

天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究

所 属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 上原 至雅

分担研究者

- | | |
|-----------------------|-----------------|
| (1) 山之内製薬(株) 創薬研究本部 | 鈴木賢一 |
| (2) メルシャン(株) 生物資源研究所 | 恒川 博 |
| (3) 慶應義塾大学理工学部 | 井本正哉 |
| (4) 昭和大学薬学部微生物薬品化学教室 | 野瀬 清 |
| (5) 富山県立大学工学部生物工学センター | 古米 保 |
| (6) 玉川大学学術研究所 | 奥田 徹 |
| (7) キリンビール医薬探索研究所 | 新藤一敏 (平成13年度のみ) |

要旨

微生物や海産物、あるいは植物由来の天然物の中に細胞内シグナル伝達の特異的阻害剤を探索した。癌細胞の足場非依存増殖の阻害物質として spicamycin の新規類縁体、 $\beta 2$ adrenoceptor agonist、hypothemycin などを、遊走の阻害物質として cylindrol F を見いだした。また、isoflavone 化合物の中に VEGF 遺伝子転写制御に作用する物質を見出した。また、真菌症とアルツハイマーの治療薬探索の新しい系を確立した。

1. 研究目的

高齢化がすすむにつれ、感染症や癌、アルツハイマーなどの疾病が年々増加する傾向にある。健康な高齢化社会を安心して迎えるために、安全かつ有効な予防・治療薬の研究開発は緊急の課題である。本研究では、感染症起因菌として増加している真菌症や癌、アルツハイマーなどの疾病を対象に、新たな標的として注目されるシグナル伝達制御物質を天然物から探索することにより、創薬のリードを見出すことを目的とする。

2. 研究方法

1) アッセイ系の確立とスクリーニングの実施

(1) 抗真菌剤の探索

Candida albicans の凝集体形成阻害剤の探索

病原性真菌 *C. albicans* は、組織への侵入を開始させる前に、組織へ接着し、凝集体を形成することによって侵入するための足場を形成していると考えられている。そこで、この酵母形もしくは菌糸形同士の凝集を阻害する物質の活性評価系を作成し探索を行った。

真菌の蛋白質リン酸化にかかわる酵素阻害剤の探索

C. albicans genome DNA より PCR 法を用いて細胞周期制御に関わると推測される3つの遺伝子 (CaKIN3, CaCDC5, CaIPL1) をクローニングした。これら大腸菌発現ベクターに組み込んだ後、GST-融合蛋白質として発現、精製した。これらの組み替え蛋白質を用いて *in vitro* のキナーゼ反応系を確立し、既知のキナーゼ阻害剤等が阻害活性を有するか検討した。

(2) 抗癌剤の探索

polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル抑制物質の探索

非接着性ポリマーでコートした 96 穴プレートを用いる polyHEMA 細胞培養法を用い、癌細胞の足場非依存性増殖を選択的に抑制する物質を探索した。この方法で見出した新規テルペノイド (anicequol) の作用機序を解析し標的の同定を試みた。

癌細胞遊走阻害物質とアポトーシス抑制タンパク質の機能阻害物質の探索

癌細胞の転移や血管新生の際のファーストステップである細胞遊走能に着目し、遊走活性の高いヒト食道癌 EC17 細胞の遊走シグナルを阻害する物質を、「傷つけアッセイ」により探索した。また、ヒト癌で過剰

発現が観察される Bcl-XL の過剰発現細胞を用いて、Bcl-XL による抗癌剤誘導アポトーシスの抑制活性を阻害する物質を探索した。

ハイポキシア応答エレメントを用いた血管新生制御物質の探索

低酸素状態で促進される血管新生に直接関与する血管増殖因子 (VEGF) 遺伝子上流転写制御領域であるハイポキシア応答エレメント (HIE) を用い、この遺伝子発現を上昇あるいは抑制する薬物の探索をレポーターアッセイにより行った。

(3) アルツハイマー予防・治療薬の探索

アルツハイマー症に関わるタウのリン酸化酵素 MARK の阻害物質を in vitro kinase アッセイにより探索した。

2) スクリーニングサンプルの調製、供与と活性物質の単離・精製

(1) 海産物 (平成13年度のみ)

