

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 1日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750151

研究課題名（和文） 細胞内で内在性遺伝子の発現を促進する人工転写因子の開発

研究課題名（英文） Development of the artificial transcription factor which promotes endogenous gene expression in cell

研究代表者

下川 浩輝（SHIMOGAWA HIROKI）

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：70447928

研究成果の概要（和文）：

- ①水溶性の向上と低分子化を実現したレンチノロール類縁体の合成に成功した。
 ②転写活性化能を有する化合物 **10** を合成し、ストレプトアビジン-ビオチン系の転写活性化アッセイによってこの化合物をアッセイした。その結果、この系ではこれらの化合物が転写の活性化をしないことがわかった。
 ③デキサメタゾン-コルチコイドレセプター系を用いて、化合物 **10** の転写活性化能を調べた。この系でも化合物 **10** は転写を活性化しない事がわかった。

研究成果の概要（英文）：

- ①The wrencholol analogue was developed, it has improved water solubility and with lower molecule weight.
 ②The compound **10** which reported have transcriptional activation ability was synthesized, and this compound was assayed by transcriptional activation assay using streptavidin-biotin system. As the result, by this system, the compound **10** did not show transcriptional activation ability.
 ③ The transcriptional activation ability of the compound **10** was measured using glucocorticoid receptor-dexamethasone system. By this system, the compound **10** also did not show transcriptional activation ability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：レンチノロール 転写因子 転写活性化 小分子有機化合物 細胞膜透過性 Sur2 アダマンタン

1. 研究開始当初の背景

細胞内での遺伝子の転写は、転写因子と呼ばれる一群の蛋白質によって調節される。転

写因子は通常二つの機能性ドメインを含んでいる。一つは DNA 結合ドメインであり、遺伝子のプロモーターの上流にあるエンハ

ンサーと呼ばれる固有の DNA 配列に結合し、遺伝子発現の特異性に寄与する。もう一方の機能性ドメインである転写活性化ドメインは、コアクチベーターと呼ばれる核内蛋白質に結合し、RNA ポリメラーゼ II による転写を促進する。

申請者は、これまでにコアクチベーターである Sur-2 に結合する小分子有機化合物レンチノロール(1) (Shimogawa et al. 2004. JACS. 126. 3461-3471) を開発しており、レンチノロールの転写活性化ドメイン様の性質を利用して、化合物濃度に依存してレポーター遺伝子の発現を促進させることに成功している (Jung et al. 2009. JACS. 131. 4774-4782)。

さらに、レンチノロールと特異的な DNA 塩基配列を認識することで知られるヘアピンアミドを結合させた人工転写因子 2 を合成した。in vitro の評価系において、この化合物に転写促進活性が見出された (Kwon et al. 2004. JACS. 126. 15940-15941)。

しかし、レンチノロールとヘアピンアミドから成る小分子人工転写因子 2 を細胞外から添加しても、細胞内の遺伝子の発現を促進させることができなかった。

その理由の一つ目は、転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインを併せ持つ化合物を合成すると、水溶性や細胞膜透過性の低下など物性が悪くなることである。二つ目の理由は小分子化合物の転写活性化能が弱いこと。実際、レンチノロールによる転写促進活性はレンチノロールが模倣する内在性の転写活性化因子と比較して弱い。人工転写因子が内在性の遺伝子発現に影響を与えるにはもっと強力な転写促進活性が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

