

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 ……	1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 ……	6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 ……	19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 ……	25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 ……	33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 ……	39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 ……	47
902A KH21016	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	上原至雅 ……	51
903A KH21017	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 ……	55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 ……	59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 ……	62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 ……	74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 ……	84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 ……	89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 ……	95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 ……	104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 ……	111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 ……	118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 ……	121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 ……	125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 ……	133

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

研究要旨 微生物由来の天然物中にシグナル伝達の特異的阻害剤を探索した。抗真菌薬の探索からは anisomycin と enniatin が同定された。抗癌物質として spicamycin の新規類縁体 TT2149-C を見出した。また、癌細胞の転移抑制候補物質として新規物質 gerfelin を見出した。

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 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

A. 研究目的

高齢化がすすむにつれ、感染症や癌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した。

B. 研究方法

(1) 抗真菌剤の探索

C. *albicans* の菌糸形成阻害物質の探索

深在性真菌症の主要原因菌である *C. albicans* は、病巣において菌糸形成を行うことによって病原性を発揮すると考えられている。本研究においては、菌糸形成を阻害する物質の活性評価系を確立し探索を行った。具体的には、血清培養では菌糸成育を阻害するが、通常の培地における成育は阻害しない物質を約 12,000 サンプルの微生物培養濾液から探索を行った。

ポンプ阻害剤の探索

C. albicans のアゾール系抗真菌剤に対する耐性獲得には薬剤排出ポンプが関与しているこ

とが多いことから、ポンプ阻害剤の探索を行った。フルコナゾール高度耐性ポンプ過剰発現株をフルコナゾール含有（および含まない）YPD 培地全体に接種後、微生物培養濾液を含む感受性ディスクを培地表面に置き、フルコナゾール共存下でディスク周囲に阻止円を生じるサンプルを探索した。

(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

新しい抗癌剤リードの発見をめざし、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、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 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。

GGPP 合成酵素阻害剤の探索

スクリーニングに用いた GGPP 合成酵素は、ヒト GGPP 合成酵素 cDNA を pGEX2T にサブクローニングし、GST-GGPP 合成酵素融合タンパク質として大腸菌に発現させ、GSH ピーズを用いて精製した。このようにして得られた GGPP 合成酵素を基質としての [¹⁴C]IPP、FPP および微生物培養液サンプルと共に反応させ、生成した [¹⁴C]GGPP の放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

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) 遺伝子の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) 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

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、各種培地にて培養した。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）。

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 20 g または 20 ml を 250 ml 容三角フラスコにいれて、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 240 μ l 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。

前年度までに、アオキの葉由来放線菌 TP-0648 株の培養液から癌細胞足場非依存性増殖阻害物質を単離し、それが spicamycin 新規類縁体であることを報告した。本年度は最終的にその構造を決定するため、500 - ml 容フラスコによる大量培養（約

1,500 本）を行い、活性物質 TT-2149-C 物質の単離・精製及び構造確認を行った。また、生産菌の分類学的検討を行った。加えて、このアッセイ系で発見した新規物質 anicequol の作用と構造活性相関について検討した。

C. 研究結果

(1) *C. albicans* の二形性および薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

探索の結果、1 サンプルが菌糸特異的阻害剤としてヒットし、分画精製・同定の結果、蛋白合成阻害剤 anisomycin であることが判明した。

ポンプ阻害剤の探索においては、フルコナゾールとの併用によって複数のサンプルに高度耐性菌の発育阻害活性が認められ、それらは主に cyclodepsipeptide alkali metal ionophore の enniatin であることが分かった。

(2) polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル抑制物質の探索

新規抗癌剤リードの発見をめざし、足場非依存性増殖阻害を指標に天然物の中に探索を行った。放線菌の生産する活性物質 TT-2149 の精製を行い、その一成分である TT-2149-C について構造を解析し、spicamycin の新規類縁体であることを決定した。真菌由来の新規テルペノイド anicequol の作用を解析し、足場非存在下の細胞においてのみ apoptosis を誘導することを見いだした。

(3) ゲラニルゲラニル基合成酵素阻害剤の開発

Rho, Rac, Cdc42 などは癌細胞の浸潤、転移に関わる低分子量 G タンパク質であり、ゲラニルゲラニル化されることにより活性化される。そこで、抗転移活性を有する新しい抗癌剤の開発を目的にゲラニルゲラニル基合成酵素 (GGPP 合成酵素) の阻害剤の探索を行い、カビの培養液から新規化合物 gerfelin を発見した。gerfelin は、癌細胞の浸潤に対して、弱い抑制活性しか示さなかった。そこで、誘導体合成を試みた結果、gerfelin をメチル化した methylgerfelin は、*in vitro* での GGPP 合成酵素阻害活性は gerfelin と同等であったが、細胞に対する膜透過性が向上し、B16 メラノーマ細胞に対する浸潤抑制活性は gerfelin より 10 倍強い活性を示した。

(4) 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

HIF-1 α / luciferase 系を用い、微生物培養液

1350種類について HIF-1 α 活性阻害を評価した。その結果、カビ由来培養液2種類について再現性のある阻害が見られたため、これらの活性成分の分離、精製を行った。活性物質として efrapeptin F および melinacidin II が同定された。また、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。

D. 考察

真菌はヒト細胞と同じ真核細胞であるために、真菌の生育のみを選択的に阻害する薬剤を見出すのは本質的に難しい。近年開発され細胞壁合成を標的としたキャンディン系薬剤は、その意味で希有なクラスの抗真菌剤である。しかし新しい抗真菌剤の開発は常に必要であり、また耐性を克服することによって安全性に優れているアゾール剤の臨床的な有効寿命を延ばすことにもなる。

今回考案した *C. albicans* の菌糸形成阻害物質を探索するためのアッセイ系は非常に簡便である。1次スクリーニングは、菌の増殖は阻害しないが、菌糸形成・凝集体形成を阻害するサンプルを選別する系であり、短時間で容易に結果が得られた。今回はこのスクリーニング系を用いて菌糸形成阻害物質として anisomycin が見出されたが、この物質の菌糸形成阻害に関する作用機作を探る必要がある。また、この系は新規の菌糸形成阻害物質の探索に有用であることが示された。

次に耐性克服の一つの手段として薬剤排出ポンプ阻害物質をアゾール剤と併用する可能性がある。ポンプ阻害剤との併用により、アゾール剤はポンプに汲みだされることなく真菌細胞内で有効濃度が保たれ、耐性菌の増殖をも阻止することが期待される。我々はこのような阻害剤のスクリーニングを目的として、排出ポンプ発現系を用いて真菌の薬剤排出ポンプを標的分子とする阻害剤の探索を試みた。我々の開発した薬剤排出ポンプ発現系も、排出ポンプ阻害剤スクリーニングの評価及びポンプ機能の解析を行うのに非常に優れていることが証明された。

アオキの葉内生放線菌として分離され、*Streptomyces thermoviolaceus* TP-A0648 と同定された放線菌の産生する癌化シグナル抑制物質 TT-2149-C が新規物質であると確定した。本物質は septacidin あるいは spicamycin の類縁体であるが、spicamycin の誘導体 KRR5500 が Phase I 試験中であることを考慮し、本物質

の特許出願を検討している。また、anicequol の構造活性相関の解析が進展したので、この知見を生かした新規誘導体調製を計画している。

methylgerfelin は in vitro での GGPP 合成酵素阻害活性は gerfelin と同等であったが、細胞内での低分子量 G タンパク質の活性化や浸潤に対する阻害効果は gerfelin よりも 10 倍低い濃度で有効であった。これらのことから methylgerfelin は新しいタイプの転移抑制剤になる可能性が期待され、現在マウスを用いた実験転移系での動物実験評価を行っている。

カビ由来培養液2種類から HIF-1 α 活性阻害活性物質が分離され、それぞれ efrapeptin F および melinacidin II が同定された。前者はペプチドを含む抗生物質であり、既にミトコンドリアの複合体IVに作用して ATP 合成酵素を阻害することが知られている。後者は dioxopiperazine 骨格を持つ既知物質であった。ミトコンドリアの呼吸鎖阻害剤は一般的に HIF-1 α 活性阻害を起こすことが明らかとなった。そこで、ミトコンドリアの呼吸鎖阻害剤として知られている antimycin、oligomycin、rotenon について検討した結果、これらも HIF-1 α 活性阻害を起こすことが明らかとなり、電子伝達系阻害によるラジカル産生が HIF-1 α 活性阻害のメカニズムと考えられる。

創薬資源として、天然物はその化学的、生物学的多様性において合成化合物とは異なった特質を有している。特に抗菌、抗真菌、抗癌、免疫抑制、および抗脂血症剤などの領域でのこれまでの成功例は特筆に値する。本研究においては、それぞれの企業と大学が独自の技術で分離した微生物（例えば希少放線菌類、動植物共生・寄生細菌類、特殊環境に生息するかび類など）の二次代謝産物由来の生物活性物質を探索源に利用することでいくつかの新規物質の発見につながった。今後も、各種疾病の治療に係わる新しい標的とスクリーニング法を組み合わせることで、創薬リード化合物が微生物二次代謝産物から発見される可能性が期待される。

E. 結論

微生物等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。真菌症の治療薬探索系からは anisomycin と enniatin に新しい生物活性を見出した。癌化シグナル阻害物質として spicamycin の新規類縁体 TT2149-C の構造を決定した。また、癌細胞の転移抑制を目的に GGPP 合成酵素阻害剤を探索し新規物質 gerfelin を見出した。HIF-1 α の発現誘導の阻

害物質の探索からは efrapeptin F 等を見出した。得られた spicamycin の新規類縁体や gerfelin について、今後医薬品としての開発の可能性を追求する。微生物代謝産物は創薬の宝庫であり、実績が示すようにわが国は放線菌や糸状菌などの微生物から活性物質を探索する能力においては世界をリードしている。今後も、企業や大学との共同研究を通じて微生物資源を活用することが肝要である。

F. 研究発表

1. Uehara, Y. Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Current Cancer Drug Targets* 3, 319-324, 2003.
2. Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makinura, K., Niimi, M., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe, N., Nishimura, K and Miyaji, M. The trend of imported mycoses in Japan. *J. Infec. Chemother.* 9, 16-20, 2003.
3. Gutzkow, KB., Lahne, HU., Naderi, S., Torgersen, KM., Skaalhegg, B., Koketsu, M., Uehara, Y. and Blomhoff, HK. Cyclic AMP inhibits translation of cyclin D3 in T-lymphocytes at the level of elongation by inducing eEF2-phosphorylation. *Cellular Signalling* 15, 871-881, 2003.
4. Hori, H., Nagasawa, H., Uto, Y., Ohkura, K., Kirk, KL., Uehara, Y., Shimamura, M. Design of hypoxia-targeting protein tyrosine kinase inhibitor using an innovative pharmacophore 2-methylene-4-cyclopentene-1,3-dione. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 29-38, 2004
5. S. Zenitani, S. Tashiro, K. Shindo, K. Nagai, K. Suzuki and M. Imoto: Gerfelin, a novel inhibitor of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Beauveria felina* QN22047. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological activities. *J. Antibiot.* 56: 617-621 (2003)
6. S. Zenitani, S. Tashiro, K. Shindo, M. Sekiguchi, M. Nishimori, K. Suzuki and M. Imoto: Gerfelin, a novel inhibitor of geranylgeranyl diphosphate synthase from *Beauveria felina* QN22047. II. Structural elucidation. *J. Antibiot.* 56: 658-660 (2003)
7. E. Tashiro, Y. Minato, H. Maruki, M. Asagiri and M. Imoto: Regulation of FGF receptor-2 expression by transcription factor E2F-1. *Oncogene* 22: 5630-5635 (2003)
8. M. Kawatani and M. Imoto: Deletion of the BHI Domain of Bcl-2 Accelerates Apoptosis by

- Acting in a Dominant Negative Fashion. *J. Biol. Chem.* 278: 19732-19742 (2003)
9. 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.* 286: 57-66 (2003)
 10. 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*, 10: 131-137 (2003)
 11. E. Tashiro, H. Maruki, Y. Minato, Y. Doki, I. B. Weinstein, and M. Imoto : Overexpression of Cyclin D1 Contributes to Malignancy by Up-Regulation of FGF Receptor 1 via the pRB/E2F Pathway. *Cancer Res.* 63: 424-431 (2003).
 12. Shibanuma, M., Kim-Kaneyama, J., Sato, S., and Nose, K. A LIM protein, Hic-5, functions as a potential coactivator for Sp1. *J. Cell. Biochem.* 91: 933-645 (2004).
 13. Hasebe, H., Egawa, K., Yamazaki, Y., Kunimoto, S., Hirai, Y., Ida, Y., and Nose K. Specific Inhibition of HIF-1 α Activation and of VEGF Production by Flavonoids. *Biol. Pharm. Bullett.* 26:1379-1383 (2003)
 14. 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* 14: 1158-1171 (2003).
 15. Sakurai, M., Nishio, M., Yamamoto, K., Okuda, T., Kawano, K., and Ohnuki, T. TMC-264, a novel antiallergic heptaketide produced by the fungus *Phoma* sp. TC 1674. *Org. Lett.* 5: 1083-1085 (2003)
 16. Sakurai, M., Hoshino, H., Kohno, J., Nishio, M., Kishi, N., Okuda, T., Kawano, K., and Ohnuki, T. TMC-260, a new inhibitor of IL-4 signal transduction produced by *Acremonium kiliense* Gruetz TC 1703. *J. Antibiot.* 56: 787-791 (2003)

F. 和文論文、学会発表 省略

- #### G. 知的財産権の出願・登録状況
- 2 件申請中
1 件申請準備中

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社