

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02128

研究課題名（和文）マルチターゲットを有する膜脂質の化学オミクス解析

研究課題名（英文）Omics analyses for understanding multiple functions of membrane lipids

研究代表者

西村 慎一（Shinichi, Nishimura）

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：30415260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：脂質に作用して特徴的な表現型を示す化合物の作用機序を各種のオミクス解析を基盤に解析し、生体膜脂質の機能の多面性の理解を目指した。まず膜ステロールに結合して強力な抗真菌活性を示す海洋天然物セオネラミドの作用解析により、膜ステロールが低分子量GTPaseの活性を制御することを明らかにした。次に抗真菌活性を示す奇数鎖脂肪酸の作用解析から、膜脂質の不飽和度の異常が小胞体の形態異常を引き起こすこと、それは細胞毒性の原因の一つになっていることを示した。さらに、セオネラミドとは全く異なる化学構造を有するがよく似た細胞表現型を示す抗真菌化合物を見出し、膜脂質の機能解析のための新たなツール化合物を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質は抗生物質や代謝疾患治療薬の標的であることから、その機能の理解が求められるが、脂質分子の化学修飾によるプローブ化は脂質の本来の性質を失わせることが多く、また、タンパク質とは異なりゲノムに直接コードされていないため、遺伝学的アプローチで十分な機能解析を行うことは困難である。本研究では、脂質に作用して特徴的な表現型を示す化合物の作用機序を各種のオミクス解析を基盤に解析することで、生体膜脂質の機能の一端を明らかにすることが出来た。また抗真菌剤として利用されている化合物の新たな生物活性を見出しており、今後、医薬品の作用機序のより深い理解が可能になると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Modes of action of bioactive compounds that act on lipids and show unique phenotypes were analyzed on the basis of various omics analyses, aiming to clarify the multifaceted nature of the functions of membrane lipids. By analyzing the action of theonellamide, a marine natural product that binds to membrane sterols and exhibits potent antifungal activity, we demonstrated that membrane sterols regulate the activity of low molecular weight GTPases. Analyses of the action of antifungal, odd-chain fatty acids revealed that abnormal unsaturation degree of membrane lipids causes aberrant ER morphology, which is likely one of the causes of cytotoxicity. Furthermore, we found an antifungal compound that has a completely different chemical structure from theonellamide but exhibits a similar cellular phenotype, obtaining a new tool molecule for the functional analysis of membrane lipids.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：膜脂質 生理活性化合物 化学遺伝学 ケミカルバイオロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の内外を仕切り、細胞内をコンパートメント化する生体膜は、重量にして約 50%を脂質が占める。10 万を超えるとされる脂質分子種であるが、進化を続ける質量分析技術により網羅的な検出が可能になってきた。ところがそれらの機能の解析はいまだにブレイクスルーに欠く。脂質は抗生物質や代謝疾患治療薬の標的であることから、その機能の理解が求められるが、脂質分子の化学修飾によるプローブ化は脂質の本来の性質を失わせることが多く、また、タンパク質とは異なりゲノムに直接コードされていないため、遺伝学的アプローチで十分な機能解析を行うことは困難である。さらに脂質により構造や機能が制御されるタンパク質は単一ではないため(マルチターゲット) 特定の表現型に注目した解析手法が必要となる。一方で、微生物や海洋生物が産生・含有する生理活性化合物には、脂質に作用する化合物が少なからず見られ、それらを用いた化学遺伝学のアプローチが脂質の機能解明に有効である。このような背景のもと本研究では、脂質に作用して特徴的な表現型を示す化合物の作用機序を各種のオミクス解析を基盤に解析し、生体膜脂質の機能の多面性を明らかにすることを目指した。

### 2. 研究の目的

膜脂質は細胞中の膜構造に勾配をもって分布する。例えばステロールは小胞体で合成され、小胞輸送により、ゴルジ体を経由して細胞膜に輸送される。ステロールの濃度は小胞体では脂質の 5 モル%程度に抑えられ、細胞膜では 30 モル%以上を占める。傾斜のついた局在はリン脂質でもみられ、ヘッドグループによってオルガネラ選択性があり、二重膜の内外葉の分布も制御されている。質量分析や電子顕微鏡観察などのさらなる技術開発によって、脂質分子種の詳細な細胞内局在マップが作成されるのは時間の問題である。ここで、脂質はそれぞれの局在部位でどのような役割を持っているのであろうか?これが本研究課題の学術的「問い」である。酵母のエルゴステロール生合成遺伝子を破壊すると、細胞膜、小胞、液胞、細胞分裂の形態や機能に幅広い影響がみられる。これはそれぞれの局在部位でステロールが異なる機能を持つことを示唆する。すなわち、脂質はマルチターゲット分子である。しかし遺伝学的な脂質の変調(例えば脂質の生合成遺伝子の破壊)では、株の樹立の間に代償経路が働くことで表現型が穏やかになることが予想され、また、部位特異的な脂質分子の機能変調は困難である。そこで本申請研究は、脂質に作用して速やかに特徴的な表現型を提示する生理活性化合物を用いる化学遺伝学のアプローチと各種オミクス解析を組み合わせ(化学オミクス解析) この問いに答えることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究で推進した 3 つの研究項目について、それぞれの方法を以下に記す。

