine)。特定の細胞への低・中分子の選択的送達法の開発が進む現状において、核内作用型分子の多様化は、新規薬剤開発に直結する重要な課題と言える。本研究で開発を進める合成システム・中分子群は、核内現象の選択的制御を実現する新規中分子ライブラリーに発展し得る。また、既存の低分子群について、DNA 近傍に人為的に接近させることで、新規機能を発現する可能性も見込まれる。簡便・迅速かつ体系的な DNA 相互作用中分子創出を可能とする本研究提案は、核内現象制御の基盤となり得る、発展性を秘めた課題と言える。

4. 自己評価

異動直後、生化学実験機器がほとんど無い状態からの研究開始であったが、多大な支援を受け設備を拡充することができた。これに合わせ、共同研究を通じて技術を習得しながら、自研究室において、1) 遺伝子のクローニング・発現、2) がん細胞の培養・増殖阻害活性試験・免疫蛍光染色実験 の実施を可能とした。1) については、実験のサイクルを早めることにも成功した。

領域会議等において自身の研究領域外の研究者から学ぶ機会を得られたことが非常に大きな原動力となった。設備の準備から実験系の立ち上げを達成できた点は、今後研究者として成長・独立していくための大きな糧となるものと考えられ、評価できるポイントと言える。

研究の進捗については、当初の想定よりも若干遅れる形となった。細胞実験への移行に手間取り、開始が遅れたのが一番の要因と考える。また、成果公表について、研究期間内の論文公表を目指しているが、こちらも当初想定より遅れている。設計分子群を合成しつつ生理活性を明らかにし、概念実証を目指す過程において、データの解釈や論旨構築に時間を要した。依然として合成分子群を用いた生命化学へのアプローチにも課題が残るが、本研究期間で得られた知見・技術・設備を基に、同プロジェクトの深化と新規プロジェクトの展開を進めていく。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Ryo Tanifuji*, Naoto Haraguchi, Hiroki Oguri*.

Chemo-enzymatic total syntheses of bis-tetrahydroisoquinoline alkaloids and systematic exploration of the substrate scope of SfmC. *Tetrahedron Chem.* **2022**, *1*, 100010.

抗腫瘍性天然物サフラマイシン A の骨格合成酵素、SfmC の基質適用範囲を拡大した。基質アナログ 13 種を化学合成し、酵素変換効率を算出した(上図 B)。全ての基質アナログから変換が進行し、非天然型側鎖を有する新規類縁体 13 種の迅速合成を達成した。単離スケール合成も行い、非天然型側鎖を有する複雑骨格を 1 日で 2.2 mg 合成した。初期生理活性試験に要する化合物量の迅速供給も可能であることを実証した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	大栗 博毅、谷藤 涼
	発 明 の 名 称	マクロ環含有新規テトラヒドロイソキノリンアルカロイド化合物
	出 願 人	東京大学
	出 願 日	2022 年 03 月 01 日
	出 願 番 号	PCT/JP2022/008664
	概 要	悪性軟部腫瘍治療薬トラベクテジンの構造を合理的に改変・拡張し、抗腫瘍性中分子群を開発した。DNA 二重鎖を可逆的にアルキル化しながら、タンパク質相互作用ユニットを呈示できる。単工程の化学変換によるユニット改変が可能であり、新規抗腫瘍薬開発に直結するポテンシャルを有する。既にトラベクテジンを上回る活性も確認できている。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国内学会 口頭講演(査読有)

1. 第 63 回天然有機化合物討論会
谷藤 涼、細野 絵里奈、大栗 博毅
“エクテナサイジン類のマクロ環骨格多様化による中分子群創出と抗腫瘍活性評価”
2021. 9. 15. 大阪市中央公会堂(大阪市、大阪府)
2. 令和 3(2021)年度 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会
谷藤 涼、大栗 博毅
“エクテナサイジン類のマクロ環骨格多様化による抗腫瘍性中分子群の創出”
2022. 2. 2. 琵琶湖ホテル(大津市、滋賀県)

受賞等

1. 2021. 11. 5. 天然有機化合物討論会
第 63 回天然有機化合物討論会 奨励賞
“エクテナサイジン類のマクロ環骨格多様化による中分子群創出と抗腫瘍活性評価”
2. 2023. 4. 19. 日本化学会 産学交流委員会
第 103 春季年会「優秀講演賞(産業)」
“エクテナサイジン類のマクロ環状骨格多様化による抗腫瘍性中分子群創出と細胞内 DNA 二重鎖切断”

著作物

1. 谷藤 涼
“酵素をしてビアリアルを合成せしむ 合成酵素によるアトロプ選択的クロスカップリングと指向性進化”
月刊化学 **2022**, 77, 61–62.
2. 谷藤 涼
“骨格編集:ヘテロ環縮小反応の進歩”
有機合成化学協会誌 **2022**, 80, 778–779.
3. 原口 尚人、谷藤 涼、大栗 博毅
“SfmC 酵素変換を基盤とした化学—酵素ハイブリッド合成”
酵素工学ニュース **2024**, 91, 17–21.