



分子遺伝学を基盤とした天然生理活性物質の化学生物学的研究

独立行政法人理化学研究所基幹研究所

ケミカルゲノミクス研究グループ グループディレクター 吉 田 稔

抗生物質の発見以来、微生物が造る天然生理活性物質は、医薬品のシードとして人類の健康に貢献してきただけでなく、劇的な表現型変化をもたらすその生物活性が多くの生物学者を魅了してきた。生理活性物質の活性発現メカニズムの解明は、医薬品開発の応用面にとどまらず、生命現象の根幹となる分子機構を解明し、新しい創薬標的を生み出す点で重要な研究分野である。その研究プロセスは突然変異の原因遺伝子を明らかにする遺伝学と類似性が高い。遺伝子と表現型の因果関係を分子レベルで明らかにする分子遺伝学が突然変異を出発点として、表現型の原因となる遺伝子を研究対象とするのに対し、筆者が取り組んできた低分子生理活性物質の作用機序研究は、突然変異の代わりに特異な生理活性（表現型）を示す化合物を出発点とし、その原因となる標的分子を同定し、機能を明らかにする「化学遺伝学」である。生理活性物質の作用機構研究は従来、生化学的に試行錯誤を繰り返し、研究の成否は研究者の経験と勘にゆだねられる部分が大きかった。本研究は、分子遺伝学を基盤にポストゲノムツールと合成化学的アプローチを組み合わせ、論理的、組織的に薬剤標的分子を同定する方法論を確立し、独自のケミカルゲノミクスへと発展させたものである。それによっていくつかの驚くべき標的分子を解明し、新しい創薬標的の発見と生命科学の発展に貢献できたものと考えている。

1. 生化学的アプローチによるトリコスタチン A の作用機序研究

筆者の化学遺伝学研究は、今から 27 年ほど前に東京大学農学部農芸化学科醗酵学研究室（別府輝彦教授）において、放線菌から単離したフレンド白血病細胞分化誘導物質トリコスタチン A (TSA) の作用機構に取り組んだことに始まる。TSA は既知化合物であったが、分化誘導活性だけでなく、正常繊維芽細胞の細胞周期を G1, G2 両期で停止させ、G2 期停止細胞から TSA を除去すると DNA 合成を開始して 4 倍体細胞を形成するという驚くべき生物活性を示した。試行錯誤の末、生化学的に標的分子を絞り込み、最終的にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害することを明らかにした。この発見をきっかけに

に TSA は世界初の特異的な HDAC 阻害剤として広く利用されるようになり、その後のクロマチン研究の興隆と HDAC 阻害剤の抗がん剤としての開発に大きな影響を与えた。当時はまだ HDAC はクローン化されていなかったが、TSA 耐性となった突然変異細胞を分離したところ、その細胞の HDAC 酵素活性が TSA 耐性となっていることがわかり、TSA の細胞周期阻害が HDAC 阻害に起因することを遺伝学的に証明した。これをきっかけに、筆者は作用機序研究に分子遺伝学的アプローチを取り入れることを決意した。さらに筆者らはカビおよび細菌より単離された抗腫瘍活性物質であるトラポキシシン (TPX) と FK228 がともに特異的な HDAC 阻害剤であることも明らかにした。これらは HDAC の活性中心亜鉛を可逆的にキレートする TSA と異なり、TPX はそのエポキシケトン構造に依存的な不可逆阻害を示し、FK228 は細胞内でジスルフィドが還元されて生成するチオールが亜鉛に配位するユニークな作用機構を有していた。FK228 は 2009 年に米国にて皮膚性 T 細胞リンパ腫の治療薬として認可されている。HDAC 阻害剤はがん細胞で見られるがん抑制遺伝子の発現抑制を解除することで抗腫瘍活性を発揮するものと考えられている (図 1)。

