

機関番号：32659

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611017

研究課題名 (和文) 高感受性線虫変異株を用いた高効率な生理活性物質探索システムの開発と応用

研究課題名 (英文) High efficient screening for bioactive compounds using *C. elegans* mutant strains

研究代表者

井上 英史 (INOUE HIDESHI)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：20184765

研究成果の概要 (和文)： 微小動物 (線虫) および、その変異体やトランスジェニック体を使って、種々の化学物質の生物活性を評価し、作用メカニズムを明らかにするための解析を行った。Ras/MAP キナーゼ系の亢進はヒトでは発癌と関連するが、生薬ゴシュユの主成分が線虫の Ras/MAP キナーゼ系を阻害することを見出した。また、カカオ由来プロシアニジン線虫の熱や酸化ストレスに対する抵抗性を亢進し、寿命を延長する。

研究成果の概要 (英文)： Using a small invertebrate, *C. elegans*, and its mutant or transgenic strains, bioactivities of various compounds and the underlying mechanism were investigated. An herbal medicine *Evodia rutaecarpa* and its constituents, evodiamine and rutaecarpine, were found to inhibit Ras/MAP kinase pathway in *C. elegans*. Cacao procyanidines were found to increase thermotolerance, resistibility, reduce oxidative stress, and increase life span.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード： *C. elegans*, 生物活性物質, スクリーニング, 線虫, プロシアニジン, Ras

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発の 2010 年問題が指摘される中、また、公的な化合物ライブラリーの構築が進む中、化合物の生物活性を高効率に評価するシステムが求められる。ハイスループットスクリーニングのほとんどは酵素や細胞を利用した系であり、動物個体を用いたアッセイ

は困難である。また、天然から単離された化合物や合成研究により得られた種々の化合物の中には、量的な制約から十分な生物活性試験が行われていないものが少なくない。特に大学の研究室には、生物活性試験が行われずに眠っている化合物が多く存在する。

線虫 *C.elegans* は、全長 1 mm 程度の小さ

な多細胞生物であるが、生殖組織の他、神経、筋、消化管等の体制をもち、またヒトと共通した遺伝子も多くもつことから、モデル生物として種々化合物の生物活性試験に用いることが可能である。その小ささ故に少量の化合物により、行動や老化などへの効果も含めた個体レベルでの試験が行えることに利点がある。こうしたことから、*C. elegans* を生物活性探索のための一次試験に利用することには価値があると考えられる。また、微生物に準じた扱いが可能なことからハイスループット化も可能である。

こうしたことに加えて、多くの変異株が単離され利用可能であるなど、モデル生物として研究のバックグラウンドが整備されていることは、化合物の作用機構を解析する上での大きな利点となる。またある種の変異体は病態モデルとして捉えることも可能である。

このような背景の中で、*C. elegans* を用いた生物活性試験や化合物ライブラリーのスクリーニングについては海外から報告が出されるようになっていた。しかしながら、投与した化合物が *C. elegans* の体内に取り込まれているかどうかは評価されておらず、スクリーニングの結果には多くの偽陰性が含まれていると考えられる。*C. elegans* を生物活性探索の一次試験に活用するためには改善の余地があると考えられる。

## 2. 研究の目的

線虫 *C. elegans* の野生株、変異株、トランスジェニック株を利用することにより、少量の化合物により種々の生物活性試験を行うシステムを構築する。これを用いて、大学や研究所等で単離された天然化合物や合成された種々の化合物の生物活性を探索することを目的とする。

### (1) 薬剤に対して高感受性化を試みる。

試験化合物の *C. elegans* 体内への取り込みを促進することができれば、偽陰性を減らし、生物活性試験の感度を改善することが可能である。

### (2) 生物活性試験をマニュアル化する。

野生型線虫に試験薬を投与してその効果を見ることは、様々な作用点に対して同時に試験をすることに相当し、何らかの作用を検出する確率は高いと考えられる。しかし、表現型というアウトプットでは効率よく捉えることができて、その薬剤がどこに作用したかについては様々な可能性があり、検討の余地を大きく残す。また、作用によっては熟練者でないと見逃す可能性が高い場合が想定される。

観察点を明確にした試験法・マニュアルを

作成できれば、線虫観察に熟練していない者でも試験薬の効果を検出することが可能である。ある遺伝子の変異により異常な表現型を生じている変異株や、レポーター遺伝子を組み込むことにより特定の遺伝子の発現を検出できるトランスジェニック株を用いれば、観察点は明確となる。このことは同時に、試験薬の作用点についても可能性を絞り込むことができる。

### (3) 化合物について生物活性を評価する。

上記(1)、(2)に記した系を活用し、野生株、変異株、トランスジェニック株をセットにして試験することにより、任意の化合物の生物活性をシステムティックに試験することができる。ここでは研究室に保有する化合物試料、および他の研究室、他の機関から分析以来を受けた化合物試料を用いて、生物活性を試験する。興味深い作用を示すものについてメカニズムを解析する。これらのことを通し、生物学研究に有用なツールとしての化合物や、医薬品開発のリードとなりうる化合物を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験試料

メーカーにより販売されている化合物、生薬、研究室を共にする伊永淑助教（専門は天然物有機化学）が精製した化合物、および共同研究先からアッセイを依頼された化合物を試験対象とした。

### (2) 薬剤排出トランスポーター欠失変異株を用いた生物活性試験の高感度化の試み

薬剤排出トランスポーターのホモログをコードする遺伝子が多数あるが、それらの変異株 11 種を用いて、薬剤高感受性化しているか否かを試験した。

### (3) 変異株、トランスジェニック株を用いたアッセイ系

ras 遺伝子の機能獲得変異体や種々の遺伝子プロモーターの制御のもとに GFP レポーターを発現するトランスジェニック株を CGC (Caenorhabditis Genetic Center) より入手し、種々のアッセイ系を準備した。

### (4) Ras 変異株を用いたアッセイ

ras 遺伝子の機能獲得変異体 *let-60(gf)* は陰門の過形成 Muv を示す。この Muv 表現型を抑える薬剤をスクリーニングした。

### (5) カカオ由来プロシアニジンの生物活性

カカオ・プロシアニジン (PLCr) とそれを分子サイズにより二つに分画した高分子画分と低分子画分を野生型線虫に投与してそ

の作用を見た。また種々の変異株を用いて、作用機構を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 薬剤排出トランスポーター欠失変異株を用いた生物活性試験の高感度化の試み

薬剤排出トランスポーターホモログをコードする遺伝子が欠失している 11 種の線虫株に対して、線虫に対して作用することが知られている化合物、および作用することが期待される化合物を投与してその効果を野生型線虫と比較した。その結果、いくつかの変異株である種の化合物に対する感受性が高くなっていることが見られたが、その差は大きくても数倍程度であり、顕著な高感受性化は見られなかった。大きな差が見られなかった理由としては、線虫に有効であることが知られている化合物を用いたためであることが考えられる。薬剤排出トランスポーターによる細胞外への排出を受けているがために顕著な生物活性を示さない化合物であれば、変異株での強い作用が期待できるものと考えられる。薬剤排出トランスポーター欠失株を生物活性物質のスクリーニングに用いることの有効性は、ある程度の規模の化合物ライブラリーを試験することによって検証する必要がある。

##### (2) 変異株、トランスジェニック株を用いたアッセイ系

野生型線虫の他に、*ras* が機能亢進して異常を示している変異株や、酸化ストレスや熱ストレスにより GFP レポーターを発現するトランスジェニック株などを取り寄せ、種々の化合物（外部機関からの依頼試料を含む）について様々な生物試験を行った。その中で顕著な影響が見られたものについて(3)と(4)に記す。

##### (3) Ras 変異株を用いたアッセイ

線虫の *Ras* をコードする *let-60* 遺伝子の機能獲得変異株に 19 種類の生薬を投与し、陰門過形成 (Muv) 表現型を抑制するものをスクリーニングした。その結果、ゴシユユに Muv 抑制効果が観察された。ゴシユユの主成分として知られている Evodiamine と Rutaecarpine をこの変異線虫に投与したところ、Muv を抑制することが観察された。その作用は、ポジティブコントロールとして用いた gliotoxin (ファルネシルトランスフェラーゼの阻害剤) とほぼ同程度であった。*Ras/Map* キナーゼ・カスケードの下流の転写因子 *lin-1* は機能減弱あるいは機能喪失により Muv 表現型を示す。ゴシユユはこれらの *lin-1* 変異体の Muv は抑制しなかった。また、*ras/Map* キナーゼ・カスケード以外の遺伝子

の変異による Muv 表現型もゴシユユでは抑制されなかった。これらのことは、ゴシユユおよびその主成分である Evodiamine と Rutaecarpine が、*Ras/Map* キナーゼ系あるいは *Ras* の活性発現に必要なファルネシルトランスフェラーゼのいずれかを阻害していることを示唆する。なお、これまでに Evodiamine がある種の癌細胞の増殖を阻害するとの報告はあるものの、*Ras/Map* キナーゼ系を阻害するという報告はない。なお、Evodiamine と Rutaecarpine は図 1 に示すように類縁の化合物であり、共通の骨格をもつ。これまでに両化合物には異なる生物活性が報告されているが、今回の結果ではほとんど活性に差が無く、両化合物に共通した骨格が重要であると考えられる。

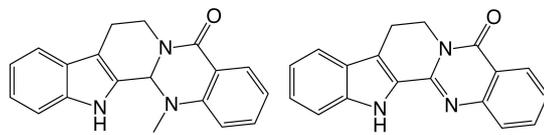


図 1 Evodiamine (左) と Rutaecarpine (右)

##### (4) カカオ由来プロシアニジンの生物活性

カカオ・プロシアニジン (CLPr) を野生型 *C. elegans* に投与したところ、過酸化水素による酸化ストレスを軽減することと熱ストレスに対する抵抗性を亢進することが観察された。また、*C. elegans* の寿命を延長させることが観察された (図 2)。CLPr を分子サイズにより二つに分画したところ、いずれの活性も高分子画分 (4 量体以上) に見られ、低分子画分 (1 ~ 3 量体) の活性は低かった。また、老化の指標として lipofuscin の蓄積や、咽頭の pumping 運動の低下を計測したところ、CLPr がそれらの進行を遅延することが観察され、CLPr が老化を遅らせることが示唆された。

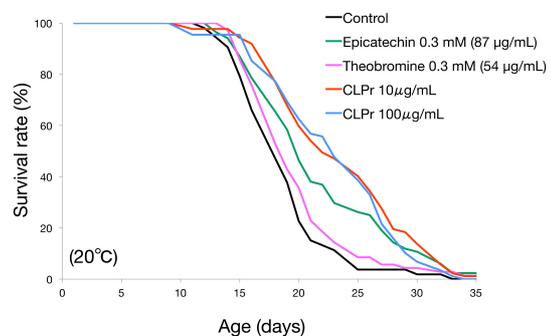


図 2 *C. elegans* の生存曲線

次に CLPr の作用機構を検討するために、

寿命に影響することが知られている種々の遺伝子の変異体に CLPr を投与した。その結果、インスリン様シグナル系の遺伝子の変異体においても CLPr による寿命延長が観察された。またカロリー摂取制限を起こす *eat-2* 変異体に CLPr を投与した場合にも寿命の延長が観察されたことから、CLPr はこれらとは異なるメカニズムで作用していると考えられる。一方、p38 MAP キナーゼ系の上流で機能していることが示唆されている *unc-43* や *osr-1* の欠失変異体においては CLPr による寿命延長が見られなかった。このことから CLPr の作用は、*unc-43* を介した p38 MAP キナーゼ系と関連している可能性が示唆される。

## 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 1 件)

Kashima, K., Sano, K., Yun, Y.S., Ina, H., Kunugi, A., and Inoue, H. (2010) *Chem. Pharm. Bull.* 57 (2) 191-194. Ovafofinin A-E, five new ligands from *Lyonia ovalifolia*. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 野田幸恵, 尹 永淑, 高橋 滋, 高橋勇二, 井上英史, 糖新生に関与する cAMP/CREB 依存的転写を阻害する天然化合物の探索, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山
- ② 神部明日香, 大内真理奈, 豊田美里, 井上英史, 線虫 *C. elegans* を用いた高感受性生理活性物質スクリーニングの検討, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山
- ③ 神部明日香, 夏目みどり, 角 公一郎, 井上英史, カカオ抽出物は線虫 *C. elegans* のストレス抵抗性を増強する, 第 54 回日本薬学会関東支部大会, 2010 年 10 月, 八王子
- ④ 神部明日香, 夏目みどり, 角 公一郎, 井上英史, カカオ抽出物の線虫 *C. elegans* に対する老化抑制効果, 第 15 回日本フードファクター学会, 2010 年 10 月, 仙台
- ⑤ 神部明日香, 雨笠航介, 夏目みどり, 角 公一郎, 井上英史, カカオ抽出物は線虫 *C. elegans* のストレス抵抗性を増し寿命を延ばす, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月, 静岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/~bsci/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 英史 (INOUE HIDESHI)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：20184765