

機関番号	82626
研究種目	基盤研究(B)
研究期間	2008~2010
課題番号	20380070
研究課題名(和文)	遺伝子修復、組み換え、スプライシングをターゲットとする新規抗癌剤の探索研究
研究課題名(英文)	Studies on screening for bioactive compounds targeting gene repair, recombination and splicing systems.
研究代表者	
新家 一男 (SHINYA KAZUO)	
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・主任研究員	
研究者番号	20251481

研究成果の概要(和文)：癌化学療法における重大な問題の一つは、癌細胞の耐性獲得であり、その一端を遺伝子修復機構が担っており、抗がん剤開発のターゲットとして考えられている。また、修復系以外でも、遺伝子の転写や修飾機も優れた薬剤開発のターゲットであることが示されてきている。本研究では、これらのシステムを容易に検出できるアッセイ系の構築を行い、微生物二次代謝産物をはじめとする天然物より、遺伝子修復等に対する阻害剤を探索し活性物質を見出した。

研究成果の概要(英文)：One of the significant problems about the cancer chemotherapy is the acquisition of resistance to antitumor agents against cancer cells, in which the gene repair mechanisms takes part in. Thus, gene repair system is considered to be the promising molecular target for the development of anti-tumor agents. In addition to repair system, transcription and modification such as splicing system is also shown to be attractive target for cancer chemotherapy.

In this research, we succeeded to construct the good assay systems to monitor gene repair and splicing activities, and also succeeded to discover inhibitors against these activities from natural products including microbial secondary metabolites as the results of wide drug screenings.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：遺伝子修復、遺伝子組み換え、スプライシング、抗がん剤、天然物、スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

癌化学療法における重大な問題の一つは、癌細胞の耐性獲得である。癌細胞の薬剤耐性のよく知られた機構は、P糖タンパク質による薬剤排出であるが、他にも分子シャペロンGRP78の発現亢進やターゲットタンパク質の発現亢進（あるいは減少）など他にも複数の機構により薬剤耐性を獲得している。癌細胞では、癌抑制因子であるp53の変異あるいは脱落していることが多く、遺伝子の安定性が低い。このため、癌細胞は常に遺伝子変異を繰り返しており、周囲へのストレスから逃れるような様々な耐性を獲得する。このように癌細胞では、遺伝子変異が多く発生するため、変異した遺伝子を安定に保つため、また致死的な変異を修復するメカニズムも強く亢進している。

したがって、癌細胞におけるこの修復機構を阻害するような薬剤は、頻繁に遺伝子変異が起こる癌細胞に細胞死を誘導すると共に、癌細胞の抗腫瘍剤、放射線療法への感受性を増大させる、これまでとは全く異なる新しいメカニズムを持った抗腫瘍剤が得られることが期待される。実際に、DNAインターカレーターやシスプラチンなどのDNAアルキル化剤など、多くの抗腫瘍剤は遺伝子に損傷を与えることによって癌細胞に細胞死を誘導しており、修復酵素を阻害することによりその効力が増大することが知られている。

また、最近の研究では遺伝子の修復のみでなく、転写時のスプライシングも細胞の生存に大きく関与していることが報告されて来っており、遺伝子の複製、転写、修飾および修復機構が、優れた薬剤開発のターゲットであることが示されてきている。

このように、遺伝子修復系は優れた癌化学療法の優れたターゲットとなることが期待されるが、DNAの修復過程には様々な因子が関与し、複雑であるが故にアッセイ系の構築は困難であった。特に、スクリーニングのようなハイスループット化が要求される場合には適さないターゲットであると考えられてきた。

一方、微生物二次代謝産物を初めとする天然ライブラリー中には、ヒトが思いつかないような構造を有する多くの化合物が存在し、我が国が世界をリードする学問分野であったと共に薬剤リード化合物のソースとして用いられてきた。しかしながら、近年コンビケムライブラリーにとって代われ衰退の一途を辿っている。これに対し、コンビケムライブラリーからは期待された成果が得られなかったため、欧米では逆に天然物に注目が集まっている。我が国では、近年急速にその貴重な技術と知識が失われつつあり、その維持・継承が急務である。

また、遺伝子の組み換えやスプライシングは、最近の学問的課題であるエピジェネティ

ックスにも深く関与しており、得られた化合物は新しい概念の新規抗癌剤となることが期待されると共に、癌生物学の研究の優れたツールとなると考えられる。このように、本研究により見出された生理活性物質は、学問的にも経済的にも大きく社会貢献することが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、遺伝子の複製、転写、修飾および修復機構を主なターゲットとして、遺伝子組み換えおよびスプライシング等を、簡便かつ迅速に検出方法を確認すると共に、遺伝子修復およびスプライシングを制御する化合物を、多くの二次代謝産物を生産する微生物を初めとした天然よりスクリーニングすることを目的とするものである。

我々は、放線菌・カビの培養代謝産物、あるいは単離天然化合物からなる約10万サンプル以上のインハウス天然物ライブラリーを保有しているが、このライブラリーを有効活用するためには、ハイスループットなアッセイ系の構築が必須である。そこで、本研究では、まず遺伝子の複製、転写、修飾および修復機構系を、簡便かつ迅速に生物活性評価を可能にするため、蛍光あるいは発光を応用した、スクリーニング系の構築を行うことをまずはじめの研究目的とする。

遺伝子の複製、転写、修飾および修復を阻害、制御する物質の探索を行うことを目的に、以上のようなハイスループットスクリーニング系を複数構築し、3~10万サンプルからなる天然物ライブラリーを用いて、活性物質の取得を行う。これらの化合物に関して、単離・精製、構造決定を行い、活性発現メカニズムの解析を含めた、詳細な生物活性を検討する。

以上の研究を通じて、抗がん剤のリード化合物の創製、あるいは遺伝子の複製、転写、修飾および修復機構を解明するための、低分子ツールの創製を目指す。

## 3. 研究の方法

遺伝子修復系の最も中心的な役割を担う、相同組み換え機構、および非同源組み換え機構に注目し、ハイスループットスクリーニング系の構築を行う。アッセイ系のアイディアの基となる論理は、相同組み換えが無い場合は不完全な遺伝子しか発現しないプラスミドを導入しておき、細胞内で相同組み換えが起きた際に、完全長の一つの遺伝子に置き換わることを応用したものである。この時、完全長になる遺伝子として蛍光タンパク質やルシフェラーゼ遺伝子を用いることにより、相同組み換え反応を容易に可視化できる。

図1および2に、ホタルルシフェラーゼを用いた具体的を示す。

ホタルルシフェラーゼ遺伝子

550 aa

\*1 \*2\*3

\*1(288aa)  
 ATTCAAAGTGCCTGCTGGTGTAGGAGCGCTGCTGCTGGTGCCAAACCCATT  
 TAAGTTTCACGCGACGACCCATCCTCGCGACGACGACCCCGGTTGGGATAA

Eco 47III site

\*2(415aa)  
 AACGCTTGATTGACAAGGATTAGGAGCGCTTGACAAGGATGGATGGCTACA  
 TTGCGGAACAACTGTTCTTAATCCTCGCGAAGCTGTTCTACCTACCGATGT

\*3(437aa)  
 CACTTCTTCATCGTTGACCGCTAGGAGCGCTCGTTGACCGCCTGAAGTCTCT  
 GTGAAGAAGTAGCAACTGGCGATCCTCGCGAGCAACTGGCGGACTTCAGAGA

