

<平成20年度助成>

食品成分を機軸としたケミカルバイオロジー研究

掛谷 秀昭

(京都大学大学院薬学研究科)

1 はじめに

人類は有史以来、合成医薬と並んで、天然有機化合物(天然物)を薬として利用してきた。天然有機化合物の資源を考えると、微生物代謝産物、生薬・漢方、植物、機能性食品、海洋無脊椎動物など多種多様である¹⁾。ブロックバスター的化合物は人類の福祉に貢献してきたのみならず、新しい学問領域であるケミカルバイオロジー(化学生物学)の発展にも大きく貢献しつつある。例えば、微生物代謝産物由来の免疫抑制剤FK506(タクロリムス)、シクロスポリンA、高脂血症治療薬プラバスタチンなどは、人類の福祉に貢献してきたのみならず、免疫領域、代謝・循環器内科領域などの関連領域科学の発展にも大きく貢献している。さらに、タイハイヨウイチイの樹皮由来の抗がん剤パクリタキセル(タキソール)は、微小管制御機構の解明に大いに貢献している。1980年以降30年間に承認された医薬品の由来を調べてみると、天然物それ自体の比率は5%程度であるが、天然物誘導体、天然物模倣型合成化合物などを含めると約50%を占め、天然物の有する化学的多様性、生物学的多様性が創薬研究に果たしている役割は非常に大きい²⁾。

ところで、近年、虚血性心疾患や高血圧性心疾患に起因する心不全は増加の一途をたどっており、健康長寿社会を目指す我が国にとっては大きな問題である。平成19年度の主な死因別死亡数の割合では、これら心疾患は、悪性新生物に続く第2位であり、ますます増加傾向にある心不全に

対して、新しい予防法・治療法を確立することが強く望まれている。

心筋細胞は、心臓の主な構成成分であり、出生と同時にその分裂能をほぼ失うと考えられており、心臓の成長は個々の心筋細胞の大きさが増すこと(肥大)による。すなわち、肥大とは限界のある代償機構であり、刺激の継続によりこの代償は破綻し、心臓は収縮機能不全(心不全)に陥る³⁾。

そこで、本研究では、画期的な心不全治療薬リード化合物の開発基盤の確立を目指して、i) 培養心筋細胞を用いて、効果的に心筋肥大細胞反応を抑制する天然資源成分等を探索するための評価系を用いて、食品成分、生薬・漢方、薬用植物由来の心筋肥大抑制物質を見出すこと、ii) 各種類縁化合物・誘導化合物を合成すること、iii) 有望な化合物に関して作用機構解析に適した機能性分子プローブ合成のための基盤を確立すること、などを目的とした(図1)。

心筋肥大細胞反応を抑制する化合物の探索
(探索源：食品成分、生薬・漢方、薬用植物等)



- ・ ヒット化合物類縁化合物等の創製
- ・ 機能性分子プローブ素子の創製



心不全治療薬リード化合物の
開発に有用な知見の取得

図1

2. 実験方法

2.1 培養心筋細胞の肥大評価

ラット初代新生仔培養心筋細胞を用いて、フェニレフリン ($\alpha 1$ 受容体作動薬、 $30 \mu\text{M}$) 刺激によって心筋細胞肥大を誘導した^{4,5)}。検体 (スクリーニングサンプル) 試験時には、各種検体溶液あるいは溶媒コントロール溶液を添加し、適宜、細胞形態を顕微鏡下で観察するとともに、2日後の心筋細胞径の変化を定量した。

2.2 スクリーニングサンプルの調製

様々な食品成分抽出液、植物抽出液 (生薬・漢方を含む) を濃縮乾固後、DMSO に溶解しスクリーニングに供するサンプルとした。また、当研究室で単離精製、あるいは合成した化合物群 (フォーカストライブラリー) も DMSO に溶解しスクリーニングサンプルとした。

