

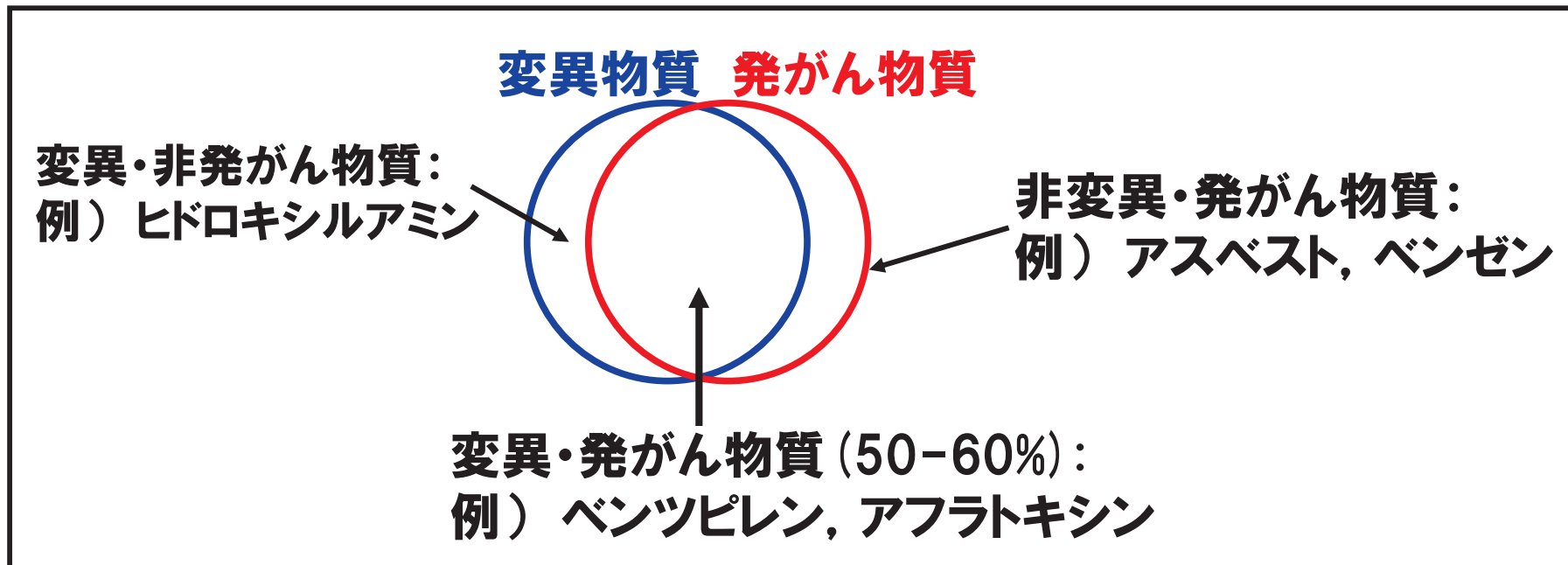
タンパク質相互作用に基づく 化学発がん性の迅速検定方法

金沢大学医薬保健研究域薬学系

准教授 山下 克美

化学物質の突然変異原性(遺伝毒性)→発がん性の指標として有用

エームス (Ames) 試験—サルモネラ菌を用いて、突然変異原性の有無を調べる。化学物質がDNAに傷を付け、それが原因となって、突然変異を導く。簡単(1週間以内で結果がでる, 誰でもできる), 安価。



非遺伝毒性発がん性を短期で評価できる試験法??