図 1. ホタルルシフェラーゼ遺伝子の配列中に挿入した相同組換え配列

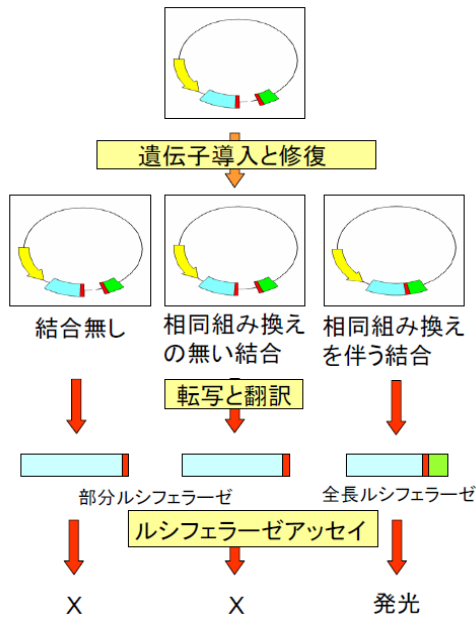


図 2. 相同組換えによるルシフェラーゼ発現機構

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を途中で分断し、それぞれの分断したサイトに相同組み換えを起こすような配列を導入しておく。このプラスミドを細胞にトランスフェクションする。癌細胞では、rad51 や rad54 と言った、相同組み換え酵素により、遺伝子修復を促進する系が亢進しているため、高頻度に組み換えが起き、完全長ルシフェラーゼが産生される。本系では、相同組み換え率をルシフェラーゼ活性で観察することが可能である。

次に、遺伝子スプライシングの可視的検出であるが、これもルシフェラーゼ遺伝子を分断し、前述の相同配列の代わりにスプライシング配列を導入することにより、スクリーニ

ング系の構築が可能である。この場合は、スプライシングが起きずに全長ルシフェラーゼが転写されてしまった場合でも、フレームシフトが起きなければ活性を発現しないコンストラクトにしておくことが必須である。

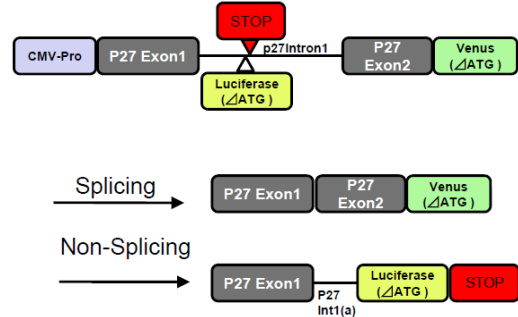


図 3. p27 スプライシング活性検出コンストラクトと検出原理

これらのアッセイ系に関して、構築したアッセイ系から順にスクリーニングを行う。スクリーニングサンプルとして、放線菌およびカビから調製したサンプル約 3~10 万サンプルを用いて、ハイスループットスクリーニングを行う。

スクリーニングでヒットが得られた場合、該当する菌株を培養し、活性物質の単離・精製を行い、NMRおよびMSスペクトルを主な分析機器として用いて構造の同定を行う。

得られた活性物質に関して、スクリーニング系での生物評価を行い、他のレポーターアッセイ系に対する効果を観察し、選択性および活性の強さ等を検討する。また、Western blottingなど幾つかの生物評価系を用いて、活性発現メカニズムの解析を行う。また、必要に応じて、動物レベルでの抗腫瘍活性を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 相同組換え阻害剤スクリーニング

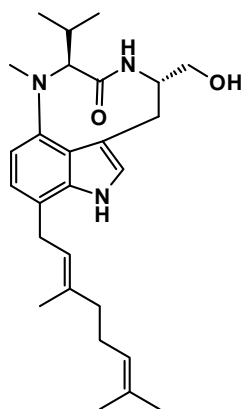
遺伝子導入効率の良いHEK293細胞を用いて、組み換え修復が起こることにより全長ルシフェラーゼが発現するレポーターアッセイ系の構築を行った。その結果、十分な組換えが細胞内で起きていることが確認でき、ハイスループットに相同組換えを検出する系の構築に成功した。本系を用いて、約6万ライブラリーについてスクリーニングを行った結果、72個のヒットを得た。これらのヒット株のうち、12菌株について活性物質の精製を行った結果、actinomycin類化合物およびadriamycinをはじめとするDNAインターカレーターが活性物質として得られた。また、カビ由来のサンプルからは、illudin M、roridin EおよびT-2-toxinの一連のキノコ毒がヒット化合物として得られた。これらの化合物は

