

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580130

研究課題名（和文）ノックアウト酵母コレクションを利用した新規生理活性物質の創製

研究課題名（英文） Drug discovery based on a new biological assay system using  
Yeast knock-out strain collection

研究代表者

川井 悟（KAWAI SATORU）

東京電機大学・理工学部・教授

研究者番号：10328528

研究成果の概要（和文）：

がんなどの化学療法において、多剤排出トランスポーターの過剰発現による多剤耐性化は解決すべき重要な問題である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の多剤耐性化遺伝子（PDR）のネットワークはABC トランスポーターの転写因子およびABC トランスポーター自体をコードしている。本研究では154種のフラボノイド類を合成し、PDR1, PDR3, PDR8, PDR10, PDR11 および PDR16 遺伝子を破壊した出芽酵母を用いて薬剤感受性に基づくスクリーニングを行った。その結果、フッ素原子を導入したフラボノイド類が pdr1D 株に対する特異的増殖抑制活性を有することが明らかとなった。この結果は多剤耐性化メカニズムに対する知見を深めるばかりでなく、がんの化学療法における新しい展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Multidrug resistance (MDR) mediated by broad specificity transporters is one of the most important strategies used by pathogens, including cancer cells, to evade chemotherapy. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a complex pleiotropic drug resistance (PDR) network of genes involved in MDR is composed of the transcriptional regulators which activate expression of the ABC transporters-encoding genes. We have synthesized 154 flavonoids and screened for their antiproliferative activities toward isogenic *S. cerevisiae* strains deleted of PDR1, PDR3, PDR8, PDR10, PDR11, PDR16 and fluorinated flavonoids demonstrated the specific antiproliferative activity toward pdr1D strains. Our results may contribute to a better understanding of the mechanism of MDR. They also provide the indication of the physiological function of MDR transporters and suggest new approaches for cancer chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合 計       |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 3,000,000 | 900,000   | 3,900,000 |
| 2010 年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 2011 年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総 計     | 4,000,000 | 1,200,000 | 5,200,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学，生物生産科学・生物有機化学

キーワード：出芽酵母，フラボノイド，クマリン，合成化学

## 1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法における深刻な問題の一つに、化学構造も作用機序も異なる複数の抗がん剤に対して耐性化するという多剤耐性化が挙げられる。多剤耐性化には数種のメカニズムが知られているが、中でも過剰に発現した薬剤トランスポーターである P-糖タンパク質による抗がん剤の細胞外排出が重要であることが明らかにされている。P-糖タンパク質は、初めて同定された多剤耐性 ABC トランスポーターであり、現在までに約 250 種の多剤耐性 ABC トランスポーターが同定されている。その機能の解明は、がんの化学治療における多剤耐性克服のための重要な課題と位置づけられている。

多剤耐性 ABC トランスポータースーパーファミリーに属するタンパク質の特徴は、Walker A と Walker B とよばれるモチーフである。いずれも ATP との結合、および ATP の加水分解に関与している。ATP 結合/ATP 加水分解する部位と膜貫通領域とのカップリングが輸送機能に必須であり、ATP 結合/ATP 加水分解によるトランスポータータンパク質のコンフォメーション変化が伝達されることにより、物質の膜輸送が駆動、あるいは制御されていることが報告されている。これらのモチーフが生物進化を超えてよく保持されたアミノ酸配列を持つことは、本機構が真核生物細胞の生命維持装置として重要なことを物語っている。