上記の二つの問題点を克服するために本研究では①と②を実践し、細胞内で任意の遺伝子の転写を活性化することができる人工の転写因子を創生する事を研究の目的とした。

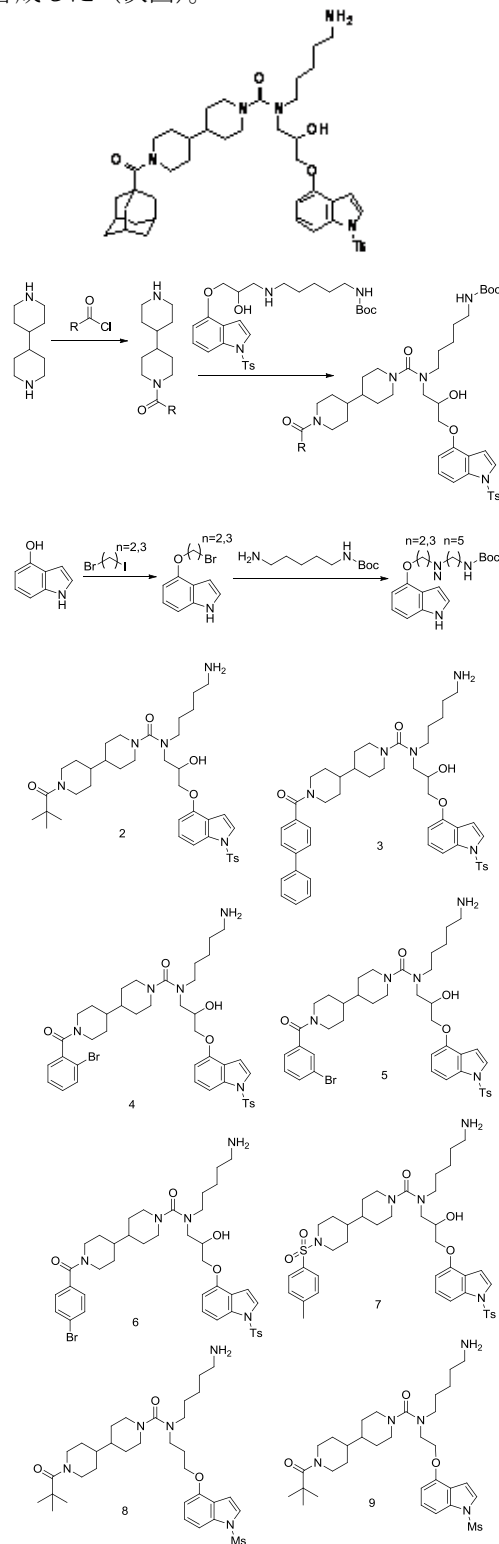
①レンチノロールの類縁体を合成し、転写促進活性と細胞膜透過性を指標とした構造活性相関を調べ、より強い転写促進活性と細胞膜透過性を有するレンチノロール類縁体を開発する。これらの化合物を用いて細胞内で遺伝子の発現を促進させることのできる小分子人工転写因子を創生する。

②生体内では複数の転写因子が協調しあい、その相乗効果によって強い転写活性を示すことが知られており、この相乗効果が化合物でも起きるのではないかと考えた。そこで化合物 3 を合成して、①で開発したレンチノロール類縁体との相乗効果によって転写活性化能を向上させる。

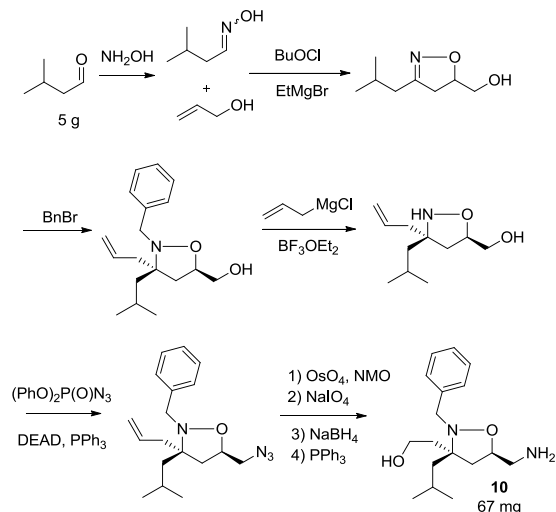
3. 研究の方法

医薬化学の研究においてアダマンチル基の置換による標的選択性や生理活性の上昇が見られた例が報告されている。

そこで、レンチノロール(1) (次図) のアダマンチン部位に焦点を絞って、下記の合成ルートによってレンチノロール類縁体 8 種を合成した (次図)。

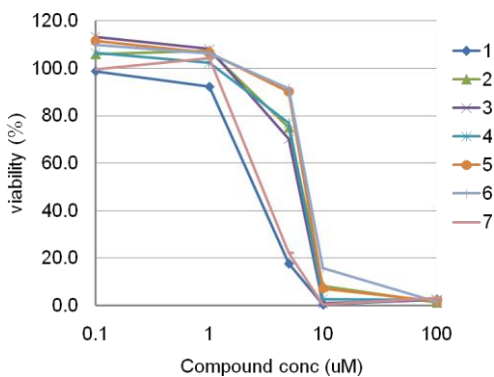


次に、レンチノロールと他グループが開発した転写活性化化合物を組み合わせることで、転写促進活性が増強されるかどうかを調べることを目的として Mapp らが報告したイソキサゾリジン骨格を有する化合物 **10** (Buhrlage et al. 2009, ACS Chem. Biol.) を以下のスキームにより合成した。



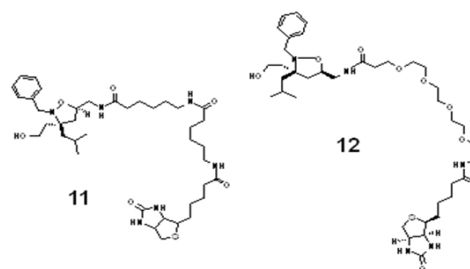
4. 研究成果

合成したレンチノロール類縁体の細胞透過性の指標として、これらの化合物の細胞毒性を測定。化合物 **7** がレンチノロール (**1**) と匹敵するぐらいの高い細胞毒性を有することがわかった。この化合物はレンチノロールに比べて、幾分か低分子化と水溶性の向上が見られたため、今後は化合物 **7** をリード化合物として研究を進めることにした。

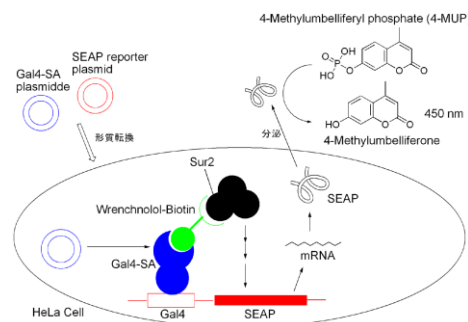


レンチノロール (**1**) および誘導体 **2**~**7** の細胞毒性アッセイの結果。SK-BR3 細胞に 24 時間作用させた後、WST-8 により細胞の生存率を求めた。DMSO 処理細胞の生存率を 100% とした。

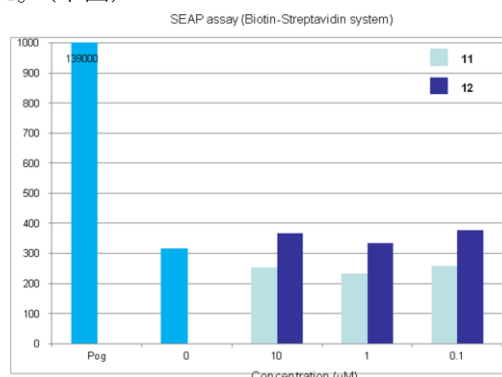
次に、レンチノロールと化合物 **10** との転写活性化の相乗効果を測定するために、化合物 **10** のビオチン結合化合物 **11**, および **12** を合成した。(次図)



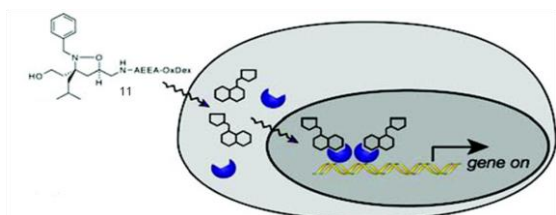
さらに、Gal4-SA plasmid および SEAP reporter plasmid を HeLa 細胞に導入して形質転換した。この細胞を上記化合物で処理すると、細胞内で Gal4-SA と化合物と Sur2 の複合体を形成して SEAP (分泌型アルカリホスファターゼ) を発現するはずである。この状態で 4-Methylumbelliferyl phosphate (4-MUP) を加えると SEAP のアルカリホスファターゼ活性によってリン酸基が加水分解され、450 nm の蛍光を発する 4-Methylumbelliferone を生成する。この蛍光を測定することによって化合物の転写活性化能を測定できる (下図)。



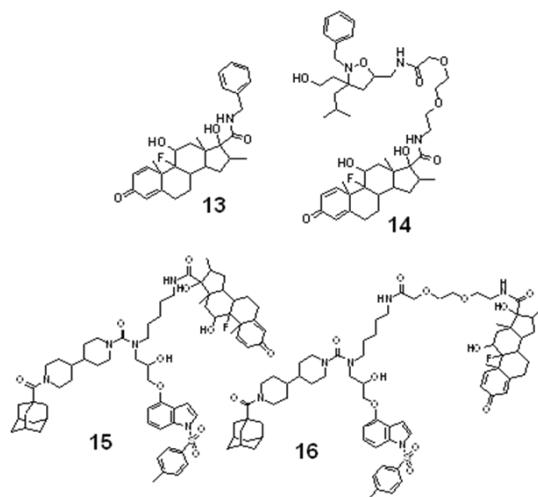
しかしながら、化合物 **11** および **12** は申請者らの構築したストレプトアビジン-ビオチン相互作用を利用した転写活性化アッセイでは転写の活性化を見る事が出来なかった。(下図)



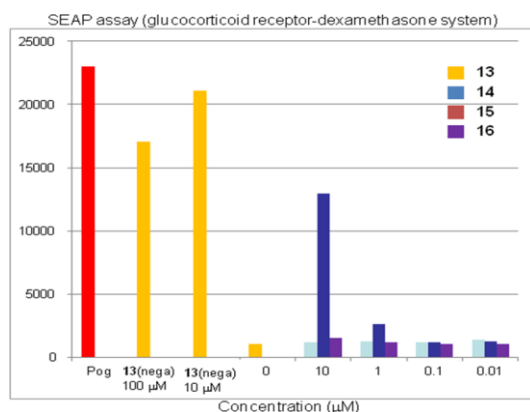
そこで、デキサメタゾン-コルチコイドレセプター相互作用を利用した転写活性化アッセイ系を用いて、レンチノロールおよび化合物 **10** の転写活性化能を調べることにした。(次図)



このアッセイ系を立ち上げるにあたって、さらに化合物 13, 14, 15, 16 を合成した。



合成した化合物の転写活性化能を調べた結果を下記に示す。レンチノロールには転写活性化能を見る事ができたが、論文既知の化合物 10 には残念ながら転写活性化能を見る事が出来なかった。



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 4 件)

① Synthesis and Evaluation of Diaryl Thiazole Derivatives that Inhibit Activation of Sterol Regulatory Element-Binding Proteins.

Kamisuki, S.; Shirakawa, T.; Kugimiya, A.;

Abu-Elheiga, L.; Choo, P. H.; Yamada, K.; Shimogawa, H.; Wakil, J. S.; Uesugi, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 4923-4927. 査読あり
DOI: 10.1021/jm200304y

② A Mitochondrial Surface-Specific Fluorescent Probe Activated by Bioconversion.

Kawazoe, Y.; Shimogawa, H.; Sato, A.; Uesugi, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5478-5481. 査読あり

DOI: 10.1002/anie.201100935

③ Cell-Morphology Profiling of a Natural Product Library Identifies Bisebromoamide and Miuraenamide A as Actin Filament Stabilizers.

Sumiya, E.; Shimogawa, H.; Sasaki, H.; Tsutsumi, M.; Yoshita, K.; Ojika, M.; Suenaga, K.; Uesugi, M.

ACS Chem. Biol. **2011**, *6*, 425-431. 査読あり

DOI: 10.1021/cb1003459

④ Chemical Library Screening Identifies a Small Molecule That Downregulates SOD1 Transcription for Drugs to Treat Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Murakami, G.; Inoue, H.; Tsukita, K.; Asai, Y.; Amagai, Y.; Aiba, K.; Shimogawa, H.; Uesugi, M.; Nakatsuji, N.; Takahashi, R. *Journal of Biomolecular Screening* **2011**, *16*, 405-414. 査読あり

DOI: 10.1177/1087057110397888

[学会発表] (計 5 件)

① 住谷瑛理子・下川浩輝・佐々木宏明・末永聖武・上杉志成

海洋天然物 Bisebromoamide によるアクチン線維の安定化

日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会
2010 年 5 月 18 日 横浜 慶応義塾大学

② 住谷瑛理子・下川浩輝・佐々木宏明・小鹿一・末永聖武・上杉志成

細胞形態変化誘導活性を指標としたアクチン阻害化合物の探索

第 52 回 天然有機化合物討論会

2010 年 9 月 29 日 静岡 静岡県コンベンションアーツセンター

③ 住谷瑛理子・下川浩輝・佐々木宏明・小鹿一・末永聖武・上杉志成

細胞形態変化誘導活性を指標としたアクチン

ン阻害化合物の探索
第 29 回 メディシナルケミストリーシンポ
ジウム
2010 年 11 月 17 日 京都 京都テルサ

④Eriko Sumiya, Hiroki Shimogawa, Hiroaki
Sasaki, Makoto Ojika, Kiyotake Suenaga,
Motonari Uesugi
Morphology-based screening for the
identification of actin-interfering compounds
PACIFICHEM 2010
15 Dec. 2010 Hawaii Hawaii convention
center

⑤下川浩輝
転写を制御する小分子有機化合物
第 130 年会 日本薬学会
一般シンポジウム S31 薬学における有機化
学の原点回帰とこれから
2010 年 3 月 28 日 岡山 岡山大学

〔図書〕(計 1 件)

①下川浩輝 上杉志成 ファルマシア第 23 回
化合物推理ゲーム 2010 年 Vol.46 No.2
179-182

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 浩輝 (SHIMOGAWA HIROKI)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号：70447928