天然物資源としての探索の歴史が浅く未知の生理活性物質の宝庫である海産物については、海綿エキスを中心とした800の海産物エキス (CHCl₃:MeOH(1:1)抽出物及び熱 MeOH 抽出物) を polyHEMA アッセイに供した。

(2) 微生物分離 (放線菌、細菌、真菌類) ・試験サンプルの調整

沖縄南西諸島 (西表島、石垣島)、本州 (山形県、山梨県、千葉県) などにおいて採集した土壌、植物および淡水より、放線菌、細菌、真菌類を分離した。放線菌の分離にあたっては、非 Streptomyces 属放線菌を標的にした選択分離・スクリーニング系を採用した。分離株は RAPD 法、ARDRA 法などを併用したフィンガープリンティング法を用いて選択を行った。また細菌類については植物の葉、根圏および淡水中に生息するグラム陰性・運動性細菌および滑走細菌を標的に分離した。菌の選択は BIOLOG 法を基準に RAPD 法などを併用した。真菌類は土壌および植物より直接分離する方法と PF (Particle Filtration) 法になどを併用して分離した。分離菌株は上記のように一次分類した後、生理的性状試験などにより再度選択し、各種培地に培養した。培養液は80%アセトン処理し、その遠心上清を濃縮 (各種カラム処理) し、サンプルライブラリーとしスクリーニングに供した (培養液換算10倍濃縮)。

アオキの葉由来放線菌の生産する活性物質IT-2149の生産性の改良と単離・精製を行った。加えて、このアッセイ系で発見した新規物質Anicequolの作用機序を解析するため、ビオチン標識をした類縁化合物を合成した。

また、新たな探索源として生薬類、栽培薬用植物類、野生或いは栽培植物から放線菌の分離を行い、得られた放線菌を液体培地で培養し、n-ブタノール抽出エキスを調製して、アッセイサンプルとして供与した。

玉川学園内、津軽地方、各地離島で採集した土壌、泥炭、落葉、生葉、樹皮、朽ち木、キノコを用い、洗浄濾過法、表面殺菌法、直接分離法で菌類を分離し、純粋培養株を確立した。分離株は仮同定後、取捨選択し、10%グリセリン水に懸濁して-80℃で超低温保存した。保存株を適宜スラントに復元し、固体培地 (2種:押し麦培地とソバの実培地) と液体培地 (2種:グリセリンとペプトンの培地とデンプンと大豆粉の培地) それぞれ20gまたは20mlを250ml容三角フラスコに入れて、25℃、12から19日間培養した。培養物は等量のブタノールで抽出し、ブタノール層を96穴マイクロプレートに240μlずつ分注し、40℃で減圧濃縮乾固した。これを無酸素下、-80℃でサンプル・ライブラリーとして保存し、適宜スクリーニングに供試した。合計4,500株以上を純水分離した。新しい分離法の検討結果、電解水を用いた表面殺菌法を開発した。これにより、植物内生菌のみならず表面に生息する菌類も効率よく分離できた。固体培地2種、液体培地2種を用いて培養した培養物を抽出し、合計15,000以上のスクリーニングサンプル・ライブラリーを構築した。

3. 研究成果

1) 抗真菌剤の探索

C. albicans の凝集体形成阻害剤の探索

96穴プレート中の C. albicans の培養液中に血清及びアッセイサンプルを加え、凝集体の有無を肉眼で観察するスクリーニングを行った。これまでに約8000種の微生物培養濾液をアッセイにかけたところ、1サンプルが再現性良く C. albicans の凝集及び菌糸形成を阻害した。現在、その一種類について分画・精製を行っている。

真菌の蛋白質リン酸化にかかわる酵素阻害剤の探索

C. albicans の細胞周期関連遺伝子、CaKIN3, CaCDC5, CalPL1 の GST-融合蛋白質はそれぞれキナー

ゼ活性を保持しているが、リン酸化基質特異性については若干異なり、GST-CaKin3p と GST-CaIpl1p がミエリン塩基性蛋白質を好むのに対し、GST-CaCdc5p の場合はカゼインの方が好ましいことが明らかになった。また、既知の阻害剤に対する感受性を比較したところ、GST-CaKin3p と GST-CaIpl1p がスタウロスポリンや K252a などの阻害剤に感受性を示した。さらに K252a は GST-CaKin3p に対して IC₅₀ 値 100 nM 付近で阻害し、スタウロスポリンより 10 倍程度強い阻害活性を有することが判明した。しかし、GST-CaCdc5p はスタウロスポリンや K252a といった非特異性の高い阻害剤に対しても非感受性であった。

