

2. エピジェネティック転写制御を標的とした天然物の探索

石橋 正己

Key words : 天然物, ヒストン修飾, ポリコム複合体,
スクリーニング, 植物成分

千葉大学 大学院薬学研究院
活性構造化学研究室

緒言

エピジェネティックな遺伝子発現制御機構とは, DNA 塩基配列の変化を伴わず, ヒストン修飾, クロマチンリモデリング, DNA メチル化などが協調して, 遺伝子発現を時間的, 空間的に制御する機構である. 最近では, 正常な幹細胞の自己複製制御や分化, 生死に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻が「がん幹細胞」への形質転換につながる可能性が指摘されている. この遺伝子転写制御は核内のクロマチンを構成するヒストンの種々の化学修飾と深く関わっており, このヒストン修飾において重要な役割を果たしているのがポリコム群 (PcG) タンパク質である. PcG タンパク質は核内で PRC1 や PRC2 という巨大複合体を形成し, ヒストンのメチル化やユビキチン化によりクロマチン構造を凝縮させ転写抑制状態の維持に働く. 例えば, がん幹細胞ではこの機構によりがん抑制遺伝子の転写が抑制されている. 本研究ではこの転写抑制化に関与する PRC1 複合体の中心分子 BMI1 に注目し, この分子の働きを低分子化合物によって制御することを目指して, BMI1 を標的としたスクリーニングを行う. これまでに BMI1 阻害作用をもつ化合物としては 2014 年に合成化合物 PTC209¹⁾ が報告されたが, 本研究ではとくに天然物を対象として BMI1 に作用する新たな化合物を見出すことを目的とした. 一方, ウィント (Wnt) シグナルおよびヘッジホッグ (Hh) シグナルは, 細胞の発生, 分化, 増殖, 自己複製, 多能性維持, 細胞運命決定等に関わる重要なシグナル伝達経路であるが, これらはいずれも BMI1 を始めとするポリコム複合体構成分子の発現制御に深く関わっていることが知られている^{2,3)}. そこで本研究では, Wnt および Hh シグナルに作用する天然物のスクリーニング研究を併せて行った. 以下に, これらの研究成果の概要について報告する.

方法、結果および考察

1. 細胞アッセイシステムの構築とスクリーニング

ポリコム群タンパク質複合体構成分子 BMI1 に関して, そのプロモーター活性を評価するルシフェラーゼ細胞アッセイシステム (Fig. 1) の構築を行った. ジョージ・ワシントン大学 G. P. Dimri 教授からご恵みいただいたプラスミド⁴⁾ を用いて, BMI1 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ配列を含むレポータープラスミドを作製した. 次に作製したプラスミドをアッセイ用細胞 (ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 293T) に導入し, 安定発現細胞の構築を行った. すなわち播種した細胞に構築したプラスミドを導入し, ピューロマイシンによる選択培養を行った後, 単一のコロニーが形成された複数のクローンについてルシフェラーゼ活性試験を行い, 陽性対照による発光の変化等の実験により最も良好な結果を示した細胞株をスクリーニング用細胞として選別した. 選別した細胞では, 陽性対照 (PTC-209)¹⁾ によってルシフェラーゼ発光量が低下するとともに BMI1 タンパク質が減少することがウェスタンブロットにより明らかとなった. これにより, 本スクリーニング細胞においては BMI1 プロモーター活性とタンパク質発現量に相関性があることが確認できた.

