

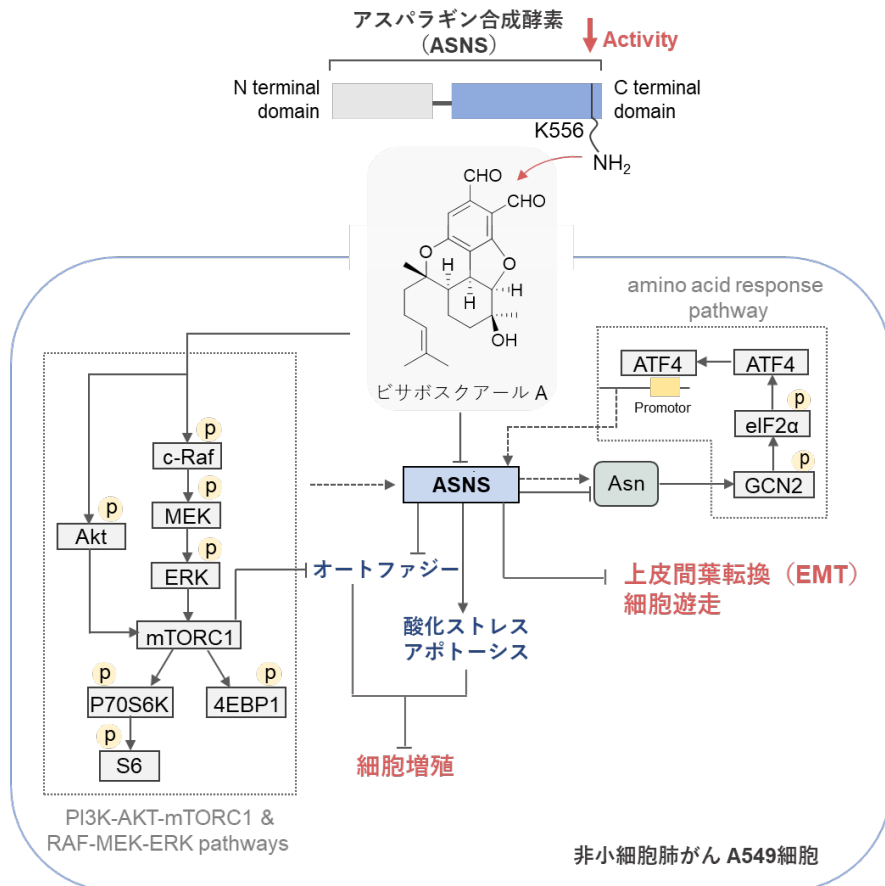
# アスパラギン合成酵素を阻害するビスボスクアール A の発見 —がん代謝特性を標的とする新規抗がん剤の開発に期待—

## 概要

掛谷秀昭 京都大学大学院薬学研究科 教授、Yanjun Pan 同博士後期課程学生、堂前直 理化学研究所環境資源科学研究センター ユニットリーダー、西尾和人 近畿大学医学部 教授、平野秀典 慶應義塾大学大学院理工学研究科 特任准教授らの研究グループは、アスパラギン合成酵素（ASNS）を阻害する微生物代謝産物ビスボスクアール A（Bis A）<sup>1</sup>を見出し、非小細胞肺癌<sup>2</sup>に対する抗がん剤シーズとしての有望性を明らかにしました。

アスパラギン合成酵素（ASNS）は、L-グルタミン（L-Gln）を窒素源として、L-アスパラギン酸（L-Asp）から L-アスパラギン(L-Asn)を生合成する酵素であり、L-Asn の de novo 合成<sup>3</sup>における律速酵素です。ASNS は、肺癌、大腸がん、急性リンパ性白血病などで高発現が報告されており、がんの悪性化・再発や薬剤耐性に寄与する分子標的として注目されていますが、既存の ASNS 阻害剤は低い細胞膜透過性や化学構造の多様性の少なさなどの問題を抱えています。本研究グループは、新規ファーマコホア<sup>4</sup>を有する Bis A を単剤処理あるいは L-アスパラギナーゼ<sup>5</sup>や mTORC1 阻害剤<sup>6</sup>と併用することで、顕著な抗がん活性を示すことを明らかにし、がん代謝特性を標的とする新規抗がん剤開発に繋がること期待されます。

