

Figure 6 Identification of downstream target genes of Fra-2 in adult T-cell leukemia (ATL). (a) Microarray analysis. ST1 cells were transfected with control siRNA or Fra-2 siRNA. After 48 h, microarray analysis was performed using the Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0 array. Four independent transfection samples were analysed for each group. Each column represents the expression level of a given gene in an individual sample. Red represents increased expression and blue represents decreased expression relative to the normalized expression of the gene across all samples. We computed the statistical significance level for each gene between the Fra-2-knockdown group and the control group with a mean fold change of > 3 by the *t*-test ($P < 10^{-3}$). (b) Reverse transcription (RT)-PCR analysis. HUT102 and ST1 cells were transfected with control siRNA or siRNA for Fra-2 or JunD. After 48 h, the expression of c-Myb, BCL-6, MDM2 and GAPDH was determined by RT-PCR. The representative results from three separate experiments are shown. (c) RT-PCR analysis. Normal CD4⁺ T cells from healthy donors ($n = 3$; purity, > 96%) and PBMC from ATL patients ($n = 6$; leukemic cells, > 90%) were examined for the expression of c-Myb, BCL-6 and MDM2 by RT-PCR. The representative results from two separate experiments are shown.

various AP-1 family members in primary ATL cells (patient nos. 1 and 5) and in some ATL cell lines expressing Tax (Figures 2a and b). However, the constitutive expression of Fra-2, JunD and JunB in freshly isolated primary ATL cells and ATL cell lines is apparently independent from Tax expression (Figures 2a and b). This is further supported by the finding that CCR4-expressing HTLV-1-negative CTCL cell lines also constitutively express Fra-2, JunB and JunD at high levels (Figure 2). By using JPX-9, which is a subline of Jurkat carrying the HTLV-1 Tax gene under the control of the metallothionein gene promoter (Nagata *et al.*, 1989), we have also confirmed that Fra-2 is not inducible by Tax (data not shown).

The CCR4 promoter was potently activated by the Fra-2/JunB and Fra-2/JunD heterodimers (Figure 3a). Fra-2, JunB and JunD were also shown to bind specifically to the AP-1 site in the CCR4 promoter *in vitro* by the NoShift binding assays and *in vivo* by the ChIP assays (Figures 4a and b). By using the siRNA knockdown technique, however, only Fra-2 siRNA and JunD siRNA efficiently suppressed CCR4 expression and cell growth in ATL cell lines (Figure 5). On the other hand, JunB siRNA showed little such effect (Figure 5). Therefore, it is likely that, at least in terms of CCR4 expression and cell proliferation, the Fra-2/JunD heterodimer plays a more dominant role than the Fra-2/JunB heterodimer in ATL cells. It thus remains to be determined whether the Fra-2/JunB heterodimer has any specific functions in ATL.

The most striking finding in the present study is the aberrant expression of Fra-2 in primary ATL cells. Fra-2 expression is essentially absent in normal CD4⁺ T cells under various conditions thus far examined (Figures 2a and c). Physiologically, Fra-2 is known to be expressed by various epithelial cells and in cartilaginous structures and has been shown to be required for efficient cartilage development (Karreth *et al.*, 2004). With regard to lymphoid cells, developing murine thymocytes were reported to express Fra-2 (Chen *et al.*, 1999). Previous studies have shown that individual homodimeric and heterodimeric AP-1 proteins have different functional properties and target genes (Shaulian and Karin, 2002; Eferl and Wagner, 2003). However, little is known about the target genes of Fra-2 and even less is known about the oncogenic role of Fra-2 in human malignancies. In this study, we have shown that CCR4 is the direct target gene of Fra-2 in association with JunD in ATL cells. Furthermore, we have shown that at least 49 genes are downregulated more than threefold in the ATL cell line ST-1 by Fra-2 siRNA (Figure 6). Among these genes, the proto-oncogenes c-Myb, BCL-6 and MDM2 (Oh and Reddy, 1999; Pasqualucci *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2003) are further confirmed to be dependent on the Fra-2/JunD heterodimer and to be expressed at high levels in primary ATL cells (Figure 6). It remains to be seen whether the Fra-2/JunD heterodimer directly induces these proto-oncogenes or indirectly maintains their expression by promoting cell growth.

c-Myb is the genomic homologue of the avian myeloblastosis virus oncogene v-Myb. c-Myb is widely

expressed in immature hematopoietic cells and also in various leukemias and carcinomas (Oh and Reddy, 1999; Shetzline *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2006). The target genes of c-Myb include the anti-apoptotic genes BCL-2 and BCL-X_L and also c-Myc (Ramsay *et al.*, 2003). Thus, c-Myb may promote the survival of ATL cells via BCL-2 and BCL-X_L (Galonek and Hardwick, 2006) and also cell cycle progression via c-Myc (Dang, 1999). BCL-6 was originally identified as the target gene of recurrent chromosomal translocations affecting 3q27 in non-Hodgkin's lymphoma. The expression of BCL-6 is frequently upregulated in diffuse large-cell lymphoma and follicular lymphoma through promoter substitution or somatic promoter point mutations (Ye *et al.*, 1993; Migliozza *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996). Frequent expression of BCL-6 has also been reported in some T-cell lymphomas (Kerl *et al.*, 2001). The BCL-6 protein has been shown to exert cell-immortalizing and anti-senescence activities (Shvarts *et al.*, 2002; Pasqualucci *et al.*, 2003). Thus, BCL-6 may also inhibit apoptosis and promote cell cycle progression in ATL. The MDM2 protein is a negative regulator of p53 and suppresses p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis (Vargas *et al.*, 2003). Elevated expression of MDM2 has been demonstrated in various types of human cancer (Rayburn *et al.*, 2005). Given that only a minor fraction of ATL cases have mutations affecting p53 (Cesarman *et al.*, 1992), the elevated expression of MDM2 may contribute to the functional downregulation of p53 in the majority of ATL cases.

CTCLs are a group of T-cell lymphomas derived from skin-homing memory T cells. CTCLs are not associated with HTLV-1 infection but resemble ATL and frequently express CCR4 (Ferenczi *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). Furthermore, CCR4 expression has been shown to be a consistent feature of the large-cell transformation of mycosis fungoides (Jones *et al.*, 2000). In the present study, we have shown that CTCL cell lines also express Fra-2, JunB and JunD at high levels (Figure 2b). Therefore, it is likely that aberrantly expressed Fra-2 in association with Jun proteins, particularly JunD, is also involved in CCR4-expression and cell proliferation in CTCLs.

In conclusion, we have shown that aberrantly expressed Fra-2 in association with JunD is responsible for CCR4 expression in ATL and is also likely to play an important role in ATL oncogenesis in part by inducing the expression of the proto-oncogenes c-Myb, BCL-6 and MDM2. Future studies are necessary to elucidate how the Fra-2/JunD heterodimer induces the expression of these proto-oncogenes and their individual roles in ATL oncogenesis. It also remains to be seen how ATL cells aberrantly express Fra-2 at high levels. Furthermore, the expression and function of Fra-2 in CTCLs remain to be determined.

Materials and methods

Cells

All the human T-cell lines used were described previously (Nagata *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1996; Hata *et al.*, 1999;

Yoshie *et al.*, 2002). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood samples obtained from healthy adult donors and acute ATL patients with a high leukemic cell count (>90%) by using Ficoll-Paque (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, USA). Normal CD4⁺ T cells (purity, >96%) were further prepared from PBMC by negative selection using an IMagnet system (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Activated CD4⁺ T cells were prepared by stimulating CD4⁺ T cells with anti-CD3 (clone HIT3a; BD Pharmingen) and anti-CD28 (clone CD28.2; BD Pharmingen) for 24 h. The preparation of naive CD4⁺CD45RA⁺ T cells and their polarization into Th1 and Th2 cells were performed as described previously (Imai *et al.*, 1999). Primary ATL cells and normal resting CD4⁺ T cells were used without culture for the experiments. This study was approved by the local ethical committee and written informed consent was obtained from each patient.

Transfection and luciferase assay

The major transcriptional start site (+1) of the human CCR4 gene was determined by the method of rapid amplification of cDNA 5'-ends and was found to be located 1797 bases upstream from the translation start codon (data not shown). To generate a promoter-reporter construct, the 1-kb promoter region of the human CCR4 gene (-983 to +25) was amplified from the genomic DNA by PCR using primers based on a GenBank genomic DNA sequence (accession no. NC_000003) and inserted into the reporter plasmid pGL3-Basic (Promega, Madison, WI, USA). Deletions and site-directed mutations were also performed using PCR. pGL3-2xAP-1 was constructed by introducing a sequence containing two copies of the AP-1 consensus binding site (TGATGACTCAGCCG-GAATGATGACTCAGCC) in front of a minimal CCR4 promoter pGL3 (-96/+25; Figure 1b). The coding regions of human FosB and GATA-3 were amplified from a cDNA library generated from phytohemagglutinin (PHA)-stimulated PBMC by PCR and cloned into the expression vector pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The coding region of HTLV-1 HBZ was amplified from a cDNA library generated from the HTLV-1⁺ T-cell line C8166 by PCR and cloned into the expression vector pEF4/myc-His A (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The expression vectors for c-Fos, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD and Tax were described previously (Iwai *et al.*, 2001). Cells (5×10^5) were transfected with 2 μ g of reporter plasmid, 0.5 μ g of expression plasmids for various transcription factors and 1 μ g of pSV- β -galactosidase using DMRIE-C (Invitrogen). After 24–27 h, luciferase assays were performed using a Luciferase Assay kit (Promega). Luciferase activity was normalized by β -galactosidase activity that served as an internal control for transfection efficiency.

