

2018年1月27日

## 「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員（主査） 農学部 専任准教授

氏名 久城 哲夫 印

（副査） 農学部 専任教授

氏名 前田 理久 印

（副査） 農学部 専任講師

氏名 小山内 崇 印

1 論文提出者 氏名 高瀬 翔平

2 論文題名

（邦文題） 効率化した shRNA ライブラリースクリーニングによる生理活性物質の標的経路の解明

（欧文訳） Analysis for target pathways of bioactive compounds using modified shRNA library screening

3 論文の構成

本論文は、以下のように構成されている。

第1章 序論

第2章 shRNA ライブラリースクリーニングの効率化

第3章 オーリライド B の作用機構解析

第4章 JBIR-140 の作用機構解析

総括と展望

実験の部

参考文献

4 論文の概要

第1章では、生理活性物質の標的特定や shRNA ライブラリースクリーニング技術、化合物オーリライド B や JBIR-140 に関連したこれまでの知見と本研究の目的について述べている。

微生物や植物が生産する天然有機化合物は非常にユニークで複雑な構造を有し、

特徴的で強力な生理活性を持つものが数多く存在する。そのような生理活性物質の標的分子を同定することは創薬研究において重要な研究分野であり、それら化合物をバイオプローブとして利用できることによって生命科学等の基礎研究のさらなる発展にも大きく貢献できる。生理活性物質の標的分子の同定は標的既知化合物の多様なオミクスデータの比較や、化合物の物理的相互作用等の解析を駆使するため、労力や時間の面で非常に困難であり、創薬研究の律速段階となっている。化学遺伝学的アプローチとして shRNA ライブラリーを用いたゲノムワイドな RNAi スクリーニング技術は、生理活性物質の作用機構解析にとって非常に有効な手段の 1 つである。この手法は、網羅的でバイアスのない解析を可能とし、生理活性物質の直接的な標的分子や経路だけでなく、合成致死に関わる因子の同定も一挙に行うことが期待できる。これにより、細胞増殖抑制活性を持つ生理活性物質の標的分子の同定だけでなく、生理活性物質の副作用の推定や、合成致死的同定を通して治療薬の併用療法の確立にもつながることが期待される。しかし、この手法は次世代シーケンサーでの解析が必須であるため、時間やコストの面が課題であり、ハイスループットな実験系の妨げとなっている。そこで本研究では、インデックスタグを PCR プライマーに付加することでマルチプレックスシーケンスを可能とし、より効率的な解析手法を確立することを目的とした。

第 2 章では、shRNA ライブラリースクリーニングの効率化を目指し、インデックスタグを付加した PCR プライマーを用いてマルチプレックスバーコードシーケンスの確立に関する内容を述べている。本研究で確立した手法によって、少なくとも従来の 4 倍量のサンプルを一度に次世代シーケンサーにて解析できるようになった。この改良した手法は再現性や定量性がある方法であることを確認した。さらに、DNA topoisomerase II の阻害剤であるエトポシドを用いて shRNA ライブラリースクリーニングを行ったところ、既報と一致し、DNA topoisomerase II に対する shRNA を発現する細胞が顕著に蓄積した。このことより、本研究によって確立した shRNA ライブラリースクリーニングにおけるマルチプレックスバーコードシーケンスは従来通り生理活性物質の標的分子に関わる遺伝子の同定を可能としているだけでなく、スループット性の向上により従来の手法と比較して効率的な評価系になったことが示された。

第 3 章では、オーリライド B を用いた shRNA ライブラリースクリーニングの結果について述べている。オーリライド B は、シアノバクテリア *Lyngbya majuscula* から単離されたシクロデプシペプチドの一種であり、癌細胞に対して GI<sub>50</sub> 値が 10 nM 以下といった強力な細胞毒性を有しているため、治療薬のリード化合物としての可能性を有している。そこで、改良 shRNA の手法を用いてオーリライド B への感受性を亢進するような遺伝子の同定を試みたところ、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase の  $\alpha$  サブユニットをコードする *ATPIA1* をノックダウンすることでオーリライド B に対する感受性が亢

進することを明らかにした。さらに、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase の阻害剤である強心配糖体ウアバインとオーリライド B の併用処理により感受性が亢進した。この現象はいくつかの癌細胞においても確認されたことから、癌細胞全般に併用効果があることが示唆された。また、ウアバイン処理は OPA1 のプロセシング活性には影響を与えないこと、ウアバインとオーリライド B の併用処理によってアポトーシスが亢進していること、ウアバインとオーリライド B 処理はそれぞれ細胞内 ATP 量を減少させていることを明らかにした。これらのことより、ATP1A1 の阻害とオーリライド B 処理による細胞への効果には相互に関連したメカニズムが存在し、特にミトコンドリアでの作用機構を介した細胞死を亢進していることが示唆された。

第 4 章では、JBIR-140 の標的分子の同定を目的に行った結果について述べている。JBIR-140 は 5 つのチオアミド構造を有するウンデカペプチドの抗生物質であり、JBIR-140 の類縁体であるチオピリダミドはアデノウイルスが持つ癌遺伝子 E1A を発現させた細胞選択的にアポトーシスを誘導する化合物として放線菌 *Streptomyces olivoviridis* より単離された。JBIR-140 の標的分子を同定するために、DNA マイクロアレイ、改良 shRNA ライブラリースクリーニング、JBIR-140 を固定化したビーズを用いた結合タンパク質の同定等、多方面からの解析を行った。DNA マイクロアレイの結果から、JBIR-140 は統合ストレス応答 (Integrated stress response, ISR) を誘導していることが明らかとなり、ISR の中でもアミノ酸飢餓で活性化することが知られている GCN2 のリン酸化を引き起こしていることが明らかとなった。次に、改良 shRNA ライブラリースクリーニングによって、JBIR-140 が引き起こす細胞増殖阻害活性に関わる遺伝子として 124 遺伝子を同定した。その中でも翻訳関連因子やミトコンドリアに局在したタンパク質のノックダウンは JBIR-140 の感受性を見かけ上弱めるだけでなく、JBIR-140 が誘導する ISR のうち GCN2-ATF4 経路を活性化していることから、これらの遺伝子は JBIR-140 の標的経路に関わることが示唆された。また、JBIR-140 を固定化したビーズを用いた結合タンパク質の検出では、JBIR-140 はミトコンドリア呼吸鎖 complex V の  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase の  $\alpha$  サブユニット ATP5A、 $\beta$  サブユニット ATP5B、ミトコンドリア外膜に局在する VDAC と結合していた。さらに、JBIR-140 はミトコンドリア呼吸鎖 complex V を阻害することで GCN2-ATF4 経路を活性化していることが明らかとなった。そして、E1A 発現は GCN2-ATF4 経路の発現亢進または安定化に寄与することによって、JBIR-140 への感受性が亢進していることが示唆された。

## 5 論文の特質

本研究では、従来の shRNA ライブラリースクリーニングにおける次世代シーケンサーの解析において、インデックスタグを付加した PCR プライマーを用いることでマルチプレックスバーコードシーケンスの確立に成功し、従来の手法よりもスル

ーット性を大きく向上させることができた。本手法を癌細胞への細胞毒性を有する海洋天然物オーライド B の作用機構解析に適応することで、その毒性の発現機構が、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase の  $\alpha$  サブユニットである ATP1A1 を介することを明らかにした。また、アデノウイルスの癌遺伝子 *E1A* を発現させた細胞選択的にアポトーシスを誘導する JBIR-140 の標的分子の探索に適応することで、JBIR-140 は統合ストレス応答を誘導し、GCN2 のリン酸化を引き起こすことを明らかにした。

## 6 論文の評価

生理活性物質の細胞内の標的経路の同定において、shRNA ライブラリースクリーニングは、化合物の直接の標的分子または経路に関わる細胞内因子の同定を可能とする強力な手法であるが、コストがかかり、スループット性が低いなどの問題点があった。本研究で開発されたマルチプレックスバーコードシークエンス法はこれらの点を大幅に改善するものであり、本手法を 2 種類の生理活性天然物の標的探索に適応することで、これまで未知の標的タンパク質および経路を同定することに成功するなど大きなインパクトを与えた。さらに、オーライド B を既存の薬物と併用することで効果が亢進されることを見出し、これは併用薬剤の同定につながる画期的な成果である。また、JBIR-140 がミトコンドリアの呼吸鎖 complex V を阻害することを見出したことで、アデノウイルスの癌遺伝子 *E1A* を介した選択的なアポトーシス誘導のメカニズムの解明に寄与するなど、今後の創薬研究や基礎研究にも大きく貢献することが期待される。

## 7 論文の判定

本学位請求論文は、農学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以 上