2. 遺伝学的アプローチによるレプトマイシンの作用機序研究

レプトマイシン B (LMB) は醗酵学研究室で発見された放線菌が生産する新規抗真菌抗生物質であり、長鎖不飽和脂肪酸の一端がβ-ラクトンとなったユニークな構造を持つ。生物活性も極めてユニークであり、低濃度で真菌の形態異常と動物培養細胞の細胞周期停止および抗がん活性を示す。LMB は出芽酵母に対しては全く作用しなかったため、分裂酵母を用いて LMB 耐性変異株を取得し、その耐性遺伝子のクローン化を行い、2 種類の耐性遺伝子を同定した。一方は抗がん剤多剤耐性に関わるヒト MDR1 のホモログであり、過剰発現によって多剤耐性を与える薬剤排出ポンプであった。もう一方は、LMB 特異的な耐性を与える変異遺伝子であり、酵母からヒトまで広く保存された機能不明のタンパク質をコードする *crm1* であった。筆者らはヒト Crm1 をクローン化し、その遺伝子産物の細胞内局在や LMB との結合など明らかにするとともに、種々の機能解析から Crm1 がタンパク質の核外移行シグナル NES の受容体であることを証明した。さらに Crm1 変異体の抑圧変異を同定することにより、Crm1 中のシステイン残基 (Cys-529) がセリンに変異することで完全な LMB 耐性を与えることを見いだした。このシステイン残基は、LMB 感受性を示す全ての真核生物で保存されているのに対し、出芽酵母など LMB 耐性を示す真菌では存在しない。筆者らは LMB が Cys-529 にマイケル付加反応で結合し、細胞内の結合タンパク質は Crm1 のみであることも明らかにした。以後 LMB は核輸送研究のためのプローブとして世界中で利用されている。

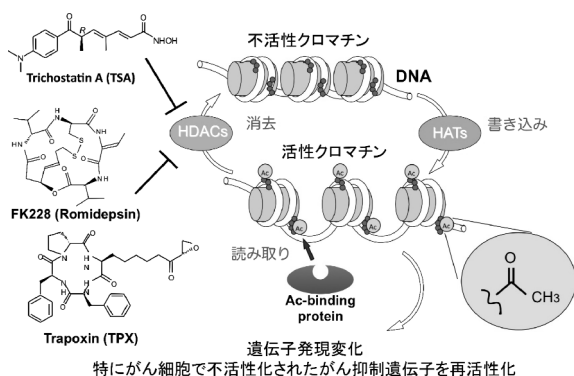


図 1 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の発見と創薬基盤

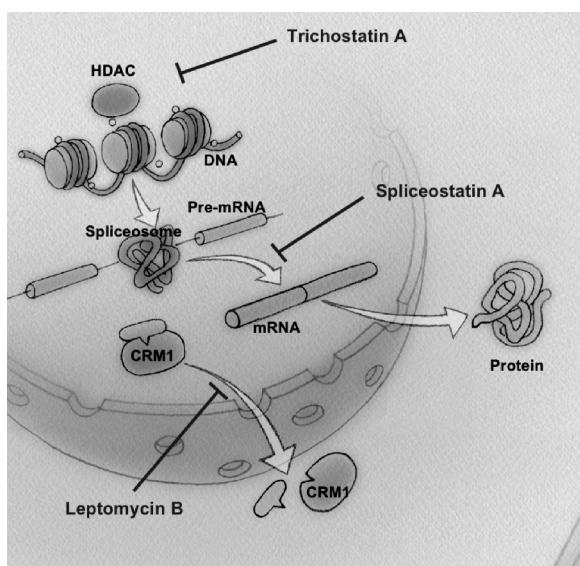


図2 本研究で明らかになった真核細胞の遺伝子発現を制御する天然生理活性物質の作用機序

3. 抗がん物質 FR901464 の作用機序研究

FR901464 は藤沢薬品工業で発見された微生物由来抗がん活性物質である。東大農学部有機化学研究室の北原・渡邊両博士と共同で構造活性相関研究を行ったところ、FR901464 のメチルケタール体（スプライソスタチン A (SSA)）が化学的に安定で高活性であることがわかった。そこで SSA のビオチン化誘導体を合成し、結合タンパク質を解析したところ、スプライソソーム U2 snRNP の構成成分である SF3b 複合体を同定し、SSA がスプライシングを阻害する初めての化合物であることが判明した。興味深いことに SF3b の機能欠損の結果、スプライシングが阻害されるだけでなく、一部の mRNA 前駆体が細胞質に漏出し、イントロンを含むタンパク質が翻訳されることがわかった。このことは SF3b がスプライシングを受ける前の未成熟な mRNA の核内保持にも関わることを示す。前述の分裂酵母多剤耐性遺伝子破壊株を用いて SSA は分裂酵母においても SF3b に結合し、スプライシングを阻害するとともに、SF3b の変異体は mRNA 前駆体の核内保持に欠陥があることを証明した。以上、TSA、LMB、SSA はいずれも真核細胞の遺伝子発現を制御する基本的な制御機構の初めての阻害剤であり、その分子機構の解明と遺伝子発現の人為的な制御に道を開くものとなった（図2）。

4. 分裂酵母全遺伝子発現系の構築とケミカルゲノミクス基盤の確立

より組織的に薬剤標的分子を解明することを目的に、約 5000 の分裂酵母ゲノム ORF をすべてクローン化し、局在観察用タグ（YFP）および検出・精製用タグ（FLAG-His6）を付けて発現させた。これにより全遺伝子産物の細胞内局在のカタログ（Localizome）と電気泳動位置のカタログ（Mobilitome）を完成させた（図3）。これを用いて LMB で局在変化するタンパク質を網羅的に同定し、300 個近いタンパク質が Crm1 によって制御されることがわかった。これらの解析から、分裂酵母では微小管構成タンパク質であるチューブリンが分裂期に核移行して紡錘体を形成し、間期に核外へ輸送されることを明らかにした。さらに化合物に対する全遺伝子発現株コレクションの化合物感受性プロファイルから作用機序を解明する系を構築した。セオネラミドは海綿から単離されたユニークな環状ペプ

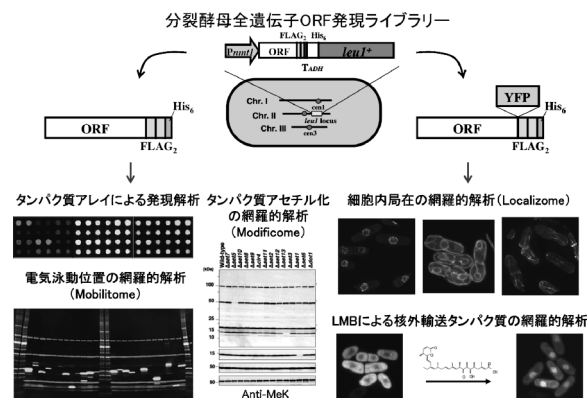


図3 分裂酵母全ゲノム ORF のクローン化とケミカルゲノミクス基盤の構築

チドであり、強い抗真菌活性を示すが、作用機序は長く不明であった。筆者らは過剰発現によってセオネラミド感受性が変化する遺伝子のゲノムワイド解析から、セオネラミドの標的としてエルゴステロールを同定した。最終的に細胞膜のエルゴステロールに直接結合することで Rho1 依存的に細胞壁合成酵素を活性化し、細胞壁合成を異常に促進するという新しい作用機構を明らかにした。このようなゲノムワイドな化合物の感受性プロファイルは、生理活性物質の作用機序解析に絶大な効果を発揮すると考えられる。そこで分裂酵母の多剤高感受性株を宿主に全 ORF を導入し、約 5000 株の増殖を DNA マイクロアレイで一度に定量するシステムを開発した。これにより組織的な化合物標的分子の解明が可能となった。

5. おわりに

本研究によって HDAC 阻害による抗がん活性、転写因子の核外輸送によるタンパク質の活性制御、スプライシングとカップルした mRNA 前駆体の核内保持、エルゴステロールと小分子化合物の結合によるシグナル伝達の攪乱など、天然生理活性物質の作用機序研究は、当初予想もできなかった発見をもたらした。ヒトを含めて多様な生物のゲノム情報が明らかになった結果、遺伝子の機能は複雑なネットワークによって成り立っており、加えて非コード RNA、エピゲノムによる制御などの存在が遺伝情報発現の理解をいっそう複雑にしている。医薬品の薬効や副作用を理解するうえで、これら遺伝情報ネットワークをシステムとして理解する必要がある。特異的な分子を標的として、これを阻害することのできる化合物は、従来の遺伝学では困難であった増殖必須遺伝子や重複遺伝子の機能を簡便にかつ一時的にブロックできる点で有効であり、天然生理活性物質は、医薬品としてだけでなく、ゲノムネットワーク、シグナルネットワークの解析ツールとしてますます重要になっていくと考えられる。筆者は今後も生理活性物質とその標的分子の新しいペアを見いだしていくケミカルゲノミクスによってさらに新しい生命科学研究に挑戦したいと考えている。

謝 辞 本研究は、筆者が東京大学農学部醸酵学研究室に在籍していたときにスタートしてのものであり、理化学研究所にて発展させたものです。すべての成果は、一貫して温かいご指導を賜った東京大学名誉教授の別府輝彦先生、故 堀之内末治先生をはじめとする東京大学および理化学研究所の諸先生、そして苦楽をともにした研究員、学生、卒業生のみなさま、および多くの共同研究者のみなさまのご協力によって得られたものです。この誌面をお借りして厚く御礼申し上げます。