RT-PCR

RT-PCR was carried out as described previously (Yoshie *et al.*, 2002). The primers used were as follows: +5'-AAGAA GAACAAGGCGGTGAAGATG-3' and -5'-AGGCCCTC TGCAGGTTTTGAAG-3' for CCR4; +5'-TACTACCACTC ACCCGCAGACTC-3' and -5'-CTTTCCCTTCGGATTCT CCTTTT-3' for c-Fos; +5'-TAGCAGCAGCTAAATGC AGGAAC-3' and -5'-CCAGCTGAAGCCATCTTCTT AG-3' for FosB; +5'-CAGTGGATGGTACAGCCTCA TTT-3' and -5'-GCCCAGATTTCTCATCTTCCAGT-3' for Fra-1; +5'-CCAGCAGAAATCCGGGTAGATA-3' and -5'-TCTCCTCTTCCAGGAGACAGC-3' for Fra-2; +5'-AAACAGAGCATGACCCTGAACCT-3' and -5'-CTC CTGCTCATCTGTACGTTCT-3' for c-Jun; +5'-AAAAT GGAACAGCCCTTCTACCA-3' and -5'-AGCCCTGACCA

GAAAAGTAGCTG-3' for JunB; +5'-AACACCCTTCT ACGGCGATGAG-3' and -5'-GGGTAGAGGAAGCTGTG AGCTCGT-3' for JunD; +5'-GAATTGGTGGACGGG CTATTATC-3' and -5'-TAGCACTATGCTGTTTCGCCT TC-3' for HBZ; +5'-CCGGCGCTGCTCTCATCCCCGGT-3' and -5'-GGCCGAACATAGTCCCCCAGAG-3' for Tax; +5'-AAGGCATCCAGACCAGAAACCG-3' and -5'-AGC ATCGAGCAGGGCTCTAACC-3' for GATA-3; +5'-CAGT GACGAGGATGATGAGGACT-3' and -5'-AACGTTTCG GACCGTATTTCTGT-3' for c-Myb; +5'-ATTCCAGCTT CGGAACAAGAGAC-3' and -5'-GTCCTTTTGATCAC TCCCACCTT-3' for MDM2; +5'-CAAGAAGTTTCTAGG AAAGGCCGG-3' and -5'-GATTGATCACACTAA GGTTCATT-3' for BCL-6 and +5'-GCCAAGGTCATCC ATGACAACCTTGG-3' and -5'-GCCTGCTTACCA CCTTCTTGATGTC-3' for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The amplification conditions were denaturation at 94°C for 30 s (5 min for the first cycle), annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s (5 min for the last cycle) for 34 cycles for CCR4; 35 cycles for c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, c-Jun, JunB, JunD, HBZ, Tax, c-Myb, BCL-6 and MDM2; 29 cycles for GATA-3 and 27 cycles for GAPDH. Amplification products were electrophoretically run on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

Quantitative real-time PCR was carried out using the TaqMan assay and a 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The conditions for PCR were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and then 50 cycles of 95°C for 15 s (denaturation) and 60°C for 1 min (annealing extension). The primers and fluorogenic probes for CCR4 and 18S ribosomal RNA were obtained from a TaqMan kit (Applied Biosystems). Quantification of CCR4 expression was performed using the Sequence Detector System Software (Applied Biosystems).

NoShift transcription factor assay

Anti-c-Fos (sc-52), anti-FosB (sc-7203), anti-Fra-1 (sc-22794), anti-Fra-2 (sc-604), anti-c-Jun (sc-1694), anti-JunB (sc-73) and anti-JunD (sc-74) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Transcription factors bound to specific DNA sequences were identified using the NoShift Transcription Factor Assay Kit (EMD Biosciences, Madison, WI, USA). Nuclear extracts were prepared from human T-cell lines by using the NucBuster Protein Extraction Kit (EMD Biosciences). The oligonucleotides used were as follows (differences underlined): TGGGAAATGACTAAGAATCAT for the biotinylated probe and unlabeled competitor of the AP-1 site and TGGGAAATGTCAAAGAATCAT for the mutated AP-1 site.

ChIP assay

This assay was performed using a ChIP assay kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) following the manufacturer's instructions. In brief, cells (1×10^6) were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The cell pellets were lysed with sodium dodecyl sulfate (SDS) lysis buffer and sonicated to shear DNA to a size range between 200 and 1000 bp. After centrifugation, the supernatant was diluted 10-fold in ChIP dilution buffer and incubated overnight at 4°C with 4 μ g of anti-Fra-2 (sc-604), anti-JunB (sc-73), anti-JunD (sc-74) or normal rabbit IgG (DAKO, Kyoto, Japan). Immunocomplexes were collected by adding protein A-agarose beads. The immune complexes were incubated at 65°C for 4 h to reverse the protein/DNA cross-links. DNAs were then purified by phenol/chloroform extraction and used as templates for quantitative real-time PCR. The primers and

the fluorogenic probe for the AP-1 site of the CCR4 promoter were as follows: primers: +5'-GGTCTTGGGAAATGACT AAGAATCA-3' and -5'-TCTCCCTCACCCAAGTACT AAGT-3'; probe: 5'-TCTGCTTCTACTTCTATCAAA AAACCCCACTTG-3'.

Immunological staining

Cells were spotted on a glass slide and fixed with 4% paraformaldehyde. Tissue sections were prepared from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsy tissue samples and subjected to microwave irradiation for 5 min three times in Target Retrieval Solution (DAKO). Slides and tissue sections were incubated for 1 h at room temperature with anti-Fra-2 (sc-604), anti-JunB (sc-73), anti-JunD (sc-74) or mouse monoclonal anti-CCR4 (KM-2160; Kyowa Hakko, Tokyo, Japan). Normal rabbit IgG and control mouse IgG₁ (DAKO) were used as negative controls. After washing, the slides and tissue sections were incubated with biotin-labeled goat anti-rabbit IgG or biotin-labeled horse anti-mouse IgG followed by detection using the Vectastain ABC/HRP kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finally, cells and sections were counterstained with Gill's hematoxylin (Polysciences, Warrington, PA, USA), dehydrated and mounted.

Transfection of siRNA

siRNAs for Fra-2 (SI00420455), JunB (SI03077445), JunD (SI00075985) and the negative control (1022064) were obtained from Qiagen (Hilden, Germany). Transfection experiments were performed using Amaxa Nucleofector (Amaxa, Cologne, Germany). Cells (1×10^6) were resuspended in 100 μ l of Nucleofector solution (T solution for MOLT-4, HUT102 and ST1 and V solution for Jurkat) and transfected with 2.5 μ g of siRNA using program O-17 for MOLT-4, HUT102 and ST1 and program S-18 for Jurkat. The transfection efficiency was ~95% as determined using fluorescent siRNA (Qiagen).

Cell proliferation assay

Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 0.5×10^4 per well and cultured. The number of viable cells was determined

every 24 h on a FACSCalibur system (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) by gating out cells stained with propidium iodide. To prepare stable transfectants of Fra-2 and JunD, the coding regions of human Fra-2 and JunD were inserted into the pIRES2-EGFP vector (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Jurkat cells were transfected with the plasmids using DMRIE-C (Invitrogen). Stable transfectants expressing green fluorescence protein were sorted by flow cytometry using FACS Vantage (Becton Dickinson).

Oligonucleotide microarray

Microarray analysis was performed as described previously (Igarashi *et al.*, 2007) using the Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). In brief, the ATL-derived cell line ST1 was transfected with control siRNA or Fra-2 siRNA. Four independent transfections were performed for each group. After 48 h, total RNA samples were prepared and confirmed to be of good quality with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). All microarray data have been submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession no. GSE6379). The analysis was performed using the BRB Array Tools software version 3.3.0 (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) developed by Richard Simon and Amy Peng.

Acknowledgements

We thank Namie Sakiyama for her excellent technical assistance. We also thank Dr Rich Simon and Dr Amy Peng for providing the BRB ArrayTools software. This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports and Technology, Japan; by Solution-Oriented Research for Science and Technology (SORST) from Japan Science and Technology Corporation and by High-Tech Research Center Project for Private Universities: matching fund subsidy from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, 2002–2009.

References

- Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* **278**: 43620–43627.
- Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G, Knowles DM. (1992). Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. *Blood* **80**: 3205–3216.
- Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R. (1996). BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6947–6952.
- Chen F, Chen D, Rothenberg EV. (1999). Specific regulation of fos family transcription factors in thymocytes at two developmental checkpoints. *Int Immunol* **11**: 677–688.
- Dang CV. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**: 1–11.
- Eferl R, Wagner EF. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **3**: 859–868.
- Ferenci K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, Pinkus GS, Kupper TS. (2002). Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* **119**: 1405–1410.
- Galonek HL, Hardwick JM. (2006). Upgrading the BCL-2 Network. *Nat Cell Biol* **8**: 1317–1319.
- Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. (2005). Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**: 5976–5985.
- Hata T, Fujimoto T, Tsushima H, Murata K, Tsukasaki K, Atogami S *et al.* (1999). Multi-clonal expansion of unique human T-lymphotropic virus type-I-infected T cells with high growth potential in response to interleukin-2 in prodromal phase of adult T cell leukemia. *Leukemia* **13**: 215–221.
- Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, Bach C, Fuchs U, Borkhardt A *et al.* (2006). c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* **108**: 297–304.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**: 1057–1061.
- Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F *et al.* (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* **194**: 847–853.
- Igarashi T, Izumi H, Uchiyama T, Nishio K, Arao T, Tanabe M *et al.* (2007). Clock and ATF4 transcription system regulates drug resistance in human cancer cell lines. *Oncogene* **26**: 4749–4760.
- Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J *et al.* (1999). Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and

- activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 11: 81–88.
- Ishida T, Utsunomiya A, Iida S, Inagaki H, Takatsuka Y, Kusumoto S et al. (2003). Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res* 9: 3625–3634.
- Iwai K, Mori N, Oie M, Yamamoto N, Fujii M. (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* 279: 38–46.
- Jiang KT, Chiu R, Santos E, Kim SJ. (1991). Induction of the HTLV-I LTR by Jun occurs through the Tax-responsive 21-bp elements. *Virology* 181: 218–227.
- Jones D, O C, Kraus MD, Perez-Atayde AR, Shahsafaei A, Wu L et al. (2000). Expression pattern of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific subtypes of T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 96: 685–690.
- Karreth F, Hoebertz A, Scheuch H, Eferl R, Wagner EF. (2004). The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development. *Development* 131: 5717–5725.
- Karube K, Ohshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzumiya J et al. (2004). Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Br J Haematol* 126: 81–84.
- Kerl K, Vonlanthen R, Nagy M, Bolzonello NJ, Gindre P, Hurwitz N et al. (2001). Alterations on the 5' noncoding region of the BCL-6 gene are not correlated with BCL-6 protein expression in T cell non-Hodgkin lymphomas. *Lab Invest* 81: 1693–1702.
- Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM et al. (2005). Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 115: 798–812.
- Matsubara Y, Hori T, Morita R, Sakaguchi S, Uchiyama T. (2005). Phenotypic and functional relationship between adult T-cell leukemia cells and regulatory T cells. *Leukemia* 19: 482–483.
- Matsuoka M. (2003). Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene* 22: 5131–5140.
- Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM et al. (1995). Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12520–12524.
- Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW et al. (1999). Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 93: 2360–2368.
- Mori N, Fujii M, Iwai K, Ikeda S, Yamasaki Y, Hata T et al. (2000). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95: 3915–3921.
- Nagakubo D, Jin Z, Hieshima K, Nakayama T, Shirakawa AK, Tanaka Y et al. (2007). Expression of CCR9 in HTLV-1⁺ T cells and ATL cells expressing Tax. *Int J Cancer* 120: 1591–1597.
- Nagata K, Ohtani K, Nakamura M, Sugamura K. (1989). Activation of endogenous c-fos proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40tax protein in the human T-cell line, Jurkat. *J Virol* 63: 3220–3226.
- Oh IH, Reddy EP. (1999). The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene* 18: 3017–3033.
- Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H, Klein U, Basso K, Guglielmino R et al. (2003). Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma* 44(Suppl 3): S5–S12.
- Ramsay RG, Barton AL, Gonda TJ. (2003). Targeting c-Myb expression in human disease. *Expert Opin Ther Targets* 7: 235–248.
- Rayburn E, Zhang R, He J, Wang H. (2005). MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 27–41.
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21: 479–483.
- Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 720–725.
- Shaulian E, Karin M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131–E136.
- Shetzline SE, Rallapalli R, Dowd KJ, Zou S, Nakata Y, Swider CR et al. (2004). Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias. *Blood* 104: 1833–1840.
- Shvarts A, Brummelkamp TR, Scheeren F, Koh E, Daley GQ, Spits H et al. (2002). A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes Dev* 16: 681–686.
- Thebault S, Basbous J, Hivin P, Devaux C, Mesnard JM. (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 562: 165–170.
- Vargas DA, Takahashi S, Ronai Z. (2003). Mdm2: a regulator of cell growth and death. *Adv Cancer Res* 89: 1–34.
- Yamada Y, Ohmoto Y, Hata T, Yamamura M, Murata K, Tsukasaki K et al. (1996). Features of the cytokines secreted by adult T cell leukemia (ATL) cells. *Leuk Lymphoma* 21: 443–447.
- Yamamoto N, Hinuma Y. (1985). Viral aetiology of adult T-cell leukaemia. *J Gen Virol* 66: 1641–1660.
- Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS et al. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262: 747–750.
- Yoshida M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 19: 475–496.
- Yoshie O, Fujisawa R, Nakayama T, Harasawa H, Tago H, Izawa D et al. (2002). Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 99: 1505–1511.
- Yoshie O, Imai T, Nomiya H. (2001). Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78: 57–110.

微生物代謝産物由来の小分子ライブラリーの利用技術

—スクリーニングとケミカルバイオロジー研究—

Small Molecules Library from Microbial Metabolites : Screening and Chemical Biology

掛谷秀昭*¹ 齊藤安貴子*² 長田裕之*³

特異な構造・生物活性を有する微生物代謝産物由来の小分子は、新しい化学・生物学を生み出し、創薬に直結する可能性が高い。そのような小分子を開拓するためのスクリーニング、およびそのような小分子を利用したケミカルバイオロジー研究は、“微生物の復権”には不可欠である。本稿では、スクリーニング技術の動向とケミカルバイオロジー研究を筆者らの研究を中心に紹介する。

1. はじめに

人類は有史以来、合成医薬と並んで、天然有機化合物を薬として利用してきた。天然有機化合物の資源を考えると、微生物代謝産物、植物成分、海洋無脊椎動物等、多種多様であるが、微生物代謝産物が果たす役割は大きい。我が国は、天然物化学の分野においては、世界のフロントランナーであり、これらの強固な地盤は、創薬研究にも活かされている。例えば、微生物代謝産物由来の免疫抑制剤 FK506 (タクロリムス)、シクロスポリン A、高脂血症治療薬プラバスタチン、抗寄生虫薬エバーメクテンなどは、人類の福祉に貢献してきたのみならず、関連領域科学の発展にも大きく貢献している。

ケミカルバイオロジー研究、および創薬リード化合物創製の成否は、まず目的とする生物活性を

示すリード化合物を迅速に見出せるか否かに大きく依存する。そのためスクリーニング方法として、近年、ハイスループットスクリーニング (HTS; high throughput screening) やハイコンテンツスクリーニング (HCS; high-contents screening) が重要な戦略の一つとなっている。いずれも高度にシステム化された方法で短期間に多数の化合物を生化学的に評価して、新規なリード化合物を迅速に発見する方法論である。一方で、コンピューター科学の発展に伴い、インシリコ (*in silico*)・スクリーニングも台頭しつつある。

本稿では、“微生物の復権”に向けたスクリーニング技術の動向とケミカルバイオロジー研究について概説する (図 1)^{1, 2)}。

2. スクリーニング技術の動向

本稿で述べる“スクリーニング”とは、*in*

*¹Hideaki Kakeya 京都大学 大学院薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムケモセラピー・制御分子学分野 教授; 物理化学研究所 客員研究員

*²Akiko Saito 物理化学研究所 中央研究所 長田抗生物質研究室 基礎科学特別研究員

*³Hiroyuki Osada 物理化学研究所 中央研究所 長田抗生物質研究室 主任研究員

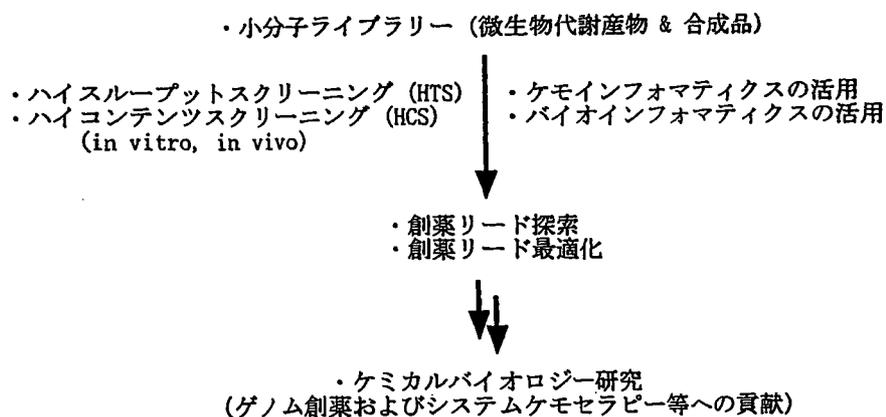


図1 小分子ライブラリーとケミカルバイオロジー研究

in vitro あるいは *in vivo* において“何らかの基準によって生理活性小分子を選別すること”である。1990年代後半頃から、主として製薬企業を中心にHTSが発展してきた。HTSを成功させるためには、①化合物ライブラリーの構築、②評価系のミニチュア化(高密度プレートの利用)、③HTSに適した評価系の構築、④スクリーニングロボット等の使用によるオートメーション化、⑤データ処理システムの整備、などが基本的には重要である。化合物ライブラリーの構築における微生物代謝産物由来の小分子の重要性に関しては、本特集号の他稿に詳細に記述されているので割愛させて頂く。

最近では、HTSの技術を生細胞にも応用したスクリーニング手法、すなわち細胞の形態変化など細胞の表現型や細胞内で起こっているさまざまなイベント(例えば、細胞内シグナル伝達やタンパク質の細胞内輸送、細胞の形態変化など)を、蛍光タンパク質を用いた多重染色法等で多角的に捉えるHCSも盛んに利用されつつある。さらに、HCSはスクリーニングのみならず、細胞レベルでのターゲットバリデーションやリード化合物の最適化研究における化合物のプロファイリングなど多方面で利用されている³⁾。現在、HTSおよびHCSで利用されているマイクロプレートは、96穴マイクロプレート(0.25ml/穴)から、384穴マイクロプレート(0.05ml/穴)あるいは1,536穴マイクロプレート(0.01ml/穴)へと変遷してお