細胞内に移行した薬剤分子は細胞膜近傍でその効果を発揮するが、多剤排出トランスポーターは薬剤分子を細胞外へ排出することで、がん細胞は多剤耐性化する。

さらにこの問題を複雑にしているのが、一種類のトランスポーターであっても化学構造や作用機序の異なる多種多様な薬剤を排出してしまうことにある。一般的な酵素は特定の基質にのみ作用するという基質選択性をもつが多剤排出トランスポーターはその例外であり、きわめて幅広い化合物を基質とする。しかし、その選択性はまったくの無制限ではなく、糖やアミノ酸など細胞にとって有用な物質は排出しない。このように生物学上例外的な性質をもつ多剤排出トランスポーターが、どのような仕組みで薬剤を異物として認識し排除するか理解することはきわめて重要である。これにより多剤排出トランスポーターで排出されない薬剤や多剤排出トランスポーター自体の阻害物質の開発につながるばかりでなく、多剤耐性化により有効性の低下した薬剤に薬効を復活させるなどの応用面での展開も期待されている。また、がん細胞で多剤排出トランスポーターが過剰発現することは、その生合成の調節も多剤耐性化阻害のための標的となりうることを

示している。多剤耐性化阻害物質をスクリーニングするには、多剤排出トランスポーター生合成を含めた多面的評価法の構築が必要である。

従来、多剤排出トランスポーターの活性評価は培養細胞に供試化合物を投与し、このうち細胞膜を透過した供試化合物量を定量することで行われており、これによりマクロライド系抗生物質、アゾール系抗菌薬およびベラパミル等の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル開口抑制剤に多剤排出トランスポーター阻害活性があることが報告されている。しかし、この方法では定量分析のための前処理等が必要であり、多数の化合物や天然資源をスクリーニングするための手法としては適していない。また多剤排出トランスポーター自体の阻害剤なのか、それとも生合成阻害剤なのかの区別も困難である。

このような背景のもと多剤排出トランスポーター阻害物質開発のため、多面的で迅速なスクリーニング法の構築が求められている。本申請では、ヘテロ二倍体出芽酵母のハプロ不全を利用することで標的分子が明確となるスクリーニング法を構築し（図 1）、これをもとにして新規多剤排出トランスポーター阻害物質の創製をはかるものである。

本研究では化合物ライブラリーをスクリーニングのための評価パネルとして出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子破壊株コレクションを用いた。出芽酵母は遺伝学研究が進んでおり、さらにヒトとの間で数千のオルソログ遺伝子があると推定されており、薬剤のターゲット探索と作用メカニズムの解明に適したモデル生物である。実際、FK506 やシクロスポリン A、ラパマイシン、ワートマニンなどは出芽酵母のオルソログタンパク質もターゲットとすることが報告されている。

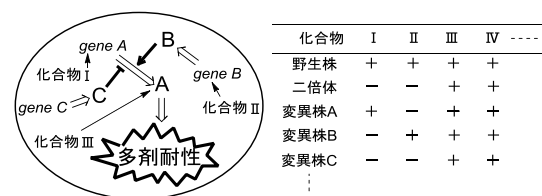


図 1. 遺伝子破壊株による標的分子の同定

## 2. 研究の目的

### (1) 遺伝子変異株による評価パネルの構築と標的分子の同定

*Saccharomyces* Genome Deletion Project により、既知酵母 ORF の 96 % を網羅したノックアウト酵母 (YKO) コレクションが構築さ

れている。これには DNA 修復、細胞周期チェックポイント、エネルギー産生、情報伝達系、多剤耐性など多岐にわたる遺伝子群に関わる 6,000 種以上の YKO 突然変異株が含まれており、酵母ゲノムが発現するタンパク質の機能解析に有用である。

そこで、作用機序が明らかにされている代表的な生物活性化合物について YKO コレクションの各突然変異株に対する感受性を調べる。できるだけ多くの化合物について感受性パターンを解析することで、感受性パターンによる化合物の分類や作用様式、さらには標的分子の同定を試みる。類似の多剤耐性化阻害機構を有する化合物の間では、類似の感受性プロファイルが得られることが期待される。さらに、感受性プロファイルと *S. cerevisiae* の詳細なゲノム情報を組み合わせることで、ある特定の多剤耐性メカニズムについて、関連する一連の遺伝子群が抽出されてくる可能性もある。

