

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07145

研究課題名(和文) 出芽酵母ケミカルジェネティクスを用いた生薬エキス成分の真の作用機序と標的分子解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of action and the target molecules of ingredients in crude extracts by chemical genetics approach using yeast knock-out strain collection

研究代表者

宇都 拓洋 (UTO, Takuhiro)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90469396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、約4000株の遺伝子破壊出芽酵母株を用いたケミカルジェネティクスのアプローチにより、カンゾウ、オウレン、オウゴンエキス感受性株を選抜し、その変動パターンを解析した。その結果、これらの生薬エキスは代表的な薬剤とは異なる経路に作用しており、各生薬エキスの高感受性株の遺伝子の機能や細胞内局在は多岐にわたり、また生薬エキスにより特徴的であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ケミカルジェネティクスの手法を用いて生薬エキスが約4000の遺伝子群に与える影響を網羅的に解析する初の試みである。本研究により、生薬エキスにより与える遺伝子群は複雑かつ多岐にわたるとともに、一部では共通する部分も見られた。今後、より詳細な検討を要するが、本研究が、生薬・漢方エキスなどの多成分系薬物の作用機序解明の一助になり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the chemical genetics approach using approximately 4000 yeast knock-out strain collection to identify the mechanism of action and the target molecules of ingredients in crude extracts, including Glycyrrhiza (Licorice), Coptis rhizome, Scutellaria root. Analyses of their variation patterns demonstrated that these crude drug extracts acted on genes and pathways different from those of representative drugs and chemicals. Furthermore, the functions and subcellular localization of the genes of the sensitive strains were diverse and specific, depending on each crude drug extract.

研究分野：生薬学

キーワード：ケミカルジェネティクス 出芽酵母 生薬エキス カンゾウ オウレン オウゴン 相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

各種疾患モデル動物などの利用により、生薬エキスの薬理作用の科学的エビデンスが得られるとともに、分子生物学的手法の発達やケミカルバイオロジーの導入によって、生薬エキスに含まれている個々の成分の作用機構解明は著しく進んでいる。しかしながら、生薬エキスは多種多様な成分からなる多成分系薬物であり、生薬エキスとしての薬理作用と、個々の含有成分の作用機序や成分間の相乗効果との因果関係は解明されていない部分が多い。

我々は、これまで天然化合物の作用機序解明や生薬エキス成分間の相乗作用の解明を行ってきた。しかしながら、我々を含めた国内外のこれまでの研究は、エキスまたはその精製成分を用いて活性を絞って解析したものが主であり、エキス中に混合物として存在する個々の成分を網羅的に活性評価したものではない。そこで我々は、まず初めにパイロット研究として、ケミカルジェネティクス的手法による約 4000 株の遺伝子破壊出芽酵母株を用いて生薬エキスの感受性株の網羅的解析を実施した。本パイロット研究では、甘草(カンゾウ)エキスにより増殖が著しく制御される高感受性株を選抜した。得られたカンゾウエキス高感受性株の遺伝子の機能とタンパクの細胞内局在を解析した結果、カンゾウエキスは代表的な既知の薬剤とは違う経路を標的と作用しており、遺伝子の機能は多岐にわたることが明らかとなった。しかしながら、このパイロット研究は、カンゾウエキスのみを用いた研究であり、他の生薬エキスでも同様な解析が可能であるのかは不明であること、さらにエキス高感受性株の詳細な解析までは実施していなかったため、本研究課題の申請に至った。

2. 研究の目的

生薬エキスは多種多様な成分からなる多成分系薬物であり、エキス全体としての薬理作用と、個々の含有成分の作用機序や成分間の相乗効果との因果関係は解明されていない部分が多い。本研究では、ケミカルジェネティクス的手法により約 4000 株の遺伝子破壊出芽酵母株を用いることで、数種の代表的な生薬エキスに対する感受性株を見つけ、その変動パターンを解析し比較する。それによりエキス中に存在する個々の成分が、標的分子群にどのように作用するのかを明確にすることを目的とする。本研究が、エキス中における生薬成分の真の標的分子および成分間の相乗効果の解明に結び付き、生薬・漢方製剤の新たな科学的エビデンス提供に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