り、アッセイのための総反応量は1/25となり、1日あたりの処理量は10倍以上になっている。評価系のミニチュア化は、アッセイ技術の開発や微量試薬分注器や高感度測定器(検出器)の開発をもたらししている。例えば、後述の小分子マイクロアレイ法などは、*in vitro*におけるアッセイ技術の革新的な手法の1つである。

3. 小分子マイクロアレイ

小分子マイクロアレイ法とは、数千から数万の小分子をガラスなどの基板に並べて固定化(アレイ化)し、これを蛍光色素によって標識されたタンパク質溶液等で処理することで、一度に小分子-タンパク質間の物理的相互作用を検出する方法である(図2)。1999年に、最初の小分子マイクロアレイが報告された⁴⁾が、低分子化合物の構造が多様性に富み、全ての化合物を同じ手法で固定化できないため、汎用性に乏しく一般化が遅れていた。例えば、DNAはデオキシヌクレオチドを基本構造単位とし、タンパク質はアミノ酸を基本構造単位とするオリゴマーである。

このように、DNAやタンパク質は基本構造単位がオリゴマー化した構造であるため、それぞれ必ず分子内に共通する官能基が存在し、それらを利用することで基板への固定化が達成できる(DNAマイクロアレイ、プロテインマイクロアレイ)。しかし、多種多様な化学構造を有する微生物代謝産物由来の小分子ライブラリーでは、全

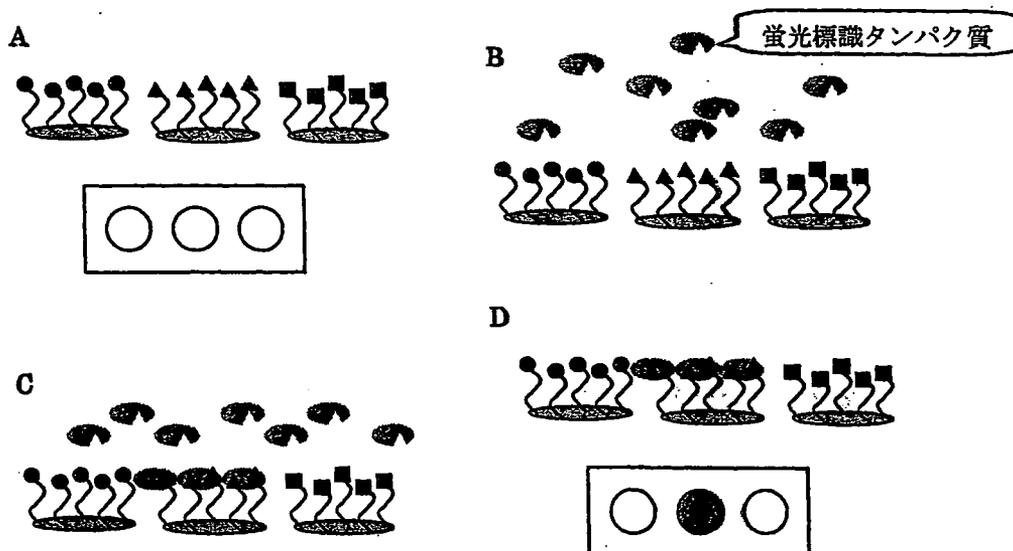


図2 小分子マイクロアレイによる小分子-タンパク質相互作用の検出方法

(A)タンパク質処理前の状態。上は異なる化合物が固定化されたスポットを模式化したもの。下は上図をマイクロアレイ用蛍光スキャナーでスキャンした時のイメージ。タンパク質処理前にシグナルは検出されない。この小分子マイクロアレイを蛍光標識タンパク質により処理し(B)、インキュベートしたのちタンパク質は相互作用する小分子と基板上で結合する(C)。この基板を洗浄して余分なタンパク質を除くと、小分子-タンパク質相互作用がある部分に蛍光標識タンパク質が残り (D上)、これをスキャンすると、タンパク質が結合したスポットに蛍光が検出される (D下)。

ての化合物に共通して含まれ、かつ、基板に固定するために利用できる官能基は存在しない。そのため、小分子マイクロアレイを作成するためには、出来るだけ多種類の小分子を、同一の基盤に固定する技術の開発が必要である。最近、新たな固定化技術が開発され、徐々に汎用化されつつあるが、SN比の向上、固定化技術の改良・最適化等が今後の課題と思われる。以下に、小分子マイクロアレイの現状を紹介する。

3.1 官能基依存的固定化法

Schreiber, S. L. らによって報告された最初の低分子マイクロアレイ⁴⁾は、マレイミド基を導入したスライドガラス基板に、チオール基を持つ化合物をマイクロアレイヤーでスポットし、マレイミド基に対するチオール基のマイケル付加により固定化している。その後、様々な小分子の固定化法が報告されている。小分子を固定化する主な方法を列挙すると、塩化チオニルで活性化したガラス基板⁵⁾やジイソシアネート導入基板⁶⁾に、含水酸化化合物を反応させる方法、ジアゾベンジリデン

導入基板に含酸性官能基(フェノールやカルボン酸等)を反応させる方法⁷⁾、*N*-ヒドロキシスクシンイミド(活性化エステル)を導入した基板に含アミノ化合物を反応させる方法⁸⁾、エポキシドを導入した基板に含ヒドラジド化合物を反応させる方法⁷⁾などが報告されている。それぞれの固定化法の詳細については、それぞれの論文、および総説^{9, 10)}を参照していただきたい。

これらの手法を用いて低分子マイクロアレイを作成するためには、基板へ固定化可能な特定の官能基を分子内に持つ化合物ライブラリーが必要である。これまで行われているスクリーニングでは、コンビナトリアル合成産物をライブラリーとして利用している。コンビナトリアル合成は、今や医薬品開発の定法となっており、ある基本骨格をビーズ等の担体に固定化し、そこに複数の置換基を組合せの手法で導入し、短期間で多数かつ多様性のある分子の一群を合成することができる。担体への固定化に利用されていた官能基を、そのままマイクロアレイ基板への固定化に使用できるため、マイクロアレイ作成に適している。また、

既存のライブラリーの中から、特定の官能基を分子内に持つ化合物を選び出し固定化することや、ライブラリーの化合物を有機合成化学的に誘導体化して特定の官能基を導入して固定化することも可能である。しかし、化合物中の固定化に利用できるような極性官能基は、タンパク質との相互作用に必要である場合もあり、基板に固定化したために相互作用が検出できない可能性がある。したがって、化合物のどの官能基を固定化に用いるべきか等の判断が重要である。

また、最近、Koehler, A. N. と Schreiber, S. L. のグループによるイソシアネートが求核性の官能基（水酸基、アミン、カルボン酸、チオール等）と反応できる性質を利用した固定化法が報告された¹²⁾。求核性の官能基を持つ化合物であれば基板に固定化できることから、これまでの固定化法と比較して汎用性が高い。しかし、この場合も、分子内に求核性の官能基がない場合は固定化されないことや、生体分子との相互作用に必要な官能基が固定化に使用されてしまう可能性は否定できない。

3.2 官能基非依存的固定化法

小分子には、特定の官能基を導入することが難

しく、かつ、コンビナトリアル合成では合成不可能な化合物が多く存在する。なかでも、特に天然有機化合物と呼ばれる微生物や植物等から得られる有機化合物は、非常に複雑で多彩な構造を有する化合物が多く、天然から微量しか得られないため、使用できる化合物量が限られている場合が多い。そこで、筆者らは、天然有機化合物のライブラリーを誘導体化することなく、少量の化合物で固定化可能で、しかも、基板への固定化に特定の官能基を必要としない新しい手法の開発を行った。

筆者らが開発した光親和型小分子マイクロアレイは、特定の官能基を化合物内に必要とせず、既存のライブラリーのままアレイ化することができる（図3）¹³⁾。現在、*in vitro* HTSには、我々はこの光親和型小分子マイクロアレイ法を利用しているケースが多い。アリアルジジンを導入したガラス基板上に小分子をスポットし、これに紫外線（365nm）を照射することでジアジリン基からカルベンを発生させて化合物を固定化する。カルベンは非常に反応性が高く、活性化されていない炭素-水素結合への挿入反応を含め、様々な官能基に対し反応することが知られている。この性

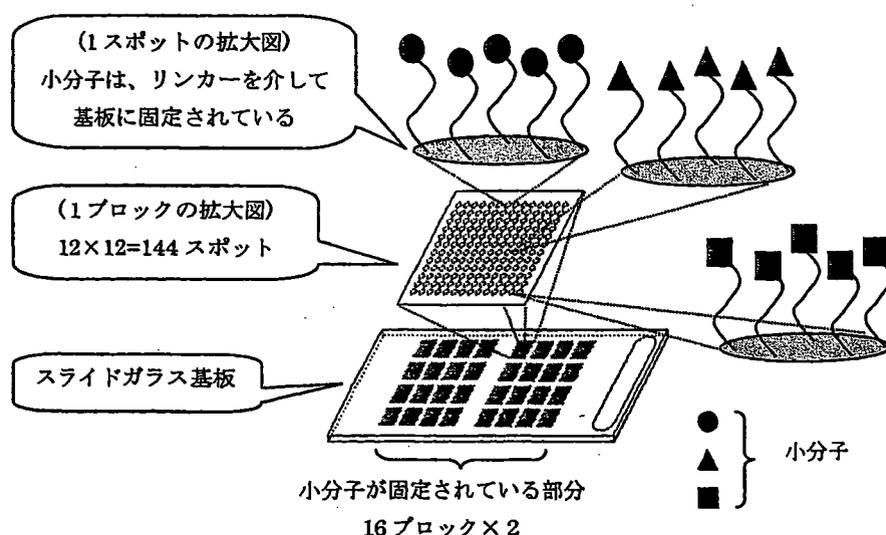


図3 筆者らが作成している小分子マイクロアレイの概略図

スライドガラスの表面に化合物を固定化するためのリンカーを導入し、マイクロアレイヤーで小分子をスポットして作成する。144種類（12×12）の化合物がスポットされたブロックが16ブロック（×2は、同じ16ブロックを2セットスポットしているという意味）あるため、1枚の基板に2,304化合物をスポットすることが可能である。

