

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

生命現象分析のための小分子転写因子創成

### 2. 氏名

上杉 志成

### 3. 研究のねらい

老化、分化、癌化といった多くの生命現象が遺伝子の発現によって調節されており、その遺伝子発現を制御しているのは、転写因子と呼ばれる一群の蛋白質である。本研究の目標は、転写因子を小分子有機化合物で模倣し、生物学の道具とすることである。振りかけるだけで細胞膜を透過し遺伝子の発現を制御したり、動物に投与するだけで生体内で自由自在に遺伝子発現を制御する小分子転写因子を開発したい。小分子転写因子の DNA 結合部位にはヘアピンポリアミド化合物を用い、転写活性化部位としては、私たちが開発したレンチノロールという有機分子を用いる。これまでの予備試験によると、このような小分子転写因子の創成は可能だと考えられる。生物学や医学の研究に実際に用いられる道具を開発するため、この提案では原理を証明する実験を行う。本研究は、小分子化合物の夢と限界に挑戦するものであり、その成果は将来の革新技術の礎となるかもしれない。

### 4. 研究成果

#### 小分子転写因子は合成可能！

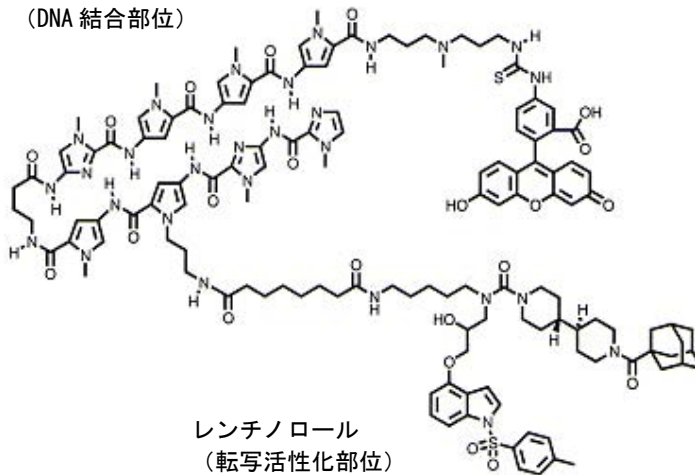
私たちの研究室が見つけたレンチノロールという小分子化合物は、転写活性化部位の小分子版ともいえる(JACS, 126, 3461)。この化合物に DNA に結合する小分子化合物を共有結合させれば、転写活性化部位と DNA 結合部位を併せ持った「小分子転写因子」ができるはずである。このさきがけ研究開始以前に、私たちの研究室では、試験的に小分子転写因子を合成して原理の証明を行った(JACS, 126, 15940)。

DNA 結合部位として、

Dervan らによって開発されたヘアピンポリアミド化合物の一つを利用した(図1)。この化合物は 5'-TGACCAT 配列に特異的に nM オーダーの解離定数で結合する。この DNA 結合分子とレンチノロールを融合させた化合物は、5'-TGACCAT 配列をエンハンサーとしたレポーター遺伝子の転写を活性化するが、エンハンサー配列を変えると転写活性化せず、配列特異的に転写を活性化する。さらに、生化学的な実験から、Sur-2 と RNA ポリメラーゼ II をプロモーターにリクルートすることで転写が活性化されていることも分かった。この融合化合物はまるで転写因子のように振舞う。有機化合物で転写因子ができるということが直接証明された。

しかしながら、この化合物には二つの問題があった。(1)レンチノロールの転写活性化能力が天然の転写活性化部位に比べて弱い。(2)小分子転写因子の細胞透過性が低い。

ヘアピンポリアミド分子  
(DNA 結合部位)



レンチノロール  
(転写活性化部位)

