

Title	がん幹細胞を標的としたアゾキシ天然物のケミカルバイオロジー研究
Sub Title	Chemical biology on azoxy natural products targeting cancer stem cells
Author	齋藤, 駿(Saito, Shun)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2024
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	今年度は、放線菌が生産する熱ショック代謝物 (HSM) として見出したアゾキシ天然物、Dihydromaniwamycin E (DME) のがん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSC) に対する抑制活性の作用機序解析を試みてきた。はじめに、分子プロファイリング支援活動の細胞パネル解析により、DMEの標的タンパク質の候補が複数予測された。そこで、これらの阻害剤のCSCに対する抑制活性を評価したが、DME同様の活性を見出すには至らなかった。続いて、アゾキシ構造を有するDMEの類縁物質が、NF-kBシグナルを阻害することに着目した。本阻害剤についても同様に活性評価を試みたところ、CSCに対する抑制活性を示すことがわかった。そこで、DMEのNF-kBシグナルに与える影響を評価したところ、阻害効果は見られなかった。この原因としては、NF-kBシグナル阻害剤のオフターゲットがCSCの抑制活性において重要である可能性があると考えている。ここまでの解析では、DMEの作用標的を見出すことができなかったため、DMEの標的タンパク質を直接的に同定することを目指すこととした。はじめに、DMEを磁気ビーズへと固定化し、プルダウンアッセイにより解析することとした。構造活性相関解析により、DMEが有する唯一の水酸基が活性に重要でないことが判明していたため、水酸基部分をビーズへと固定化した。尚、固定化後の上清をHPLCにより解析し、DMEがほとんど検出されないことを確認している。続いて、作製した磁気ビーズを使用した種々の条件検討を通じて、DMEに結合することが予想される複数のタンパク質バンドを検出することに成功した。そこで、これらタンパク質バンドを切り出し、LC-MS/MSによる解析を依頼したが、タンパク質濃度の問題で同定するには至らなかった。 This year, we have attempted to analyze the mechanism of action of an azoxy natural product, dihydromaniwamycin E (DME), found as a heat shock metabolite (HSM) produced by actinomycetes, in its inhibitory activity against cancer stem cells (CSCs). First, cell panel analysis by "Support for molecular profiling" predicted several candidate target proteins of DME. We then evaluated the inhibitory activity of these inhibitors against CSCs, but failed to find DME-like activity. Next, we focused on an analog of DME with an azoxy structure that inhibits NF-kB signaling. We attempted to evaluate the activity of this inhibitor in the same way and found that it showed inhibitory activity against CSCs. We then evaluated the effect of DME on NF-kB signaling and found no inhibitory effect. We speculate that this is due to the off-target of this NF-kB signaling inhibitor, which may be important in the inhibitory activity of CSCs. Since we could not find the target of DME in our analysis so far, we decided to aim to directly identify the target protein of DME. First, DME was immobilized on magnetic beads and analyzed by a pull-down assay. Since the structure-activity relationship analysis showed that the only hydroxyl group of DME was not important for the activity, the hydroxyl group was immobilized on the beads. The supernatant after immobilization was analyzed by HPLC, and it was confirmed that almost no DME was detected. Then, through examination of various conditions using the magnetic beads, we succeeded in detecting several protein bands that were expected to bind to DME. We then cut out these protein bands and requested LC-MS/MS analysis, but were unable to identify them due to protein concentration issues.
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20230001-0035

