

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570161

研究課題名（和文）両親媒性化合物による環境ストレス応答機構の研究

研究課題名（英文）Study of environmental stress responses using amphiphiles

研究代表者

上園 幸史 (UESONO YUKIFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30251408

研究成果の概要(和文):局所麻酔剤や抗精神病薬は高浸透圧やグルコース飢餓ストレスと同様、出芽酵母でアクチン極性化と翻訳開始の急速な遮断を引き起こす。種々の両親媒性化合物で遮断と構造の関係を調べた所、遮断の様式には親水部構造、その強度には疎水部の長さ、また安全性には親水部と疎水部の構造が共に関与する事を明らかにした。さらに臨床薬剤と類似した遮断作用を持つが、より安全性の高いTMA化合物も同定した。従って酵母システムは遮断薬剤の評価と設計に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文): Local anesthetics and antipsychotic phenothiazines cause rapid shutdowns of both actin polarization and translation initiation in yeast. Here we investigated the structure-activity relationship using a variety of amphiphiles. Structure of hydrophilic region, length of hydrophobic region, and structures of both regions were responsible for the shutdown pattern, potency, and safety, respectively. These results indicate that the yeast system can easily evaluate the clinical drugs, and provide structural basis for designing shutdown compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,090,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：高浸透圧、グルコース飢餓、アクチン、蛋白質合成、局所麻酔剤、抗精神病薬、両親媒性、酵母

1. 研究開始当初の背景
高浸透圧やグルコース飢餓などの環境スト

レスが、出芽酵母で翻訳開始やアクチン極性化を一過的に阻害する現象を見だし、この

一過的阻害は迅速な遮断と緩慢な再活性化の二つの反応から構成される事実を明らかにした。その後の解析で再活性化反応には既存の情報伝達系が関与する事を突き止めた。一方、遮断反応の実態は不明であったが、局所麻酔剤や抗精神病薬でも同様の遮断反応が引き起こされる事実を見だし、これらの臨床薬剤は全て一分子中に親水部と疎水部を持つ両親媒性構造であり、界面活性作用や細胞膜溶解能を有する事も示した。そこで両親媒性構造であるが臨床作用は知られていない種々の界面活性剤でも調べたところ、陽イオン性界面活性剤が上記臨床薬剤群よりも強力な遮断活性を示すことがわかった。そこで両親媒性化合物を用いて遮断反応を解明する事は、ストレス応答だけでなく麻酔や精神安定という高次生命現象の解明にもつながると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

出芽酵母を用いて環境ストレスや薬剤による翻訳開始やアクチン骨格を統括的に制御するシステム原理を解明する事が主目的である。出芽酵母を用いた遮断反応の定量的な評価法を開発し、遮断薬剤の詳細な構造を明らかにするとともに、その設計基盤を構築する。また臨床薬剤や環境ストレスに共通する遮断機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 薬剤による遮断反応の指標として出芽酵母のアクチンの脱極性化度を顕微鏡観察下で観察し、濃度依存的な反応曲線を作成する事で遮断効果を定量化した。

(2) また薬剤が細胞溶解を引き起こす活性を毒性の指標として濃度-反応曲線を作成し、毒性効果として定量化した。

(3) さらにこれらの遮断と毒性に必要な薬剤濃度の比を安全性(治療係数)の指標とする事で薬剤固有の安全域を定量的に評価した。

(4) これらの方法により種々の局所麻酔剤やフェノチアジン系抗精神病薬を評価し、臨床での評価結果と比較する事で酵母の評価系の妥当性を検討した。

(5) 臨床作用が知られていない種々の両親媒性化合物の親水部や疎水部の構造を上記の項目で評価することにより、遮断強度や安全性に関わる詳細な薬剤構造を明らかにした。

(5) 細胞内カルシウム濃度の変化はエクオ

リンを発現した酵母を用いてルミノメーターで測定した。

4. 研究成果

(研究の主な成果)

酵母での局所麻酔剤の作用強度や安全性の評価が臨床での評価と相対的に一致する事から、臨床薬剤の作用機構は酵母とヒトで保存されており、酵母の系が薬剤評価に有効であると考えられる。細胞内反応を遮断する薬剤の構造的特徴とその他の作用は以下の通りである。

(1) 翻訳開始とアクチン極性化を遮断する薬剤は臨床薬剤のように複雑な構造を持つ必要はなく、疎水部が単純な直鎖アルキルでもよい。

(2) 疎水部に直鎖アルキルを持つ化合物の場合、親水部が陽イオン性の第三級アミン、第四級アンモニウム構造、また非イオン性の水酸基の場合は翻訳開始を遮断するが、陰イオン性の硫酸基の場合は、翻訳開始を阻害する事なくアクチン極性を阻害する。従って翻訳開始の遮断は親水部の構造に依存する。

(3) 局所麻酔剤や抗精神病薬と同様にアクチンの脱極性化と翻訳開始の阻害を共に引き起こすが、より薬剤安全域の広いTMA化合物を発見した。

(4) TMA化合物の遮断強度は疎水部の長さに指数比例するが、膜リン脂質疎水部の平均長で限界となることから、脂質二重層の片側に配向に沿って挿入されると考えられる。

(5) 安全性は主に親水部の構造に依存する。しかし、TMA化合物と麻酔剤や抗精神病薬を比較した結果、細胞膜リン脂質の配向を壊さない疎水部構造も安全性に重要であると考えられる。

(6) 本研究により調べた遮断を引き起こす薬剤は全て細胞内Caの上昇を引き起こすが、既存のCa取り込み経路は関与していない。

(国内外における位置づけ、インパクトと今後の展望)

(1) これまで局所麻酔剤や抗精神病薬等の臨床薬剤の細胞レベルでの作用機構はモデル膜や赤血球を用いた膜の構造の変化の研究が主で、どのような細胞内反応を引き起こすのか、その詳細は不明であった。本研究により環境ストレスと上記の臨床薬剤が、酵母細胞内で翻訳開始の阻害、アクチンの脱極性化や転写因子の核移行など類似した遮断反

応を引き起こす事が初めて明らかになったことで、ストレスと麻痺の関連性や、それらの共通する細胞内遮断反応の重要性が認識されると考えられる。

(2) 上記臨床薬剤の遮断強度や安全性の酵母での定量的評価系を構築し、遮断薬剤の設計を行った研究も前例がない。本研究で見いだされた TMA 化合物は既存の臨床薬剤よりも安全性が高く、その遮断強度も制御できる。実際に動物で麻酔能を持つ事も知られているため、微生物を用いた臨床薬剤設計の可能性も本研究で初めて示された。

(3) 現在、上記臨床薬剤の作用機構には膜作用説と特異的受容体説が提唱されているが、動物類似の特異的受容体を有していない酵母の結果から、膜を標的とした作動原理が重視されると考えられる。

(4) 細胞内反応を遮断する薬剤は全て両親媒性構造を持ち、それによる細胞膜の破壊は麻痺薬剤の毒性の原因になっていると考えられる。本研究により明らかになった毒性に関わる薬剤構造は安全性の高い薬剤の設計を行う上で有益な情報を提供するだろう。

(5) TEA 化合物やそれに類似する TMA 化合物は強い麻酔能を持つ事が確認されているが、現在臨床では使用されていない。これは過去に行われた動物実験では麻酔作用や毒性の正確な発現濃度の決定が困難であり、その結果、観察された作用の誤解釈に起因すると考えられる。本研究により明らかにされた酵母での正確な作用と毒性の発現濃度を動物実験に相対的に適用すれば、TEA/TMA 化合物の正確な能力が把握できるため、これらの麻酔剤としての重要性が再認識されると予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Uesono, Y. (2009) Environmental stresses and clinical drugs paralyze a cell. *Communicative & Integrative Biology*. 2, 275-278.

(2) Uesono Y, Araki T, and Toh-e. (2008) Local anesthetics, antipsychotic phenothiazines, and cationic surfactants shut down intracellular reactions through membrane perturbation in yeast. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem. 72, 2884-2894.

(3) Takahashi, Y., Iwase, M., Strunnikov, A. V., and Kikuchi, Y. (2008). Cytoplasmic sumoylation by PIAS-type Siz1-SUMO ligase. *Cell Cycle*. 7, 1738-1744.

(4) Shinoda J, Kikuchi Y. (2007) Rod1, an arrestin-related protein, is phosphorylated by Snf1-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 364, 258-263

[学会発表] (計 8 件)

(1) 岩瀬政之、寺島一郎、上園幸史 “局所麻酔剤、抗精神病薬や界面活性剤による出芽酵母の細胞内カルシウムの動態” 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009, 12 月 12 日)

(2) 矢野興一朗、菊池淑子 “出芽酵母 Mih1 フォスファターゼの制御” 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 (2009, 12 月 11 日)

(3) 上園幸史、東江昭夫、寺島一郎 “出芽酵母のアクチン極性化と翻訳開始を阻害する薬剤の構造解析と分子デザイン” 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (2008, 12 月 11 日)

(4) 上園幸史、東江昭夫、寺島一郎 “アクチン極性と翻訳開始を阻害する薬剤の構造解析と分子デザイン” 第 41 回酵母遺伝学フォーラム、札幌 (2008, 9 月 10 日)

(5) 矢野 興一朗、菊池 淑子 “Mih1 フォスファターゼの制御と機能について” 第 41 回酵母遺伝学フォーラム、札幌 (2008, 9 月 11 日)

(6) 上園 幸史、荒木 智之、東江 昭夫 “界面活性剤による翻訳開始とアクチン骨格の制御機構” 日本農芸化学会 2008 年度大会、名古屋 (2008 年 3 月 28 日)

(7) 横田准、岩瀬政行、高橋芳充、菊池淑子 “出芽酵母セプチンのユビキチン化と SUMO 化” 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会 合同大会、横浜 (2007 年 12 月 14 日)

(8) 矢野興一朗、菊池淑子 “出芽酵母 Mih1 フォスファターゼの解析” 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会 合同大会、横浜 (2007 年 12 月 14 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上園 幸史 (UESONO YUKIFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：30251408

(2) 研究分担者

菊池 淑子 (KIKUCHI YOSHIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：00138124

(3) 連携研究者

()

研究者番号：