

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380065

研究課題名 (和文) 異常な液胞化誘導を引き起こすビセニスタチンの標的分子の同定

研究課題名 (英文) Target identification of vacuolating compound, vicienistatin.

研究代表者

臼井 健郎 (USUI TAKEO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：60281648

研究成果の概要(和文):我々は抗腫瘍物質として単離されたビセニスタチンが、動物細胞に対して初期エンドソームに由来する巨大な液胞を形成誘導することを見出し、その標的分子を明らかにすることを目的に、生化学的、化学生物学的アプローチを用いて研究を行った。その結果、ビセニスタチンの阻害点が PI3P のイノシトール環 5 位をリン酸化する酵素である PIKfyve の上流因子、または膜系を含む PI 制御系の周辺に存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文):Vicienistatin is a novel vacuolating compound, but its molecular mechanism has remained to be revealed. We found that vicienistatin interfered with the upstream factors of PIKfyve, a PI3P 5-kinase, or regulators involved in PI-turnover.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野： 化学生物学

科研費の分科・細目:生物生産化学・生物有機化学

キーワード: 液胞化、標的分子、Chemical Biology

1. 研究開始当初の背景

(1) ビセニスタチンは放線菌から単離された抗腫瘍物質であり、ビセニサミンという珍しいアミノ糖を有する 20 員環マクロラクタムである。現在までに若干の構造活性相関検討が行われており、ビセニサミンが活性に重要であることが明らかになっているが、その標的分子及び抗腫瘍活性を示す作用機序についてはほとんど不明のままである。

(2) 我々は「ビセニスタチンの細胞毒性活性発現には、アミノ糖の構造が重要である」という情報から、ビセニスタチンの標的分子がこれまでに知られている抗腫瘍物質の標的分子とは異なる

と予想し、解析を始めた。その結果、動物細胞に対して 100～300 nM 処理することにより、2 時間以内という極めて短時間のうちに細胞の半分以上を占めるような巨大な液胞を形成誘導することを見出した。ビセニスタチンは動物細胞に対して急速な液胞化を誘導する初めての薬剤であると考えられる。

(3) このようなユニークな活性を持つ低分子はユニークな標的分子を持つと予想される。ビセニスタチンは抗腫瘍剤として一時開発が進められていたが、物性の悪さにより臨床開発は中止された。しかし細胞内標的分子が明らかになり、標的分子が腫瘍細胞の異常増殖や細胞生存に対し

て関与していることが明らかになれば、新たながん分子標的治療薬の標的分子となることが期待される。

2. 研究の目的

(1) ビセニスタチンは細胞に対し急速な液胞化を誘導するユニークな化合物であり、その作用機構に興味を持たれる。そこでビセニスタチンの液胞化誘導に関わる因子や細胞内標的分子を同定する。

(2) ビセニスタチンは抗腫瘍活性を示す物質として単離された経緯があるが、急速な液胞化誘導と抗腫瘍活性との間に関連があるかどうかは不明である。そこでビセニスタチンの抗腫瘍活性と液胞化誘導活性との相関を検討する。

3. 研究の方法

(1) 先行研究よりビセニスタチンで形成される液胞は初期エンドソーム由来であると考えられている。そこで動物細胞を用いた形態学的・生化学的アプローチとして Rab5 に注目して解析を行う。Rab5 を大腸菌で発現・精製し、Rab5 の GDP/GTP 依存的結合蛋白質の差異を *in vitro* 系により検討する。また、液胞誘導に必要な細胞外環境や酵素活性などを、阻害剤等を用いて同定する。

(2) 複数の薬物トランスポーターを破壊し、薬剤感受性となった出芽酵母を親株にして、遺伝学的に優性のビセニスタチン耐性株を取得、解析を行う。

(3) ビセニスタチン固定化ビーズを作成し、細胞内結合蛋白質の同定を試みる。ビセニスタチン固定化ビーズの作成は次の2つの方法で行う。

① ビセニスタチン類縁体の構造活性相関検討を行い、活性に不要な部分からリンカーを伸ばしてビーズに固定化する。

② 光親和型アフィニティービーズを利用して官能基非依存的にビーズの固定化を行う。

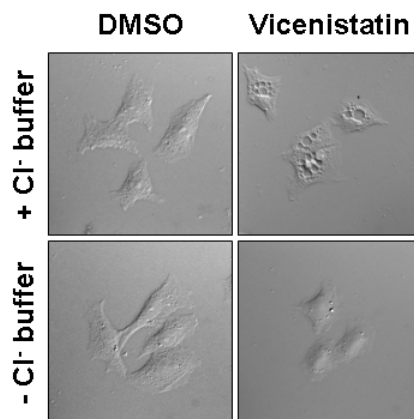
(4) 液胞化を誘導することが知られている他の薬剤や病原菌の作用機構と比較し、ビセニスタチンの標的分子を推測、特定する。