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 福澤基金研究補助研究成果実績報告書

研究代表者	所属	理工学部	職名	助教（有期）	補助額	1,500千円
	氏名	齋藤 駿	氏名（英語）	Shun Saito		
研究課題（日本語）						
がん幹細胞を標的としたアゾキシ天然物のケミカルバイオロジー研究						
研究課題（英訳）						
Chemical biology on azoxy natural products targeting cancer stem cells						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
齋藤 駿（Shun Saito）		理工学部・生命情報学科・助教				
1. 研究成果実績の概要						
今年度は、放線菌が生産する熱ショック代謝物（HSM）として見出したアゾキシ天然物、Dihydromaniwamycin E (DME) のがん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSC) に対する抑制活性の作用機序解析を試みてきた。はじめに、分子プロファイリング支援活動の細胞パネル解析により、DMEの標的タンパク質の候補が複数予測された。そこで、これらの阻害剤のCSCに対する抑制活性を評価したが、DME同様の活性を見出すには至らなかった。続いて、アゾキシ構造を有するDMEの類縁物質が、NF-kBシグナルを阻害することに着目した。本阻害剤についても同様に活性評価を試みたところ、CSCに対する抑制活性を示すことがわかった。そこで、DMEのNF-kBシグナルに与える影響を評価したところ、阻害効果は見られなかった。この原因としては、NF-kBシグナル阻害剤のオフターゲットがCSCの抑制活性において重要である可能性があると考えている。ここまでの解析では、DMEの作用標的を見出すことができなかったため、DMEの標的タンパク質を直接的に同定することを目指すこととした。はじめに、DMEを磁気ビーズへと固定化し、プルダウンアッセイにより解析することとした。構造活性相関解析により、DMEが有する唯一の水酸基が活性に重要でないことが判明していたため、水酸基部分をビーズへと固定化した。尚、固定化後の上清をHPLCにより解析し、DMEがほとんど検出されないことを確認している。続いて、作製した磁気ビーズを使用した種々の条件検討を通じて、DMEに結合することが予想される複数のタンパク質バンドを検出することに成功した。そこで、これらタンパク質バンドを切り出し、LC-MS/MSによる解析を依頼したが、タンパク質濃度の問題で同定するには至らなかった。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
This year, we have attempted to analyze the mechanism of action of an azoxy natural product, dihydromaniwamycin E (DME), found as a heat shock metabolite (HSM) produced by actinomycetes, in its inhibitory activity against cancer stem cells (CSCs). First, cell panel analysis by “Support for molecular profiling” predicted several candidate target proteins of DME. We then evaluated the inhibitory activity of these inhibitors against CSCs, but failed to find DME-like activity. Next, we focused on an analog of DME with an azoxy structure that inhibits NF-kB signaling. We attempted to evaluate the activity of this inhibitor in the same way and found that it showed inhibitory activity against CSCs. We then evaluated the effect of DME on NF-kB signaling and found no inhibitory effect. We speculate that this is due to the off-target of this NF-kB signaling inhibitor, which may be important in the inhibitory activity of CSCs. Since we could not find the target of DME in our analysis so far, we decided to aim to directly identify the target protein of DME. First, DME was immobilized on magnetic beads and analyzed by a pull-down assay. Since the structure-activity relationship analysis showed that the only hydroxyl group of DME was not important for the activity, the hydroxyl group was immobilized on the beads. The supernatant after immobilization was analyzed by HPLC, and it was confirmed that almost no DME was detected. Then, through examination of various conditions using the magnetic beads, we succeeded in detecting several protein bands that were expected to bind to DME. We then cut out these protein bands and requested LC-MS/MS analysis, but were unable to identify them due to protein concentration issues.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 （著者・講演者）	発表課題名 （著書名・演題）				発表学術誌名 （著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月 （著書発行年月・講演年月）
齋藤 駿	未研究放線菌における潜在的代謝能の覚醒化による新規天然物の探索研究				第24回天然薬物の開発と応用シンポジウム （受賞講演）	2023年10月14日

井澤 なのは	耐熱性放線菌 JA74株が生産する熱ショック代謝物 maniwamycin 類のがん幹細胞抑制活性	第24回天然薬物の開発と応用シンポジウム	2023年10月14日
齋藤 駿	微生物が生産する二次代謝物のケミカルバイオロジー研究	第7回天然物化学研究会 (招待講演)	2023年11月17日
齋藤 駿	放線菌が生産する熱ショック代謝物 (HSM) のケミカルバイオロジー	日本農芸化学会2024年度大会 (大会シンポジウム)	2024年3月26日