2.3 クルクミンの効率的な合成経路の検討

3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒドを出発原料として、縮合試薬、反応溶媒、反応温度等、様々な反応条件検討を行った。反応経過、ならびに反応生成物の追跡は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行った。さらに、反応生成物の同定・構造解析は、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 解析、質量分析スペクトル (MS) 解析等を用いて行った。

2.4 クルクミン誘導体・類縁化合物の合成経路の検討

上記 2.3 において確立した縮合経路を鍵とし、合成経路に供することが可能なモノマー化合物の合成・検討、ならびに合成したクルクミンを基質とした各種変換反応の検討を行った。

2.5 分子プローブ用の各種リンカー結合型蛍光団、ならびに二官能性分子プローブの合成法の検討

クルクミン誘導体・類縁化合物の細胞内局在や標的蛋白質を検討するための各種リンカー結合型

蛍光団、および機能性分子プローブの合成法を検討した。

2.6 出芽酵母株コレクションにおける薬剤感受性試験

ゲノムワイド出芽酵母株コレクション (DAmp collection: decreased abundance by mRNA perturbation collection); Open Biosystems⁶⁾ の各株を 96 穴マイクロプレート (YPD 培地) に植菌し 27 度で 24 時間前培養を行い、続いて検体を添加し、さらに 24 時間培養後の細胞数を濁度により検出した。

3. 結果

3.1 クルクミン、およびクルクミン誘導体・類縁化合物の効率的な合成経路の検討・確立

ラット初代新生仔培養心筋細胞を用いて、心筋肥大細胞反応を抑制する検体のスクリーニングを行った。その結果、ショウガ科ウコンに含まれる成分であるクルクミンが細胞毒性を示さない濃度域において、心筋肥大抑制効果を示した。また、クルクミン ($10 \mu\text{M}$) は、フェニレフリンによって誘導される心筋細胞径の増大、ならびに心房性利尿因子 (ANF) や β -ミオシン重鎖 (β -MHC) プロモーターの転写活性化も有意に抑制した。しかし、動物実験や構造活性相関研究等を行うためには、大量の化合物が必要となる。そこで、クルクミンおよび各種類縁化合物の効率の良い合成経路の確立を行った。すなわち、既報の方法等⁷⁾ を参考にして、3-メチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒドを出発原料として、縮合試薬、反応溶媒、反応温度等、様々な反応条件の検討を行った。その結果、**図 2** で示した合成経路を確立することができた。

続いて、**図 2** で確立した反応条件を利用して化合物 **2** を得た。なお、3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドは、本反応条件下では反応が進行しなかった。そこで、クルクミンを原料として脱メチ