#### (1) ステロールを標的にする海洋天然物セオネラミドを用いたケミカルバイオロジー

セオネラミドは海綿 *Theonella swinhoei* に含有される二環性ペプチドであり、強い抗真菌活性と弱い細胞毒性を示す。申請者らはこれまで本化合物の標的分子がコレステロールやエルゴステロールなどのステロールであること(Nat. Chem. Biol. 2010; Biochemistry 2013) 脂質二重膜の流動性と曲率を変えること(Chem. Biol. 2015; BBA 2016)を明らかにしてきた。本化合物のケミカルプローブとしての最も重要な点は、ポリエーテル系抗真菌剤に代表される他のステロール結合化合物とは異なり、速やかな細胞膜の溶解やポア形成を引き起こさず、ユニークな表現型を示すことにある。例えば分裂酵母にセオネラミドを処理すると、1,3-β-D-グルカン合成酵

素の集積による、1,3-β-グルカンの異常合成という他の化合物にはみられない表現型を誘導する。この現象の分子メカニズムを明らかにするために我々は、細胞膜や細胞極性部位に局在する約 400 のタンパク質の局在変化を蛍光顕微鏡下で観察し、100 余りのタンパク質が局在を変化させ、細胞極性因子や細胞骨格因子を含む約 30 のタンパク質が細胞壁異常部位に集積することを見出している。本研究では、タンパク質の細胞内局在情報を基盤にしたオミクス解析により見出された化合物・タンパク質間相互作用情報を基盤に、セオネラミドの作用解析を推進した。

#### (2) 奇数鎖脂肪酸が示す抗真菌活性の分子メカニズム

生体内の脂肪酸は炭素鎖長が偶数のものがほとんどである。炭素鎖長 15 の脂肪酸がスフィンゴシンから生合成されることが出芽酵母を用いて示され、ヒトもそのホモログを有することが報告されたものの (Kondo et al. Nat. Commun. 2014) その機能は全く未解明である。申請者らは生体膜に作用する化合物のスクリーニングにおいて、炭素鎖長が奇数の脂肪酸が分裂酵母の生育を阻害する事を見出した。すなわち炭素鎖長 13 (トリデカン酸) や 15 (ペンタデカン酸) の脂肪酸は分裂酵母の野生株細胞の生育を阻害し、エルゴステロールを合成できない変異株には全く効果を示さなかった。さらに偶数鎖脂肪酸は高濃度でも生育阻害をほとんど示さず、この現象は脂肪酸の炭素鎖長に強く依存することが分かった。このユニークな現象の分子メカニズムとして、ペンタデカン酸の添加により微量な内在ペンタデカン酸の機能が強化されてしまった可能性、ペンタデカン酸がタンパク質の阻害剤になった可能性、ペンタデカン酸が複合脂質に取り込まれ、それが生理活性を発揮している可能性などが考えられた。いずれにしても、奇数鎖脂肪酸に固有な分裂酵母の生育抑制現象を遺伝学的、形態学的、生化学的アプローチにより解析することで、脂肪酸の新機能について予想外の知見が得られると期待された。

#### (3) 新しい生体膜標的型化合物の探索

生体膜とユニークな相互作用を示す生理活性化合物を取得すべく、分裂酵母野生株と変異株を用いた比較アッセイおよび形態観察により微生物培養液や精製化合物を対象に探索研究を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) ステロールを標的にする海洋天然物セオネラミドを用いたケミカルバイオロジー

セオネラミドを分裂酵母に処理すると細胞末端と分裂面に 1,3-β-グルカン合成酵素が集積し、グルカンの異常蓄積が起こる。この分子メカニズムを明らかにするため、壁異常個所に集積することが見出されていた 30 余りのタンパク質の情報を解析した。するとこれらタンパク質にはアクチン骨格に関連するもの、特に低分子量 GTPase Cdc42 に関連するものが含まれていることが確認された。Cdc42 は小胞輸送およびアクチン繊維の重合を制御するタンパク質であり、細胞極性のマスターレギュレーターとして知られる。蛍光顕微鏡下でマーカータンパク質を用いて Cdc42 の活性化を観察したところ、セオネラミド処理によって経時的に活性化されている様子が見られた。この活性化は細胞極性部位で起こるものであり、細胞壁の異常合成部位と一致していた。次にその下流イベントへの影響を検証すべく、エキソサイトーシスを生化学的に計測した。するとセオネラミド処理によって、中程度の濃度域では濃度依存的にエキソサイトーシスの活性が上昇することが明らかになった。細胞壁異常合成が十分に起こる濃度のセオネラミドでは分泌タンパク質の活性を指標にしたエキソサイトーシス活性は阻害されていたが、これは、厚い壁によってタンパク質の分泌が抑制されたためと考えられる。これらの結果は、セオネラミドによる 1,3-β-グルカン合成酵素の細胞極性部位への蓄積は膜輸送の活性化によることが示唆

された。実際、分泌小胞を細胞膜に係留するために必要なエキソシスト複合体がセオネラミド処理によって細胞極性部位に集積する様子が蛍光顕微鏡観察において確認された。

次に、1,3-β-グルカン合成酵素の細胞内局在を指標に、セオネラミドがエキソサイトーシスのどの部分を活性化しているのかを蛍光顕微鏡観察により検証した。エキソサイトーシスにおいて小胞はアクチン骨格を介して細胞極性部位に輸送される経路と、アクチン骨格を必要としない経路によって運ばれる。アクチン骨格依存的な輸送に必要なミオシンを欠損した変異株およびアクチン繊維重合に重要なフォルミンの欠損株を用いて 1,3-β-グルカン合成酵素のセオネラミドによる蓄積を解析したところ、セオネラミドはこれら欠損株においても 1,3-β-グルカン合成酵素を細胞極性部位に集積させることが示された。この結果はセオネラミドによるエキソサイトーシスの活性化とそれによる 1,3-β-グルカン合成酵素の集積にはアクチン繊維は必須ではないことを示している。以上のことより、セオネラミドは細胞極性部位に多く検出される膜ステロールに結合することで Cdc42 の活性化とそれに続く 1,3-β-グルカン合成酵素を含む小胞の集積を引き起こし、その結果、1,3-β-グルカン合成酵素が集積することで細胞壁の異常合成が起こることが明らかとなった（論文準備中）。次の課題はセオネラミドによる Cdc42 活性化の分子メカニズムの解明であり、それにより膜ステロールの細胞極性制御における機能が明らかになると期待される。

## （2）奇数鎖脂肪酸が示す抗真菌活性の分子メカニズム

奇数鎖脂肪酸は分裂酵母において顕著な生育阻害を示し、その際、細胞分裂時に形成される隔壁の形成不全を引き起こす。特に効果の顕著なペンタデカン酸を処理することで、約半数の細胞は収縮環の形成に重要な Mid1 タンパク質の欠損株とよく似た形態を示し、また、20%余りの細胞が湾曲した隔壁を持つことが明らかとなった。Mid1 の局在解析を行う中でペンタデカン酸はさらに核膜の形態異常や染色体分配の異常を引き起こすことが見出され、核膜と連続する小胞体も異常な形態を示すことが明らかとなった。また、細胞膜ステロールの極性消失も本化合物の処理によって引き起こされた。次に、各種の変異株を用いることでこれらの形態変化の関連を詳細に解析した。するとペンタデカン酸の処理によって小胞体が巨大なシート状の構造（巨大 ER シート）へと変化し、巨大 ER シートが隔壁形成を邪魔している様子が見られた。オルガネラ間ではコンタクトサイトを通じて物質移動が行われている。細胞膜と ER のコンタクトサイトを欠損させてもペンタデカン酸による巨大 ER シートの形成は観察され、一方で、コンタクトサイトを欠損すると細胞膜ステロールの極性が失われることが見出された。このことは巨大 ER シートがコンタクトサイトの機能を阻害している可能性を示唆した。これらのことから、ペンタデカン酸による複数のオルガネラ形態異常は、小胞体の形態変化が初発の異常である可能性が示唆された。

ペンタデカン酸がリピドームに与える影響をノンターゲット解析に供したところ、検出されたほとんどの複合脂質にペンタデカン酸が取り込まれていた。また、特定の複合脂質はペンタデカン酸により顕著な増減を示した。このリピドーム解析の結果を受けていくつかの脂質代謝酵素群に着目してフォーカススクリーニングを実施し、複数の代謝酵素の関与を遺伝学的に示すことが出来た。すなわち、分裂酵母が有する 2 つの CoA リガーゼのうちの一つ、また、17 の 0-アシル転移酵素のうちの一つは、その欠損によりペンタデカン酸による生育阻害が完全にキャンセルされた。またこれら変異株では特徴的なオルガネラの形態変化も見られず、奇数鎖脂肪酸がリピドームに取り込まれてオルガネラの形態変化を誘導する、というシナリオを支持するものであった。

分裂酵母の複合脂質を形成するアシル鎖の主要なものはオレイン酸であった。そこにペンタデカン酸が取り込まれると、不飽和度が減少する。そこでペンタデカン酸による毒性と脂肪酸の不飽和度との関係を解析した。まず脂肪酸不飽和化酵素の発現量を抑制して増殖を検討したところ、奇数鎖脂肪酸に対する感受性が上昇し、さらに偶数鎖脂肪酸に対する感受性も示した。偶数鎖脂肪酸による毒性は、上述の CoA リガーゼを過剰発現することによっても見られた。これらの結果から、奇数鎖脂肪酸を用いて解析を進めてきたユニークな表現型は一般的な脂肪毒性であり、小胞体の形態変化が脂肪毒性の要因の一つであると示唆された（論文準備中）。野生株における奇数鎖脂肪酸の特異的毒性の分子メカニズムは依然として不明であり、そこには厳密な分子認識機構の存在が期待されることから興味深い研究課題である。

### （３）新しい生体膜標的型化合物の探索

細胞膜を標的にする抗真菌化合物は、酵母野生株には効果を示すが脂質合成の変異株には効果を示さないことがしばしばある。その感受性の差を利用した化合物探索を実施し、一つの化合物が上述のセオネラミドとよく似た表現型を示すことを明らかにした（未発表）。本化合物は感染症治療薬としても用いられているものであり、セオネラミドとは全く異なる化学構造を有する。今後、細胞壁肥厚現象の詳細を解析することで本化合物の作用メカニズムの詳細の理解につながると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Shinichi	4. 巻 74
2. 論文標題 Marine natural products targeting the eukaryotic cell membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 769 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00468-5	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 Elsadek Lobna A., Matthews James H., Nishimura Shinichi, Nakatani Takahiro, Ito Airi, Gu Tongjun, Luo Danmeng, Salvador Reyes Lilibeth A., Paul Valerie J., Kakeya Hideaki, Luesch Hendrik	4. 巻 22
2. 論文標題 Genomic and Targeted Approaches Unveil the Cell Membrane as a Major Target of the Antifungal Cytotoxin Amantelide A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1790 ~ 1799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202000685	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 該当する

1. 著者名 Kano Naoki, Terashima Ryusei, Nishiyama Hiromichi, Terajima Yuta, Nagasawa Shota, Sasano Yusuke, Iwabuchi Yoshiharu, Saito Hiroaki, Egoshi Syusuke, Dodo Kosuke, Sodeoka Mikiko, Pan Chengqian, Ikeuchi Yoshinobu, Nishimura Shinichi, Kakeya Hideaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Design, Synthesis, and Antifungal Activity of 16,17-Dihydroheronamide C and ent-Heronamide C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 16249 ~ 16258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c01761	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 Kano Naoki, Terajima Yuta, Tanaka Suguru, Terashima Ryusei, Nishiyama Hiromichi, Nagasawa Shota, Sasano Yusuke, Iwabuchi Yoshiharu, Nishimura Shinichi, Kakeya Hideaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Toward the Creation of Induced Pluripotent Small (iPS) Molecules: Establishment of a Modular Synthetic Strategy for the Heronamide C-type Polyene Macrolactams and Their Conformational and Reactivity Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 16231 ~ 16248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c01760	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 Ueoka Reiko, Sondermann Philipp, Leopold-Messer Stefan, Liu Yizhou, Suo Rei, Bhushan Agneya, Vadakumchery Lida, Greczmiel Ute, Yashiroda Yoko, Kimura Hiromi, Nishimura Shinichi, Hoshikawa Yojiro, Yoshida Minoru, Oxenius Annette, Matsunaga Shigeki, Williamson R. Thomas, Carreira Erick M., Piel Joern	4. 巻 14
2. 論文標題 Genome-based discovery and total synthesis of janustatins, potent cytotoxins from a plant-associated bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41557-022-01020-0	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 星川陽次郎、西村慎一、松山晃久、リ・シーナ、八代田陽子、ブーン・チャールズ、津川裕司、有田誠、吉田稔。
2. 発表標題 奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の脂質組成の攪乱および小胞体の形態異常。
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾拳典、西村慎一、菅長昭文、松山晃久、吉田稔。
2. 発表標題 ステロール標的型天然物セオネラミドによるアクチン骨格と膜輸送の変調。
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星川陽次郎、西村慎一、松山晃久、Sheena Li、八代田陽子、Charles Boone、津川裕司、有田誠、吉田稔。
2. 発表標題 奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の脂質代謝攪乱と細胞分裂阻害。
3. 学会等名 第 63 回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
スペイン	サラマンカ大学			
米国	フロリダ大学			
スイス	チューリッヒ工科大学			