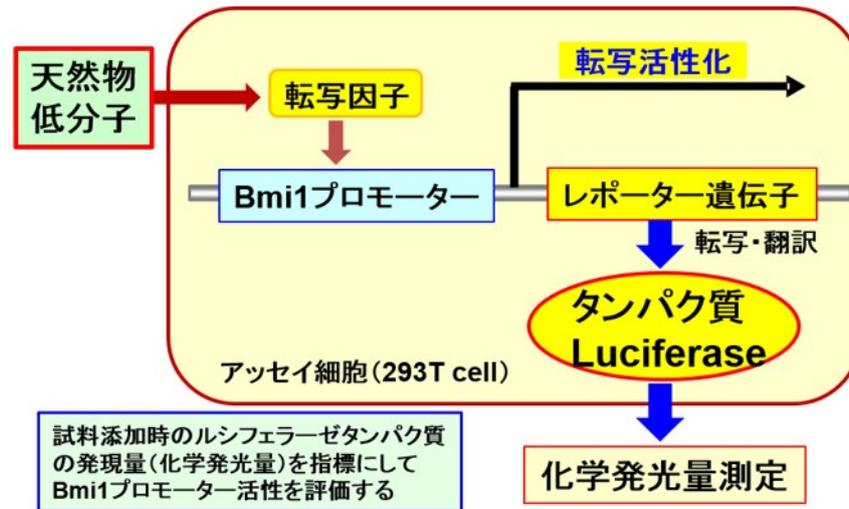


Fig. 1. Cell-assay system for BMI1 promoter activity.

上記により構築したアッセイ細胞を用いて、当研究室保有の植物エキ斯科レクションを対象としたスクリーニングを行った。これまでに、当研究室保有のタイ産植物 136 種についてアッセイ試験を行い、そのうちの 4 種が顕著なルシフェラーゼ活性の低下を示したことから、これらをヒットサンプルとして選別した。そのうちの 1 種（キョウチクトウ科植物）について、抽出エキスの溶媒分画およびクロマトグラフィーによる精製を開始し、これまでに数個の活性フラクションを得た。

2. Wnt および Hh シグナルに作用する天然物のスクリーニング

1) Wnt シグナル

Wnt シグナルに関するスクリーニングには、転写因子 TCF の転写活性をルシフェラーゼ活性により評価する細胞アッセイシステムを用いた。本試験法によりバングラデシュおよびタイ産植物の抽出エキスについてスクリーニングを行い、活性成分の分画を行った。オオバコ科 *Scoparia dulcis* から単離したジテルペン scopadulciol はヒト胃がん細胞 AGS において核内の β -catenin を減少させたが、プロテアソーム阻害剤 MG132 または epoxiomycin を併用すると β -catenin の減少は認められなくなった。これにより scopadulciol はプロテアソーム依存性の β -catenin の分解を促進することが示唆された。また、scopadulciol は AGS 細胞において Wnt シグナルの標的タンパクである cyclin D1, c-myc, および survivin の発現を抑制した。一方、scopadulciol は AGS 細胞において、アポトーシス誘導因子 TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) の感受性を増大させ、TRAIL との併用により顕著な細胞毒性を示すことが明らかとなった。Scopadulciol はデスレセプター DR4 および DR5 の発現を増大させた一方、抗アポトーシス因子 Bcl2 を減少させた。以上により、scopadulciol は AGS 細胞において TRAIL 耐性克服作用を示すことが判明した⁵⁾。

一方、センダン科 *Azadirachta excelsa* からは、1 種の新規および 7 種の既知モノイドを単離した。これらのうち 14, 15 位にエポキシドを含む化合物は顕著な TCF 転写阻害活性を示した。そのうちの 1 種である既知の trichillin H は、ヒト胃がん細胞 AGS および大腸がん細胞 HCT116 に選択的な細胞毒性を示した。Trichillin H は細胞質および核における β -catenin を減少させなかったが、Wnt シグナルの標的タンパク質である c-myc の発現を抑制した。Trichillin H は Wnt シグナル経路において β -catenin より下流に位置するコンポーネントに作用するものと考えられる⁶⁾。

2) Hh シグナル

Hh シグナルを標的として、転写因子 GLI1 の転写阻害活性に関するルシフェラーゼ細胞アッセイ系を構築し、スクリーニングを行った。選別されたナス科 *Solanum nigrum* から Hh シグナル阻害作用をもつ高度に酸化されたステロイド誘導体を 7 種単離した。このうちの 1 種 physarin H は顕著な GLI1 転写阻害活性を示し、Hh シグナルが異常亢進したヒトすい臓がん細胞 PANC1 に対する細胞毒性を有していた。また physarin H は Hh シグナルの標的タンパク質

である Ptch や Bcl2 の発現を減少させた。さらに、physarin H は GLI1 タンパク質と GLI1 結合領域を有する DNA との複合体形成を阻害することがゲルシフトアッセイにより明らかとなった。

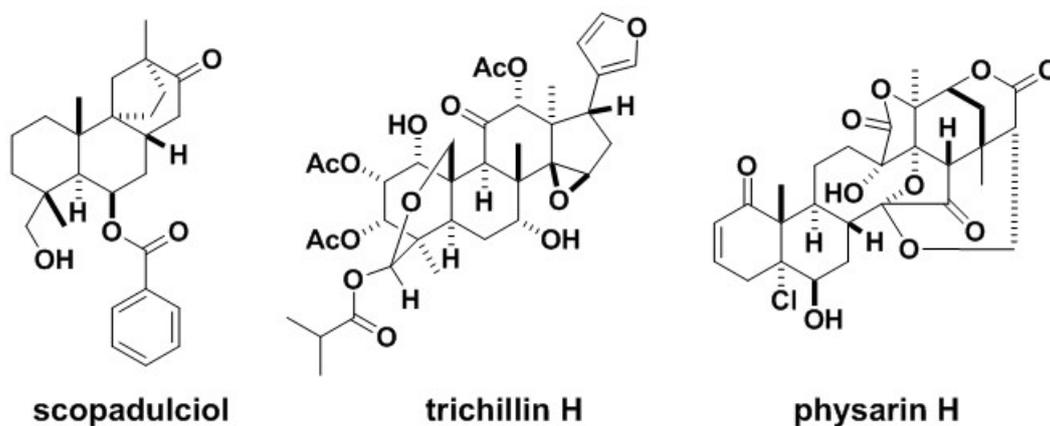


Fig. 2. Natural products having effects on Wnt or Hh signal pathway.

共同研究者

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院薬学研究院の荒井 緑および石川直樹である。最後に、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kreso, A., van Galen, P., Pedley, N. M., Lima-Fernandes, E., Frelin, C., Davis, T., Cao, L., Baiazitov, R., Du, W., Sydorenko, N., Moon, Y.-C., Gibson, L., Wang, Y., Leung, C., Iscove, N. N., Arrowsmith, C. H., Szentgyorgyi, E., Gallinger, S., Dick, J. E. & O' Brien, C. A. : Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nat. Med.*, **20** : 29-36, 2014.
- 2) Cho, J.-H., Dimri, M. & Dimri, G. P. : A positive feedback loop regulated the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **288** : 3406-3418, 2013.
- 3) Wang, X., Venugopal, C., Manoranjan, B., McFarlane, N., O' Farrell, E., Nolte, S., Gunnarsson, T., Hollenberg, R., Kwiecien, J., Northcott, P., Taylor, M. D., Hawkins, C. & Sing, S. K. : Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastom brain tumor-initiating cells. *Oncogene*, **31** : 187-199, 2012.
- 4) Guo, W.-J., Datta, S., Band, V. & Dimri, G. P. : Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Mol. Biol. Cell*, **18** : 536-546, 2007.
- 5) Fuentes, R. G., Toume, K., Arai, M. A., Sadhu, S. K., Ahmed, F. & Ishibashi, M. : Scopadulciol, isolated from *Scoparia dulcis*, induces β -catenin degradation and overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis ligand resistance in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J. Nat. Prod.*, **78** : 864-872, 2015.
- 6) Fuentes, R. G., Toume, K., Arai, M. A., Sadhu, S. K., Ahmed, F. & Ishibashi, M. : Limonoids with Wnt signal inhibitory activity isolated from the fruits of *Azadirachta excels*. *Phytochem. Lett.*, **11** : 280-285, 2015.
- 7) Arai, M. A., Uchida, K., Sadhu, S. K., Ahmed, F. & Ishibashi, M. : Physalin H from *Solanum nigrum* as Hh signaling inhibitor blocks GLI1-DNA complex formation. *Beil. J. Org. Chem.*, **10** : 134-140, 2014.