本研究成果は、2023 年 10 月 30 日に「*European Journal of Pharmacology*」のオンライン版に掲載されました。



## 1. 背景

がん細胞は高い栄養要求性があり、L-グルタミン (L-Gln) や L-アスパラギン (L-Asn) などの欠乏は、肺がん、乳がん、白血病細胞、前立腺がんなどの増殖や転移を抑制します。細胞外 L-Asn を低下させる L-アスパラギナーゼ<sup>5</sup> は急性リンパ性白血病 (ALL) の治療薬として承認されていますが、治療に伴う細胞内アスパラギン合成酵素 (ASNS : asparagine synthetase) の発現上昇による耐性が大きな課題になっています。ASNS は、Asn の de novo 合成<sup>3</sup> を担い細胞内タンパク質合成の律速酵素であり、肺がん、前立腺がん、膵がんなどで高発現しており、がん分子標的として非常に注目されています。

ASNS は 561 残基のアミノ酸からなり、N 末側 (1-216) にグルタミナーゼドメイン、C 末側 (217-561) にシンターゼドメインを有しており、基質となる L-アスパラギン酸 (L-Asp) と ATP を反応させ活性な  $\beta$ -aspartyl-AMP 中間体を生成すると同時に、L-Gln の加水分解によって生じたアンモニアと反応させ、四面体型遷移状態を経て L-Asn を生成します (図 1)。これまでに、基質 L-Asp や遷移状態を模倣した阻害剤やプラチナ製剤などが ASNS 阻害剤として報告されていますが、低い細胞膜透過性や化学構造の多様性の少なさなどの問題を抱えています。そこで、本研究は、ASNS を標的とした抗がん剤シーズ開発を目指しました。

## 2. 研究手法・成果

はじめに、ASNS を標的とした治療薬候補を取得するため、組換えヒト ASNS を用いたハイスループット・スクリーニング (HTS) に適した評価系の構築を行いました。続いて、in-house 化合物ライブラリー (独自の天然有機化合物、合成化合物を含む) を用いて HTS を実施した結果、糸状菌スタキボトリス属 RF-7260 が産生するピサボラン型メロテルペノイドであるピサボスクアール A (Bis A)<sup>1</sup> を新規 ASNS 阻害剤として見出しました。LC-MS/MS を用いた in vitro 阻害機構の解析結果により、Bis A は、主に、ASNS の K556 にコバレントに結合し、 $\beta$ -aspartyl-AMP 中間体の生成を抑制することを明らかにしました。Bis A と ASNS からなる複合体の CovDock による in silico 解析の結果、ASNS の K556 周辺の結合ポケットの詳細な情報の取得にも成功しました。

一方、Bis A は、ヒト非小細胞肺がん A549 細胞株に対して、顕著な増殖抑制効果 ( $IC_{50}$ : 1.7  $\mu$ M) を示し、この増殖抑制効果は、Asn の添加により減弱しました。また、細胞サーマルシフトアッセイ (CETSA) により、Bis A は細胞内においても ASNS を標的とすることが強く示唆され、さらに、Bis A は、L-アスパラギナーゼとの併用により相乗効果を示しました。また、Bis A は、酸化ストレスやアポトーシスを惹起すること、細胞遊走や上皮間葉転換 (EMT)<sup>7</sup> などを阻害し、がんの転移・悪性を抑制することを明らかにしました。一方、Bis A 処理した A549 細胞においては、RNAseq データや Western blot 等の詳細な解析により、負のフィードバック経路として PI3K-AKT-mTORC1 経路、GCN2-eIF2a-ATF4 経路 (アミノ酸応答経路) などの活性化が示唆されました。そこで、A549 細胞において、Bis A と mTORC1 阻害剤<sup>6</sup> (ラパマイシン、Torin1) を併用することで、負のフィードバック経路が抑制され、より顕著な増殖抑制効果を発揮できることを明らかにしました。

本研究成果は、ASNS 阻害剤を単剤処理あるいは L-アスパラギナーゼや mTORC1 阻害剤と併用するがん化学療法確立に向けた基盤研究となり、がん特有の代謝特性を標的とする新規抗がん剤開発に繋がることが期待されます。