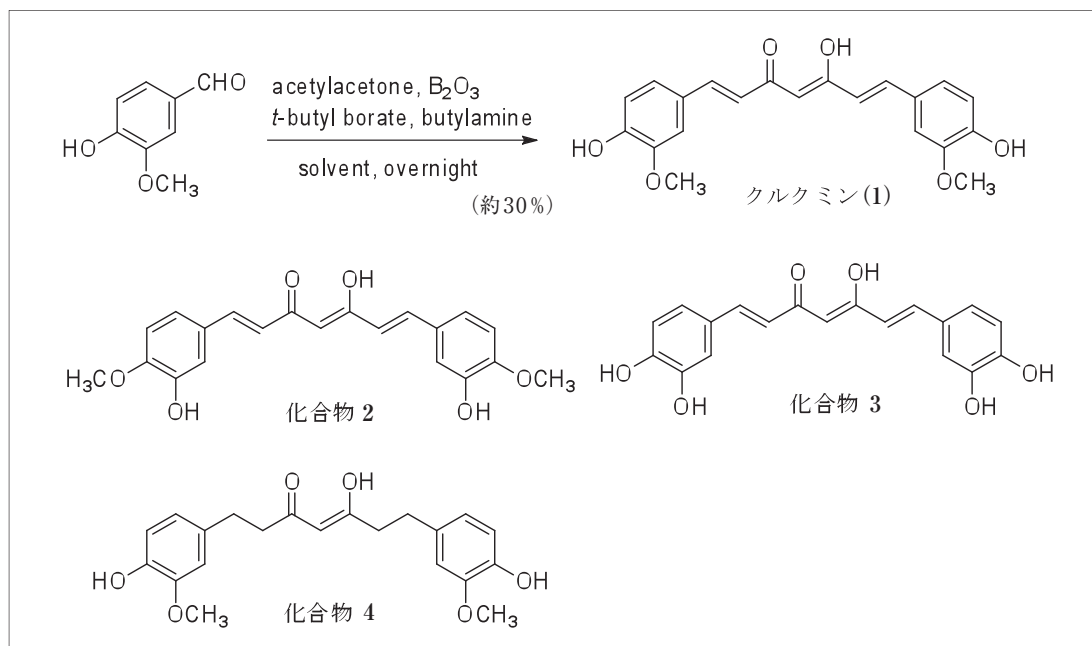


図 2

ル化反応を行うことで、化合物 3 を得た。また、クルクミンを水素添加反応条件に付すことで化合物 4 を得た。

3.2 分子プローブ用の各種リンカー結合型蛍光団、ならびに二官能性分子プローブの合成法の検討・確立

近年、クルクミンの生体への薬効として、抗酸化作用、抗炎症作用、細胞保護作用をはじめとして、様々な効果が報告されている。しかし、これまでの研究で、クルクミンの細胞内局在や物理的に相互作用する結合タンパク質に関する知見は乏しい。そこで、これらの知見を得るためのアプローチの1つとしては、機能性分子プローブの創製・活用が有効であると考えられる(図3)。本研究に

おいては、クルクミン類の機能性分子プローブ化研究の1つとして、各種リンカーの合成検討や標識タグ部分の合成検討を行った。その結果、図4に示した合成経路にて、化合物の細胞内局在を可視化可能なプローブ部分として化合物6、細胞内結合タンパク質の探索・同定に適したプローブ部分として化合物7の合成を行った。

3.3 出芽酵母株コレクションにおける薬剤感受性試験

3.2で合成した二官能性分子プローブ(化合物7)などは、目的化合物のビオチン標識体と標的タンパク質の物理的相互作用を指標にした利用が可能である。一方で、標的タンパク質の発現量が少ない、あるいは形成すべき複合体が生体外では不安定である、といった場合には目的化合物の標的タンパク質の探索・同定は決して容易ではない。

そこで、近年、目的化合物の標的パスウェイを検討する手法として、取得した大規模なデータを活用したデータマイニング法が考案されており、特に、クラスター解析は簡便な方法で有用な情報を提示可能である^{8,9)}。この場合、作用機序が類似した化合物をグループ化することが可能である(図5)。そこで、目的化合物の標的パスウェイ解