3.1. 生薬エキスによる出芽酵母のサブリーサル濃度の確認

生薬粉末 1 g にメタノール 10 mL を加え、低温室で抽出し上清を回収した後、窒素ガスを吹付けて濃縮した。凍結乾燥後、100 mg/mL になるように DMSO に溶解した。出芽酵母野生型株 BY4741 を各エキスにて処理し、30 で振とう培養しながら経時的に濁度の測定を行い、培養時間あたりの菌体濃度における近似曲線を作成した。さらに、コントロールの近似曲線の傾きを 100%とした時の各濃度の傾きの割合をプロットし、各生薬エキス添加時の増殖速度が 70%となる濃度(サブリーサル濃度)を決定した。

3.2. 生薬エキスによる出芽酵母破壊株の変動解析

出芽酵母破壊株プール(Yeast Knockout Collection Haploid MAT-a pool)を各生薬エキスのサブリーサル濃度とそれより低い濃度の最低 2 点で処理し、30 で振とう培養しながら経時的に濁度の測定を行った。10~12 時間後にサンプルを回収し、ゲノム抽出し PCR にてバーコードタグを増幅させた。その後、次世代シーケンサーにより野生株と各生薬エキス処理破壊株のバーコードタグの定量結果を比較(タグカウント)し、感受性株を同定した。

4. 研究成果

4.1. 野生型株 BY4741 における生薬エキスのサブリーサル濃度の決定

代表的な生薬の中から、候補となる生薬としてカンゾウ、黄連(オウレン)、黄芩(オウゴン)、人參(ニンジン)、麻黄(マオウ)を選び、エキス作製後、野生型株 BY4741 を用いてサブリーサル濃度の決定を試みた。その結果、カンゾウ、オウレン、オウゴンエキスのサブリーサル濃度を、45.0 $\mu\text{g/mL}$ 、8.63 $\mu\text{g/mL}$ 、250.2 $\mu\text{g/mL}$ と決定した。一方、ニンジンおよびマオウエキスは、最終濃度 125~500 $\mu\text{g/mL}$ で検討したが、ニンジンエキス処理において菌体濃度は増加し、マオウエキスにおいては変化しなかった。この結果から、サブリーサル濃度を決定できたカンゾウ、オウレン、オウゴンエキスに焦点を当て、遺伝子破壊出芽酵母株を処理し、次世代シーケンサーによるエキス耐性株の選抜を行うこととした。

4.2. カンゾウ、オウレン、オウゴンエキス感受性株の選抜

バーコードシーケンシング法により、約 4000 株の遺伝子破壊出芽酵母株からカンゾウ、オウレン、オウゴンエキスに高感受性を示す破壊株を選抜した。ノックアウト酵母クローンコレクションを、サブリーサル濃度とそれより低い濃度の最低 2 点で処理し、サブリーサル濃度における

z-score が -2 以下に変動しているものを抽出した。その結果、カンゾウ、オウレン、オウゴンエキスで、それぞれ 55 株、22 株、52 株が有意に抑制され、そのうち既知の代表的な化合物や薬剤に対する 65 の薬剤耐性関連遺伝子株は、それぞれ 0 株、1 株 (SAC6)、1 株 (VMA8) であった。このことから、これらの生薬エキスは、代表的な薬剤とは異なる経路に作用していることが示唆された。

4.3. カンゾウ、オウレン、オウゴンエキス感受性株の遺伝子オントロジー (GO) のカテゴリー

Gene Ontology Slim Term (GO slim) を使って、解析によって抽出された高感受性株において破壊されている遺伝子を Biological Process (BP)、Cellular Component (CC)、Molecular Function (MF) の 3 つのカテゴリーについて評価した。