図1 小分子転写因子の化学構造。

このさきがけ研究の目的は、この二つの問題を解決することである。

## ●転写活性化能を向上させたレンチノロール類縁体の探索

### 分子設計および合成

合成したレンチノロール誘導体を図2に示した。一般的に、転写因子の転写活性化ドメインには疎水性部位と親水性部位が点在していることが言われている。私たちの研究によって、レンチノロールが ESX の転写活性化ドメインの疎水性部位を模倣して、Sur2 と相互作用していることが分かっている。そこで親水性部位も模倣できるように、レンチノロールへ水酸基やカルボキシル基を導入した誘導体の合成を行った(2a~3c)。次に、ビピペリジン部位にベンゼン環を挟むことによってレンチの幅を長くした類縁体(4a)やメタ置換にすることで角度を変えた類縁体(4b, 4c)の合成を行なった。さらに、レンチノロールの骨格をフレキシブルにすることを狙い、ビピペリジン部位を様々な長さのアルキル鎖に置換した類縁体(5a~5c)の合成を行なった。

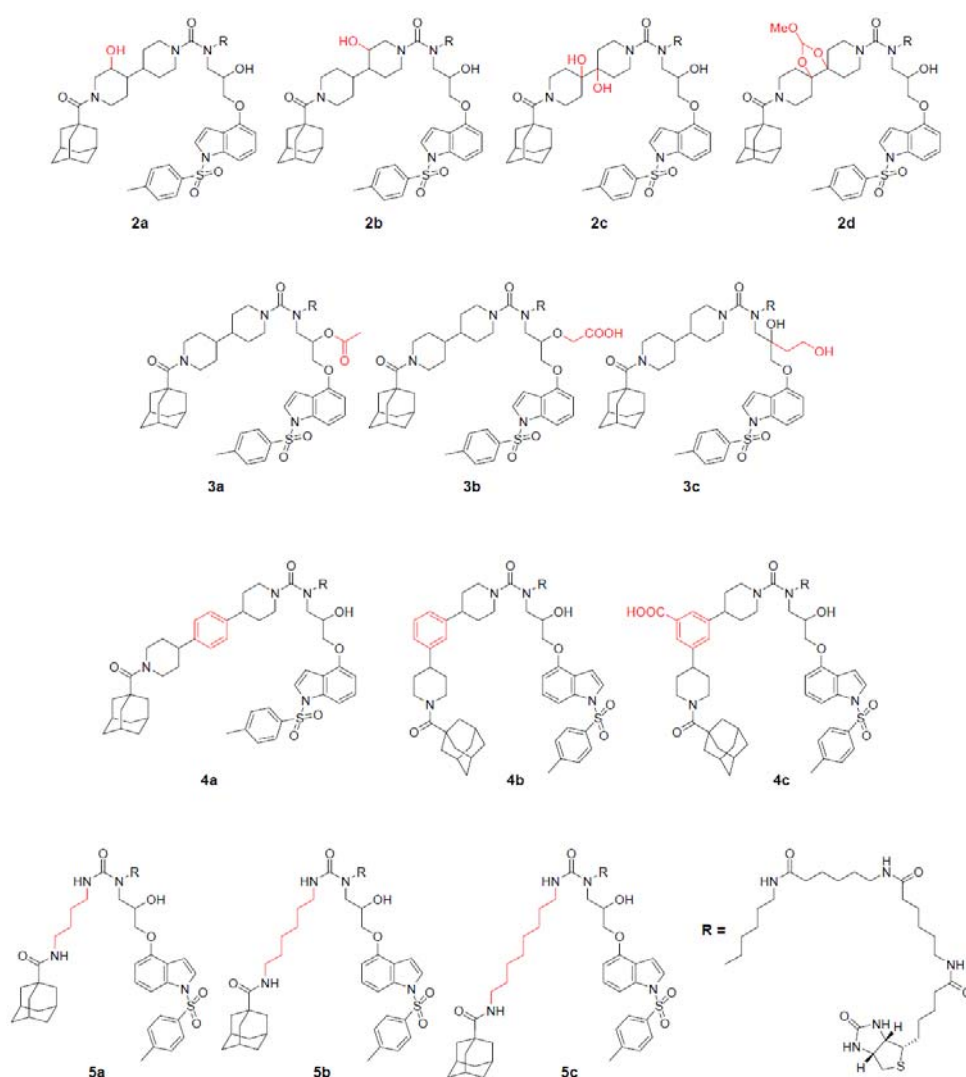


図2 レンチノロール誘導体の化学構造

### レンチノロール類縁体の生物学的評価

合成した類縁体の転写活性化能の評価は二種類の方法を用いて行なった。一つ目は *in vitro*

の系でビオチン化類縁体の転写活性化能が高いほど RI ラベルされた mRNA が多く発現するため濃いバンドが見られる(図3A)。次に、*in vitro* 系の評価で成績の良かった 9 個の類縁体を Gal4-SA plasmid および SEAP reporter plasmid を用いた細胞ベースのレポーターアッセイ(図3B)によって評価した。その結果、レンチノロールに比べて約2倍の活性を持つ 2a と約3倍の活性を持つ 4a を見出すことができた。4a の転写活性化能力は天然の転写活性化部位(ESX)に匹敵する。

### 類縁体 4aによる内因性遺伝子の発現

4a の転写活性化能力が強いのであれば、人工的なレポーター遺伝子ではなく、内因性の遺伝子を活性化できるはずである。そこで MyoD 転写因子に着目した。この筋細胞分化のマスター転写因子は、筋肉分化のための遺伝子を活性化し、筋芽細胞から筋細胞への分化を誘導する。この MyoD の転写活性化部位を 4a で置き換えた。

MyoD 遺伝子の DNA 結合ドメインとストレプトアビジンの融合タンパク質(Myod-SA)を発現するベクターをマウス筋芽細胞(C2C12)に導入し、安定発現株をネオマイシン耐性により選択して樹立した。この細胞株を 2% horse serum を含む培地で培養し、4a(1  $\mu$ M)により一週間処理した。

筋線維は多核の筋細胞によって構成されるが、未分化な段階の筋芽細胞は単核である。すなわち分化の過程で細胞は多核化していくということである。下の写真では、MyoD-SA 発現株をレンチノロール-ビオチン結合化合物で処理し、1週間後に細胞核の核酸塩基に特異的にインターカレートする蛍光色素である Hoechst33342 により染色した結果、筋細胞への分化が顕著に誘導されていることがわかった(図3CD)。

なぜ 4a の活性が強くなったのかを明らかにするためにウエスタンブロット法を用いてレンチノロールおよび 4a と Sur2 の相互作用を評価した(図3E)。その結果、4a はレンチノロールよりも強く Sur2 と結合することが示唆された。さらに 4a と Sur2 の解離定数を蛍光偏光法によって測定した。その結果 4a の解離定数は 0.32  $\mu$ M でありレンチノロール(0.86  $\mu$ M)よりも約 2.6 倍の強さで Sur2 と結合していることがわかった。

これらの成果をまとめ、現在論文投稿中である。

### 5. 自己評価

このさがけ研究では以下の事項を達成することができた。(1)インビトロで遺伝子を発現する小分子転写因子が合成できた。(2)DNAに結合するヘアピンボリアミド分子を安定供給する化学合成法を開発した。(3)レンチノロールを最適化し、細胞内で強く遺伝子発現を活性化できる小分子化合物を見つけ出した。(4)さまざまなタイプの小分子転写因子を合成した。

現時点での問題点は、小分子転写因子の細胞透過性を上げることが予想以上に困難だったということである。これは比較的分子量の大きな分子には普遍的な問題である。今後も続けて研究を行い、この普遍的な問題に挑戦する。

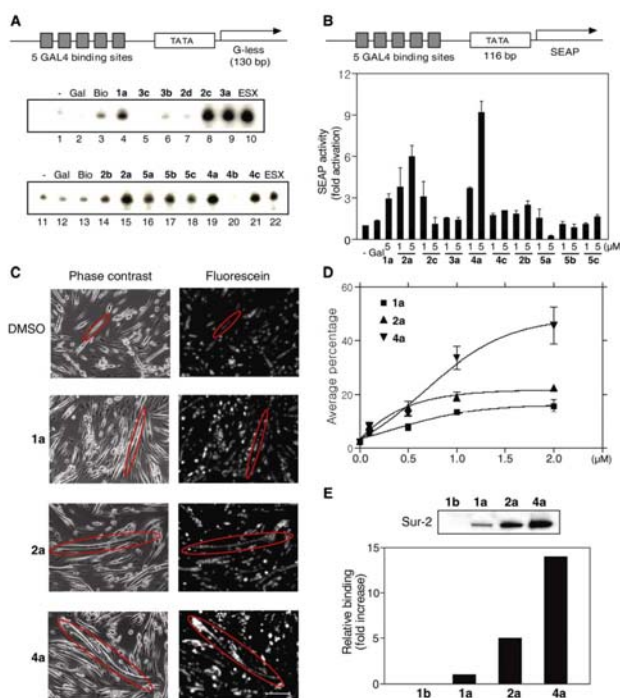


図3 レンチノロール誘導体の転写活性化能の測定

## 6. 研究総括の見解

本研究者が見いだしたレンチノールを出発点として分子設計した数多くの有機分子の合成とスクリーニングの末、有効な小分子転写因子を開発したことは極めて高く評価される。しかしながら、細胞膜透過性に難点があり、是非ともこの点を今後の研究で克服してほしい。また、分解性の問題なども課題となろう。大きな目標を持った研究なので本研究者の情熱と執着心をもってすれば必ず達成されるであろう。

## 7. 主な論文等

### (A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Choi, Y., Shimogawa, H., Murakami, K., Ramdas, L., Zhang, W., Qin, J., Uesugi, M. Chemical genetic identification of the IGF-linked pathway that is mediated by STAT6 and MFP2. *Chem. Biol.* 13, 241-249 (2006).

・Sato, S., Kwon, Y., Kamisuki, S., Srivastava, N., Mao, Q., Kawazoe, Y., Uesugi, M. Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: Isolation of a new target of indomethacin. *J. Am. Chem. Soc.* 129(4), 873-880 (2007).

・Jung, D., Shimogawa, H., Kwon, Y., Mao, Q., Sato, S., Kamisuki, S., Kigoshi, H., Uesugi, M. Wrenchinolol Derivative Optimized for Gene Activation in Cells. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 4774-4782 (2009).

#### (2) 特許出願

・発明者: 上杉志成、山添紗有美

発明の名称: 細胞接着促進剤及び細胞の接着を促進させる方法

出願人: 京都大学

出願日: 2008年6月18日

#### (3) 受賞

・平成18年4月 東京テクノフォーラム 21 ゴールド・メダル賞

#### (4) 著書

・Jung, D., Choi Y., Uesugi, M. Small organic molecules that modulate gene transcription. *Drug Discovery Today* 11, 452-457 (2006).

・紙透 伸治, 上杉 志成 「小分子化合物で転写因子をつくる」 化学と生物 Vol.45, No.4 (2007).

・下川浩輝, 上杉志成 「小分子有機化合物による転写制御」 化学工業 58(5) 58-66 (2007).

・佐藤綾人, 上杉志成 「有機化合物で転写因子をつくる」 *Medical Science Digest* 34(1) 5-6 (2008).

#### (5) 招待講演

##### 招待講演(国際)

・Uesugi, M. "Chemical biology of gene expression and cell differentiation." 6th Australian Peptide Conference. 2005, 10.

• Uesugi, M. "Chemical biology of gene expression and cell differentiation." ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC, International Conference on Biodiversity and Natural Products. 2006, 7.

• Uesugi, M. "Chemical Biology of Gene Expression." 2006 Japanese-American Kavli Frontiers of Science Symposium. 2006, 12.

• Uesugi, M. "Chemical biology of gene expression." 19<sup>th</sup> FAOBMB Seoul Conference. 2007, 5.

• Uesugi, M. "Isolating and identifying the targets of bioactive small molecules." The 22<sup>nd</sup> Naito Conference on Chemical Biology. 2008, 9.

## (B)その他の主な成果

### (1)論文(原著論文)発表

#### 論文(国際)

• Henderson, Y. C., Frederick, M. J., Jayakumar, A., Choi, Y., Kang, Y., Spring, P. M., Uesugi, M., and Clayman, G. L. Human LBP-32/MGR is a repressor of the P450scc in human choriocarcinoma cell line JEG-3. Placenta. 28, 152-160 (2006).