

《日本農芸化学会賞》



微生物二次代謝産物に関するケミカルバイオロジー

理化学研究所・基幹研究所・ケミカルバイオロジー研究領域 領域長 長田 裕之

ケミカルバイオロジーは、「化学的手法で生命現象を解き明かす」ことを目標の一つとしているが、これはまさしく、農芸化学の理念である「化学的手法で農学にかかわる事象を解き明かす」ことと一致する。麹菌が生産するコウジ酸の論文(藪田貞治郎)が、日本農芸化学会誌創刊号(1924年)の巻頭に掲載されたことからわかるように、微生物の代謝産物に関する研究は、本学会の発足時から現在まで脈々と受け継がれている重要な研究課題である。

筆者は、東京大学農芸化学科の卒業論文研究で「大腸菌におけるコリシンE2の作用機作研究」を行ったことから、微生物同士の拮抗現象、さらには現在の研究につながるシグナル伝達研究に興味をもった。学位取得後、理研の抗生物質研究室に入室し、それ以来、微生物が生産する生理活性物質の化学構造および生理活性の多様性と面白さに魅了されてきた。筆者が理研に入所した1980年代は、企業でも微生物代謝産物、特に抗生物質以外の生理活性物質(抗がん剤、コレステロール合成阻害剤、免疫抑制剤)の研究が盛んであった。最近では、微生物源医薬のスクリーニングはやや下火になっているように感じるが、筆者は、今でも微生物は医薬シードの宝庫だと信じている。

本講演では、微生物が生産する生理活性物質の中でも、動物細胞に対する作用に着目したスクリーニングと動物細胞における標的分子同定について報告する。

1. 微生物二次代謝産物のスクリーニング(化学的研究)

最近の医薬探索では、ロボットを導入したハイスループットスクリーニングが主流になったことで、微生物を探索源とするスクリーニングより合成化合物のスクリーニングが主流になっている。微生物培養液では、ハイスループットスクリーニングに供する検体数を確保することが困難であったり、精製に手間やコストがかかったりすることが障害となる。その点で、合成化合物のほうが有利と考えられているようだが、微生物から単離されたFK506, ML236Bが、それぞれプログラフィ、メバロチンとして商品化された例でも明らかなように、独自のスクリーニング系で微生物産物をスクリーニングすれば、選択的かつ強力な阻害剤が発見できる確率が高いことも知られている。

現在、筆者らの研究グループは、微生物代謝産物の良さを引き出し、かつハイスループットスクリーニングに対応可能な新しい方向を目指している。これまでは、微生物培養液から生理活性をベースにして活性物質を単離することが多かったが、微生物培養液に含まれるすべての成分をHPLCで分画したフラクションライブラリーを構築している。各フラクションは完全に精製する必要はなく、いくつかの化合物が混在して構わない(純度50%以上が目標)。ただし、すべてのフラクションについてホトダイオードアレー液体クロマト質量分析装置でUVと質量の分析データを取得し、再精製可能な状態にしている。このフラクションライブラリーの物理化学的特徴、生物活性情報

