

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 5月 15日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790117

研究課題名（和文）スプライシング阻害化合物 GEX1A の作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Splicing Inhibition Mechanism of GEX1A, An Antitumor Natural Product.

研究代表者

長谷川 慎 (HASEGAWA MAKOTO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：10367899

研究成果の概要（和文）：

GEX1A は、放線菌の代謝物から単離同定された抗腫瘍活性を持つ低分子化合物である。光親和性標識法により GEX1A の標的タンパク質が SAP155 であることを明らかにした。SAP155 は、イントロンを除去するスプライソソーム構成要素の U2snRNP に含まれるタンパク質である。スプライシング反応の進行には、キナーゼである Cdk2 とホスファターゼである PP1 による SAP155 の可逆的なリン酸化制御が必須であることが報告されている。そこで、GEX1A を添加することによるスプライシング反応阻害と SAP155 のリン酸化制御の関連を調べた。その結果、GEX1A の作用により Cdk1 および Cdk2 の不活性化が示唆される結果が得られた。これらの結果と先行研究から、GEX1A の作用と Cdk1 および Cdk2 のキナーゼ活性の関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We reported that antitumor activity of GEX1A (herboxidiene) links to the splicing machinery of the cell. This compound causes cell cycle arrest at the G1 (major period of cell growth) and G2/M (DNA damage checkpoint) phases in different human cell lines. Several factors, including cyclin-kinase inhibitors such as p27, regulate the cyclin-dependent kinases that drive the mammalian cell cycle. GEX1A inhibited the pre-mRNA splicing of p27, leading to accumulation of an aberrant form of p27. By using a series of photoaffinity-labeling derivatives of GEX1A, we found that GEX1A targeted a protein responsible for pre-mRNA splicing. GEX1A serves as a splicing inhibitor that specifically impairs the splicing process of p27 by binding to the splicing machinery associating protein, resulting in inactivation of Cdk1 and Cdk2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：スプライシング・抗癌剤・翻訳後修飾・薬剤反応性・蛋白質

1. 研究開始当初の背景

スプライシングは、真核生物が正確な遺伝子発現をする上で必須のステップである。GEX1A は、協和発酵キリン (株) により放線菌の代謝物から単離・同定された。GEX1A の特徴的な生理活性として細胞周期の停止、レポーター遺伝子など外来遺伝子の転写促進が報告されている。われわれは GEX1A のスプライシング阻害効果を確認したことから、その分子機構を解析し、この化合物を軸にスプライシング阻害に基づく分子標的抗癌剤を創出したいと考えている。

スプライシング反応の場合は 150 以上のタンパク質と 5 種類の RNA からなる核内複合体スプライソームである。スプライソスタチン A およびプラジエノライド B は、スプライソーム中の SF3b に直接作用することが明らかにされている。SF3b は U2snRNP の構成因子であり、SAP155・SAP145・SAP130・SAP49・p14 といったサブユニットからなることが知られている。SF3b はイントロン除去の際に投げ縄状イントロン (ラリアット構造) のブランチ部位に直接的に結合することから、U2snRNP において中心的な機能を果たしているものと考えられる。このようなことから、SF3b とスプライシング阻害剤の関係を分子レベルで明らかにすることは新しい分子標的抗癌剤創出の基盤となりえる。

2. 研究の目的

スプライシング反応阻害剤として 2 化合物がすでに報告されているが、GEX1A の作用メカニズムの違いはわかっていない。そこで本研究は、GEX1A のスプライシング反応阻害メカニズムを明らかにするために受容体を同定した。その結果、スプライシング因子の一つである SAP155 であることが判明した。SAP155 は、mRNA 前駆体からイントロンを除去するスプライソーム構成要素の U2snRNP に含まれるタンパク質である。この蛋白質はリン酸化により活性制御を受けていることが報告されている。キナーゼである Cdk1 と Cdk2、ホスファターゼである PP1 による SAP155 の可逆的なリン酸化制御が必須である。そこで GEX1A による SAP155 のリン酸化状態の変化を解析することで、これらスプライシング阻害剤の抗癌作用メカニズムを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

先行研究で GEX1A の受容体であることが判明した SAP155 は、イントロンを除去するスプライソーム構成要素の U2snRNP に含まれるタンパク質である。そこで細胞から分画した抽出液を用い GEX1A との結合親和性

を、蛍光相関分光法により測定した。

また、SAP155 のリン酸化修飾および他の蛋白質との会合状態に与える GEX1A の効果を検証するために、免疫沈降法で蛋白質複合体を細胞抽出液から分離し、質量分析法およびウェスタンブロッティングによりリン酸化修飾部位を解析した。

4. 研究成果

近年、スプライシング反応を阻害する化合物が見出され、新しい分子標的抗癌剤候補として注目されている。このような化合物は 2 研究機関が独立に 2007 年に報告しており、スプライソスタチン A (理化学研究所) およびプラジエノライド B (エーザイ) と名づけられた (図 1)。これらの化合物は微生物代謝物から同定され、分子量 500 前後で共役ジエンとエポキシ基という共通する化学構造を持つ。本研究は、同様の由来・活性・構造的特徴を持つが、スプライシング阻害効果について未発表の第 3 の化合物 GEX1A を研究対象としている。

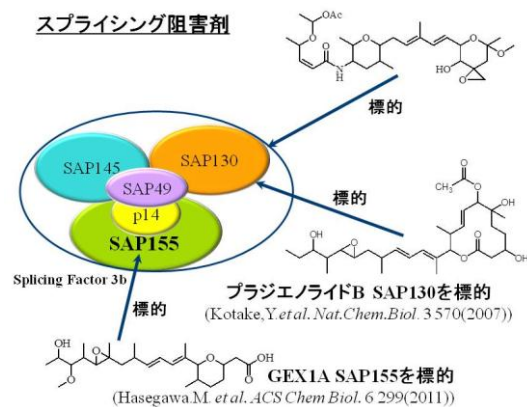


図 1 スプライシング阻害剤のターゲット分子 Splicing Factor 3b (SF3b)

GEX1A のスプライシング因子 SAP155 への分子間相互作用解析を行った。まず Dignam 法を用いて HeLa 細胞の分画を行い、BODIPY-FL により蛍光標識化した GEX1A 誘導体と混合し、蛍光相関分光法 (FCS) を用いて相互作用解析を行った。FCS は、その領域に存在する蛍光分子の蛍光強度の時間変化を測定することにより、溶液内拡散速度を調べる方法である。拡散速度は分子量変化に応じて変化することから、蛍光標識 GEX1A の分子量変化に関する情報を得られ、受容体との結合解離定数の測定が可能である。

細胞質分画においては、蛍光標識 GEX1A の挙動には変化がなく、したがって結合蛋白

質が含まれていないものと考えられた (図 2 (A))。一方、核抽出液を蛍光標識 GEX1A に加えた場合においては、そのみかけの分子サイズが大きく変化し、100MDa 以上の巨大な複合体に取り込まれることがわかった (図 4 (B)および表 1)。また、非蛍光標識 GEX1A を加えることにより蛍光標識体の結合が競合的に阻害された。GEX1A 濃度と結合量の相関から解析した結果、結合解離定数 K_d 値は 59 nM であった。

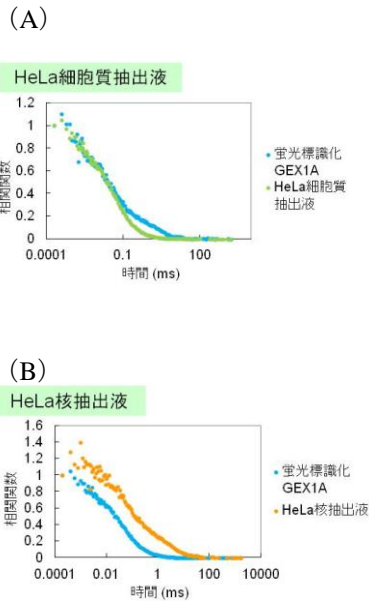


図 2 細胞分画中の蛍光標識 GEX1A の挙動に対する FCS 測定 (自己相関解析) 結果。拡散速度を表わす曲線が核抽出液中でのみ右にシフトしていることから、分子量変化が示唆された。

表 1 FCS 測定から求められた分子量変化

	成分1		成分2	
	拡散時間(ms)	分子量	拡散時間(ms)	分子量
BODIPY-GEX1Aのみ	0.0570	936 Da	検出されず	検出されず
+HeLa核抽出液	0.0570	936 Da	2.8034	111 MDa
+HeLa細胞質抽出液	0.0486	580 Da	検出されず	検出されず

スプライシング反応の進行には、キナーゼである Cdk1 および Cdk2 とホスファターゼである PPI による SAP155 の可逆的なリン酸化制御が必須であることが報告されている。また、SAP155 には多数の Cdk によりリン酸化候補部位が含まれている (図 3)。そこで、これらの酵素群に着目して、GEX1A を添加することによるスプライシング反応阻害と SAP155 のリン酸化制御の関連を調べた。

SAP155 のリン酸化状態を解析するために、SAP155 のリン酸化部位を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロッティング解

析を行った。この抗体は、図 3 に示したリン酸化スレオニン-プロリン (pTP) 配列に反応する。核抽出液に対して、抗 SAP155 抗体および抗 pTP 抗体でウェスタンブロッティングを行った結果を図 4 に示した。リン酸化バンドは、泳動条件により SAP155 主要バンドの上部に分離される。このバンドは抗 pTP 抗体により検出される。そして、このバンドは GEX1A を添加すると 4 時間以内に消失する。このことから、GEX1A により短い作用時間で SAP155 のリン酸化レベルが著しく低下することが示唆された。

SAP155 に対する抗体の免疫沈降物についても、GEX1A によるリン酸化状態の低下は確認された (図 5)。この沈降物について LC-MS によりトリプシン分解物の分子量の違いを解析したが、GEX1A により影響を受けるリン酸化部位の特定にまでは至らなかった。また、共沈降する SAP130 および SAP145 についても、顕著な変化は観察されなかった。

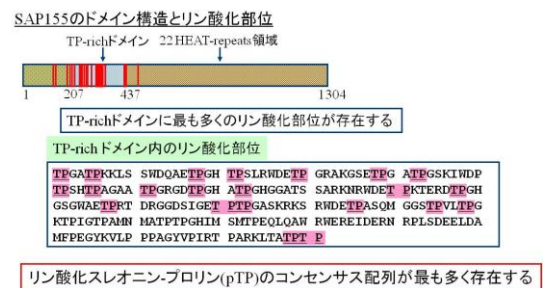


図 3 SAP155 の Cdk リン酸化候補部位

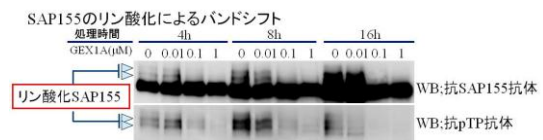


図 4 SAP155 リン酸化の GEX1A による抑制効果

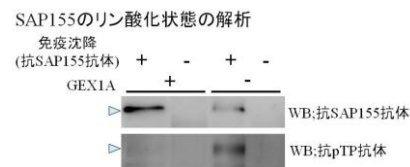


図 5 抗 SAP155 抗体の免疫沈降物のリン酸化状態

次に、GEX1A 添加時に SAP155 のキナーゼである Cdk1 活性をウェスタンブロッティング解析で調べた。Cdk1 は、G1 および S 期においては、脱リン酸化により不活性型となっている。一方、G2 期において Thr14、Tyr15、Thr161 がリン酸化されサイクリン B と会合する。さらに、M 期において Thr14 および Tyr15 が脱リン酸化され、自身のキナーゼ活性が増大する (図 6)。そこで Tyr15 および Thr161 のリン酸化状態を検出する抗体を用いて、Cdk2 の活性化の状態を考察することとした。GEX1A の HeLa 細胞への添加後、細胞抽出液の Cdk1 のリン酸化状態は、上記の 2 か所ともに処理後 16 時間において低下していた。このことから、GEX1A 処理により G1 または S 期に細胞周期が停止したことにより Cdk1 の活性低下が示唆された。一方で、GEX1A 添加後 8 時間以内においては、Cdk1 のリン酸化状態には不活性型 Cdk1 にはあまり変化がみられず、キナーゼ活性を保持していることが示唆された (図 7)。

GEX1A 処理による SAP155 の脱リン酸化は処理後 4 時間以内と、迅速に起こることが観察されている (図 4)。一方、Cdk1 の不活性型の蓄積は、処理後 16 時間後に起こることから、SAP155 のリン酸化を中心的に担っているのは Cdk1 ではないことが示唆された。SAP155 によるスプライシング反応阻害は、C 末端欠損型 p27 の蓄積を引き起こし、まず Cdk2 活性を抑制させることは、先行研究によりすでに報告した (Hasegawa, ACS Chem Biol)。Cdk2 の不活性化により、細胞周期を G1 期に停止が起こり、それに伴って M 期で活性化する Cdk1 活性も抑制される。SAP155 は Cdk2 により主にリン酸化されているものの、Cdk1 も含めた 2 つのキナーゼ活性が抑制されるため、SAP155 の脱リン酸化状態が長時間維持されるものと考えられる。このようなスプライシング反応の阻害維持の作用モデルを図 8 に示す。

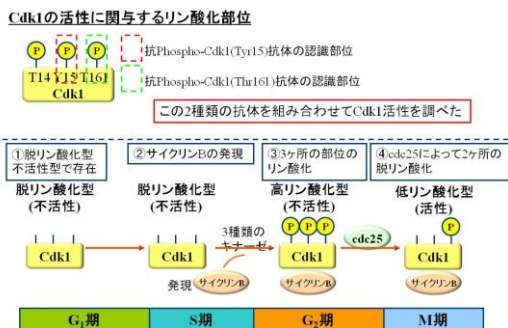


図 6 Cdk1 のリン酸化状態とキナーゼ活性の関係について

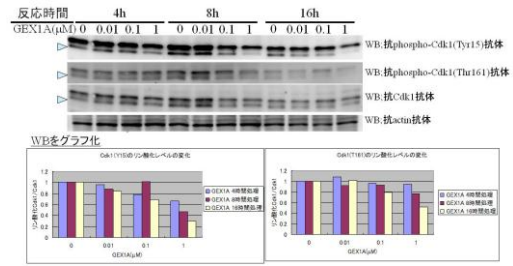


図 7 GEX1A 処理後の Cdk1 のリン酸化状態の変化

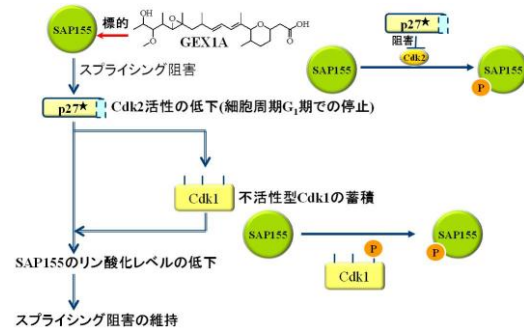


図 8 GEX1A による Cdk1・Cdk2 の不活性化とスプライシング阻害作用の関係

以上の結果を要約する。SAP155 をリン酸化する酵素としては Cdk1 および Cdk2 が考えられる。Cdk2 に関しては、spliceostatin A と同様に GEX1A においても Cdk2 阻害因子 p27 の C 末端欠損型の蓄積を促し、これにより Cdk2 キナーゼ活性が低下し、細胞周期を G1 期及び G2/M 期に停止させる一因となっている。一方、Cdk1 については、GEX1A の作用により不活性化するが、その時間フェイズは遅く、細胞周期の停止に伴って生じていることを示す結果が得られた。このことは、Cdk1 不活性化が GEX1A のスプライシング阻害効果を維持することに寄与している可能性を示唆する。

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 7 件)

Hasegawa, M., Miura, T., Kuzuya, K., Inoue, A., Se Won Ki, Horinouchi, S., Yoshida, T., Kunoh, T., Koseki, K., Mino, K., Sasaki, R., Yoshida, M., and Mizukami, T. "Identification of SAP155 as the Target of GEX1A (Herboxidiene), An Antitumor Natural Product." ACS Chem Biol 18,

229, 2011 (DOI: 10.1021/cb100248e) (査読有)
その他、関連論文 6 件

〔学会発表〕(計 1 件)

棚橋一晃、葛谷晃司、三浦達拓、小坂葉子、
吉田哲郎、吉田稔、佐々木隆造、水上民夫、
長谷川慎「抗腫瘍活性物質 GEX1A の標的タンパク質とそのリン酸化修飾の解析」日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会 2011 年 5 月 23 日東京

〔その他〕

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp> で研究成果を随時公開。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 慎 (HASEGAWA MAKOTO)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
准教授
研究者番号：10367899