

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 4日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659022

研究課題名（和文）ケミカルゲノミクスを基盤とする活性天然物質の標的分子解析法の確立

研究課題名（英文）Establishment of the methodology for target identification of bioactive natural products based on the chemical genomics

研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI MASAYOSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80311231

研究成果の概要（和文）：cDNA ライブラリー形質転換 HeLa 細胞や次世代シーケンサーを利用して、動物細胞などの真核生物に作用する活性天然物質の標的分子を明らかにする一般性のある方法論の確立を試みた。Topoisomerase I 阻害剤 camptothecin をモデル化合物に、HeLa 細胞の cDNA をランダムに高発現する形質転換細胞から、camptothecin 耐性細胞を選択して、導入されている cDNA を解析する方法の確立に成功した。次世代シーケンサーを使用して、化合物に自然耐性となった HeLa 細胞のゲノム変異を解析する方法論を確立するため、camptothecin 自然耐性 HeLa 細胞の取得を行いこれに成功した。

研究成果の概要（英文）：With the transformants of HeLa cells with cDNA library or the next-generation sequencer, we tried establishment of the general methodology to clarify the target molecules of the bioactive natural products that acts on the eukaryotes such as an animal cells. Using topoisomerase I inhibitor of camptothecin as a model compound, we succeeded in the establishment of the methods, which selects a camptothecin-resistant HeLa cell from the transformants of HeLa cells that over-expressed cDNA randomly, and analyzes the cDNA introduced from the camptothecin-resistant HeLa cell. We also succeeded in the preparation of spontaneous resistant HeLa cells against camptothecin for exhaustively analyzing genetic mutation using a next-generation sequencer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ケミカルジェノミクス、ケミカルバイオロジー、生物活性物質、標的分子

1. 研究開始当初の背景

数多く存在する活性天然物質の標的分子を明らかにすることは、新しい薬剤標的の開

拓や細胞内情報伝達機構を解析するツールとして利用するために非常に重要であるが、現在でも確立された手法はなく、多くの研究

者が多大な時間とエネルギーを費やしている。このため、簡便かつ迅速な標的分子の解析手法を確立することが重要な課題となっている。一方、研究代表者はこれまでに、ゲノム DNA ライブラリーや次世代シーケンサーを利用する、抗菌物質の標的分子解析法を確立してきた。しかしながら、動物細胞などの真核生物に作用する活性天然物質の標的分子を簡便に明らかにする一般性のある方法論は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまでに確立してきた、ゲノム DNA ライブラリーや次世代シーケンサーを利用する抗菌物質の標的分子解析法を、動物細胞などの真核生物に作用する活性天然物質の標的分子解析法へ応用することに挑戦し、汎用性の高い手法に発展させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゲノム DNA ライブラリーを利用する抗菌物質の標的分子解析法の応用：研究代表者はこれまでに、「抗菌物質の標的分子を高発現した形質転換株は、その抗菌物質に対して耐性を示す」という考えのもと、*Mycobacterium* 属細菌とそれに有効な抗菌物質を利用して、ゲノム DNA ライブラリーを利用する抗菌物質の標的分子解析法を確立してきた。すなわち、*M. bovis* BCG のゲノム DNA からゲノム DNA ライブラリーを作成して、これで *M. smegmatis* を形質転換することにより、ランダムに *M. bovis* BCG 遺伝子を高発現する形質転換株を作成した。そしてこの中から、見出した抗菌物質に対して耐性を示す形質転換株をスクリーニングし、その形質転換株に導入されている *M. bovis* BCG のゲノム遺伝子の情報を基に、見出した抗菌物質に対して耐性を付与する遺伝子を明らかにした。

本研究では、前述の手法を動物細胞に作用する活性天然物の標的分子解析に応用するため、がん細胞から cDNA ライブラリーを作成後、これのがん細胞を形質転換することにより、ランダムにがん細胞に発現している遺伝子を高発現する形質転換細胞を作成し、が

ん細胞に対して増殖阻害活性を示す化合物に対して耐性を示す形質転換細胞を選択後、そこに導入されている cDNA 遺伝子を明らかにする方法論の確立に挑戦した。

(2) 次世代シーケンサーを利用する抗菌物質の標的分子解析法の応用：抗菌剤に耐性を獲得した細菌には、抗菌剤の標的分子やその関連分子のゲノム内に変異を有するものが数多く知られている。研究代表者はこれまでに、化合物に対して自然耐性を示す菌株の取得を行い、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子変異の解析を行うことにより、抗菌剤の標的分子を解明することを行ってきた。本研究では、Topoisomerase I を標的分子とする camptothecin をモデル化合物として、これに自然耐性となったがん細胞の取得と次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子変異の解析を試みた。

4. 研究成果

(1) cDNA ライブラリーを利用する細胞増殖阻害物質の標的分子解析法の確立：

使用するがん細胞として、形質転換効率が良い、ヒト子宮頸部がん HeLa 細胞を選択した。またモデル化合物として、topoisomerase I を阻害する camptothecin を用いた。

cDNA ライブラリーは、0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC_{20} 値量) の camptothecin で 12 時間処理した HeLa 細胞から mRNA を取得し、TaKaRa 社の cDNA library construction Kit を利用して、SV40 プロモーターの下流に cDNA が挿入されたライブラリーを作成した。また、作成した cDNA ライブラリーで *Escherichia coli* EZ10 株を形質転換した結果、約 13,000 個のクローンが得られた。そこで次に、作成した cDNA ライブラリーで HeLa 細胞を形質転換し、ランダムに cDNA を一過性発現させた形質転換 HeLa 細胞を作成した。そしてこれを、野生型の HeLa 細胞が死滅する 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の camptothecin で 24 時間処理することにより、camptothecin 耐性細胞を選択し、これら細胞からプラスミドを回収した。そして、回収したプラスミドを使用して、同操作を繰り返し 4 回行うことにより、camptothecin に対して耐性を付与する cDNA を濃縮した。最終的に回収したプラスミ

ドを *E. coli* EZ10株に導入し、約400個の形質転換株を得た。

次に本研究では予試験的に、以下の検討を行った。

① 最終的に得られたプラスミドに topoisomerase I をコードする遺伝子が存在しているか否かを、得られたプラスミドを template にして PCR 法で確認した。しかしながら、得られたプラスミド中には topoisomerase I は見出せなかった。

② 最終的に得られた約400個の形質転換株から4株を無作為に選択し、各プラスミドを抽出後、HeLa細胞に導入した。そして、camptothecinに耐性となるか否かを確認した結果、すべての形質転換細胞が camptothecin耐性となった。また各プラスミドに含まれるcDNAの配列を調べた結果、それぞれ、ubiquitin B、folate receptor 1、TNF receptor-associated protein および HLA class I histocompatibility antigen A-74 alpha chain-like であることが確認された。

Camptothecinは、細胞内のtopoisomerase I とDNAの間で不可逆的な結合を有する複合体を形成し、これが保持されることにより細胞死が誘導される。一方、この複合体を排除するシステムとして、ユビキチン・プロテアソーム経路が知られている。また26Sプロテアソームの高発現細胞が camptothecin に耐性を示すことが報告されていることから、ubiquitin B の高発現により、Camptothecin-Topoisomerase I-DNA複合体の排除が亢進し、camptothecin耐性を示したと予想された。一方、camptothecin と他の3種の遺伝子との関連性を示す報告は現在のところない。しかしながら、これら3種の遺伝子は、受容体またはその基質となるタンパク質をコードしており、これら遺伝子が高発現することにより、細胞内シグナル伝達に変化し、topoisomerase I の発現量や camptothecin の排除システムが亢進することが考えられる。

以上の研究結果から、cDNAライブラリーを利用する細胞増殖阻害物質の標的分子解析法の基盤技術の確立には成功した。しかしながら、最終的に得られた、camptothecin に対して耐性を付与するプラスミド群に、topoisomerase I の存在が確認できなかった

こと、camptothecinの作用メカニズムと関連性が高い遺伝子が検出されなかったことから、cDNAライブラリーの作成法や化合物に対して耐性を付与する遺伝子の選択方法について更に検討が必要であると考えられた。

(2) 次世代シーケンサーを利用する細胞増殖阻害物質の標的分子解析法の確立：

がん細胞としてHeLa細胞を用い、camptothecinに対して自然耐性を示す細胞株の樹立を試みた。

0.02 µg/mL (IC₂₀値量)のcamptothecinでHeLa細胞を24時間処理し、生存していた細胞を、70%コンフレントの状態までcamptothecinを含まない培地で増殖させた。そして再度、camptothecinで処理をした。この操作をcamptothecin濃度を上昇させながら繰り返し行った。その結果、野生型のHeLa細胞が死滅する0.1 µg/mLのcamptothecinで24時間処理した場合にも、75%以上の細胞生存率を示す camptothecin 自然耐性HeLa細胞が得られた。現在、網羅的遺伝子変異解析に向けた準備を進めている。

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3件)

① Pruksakorn P., Arai M., Liu L., Moodley P., Jacobs Jr. W.R., Kobayashi M. Action-mechanism of trichoderin A, an anti-dormant mycobacterial aminolipopeptide from marine sponge-derived *Trichoderma* sp. *Biol. Pharm. Bull.* (2011) 34(8), 1287-1290. 査読有り

② Arai M., Liu L., Fujimoto T., Setiawan A., Kobayashi M. DedA protein relates to action-mechanism of halicyclamine A, a marine spongean macrocyclic alkaloid, as an anti-dormant mycobacterial substance. *Marine Drugs* (2011) 9(6), 984-993. 査読有り

③ 荒井雅吉、小林資正 海洋生物からの医薬シーズ探索 有機合成化学協会誌 68巻 470-479 2010年 査読有り

[学会発表] (計2件)

① 荒井雅吉、Liu Liu、藤本貴男、小林資正 抗潜在性結核物質 halicyclamine A の作

用メカニズム解析—ゲノム DNA ライブラリー
を利用する標的分子の解明— 第 6 1 回日
本薬学会近畿支部総会・大会 2011 年 10 月
22 日 兵庫

② 河内崇志、荒井雅吉、古徳直之、小林資
正 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物
質 furospinosulin-1 の作用メカニズム解析
日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 29 日 静
岡

[その他]

ホームページ等

[http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b
012/](http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI MASAYOSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80311231

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし