

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月13日現在

天然化合物の革新的標的分子同定法の確立とケミカルエピジェネティクス

Development of novel methods for target identification of natural products and chemical epigenetics

課題番号：26221204

吉田 稔 (Yoshida, Minoru)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員



研究の概要

酵母ケミカルゲノミクス、分子バーコード付き shRNA ウイルスライブラリー、二分子発光・蛍光補完法などを駆使して新しい化合物-標的相互作用検出技術を開発し、特異な生理活性を示す天然物の標的分子を迅速、組織的に同定する系を構築する。また、エピジェネティクスに作用する化合物を同定し、作用機構の解明からその制御機構に迫る。

研究分野：境界農学

キーワード：エピジェネティクス、プロテオーム、標的分子

1. 研究開始当初の背景

天然生理活性物質（天然物）には極めて強力の特異的な作用を示す物質が存在する。それらの標的分子と作用機構の解明は、ペニシリンを例に挙げるまでもなく、時として世界を変えるほどのインパクトを生物学に与えてきた。しかし、これまでの個別研究は試行錯誤の繰り返しによるものであり、生理活性物質の標的分子を迅速に同定し、作用機構を解明する効率的な方法論は確立されていない。また、研究代表者らはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤をはじめ、エピジェネティクス制御に重要な因子の阻害剤を見だし、先駆的な研究成果を挙げてきたが、エピジェネティクス研究のさらなる発展には新たな化合物の発見が不可欠となっている。

2. 研究の目的

本研究では、新しい化合物-標的相互作用検出技術を開発し、微生物、海洋生物由来の天然物をはじめ、あらゆる化合物の標的分子を迅速、組織的に同定する系を構築する。それを基盤に未解明の天然物の作用機構を解明すると同時に、エピジェネティクスなど標的分子の機能に迫る。また、合成致死の概念をもとに、疾患原因遺伝子から治療標的遺伝子を同定し、新しい治療戦略を確立する。

3. 研究の方法

バーコードシーケンス、イメージング等を駆使して生理活性物質の標的分子を短時間で確実に決定できる総合システムを開発する。具体的には、分子バーコードが挿入され

た分裂酵母および出芽酵母遺伝子破壊株、プール型 shRNA ウイルスライブラリーを用いた動物細胞における薬剤感受性遺伝子の同定とネットワーク解析、二分子発光または蛍光補完法を使った three-hybrid による化合物-標的間相互作用のスクリーニング系を構築する。このシステムと化合物ビーズを用いた相互作用解析を総合して、迅速に微生物由来、海洋由来天然物の標的分子・作用経路を同定する。また、エピジェネティクス因子に突然変異を有する疾患細胞に対して合成致死を誘導する shRNA を同定し、新たな創薬スクリーニング系を創出する。確立した標的分子決定法とスクリーニング系を用いてこれまで作用機構不明であった天然物の標的分子を決定するとともにエピジェネティクスを中心とした細胞機能を制御しうる新たな化合物を同定する。

4. これまでの成果

(1) 酵母ケミカルゲノミクス

薬剤感受性を高め、多くの化合物に対してケミカルゲノミクス解析が可能となるように、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーには重要な 2 つの薬剤耐性遺伝子の破壊 (*pmd1Δ bfr1Δ*) を導入し、出芽酵母には *pdr1Δ pdr3Δ snq2Δ* の 3 重変異を導入した。すでに遺伝子ネットワークの解析が進んでいる出芽酵母を用い、ネットワークにおいて重要な 310 株の診断株ミニプールの混合培養を用いた高速ケミカルゲノミクス系を構築した。これを用いて理研天然化合物ライブラリー NPDepo の約 10,000 化合物を含め、複

数の化合物ライブラリーの活性物質について作用経路の同定に成功した。

(2) 分子バーコード付きプール型 shRNA を用いた高速スクリーニング

ヒト細胞において化合物感受性に関わる遺伝子を一括して同定するため、分子バーコード付きプール型 shRNA ウイルスライブラリーを作製した。バーコードシーケンシングを行うことにより、化合物処理後に増殖が変化する細胞の shRNA を一括して特定することが可能となった。これを利用し、新規天然物 JBIR-140 や海洋天然物 Aurilide B の作用機構を解析した。また、疾患由来細胞の疾患原因遺伝子との合成致死遺伝子の同定法としての利用を検証するため、解糖系阻害剤 2-deoxyglucose、スプライシング阻害剤 Spliceostatin A に対して合成致死となる遺伝子を探索し、特定した。