このように、作用メカニズム既知の生物活性化合物を用いて、多剤耐性に関与する遺伝子 (すなわち突然変異株) の抽出を試みた後、抽出された変異株の感受性パターンとゲノム情報を精査することで、多剤耐性化に関与する遺伝子の関連づけをはかることとした。さらに、これらの知見をもとにして、新規多剤耐性化阻害物質を検出するための「遺伝子変異株による評価パネル」の構築をはかることを計画した。

## (2) 化合物ライブラリーの構築と感受性プロファイルの解析

本研究の成否は、酵母変異株パネル用の試料とするための化合物ライブラリーの特性に依存していると考えた。すなわち、細胞内における生命現象のメカニズムを解明する研究では、細胞内に存在する多くのタンパク質の機能を調整する必要がある、また無数ともいえる表現型をもたらすための刺激を加える必要がある。このためには多様な化合物を含む多様性指向ライブラリーが有利であると考えられる。したがって、多様な化合物と多様な生理活性を含む化合物ライブラリーの構築を目指すこととした。作用機序が明らかにされている代表的な化合物として、フラボノイド類とクマリン類を中心として、置換基の多様性と共に骨格構造にも多様性を与える反応の設計を行い、多様性指向ライブラリーの構築を試みた。

このような化合物ライブラリーを遺伝子変異株による評価パネルに供することで、新しい多剤耐性化阻害物質の探索を試みることにした。しかし、新規多剤耐性化阻害物質を検出するために、YKO コレクション中のすべての突然変異株を用いて試験することは非現実的である。上記の知見をもとに、同等、

あるいは代替可能な遺伝子を削除し、効率よく活性を検出するための評価パネルの最適化をはかることとした。

## 3. 研究の方法

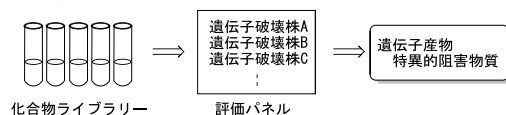
### (1) 評価パネルの構築

出芽酵母の多剤耐性化関連遺伝子 (pdr 遺伝子) として 16 個が明らかにされている。それぞれの遺伝子破壊株 16 株および野生株を評価パネルとして、化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、新規多剤耐性化阻害物質の探索的合成をはかった (図 2 (1))。多様な物質の感受性パターンを解析することで、感受性パターンによる化合物の分類や作用様式、さらには標的分子の同定を試みる。類似の多剤耐性化阻害機構を有する化合物の間では、類似の感受性プロファイルが得られることが期待された。

一方、出芽酵母遺伝子破壊株 (YKO) コレクションの中には、pdr 遺伝子以外にも多剤耐性化に関与する遺伝子が含まれて可能性がある。しかし、すべてを評価パネルに用いるのは非現実的であるため、作用機序の明確な代表的生物活性物質を評価パネルとして YKO コレクションのスクリーニングを行い (図 2 (2))、多剤耐性化に関与する遺伝子の抽出を試みた。感受性プロファイルと *S. cerevisiae* の詳細なゲノム情報を組み合わせることで、これまで明らかにされていなかった多剤耐性化に関連する一連の遺伝子群の抽出を試みた。

薬剤の薬理学的標的分子を同定することができれば、より薬効の高い薬剤の開発や副作用の少ない薬剤の開発につながることから、標的分子の体系的同定法の確立が求められている。本申請で計画している遺伝子破壊二倍体 (ヘテロ二倍体) のハプロ不全を利用した標的分子同定法はこの目的にかなうものであると考えられた。