カンゾウエキス高感受性株の 55 遺伝子は、BP 60 項目、CC 14 項目、MF 22 項目に分類された (Fig. 1)。カンゾウエキス高感受性株の 55 遺伝子について偏りがあるかどうかを調べるために全出芽酵母遺伝子約 6000 遺伝子の比率と比較した。その結果、カンゾウエキス高感受性株の遺伝子において、BP では response to chemical、lipid metabolic process、cytoskeleton organization、mitotic cell cycle、meiotic cell cycle、endocytosis、carbohydrate metabolic process、cytokinesis、regulation of cell cycle、cell wall organization or biogenesis、transcription by RNA polymerase II、vesicle organization、protein lipidation、pseudohyphal growth、response to starvation、chromatin organization、DNA repair、ion transport、sporulation、proteolysis involved in protein catabolic process、response to osmotic stress、generation of precursor metabolites and energy、protein targeting、regulation of transport、monocarboxylic acid metabolic process、transmembrane transport、nucleobase-containing small molecule metabolic process、vacuole organization、cytoplasmic translation、Golgi vesicle transport、response to oxidative stress、regulation of organelle organization、regulation of protein modification process、protein acylation、nucleobase-containing compound transport、protein modification by small protein conjugation or removal、oligosaccharide metabolic process、organelle fusion、nucleus organization、amino acid transport、mRNA processing、protein phosphorylation、endosomal transport、regulation of translation、peptidyl-amino acid modification、organelle fission、lipid transport、protein maturation、RNA splicing、invasive growth in response to glucose limitation、cellular ion homeostasis、organelle assembly、cellular response to DNA damage stimulus、DNA replication、RNA modification、vitamin metabolic process、cell budding、histone modification、DNA recombination、organelle inheritance

