

タマゴからの mRNA 成熟阻害活性を指標とする 抗ガン化合物の探索と産業利用

京都大学大学院生命科学研究科・准教授 増田 誠司

■ 緒 言

鶏卵は長年安価かつ安定に供給されてきた物価の優等生である。食品としてのタマゴは、栄養学的に極めて優良な食品であるが故に、新たな活性因子の探索を行わなくても、その重要性は十分に認知されてきた。このため、タマゴの中の活性化合物の探索とその作用機序に関する研究は十分とは言えない。一方で、タマゴは生鮮食料品であるため鳥インフルエンザ等の疫病の影響を大きく受ける。これらのことから、2次加工品として価値をもつ商品の開発は、関連業界にとって大きな価値を持つことになる。よってタマゴの持つ新たな有効成分を社会に発信するために、新規の指標を用いて活性化合物を探索し、評価する系の確立が求められている。

最近、mRNA の成熟過程は抗ガン剤の重要なターゲットとして期待されている (Kaida et al., 2007; Kotake et al., 2007; 小竹良彦, 水井佳治, 2010)。著者は、mRNA の成熟因子に関する研究を行ってきたことから (Fujiwara et al., 2010; Masuda et al., 2005; Strasser et al., 2002; Yamazaki et al., 2010)、mRNA の成熟阻害という作用機序の明らかなスクリーニング系を用いて、食品から抗ガン活性化合物を探索・利用するためのスクリーニング・評価系をいち早く開発した (Fujita et al., 2012; 増田誠司, 2011)。本スクリーニング系で見つかった化合物の作用機序は、mRNA の成熟阻害による細胞増殖の阻害にあるので、特定保健用食品としても早期産業利用が期待できる。

■ 方 法

1. 細胞の培養

HeLa 細胞にイントロンを含むレニラルシフェラーゼ遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、0.5 μ g/ml のピューロマイシンで遺伝子の導入された細胞を選択した。その中よりレニラルシフェラーゼを安定に発現する株 RLM1 株を取得した。この細胞は、DMEM+10%牛胎児血清の培地を用い、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ に調整したインキュベーターで維持した。

2. サンプルの調製

サンプルを 20% (W/V) となるように PBS で希釈した。その後、ボルテックスで懸濁してサンプルとした。クルードサンプルについては、細胞培養液に対して終濃度 0.1%、0.5% となるように添加した。また純品サンプルについては、結果欄に記載の通りである。

3. ルシフェラーゼレポーターによるスクリーニング

1 段階目のスクリーニングは、イントロンを含むレニラルシフェラーゼを安定に発現する RLM1 株を用いて、サンプル中の mRNA 成熟に関わる因子の探索を遂行した。RLM1 細胞 2x10⁴ cells/well となるように 12 well plate に播いた。24 時間培養後、サンプルを細胞に添加して 24 時間培養した後、細胞を PBS で洗浄し、ルシフェラーゼ可溶化緩衝液 (Promega) を用いてタンパク質の抽出を行った。レニラルシフェラーゼ活性は Renilla luciferase assay system (Promega) を用いて測定した。またタンパク質総量は、Protein assay kit (Nacalai) により測定した。レニラルシフェラーゼ活性を総タンパク質量で標準化した。

4. RNA-in situ hybridization による mRNA の局在解析

1 段階目において活性のあったサンプルの作用点が mRNA のプロセッシング過程にあることを RNA-in situ hybridization (FISH) により mRNA の局在を確認することで評価した。RNA-FISH は、既報告の方法により行った (Fujita et al., 2012; Fujiwara et al., 2010)。カバーガラスを乗せた 12 well plate 上で細胞を 24 時間培養し、サンプルを添加後、24-48 時間培養した。その後、PBS で洗い、10%ホルムアミドで固定化した。次いで 0.1% TritonX100 で細胞を透過化した。これを 2xSSC で洗浄し、oligo-hybrid buffer (Ambion) で 1 時間処理した。その後 Cy3 で標識した oligo-dT₄₅ と 1 晩ハイブリダイズした。翌日、2xSSC、0.5xSSC、0.1xSSC で洗浄した後、DAPI を用いて核を対比染色した。mRNA の局在