(3) 細胞内相互作用検出系

二分子蛍光補完法 (BiFC) による細胞内のタンパク質間相互作用と化合物-タンパク質相互作用の網羅的検出系を検討した。検討の結果、一次スクリーニングとしては、BiFC よりも二分子発光補完法 (NanoBiT) の方が有利であることが判明したため、スクリーニングは NanoBiT で行い、BiFC は検証実験に用いることとした。現在、ヒト cDNA ライブラリーとの融合クローンの取得を進めている。

(4) ケミカルエピジェネティクス

まず、HDAC 阻害剤による抗がん活性の原因を明らかにするため、非ヒストンタンパク質基質を探索したところ、がん細胞の運動性に関わる cortactin を見いだした。Cortactin はアクチン結合タンパク質 Keap1 とともに細胞辺縁部でアクチン再編成を促進するが、アセチル化を受けると cortactin は Keap1 と解離して不活性化されることを明らかにした。そこで cortactin の脱アセチル化に関わる NAD⁺ 依存的脱アセチル化酵素 SIRT2 の阻害剤を探索し、NPDepo より特異的な阻害剤 NPD11033 を同定した。SIRT2 との X 線結晶構造解析を行ったところ、活性中心部位の奥に通常で見られない新たな疎水ポケットが形成され、阻害剤はこの疎水ポケットに入り込んでいた。疎水ポケットの生理的意義を解析した結果、リジン残基が長鎖アシル化されたアシル化基質を脱アシル化するためのものであることが判明した。興味深いことに、NPD11033 は SIRT2 の脱アセチル化活性は強く阻害するが、長鎖脱アシル化活性は全く阻害しなかった。その理由を解析したところ、酵素-阻害剤複合体は、長鎖アシル化基質の存在下では阻害剤が解離し、活性が回復することがわかった。

5. 今後の計画

酵母ケミカルゲノミクス、分子バーコード

付きプール型 shRNA による遺伝子探索、二分子発光または蛍光補完法を用いた細胞内相互作用検出系を完成させるとともに、それらを組み合わせた総合的化合物標的的同定システムを構築する。また、SIRT2 が脱アセチル化・脱アシル化の二重特異性酵素であることが判明したので、その活性制御機構を解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
主な論文発表

1. Vo, T.V., Das, J., Meyer, M.J., Cordero, N.A., Akturk, N., Wei, X., Fair, B.J., Degatano, A.G., Fragoza, R., Liu, L.G., Matsuyama, A., Trickey, M., Horibata, S., Grimson, A., Yamano, H., Yoshida, M., Roth, F.P., Pleiss, J.A., Xia, Y., and *Yu, H. A proteome-wide fission yeast interactome reveals network evolution principles from yeasts to human. *Cell* 164, 310-323 (2016)
2. Ito, A., Shimazu, T., Maeda, S., Shah, A. A., Tsunoda, T., Iemura, S.-I., Natsume, T., Suzuki, T., Motohashi, H., Yamamoto, M., and *Yoshida, M. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci. Signal.* 8, ra120 (2015)
3. Feldman, J.L., Dittenhafer-Reed, K.E., Kudo, N., Thelen, J.N., Ito, A., *Yoshida, M., and *Denu, J.M. Kinetic and structural basis for acyl-group selectivity and NAD(+) dependence in sirtuin-catalyzed deacylation. *Biochemistry* 54, 3037-3050 (2015)
4. Arita, Y., Nishimura, S., Ishitsuka, R., Kishimoto, T., Ikenouchi, J., Ishii, K., Umeda, M., Matsunaga, S., Kobayashi, T., and *Yoshida, M. Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by theonellamides modulates cell membrane order and cell shape. *Chem. Biol.* 22, 604-610 (2015)

受賞等

平成 27 年 6 月 日本学士院賞

平成 29 年 2 月 高松宮妃癌研究基金学術賞

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/chief/chem_genet/

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20151202_1/

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150525_1/