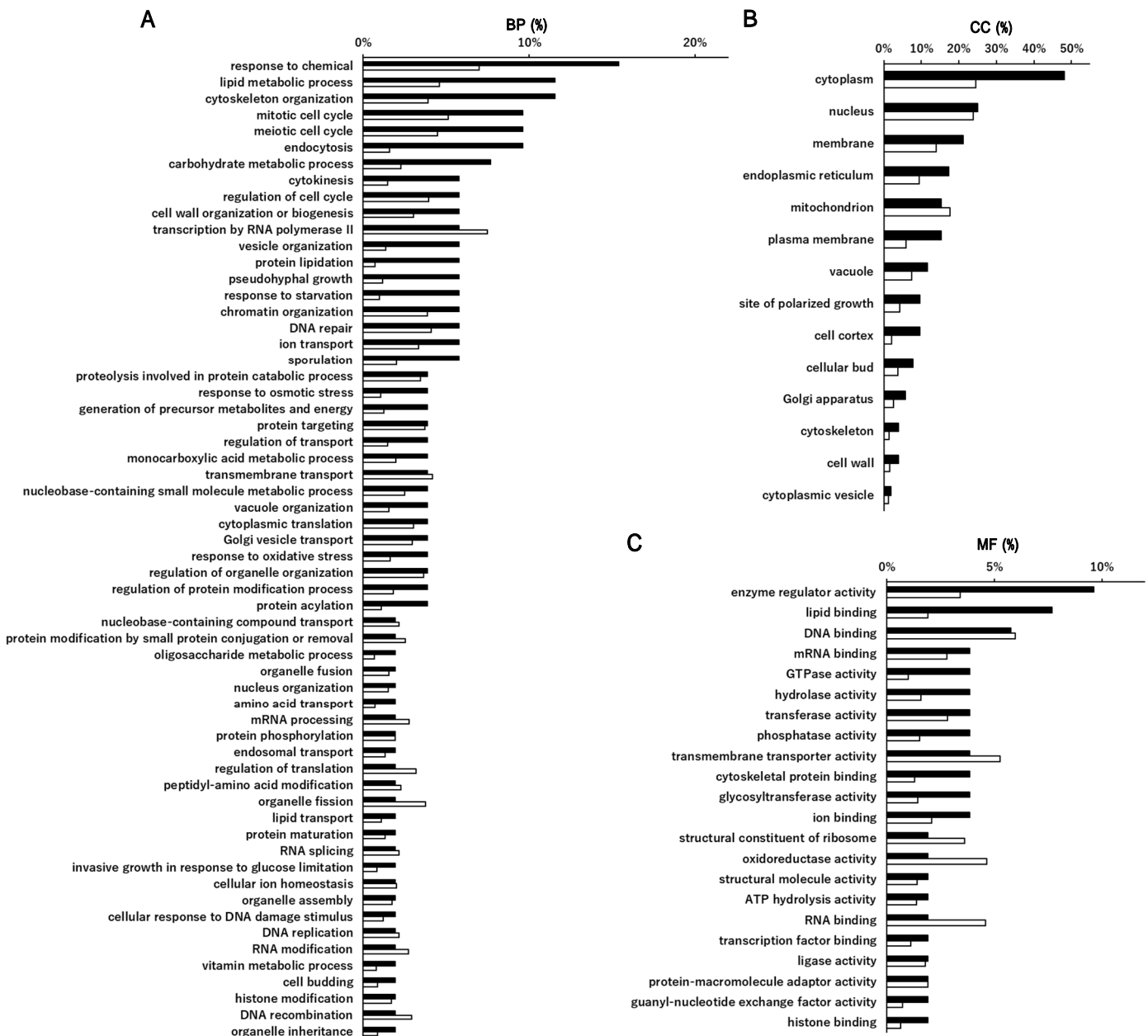


Fig. 1. カンゾウエキス高感受性株の 55 遺伝子と全 6000 遺伝子と BP (A)、CC (B)、MF (C) の分類 (カンゾウエキス、全 6000 遺伝子)

オウレンエキス高感受性株の 22 遺伝子は、BP 29 項目、CC 12 項目、MF 8 項目に分類された (Fig. 2)。オウレンエキス高感受性株の 22 遺伝子について偏りがあるかどうかを調べるために全欠損遺伝子約 6000 遺伝子の比率と比較した結果、BP では transcription by RNA polymerase II、cytoskeleton organization、chromatin organization、CC では plasma membrane、MF では transmembrane transporter activity、protein-macromolecule adaptor activity、DNA-binding transcription factor activity に偏りが見られた。