を蛍光顕微鏡で観察した。

■ 結果

本探索系で行うアッセイを図1に示した。mRNA スプライシングを阻害する Gex1A (Hasegawa et al., 2011; Sakai et al., 2002)は、このアッセイ系で効果的に検出されることを昨年度の貴財団に報告した。まずタマゴサンプルについて検討した。ニワトリタマゴのうち、無精卵1日目、6日目、有精卵1日目、6日目をそれぞれ0.5%、1.0%となるように培地に添加し、24時間後のレニラルシフェラーゼ活性を測定した。有精卵1日目、有精卵6日目のサンプルにおいては、いずれの場合にも有意なレニラルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。一方無精卵を使用した場合、6日目のサンプルでは、レニラルシフェラーゼの活性が低下する傾向が観察された。しかし再現性は得られなかった (data not shown)。このことから、mRNA 成熟阻害成分が存在しているにしても、その量は極めて微量であると考えられた。

そこでタマゴ中の活性因子の濃度が検出限界以下である可能性について検証するため、食品に存在する化合物を用いて本アッセイ系の感度を検討することとした。そのために比較的多数の食品由来精製サンプルが安価に手に入る様々な化合物を用いて検討した。

様々な食品に由来する化合物を検討した中で、白ウコンに存在するゼルンボンを追加すると、レニラルシフェラーゼの活性が濃度依存的に低下した(図2)。そこで RNA-FISH により mRNA の局在を観察した。その結果、ゼルンボンの添加濃度依存的に mRNA の局在は細胞質から核へと変化した(図3)。したがってゼルンボンには mRNA 成熟阻害活性があると考えられた。この効果が mRNA スプライシングであるのか、そのほかのプロセッシングであるのかについて現在解析中である。

■ 考察

発ガンの原因には、化学物質、ウイルス、紫外線などの放射線、ストレスなど、さまざまなものが挙げられる。よってガンになりにくい食事の摂取が必要であるとともに、一歩進んでガンを抑制する活性化化合物を食品やサプリメントから積極的に利用することで健康な長寿社会の実現に近づくと期待される。

鶏卵は最も優れた栄養価を持つ食品であり、ビタミン B₂ やグルタチオンの材料となるメチオニンが豊富に存在する。これらの化合物は、抗酸化活性を通して抗ガン活性を持つ化合物として報告されている。ただビタミン C 等のサプリメントが普及する中で、これらの抗酸化化合物がタマゴに存在する量は特記に値する程ではない。この他にも様々な活性成分がタマゴには含まれている。そこでタマゴの持つ新たな有効成分を社会に発信するために、新規の指標を用いて活性化化合物を探索し、評価する系の確立が求められている。本研究は、タマゴに含まれている抗ガン活性を持つ成分を探索し、産業利用へと結びつけることを最終的な目標としている。

そこでタマゴ懸濁液についてレニラルシフェラーゼ活性を測定したところ、再現性良く活性の低下が観察されるのは見いだせなかった。原因として、タマゴ中には mRNA 成熟阻害活性が存在しないか、あるいは存在するとしても有効濃度が検出限界以下であると考えられた。

そこで有効成分が検出限界以下である可能性について検証するため、食品に存在する化合物を用いて本アッセイ系の感度を検討することとした。そのために精製サンプルが安価に手に入る食品由来の様々な化合物を用いて検討することとした。検討した中で白ウコンに由来するゼルンボンに mRNA 成熟阻害活性を認めた。ゼルンボンによる、mRNA 成熟阻害活性は 20 μ M から見られ始める。一方コントロールとして用いた Gex1A については、2桁低い濃度において効果が観察された。一般に食品中の生理活性物質は医薬品等に用いられる薬剤に比べて作用発現に必要な濃度が高い。今回の探索においても同様の傾向が見られた。このことから、タマゴそのものの抽出液をそのままスクリーニングするのではなく、あらかじめ分画したサンプルを用いることにより、タマゴに含まれている有効成分を検出することが出来ると考えられた。

■ 要約

最近の研究から、mRNA のプロセッシング過程は抗ガン剤探索において有効な標的として新たに期待されている。そこで mRNA のプロセッシング過程をモニタリングするシステムを用いてタマゴに由来する mRNA プロセッシング阻害成分を探索した。残念ながら正の結果は得られなかった。そこで本アッセイ系の感度を観察する実験を行った。その結果、本アッセイ系の検出感度は食品に由来する化合物の濃度が 10 μ M 程度以上必要であると考えられた。実際に、この濃度以上を食品に含む化合物は比較的

少ないと考えられる。したがって食品の成分を直接アッセイ系にかけて有効成分を検出することは困難と考えられた。一方コントロールとして用いている Gex1A の有効濃度は $0.1\mu\text{M}$ 程度と考えられた。この有効濃度の差は、阻害剤と食品成分の差であり、合理的と考えられる。したがって食品成分を直接アッセイにかけるよりは、様々な溶媒を用いてまず分画してからアッセイをすることが必要と考えられた。今後は、タマゴの主要な成分についてある程度精製あるいは分画し個別にアッセイにかけることにより、有効濃度以上にする必要があると考えられた。

■ 文 献

Fujita, K., Okamura, M., Nishimoto, S., Kurihara, T., Momma, K., Miyamae, Y., Kambe, T., Nagao, M., Narita, H., and Masuda, S. (2012). Establishment of a monitoring system to detect inhibition of mRNA processing. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 76, 1248-1251.

Fujiwara, N., Yoshikawa, M., Yamazaki, T., Kambe, T., Nagao, M., and Masuda, S. (2010). A screening method tuned for mRNA processing factors in human cells by evaluation of the luciferase reporter activity and the subcellular distribution of bulk poly(A)⁺ RNA. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74, 1512-1516.

Hasegawa, M., Miura, T., Kuzuya, K., Inoue, A., Won Ki, S., Horinouchi, S., Yoshida, T., Kunoh, T., Koseki, K., Mino, K., *et al.* (2011). Identification of SAPI55 as the target of GEX1A (Herboxidiene), an antitumor natural product. *ACS Chem Biol* 6, 229-233.

Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., *et al.* (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* 3, 576-583.

Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M., and Mizui, Y. (2007). Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol* 3, 570-575.

Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005). Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev* 19, 1512-1517.

Sakai, Y., Yoshida, T., Ochiai, K., Uosaki, Y., Saitoh, Y., Tanaka, F., Akiyama, T., Akinaga, S., and Mizukami, T. (2002). GEX1 compounds, novel antitumor antibiotics related to herboxidiene, produced by *Streptomyces* sp. I. Taxonomy, production, isolation, physicochemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 55, 855-862.

Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., *et al.* (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417, 304-308.

Yamazaki, T., Fujiwara, N., Yukinaga, H., Ebisuya, M., Shiki, T., Kurihara, T., Kioka, N., Kambe, T., Nagao, M., Nishida, E., *et al.* (2010). The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. *Mol Biol Cell* 21, 2953-2965.

小竹良彦、水井佳治(2010). スプライシング因子を標的とする抗ガン剤研究. *細胞工学* 29, 168-174.

増田誠司 (2011). 卵からの新規 mRNA 成熟阻害活性を指標とする抗ガン化合物の探索と利用へ向けた基盤研究. *財団法人旗影会平成 23 年度研究報告概要集* 1, 83-88.

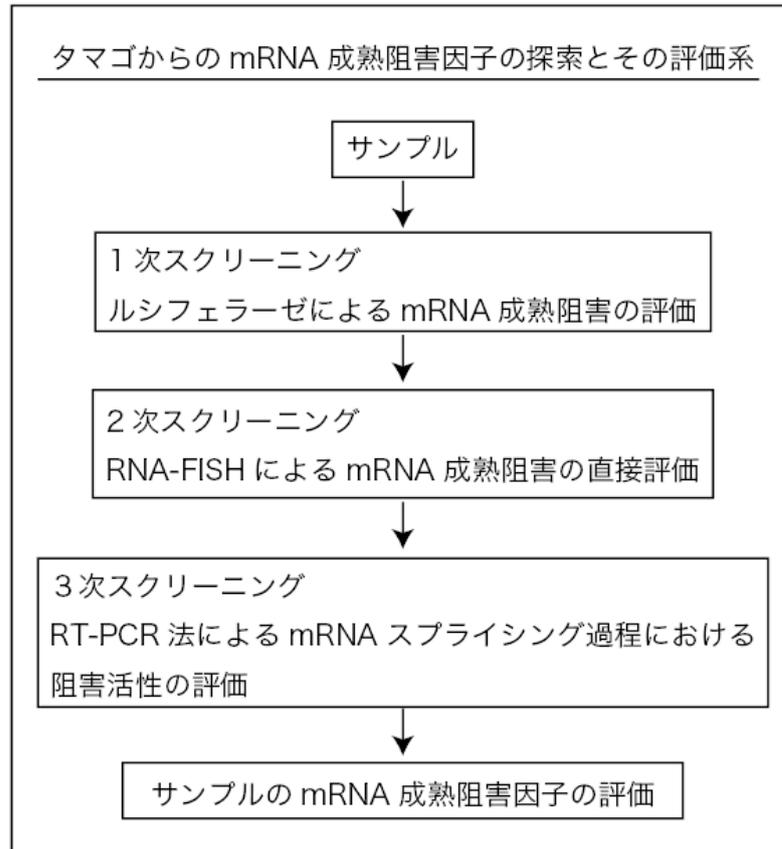


図1 本研究のスキーム

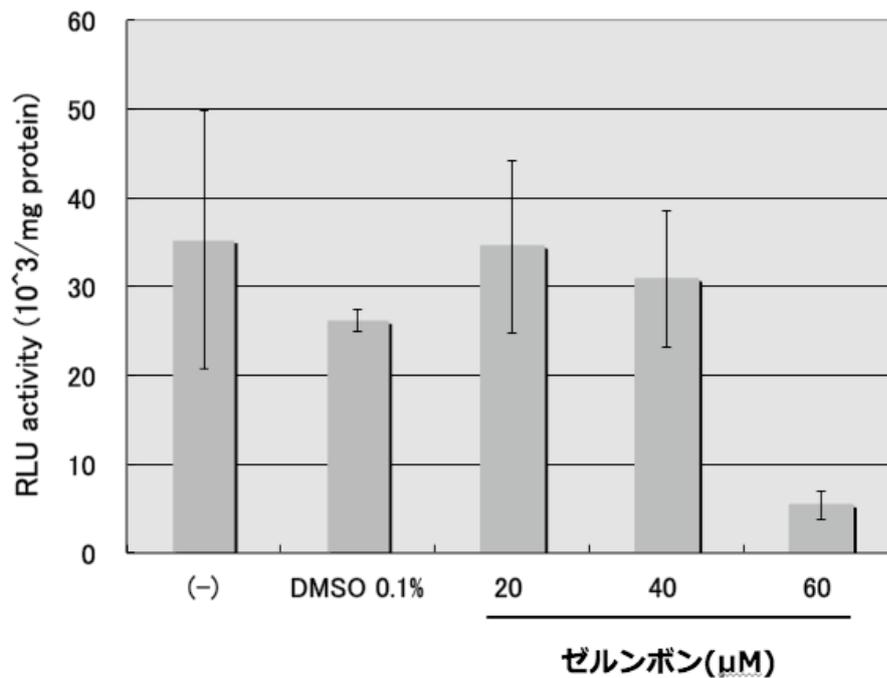


図2 ゼレンボンによるレニラルシフェラーゼ活性の低下

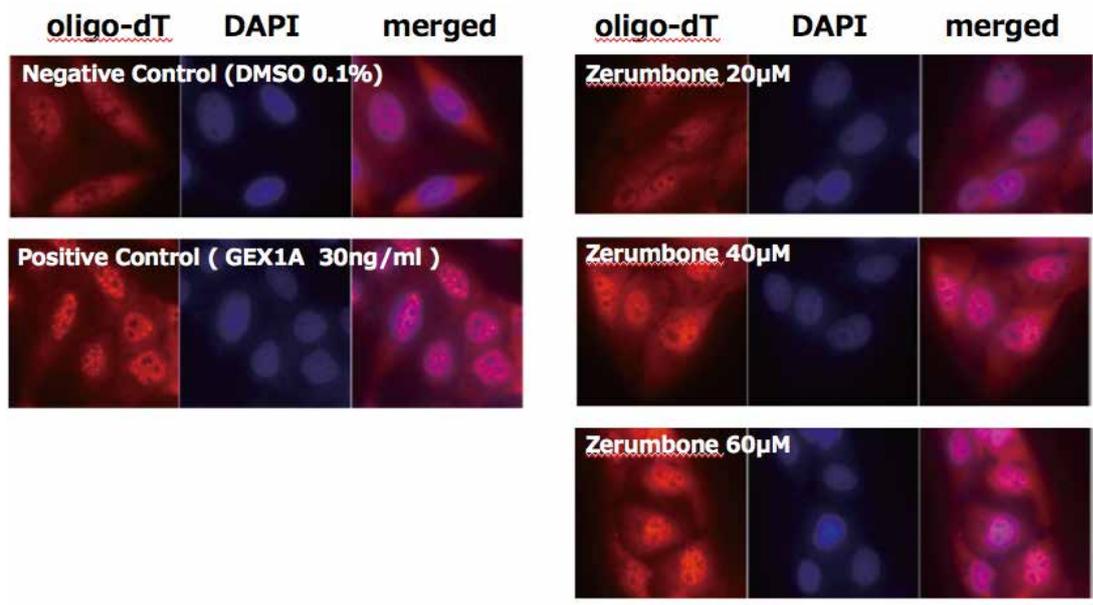


図3 ゼルンボンによる mRNA 局在の変化
 oligo dT は mRNA を検出、DAPI は染色体 DNA を検出、merged は、検出した mRNA と DNA をあわせた画面