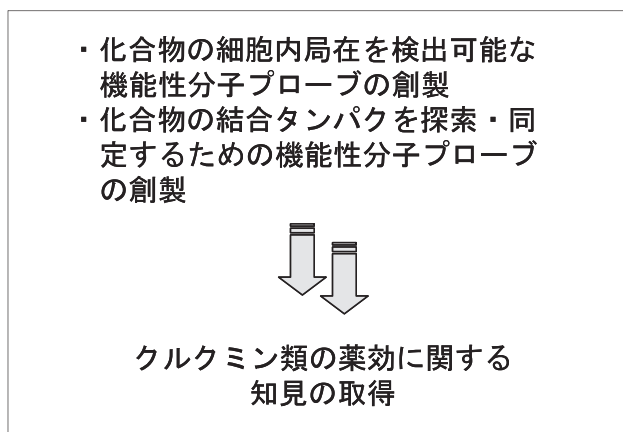


図 3

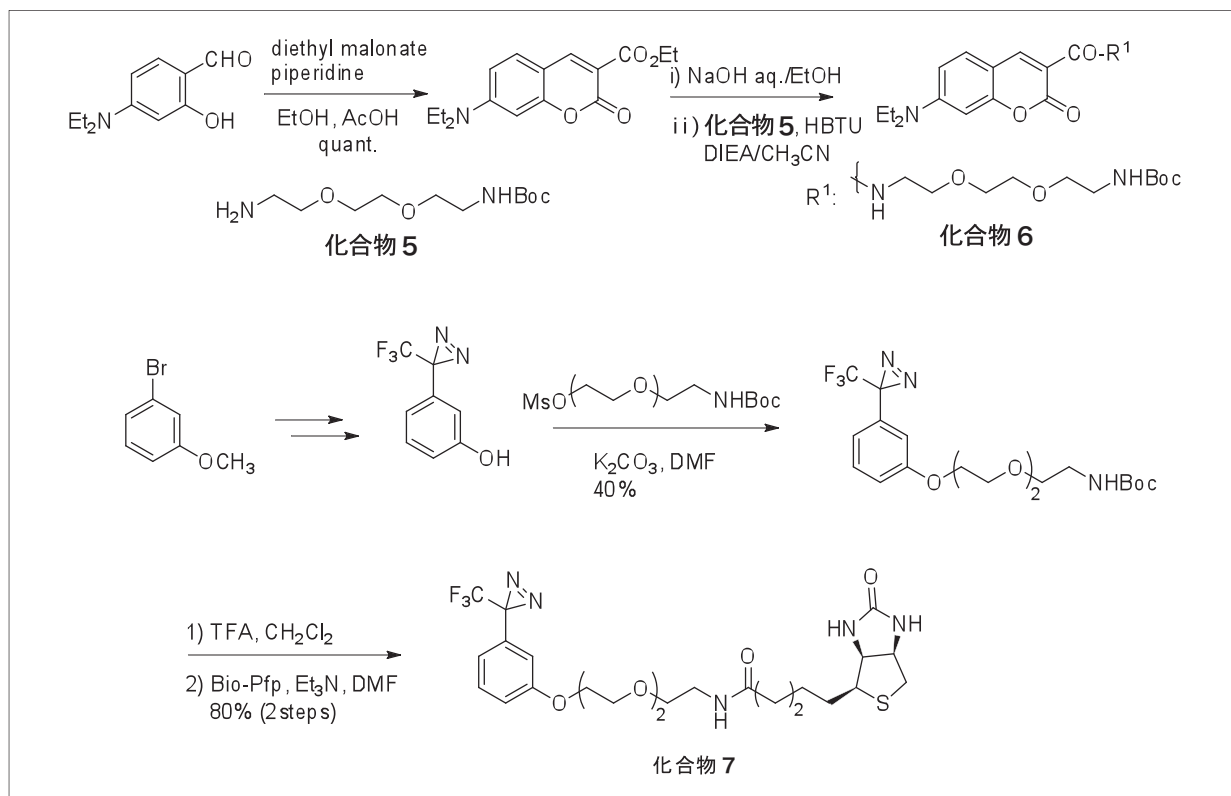


図 4

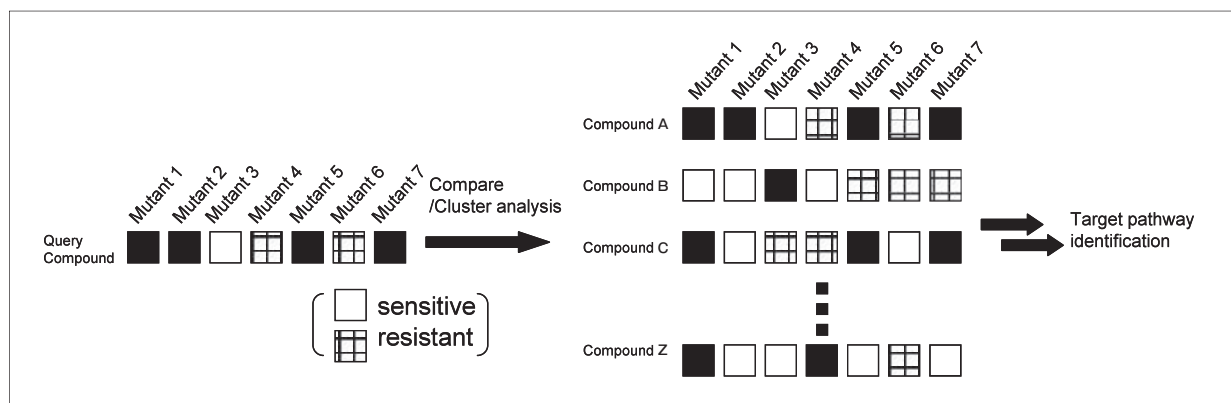


図 5

析用プラットフォームとして本項では、ゲノムワイド出芽酵母株コレクション (DAmP collection: decreased abundance by mRNA perturbation collection)⁶⁾のうち、約850株を用いて、感受性試験に適した細胞数、培養時間等を検討した。DAmP株とは、出芽酵母における各必須遺伝子の発現レベルを1/4~1/10に減少させた出芽酵母変異株ライブラリーである。その結果、各被検株を27度で24時間前培養を行い、続いて検体を添加し、さらに24時間培養することで各種薬剤感受性試験が可能となった。例えば、予備的実験

として実施したある化合物においては、850株中約40株において高感受性を示したことから、標的パスウェイ解析が可能になりつつある。

4. 考 察

本研究においては、心筋肥大抑制化合物として見出されたクルクミンの天然資源からの大量供給の代替として、効率の良い合成経路を確立した。さらには、各種縮合に供する多置換ベンズアルデヒド体の合成検討、ならびに縮合反応の適応性を広く検討したところ、様々なモノマータイプ・ダイ

マータイプ等の多くのクルクミン誘導体・類縁化合物を創製することが可能になり、今後のさらなる構造活性相関研究に利用可能である。なお、これらの類縁化合物群の合成経路は、今後の動物実験等に必要な充分量の化合物量を供給可能とした。