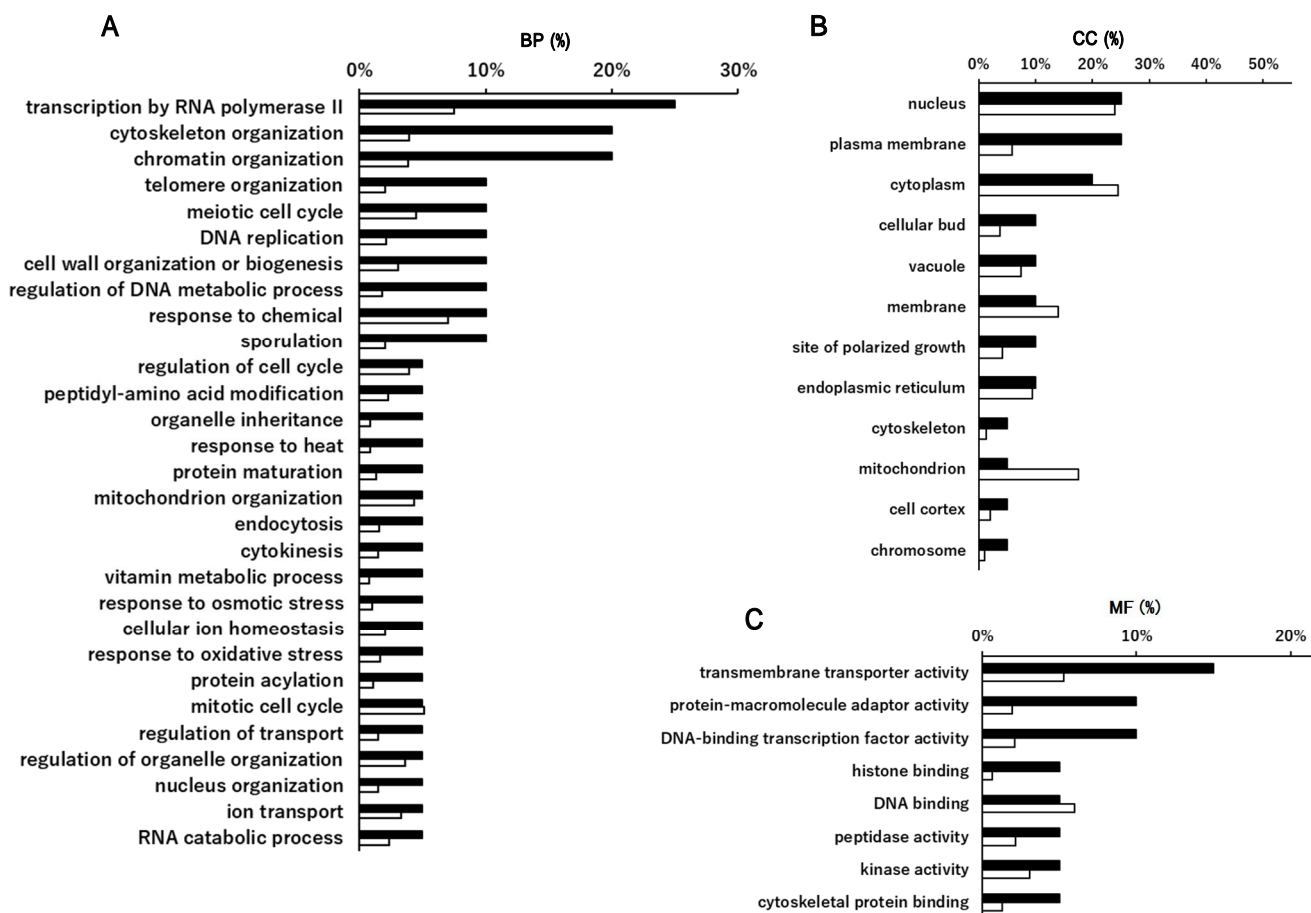


Fig. 2. オウレンエキス高感受性株の 22 遺伝子と全 6000 遺伝子と BP (A)、CC (B)、MF (C) の分類 (オウレンエキス、 全 6000 遺伝子)

オウゴンエキス高感受性株の 52 遺伝子は、BP 56 項目、CC 15 項目、MF 25 項目に分類された (Fig. 3)。オウゴンエキス高感受性株の 52 遺伝子について偏りがあるかどうかを調べるために全欠損遺伝子約 6000 遺伝子の比率と比較した結果、BP では cellular ion homeostasis、lipid metabolic process、cell wall organization or biogenesis、mitochondrion organization、cytoskeleton organization、Golgi vesicle transport、protein targeting、mitochondrial translation、CC では mitochondrion、membrane、endoplasmic reticulum、MF では transmembrane transporter activity、guanyl-nucleotide exchange factor activity に偏りが見られた。

これらの結果から、各生薬エキスの高感受性株の遺伝子の機能および細胞内局在は多岐にわたり、また生薬エキスにより特徴的であることが示された。

4.4. カンゾウ、オウレン、オウゴンエキスで共通の感受性株の抽出

カンゾウ、オウレン、オウゴンエキスの間で、共通の感受性株を抽出した (Fig. 4)。カンゾウ、オウレン、オウゴンの 3 エキス間、およびカンゾウ、オウレンの 2 エキス間で共通する感受性株はなかった。一方、カンゾウ、オウゴンの 2 エキス間では、13 の感受性株が共通していた。これらの遺伝子は、endoplasmic reticulum、membrane、cytoplasm へ多く局在しており、lipid metabolic process や response to chemical に関与するものが多かった。また、オウレン、オウゴンの 2 エキス間では、1 つの感受性株が共通していた。

本研究は、ケミカルジェネティクス的手法を用いて生薬エキスが約 4000 の遺伝子群に与える影響を網羅的に解析する初の試みであった。本研究により、生薬エキスにより与える遺伝子群は複雑かつ多岐にわたるとともに、一部では共通する部分も見られた。今後、より詳細な検討を要するが、本研究が、生薬・漢方エキスなどの多成分系薬物の作用機序解明の一助になり得ると考える。