actinomycin同様、RNA合成阻害活性を示し、細胞増殖抑制効果を発現することが近年報告されていることから、DNAインターカレーター様活性により、相同組換え阻害活性を発現していると考えられる。さらにスクリーニングを継続した結果、上記のヒット化合物以外に、beauvericin、antimycin類、leucinostatin A、BおよびB2を見出した。これらの化合物は、IGF-1産生阻害活性など他の活性機序が報告されているが、ミトコンドリア呼吸系あるいはタンパク質合成系に作用する化合物であることから、相同組み換え特異的な阻害活性ではないと判断した。

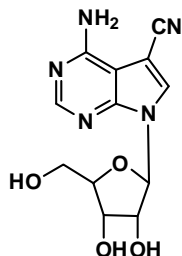
## (2) スプライシング阻害剤スクリーニング

がん抑制遺伝子 p27 は、通常スプライシングを受け不安定な形で発現する。スプライシングを阻害することにより、安定な p27 の発現が促進され癌細胞に対し細胞毒性を示す。本スクリーニングを展開するため、スプライシングが阻害された際に全長ルシフェラーゼが発現するレポータープラスミドを導入した、stable transformant を作製した。本細胞は、通常状態ではルシフェラーゼが発現していないが、スプライシングを阻害するとルシフェラーゼが強く誘導されることを確認した。スプライシング阻害活性を検出する系として、p27 のスプライシングを指標とする方法は組織染色あるいは Western blotting を用いた方法が既に報告されているが、細胞内では通常状態の一部スプライシング阻害が起きており、ルシフェラーゼをレポーターとして用いるような高感度なシステムでは、「漏れ」によるバックグラウンドが高く出てしまい、ハイスループット化は達成できていなかった。

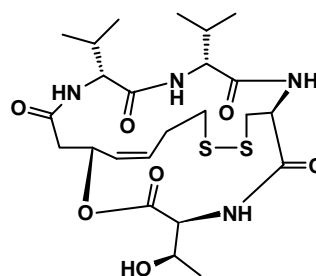
本系を用いて、約 10 万ライブラリーについてスプライシング阻害剤のスクリーニングを行った結果、下記に示す化合物を活性物質として見出した。



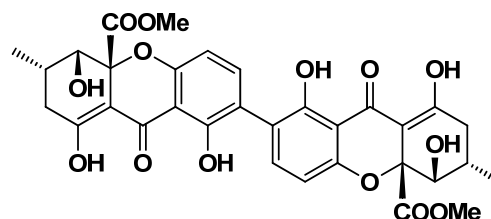
7-Geranylindolactam-V



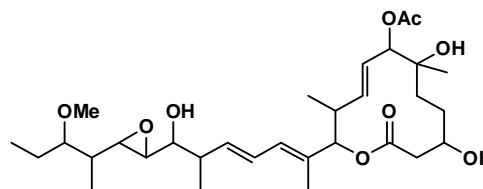
Toyocamycin



FR901375



Secalonic acid A



FD-895

これらの化合物のうち、FR901375 は、HDAC 阻害剤として知られており、非選択的に多くの遺伝子の発現を誘導する。本スクリーニングでヒット化合物として得られたのは、通常状態で起きている一部のスプライシング阻害活性により発現するルシフェラーゼを非選択的に発現促進したためと考えられる。本化合物は、10  $\mu$ M の濃度で 47 倍までルシフェラーゼの発現を誘導した（バックグラウンドのルシフェラーゼ発現量を 1 とする）。

また、発がんプロモーター teleocidin 誘導体である 7-geranylindolactam-V に関しては、細胞増殖促進活性を示すと考えられ、ルシフェラーゼ誘導活性よりも、むしろ細胞数が増殖した結果、総ルシフェラーゼ活性が増加したためヒット化合物として得られたと考えられる（50  $\mu$ M の濃度で 23 倍）。

核酸誘導体である toyocamycin は（12  $\mu$ M の濃度で 13 倍）、代謝拮抗型の抗腫瘍活性を示す化合物として知られている。今回、本スクリーニング系にて得られた結果から、代謝拮抗阻害の他にスプライシング阻害活性が抗腫瘍活性の作用機序の一因として作用する興味ある結果が得られた。

マイコトキシンとして知られる secalonic acid を活性物質は（50  $\mu$ M の濃度で 43 倍）、転写因子の DNA 結合阻害という報告されてい

る。この阻害メカニズムでは、スプライシング阻害活性は説明できないことから、さらに詳細な作用機作解析が期待される。

12員環マクロライドであるFD-895は、抗菌活性などは示さず細胞毒性のみを特異的に発現する化合物として報告されていたが、その作用メカニズムは不明なままであった。

FD-895は、現在臨床開発が進められているpladienolideと極めて構造が類似している。この構造の類似性と、今回本スクリーニングでFD-895が、活性を示したことから、FD-895の細胞毒性発現メカニズムは、スプライシング阻害活性によるものであることを明らかにすることが出来た。がん抑制遺伝子p27のスプライシング阻害を指標としたスクリーニングにおいて、FD-895はレポーター遺伝子であるルシフェラーゼを、12  $\mu$ Mの濃度で235倍と言う、極めて強い活性でスプライシングを阻害した。

現在、これらの化合物について、詳細な活性発現メカニズムを解析中である。これらの化合物について、新たな活性発現メカニズムが解明されることにより、新たな抗腫瘍剤開発のための分子標的を見出すこと、またこれらの化合物をリードとした、新たな遺伝子複製、転写、修飾および修復機構をターゲットとする、抗腫瘍剤のリード化合物の創製が期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

- ① Jun-ya Ueda, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. New xanthoquinodine-like compounds, JBIR-97, -98 and -99, obtained from marine sponge-derived fungus *Tritirachium* sp. SpB081112MEf2. *J. Antibiot.*, 63 (10), 615-618 (2010). 査読有り
- ② Keiichiro Motohashi, Motoki Takagi, Hideki Yamamura, Masayuki Hayakawa and Kazuo Shin-ya. A new angucycline and a new butenolide isolated from lichen-derived *Streptomyces* spp. *J. Antibiot.*, 63 (9), 545-548 (2010). 査読有り
- ③ Takeshi Fujiwara, Aya Nagai, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-69, a new peptide metabolite from *Streptomyces* sp. 0G05. *J. Antibiot.*, 63 (2), 95-96 (2010). 査読有り
- ④ Ikuko Kozone, Jun-ya Ueda, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-52, a novel antimycin-like compound, from *Streptomyces* sp. ML55. *J. Antibiot.*, 62 (10), 593-595 (2009). 査読有り
- ⑤ Takeshi Fujiwara, Ji-Hwan Hwang, Akihiko Kanamoto, Hiroshi Nagai, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-44, a new bromotyrosine compound from a marine sponge *Psammaplysilla purpurea*. *J. Antibiot.*, 62 (7), 393-395 (2009). 査読有り
- ⑥ Jun-ya Ueda, Ji-Hwan Hwang, Taira Kato, Atsushi Ochiai, Kunio Isshiki, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-17, a novel trichostatin analogue from *Streptomyces* sp. 26634. *J. Antibiot.*, 62 (5), 283-285 (2009). 査読有り
- ⑦ Ping Zhao, Jun-ya Ueda, Ikuko Kozone, Shuhei Chijiwa, Motoki Takagi, Fumitaka Kudo, Makoto Nishiyama, Kazuo Shin-ya and Tomohisa Kuzuyama. New glycosylated derivatives of versipelostatin, the GRP78/Bip molecular chaperone down-regulator, from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6. *Org. Biomol. Chem.*, 7 (7), 1454-1460 (2009). 査読有り
- ⑧ Keiichiro Motohashi, Ji-Hwan Hwang, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-23 and -24, novel anticancer agents from *Streptomyces* sp. AK-AB27. *Org. Lett.*, 11 (2), 285-288 (2009). 査読有り
- ⑨ Junichi Matsuo, Yoshinori Tsukumo, Junko Sakurai, Satomi Tsukahara, Hae-Ryong Park, Kazuo Shin-ya, Toshiki Watanabe, Takashi Tsuruo and Akihiro Tomida. Preventing the unfolded protein response via aberrant activation of 4E-binding protein 1 by versipelostatin. *Cancer Sci.*, 100 (2), 327-333 (2009). 査読有り
- ⑩ Masayuki Tera, Hiromichi Ishizuka, Motoki Takagi, Masami Suganuma, Kazuo Shin-ya and Kazuo Nagasawa. Macrocyclic hexaoxazoles as sequence- and mode-selective G-quadruplex binders. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47 (30), 5557-5560 (2008). 査読有り

⑪ Miho Izumikawa, Hideki Ukai, Motoki Takagi, Hiroki R. Ueda and Kazuo Shin-ya. JBIR-26, a novel natural compound from *Streptomyces* sp. AK-AH76, regulates mammalian circadian clock. *J. Antibiot.*, 61 (12), 756-758 (2008). 査読有り

⑫ Jun-ya Ueda, Shuhei Chijiwa, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. A novel versipelostatin analogue, versipelostatin F isolated from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6. *J. Antibiot.*, 61 (12), 752-755 (2008). 査読有り

[学会発表] (計8件)

①本橋慶一郎、高木基樹、新家一男、海綿由来の放線菌より単離した新規anthracycline、2010年日本農芸化学会総会、東京、2010年03月28日

②泉川美穂、橋本絢子、広川貴次、杉本聡、加藤平、高木基樹、新家一男、プロテアソーム形成を阻害する化合物JBIR-22に関する研究、2010年日本農芸化学会総会、東京、2010年03月28日

③小曾根郁子、上田純也、高木基樹、新家一男、新規GRP78発現抑制物質JBIR-52に関する研究、2010年日本農芸化学会総会、東京、2010年03月28日

④新家一男、村上秀樹、Hwang Ji-Hwan、関戸好孝、高木基樹、JBIR-23, a novel compound of microbial origin, induces cytotoxicity against malignant mesothelioma cells by tubulin polymerization and apoptosis、8th AACR-JCA Joint meeting、Waikoloa, Hawaii、2010年02月09日

⑤高木基樹、村上秀樹、Hwang Ji-Hwan、関戸好孝、新家一男、JBIR-23, a novel compound of microbial origin, induces cytotoxicity against malignant mesothelioma cells by tubulin polymerization and apoptosis、AACR Cell Death Mechanisms and Cancer Therapy、San Diego、2010年02月03日

⑥本橋慶一郎、Tabrez Shams Khan、小牧久幸、小曾根育子、向井啓、高木基樹、新家一男、新種の*Streptomyces*属から単離された新規化合物に関する研究、天然有機化合物討論会、名古屋、2009年10月8日

⑦Hwang Ji-Hwan、本橋慶一郎、関戸好孝、高木基樹、新家一男、新規化合物JBIR-23の

中皮腫細胞に対する殺細胞活性発現メカニズムに関する報告、2009年日本農芸化学会総会、福岡、2009年03月28日

⑧本橋慶一郎、Hwang Ji-Hwan、関戸好孝、高木基樹、新家一男、中皮腫細胞に対して抗がん活性を示す化合物のスクリーニング、2009年日本農芸化学会総会、福岡、2009年03月28日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新家 一男 (SHINYA KAZUO)

独立行政法人・産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・主任研究員  
研究者番号：20251481