2) 抗癌剤の探索

polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル特異的阻害剤の探索

(1) S1319 (平成13年度)

海産物 800 エキスの中から、乳癌細胞に特異的に増殖抑制作用を示すものとして活性物質の完全精製を実施した結果、活性本体を S1319 (鈴木、新藤らが β 2-adrenoceptor agonist として見出した新規化合物) と同定した。S1319 の乳癌細胞 MDA-MB231 の polyHEMA プレート (足場非依存性増殖) における増殖抑制作用は IC₅₀ 10 ng/ml であった。一方で同じ細胞の plastic プレート (足場依存性増殖) では 10 μ g/ml でも全く増殖抑制作用を示さなかった。

(2) TT-2149

TT-2149 株の培養上清液 (10L) から、HP-20 樹脂カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取用 HPLC を経由して、TT-2149-A (0.3 mg)、B (0.6 mg)、C (0.3 mg) を得た。これらの内、TT-2149-A と B は未だ混合物であるため、TT-2149-C について構造解析を行った。この TT-2149-C の UV スペクトルは septacidin に良い一致を示し、分子量を 619、分子式を C₃₀H₄₉N₇O₇ と推定した。さらに、各種二次元 NMR データの解析を行い、TT-2149-C は septacidin またはその立体異性体である spicamycin の新規類縁体であると推定した。加えて、septacidin に癌化シグナル抑制作用を確認した。

(3) anicequol の作用の解析

anicequol 処理細胞内では、リボゾーム S6 サブユニットのリン酸化が確認され、基質に接着していない細胞にのみカスパーゼ 3 の活性化が見られた。また、anicequol の作用は PI3K 阻害剤によって抑制された。anicequol 類縁体である TPU2013 のビオチン化合物を作製し、これに結合するタンパク質を探索したところ、40 kDa のものを始めとしたいくつかのタンパク質に共有結合することが明らかとなった。

(4) hypothemycin

真菌ライブラリーから約 6,400 のサンプルを polyHEMA スクリーニングに供試した。その結果、33 株に活性が見つかり、合計 9 株について予備分画に進めた。いずれも菌類寄生菌であり、F 2422、F 2420、F 2571 は *Hypomyces subiculosus*、F 2699 と F 2705 は *Hypomyces* spp.、F 2469 は *Nectria* sp. であった。このうち最も活性の高い F 2422 について活性物質の単離精製を行った結果、hypothemycin 類と同定された。現在本物質の有用性について検討中であり、ほかの菌株についても精製を継続中である。

癌細胞遊走阻害物質とアポトーシス抑制タンパク質の機能阻害物質の探索

癌細胞遊走阻害物質として *Aspergillus* の生産する cylindrol F を再発見した。cylindrol F は 10 μ g/ml の濃度で食道癌 EC17 細胞の遊走を完全に阻害した。また、癌細胞遊走阻害物質として発見した migrastatin は、vinblastine (VBL) の細胞内濃度を上昇させることにより、VBL の効果を増強させる活性を有することを見いだした。また、Bcl-XL のアポトーシス抑制機能の阻害物質として、微生物培養液より V-ATPase 阻害剤である destruxin E や concanamycin B を単離した。

ハイポキシア応答エレメントを用いた血管新生制御物質の探索

約 860 検体の生薬予備抽出物について HIF-1 α 活性阻害作用を検討したところ、flavonoid を含む数種の生薬に活性が認められた。しかし HIF-1 α 活性阻害作用は、flavonoid 骨格と関連性は見られなかったので、構造的に珍しい homoisoflavone に着目して HIF-1 α 活性阻害と血管新生阻害機構を検討した。その結果、HIF-1 α が活性化されることによって誘導される VEGF の mRNA 発現への影響を濃度依存的に VEGF mRNA の発現が抑制されることが示された。メカニズムの解析から、VEGF mRNA 発現の抑制は HIF-1 α 蛋白の減少によるものであると考えられた。さらに、in vitro の血管新生モデルである HUVEC の管腔形成も阻害した。