## 3. 波及効果、今後の予定

本研究成果は、天然物ケミカルバイオロジー研究とがん代謝特性研究などを組み合わせて得られた研

研究成果であり、Bis A の化学構造は、既存の ASNS 阻害剤とは大きく異なり新しいファーマコホア<sup>2</sup>を有しています。Bis A と ASNS との複合体の in silico 解析情報は、今後の Bis A を起点とした新規 ASNS 阻害剤の設計・創製に有用な知見をもたらす、独創性の高い新規抗がん剤の開発に繋がることが期待されます。また、Bis A と L-アスパラギナーゼや mTORC1 阻害剤との併用効果は、今後の ASNS 阻害剤を用いたがん化学療法に福音をもたらすことが期待されます。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、京都大学、理化学研究所、近畿大学、慶應義塾大学との共同研究です。また、科学研究費助成事業（新学術領域研究(研究領域提案型)「化学コミュニケーションのフロンティア」、学術変革研究 A 「天然物が織りなす化合物潜在空間が拓く生物活性分子デザイン」）、日本医療研究開発機構 生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）、日本科学技術振興機構（JST）等の支援を受けて実施されました。

##### <用語解説>

- ※1 ビサボスクアール A (Bisabosqual A: Bis A)：糸状菌スタキボトリス属 RF-7260 株が産生するビスボラン型メロテルペノイド。
- ※2 非小細胞肺癌：肺癌の 8-9 割を占め、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんに分類される。
- ※3 de novo 合成：生物の代謝経路において、ある物質が原料となる別の物質から新しく生合成されること。
- ※4 ファーマコホア：薬剤が薬効を発現するために必要な化学構造。
- ※5 L-アスパラギナーゼ：L-アスパラギンを加水分解して L-アスパラギン酸を生成する酵素。
- ※6 mTORC1 阻害剤：ラパマイシンや Torin 1 など、代謝調節、細胞増殖、オートファジーなど様々な反応を制御する mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) を阻害する薬剤。
- ※7 上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)：上皮細胞がその細胞極性や周囲の細胞との細胞接着機能を失い、遊走・浸潤能を得ることで間葉系様の細胞に変化すること。

##### <論文タイトルと著者>

タイトル：Bisabosqual A: a novel asparagine synthetase inhibitor suppressing the proliferation and migration of human non-small cell lung cancer A549 cells (ビスボスクアール A：ヒト非小細胞肺癌 A549 細胞の増殖・転移を抑制する新規アスパラギン合成酵素阻害剤)

著者：YanJun Pan, Takehiro Suzuki, Kazuko Sakai, Yoshinori Hirano, Hiroaki Ikeda, Akira Hattori, Naoshi Dohmae, Kazuto Nishio, Hideaki Kakeya  
(YanJun Pan, 鈴木健裕, 坂井和子, 平野秀典, 池田拓慧, 服部明, 堂前直, 西尾和人, 掛谷秀昭)

掲載誌：European Journal of Pharmacology. DOI：10.1016/j.ejphar.2023.176156

##### 研究者のコメント

この度、ASNS 阻害剤として新規ファーマコホアを有する微生物代謝産物 Bis A を見出し、非小細胞肺癌細胞に対する抗がん活性を種々検討した結果、Bis A 単剤処理あるいは Bis A を L-アスパラギナーゼや mTORC1 阻害剤と併用することで、顕著な抗がん活性を示すことを明らかにしました。本研究成果が、がんの代謝特性を標的とした革新的な抗がん剤の開発や化学療法の開発に繋がることが期待されています。

< 参考図表 >

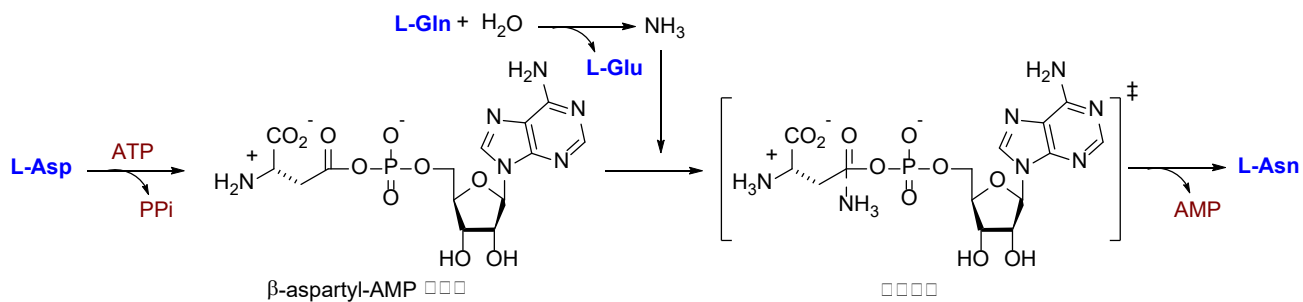


図 1. アスパラギン合成酵素 (ASNS) によるアスパラギン (L-Asn) 生成機構

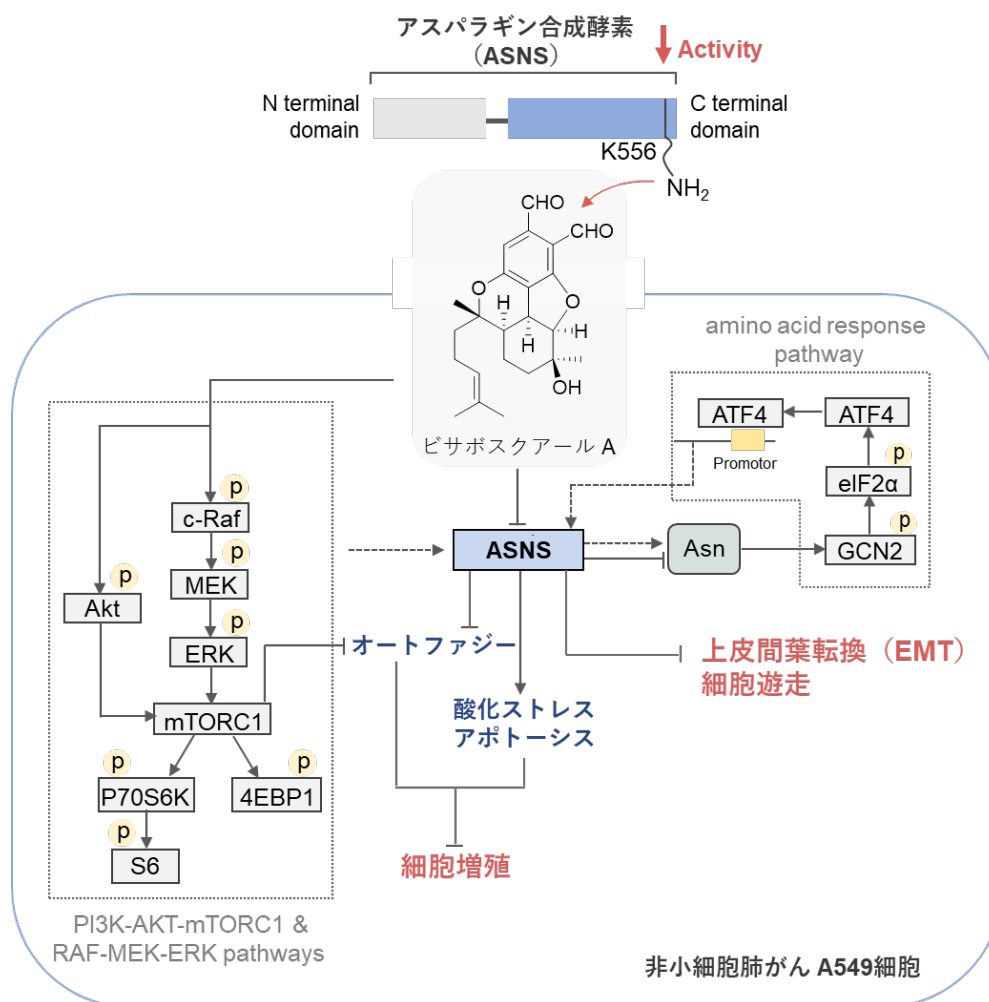


図 2. ビサボスクアール A の ASNS 阻害を介した抗がん活性メカニズムの概要