を整備することにより、これまで微生物代謝産物スクリーニングの弱みと言われてきた、煩雑性、不確定性、重複性の問題点を克服しようとしている。

また、微量の微生物代謝産物を有効に活用するために、新しい創薬スクリーニング法として「化合物アレイ法」を確立した(図1)。化合物アレイは、DNAマイクロアレイにヒントを得て、基板の上に数千種類の化合物を固定化し、各種タンパク質との相互作用を網羅的にスクリーニングする画期的方法である。筆者らが化合物アレイの研究を始めたころ、すでにSchreiber(ハーバード大)とWaldmann(マックスプランク研)らが同様の研究を開始しており、それぞれが独自の手法を確立していた。しかし、彼らが行った方法では、化合物の特定の官能基にリンカーを付けていたので、その官能基部分を認識するタンパク質が結合できなくなる欠点があった。筆者らは、この問題点を解決する手段として、官能基に依存せず化合物を基板上へ固定化する官能基非依存型固定化法を開発した。リンカーを介してガラス基板上に固定化(アレイ化)したジアジリル環をUV照射するとカルベンという高反応性活性種が発生するので、特定の官能基をもたない化合物でもリンカーに結合することが可能である。蛍光標識したタンパク質を化合物アレイ上に添加し、結合したタンパク質の蛍光を観測することで、網羅的にタンパク質と化合物の相互作用が検出できる。実証研究として、多数のプレオマイシン誘導体を担持した化合物アレイを作製して、放線菌由来のプレオマイシン結合タンパク質(*ShBle*)と赤色蛍光タンパク質の融合タンパク質との結合を測定した。化合物アレイ上で蛍光スポットとして検出できたプレオマイシン誘導体は、等温滴定型カロリメーター(ITC)による測定でも強い結合を示した。さらに、*ShBle*とプレオマイシンの共結晶の構造解析に成功し、その解析結果が化合物アレイ上での構造活性相関データと良い一致を示すことを証明した。

筆者らは、これまでに15,000化合物を基板上に固定化し、さらに100種類の蛍光タンパク質を発現している。この化合物ア

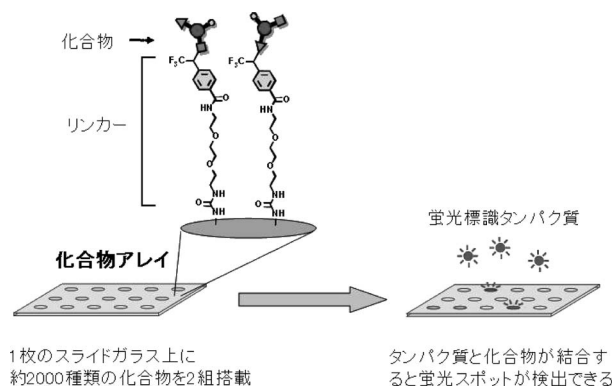


図 1

レイとタンパク質ライブラリーを用いた 15,000×100 通りの相互作用解析は、従来のハイスループットスクリーニングとは桁違いの高速スクリーニングである。

2. 微生物二次代謝産物を用いた標的分子研究 (生物学的研究)

次に、がん細胞におけるバイオプローブの応用例を報告する。筆者は、生命機能の解析に役立つ化合物をバイオプローブと呼ぶことを提唱し、バイオプローブを用いて標的タンパク質の機能を解明するケミカルバイオロジー研究を行ってきた。

がん細胞は、抗がん剤の作用を免れるためにさまざまなタンパク質を発現して薬剤耐性を獲得することが知られている。ミトコンドリアに存在する Bcl-2 および Bcl-X_L タンパク質が過剰発現したがん細胞は、アポトーシスを起こしにくくなり、さまざまな抗がん剤に対して耐性となる。放線菌が生産するチューブリン重合阻害剤ピロネチンでがん細胞を処理すると、Bcl-2 および Bcl-X_L タンパク質がリン酸化されて、アポトーシス抑制活性を失うことを明らかにした。さまざまな微生物由来のバイオプローブを用いて、そのリン酸化にかかわる酵素を検索した。その結果、Bcl-2 は、MAP キナーゼとホスファターゼ 2A のバランスによってリン酸化状態が制御されていることを明らかにした。一方、Bcl-X_L は、Hsp90 阻害剤ゲルダナマイシン感受性のリン酸化酵素によって機能調節されていることが示唆された。詳細な解析から、分裂期で重要な働きをする Polo like kinase (Plk1) が Hsp90 と結合すること、Bcl-X_L タンパク質のリン酸化を行うことを明らかにした。

さらに、細胞周期調節タンパク質 Wee1 は、M 期でプロテアソーム依存的に分解されるが、その分解制御で Plk1 とカゼインキナーゼ CK2 がスイッチとなっていることを明らかにした。上述のように、Plk1 は細胞周期制御にかかわっており (図 2)、抗がん剤の標的分子としても注目されている。Plk1 は、N 端側にキナーゼドメイン、C 端側にタンパク質認識にかかわるポロボックスドメイン (PBD) をもつ。最近、細胞分裂期に重要な働きをもつ多数のタンパク質が、PBD に結合することが次々と明らかにされてきている。PBD に依存した結合を特異的に阻害する化合物は、PBD を標的とする新しいタイプの抗がん剤として期待できる。Plk1 のキナーゼ活性阻害剤はいくつか報告されていたが、PBD に作用してタンパク質間相互作用を阻害する薬剤の報告は、当時なかった。そこで、筆者らは蛍光タンパク質標識 PBD とその標的リン酸化ペプチドの結合を蛍光プレートリーダーで定量する系を構築した (図 3)。結合が特異的であることは、標的ペプチドを非リン酸化ペプチドや配列変異体にするると結合が認められなくなることで確認した。この系を用いて、PBD のリン酸化タンパク質への結合阻害物質を理研天然化合物バンク (NPDepo) の化合物ライブラリーから探索した。その中の一化合物 purpurogallin は試験管内で PBD と標的タンパク質 (Wee1) の結合を 1 μM でほぼ完全に阻

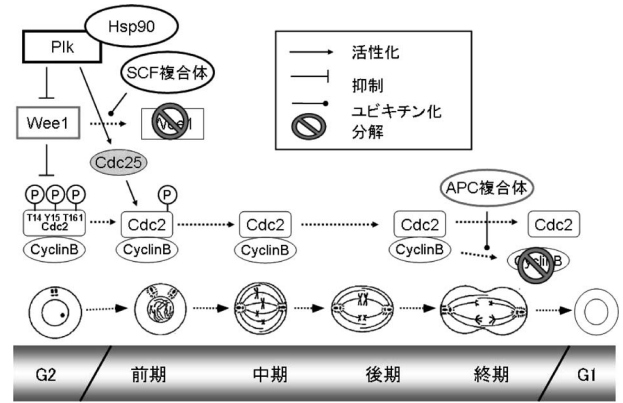


図 2

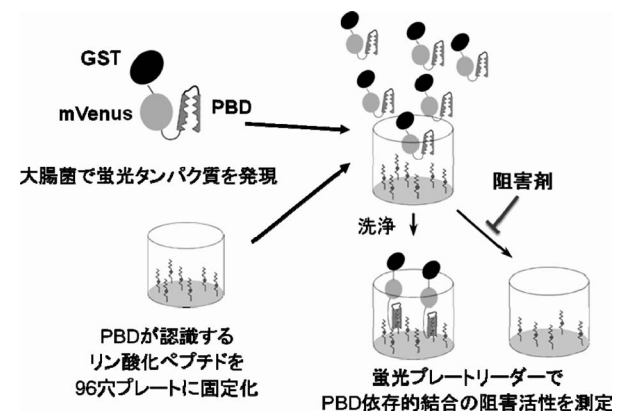


図 3

害した。本阻害剤を用いた詳細な生物学的解析により、PBD 依存性の結合の新しい生物学的意義が解明されつつある。

微生物代謝産物の研究は、生産菌における二次代謝産物の生成機構や遺伝子発現の解析、そして化合物の作用標的となるがん細胞における標的分子の同定など、天然物化学から分子生物学まで多岐にわたる。ケミカルバイオロジーの研究対象として、解明すべきテーマがたくさん残されている。「少年老い易く学成り難し、一寸の光陰軽んずべからず」を肝に銘じて、研究に精進しなければならない。

謝 辞 東京大学名誉教授・別府輝彦先生には学生時代から今に至るまで、折に触れご指導をいただきたいへん感謝しております。また、理化学研究所名誉研究員・磯野清先生には、理研入所以来、抗生物質研究の化学と生物学をご指導いただくとともに、新しい研究分野に挑戦する機会を与えていただき心より感謝いたします。本研究は、諸先輩のご指導とともに多くの共同研究者のご協力によって成し遂げられた成果です。特に、昼夜を分かたず実験を遂行してくれた理研抗生物質研究室の皆さんに、この誌面を借りて厚く御礼申し上げます。