さらに、関連化合物の機能性分子プローブ化研究の一環として、化合物の細胞内局在可視化などに利用可能なプローブ(化合物6)や、ビオチンタグと光親和性官能基であるアジリジン基を有する二官能性分子プローブ(化合物7)を合成したことで、関連化合物の細胞内局在や標的タンパク質の探索・同定研究が可能となった。

近年、クルクミンの生体に対する様々な薬効が注目されており、世界中で、基礎研究・応用研究の両面から研究が進められている。クルクミンの作用としては、フリーラジカル消去などを介した抗酸化作用や、転写因子NF- κ Bの活性化抑制などを介した抗炎症作用など様々な作用が報告されている^{10,11)}。さらには、クルクミンの心筋細胞肥大抑制活性には、ヒストンアセチル化酵素(Histone acetyltransferase; HAT)活性を持つ転写コアクチベーター p300HATの機能的阻害の関与が報告されているが⁴⁾、クルクミンのp300HATに対する直接的な阻害効果は不明のままである。今後、本研究で得られた化合物群の心肥大抑制活性、p300HAT抑制活性、細胞内局在、作用機序解析、ゲノムワイドなパスウェイ解析等を詳細に解析することで、心不全の新規薬物療法開発に向けた標的タンパク質および複合体の解析研究が進展することが期待できる。

一方、クルクミンは化学構造上、高い脂溶性を有するために経口摂取時には極微量しか体内に吸収されず、吸収率の改善が臨床応用等の今後の最重要課題の一つと考えられている¹²⁾。DDS(drug delivery system)製剤の活用も有効な手段の一つではあるが、本研究で確立したクルクミン類縁化合物群の効率的な合成経路を利用・発展すること

