

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 - 2010

課題番号：21710227

研究課題名 (和文) 細胞膜のケミカルジェネティクス研究：Theonellamide の真の標的は何か？

研究課題名 (英文) Chemical genetic research on cellular membrane using theonellamide.

研究代表者

西村 慎一 (NISHIMURA SHINICHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：30415260

研究成果の概要 (和文)：

海綿に由来する抗真菌化合物 theonellamide は細胞膜中のステロールと相互作用することで分裂酵母において細胞壁の異常合成を誘導する。本研究ではこの現象に着目して生体膜の恒常性を維持するメカニズムの解明を試みた。その結果、細胞骨格や細胞膜センサー等が theonellamide の作用と密接な関連を持つことが明らかとなり、それらが細胞膜構造の維持に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Theonellamides are known to recognize membrane sterol molecules and its consequences are unique cellular morphological changes. However, molecular mechanisms underlying the phenomena have not been clarified. In this study, we tried to uncover the mechanisms by genetic and chemical genetic approaches. We identified several genes/proteins whose mutation affected the sensitivity of cells to theonellamide, while some of them were revealed to be involved in an unknown system to orchestrate the events on/around the plasma membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：海洋天然物、脂質生物学、分裂酵母、ケミカルジェネティクス、ケミカルゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する脂質分子のうち、スフィンゴ脂質とステロールは融点の高い会合体を作る。この 10 年来、生体膜においてそれらの分子とタンパク質が会合して機能的なマイクロドメインを形成していることを提唱する脂質ラフト仮説が受け入れられつつある。シグナル伝達などの生理現象が効果的に起こるための集合体として考えられており、1970 年代から広く受け入れられていた流動モザイクモデルと異なって構造体自体に機能を付与しようという点が非常に興味深

い。しかしその動的な超複合体の形成・維持機構や機能についての理解はあまり深まっているとはいえない。

2. 研究の目的

Theonellamide (TNM) は *Theonella* 属の海綿より得られた二環性のペプチドであり、細胞膜中のステロールへ特異的に結合することで抗真菌性を発揮する。申請者は、TNM の蛍光標識体と分裂酵母のポストゲノム研究とを駆使して標的の同定を行ったが、その劇的な表現型には未解明な点が多く、標的の同

定によってますます謎が深まったともいえる状況である。TNM は細胞膜ステロールに結合することで細胞壁合成の亢進を促すという、これまでに報告の無い効果を示すのである。このような効果は、ただ単にステロールに結合することによって起こっているとは考えにくい。実際、エルゴステロールに結合して膜損傷を引き起こすポリエン系抗真菌化合物を用いても同様の現象は見られない。本申請研究は、TNM の作用機序を詳細に解析することで、細胞膜の構造と機能に関する理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、TNM (図 1) の感受性に関連する遺伝子情報を手がかりにステロールの代謝・局在制御を解析した。本研究の開始時にすでに、TNM の感受性に関連する 32 の遺伝子を分裂酵母のゲノムより同定していた。強制発現させた時に TNM に対する感受性を変動させるこれらの遺伝子にコードされるタンパク質は、TNM と標的分子との相互作用に直接的に関わっている可能性があり、すなわち、ステロールの量や質を調節していることが期待できる。そこで、同定した遺伝子の強制発現や破壊、あるいは変異の導入による、化合物に対する感受性や表現型への影響

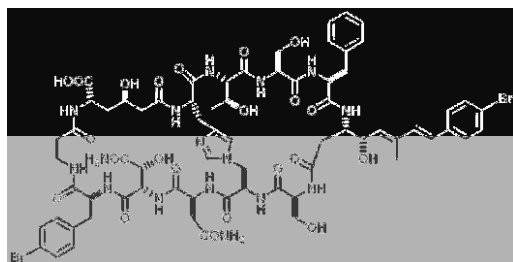


図 1. TNM の化学構造. これまでに 8 つの類縁化合物が報告されている. ここに示すのは TNM-F.