4. 研究成果

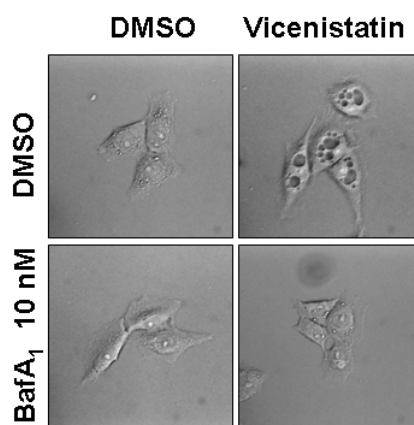
(1) リコンビナントの GST-Rab5 を大腸菌発現により得て、GTP 型、GDP 型それぞれでビセニスタチンと反応させ、細胞抽出液から Rab5 結合蛋白質を単離した。以前の報告と同様、GTP 結合型と GDP 結合型それぞれの Rab5 を用いた場合には結合蛋白質の差異が検出されたが、そのパターンはビセニスタチン存在下でも変化が見られなかった。

次に塩化物イオンを含まない培地ではビセニスタチンによる液胞化が阻害されたことから、塩

化物イオンが液胞化に必要であると考えられる。



そこで各種 Cl チャンネル阻害剤を用いて検討したが、いずれの阻害剤も液胞化形成を抑えられなかった。一方、ビセニスタチンにより形成された液胞の多くが酸性化していたことから、小胞の酸性化が液胞形成に必要なか否かを V-ATPase 阻害剤である bafilomycin を用いて検討したところ、bafilomycin 前処理によりビセニスタチンによる液胞形成が阻害された。V-ATPase が機能するためにはプロトンの小胞内流入に伴い塩化物イオンの流入が必要であることから、塩化物イオンは必要なものの、チャンネルを介しての流入は起こっていないものと考えられる。

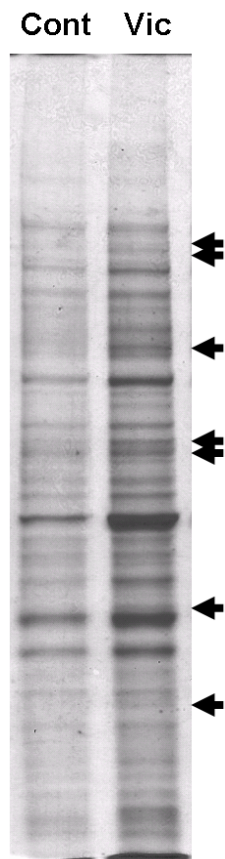


(2) 薬物トランスポーター、特に細胞膜上に存在する薬剤排出型の ABC トランスポーター、及び非特異的薬剤耐性に関わる転写因子、合計 12 遺伝子を破壊した出芽酵母を作成し、ビセニスタチン感受性を検討したが、野生株と比較して感受性の向上はあまり見られなかった。このため、酵母を用いた遺伝学的解析を行うにはビセニスタチンの量が不足することが予測されたため、このアプローチは断念することとした。

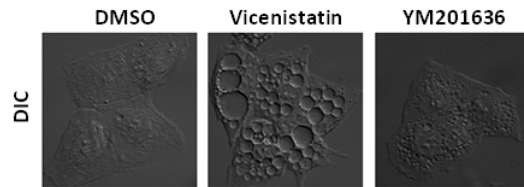
(3) ビセニスタチン固定化ビーズを作成するため、まず類縁体の構造活性相関検討を行った。アミノ糖部分及びラクタム部分の類縁体を作成し、それら単独及び結合させたものの細胞増殖阻

害活性、並びに液胞化誘導活性を検討した。いずれの活性に対しても、天然型のビセニスタチンを超える化合物は得られなかった。また、アミノ糖とラクタムのそれぞれの構造が共に重要であること、さらに細胞増殖阻害活性と液胞化誘導活性は、一部相関しない場合があることが明らかとなった。このことから、増殖阻害と液胞化に関わる細胞内標的分子は異なると考えられる。明確な構造活性相関が得られず、また活性に不要な部位の特定も出来なかったことから、方法①の活性に不要な部分からリンカーを伸ばしてビーズに固定化する手法は断念した。

次に方法②の光親和型アフィニティービーズを利用した固定化ビーズを用いて、ビセニスタチン結合蛋白質の取得を試みた。細胞抽出液とビセニスタチン固定化ビーズを反応させ、種々の緩衝液で洗浄後、SDS サンプルバッファーで溶出した。得られた結合蛋白質はSDS-PAGEで分離後、コントロールビーズとビセニスタチンビーズで差の見られた蛋白質に対しては質量分析計で同定を行った。その結果、複数の結合蛋白質が得られ、その幾つかは膜融合に関わる因子であったが、標的分子を含む複合体が得られたのか、あるいは標的である初期エンドソームごと精製されているのかは不明である。現在それらの構成分子のいずれと結合するか、生化学的に検証を続けているところである。

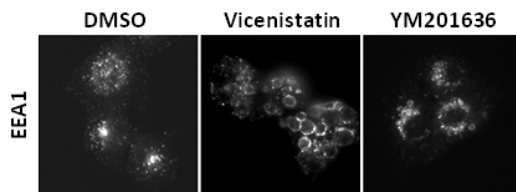


(4) 動物細胞に液胞化を誘導する薬剤として、theonellamide B や YM201636 が報告されている。これらの薬剤はビセニスタチンが誘導する液胞と異なり、小さな液胞が細胞内に形成されるといった違いがあるものの、液胞化機構解析の手がかりとして有効であると考えられる。

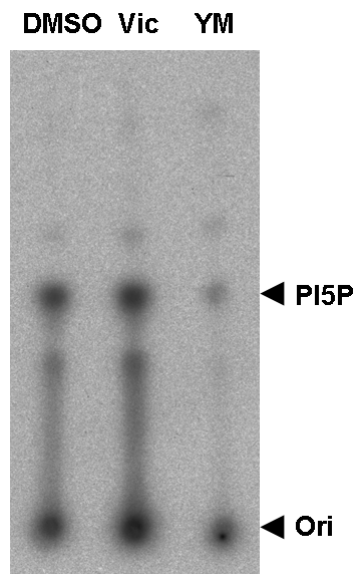


Theollenamide B は最近、ergosterol と結合することが報告されたが、誘導される液胞の由来についてはほとんど解析がなされていない。それに対し YM201636 は PI3P の inositol 環 5 位の水酸基をリン酸化し、PI3,5P2 を生産するリン酸化酵素 PIKfyve の阻害剤であり、形成される液胞はエンドソーム由来であることが分かっていることから、YM201636 の作用機構と比較することでビセニスタチンの標的分子同定の手がかりとすることにした。

ビセニスタチン、YM201636 いずれの処理によっても初期エンドソーム由来の液胞が形成され、液胞の大きさ以外には違いは見られなかった。



そこで PIKfyve がビセニスタチンの標的分子である可能性を検討するため、PIKfyve 遺伝子を細胞に導入して液胞化に及ぼす影響について検討を行った。その結果、PIKfyve 過剰発現細胞ではビセニスタチンにより液胞化が抑制された。



このことからビセニスタチンは PIKfyve、またはその上流を阻害していると考えられる。そこで PIKfyve を免疫沈降し、PI を基質にした in vitro kinase assay を行った。その結果、YM201636 は PIKfyve の PI リン酸化を強く抑制したが、ビセニスタチンは全く阻害することが出来なかった。以上の結果から、ビセニスタチンは PIKfyve の上流で阻害していると考えられる。

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 9 件)

- ① Chinen T., Nagumo Y., Watanabe T., Imaizumi T., Shibuya M., Kataoka T., Kanoh N., Iwabuchi Y., and Usui T. “Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway.” *Toxicol. Lett.* **199**, 341-356 (2010) 査読有
- ② Muroi M., Kazami S., Noda K., Kondo H., Takayama H., Kawatani M., Usui T., and Osada H. “Application of proteomic profiling based on 2-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action.” *Chem. Biol.* **17**, 460-470 (2010) 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 臼井健郎「蛋白質-蛋白質相互作用阻害剤の解析」日本農芸化学会東北北海道支部合同第 11 回若手シンポジウム、2010 年 11 月 26 日、モンタナリゾート(宮城県)
- ② 臼井健郎「マーカーレス遺伝子破壊によるフォワードケミカルバイオロジー研究に向けた薬剤超感受性酵母の作成と利用」酵母研究会、2010 年 3 月 9 日、小西酒造(株)(兵庫県)

[図書] (計 1 件)

- ① Usui T., Saito A., and Osada H. Chapter 12 “Data on Small Molecules and Their Target Proteins” in *Protein in Targeting with Small Molecules* (Osada H. ed.) p239-p276 (2009)

[その他]

ホームページ

<http://www.sakura.cc.tsukuba.ac.jp/~usui/index/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

臼井 健郎 (USUI TAKEO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准

教授

研究者番号:60281648

(2)連携研究者

叶 直樹 (KANO NAOKI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号:40317293