明確な指標がないことがシステムを開発するうえでネックとなる
マイクロアレイ—遺伝子発現で検定する→トキシコゲノミクス的手法

化学物質の発がん性を予測する短期評価法

非遺伝毒性化学発がん物質が存在するにもかかわらず有効な短期評価試験法がない。



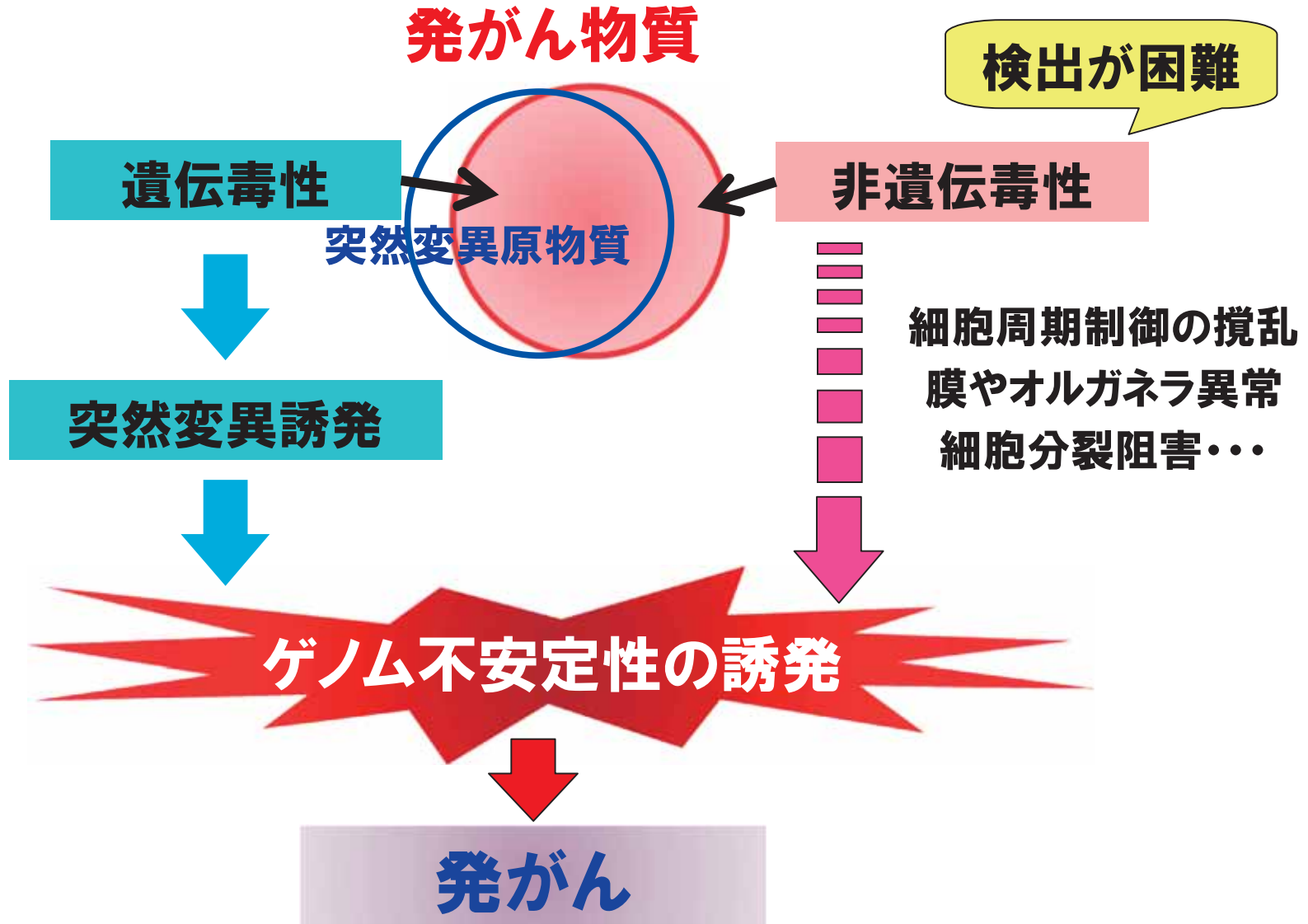
疑わしきものは、**長期動物発がん試験**で判定。



時間・コスト・労力がかかる(2年間、1億円以上)。

一次判定が可能な方法の開発→**大幅なコスト削減**

化学発がん物質と発がん



基本コンセプト

遺伝毒性発がん物質

非遺伝毒性発がん物質

突然変異

細胞ストレス

細胞周期制御因子

細胞周期異常

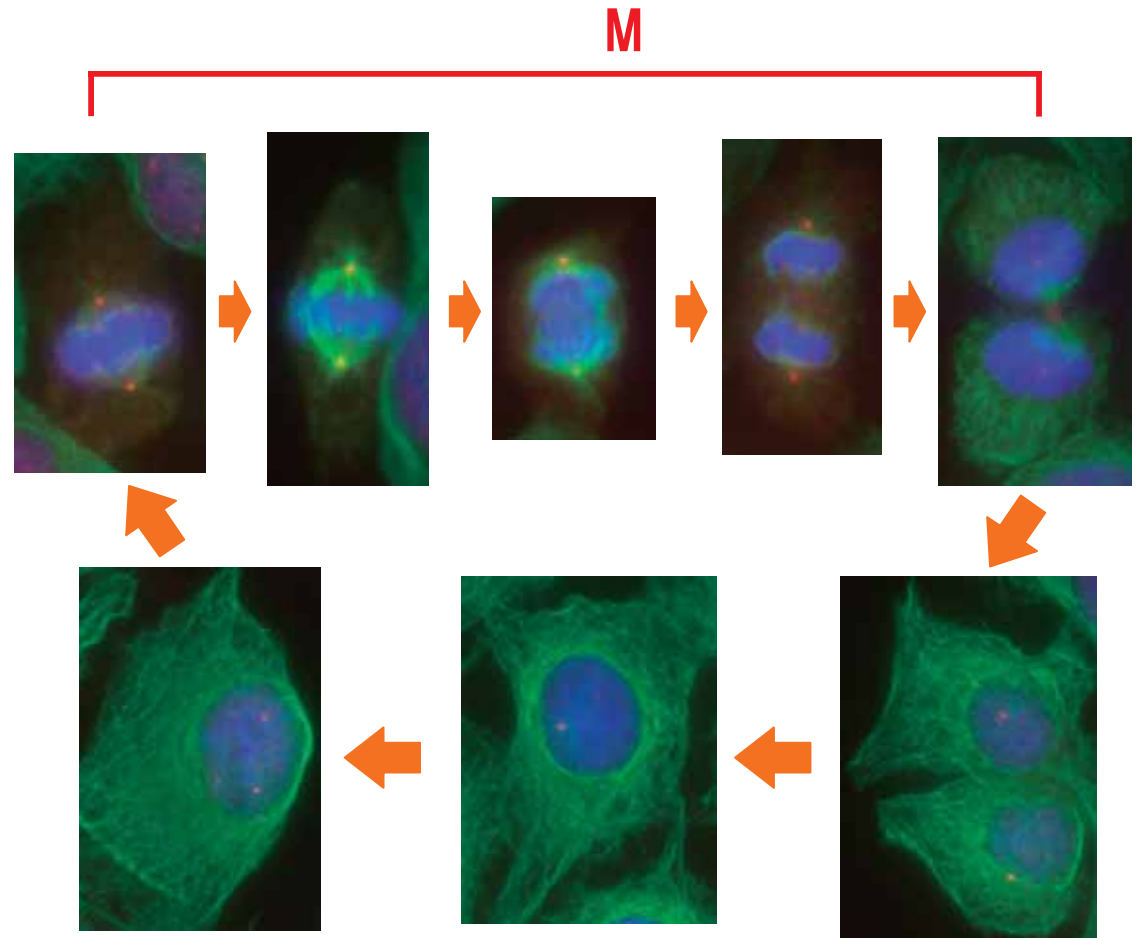
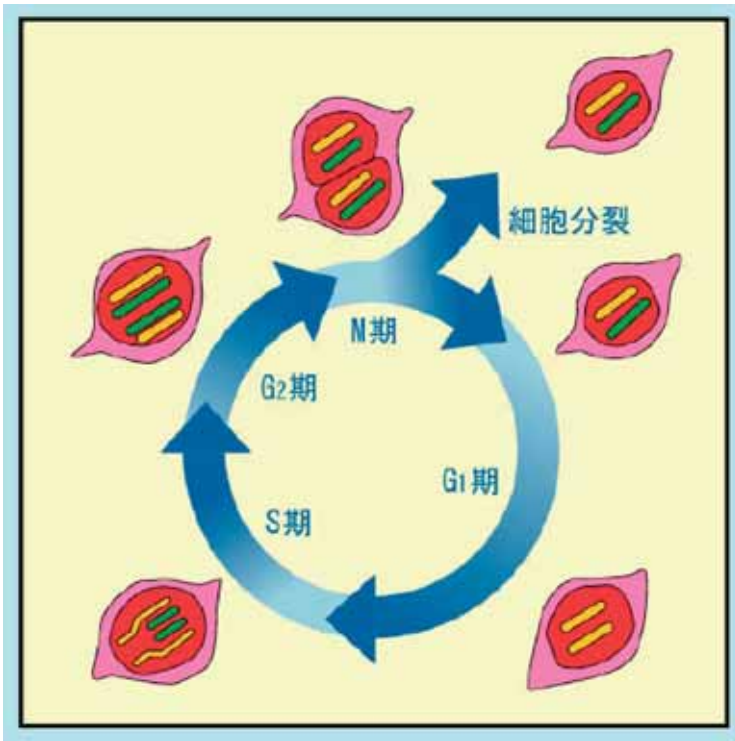
ゲノム不安定性

ゲノム損傷を起こさなくても細胞周期は停止するはず



非遺伝毒性化学発がん物質候補

哺乳動物細胞の細胞周期調節

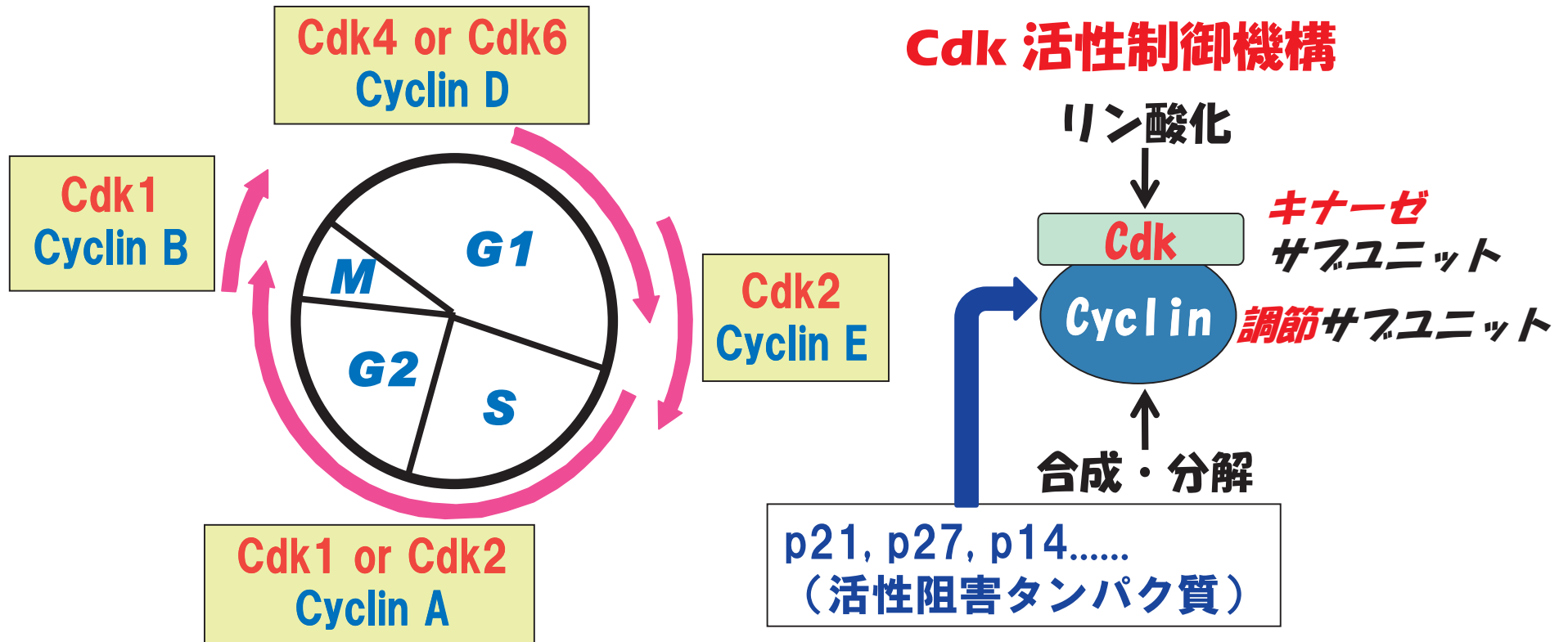


G₂

G₁~S

G₁ (new born)

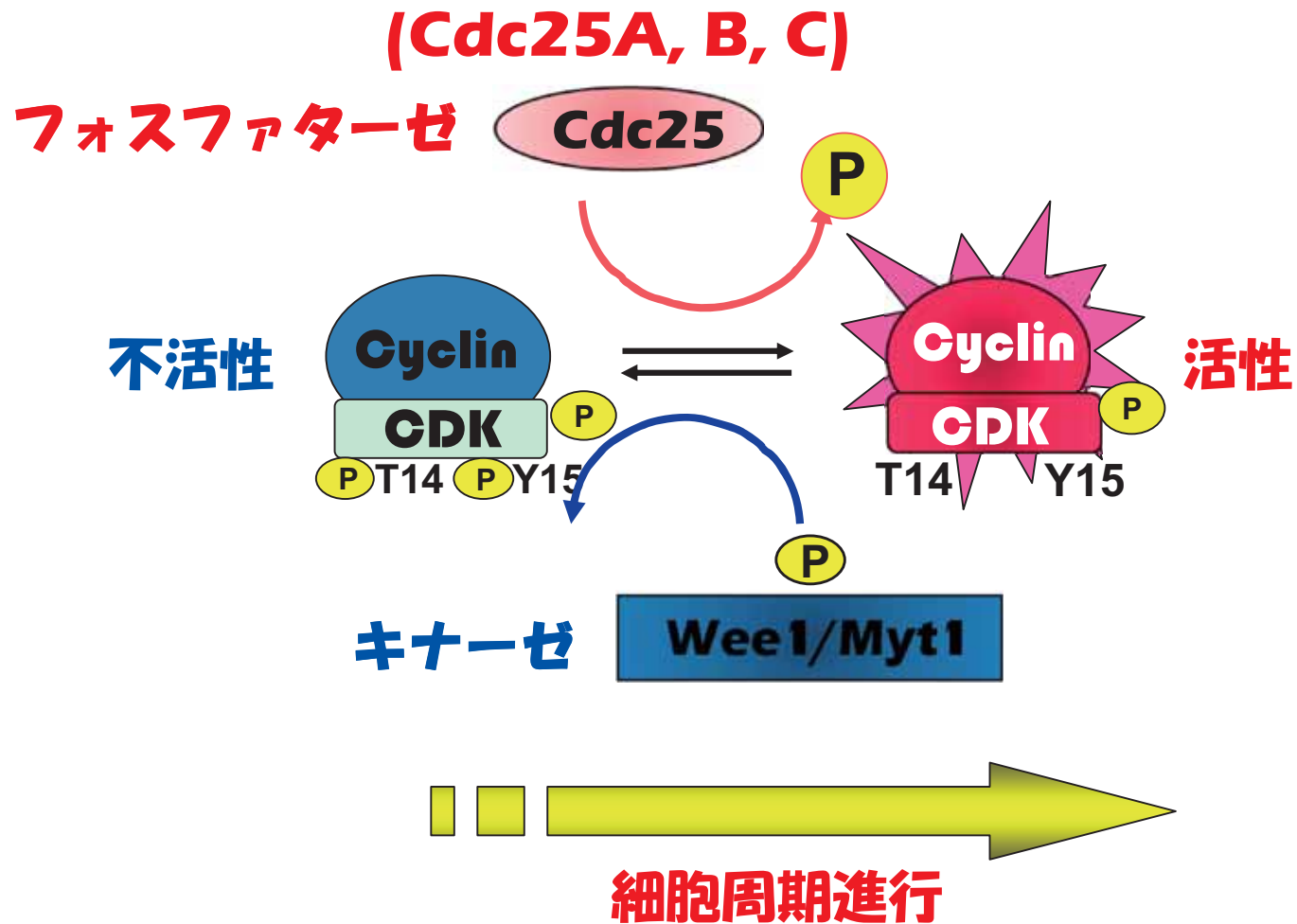
細胞周期とCyclin-dependent kinases(Cdk)



Cdk のキナーゼ活性が細胞周期を制御

→ゲノム安定性制御のエンドポイント

細胞周期進行制御における Cdc25 と Wee1/Myt1



Cdc25A と Cdc25B は 発がん関連遺伝子

Cdc25A/Cdc25Bの制御異常は細胞がん化を引き起こす

- ・正常細胞にフォーカス形成＝細胞がん化を誘発する
 - ・臨床的にも多くの腫瘍で発現の亢進が認められる
- :悪性度との関連性



Cdc25A/Cdc25Bを標的とした抗がん剤開発

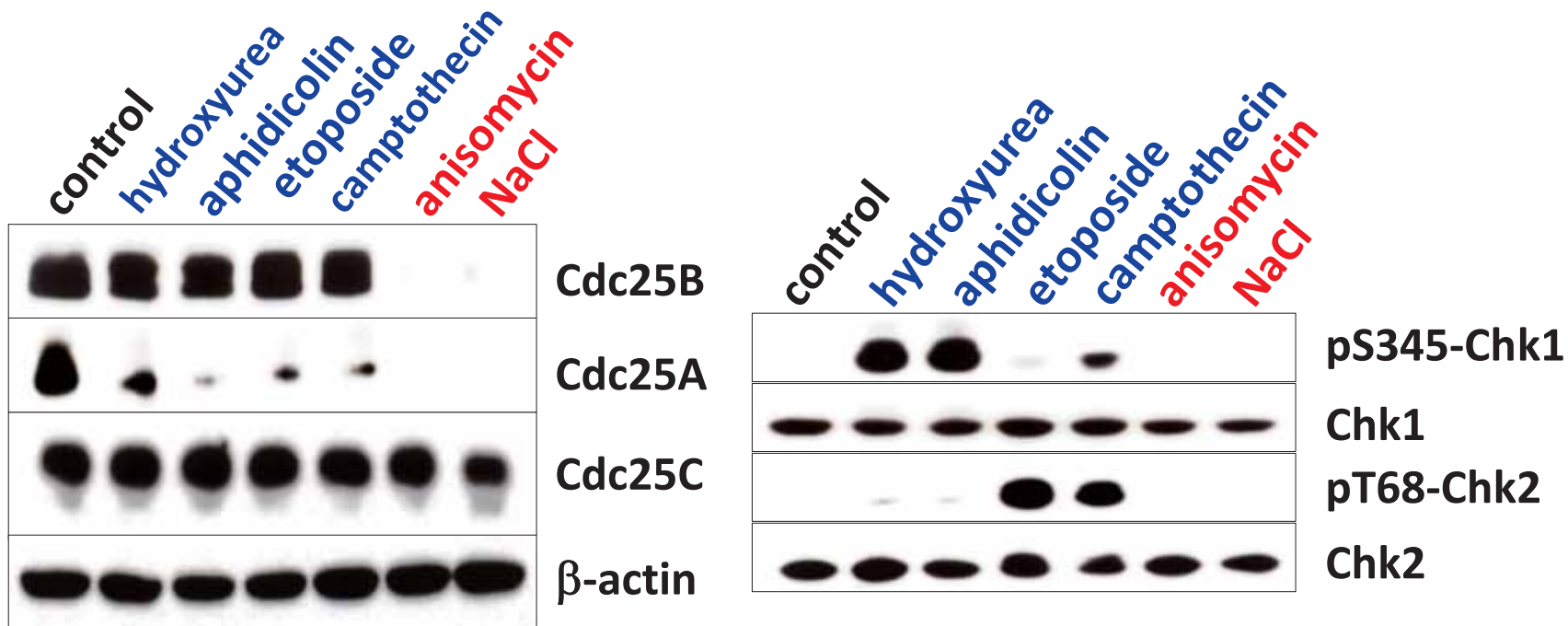
Cdc25AはDNA損傷応答の第一標的

DNA損傷によるリン酸化→SCF^{βTrCP1}/Fbxw1によるユビキチン化→分解

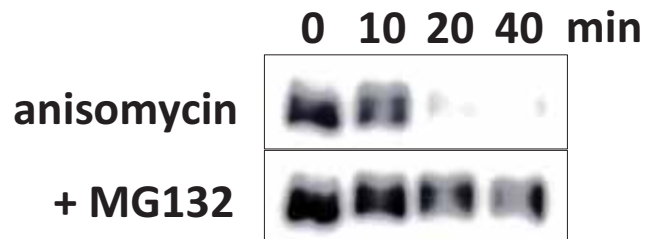
Cdc25B/Cdc25C欠損細胞→DNA損傷応答欠損はない

細胞がん化におけるCdc25Bの役割は?

非遺伝毒性ストレス依存的なCdc25Bの分解

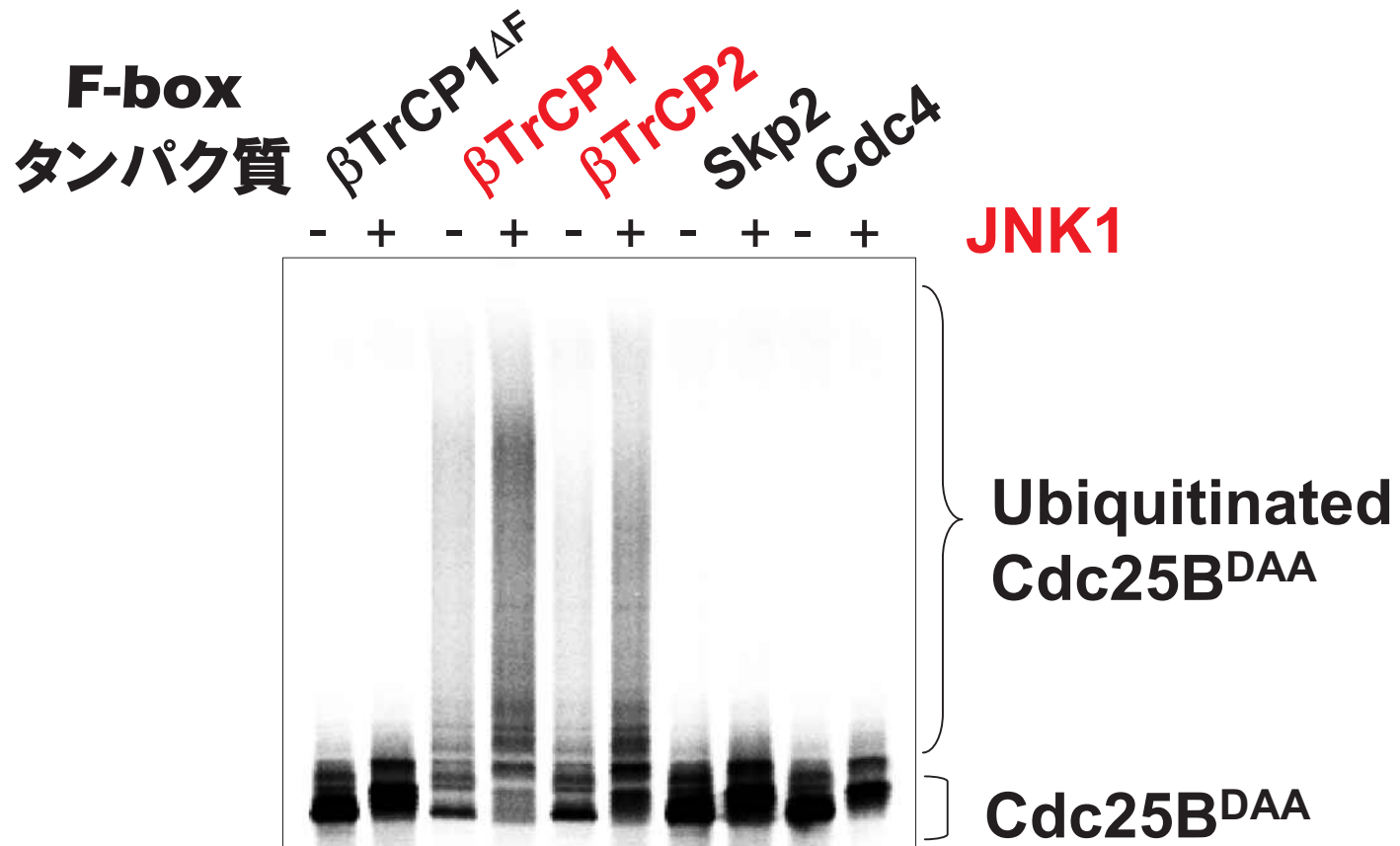


Cdc25Bはプロテアソームで分解される

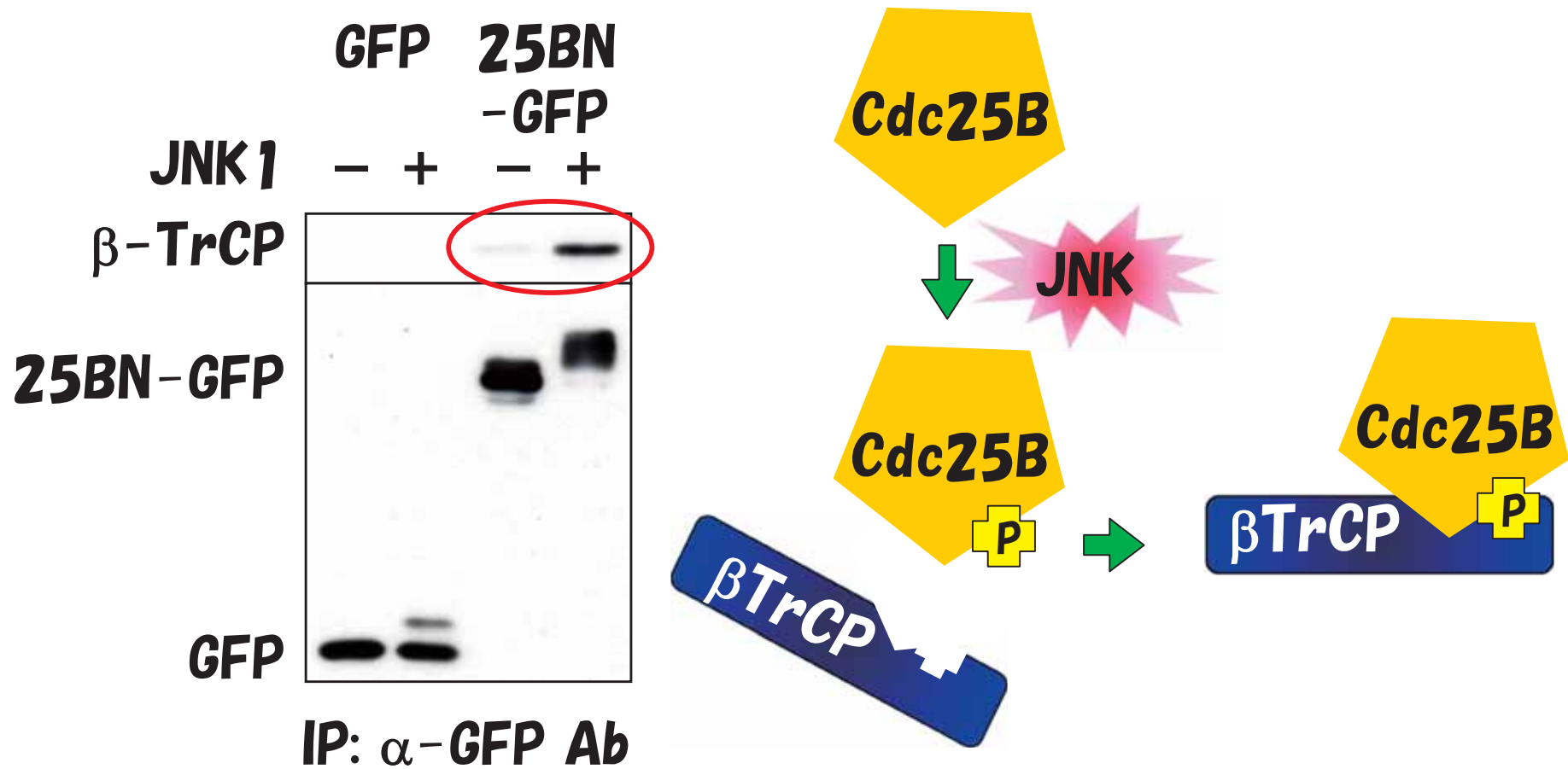


JNK依存的に

Cdc25BはSCF^{βTrCP}によりユビキチン化される

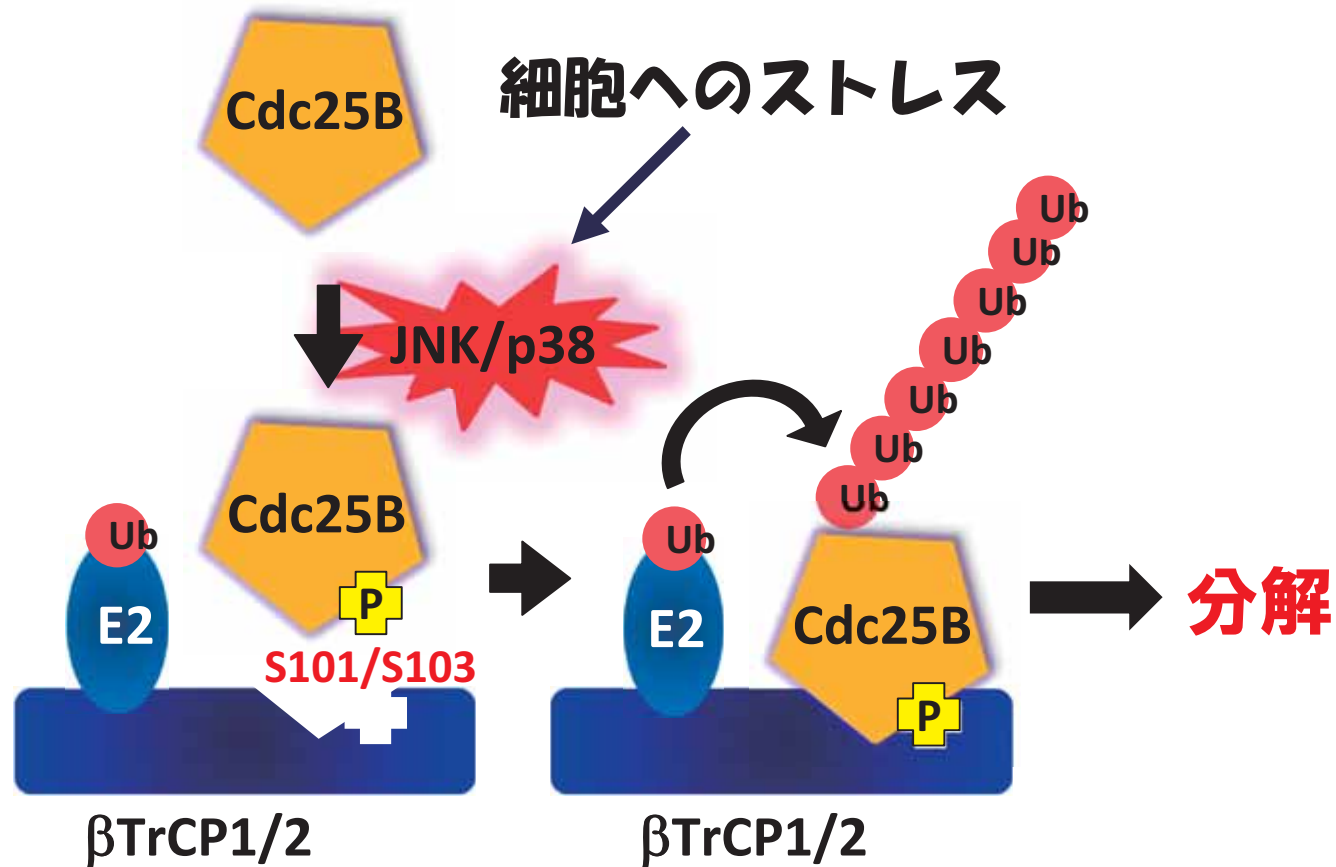


Cdc25BのN-末断片のJNKに依存した F-boxタンパク質 β TrCPとの結合



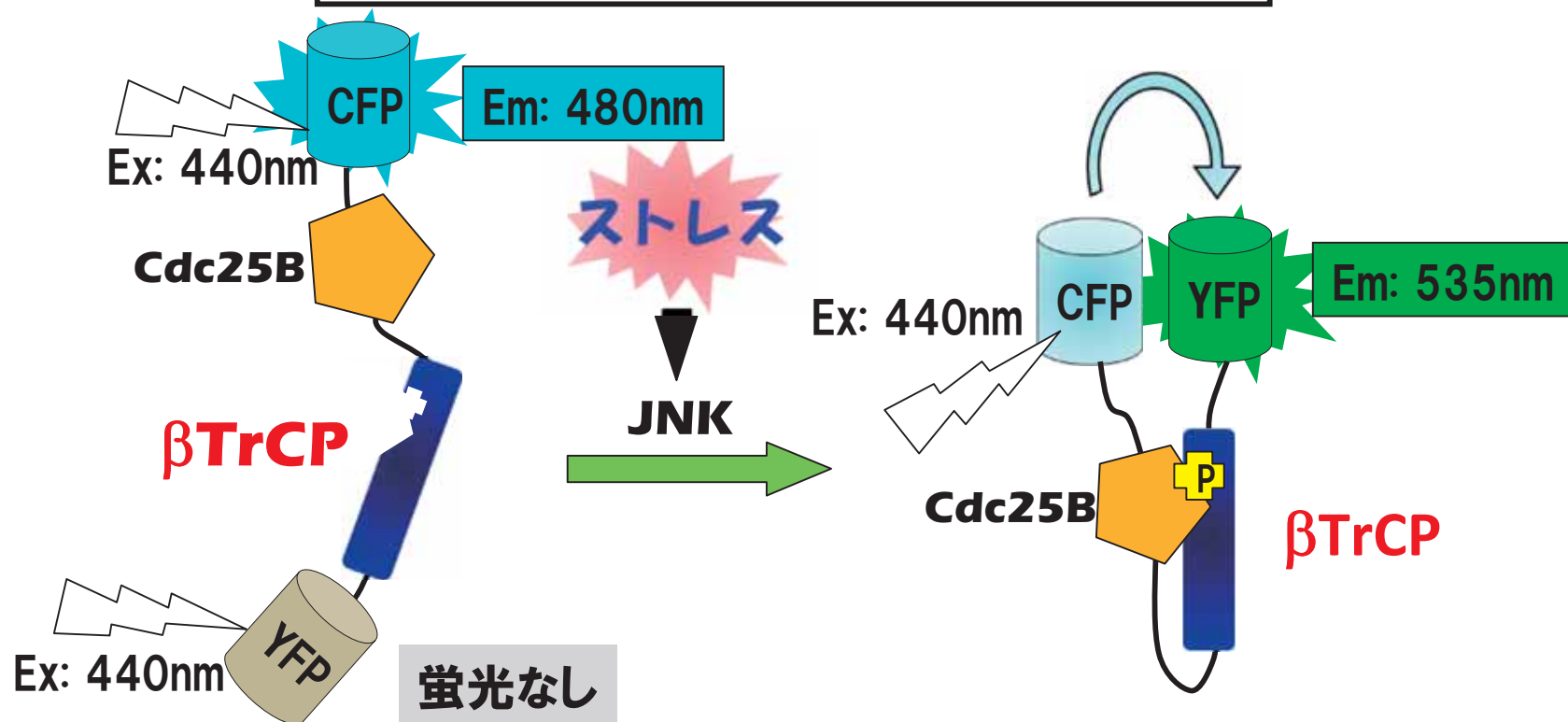
Cdc25B-Nと β TrCPの相互作用はストレス (JNK活性) 依存的に起こる

ストレスに応答した β TrCP依存的な Cdc25Bユビキチン化

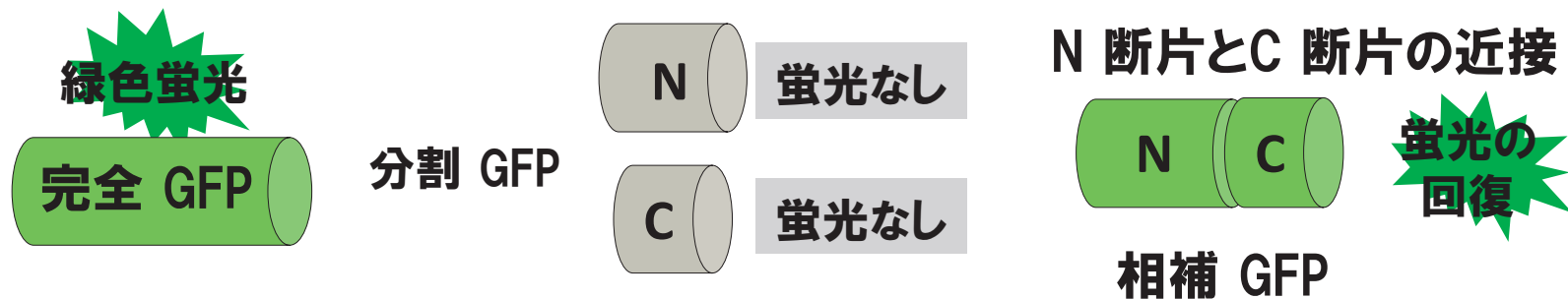


Cdc25B: β TrCP相互作用は細胞へのストレスの指標!

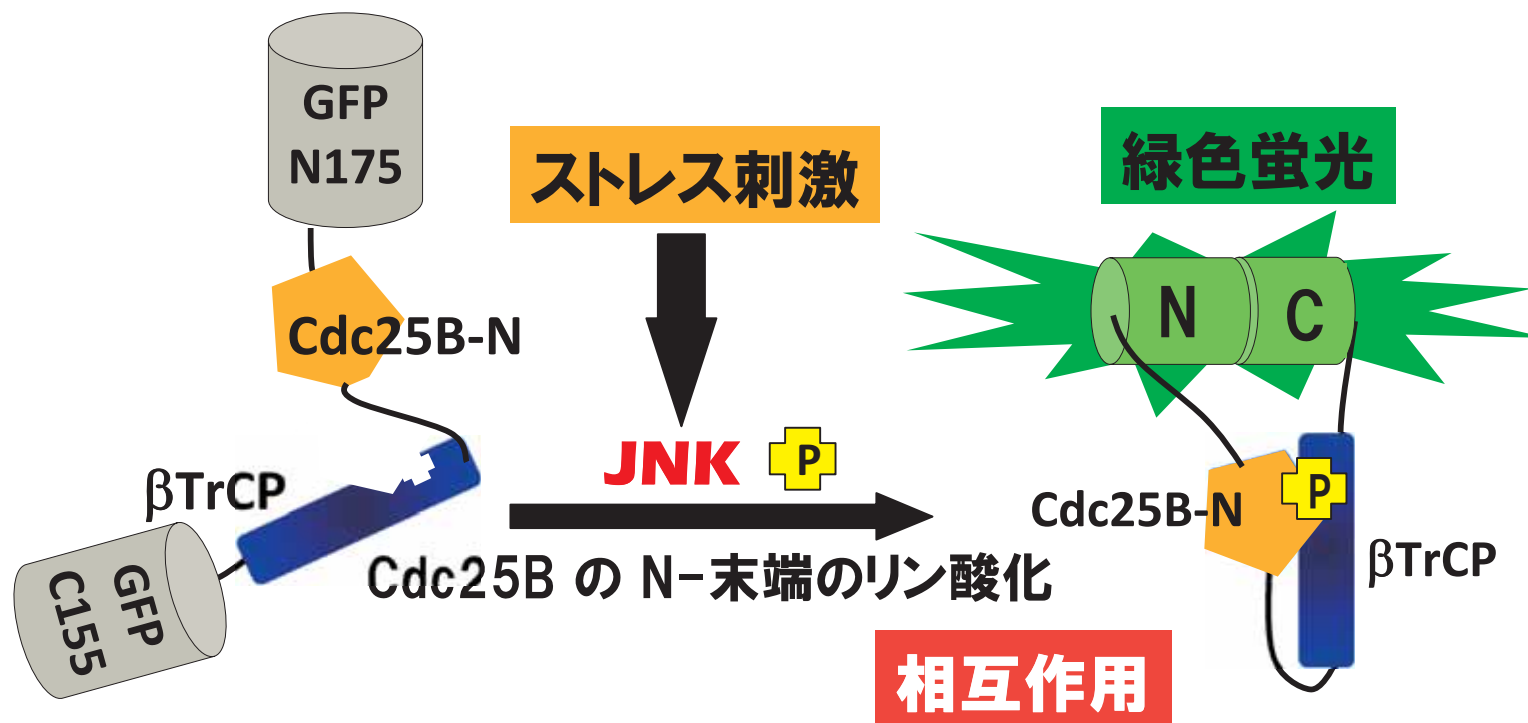
FRET (蛍光共鳴エネルギー移動)



BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)

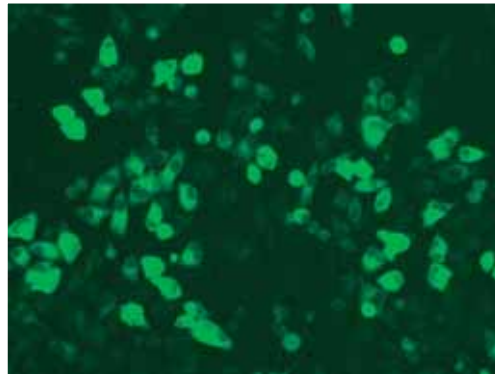


Cdc25B:βTrCPを用いたBiFC法

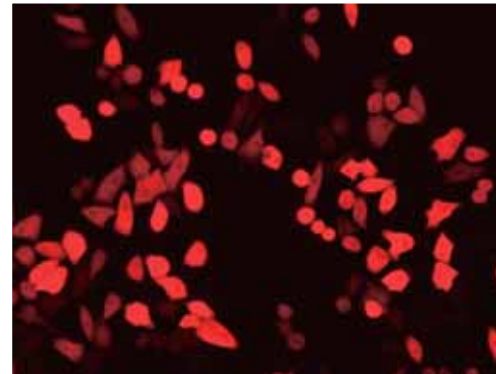


JNK1の発現によるCdc25B: β TrCPのBiFC

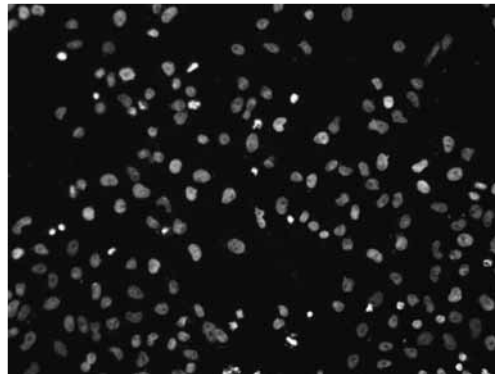
GFP
(BiFC)



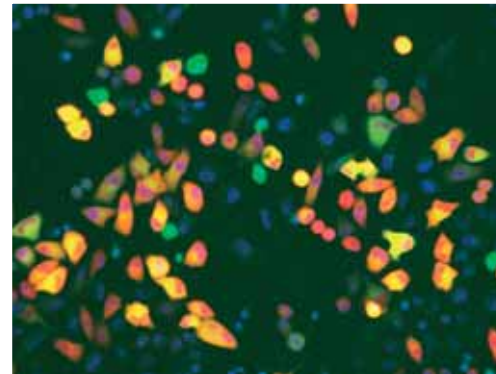
JNK1
(発現)



DAPI
(核)

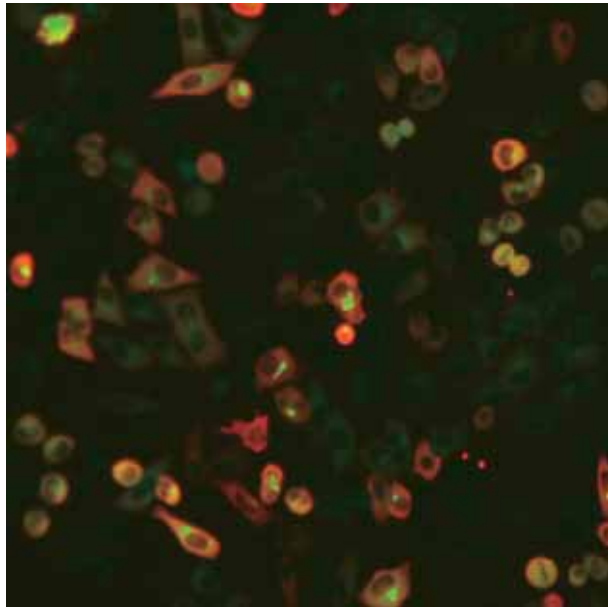


Merge

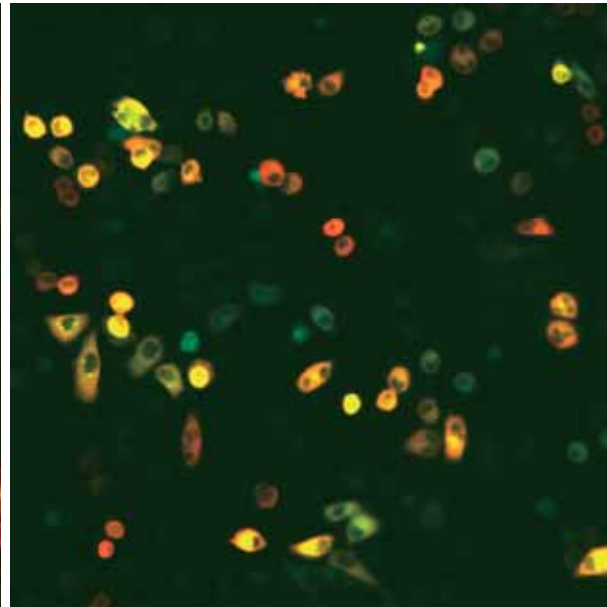


アニソマイシンまたは食塩処理による Cdc25B: β TrCPのBiFC

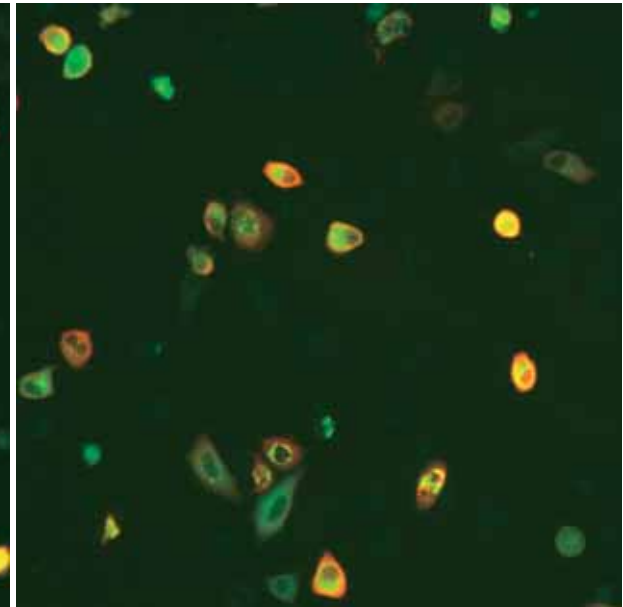
Control



Anisomycin (50ng/mL)



NaCl (250mM)



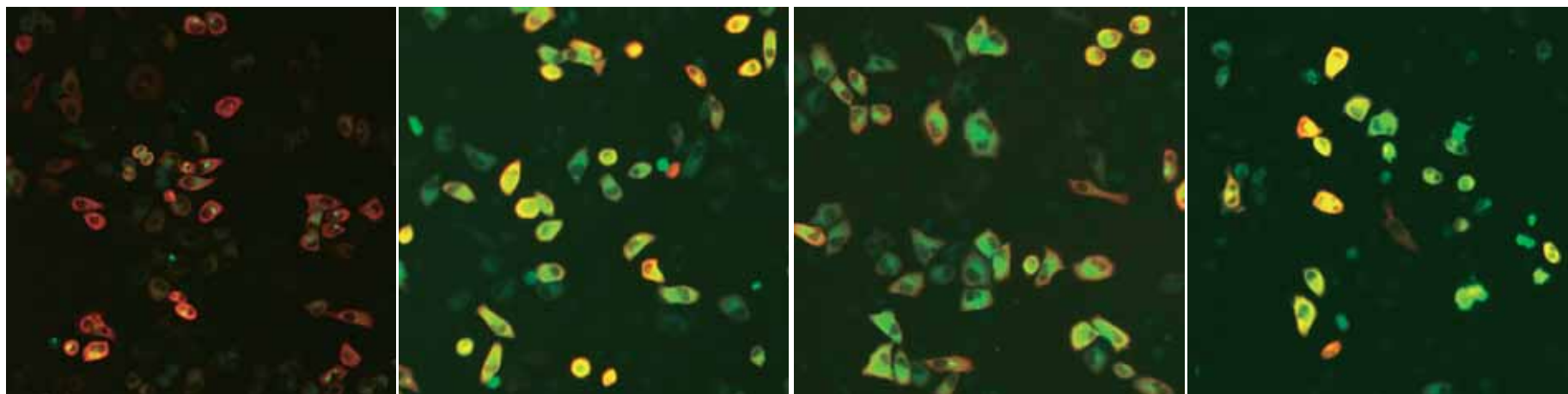
遺伝毒性ストレスによるCdc25B: β -TrCPのBiFC

control

hydroxyurea

aphidicolin

etoposide



Green: BiFC/RED: インディケーター

Cdc25Bは遺伝毒性ストレスでも分解される
(長時間または高濃度処理)

問題点と考えられる対策

- 全ての化学物質をカバーできるわけではない
 - **別のペアを探す**
- 現状では、アッセイのたびにDNAをtransfectionする必要がある
 - **インディケーター発現細胞**
- 定量性
 - **FACS解析**

本方法により、原理的には短時間(最短で24時間)で発がん性予測が可能

想定される用途

一次スクリーニング系としての有用性

- (1) 発がん性予測試験
- (2) 細胞へのストレス性試験
- (3) 抗がん性物質探索
- (4) ストレス抑制物質の探索

本システムはプロトタイプ
新しいペアで新しい用途

新しいペアで新規な機能物質の探索が可能

想定される業界

- ・製品に含まれる成分の発がん性の一次試験

食品・医薬品・化粧品・・・

- ・医薬品や補助栄養食品、化粧品等のシーズ開発・探索
- ・水質汚染等の環境化学物質の検査

製薬企業・食品会社等の安全性研究所

安全性試験の受託会社

- ・新機能性化学物質の探索：医薬品や化粧品のシーズ

企業への期待

— 実用化へ向けた共同開発 —

- ・システムのチューンアップ: SN比を上げる
- ・インディケーター遺伝子安定発現細胞のパネル化
- ・インディケーター発現動物の開発

ケミカルライブラリーや天然抽出物ライブラリーからの化学物質のスクリーニング

- ・医薬品のシーズ
- ・新規機能性化学物質（新規皮膚保護作用物質等）

本技術に関する知的財産権

Cdc25Bと β -TrCPとの特異的結合を利用した検出系

出願番号： 特願2008-306804

出願人：国立大学法人 金沢大学

発明者：山下克美、内田早苗

お問い合わせ先

(有)金沢大学ティ・エル・オー

ライセンシング・アソシエイト

坂口 菜朋子

TEL 076-264-6090

FAX 076-234-4018

E-mail sakaguchi@kutlo.incu.kanazawa-u.ac.jp