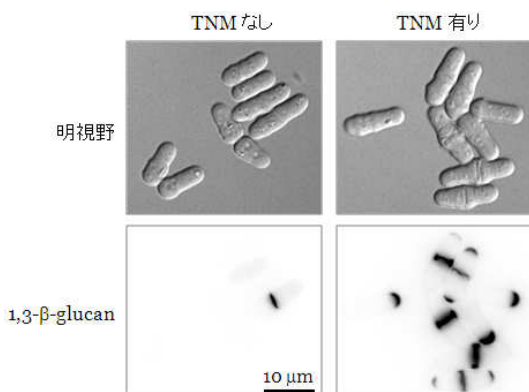


図 2. TNM による細胞壁異常. TNM を分裂酵母に処理すると、細胞壁の主成分の一つである 1,3-β-glucan の異常蓄積という特徴的な表現型が観察される。

(図 2)、脂質の組成や局在の変化を検討することで、TNM の作用機序とともにステロール分子などの脂質分子の制御メカニズムを明らかにする。また、32 の遺伝子と関連の深い遺伝子と、TNM の効果を阻害あるいは促進する化合物についても同様の解析も試みた。

4. 研究成果

TNM の標的分子は分裂酵母のゲノムワイドなスクリーニングにより推測されたが、その過程で、過剰発現によって TNM の感受性に影響を与える 32 の遺伝子が同定された。本研究ではまず、それらの遺伝子について過剰発現株を再度構築することで再現性を確認するとともに機能欠損株を作製し、また、ネットワーク解析からハブタンパク質として新たに同定されたものについても変異株を作製し、TNM および細胞膜ステロールとの関連を検討した。するといくつかの遺伝子についてはその過剰発現が TNM の結合を阻害することで TNM に対する耐性化を獲得し、別のものについては TNM の結合量が増加して感受性が上昇している様子がみられた (図 3)。例えば脂質分子の輸送体をコードしていると予想されている遺伝子 *SPCC23B6.04c* は過剰発現によって TNM への感受性が低下するが、このとき TNM の蛍光標識体 TNM-BF の細胞への結合は顕著に低下していた。一方、細胞骨格に関連する遺伝子 *SPAC26A3.09c* については過剰発現によって感受性は上昇し、TNM-BF の細胞への結合量も顕著に上昇していた。次に過剰発現によって変化が確認された遺伝子について、遺伝子破壊株を作製し、それらの TNM との関連を検討した。すると、細胞膜のストレスセンサーをコードすると推測されている遺伝子 A については、過剰発現によって TNM への感受性が上昇し、遺伝子破壊によって感受性が低下することが明らかとなった。興味深いことにこの遺伝子の破壊株については、TNM だけでなく別なステロールを標的とする化合物に対しても感受性化が低下していた。一方、細胞壁合成との関連が報告されているキナーゼをコードする遺伝子 B については、過剰発現によって TNM-BF は細胞へ結合できないものの、ステロールのマーカであるポリエン系抗生物質 *filipin* の結合は低下しなかった。以上の結果から、過剰発現によって TNM の結合を阻害する遺伝子は、全てが同じ機構をもって作用しているのではなく、細胞膜の恒常性維持に複数経路が働いていることを示唆している。メカニズムの詳細については、今後の解析が待たれる。

次に TNM の効果に影響を与える化合物を探索し、それを用いて TNM の作用機序解析を行った。TNM による細胞壁異常をほぼ完全に抑制する化合物はいくつか取得され、

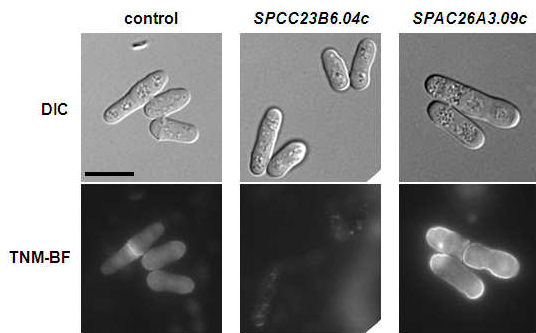


図 3. 遺伝子の過剰発現による TNM の細胞への結合の変化. 脂質輸送に関連することが予想されている遺伝子 (中) と細胞骨格の制御因子をコードしている遺伝子 (右) はそれぞれ過剰発現によって TNM に対する感受性の低下と上昇を招くが、それと TNM の結合量 (TNM-BF: TNM の蛍光標識体) との間には相関がみられた。