で、バイオアベイラビリティを向上させた高吸収性化合物群の創製が可能となり、今後の発展が期待される。

謝 辞

本研究を遂行する上で、多大なご支援を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団に深謝申し上げます。また、研究遂行にご協力頂きました京都医療センター・長谷川浩二博士ならびに森本達也博士(現・静岡県立大学)に深謝致します。

文 献

- 1) 掛谷秀昭、大石真也、矢倉徹、藤井信孝. 創薬研究における化合物ライブラリー. *インシリコ創薬科学—ゲノム情報から創薬へ—*(藤井信孝, 辻本豪三, 奥野恭史(編)、京都廣川書店)、pp46-63 (2008).
- 2) Newman, D.J. Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311-335 (2012).
- 3) Frey, N., Olson, E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 45-79 (2003).
- 4) Yanazume, T., Morimoto, T., Wada, H., Kawamura, H., Hasegawa, K. Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3593-3606 (2003).
- 5) Morimoto, T., Sunagawa, Y., Kawamura, T., Takaya, T., Wada, H., Nagasawa, A., Komeda, M., Fujita, M., Shimatsu, A., Kita, T., Hasegawa, K. *J. Clin. Invest.* 118, 868-878 (2008).
- 6) Breslow, D.K., Cameron, D.M., Collins, S., Schuldiner, M., Stewart-Ornstein, J., Newman, H.W., Braun, S., Madhani, H. D., Krogan, N. J., Weissman, J.S. A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat. Methods*, 5, 711-718 (2008).
- 7) Hahm E.R., Cheon, G., Lee, J., Kim, B., Park, C., Yang, C.H. New and known symmetrical curcumin derivatives inhibit the formation of Fos-Ju-DNA complex. *Cancer Lett.* 184, 89-96 (2002).
- 8) Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., Yoshida, M. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schiosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24, 841-847 (2006).
- 9) Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Kakeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S., Yoshida, M. *Marin antifungal*

-
- theonellamides target 3 β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat. Chem. Biol.* 6, 519-526 (2010).
- 10) Strimpakos, S.S., Sharma, R.A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid. Redox. Signal.* 10, 511-545 (2008).
- 11) Aggarwal, B.B., Shishoda, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1397-1421 (2006).
- 12) Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A. Aggarwal, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 4, 807-818 (2007).

Food ingredients-oriented chemical biology research

Hideaki Kakeya

Department of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Exploitation of bioactive small molecules from natural sources such as microbial metabolites, medicinal plants, food, and marine invertebrates has contributed to the discovery of lead molecules for drugs as well as research tools on chemical biology. We have discovered several novel bioactive natural products by both *in vivo* cell-based phenotypic screenings and *in vitro* target-oriented screenings, and investigated their modes of action using a chemical genetics or a chemical genomics approach.

In this research, first we set up the screening system for identifying a lead molecule that inhibits the hypertrophic response induced by phenylephrine, α 1-adrenergic receptor antagonist, in primary cardiomyocytes. After our extensive screening, we re-discovered a naturally occurring curcumin from *Curcuma longa* as an inhibitor against hypertrophic responses in primary cultured neonatal rat cardiomyocytes, and established the efficient synthetic route for curcumin and its derivatives via a condensation of a monomer substituted benzaldehyde with acetylacetone. In addition, several functional molecular probes possessing a diethyl aminocoumarin unit or a bifunctional unit comprised of diazirin and biotin tags were designed and synthesized efficiently, in order to analyze a localization of the compounds in cultured cells and mining their target protein(s). These functional molecular probes are also useful for a chemical tagging approach by using 5-sulfonyl tetrazole we have recently established. Moreover we investigated the genome-wide approach by utilizing *Saccharomyces cerevisiae* DAMP (the Decreased abundance by mRNA perturbation) strain library for analyzing the cellular signaling pathway affected by bioactive small molecules.

These results herein would contribute to development of a new lead molecule as well as identification of promising molecular target(s) for treatment of heart failure.