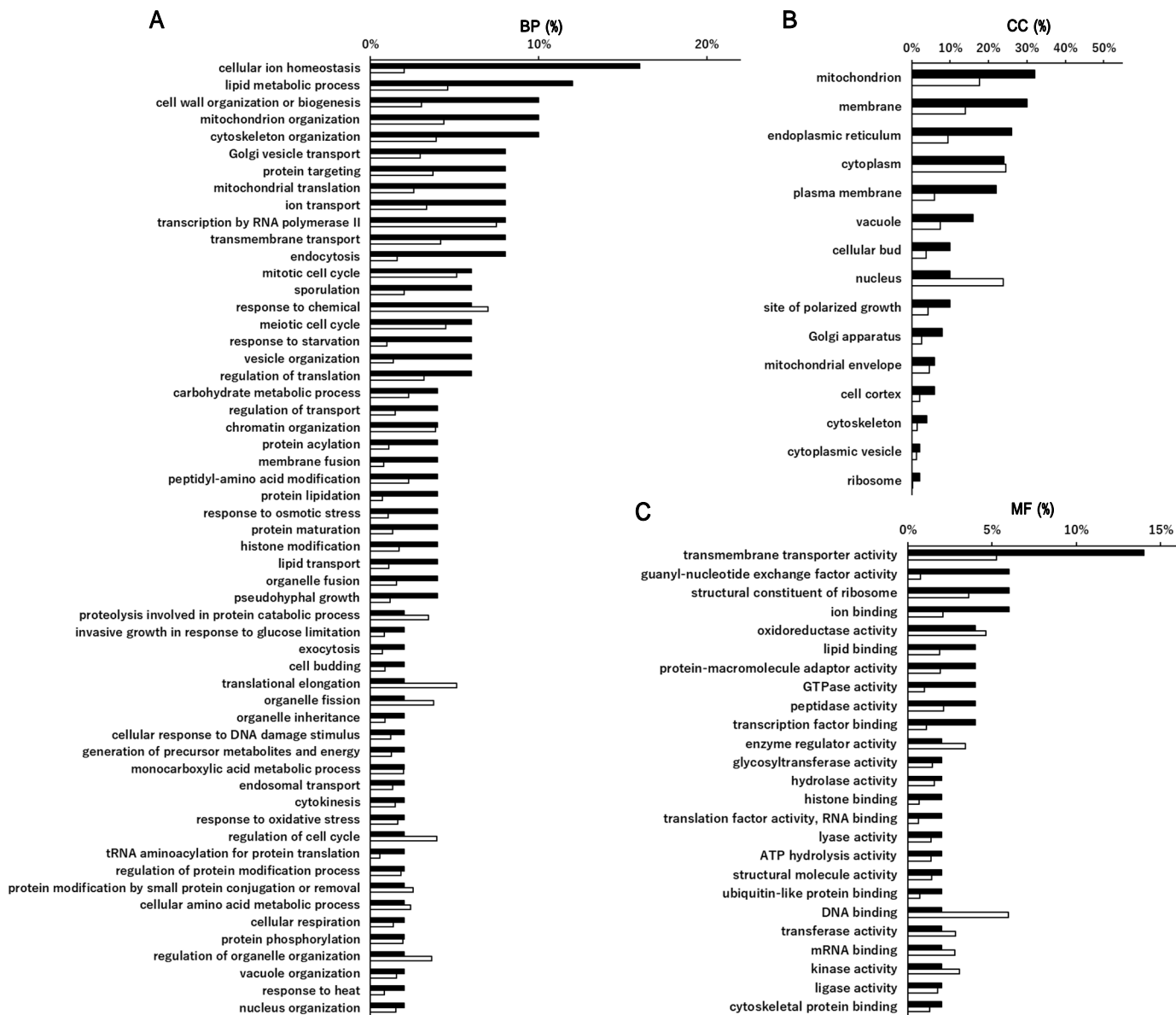


Fig. 3. オウゴンエキス高感受性株の 52 遺伝子と全 6000 遺伝子と BP (A)、CC (B)、MF (C) の分類 (オウゴンエキス、 全 6000 遺伝子)