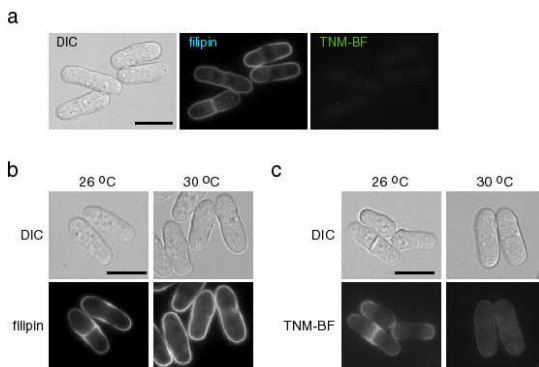


図 4. アクチンによるステロール局在の制御. a. アクチン繊維の重合を阻害する latrunculin A を処理した時の filipin と TNM-BF の細胞への結合. b-c. *act1* 遺伝子の温度感受性変異株に対する filipin (b) と TNM-BF (c) の結合。

latrunculin A はその一つであった。この化合物は TNM の細胞への結合阻害することで TNM による細胞壁異常を抑制する (図 4)。Latrunculin A はアクチンへ結合することでアクチン骨格を崩壊させることが知られており、アクチン遺伝子の温度感受性変異株を用いてアクチンと TNM との関連を検討した。すると、本変異株を制限温度で処理した時には TNM-BF の結合が劇的に抑えられた。前述の遺伝子群には細胞骨格に関連するものがいくつか含まれていたことから、アクチン骨格が細胞膜ステロールの局在制御と関連があり、TNM が認識する細胞膜ステロールをアクチン骨格が制御している可能性が強く示唆された。しかしアクチン骨格の崩壊では別なステロール認識化合物である filipin は、その結合パターンの極性は失うものの結合が無くなるわけではなかった。これは、TNM と filipin が異なる状態の膜構造を認識

することを示唆しており、それが何に起因するのか興味深い。一方、化合物 c は TNM と filipin、両者の細胞への結合を阻害するものとして同定された。本化合物はタンパク質の翻訳後修飾の阻害剤として知られており、この標的分子の下流に基質として存在する分子がどのように細胞膜の性状を制御しているのか、興味深い。

本研究では細胞膜ステロールを認識し、分裂酵母においては細胞壁異常を誘導する theonellamide を足掛かりに、細胞膜の恒常性維持のメカニズムの解明研究を進めてきた。その結果、これまでに報告のあった細胞骨格だけでなく、ストレスセンサーや特定のタンパク質翻訳後修飾が細胞膜の性状の維持に寄与している可能性が示唆された。今後、これらの現象をモデルとして詳細に解析することで、細胞膜を標的とする化合物の作用機序が明らかとなり、生体膜の性状の維持機構の解明につながることを期待される。

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 西村慎一, 掛谷秀昭 & 吉田稔. 細胞膜を攪乱する海洋天然物-セオネラミドはステロールに結合し、異常な細胞壁合成を誘導する. *化学と生物* 2011, 49, 295-297 (査読無).
- ② 西村慎一 & 吉田稔. プロファイリングによる化合物の作用解析. *化学* 2011, 66, 51-56 (査読無).
- ③ 掛谷秀昭 & 西村慎一. 新規有用天然有機化合物の開拓とケミカルバイオロジー研究. *有機合成化学協会誌* 2010, 68, 490-500 (査読有).
- ④ Nishimura, S., et al. Marine antifungal theonellamides target β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 519-526 (査読有).

[学会発表] (計 5 件)

- ① Nishimura, S., Matsunaga, S., Kakeya, H. & Yoshida, M. Modes of action of theonellamides, antifungal bicyclic peptides from a marine sponge. *Pacificchem2010* 15-20 Dec. 2010. Hawaii, U.S.A.
- ② 西村慎一, 越智順子, 有田裕子, 松山晃久, 吉田稔 & 掛谷秀昭. 海産抗真菌物質 theonellamide の作用機序解明. 日本薬学会近畿支部会. 2010年10月30日 大阪.
- ③ 西村慎一, 越智順子, 有田裕子, 松山晃久, 松永茂樹, 吉田稔 & 掛谷秀昭. ステロール

を標的とする theonellamide の作用機序解析.
第 5 回 日本ケミカルバイオロジー学会年会.
2010 年 5 月 18-19 日, 神奈川.

④ Nishimura, S., Matsuyama, A., Yoshida, M., Matsunaga, S. & Kakeya, H. Regulation of sterol localization revealed by chemical genetics using theonellamide. The 5th International Fission Yeast Meeting. 26-31 Oct. 2009. Tokyo, Japan.

⑤ 西村慎一, 松山晃久, 松永茂樹, 掛谷秀昭 & 吉田稔. ステロールを標的とする theonellamide 類が誘導する分裂酵母の形態異常. 第 42 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会. 2009 年 7 月 28-30 日, 茨城.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 慎一 (NISHIMURA SHINICHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号 : 30415260

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし