

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658037

研究課題名（和文） 生物活性物質標的分子の新規同定法

研究課題名（英文） New method for identifying target molecules of bioactive compounds

研究代表者

作田庄平（ SAKUDA SHOHEI ）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80192087

研究成果の概要（和文）：生物活性物質の標的分子の同定は、生物活性物質の作用機構を解明する上で最も重要であり、それは生物活性物質が関与する未知の生命現象を分子レベルで明らかにするための手がかりを与える。本研究では、生物活性物質をダイマー化したプローブを用いて分子標的を同定する方法の開発を試みた。カビのマイコトキシン生産を特異的に阻害する化合物とキチナーゼ阻害物質アロサミジンモデル化合物とした。各種誘導体の構造と活性をもとに、トリコテセン阻害物質であるプレコセンIIのダイマーを調製したが、活性を保持したダイマーを得ることはできなかった。そこで、既知の方法ではあるが最新の手法であるクリックケミストリーと磁気アフィニティービーズを用いる方法を適用し、旧来のフォトアフィニティープローブを用いる方法と比較しながら、標的分子の同定を進め、候補タンパク質の同定に至った。アロサミジンのダイマー化は、目的の部位でのダイマー化には至っておらず、現在さらなる実験を進めている。

研究成果の概要（英文）：Identification of the target molecule of a bioactive compound is most important for clarifying the mode of action of the compound. The target molecule can afford a clue to investigate the unknown biological phenomenon concerning the bioactive compound at the molecular level. In this study, we attempted to develop a novel method for identifying the target molecule using a dimer probe. Mycotoxin production inhibitors and allosamidin, a chitinase inhibitor, were used as model bioactive compounds. A dimer of precocene II, specific inhibitor of trichothecenes, was prepared based on the structure-activity relationship work, but no dimer with inhibitory activity was obtained. Therefore, we tried to investigate its target molecule using click chemistry and magnetic affinity-beads methods, which are recently developed, by comparing the methods with conventional photoaffinity probe method, and we have gotten a candidate protein as the target molecule. Preparation of allosamidin dimers is still in progress because it is difficult to connect two allosamidin molecules at desirable positions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質、標的分子、プローブ

## 1. 研究開始当初の背景

微生物や植物由来の二次代謝産物には特異的な生物活性を有する化合物が含まれる。得られた天然物は医薬、農薬等に利用され有用である。また基礎科学に大きなインパクトを与える。生物活性物質研究において新規物質の発見は最も重要である。それと同等に活性物質の作用機構の解明は重要である。作用機構解明はより有効な薬剤開発につながる。また生命科学の未知領域への切り込みとなる場合が多い。作用機構の鍵となるのが標的分子である。標的分子の同定は活性物質と特異的に結合するタンパク質等をとらえることで行う。最も一般的な手法は以下のとおりである。まずリガンドである活性物質をプローブ化する。放射能、蛍光、光親和性基、ビオチン化ラベルがプローブ化に用いられる。そのプローブとの結合を指標に標的分子を得る。しかしこの手法で速やかに標的分子が得られることは稀である。プローブの結合活性の低下、非特異的結合、標的分子の存在量等の問題が大きく立ちはだかる。従って、もっと確実に標的分子を同定する手法の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

前述のように、生物活性物質の標的分子の同定は、生物活性物質研究分野において現在最も重要な課題であるが、現在用いられるフォトアフィニティプローブによる方法では同定が極めて困難である。そこで、本研究では標的分子を同定するための新たな手法の開発を試みることを目的とする。

## 3. 研究の方法

生物活性物質を二量体化したプローブに標的分子を結合させることで、分子量が倍加したタンパク質として標的分子を検出することが可能ではないかと考えた。そこで、*Fusarium graminearum* のマイコトキシンであるトリコテセン化合物の生産を特異的に阻害するプレコセンII、およびキチナーゼを特異的に阻害するアロサミジン類をモデル化合物として二量体化プローブの調製を検討した。

また、本研究課題の開始当初はあまり使用されていなかったクリックケミストリーと磁気アフィニティビーズを用いる手法が、標的分子の同定に有効であるとの報告が最近多くなされていることより、旧来のフォトアフィニティプローブを用いる方法とクリックケミストリーあるいは磁気アフィニティビーズを用いる新たな手法を比較しながら、プレコセンIIの標的分子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) プレコセンIIの構造活性相関とダイマープローブ

プレコセンIIの各種誘導体を調製し、*F. graminearum* のトリコテセン生産阻害活性を調べた。その結果、プレコセンII (図1) の6位あるいは7位のメトキシ基の構造変換は活性を保持できることが判明した。その際、6位をエトキシあるいはブトキシ基とした化合物1および2が強い活性を保持するのに対し、7位を置換した化合物3および4は弱い活性を示した。これらの知見をもとに、6位どうしをメチレンで結合した化合物5を調製したが、活性を全く示さなかった。

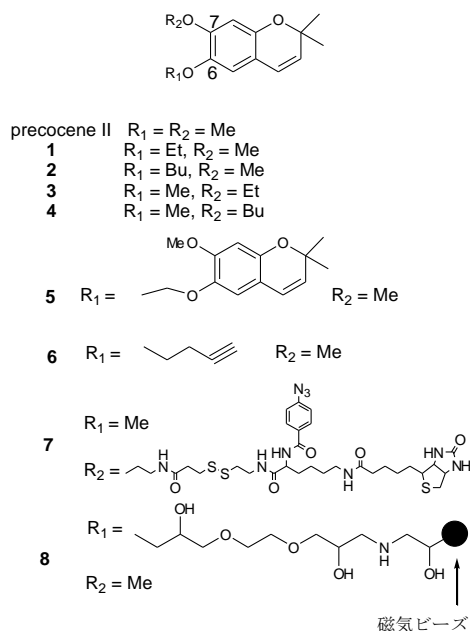


図1 プレコセンIIおよび誘導体の構造

(2) プレコセンIIの標的タンパク質の同定  
まず、プレコセンIIによる*F. graminearum*の代謝系における変化を菌体に発現するタンパク質を網羅的に解析することで調べた。その結果、プレコセンIIにより、メバロン酸経路を含めたトリコテセン合成酵素の発現が減少することが認められた。メバロン酸合成酵素の発現減少が見られたため、エルゴステロール生産に対するプレコセンIIの影響を調べたが、影響を与えないことが示された。その際に、塩化コバルトを培地に添加すると、トリコテセンの生産が大幅に促進される現象を見出した。さらに、

ミトコンドリアから細胞質にアセチル-CoA を供給する際に重要な ATP-citrate lyase の発現もプレコセン II により低下することが分かった。そこで、アセチル-CoA と ATP-citrate lyase mRNA 量に対するプレコセン II の影響を調べたところ、それらはプレコセン II により低下することが示され、プレコセン II の作用に ATP-citrate lyase の発現が大きく関与することが示唆された。

以上の生化学的なプレコセン II の作用に関する知見をもとに、標的タンパク質の同定を試みた。プローブとの結合実験に用いる菌体タンパク質について、*F. graminearum* の菌体からタンパク質を穏やかな条件で抽出する方法を検討し、プロトプラストとした後タンパク質を抽出する手法を開発した。

まず、クリックケミストリーを用いた結合タンパク質の検出を試みた。末端三重結合を持つ化合物 **6** を調製したところ強い活性を保持していた。そこで化合物 **6** と共有結合するタンパク質の検出を試みたが、結合タンパク質を得ることはできなかった。

そこで次に、旧来のプローブとして光反応基であるアリルアジド基とビオチン残基を有する化合物 **7** を調製し結合タンパク質を検出した。図 2 に示すように非特異的に結合したと考えられるバンドが多く見られたが、過剰量のプレコセン II を添加した競合阻害実験によって消失するバンド (矢印) が 27 kDa 付近に検出された。

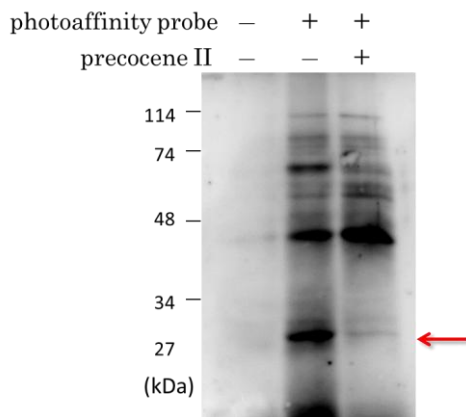


図 2 フォトアフィニティプローブを用いた結合タンパク質の検出

次に、磁気アフィニティビーズのリンカーにプレコセン II 分子を結合したプローブ **8** を調製し、結合タンパク質の検出を試みた。図 3 に示した結合実験の手法を確立し、非特異的結合によるタンパク質のバンドを図 2

と比べて大幅に減少させ、図 4 に示したように競合実験で消失するバンドを 27 kDa 付近に検出した。このバンドは図 2 のバンドとおそらく同じタンパク質に由来するものであると考えられた。

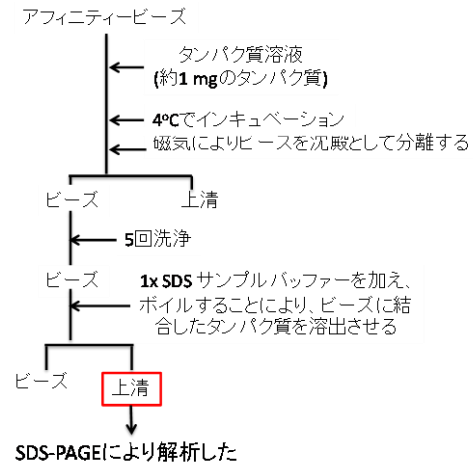


図 3 磁気アフィニティビーズを用いた実験方法

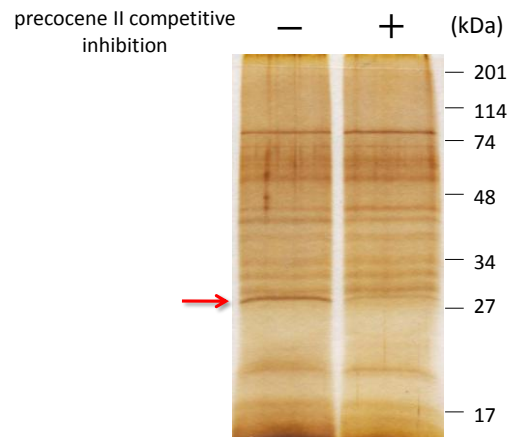


図 4 磁気アフィニティビーズを用いた結合タンパク質の検出

図 4 の矢印のバンドを切り出し、トリプシンで消化後、LC MS/MS でペプチドマッピングを行った。その結果、バンドに含まれるタンパク質はミトコンドリア内膜の ADP/ATP translocase であることが判明した。前述の ATP citrate lyase との関連が示唆されるこ

とから、現在遺伝子破壊や他の阻害剤を用いる実験を行い、得られたタンパク質がプレコセンIIの標的分子であることを確認している。

### (3) アロサミジンの二量体化

アロサミジンの *N*-デメチル体であるデメチルアロサミジンのモノ脱アセチル化により得られたモノアミン体について、BM(PEG)<sub>2</sub>をスパーサーにした二量体化を試みた。モノアミン体と BM(PEG)<sub>2</sub>を種々のモル比で混合し、DMF 中塩基性条件で反応させた。その結果、微量生成物であるものの二量体の生成が認められた。そこでアロサミジンについても同様にモノ脱アセチル化体の二量体化反応を行ったが今度は、二量体は得られなかった。おそらく、アロサミジンのアミノオキサゾリン骨格の存在が目的の部位での反応を阻害していると考えられた。また、非特異的な多量化反応剤であるヘキサメチレンジイソシアネートを用いて反応を行ったが反応に用いる溶媒への溶解性の問題で二量体は得られていない。現在さらなる反応の検討を行っている。

## 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 6 件)

- ① Tomoya Yoshinari, Yoichi Noda, Koji Yoda, Hiroshi Sezaki, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, Inhibitory activity of blasticidin A, a strong aflatoxin production inhibitor, on protein synthesis of yeast: selective inhibition of aflatoxin production by protein synthesis inhibitors. *Journal of Antibiotics*, 査読有、63 巻, 309-314 (2010).
- ② Rie Tsuyuki, Tomoya Yoshinari, Naoko Sakamoto, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, Enhancement of trichothecene production in *Fusarium graminearum* by cobalt chloride, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有、59 巻, 1760-1766 (2011).
- ③ Shohei Sakuda, Mycotoxin production inhibitors from natural products. *Mycotoxins*, 査読無、60 巻, 79-86 (2010).
- ④ Usuma Jermnak, Tomoya Yoshinari, Yasumasa Sugiyama, Rie Tsuyuki, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor

from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds, *International Journal of Food Microbiology*, 査読有、153, 339-344 (2012). DOI:

10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.023

- ⑤ 作田庄平、天然物由来のアフラトキシンおよびデオキシニバレノール生産阻害物質、査読無、*農薬学会誌*、36(1), 115-118 (2011).
- ⑥ Usuma Jermnak, Amara Chinaphuti, Amnart Poapolathep, Ryo Kawai, Hiromichi Nagasawa, Shohei Sakuda, Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces aflatoxin production inhibitors, 査読有、*Microbiology*, 159, 902-912 (2013). DOI: 10.1099/mic.0.065813-0

[学会発表] (計 6 件)

- ① 作田庄平、天然物由来のアフラトキシンおよびデオキシニバレノール生産阻害物質、日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月 30 日、北海道大学学術交流会館 (北海道)
- ② Shohei Sakuda et al., Mode of action of aflatoxin and trichothecene production inhibitors originated from natural products, *International Mycotoxin Conference MycoRed 2010*, December 3, 2010, Penang, Malaysia
- ③ Usuma Jermnak, 作田庄平 *et al.*, Aflatoxin production inhibitory activity of methyl syringate, 日本マイコトキシン学会第 69 回学術講演会、2011 年 1 月 7 日、タワーホール船堀 (東京)
- ④ Naoko Sakamoto, Shohei Sakuda et al., Mode of action of precocene II as trichothecene production inhibitor, *IUMS 2011 Congress*, 2011 年 9 月 7 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑤ 坂本直子、作田庄平他、*Fusarium graminearum* における ATP citrate lyase, acetyl-CoA 量とトリコテセン生産との関係、日本マイコトキシン学会第 71 回学術講演会、2012 年 7 月 6 日、沖縄県市町村自治会館 (沖縄県)
- ⑥ 古川智宏、作田庄平他、*Fusarium graminearum* のトリコテセン生産を阻害する precoceneII の標的タンパク質に関する研究、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、東北大学 (宮城県)

[図書] (計 1 件)

- ① 作田庄平、カビ毒産生の制御、食の安全科学の展開—食のリスク予測と制御に向けて—、東京大学食の安全研究センター編、シーエムシー出版

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

作田庄平（SAKUDA SHOHEI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・

准教授

研究者番号：80192087