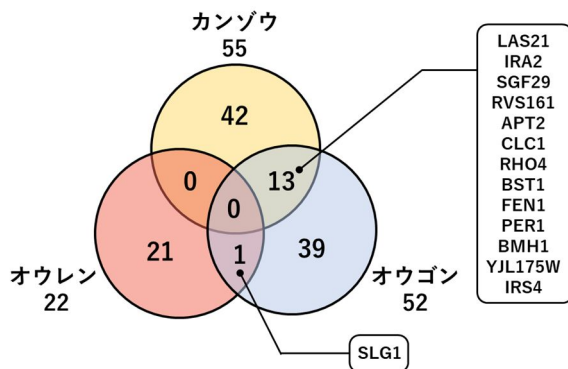


Fig. 4. カンゾウ、オウレン、オウゴンエキス間で共通する感受性株

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uto Takuhiro, Ohta Tomoe, Fujii Shunsuke, Shoyama Yukihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Immunological Separation of Bioactive Natural Compounds from Crude Drug Extract and Its Application for Cell-Based Studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibodies	6. 最初と最後の頁 48 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antib10040048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uto Takuhiro, Fujii Shunsuke, Sakamoto Seiichi, Ohta Tomoe, Shoyama Yukihiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Applications of Monoclonal Antibodies Against Natural Compounds for Functional Analysis of Crude Drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 192 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40495-020-00224-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Shunsuke, Shoyama Yukihiro, Nomura Shuichi, Uto Takuhiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Development of Highly Sensitive Chemiluminescence Enzyme Immunostaining Assay to Determine Glycyrrhizin Content Using Anti-glycyrrhizin Monoclonal Antibody	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 694 ~ 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Shunsuke, Ohta Tomoe, Ehama Riho, Irikida Mizuki, Nomura Shuichi, Shoyama Yukihiro, Uto Takuhiro	4. 巻 403
2. 論文標題 Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for formononetin and its application in a cell-based assay using MC3T3-E1 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 134339 ~ 134339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2022.134339	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuhiro Uto
2. 発表標題 Analysis of synergistic effects and molecular targets of natural compounds using monoclonal antibodies against natural compounds
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤美沙希, 石橋優美子, 高崎伸也, 宇都拓洋, 太田一寿
2. 発表標題 甘草エキスに含まれるミトコンドリア機能改善成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井俊輔, 太田智絵, 正山征洋, 宇都拓洋
2. 発表標題 ホルモノネチンに対する特異的モノクローナル抗体の作製および間接競合ELISAへの応用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牛之濱早紀, 山脇知実, 太田智絵, 原太一, 宇都拓洋
2. 発表標題 シャルコー・マリー・トゥース病治療薬を志向した生薬成分の探索
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本怜奈、永松愛美、牛之濱早紀、太田智絵、原太一、宇都 拓洋
2. 発表標題 シャルコー・マリー・トゥース病治療薬を志向したベルベリン類緑化合物の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井俊輔、太田智絵、友利桃子、小嶋涼華、野村秀一、宇都 拓洋
2. 発表標題 アルクチゲニンおよびアルクチインに対するモノクローナル抗体を用いた間接競合ELISAの確立
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎国際大学 薬品資源学研究室ホームページ 研究業績 http://niu.pharmacog.jp/achievement03.html 長崎国際大学 宇都拓洋 教員データベース https://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?tid=230
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	太田 一寿	長崎国際大学・薬学部・薬学科・准教授	
	(Ota Kazuhisa)	(37303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤井 俊輔 (Fuji i Shunsuke) (10610165)	長崎国際大学・健康管理学部・健康栄養学科・講師 (37303)	
研究協力者	太田 智絵 (Ohta Tomoe) (10804221)	長崎国際大学・薬学部・薬学科・講師 (37303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関