3) アルツハイマー予防・治療薬の探索

タウを発現させた HEK293T 細胞にアミロイドペプチド(Aβ42)を作用させて細胞死を観察するアルツハイマー症モデルを構築した。一方、MARK の阻害剤として単離した K252a や 3,9-diOH-acriafavin A は、本モデル系同様、神経細胞 PC12D 細胞系においても Aβ42 による細胞死を濃度依存的に抑制した。

4. 考察・まとめ

抗真菌剤の探索について

凝集体形成阻害活性を指標とするスクリーニングの結果、*C. albicans* の成育は阻害しないが、菌糸形成・凝集体形成を阻害するサンプルが取得できた。今後は、ポジティブであったサンプルについて、阻害物質の精製・単離・構造決定を行っていく予定である。一方、*C. albicans* の細胞周期関連遺伝子産物の組み替え蛋白質が容易に調整できる発現系を確立できたことから、今後、阻害剤探索研究に使用する大量の酵素が供給できると考えられる。また、既知の阻害剤の検索から、GST-CaKin3p と GST-CaIpl1p がスタウロスポリンや K252a に感受性であることが判明したが、スタウロスポリンや K252a はプロテインキナーゼCなど多数のキナーゼ群の ATP 結合ポケットに結合しキナーゼ活性阻害効果を示すと考えられていることから、今後、スタウロスポリンや K252a の誘導体を検索すれば、より特異性の高い化合物が見出される可能性が期待される。一方、CaCdc5p は、スタウロスポリンや K252a に非感受性であることから、全く別の骨格を持った化合物や天然物ソースから探索することが重要と考えられる。

抗癌剤とアルツハイマー治療薬の探索について

海産物から得られた S1319 の作用を検討するため、市販のβ2 adrenoceptor agonist である salbutamol, isoprenol の作用も検討した結果、これらの化合物にも足場非依存性増殖における増殖抑制作用が認められた。従って、おそらくβ2 adrenoceptor を介したシグナル伝達機構を介して増殖抑制作用を示すと考えられる。このようなβ2 adrenoceptor agonist の作用は新発見であり、全く新たな乳癌治療薬の切り口が見つかったのではないかと考えられた。

アオキの葉由来の放線菌 TT-2149 株が産生する癌細胞足場非依存性増殖阻害物質は、その後の生産培地検討にも関わらず極々低生産で、本研究の進展を著しく困難にしている。多様な試みの結果、10 L の培養液から TT-2149-C (0.3 mg) の単離に成功し、本物質が septacidin 或いは spicamycin の新規類縁体であることを明らかにした。加えて、septacidin にも癌化シグナル抑制作用を確認出来たので、より詳細な構造活性相関を検討すべきと考えている。

anicequol の作用機構として PI3K の過剰な活性化の誘導が考えられた。基質接着細胞においては、基質への接着から始まる生存シグナルによって、アポトーシスの誘導が抑えられるものと考えられた。TPU2013 に共有結合するタンパク質については、anicequol との結合の有無についてさらに検討を加える必要がある。

癌細胞の遊走を阻害する薬剤は、抗転移活性や血管新生阻害活性が期待される。カビ培養液から遊走阻害剤として単離した cylindrolF は、ファルネシルトランスフェラーゼの阻害活性が報告されている。また、EC17 細胞は他の食道癌細胞に比べて極めて高い遊走能を持っているが、Ras mRNA の発現量も著しく高かった。このことからことから、EC17 細胞の遊走には Ras の関与が示唆された。アポトーシス抑制においては、V-ATPase 阻害剤が Bcl-XL と BAX の結合を阻害することなく Bcl-XL のアポトーシス抑制機能を阻害した。また、細胞内 V-ATPase 阻害濃度と Bcl-XL のアポトーシス抑制機能阻害濃度域が完全に一致したことから、細胞内 pH 変化が Bcl-XL の機能を抑制していることが考えられる

低酸素下で HIF-1α 蛋白量が著しく増加するが、この増加は蛋白質の低酸素下での安定化によるものであることが知られている。再酸素化によって HIF-1α は非常に速やかに分解されるが、この急速な HIF-1α の分解には Ubiquitin-proteasome による蛋白質分解機構が関与し、さらに、癌抑制遺伝子の一種である von Hippel-Lindau (VHL) 遺伝子が関与していることが知られている。一方、hypoxia での HIF-1α の安定性については、p53 が関与し、p53/MDM2 により Ubiquitin-proteasome の分解系で分解を受けることが明らかにされている。今回見出されたフラボノイドは、proteasome および p 5 3 依存的に HIF-1α の分解を促進していたので、今後、HIF-1α 蛋白減少の分子機構を解析すると共に、in vivo での効果を検討していく予定である。

アルツハイマー症の治療薬については、我々が構築したアルツハイマー症のモデル系を用いて、Aβ42 による細胞死阻害物質を探索する予定である。

微生物分離について

過去 2 年間に国内各地から様々な分離源を採集して菌類を分離した結果、泥炭から分離した *Tolypocladium cylindrosporum*、*Acremonium guillematii*、各種菌蕈類から分離した *Hypomyces armeniacus*、*Tylophilus valens* から分離した *Hypomyces completes*、*C. versicolor* から分離した *H.*

broomeanus, *Crepidotus* sp.から分離した *Hypomyces tremellicola* は日本新産種であり、八丈島の土壌から分離した *Idriella* sp.、朽ち木から分離した *Chaetopshaeria* sp.、ヒダナシタケ目キノコの子実体より分離した 2 種の *Hypomyces* 属と 1 種の *Cladobotryum* 属菌は新種と考えられる。このように、多くの日本新産種、新種を発見できたことから、我が国には未知の多様な菌類が生息しており、今後も探索を継続する意義があることを示唆している。また、これまで、他の生物と関わり合いのある菌類にターゲットを絞り分離を続けてきた結果、数種の *Hypomyces* およびその関連属に polyHEMA スクリーニング活性が見いだされたのは興味深い。

5. 研究発表

1. Cho, S. I., Fukazawa, H., Honma, Y., Kajiura, T., Hori, H., Igarashi, Y., Furumai, T., Oki, T. and Uehara, Y. Effects of hibarimicins and hibarimicin-related compounds produced by *Microbispora* on v-src kinase activity and growth and differentiation of human myeloid leukemia HL-60 cells. **J. Antibiotics** 55, 270-278, 2002.
1. Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., and Uehara, Y. MEK inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated ERK pathway. **Mol. Cancer Therap.** 1, 303-309, 2002.
1. Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M and Uehara, Y. Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans*. **Yeast** 19, 611-618, 2002.
1. Murakami, Y., Fukazawa, H., Kobatake, T., Yamagoe, S., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M, and Uehara, Y. A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. **Antiviral Res.** 55, 161-168, 2002.
1. Ishino, K., Fukazawa, H., Shikano, M., Ohba, M., Kuroki, T. and Uehara, Y. Enhancement of anchorage-independent growth of human pancreatic carcinoma MIA PaCa-2 cells by signaling from PKC to MAP kinase. **Mol. Carcino.** 34, 180-186, 2002.
1. Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y. and Uehara, Y.: Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. **J. Biol. Chem.** 277, 39655-39665, 2002.
1. Wada, S. Niimi, M. Niimi, K. Holmes, A. R. Monk, B. C. Cannon, R. D. and Uehara, Y.: *Candida glabrata* ABC transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. **J. Biol. Chem.** 277, 46809-46821, 2002
1. Masuoka Y., Shin-Ya K., Furihata K., Nagai K., Suzuki K., Hayakawa Y., and Seto H. Phoenistatin, a new gene expression-enhancing substance produced by *Acremonium fusigerum*. **J. Antibiotics** 54, 187-90, 2001.
1. Masuoka Y., Nagai A., Shin-ya K., Furihata K., Nagai K., Suzuki K., Hayakawa Y., and Seto H., Spiruchostatins A and B, novel gene expression-enhancing substances produced by *Pseudomonas* sp. **Tetrahedron Letters** 42, 41-44, 2001.
1. Taniguchi M., Nagai K., Watanabe M., Mimura N., Suzuki K., and Tanaka A. YM-181741, A novel benz[*a*] anthraquinone antibiotic with anti-helicobacter pylori activity from *Streptomyces* sp. **J. Antibiotics** 55, 30-35, 2002.
1. Nagai K., Kamigiri K., Matsumoto H., Kawano Y., Yamaoka M., Simoi H., Watanabe M., and Suzuki K. YM0202204, a new antifungal antibiotic produced by marine fungus *Phoma* sp. **J. Antibiotics** 55, 1036-1041, 2002.
1. Huang, G., Okabe, M., Kahar, P., Tsunekawa, H., and Park, Y.: Optimization of tylosin feeding rate profile in production of acetyl-isovaleryl tylosin(AIV) from tylosin by *Streptomyces thermotolerans* YN554. **J. Bioscience Bioengineering** 91, 504-508, 2001.
1. Fujii T., Mukaihara M., Agematsu H., and Tsunekawa H. Biotransformation of L-lysine to L-pipecolic acid catalyzed by L-lysine 6-aminotransferase and pyrroline-5-carboxylate reductase. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66, 622-627, 2002.
1. M. Shintani, A. Okazaki, T. Masuda, M. Kawada, M. Ishizuka, Y. Doki, I. B. Weinstein and M. Imoto: Overexpression of cyclin D1 contributes to malignant properties of esophageal tumor cells by increasing VEGF production and decreasing Fas expression. **Anticancer Res.** 22: 639-647, 2002.
1. H. Nakamura, Y. Takahashi, H. Naganawa, K. Nakae, M. Imoto, M. Shiro, K. Matsumura, H. Watanabe and T. Kitahara: Absolute configuration of migrastatin, a novel 14-membered ring macrolide. **J. Antibiotics** 55: 442-444, 2002.
1. Y. Yoshimoto and M. Imoto: Induction of EGF-dependent apoptosis by vacuolar-type H⁺-ATPase inhibitors in A431 cells overexpressing the EGF receptor. **Exp. Cell Res.** 279, 118-127, 2002
1. Y. Yoshimoto, T. Jyojima, T. Arita, M. Ueda, M. Imoto and S. Matsumura, K. Toshima: Vacuolar-type H⁺-ATPase inhibitory activity of synthetic analogues of the concanamycins: Is the hydrogen bond network involving the lactone carbonyl, the hemiacetal hydroxy group, and the C-19 hydroxy group essential for the biological activity of the concanamycins?. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 12(24): 3525-3528, 2002.
1. E. Tashiro, H. Maruki, Y. Minato, Y. Doki, I. B. Weinstein, and M. Imoto: Over expression of cyclin D1 contributes to malignancy by up-regulation of FGF receptor 1 via the pRB/E2F pathway. **Cancer Res.** 63: 424-431, 2003.
2. M. Kawatani, M. Uchi, S. Simizu, H. Osada, and M. Imoto: Transmembrane domain of Bcl-2 is required for

- inhibition of ceramide synthesis, but not cytochrome *c* release in the pathway of inostamycin-induced apoptosis. **Exp. Cell Res.** in press.
3. J. Nakazawa, J. Yajima, T. Usui, M. Ueki, A Takatsuki, M. Imoto, Y. Y. Toyoshima, and H. Osada; A novel action of terpendole E on the motor activity of mitotic kinesin Eg5. **Chemistry & Biology** in press.
 4. Shibanuma, M., Iwabuchi, Y., and Nose, K. Possible involvement of Hic-5, a focal adhesion protein, in the differentiation of C2C12 myoblasts. **Cell Stru. Functions** 27: 21-27. 2002.
 5. Nishiya, N., Shirai, T., Suzuki, W., and Nose, K. Hic-5 interacts with GIT1 with a different binding mode from paxillin. **J. Biochem. (Tokyo)** 132: 279-289. 2002.
 6. Egawa, K., Kurihara, Y., Ito, T., Matsumoto, M., and Nose, K. Induction of p16INK4a transcription and of cellular senescence by aclacinomycin-derivatives and cardiac glycosides. **Biol. Pharm. Bullet.** 25. 461-465. 2002.
 7. Kurihara, Y., Egawa, K., Kunimoto, S., Takeuchi, T., and Nose, K. Induction of p16/INK4a gene expression and cellular senescence by toyocamycin. **Biol. Pharm. Bullet.** 25. 1271-1276. 2002.
 8. Kawada, M., Usami, I., Ohba, S., Someo, T., Kim, J.W., Hayakawa, Y., Nose, K., and Ishizuka, M. Hygrolidin induces p21 expression and abrogates cell cycle progression at G1 and S phases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 298. 178-183. 2002.
 9. Kim-Kaneyama, J., Shibanuma, M., and Nose, K. Transcriptional activation of the c-fos gene by a LIM protein, Hic-5. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 299. 360-365. 2002.
 10. Shibanuma, M., Kim-Kaneyama, J., Sato, S., Ishino, K., Sakamoto, N., Mashimo, J., and Nose, K. Hic-5 communicates between focal adhesions and the nucleus through oxidant-sensitive nuclear export signal. **Mol. Biol. Cell** in press.
 11. Hori, H., Kajiura, T., Igarashi, Y., Furumai, T., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y., and Oki, T. Biosynthesis of Hibarimicins. I. ¹³C-labeling experiments. **J. Antibiotics** 55: 46~52, 2002.
 12. Kajiura, T., Furumai, T., Igarashi, Y., Hori, H., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y., and Oki, T. Biosynthesis of Hibarimicins. II. Elucidation of biosynthetic pathway by cosynthesis using blocked mutants. **J. Antibiotics** 55: 53~60, 2002.
 13. Igarashi, Y., Kajiura, T., Furumai, T., Hori, H., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y., and Oki, T. Biosynthesis of Hibarimicins. III. Structures of new hibarimicin-related metabolites produced by blocked mutants. **J. Antibiotics** 55: 60~70, 2002.
 14. Igarashi, Y., Yoshida, R., and Furumai, T. Plant bioactive secondary metabolites of plant-associated Actinomycetes. **Regulation Plant Growth & Development** 37: 63~68, 2002.
 15. Furumai, T., Igarashi, Y., Higuchi, H., Saito, N., and Oki, T. Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. **J. Antibiotics** 55: 128~133, 2002.
 16. Igarashi, Y., Sekine, A., Fukazawa, H., Uehara, Y., Yamaguchi, K., Endo, Y., Okuda, T., Furumai, T., and Oki, T. Anicequol, a novel inhibitor for anchorage-independent growth of tumor cells from *Penicillium aurantiogriseus* Dierckx TP-F0213. **J. Antibiotics** 55: 371~376, 2002.
 17. Furumai, T., Eto, E., Sasaki, T., Higuchi, H., Onaka, H., Saito, N., Fujita, T., Naoki, N., and Igarashi, Y. TPU-0037-A, B, C and D, novel lydicamycin congeners with anti-MRSA activity from *Streptomyces platensis* TP-A0598. **J. Antibiotics** 55: 873~880, 2002.
 18. Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y., and Furumai, T. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. **J. Antibiotics** 55: 1063~1071, 2002.
 19. Suzuki, S., Okuda, T., and Komatsubara, S. Selective isolation and distribution of the genus *Planomonospora* in soils. **Can. J. Microbiol.** 47: 253-263, 2001.
 20. Isshiki, K. Asai, Y., Tanaka, S., Nishio, M., Okuda, T., Komatsubara, S. and Sakurai, S. Aurantiamide acetate, a selective cathepsin inhibitor, produced by *Aspergillus peincilloides*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 1195-1197, 2001.
 21. Suzuki, S., Okuda, T., and Komatsubara, S. Selective isolation and study on the global distribution of the genus *Planobispora* in soils. **Can. J. Microbiol.** 47: 979-986, 2001.
 22. Hirano, N., Kohno, J., Tsunoda, S., Nishio, M., Kishi, N., Okuda, T., Kawano, K., Komatsubara, S. and Nakanishi, N. TMC-69, a new antitumor antibiotic with Cdc25A inhibitory activity, produced by *Chrysosporium* sp. TC1068 Taxonomy, fermentation and biological activity. **J. Antibiotics** 54: 421-427, 2001.
 23. Murakami, Y., Okuda, T., and Shindo, K. Roridin L, M and verrucarin M, new macrocyclic trichothecene group antitumor antibiotics, from *Myrothecium verrucaria*. **J. Antibiotics** 54: 980-983, 2001.
 24. Tokiwa, T. and Okuda, T. Japanese fungicolous ascomycetes, three *Hypomyces* species. **Trans. Mycol. Soc. Japan** 42: 199-209, 2001.
 25. Yajima, K., Ohgaru, T., Hashimoto, Y., Suto, N. and Okuda, T., An effective tool for homogeneous assays using a simple robot arm with stackers – TRISTAN. **J. Biomol. Screening** 7: 89-94, 2002.
 26. Shindo, K., Suzuki, H. and Okuda, T., Paecilopeptin, a new cathepsin S inhibitor produced by *Paecilomyces carneus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66: 2444-2448, 2002.
6. 知的所有権の取得状況 (なし)