質により、基板への固定化は特定の官能基を必要とせず、求核性の官能基等が分子内に存在しない化合物も固定化できる。また、化合物内の様々な部分で基板に固定化されると予想される¹⁴⁾ため、一定の割合で、タンパク質との相互作用に必要な小分子内の官能基が固定化に使用されずに残っているはずである。一方で、特定の官能基を利用して基板に固定化する場合に比べて感度が低下する可能性がある(図4)。また、UV照射により固定化するため、UVにより分解する化合物を固定化することはできない。

3.3 非固定化法

小分子を基板に固定化しないマイクロアレイも報告されている。小分子のグリセロール溶液を基

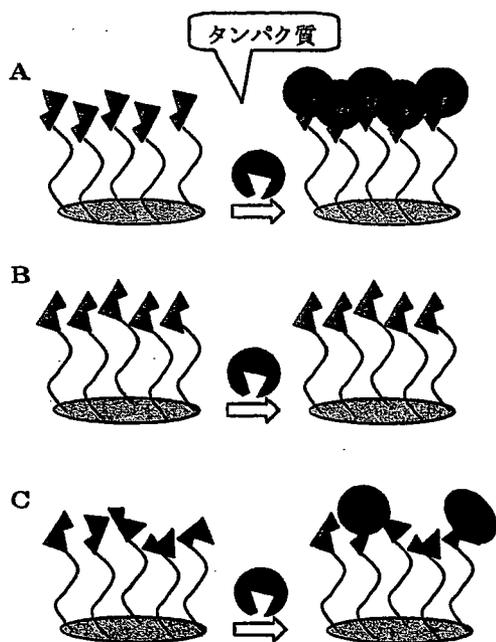


図4 官能基依存的固定化(A, B)と官能基非依存的固定化(C)の概念図

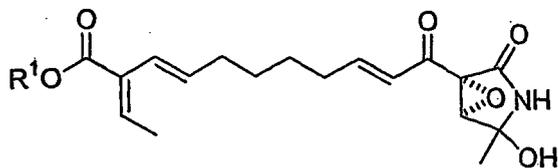
タンパク質と相互作用しない部分が基板への固定化に使用されていない場合は、基板上でタンパク質と結合できる(A)が、タンパク質と相互作用する部分が基板への固定化に使用されている場合はタンパク質と結合できない(B)。一方、光親和型マイクロアレイは、特定の官能基を必要とせず、様々な方向で小分子が基板に固定化されていると考えられるため、タンパク質と結合可能な小分子が存在する(C)。しかし、(A)と比較すると結合できる化合物の割合が少ないため感度が低下する可能性がある。

板にスポットしてマイクロアレイ化し、そこにタンパク質溶液等をエアロゾルとして噴霧して各スポット中の化合物による酵素阻害活性等を評価できる方法¹⁵⁾や、生分解性ポリマーに小分子を埋め込んだマイクロアレイ基板を作成し、この基板上で動物細胞を培養することで、細胞の表現系スクリーニングが可能な方法¹⁶⁾が報告されている。両方法とも、小分子の修飾を必要としないため、生体物質と相互作用する官能基が固定のために使用される可能性はなく優れた方法であり、今後の発展が期待される。

4. アポトーシス誘導剤 ETB (epolactaene *tert*-butyl ester) に関するケミカルバイオロジー研究

真核細胞は、1個の受精卵から始まりさまざまな「増殖・細胞死・分化」決定因子の厳密な制御のもとに「生・死・分化」が決定されている。この調節機構に異常が生じるとがん、免疫不全などをはじめとした様々な疾病につながると考えられている。細胞死の1つであるアポトーシスを誘導する生体機能分子は抗がん剤のリード化合物として有用である。

筆者らは、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y において神経分化誘導活性およびアポトーシス誘導活性を有する小分子を探索するための表現型スクリーニングにおいて、糸状菌 *Penicillium* 属が生産する epolactaene (Epo) を見出した^{17, 18)}。さらに、epolactaene の構造活性相関研究の過程で、様々なヒトがん細胞に対して強力なアポトーシス誘導活性を有する化合物 ETB (epolactaene *tert*-butyl ester) を見出した。詳細な構造活性相関研究の結果、ETB/Epo 分子内の γ -ラクタム環および α, β -不飽和カルボニル基が活性発現に重要であることが判明した¹⁹⁾。そこで、ETB/Epo 標的分子の同定のための分子プローブ (bio-ETB) を設計・創製し(図5)、ETB/Epo 結合タンパク質の探索・同定を試みた。その結果、ETB/Epo の細胞内結合タンパク質の1つとして、分子シャペロン Hsp60 を同定した。そこで、リンゴ酸脱水素



Epo: R¹=CH₃

ETB: R¹=*tert*-Bu

bio-ETB: R¹=

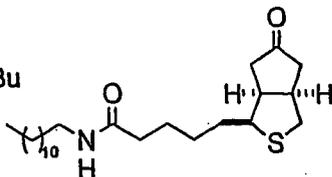
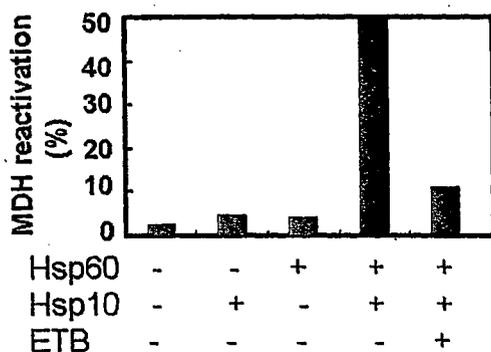


図5 Epo, ETB および bio-ETB の化学構造

(A)



(B)

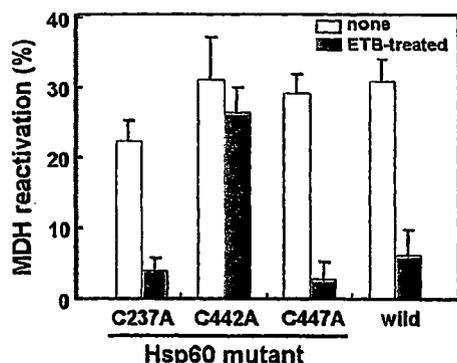


図6 ETBの細胞内分子標的の1つはHsp60である

(A)ETBによるHsp60の分子シャペロン活性の抑制。
(B)ETBはHsp60の442番目のCys残基を介して結合し、分子シャペロン活性を抑制する。

酵素 (malate dehydrogenase ; MDH) を基質としたHsp60の分子シャペロン活性に与えるETBの影響を検討した結果、ETBは顕著にHsp60の分子シャペロン活性を抑制した(図6A)。さらに、詳細な検討の結果、ETBは、Hsp60の442



図7 ヒトHsp60の推定立体構造

番目のシステイン残基(Cys⁴⁴²)を介して結合し、分子シャペロン活性を抑制することを明らかにした(図6B)。Hsp60のCys⁴⁴²は、大腸菌GroELとのホモロジーモデリングの結果、ATP結合部位近傍に位置することが示唆され、ETB/EpoがHsp60のATPase活性および多量体化に影響を与えることが示唆された(図7)²⁰。以上の結果から、ETB/EpoはHsp60の機能解明のための強力なツールおよび創薬リード化合物になるとともに、Hsp60が新しいがんの分子標的となりうる可能性が期待される。

5. おわりに

これまでに、小分子マイクロアレイを用いたスクリーニングにより酵母由来のタンパク質Ure2pのリガンドであるuretopamide A²¹や転写因子Hap3pのリガンドであるhaptamide²²等が報告されている。筆者らは、現在、表現型等を指標とし生細胞を用いたHCSに加えて、*in vitro* HTSには、官能基非依存的固定化法により作成された小分子マイクロアレイを多く利用している。両者

を上手く併用していくことで、微生物代謝産物由来の小分子ライブラリーに加えて、合成小分子ライブラリーの効率的な活用が期待される。

また、微生物代謝産物の有用性として、糸状菌が生産する epolactaene をリード化合物としたアポトーシス誘導剤 ETB の開発に関するケミカルバイオロジー研究を紹介した。スクリーニング技術の進展に伴い、ケモインフォマティクス、バイオインフォマティクス等による化合物情報、生物活性情報、小分子-タンパク質相互作用の解析情報が飛躍的に蓄積され、微生物代謝産物を機軸にしたポテンシャルの高い創薬リード化合物の開発およびケミカルバイオロジー研究の発展が期待される。

文 献

- 1) 掛谷秀昭, Natural products-based chemical biology - 独創的なケミカルバイオロジー研究を目指して -, バイオサイエンスとインダストリー, 65, 75 (2007)
- 2) 掛谷秀昭, 微生物が生産する新規生理活性物質の開拓とケミカルバイオロジー研究, *Jpn. J. Antibiotics*, 60, 2007 (印刷中)
- 3) Giuliano, K. A. *et al.*, *Assay Drug Dev. Technol.*, 1, 565-577 (2003)
- 4) MacBeath, G. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 7967-7968 (1999)
- 5) Hergenrother, P. J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 7849-7850 (2000)
- 6) Wong, J. C. *et al.*, *Chem. Biol.*, 11, 1279-1291 (2004)
- 7) Barnes-Seeman, D. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 2376-2379 (2003)
- 8) Uttamchandani, M. *et al.*, *J. Comb. Chem.*, 6, 862-868 (2004)
- 9) Lee M. -R. and Shin, L. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 2881-2884 (2005)
- 10) 叶直樹, 長田裕之, 有機合成化学協会誌, 64, 639-650 (2006)
- 11) He, X. G. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 313, 1-7 (2005)
- 12) Bradner, J. E. *et al.* *Chem. Biol.*, 13, 493-504 (2006)
- 13) Kanoh, N. *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 5584-5587 (2003)
- 14) Kanoh, N. *et al.*, *Chem. Asian J.*, 1, 789-797 (2006)
- 15) Gosalia, B. N. and Diamond, S. L. *PNAS*, 100, 8721-8726 (2003)
- 16) Bailey, S. N. *et al.*, *PNAS*, 101, 16144-16149 (2004)
- 17) Kakeya, H. *et al.*, *J. Antibiot.*, 48, 733-735 (1995)
- 18) Kakeya, H. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 40, 391-394 (1997)
- 19) Nagumo, Y. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 4425-4429 (2004)
- 20) Nagumo, Y. *et al.*, *Biochem. J.*, 387, 835-840 (2005)
- 21) Kuruvilla, F. G. *et al.*, *Nature*, 416, 653-657 (2002)
- 22) Koehler, A. N. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 8420-8421 (2003)



住木・梅澤記念賞受賞講演会記録

2006年11月1日, グランドヒル市ヶ谷 3階「珊瑚」

【2006年度受賞講演, 座長: 永井和夫】

微生物が生産する新規生理活性物質の開拓とケミカルバイオロジー研究

掛谷秀昭 (独立行政法人理化学研究所中央研究所)¹⁾

真核細胞の一生は, 1個の受精卵から始まり様々な増殖・分化・細胞死決定因子による厳密な制御のもとに「生・死・分化」が決定されている。この厳密な調節機構に異常が生じると, 癌・免疫不全・炎症疾患などをはじめとした様々な疾病につながると考えられている。細胞の「生・死・分化」の調節機構の全貌を解明することは, 生命科学にとって究極の課題とも考えられる。そのためのアプローチとして, 生理活性物質を利用したケミカルバイオロジー的アプローチは, 分子遺伝学的アプローチと相補的に, 非常に強力かつ有意義なアプローチである^{1,2)}。ケミカルバイオロジー的アプローチの成功は, 標的蛋白質に作用する生理活性物質の開拓に大きく依存していると言っても過言ではない。

このような背景のもと, 筆者は, 天然物有機化学を基軸として, 微生物が生産する多くの有用な新規生理活性物質を開拓し, それらを利用して細胞の「生・死・分化」の調節機構の解明研究に取組み, 独創性の高いオリジナリティーのあるケミカルバイオロジー研究の先導的研究を展開している。すなわち, 培養細胞系の複雑かつ多様な細胞内

情報伝達ネットワークを利用して, 細胞死制御活性(細胞死誘導活性/細胞死抑制活性), 神経分化誘導活性, 細胞周期阻害活性, 血管新生抑制活性等を効率的に検出可能な系を構築し, 探索研究・精密構造解析研究の結果, 微生物(放線菌, 糸状菌など)が生産する新規生理活性物質, およびそれらをリード化合物とした新規類縁合成化合物を開拓している(表1)。さらに, 新規生理活性物質の生合成機構解析研究, 構造活性相関研究を基盤とした機能性分子プローブの設計/創製研究, およびケミカルバイオロジー研究を展開している(図1)。これまでに, 筆者らの基礎研究の成果を基盤にして, 複数の生理活性物質が市販化され細胞生物学研究に貢献している。

本稿では, 表1に示した化合物群に関する研究の中から抜粋して, アポトーシスを制御する生理活性物質サイトトリエニン A, MT-21, ETB, ECH および RKTS-33&34 について概説する。

細胞死制御物質の開拓研究

細胞死の1つであるアポトーシスの制御異常は, 様々な疾病の原因となりうる³²⁾。また, アポトーシ

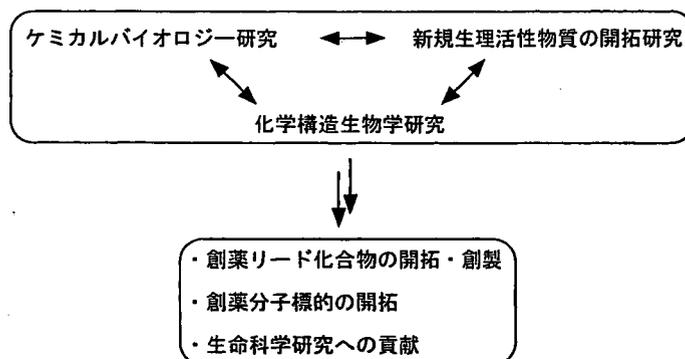
[Proceedings] HIDEAKI KAKEYA: Discovery of novel bioactive small molecules from microbial metabolites and chemical biology research.

¹⁾現所属: 京都大学大学院薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムケモセラピー・制御分子学分野

表1. 筆者が見出した新規生理活性物質 (抜粋)

化合物名	生理活性	生産微生物/ 合成化合物	文献
エボラクタエン	神経分化誘導活性/ アポトーシス誘導活性	<i>Fusarium</i> 属	3, 4
トリプロスタチン A&B	細胞分裂阻害活性	<i>Aspergillus</i> 属	5, 6, 7
スピロトリプロスタチン A&B	細胞分裂阻害活性	<i>Aspergillus</i> 属	8, 9
シクロトリプロスタチン A-D	細胞分裂阻害活性	<i>Aspergillus</i> 属	10
サイトトリエニン A-C	アポトーシス誘導活性	<i>Streptomyces</i> 属	11-15
MT-21	アポトーシス誘導活性	合成化合物	4, 16
ETB	アポトーシス誘導活性	合成化合物	17, 18
RK-1009	細胞分裂阻害活性	<i>Streptomyces</i> 属	19
サイトキサゾン	免疫抑制活性/ 肝細胞繊維化阻害活性	<i>Streptomyces</i> 属	20, 21
ルシラクタエン	細胞周期阻害活性 (G1 期)	<i>Fusarium</i> 属	22
アザスピレン	血管新生抑制活性	<i>Neosartorya</i> 属	23
エボキシキノール A&B	血管新生抑制活性	未同定糸状菌	24, 25
エボキシツイノール A	血管新生抑制活性	未同定糸状菌	26
RK-95113	血管新生抑制活性	<i>Aspergillus</i> 属	27
ECH	アポトーシス抑制活性	未同定糸状菌	28, 29
RKTS-33&34	アポトーシス抑制活性	合成化合物	30, 31

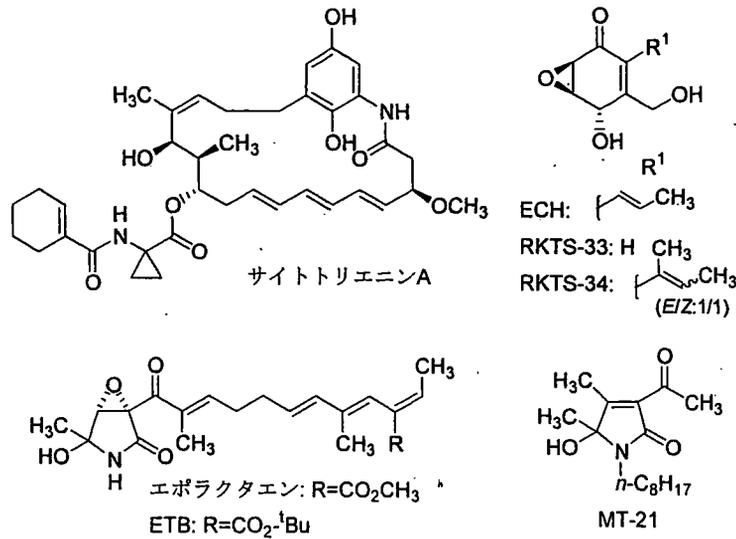
図1. 本研究の戦略



スは、癌の分子標的治療等において重要な標的であると考えられる。アポトーシスの研究は1990年代後半に全盛期を迎え、現在ではアポトーシスに関する全体像がかなりはつきりと捉えられてきた。その一方で、アポトーシスは非常に複雑に制御されていることも明らかとなっており、今日

では、アポトーシス依存性細胞死に加えてアポトーシス非依存性細胞死の重要性もクローズアップされつつある。このような複雑な生命現象を解析するのに有用なツールとなる生理活性物質をバイオプローブと呼んでいる。アポトーシスの研究分野においても、バイオプローブを利用して多く

図2. サイトトリエンin A, エポラクタエン, ETB, MT-21, ECH および
RKTS-33&34の化学構造



の知見が得られてきた。アポトーシスにおけるバイオプローブは、大きく分けてアポトーシス誘導物質とアポトーシス抑制物質とに分類可能である。このうちアポトーシス誘導物質は抗癌剤開発の観点などから、数多くの有用なバイオプローブが見出されている。その一方で、アポトーシス抑制物質は、zVAD-fmkに代表されるカスパーゼの基質認識配列に基づく基質拮抗型のペプチド性阻害剤が主流であり、非ペプチド性のアポトーシス抑制物質は極めて少ない。特に、デスレセプター依存性アポトーシスは癌細胞の除去以外にも、自己免疫疾患や劇症肝炎、慢性関節リウマチなど様々な疾患にも関与しており、デスレセプター依存性アポトーシス抑制剤はこれら疾病の治療薬のリード化合物となりうる。

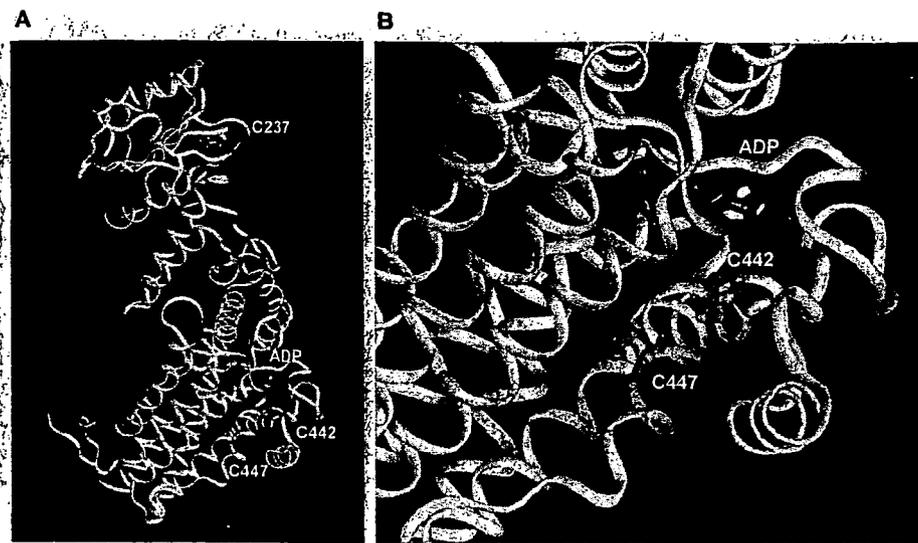
1. アポトーシス誘導剤サイトトリエンin A

ヒト前骨髄性白血病HL-60細胞とヒト正常肺繊維芽WI-38細胞を用いて、HL-60細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導する新規物質として放線菌 *Streptomyces* 属 RK95-74 株が生産するアンサ

マイシン系化合物サイトトリエンin Aを見出した^{11,12)}。サイトトリエンin Aは、放線菌代謝産物では初めてのACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) ユニット構造を含む化合物であることを証明し、各種¹³C同位体標識前駆体 ([1-¹³C]酢酸, [1-¹³C]プロピオン酸, L-[メチル-¹³C]メチオニン, L-[U-¹³C]メチオニン) のサイトトリエンin Aへの取り込み実験の結果、進化的にも非常に興味深い「L-メチオニン→ACC経路」が生産菌内に存在することを明らかにした¹³⁾。なお、高等植物には植物ホルモンであるエチレンの主要な生合成経路としてACC合成経路の存在が知られているが³³⁾、放線菌二次代謝産物以外でも分子内にACC骨格を有する微生物代謝産物は極めて稀であり、放線菌におけるACC合成経路は全く不明であった。

サイトトリエンin A (10~100 nm) は、HL-60細胞において濃度・時間依存的にアポトーシスに特徴的なクロマチンの凝縮やDNAの断片化を誘導した。一方、正常肺繊維芽WI-38細胞においては1000倍以上の高濃度でもアポトーシスを誘導しなかった。サイトトリエンin Aのアポトーシス誘導は、N-

図3. ETBのEsp60結合部位Cys442は、ATP結合部位近傍と推定される
A. ヒトHsp60の推定立体構造、B. ATP結合部位近傍の拡大図



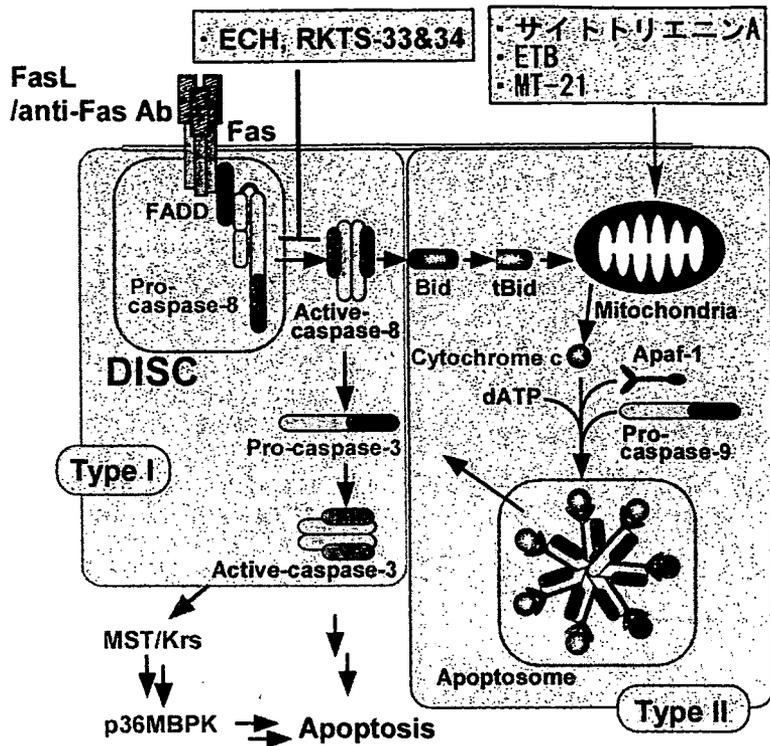
アセチルシステインで抑制されたがその不活性体 *N*-アセチルセリンでは抑制されなかったことなどからミトコンドリア経路による活性酸素種の関与が示唆された。さらに、サイトトリエニンAは、ミトコンドリア経路を介して、出芽酵母のSte-20キナーゼホモログであるMst1/Krsタンパク質を活性化し、アポトーシスを誘導することを明らかにした¹⁴⁾。すなわち、サイトトリエニンによって活性化されたカスパーゼが全長のMst1/Krs2, Mst2/Krs1をカスパーゼ認識部位で切断し、その結果生じた分子量約36kDaのN末断片(p36 MBPK; p36 myelin basic protein kinase)が顕著なキナーゼ活性を有することを明らかにし、それまでその生理的意義の詳細が不明であったMst/Krsタンパク質のアポトーシス誘導等における意義を明らかにした。さらに、臨床使用されている各種抗癌剤に対する感受性細胞においては、これら抗癌剤によってp36 MBPKの活性化が認められ、Mst/Krsの発現あるいはp36 MBPKの活性化が抗癌剤感受性マーカーのひとつになりうる可能性を示した¹⁵⁾。さらに、近年、ショウジョウバエにおいても、Ste-20キナーゼ

ホモログのHippoが増殖、細胞死に深く関与していることが示された³⁴⁻³⁷⁾。

2. アポトーシス誘導剤MT-21およびETB

糸状菌*Fusarium*属が生産するエポラクタエンの詳細な構造活性相関研究の過程で、新規アポトーシス誘導剤MT-21およびETB (epolactaene tertiary-butyl ester)を見出した^{3,4,16-18)}。現在、MT-21は細胞レベルでチトクロームCの遊離を誘導するANT (adenine nucleotide translocase)阻害剤として広く利用されている^{38,39)}。また、ETB (1~10 μ M)は、ミトコンドリア経路を活性化して各種ヒトがん細胞に対して強力なアポトーシス誘導活性を有することを見出した。そこで、構造活性相関研究の知見を基にETB標的分子同定のための分子プローブを設計/創製し、ETB結合タンパク質の探索・同定を行った。その結果、ETBの細胞内結合タンパク質の1つとして分子シャペロンHsp60を同定した。リンゴ酸脱水素酵素等を基質としたHsp60の分子シャペロン活性に与えるETBの影響を検討した結果、ETBは顕著にHsp60の分子シャペロン活性を

図4. Fas 依存性アポトーシスのシグナル伝達経路および各薬剤の作用点



抑制した。さらに、ETBはHsp60とCys⁴⁴²を介して共有結合しシャペロン活性を阻害することを明らかにした。Hsp60のCys⁴⁴²は、大腸菌GroELとのホモロジーモデリングの結果、ATP結合部位近傍に位置することが示唆され、ETBがHsp60のATPase活性および多量体化にも影響を与えることが示唆された^{17,18)}。ETBはHsp60の機能解明のための強力なツールになるとともに、Hsp60が新しい癌の分子標的となりうる可能性が期待される。

3. アポトーシス抑制剤 ECH および RKTS-33&34

デスレセプター依存性アポトーシス抑制剤として糸状菌（未同定）が生産する非ペプチド系化合物ECH [(2*R*, 3*R*, 4*S*)-2,3-epoxy-4-hydroxy-5-hydroxymethyl-6-(1*E*)-propenyl-cyclohex-5-en-1-one]を見出した²⁸⁾。ECHの構造活性相関研究の結果、新

規合成類縁化合物としてRKTS-33&34の開発に成功した³⁰⁾。さらに、構造活性相関研究の知見を基にECH標的分子同定のための分子プローブを設計/創製/利用し、ECHの細胞内標的としてpro-caspase-8を同定し、詳細な解析の結果、ECHはDISC (death-inducing signaling complex)の形成には影響を与えず、DISCの形成に引き続くpro-caspase-8の活性化を抑制することを明らかにした²⁸⁾。また、ECHおよびRKTS-33&34を利用してFas/FasLシステムの活性化にはFasのインターナリゼーションが重要であることを明らかにした。さらに、免疫細胞の一つである細胞障害性T細胞(CTL)が標的細胞を殺傷する際に、細胞障害性顆粒の経路に加えて、Fas/FasL経路が重要であることを示した^{29,31)}。今後、ECHおよびRKTS-33&34がFas/FasLシステムの生理的意義の解析研究に貢献するとともに、創薬リード化合物となることが期待される。

今後の展望

微生物由来の新規生理活性物質の開拓研究を基軸として、今後も、化学と生物学の学際領域において重要な研究分野であるケミカルバイオロジー研究・化学構造生物学研究における独創的な研究を展開し、創薬・生命科学研究に貢献したいと考えている。

微生物(放線菌,糸状菌,細菌など)が生産する有用な新規生理活性物質を探索・同定するための効率の良いスクリーニングシステムの構築,精製・構造解析システムの構築,さらには,微生物によって生産される興味深い化学構造と生理活性を有する新規生理活性物質の生合成機構を遺伝子レベル・酵素レベルでの解明を行う予定である。これらの研究は,新規創薬リード化合物の開拓のみならず,二次代謝制御酵素群のグリーンケミストリーを指向したコンビナトリアル生合成への利用へと広がる。また,新規生理活性物質の標的蛋白質を迅速に探索・同定するための機能的プロテオミクス研究を行い,新規生理活性物質と結合蛋白質の迅速な検出システムの開発研究・応用研究を行い,創薬等の基礎となる生命現象のケミカルバイオロジー研究・化学構造生物学研究を展開する予定である。

謝辞

本研究を行うにあたり,多くのご指導・ご鞭撻を賜りました独立行政法人理化学研究所中央研究所長田抗生物質研究室・主任研究員 長田裕之博士に心より感謝申し上げます。また,本研究に関する共同研究者の方々,ならびにご協力・ご助言を賜りました先生方,皆様方に心より感謝いたします。最後に,本記念賞に推薦頂きました独立行政法人理化学研究所中央研究所・所長 茅幸二博士に厚く感謝申し上げます。

文献

- 1) Bioprobes: Biochemical tools for investigating cell function (Ed.: OSADA, H.), Springer, Tokyo, 1999
- 2) SCHREIBER, S. L.: Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* 6: 1127~1152, 1998
- 3) KAKEYA, H.; I. TAKAHASHI, G. OKADA, *et al.*: Epolactaene, a novel neurotogenic compound in human neuroblastoma cells, produced by a marine fungus. *J. Antibiot.* 48: 733~735, 1995
- 4) KAKEYA, H.; C. ONOZAWA, M. SATO, *et al.*: Neurotogenic effect of epolactaene derivatives on human neuroblastoma cells which lack high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Med. Chem.* 40: 391~394, 1997
- 5) CUI, C. B.; H. KAKEYA, G. OKADA, *et al.*: Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* 48: 1382~1384, 1995
- 6) CUI, C. B.; H. KAKEYA, G. OKADA, *et al.*: Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 49: 527~533, 1996
- 7) CUI, C. B.; H. KAKEYA & H. OSADA: Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structure. *J. Antibiot.* 49: 534~540, 1996
- 8) CUI, C. B.; H. KAKEYA & H. OSADA: Spirotryprostatin B, a novel mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* 49: 832~835, 1996
- 9) CUI, C. B.; H. KAKEYA & H. OSADA: Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron* 52: 12651~12666, 1996
- 10) CUI, C. B.; H. KAKEYA & H. OSADA: Novel mammalian cell cycle inhibitors, cyclotryprostatins A-D, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase. *Tetrahedron* 53: 59~72, 1997
- 11) KAKEYA, H.; H. P. ZHANG, K. KOBINATA, *et al.*: Cytotrienin A, a novel apoptosis inducer in human leukaemia HL-60 cells. *J. Antibiot.* 50: 370~372, 1997
- 12) ZHANG, H. P.; H. KAKEYA & H. OSADA: Novel trienansamycins, cytotrienins A and B inducing apoptosis on human leukaemia HL-60 cells. *Tetrahedron Lett.* 38: 1789~1792, 1997
- 13) ZHANG, H. P.; H. KAKEYA & H. OSADA: Biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid moiety on cytotrienin A in *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Lett.* 39: 6947~6948, 1998
- 14) KAKEYA, H.; R. ONOSE & H. OSADA: Caspase-mediated activation of a 36-kDa myelin basic protein kinase during anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.* 58: 4888~4894, 1998
- 15) WATABE, M.; H. KAKEYA, R. ONOSE, *et al.*: Activation of

- MST/Krs and c-Jun-N-terminal kinases by different signaling pathways during cytotriecin A-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 8766~8771, 2000
- 16) WATABE, M.; H. KAKEYA & H. OSADA: Requirement of protein kinase (Krs/Mst) activation for MT-21-induced apoptosis. *Oncogene* 18: 5211~5220, 1999
- 17) NAGUMO, Y.; H. KAKEYA, J. YAMAGUCHI, *et al.*: Structure-activity relationships of epolactaene derivatives: Structural requirements for inhibition of HSP60 chaperone activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 4425~4429, 2004
- 18) NAGUMO, Y.; H. KAKEYA, M. SHOJI, *et al.*: Epolactaene binds human Hsp60 Cys442 resulting in the inhibition of chaperone activity. *Biochem. J.* 387: 835~840, 2005
- 19) KAKEYA, H.; M. MORISHITA, A. IKENO, *et al.*: Factumycin and its new derivative RK-1009 enhance threonine-phosphorylation of a 60-kDa protein in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* 51: 963~966, 1998
- 20) KAKEYA, H.; M. MORISHITA, K. KOBINATA, *et al.*: Isolation and biological activity of a novel cytokine modulator, cytotoxazone. *J. Antibiot.* 51: 1126~1128, 1998
- 21) KAKEYA, H.; M. MORISHITA, H. KOSHINO, *et al.*: Cytotoxazone: a novel cytokine modulator containing 2-oxazolidinone ring produced by *Streptomyces* sp. *J. Org. Chem.* 64: 1052~1053, 1999
- 22) KAKEYA, H.; S. I. KAGEYAMA, R. NIE, *et al.*: Lucilactaene, a new cell cycle inhibitor in p53-transfected cancer cells, produced by a *Fusarium* sp. *J. Antibiot.* 54: 850~854, 2001
- 23) ASAMI, Y.; H. KAKEYA, R. ONOSE, *et al.*: Azaspirorene: A novel angiogenesis inhibitor containing 1-oxa-7-azaspiro[4.4]-2-ene-4,6-dione skeleton produced by the fungus *Neosartorya* sp. *Org. Lett.* 4: 2845~2848, 2002
- 24) KAKEYA, H.; R. ONOSE, H. KOSHINO, *et al.*: Epoxyquinol A, a highly functionalized pentaketide dimer with antiangiogenic activity isolated from fungal metabolites. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 3496~3497, 2002
- 25) KAKEYA, H.; R. ONOSE, A. YOSHIDA, *et al.*: Epoxyquinol B, a fungal metabolite with a potent antiangiogenic activity. *J. Antibiot.* 55: 829~831, 2002
- 26) KAKEYA, H.; R. ONOSE, H. KOSHINO, *et al.*: Epoxytwinol A, a novel unique angiogenesis inhibitor with C₂ symmetry, produced by a fungus. *Chem. Commun.* 2005, 2575~2577, 2005
- 27) ASAMI, Y.; H. KAKEYA, G. OKADA, *et al.*: RK-95113, a new angiogenesis inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* 59: 724~728, 2006
- 28) MIYAKE, Y.; H. KAKEYA, T. KATAOKA, *et al.*: Epoxy-cyclohexenone inhibits Fas-mediated apoptosis by blocking activation of pro-caspase-8 in the death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 278: 11213~11220, 2003
- 29) MITSUI, T.; Y. MIYAKE, H. KAKEYA, *et al.*: Epoxy-cyclohexenone, a specific inhibitor of Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 172: 3428~3436, 2004
- 30) KAKEYA, H.; Y. MIYAKE, M. SHOJI, *et al.*: Novel non-peptide inhibitors targeting death receptor-mediated apoptosis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 3743~3746, 2003
- 31) MITSUI, T.; Y. MIYAKE, H. KAKEYA, *et al.*: RKTS-33, an epoxy-cyclohexenone derivative that specifically inhibits Fas ligand-dependent apoptosis in CTL-mediated cytotoxicity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1923~1928, 2005
- 32) HANAHAN, D. & R. A. WEINBERG: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57~70, 2000
- 33) YANG, S. F. & N. E. HOFFMAN: Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155~189, 1984
- 34) UDAN, R. S.; M. KANGO-SINGH, R. NOLO, *et al.*: Nature Cell Biol. 5: 914~920, 2003
- 35) WU, S.; J. HUANG, J. DONG, *et al.*: *hippo* encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with *salvador* and *warts*. *Cell* 114: 445~456, 2003
- 36) HARVEY, K. F.; C. M. PFLEGER & I. K. HARIHARAN: The *Drosophila* Mst ortholog, *hippo*, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 114: 457~467, 2003
- 37) HUANG, J.; S. WU, J. BARRERA, *et al.*: The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell* 122: 421~434, 2005
- 38) WATABE, M.; K. MACHIDA & H. OSADA: MT-21 is a synthetic apoptosis inducer that directly induces cytochrome C release from mitochondria. *Cancer Res.* 60: 5214~5222, 2000
- 39) MACHIDA, K.; Y. HAYASHI & H. OSADA: A novel nucleotide translocase inhibitor, MT-21, induces cytochrome c release by a mitochondrial permeability transition-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 277: 31243~31248, 2002