#### (1) 化合物のスクリーニング



#### (2) 遺伝子破壊株のスクリーニング

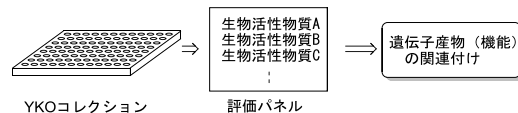


図 2. 評価パネルの構築

ヘテロ二倍体細胞では姉妹染色体のうち一方に変異が起っているが、もう一方の染色体により補われるため増殖可能である。しか

し、ヘテロ二倍体における当該遺伝子産物タンパク質の量はホモ二倍体より少なく、当該タンパク質の阻害物質に対する感受性は高い。一方、当該タンパク質以外の阻害物質に対する感受性についてはホモ二倍体とヘテロ二倍体変異株の間で差異はない。すなわち、ヘテロ二倍体変異株の薬物感受性はホモ二倍体株よりも高く、薬剤添加することによりハプロ不全が表現型として表れることになる。この現象を利用して化合物ライブラリーのスクリーニングを行うことで、特定遺伝子産物に特異的な阻害物質を選抜することが可能となることが期待された（図3）。

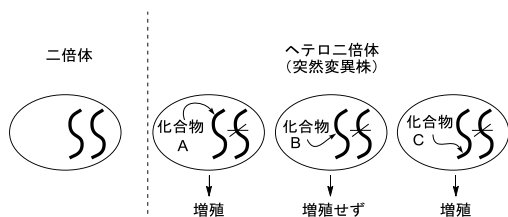


図3. ハプロ不全によるスクリーニング

本研究では、出芽酵母で明らかにされている16個の多剤耐性化遺伝子（pdr 遺伝子）をそれぞれ破壊したヘテロ二倍体変異株16種（比較のためにホモ二倍体と一倍体野生株を加えて）を評価パネルとして化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。すなわち、化合物を野生株に投与した場合に得られる遺伝子発現プロファイルと、当該化合物の標的であるとされる遺伝子の破壊株の発現プロファイルを比較し、その相関性を考慮することで標的分子の同定を試みた。出芽酵母の詳細なゲノム情報を組み合わせることで、薬剤によるハプロ不全を用いたスクリーニング法は、薬物の輸送、代謝または耐性に関わる遺伝子産物も明らかにできると期待される。また、標的となる遺伝子量が減少すると薬剤感受性が増加する現象を利用して標的分子の探索が行われていたという報告もあることより、このような現象についても検証を試みた。

## (2) 化合物ライブラリーの構築

本研究の成否は、酵母変異株パネル用の試料とするための化合物ライブラリーの特性に依存している。生命現象のメカニズムを解明する研究において、標的分子が明らかでない場合には、無数ともいえる表現型をもたらすための刺激を加える必要があるため、多様な化合物を含む多様性指向ライブラリーが有利であると考えられる。

しかし本研究のように、標的分子が明らかな場合には、フォーカスト化合物ライブラリーが用いられる。フォーカスト化合物ライブラリーとは、標的タンパク質への結合能を高

めるために限られた骨格構造を基本として数多くの類縁体を合成することで、化合物ライブラリーの構築をはかるものである。

そこで本研究では、フラボノイド類に ABC トランスポーター阻害活性があるという報告に注目し、フラボノイド類の系統的合成を行うことでフォーカスト化合物ライブラリーの構築をはかった。具体的には、2-ヒドロキシアセトフェノン類と安息香酸類（あるいは各種の芳香族カルボン酸）とのエステルを合成した後に、塩基性条件下で加熱処理を行うことで Baker-Venkataraman 転位を誘導して 1,3-ジケトン類とし、これを酸性条件下で脱水・環化することで各種のフラボノイド類を合成した（図4）。

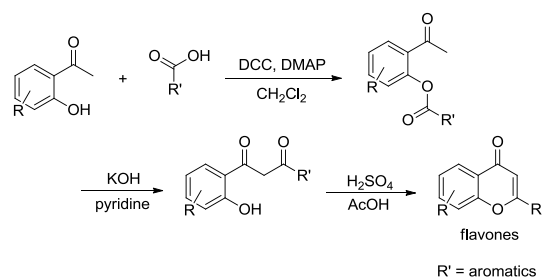


図4. フラボノイド類の合成

同時に本研究では、多様な化合物と多様な生理活性を含む化合物ライブラリーの構築を目指し、化合物ライブラリーを構成する化合物について系統的に多剤耐性化阻害活性を評価する必要があるため、天然資源中の活性物質の探索についても検討を行った。特にキク科リグリア属植物中の化合物の探索を行った。

このようにして作用機序が明らかにされた代表的な化合物を中心として、置換基の多様性と共に骨格構造にも多様性を与える反応の設計を行うことで、多様性指向ライブラリーの構築も試みた。化合物ライブラリーを遺伝子変異株による評価パネルに供することで、新しい多剤耐性化阻害物質の探索的創製をはかった。

## 4. 研究成果

### (1) 効率的ハログノフラボノイド類合成法の確立

研究代表者らによりすでに構築されていたフラボノイド類縁体の化合物ライブラリーについて ABC トランスポーター阻害物質のスクリーニングを行った。当初、この化合物ライブラリーにはポリヒドロキシフラボン類、ポリメトキシフラボン類、ポリメトキシフラバノン類、ポリメトキシフラバノン類を中心とした化合物が含まれていたが、その中で活性を示したのはフラボノイド骨格にハロゲン原子を導入したハログノフラボノイド類であった。しかし当初の化合物ライブラリー

中のハロゲンフラボノイド類の数は少数であったため、ハロゲンフラボノイド類の系統的合成を行った。

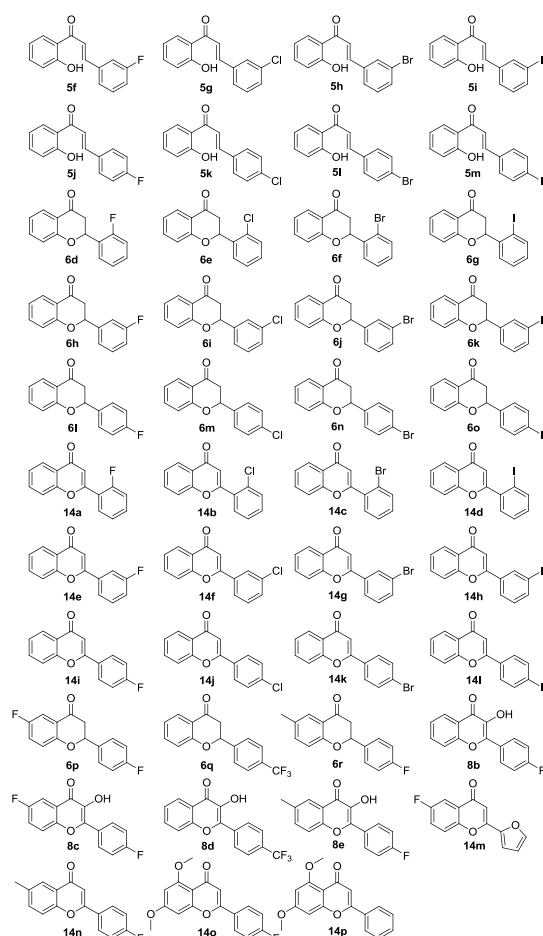


図 5. 合成ハロゲンフラボノイド類 (一部)

当初は Baker-Venkatarman 転位を経由する 1,3-ジケトン類を経由する方法でフラボノイド合成を行っていたが、より効率的なハロゲンフラボノイド類合成をはかるため、カルコン類を合成中間体とし、環化条件を選択することでフラボノイド骨格あるいはフラバノン骨格を選択的に合成する条件を明らかにすることができた。これによりハロゲンフラボノイド類 100 種余りを合成することができた。

## (2) 評価パネルの構築

本研究ではフラボノイド類の他にクマリン類やスチルベノイド類についても合成したり天然資源より抽出したりして、本スクリーニングシステムで評価を行った。本研究では多剤耐性関連遺伝子破壊株である pdr1Δ, pdr3Δ, pdr8Δ, pdr10Δ, pdr11Δ, pdr16Δ, および対照株として野生二倍体株 BY4743 の増殖を比較することで、特定遺伝子破壊株への作用を評価した。その結果、pdr1Δと pdr8Δ

および pdr10Δに対して同時に活性を示すフラボノイド類を見いだすことができ。Pdr1Δと pdr8Δは ABC トランスポーターの転写因子であることが明らかにされており、一方 pdr10Δは ABC トランスポーター自体をコードする遺伝子であることが明らかにされていることから、この知見は評価パネルを構築する上できわめて有用な知見であると考えられる。すなわちすべての遺伝子破壊株を用いてスクリーニングすることは多大な時間と労力を要するため非現実的であるが、このように化合物による感受性をもとにした遺伝子の相互関係が明らかになることで、効率的な評価パネルが構築できると考えられるためである。今後はより詳細な遺伝子間の相互作用を明らかにするため、更なる研究を進めていく必要がある。

## (3) ABC トランスポーター阻害活性を持つフラボノイド類

本研究で選択的阻害活性を示した化合物として 5a, 5b, 5f および 5j をあげることができる (表 1)。

表 1. 薬剤感受性試験結果 (IC<sub>50</sub> / μM)

|        | 5a | 5b | 5f   | 5j   |
|--------|----|----|------|------|
| BY4743 | 25 | 11 | >400 | >400 |
| pdr1Δ  | 7  | 14 | 63   | >400 |
| pdr3Δ  | 34 | 75 | >400 | >400 |
| pdr8Δ  | 25 | 38 | >400 | >400 |
| pdr10Δ | 29 | 80 | >400 | >400 |
| pdr11Δ | 31 | 78 | >400 | >400 |
| pdr16Δ | 33 | 22 | >400 | >400 |

いずれもフッ素原子を導入したフラボノイド類である。フッ素原子は水素原子と原子半径がほとんど変わらないことから、これら 4 種のカルコン類の立体構造に大きな差はないと考えられるため、活性の差は膜タンパク通過時よりも生体内の代謝における反応性の違いに起因するものであると推測される。また、pdr1Δのみに高い活性を示した化合物が明らかになったことは、この遺伝子は薬剤排出タンパクをコードする pdr5Δの転写に関与しているとの報告があることから、興味深い知見である。

## 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 2 件)

① Satoru Kawai, Kotaro Endo, Tetsuo Tokiwano, Yuko Yoshizawa. Relationship between structure and antiproliferative activity of 1-azaflavonones, Anticancer Research, 2012 in press

(<http://www.iar-anticancer.org/>).

② Hiroshi Hirota, Yurie Horiguchi, Satoru Kawai, Chiaki Kuroda, Ryo Hanai, Xun Gong. Four New Bisabolane-type Sesquiterpenes from *Ligularia lankongensis*, *Natural Product Communications*, 2012, 7, 451-454 (<http://www.naturalproduct.us/>).

〔学会発表〕（計 2 件）

① 田島知子, 川井 悟, 常盤野哲生, 中澤伸重, 吉澤結子 フラボノイド関連化合物の合成とノックアウト酵母に対する影響, 日本農芸化学会 2012 年度大会（京都）. 2012 年 3 月 24 日発表

② 倉持晴樹, 潮見あずさ, 山本夕貴, 川井 悟, 常盤野哲生, 中澤 伸重, 吉澤結子 スチルベノイドの合成と遺伝子破壊出芽酵母に対する影響 日本農芸化学会 2012 年度大会（京都）. 2012 年 3 月 24 日発表

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川井 悟 (KAWAI SATORU)  
東京電機大学・理工学部・教授  
研究者番号：10328528

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし