

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670045

研究課題名(和文) ヒストン修飾を標的とした天然物の探索とエピジェネシス制御機構解析への応用

研究課題名(英文) Screening study on natural products having effects on histone modification and epigenetic control mechanism

研究代表者

石橋 正己 (Ishibashi, Masami)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90212927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒストン修飾を司るポリコム複合体中心分子BMI1、およびBMI1の発現を制御することが知られているウイント(Wnt)やヘッジホッグ(Hh)シグナルに作用する化合物を見出すことを目的として、天然物を対象としたスクリーニング研究を行った。BMI1プロモーター活性を評価するルシフェラーゼ細胞アッセイシステムを構築し、良好な活性を示す植物種を数種選別した。一方、Wntシグナル阻害作用をもつ天然物として、オオバコ科植物からジテルペン、センダン科植物からリモノイドを単離し、またナス科植物からHhシグナル阻害作用をもつ高度に酸化されたステロイド誘導体を単離した。

研究成果の概要(英文)：This study aims at search for bioactive small molecule from natural resources that have effects on BMI1, which is a key regulatory component of the polycomb repressive complex1 (PRC1) as well as those that act on Wnt and hedgehog signaling pathways, which are known to control the expression of BMI1 molecule. First a cell-based luciferase assay system which assesses the BMI1 promoter activity was constructed, and screening study using this assay system afforded several plant extracts as hit samples. On the other hand, a diterpene from a Plantaginaceous plant and a limonoid from a Meliaceae plant with Wnt signal inhibitory activity were isolated, while a highly oxygenated steroid derivative with hedgehog inhibitory activity was obtained from Solanaceous plant.

研究分野：天然物化学

キーワード：シグナル伝達 生理活性 薬学 生体分子 薬学

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな遺伝子発現制御機構とは、DNA塩基配列の変化を伴わず、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、DNAメチル化などが強調して、遺伝子発現を時間的、空間的に制御する機構である。最近では、正常な幹細胞の自己複製制御や分化、生死に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻が「癌幹細胞」への形質転換につながる可能性が指摘されている。この遺伝子転写制御は核内のクロマチンを構成するヒストンの種々の化学修飾と深く関わっており、このヒストン修飾において重要な役割を果たしているのがポリコーム群 (PcG) タンパク質である。PcG タンパク質は核内で PRC1 や PRC2 という巨大複合体を形成し、ヒストンのメチル化やユビキチン化によりクロマチン構造を凝縮させ転写抑制状態の維持に働く。例えば、癌幹細胞ではこの機構により癌抑制遺伝子の転写が抑制されている。

本研究ではこの転写抑制化に関与する PRC1 複合体の中心分子 Bmi1 に注目し、この分子の働きを低分子化合物によって制御することを目指して、Bmi1 を標的としたスクリーニングを行う。当研究室では、数年来、天然物を主な探索素材として、種々のシグナル伝達分子を標的としたスクリーニング研究を行っているため、本研究課題を遂行する環境は整っている。当研究室で培ってきた天然物スクリーニングに関するノウハウを有効に活用して、ヒストン修飾とエピジェネシス制御という最先端分野に貢献する低分子化合物の創出にチャレンジしたいと考え、本研究課題を提案した。

2. 研究の目的

近年、ヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな転写制御機構が個々の細胞の増殖、分化、生死に大きく関わることが知られて来ている。本研究ではこのような転写制御機構の分子レベルでの解析を目指し、ヒストン修飾とそれを司るポリコーム分子群を標的として天然物および天然物基盤化合物ライブラリーよりスクリーニングを行い、有用な低分子化合物を開拓することを目的とする。とくに本研究では、ポリコーム複合体 PRC1 の中心分子 Bmi 等をスクリーニングの主な対象に取り上げる。また本研究では、天然物探索、細胞アッセイ、細胞応答解析、作用分子機構と標的分子の解明等の一連の包括的研究 (いわゆるケミカルバイオロジー研究) を展開し、それを通して、創薬・生命科学の進展に寄与する高活性低分子化合物の創出を目指す。一方、BMI1 の発現を制御することが知られている Wnt (Wnt) やヘッジホッグ (Hh) シグナルに作用する化合物に関しても天然物を対象としたスクリーニング研究を行う。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング法 (細胞アッセイシステム) の構築: Bmi1 プロモーター活性を評価するルシフェラーゼ細胞アッセイシステムを構築する。

(2) スクリーニングと活性成分の分離: (1) で構築したアッセイシステムを用いて当研究室保有の天然物ライブラリー等を対象としたスクリーニングを行い、ヒットしたサンプルについて活性成分の分離・精製を行う。単離した活性成分に対して、化学構造を解明する。

(3) 作用発現分子機構の解析: (2) で得られた活性化合物に対して、シグナル制御分子機構および細胞応答現象の解析を行う。

(4) 一方、BMI1 の発現を制御することが知られている Wnt (Wnt) やヘッジホッグ (Hh) シグナルに作用する化合物に関しても、当研究室で構築済みのルシフェラーゼ細胞アッセイシステムを用いて天然物を対象としたスクリーニング研究を行い、上記 (2)、(3) の方法と同様に、活性成分の分離精製、化学構造の決定、作用発現分子機構の解析を行う。

4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼアッセイ方法の構築と天然物スクリーニング

ポリコーム複合体中心分子 BMI1 に関して、そのプロモーター活性を評価するルシフェラーゼ細胞アッセイシステムの構築を行った。ジョージ・ワシントン大学 G. P. Dimri 教授からご恵与いただいたプラスミドを用いて、BMI1 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ配列を含むレポータープラスミドを作成した。次に作成したプラスミドをアッセイ用細胞 (ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 293T) に導入し、安定発現細胞の構築を行った。すなわち播種した細胞に構築したプラスミドを導入し、ピューロマイシンによる選択培養を行った後、単一のコロニーが形成された複数のクローンについてルシフェラーゼ活性試験を行い、陽性対照による発光の変化等の実験により最も良好な結果を示した細胞株をスクリーニング用細胞として選別した。選別した細胞では、陽性対照 (PTC-209) によってルシフェラーゼ発光量が低下した。

上記により構築したアッセイ細胞を用いて、当研究室保有の植物エキスコレクションを対象としたスクリーニングを行った。これまでに、当研究室保有のタイ産植物 136 種についてアッセイ試験を行い、そのうちの 4 種が顕著なルシフェラーゼ活性の低下を示したことから、これらをヒットサンプルとして選別した。そのうちの 1 種 (キョウチクトウ科植物) について、抽出エキスの溶媒分画およびクロマトグラフィーによる精製を開始し、これまでに数個の活性フラクションを得た。

(2) Wnt および Hh シグナルに作用する天然

物のスクリーニング

Wnt シグナル

Wnt シグナルに関するスクリーニングには、転写因子 TCF の転写活性をルシフェラーゼ活性 (TOP 活性) により評価する細胞アッセイシステムを用いた。本試験法によりバンガラデシュおよびタイ産植物の抽出エキスについてスクリーニングを行い、活性成分の分画を行った。オオバコ科 *Scoparia dulcis* から単離したジテルペン scopadulciol はヒト胃がん細胞 AGS において核内の β -catenin を減少させたが、プロテアソーム阻害剤 MG132 を併用すると β -catenin の減少は認められなくなった。これにより scopadulciol はプロテアソーム依存性の β -catenin の分解を促進することが示唆された。また、scopadulciol は AGS 細胞において Wnt シグナルの標的タンパクである cyclin D1, c-myc, および survivin の発現を抑制した。一方、scopadulciol は AGS 細胞において、アポトーシス誘導因子 TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) の感受性を増大させ、TRAIL との併用により顕著な細胞毒性を示すことが明らかとなった。Scopadulciol はデスレセプター DR4 および DR5 の発現を増大させた一方、抗アポトーシス因子 Bcl2 を減少させた。以上により、scopadulciol は AGS 細胞において TRAIL 耐性克服作用を示すことが判明した。

一方、センダン科 *Azadirachta excelsa* からは、1 種の新規および 7 種の既知リモノイドを単離した。これらのうち数種は顕著な TCF 転写阻害活性を示した。そのうちの 1 種である既知の trichillin H は、ヒト胃がん細胞 AGS および大腸がん細胞 HCT116 に選択的な細胞毒性を示した。Trichillin H は細胞質および核における β -catenin を減少させなかったが、Wnt シグナルの標的タンパク質である c-myc の発現を抑制した。Trichillin H は Wnt シグナル経路において β -catenin より下流に位置するコンポーネントに作用するものと考えられる。

Hh シグナル

Hh シグナルを標的として、当研究室で構築した転写因子 GLI1 の転写阻害活性に関するルシフェラーゼ細胞アッセイ系を用いてスクリーニングを行った。選別されたナス科 *Solanum nigrum* から Hh シグナル阻害作用をもつ高度に酸化されたステロイド誘導体を 7 種単離した。このうちの 1 種 physarin H は顕著な GLI1 転写阻害活性を示し、Hh シグナルが異常亢進したヒトすい臓がん細胞 PANC1 に対する細胞毒性を有していた。また physarin H は Hh シグナルの標的タンパク質である Ptch や Bcl2 の発現を減少させた。さらに、physarin H は GLI1 タンパク質と GLI1 結合領域を有する DNA との複合体形成を阻害することがエムザ実験により明らかとなった。

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 10 件)

Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Scopadulciol, isolated from *Scoparia dulcis*, induces β -catenin degradation and overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis ligand resistance in AGS human gastric adenocarcinoma cells" *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 864-872 (査読有)

Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Limonoids with Wnt signal inhibitory activity isolated from the fruits of *Azadirachta excelsa*" *Phytochem. Lett.* **2015**, 11, 280-285 (査読有)

Ohishi, K.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M. "Ricinine: a pyridone alkaloid from *Ricinus communis* that activates the Wnt signaling pathway through casein kinase 1 α " *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4597-4601 (査読有)

Park, H.-Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Calotropin: a cardenolide from *Calotropis gigantea* that inhibits Wnt signaling by increasing casein kinase 1 α in colon cancer cells" *ChemBioChem* **2014**, 15, 872-878(査読有)

Arai, M. A.; Uchida, K.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Physalin H from *Solanum nigrum* as Hh signaling inhibitor blocks GLI1-DNA complex formation" *Beil. J. Org. Chem.* **2014**, 10, 134-140 (査読有)

Toume, K.; Tsukahara, K.; Ito, H.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. "Chromomycins A2 and A3 from marine actinomycete with TRAIL resistance-overcoming activity and Wnt signal inhibitory activity" *Mar. Drugs* **2014**, 12, 3466-3476 (査読有)

Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "Constituent from the rhizomes of *Curcuma comosa* and their Wnt signal inhibitory activity" *Heterocycles* **2014**, 88, 1501-1509 (査読有)

Park, H.-Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. " β -sitosterol and flavonoids isolated from *Bauhinia malabarica* found in a screening program for Wnt signal inhibitory activity" *J. Nat. Med.* **2014**, 68, 242-245(査読有)

Toume, K.; Kamiya, K.; Arai, M. A.; Mori, N.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Xylogranin B: a potent Wnt signal

inhibitory limonoid from *Xylocarpus granatum*" *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6106-6109 (査読有)

Arai, M. A.; Fujimatsu, T.; Uchida, K.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Hh signaling inhibitors from *Vitex negundo*, naturally occurring inhibitor of GLI1-DNA complex" *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 1012-1018 (査読有)

[学会発表](計 20 件)

M. Ishibashi, "Natural products screening studies on disease and development signaling pathways", The 4th Annual Conference of the Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS2015), February 10, 2015, Washington, DC, U.S.A.

M. Ishibashi, "Calotropin, a cardenolide from *Calotropis gigantea*, with Wnt signal inhibition activity through increase of casein kinase 1 α ", The 9th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia, Abstract p. 163, December 3, 2014, Kuala Lumpur, Malaysia

M. Ishibashi, M. A. Arai, and K. Toume, "New heterocyclic natural products isolated in screening studies on disease and development pathways", The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, Abstract p. 22, October 29, 2014, Osaka

M. Ishibashi, M. A. Arai, and R. Okamoto, "Natural products-based screening study on disease and development pathways", The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, October 28, 2014, Osaka

M. Ishibashi "Natural products screening studies targeting Wnt, Hedgehog, and TRAIL signaling pathways", The 14th International Symposium on Traditional Medicine in Toyama 2014, Abstract p. 33-36, October 28, 2014, Toyama

M. Ishibashi "Natural products screening studies on Wnt and Hedgehog signaling pathways", The 28th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 8th International Conference on Biodiversity (ISCNP-28 & ICOB-8), Abstract p. 171-172, October 20-24, 2014, Shanghai, China

當銘一文, 朴賢英, 神谷謙太郎, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea および *Xylocarpus granatum* からのウイントシグナル阻害成分の探索", 第 56 回天然有機化合物討論会講演要旨集 187-192, 2014 年 10 月 17

日, 高知

R. G. Fuentes, 荒井緑, 小谷野喬, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Limonoids from *Azadirachta excelsa* inhibit Wnt/ β -catenin signal", 日本生薬学会第 61 年会講演要旨集 114 (2014), 2014 年 9 月 14 日, 福岡

米山達朗, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Themeda arguens 等からのヘッジホッグ伝達経路阻害剤の探索", 日本生薬学会第 61 年会講演要旨集 113 (2014), 2014 年 9 月 14 日, 福岡

石橋正己, "バングラデシュ天然薬物資源調査", 第 4 回天然物パワーシンポジウム, 2014 年 7 月 19 日, 東京

石橋正己, "ガガイモ科植物由来天然物カロトロピンのウイントシグナル阻害作用", 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014 年 6 月 26 日, 仙台

石橋正己, 荒井緑, "シクロペンタベンゾフラン骨格を有する天然物およびその誘導体合成", 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 6 回公開シンポジウム, 2014 年 5 月 28 日, 名古屋

R. G. Fuentes, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Screening of Wnt Signal Inhibitors from *Scoparia dulcis*", 日本薬学会第 134 年会 (2014), 2014 年 3 月 29 日, 熊本

朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea 由来カルデノリド calotropin のウイントシグナル阻害作用", 日本薬学会第 134 年会 (2014), 2014 年 3 月 29 日, 熊本

大石健介, 當銘一文, 荒井緑, 溝口貴正, 伊藤素行, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "Ricinus communis などからの Wnt シグナルに作用する天然物の探索", 日本薬学会第 134 年会 (2014), 2014 年 3 月 28 日, 熊本

M. A. Arai, K. Komatsuzaki, H. Hanaoka, Y. Arano, and M. Ishibashi, "Synthesis and evaluation of ¹²⁵I Fuligocandin B derivatives targeting TRAIL resistant cancer cells", 3rd Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia, November 22-25, 2013, Chiba, Abstract p. 44

大石健介, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Ricinus communis からの Wnt シグナル活性化作用をもつ天然物の探索", 第 5 回食品薬学シンポジウム講演要旨集 151-153 (2013), 2013 年 11 月 1-2 日, 大阪

荒井緑, 藤松輝久, 内田響子, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Vitex negundo から単離したヘッジホッグシグナル阻害作用をもつジテルペン", 第 57 回香料・テル

ペンおよび精油化学に関する討論会講演
要旨集 121-123 (2013), 2013 年 10 月 5-6
日, さいたま

R. G. Fuentes, K. Toume, M. A. Arai, T.
Koyano, T. Kowithayakorn, S. K. Sadhu, F.
Ahmed, and M. Ishibashi, "*Curcuma comosa*
and *Scoparia dulcis*: Potential sources of
active compounds with Wnt signal inhibitory
activity", 13th International Conference on
the Chemistry of Antibiotics and other
bioactive compounds, September 25, 2013,
Kawaguchiko, Abstract p. 108

R. G. Fuentes, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野
喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己,
"Activity-guided isolation and identification
of Wnt signal inhibitors from *Scoparia
dulcis*", 日本生薬学会第 60 年会講演要旨
集 249 (2013), 2013 年 9 月 8 日, 北海道

〔図書〕(計 3 件)

野依良治, 奥山格, 柴崎正勝, 檜山為次
郎(監訳), 石橋正己, 岩澤伸治, 大嶋
孝志, 金井求, 木越英夫, 忍久保洋, 白
川英二, 橋本俊一, 吉田潤一(共訳),
"ウォーレン有機化学第 2 版(上)" 東
京化学同人, **2015**, p. 41-76, 273-306,
415-436

M. Ishibashi, "Bioactive heterocyclic
natural products from actinomycetes having
effects on cancer-related signaling
pathways" *Progress in the Chemistry of
Organic Natural Products*, Kinghorn, A.
D.; Falk, H.; Kobayashi, J. (Eds.); Springer;
Wien, **2014**, 99, 147-198

石橋正己(翻訳), 有機スペクトル解析
ワークブック, 東京化学同人, **2014**, 251

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/kassei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 正己 (ISHIBASHI MASAMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 90212927

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: