

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657041

研究課題名(和文)クロロフィル蛍光を用いた新規薬剤スクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Novel screening method for drugs using chlorophyll fluorescence

研究代表者

園池 公毅 (Sonoike, Kintake)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：30226716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：医薬・農薬などを新規に開発するために、さまざまな化学物質の生理機能活性をスクリーニングする新規な方法を開発することを目的として研究を行った。単細胞の光合成生物であるシアノバクテリアを材料として用い、光合成生物が持つクロロフィルの蛍光を利用することにより、さまざまな薬剤が細胞内の代謝系に及ぼす影響を解析した。その結果、細胞内の中間代謝産物を添加した場合に、代謝系によってその応答が異なることが明らかとなり、薬剤の評価にクロロフィル蛍光を用いることが可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop the novel method to screen drugs affecting specific metabolic process. We used chlorophyll fluorescence for that purpose, using cyanobacteria, unicellular photosynthetic organisms. The obtained results demonstrate that the addition of the several metabolite to cyanobacterial cells results in the specific change in the induction kinetics of the chlorophyll fluorescence.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：クロロフィル蛍光 薬剤スクリーニング シアノバクテリア 代謝 光合成

## 1. 研究開始当初の背景

医薬・農薬などを新規に開発するために、さまざまな化学物質の生理機能活性をスクリーニングすることは古くから行われており、近年、そのようなプロセスを促進するために、化合物ライブラリーの整備も進められている。ライブラリーから生理機能活性をスクリーニングする場合には、細胞や組織の生死への影響、培養細胞や単細胞生物の生育速度への影響、特定の酵素などの活性への阻害作用をみる、といった方法が主にとられている。このような方法の中で、生死や生育速度への影響を見る場合には、多様な機能活性への影響を見ることのできる代わりに、実際の化合物の標的は別途、同定する必要があるという問題点があり、逆に、特定の酵素などの活性への阻害作用を見る場合には、化合物と標的の関係は明らかになるが、その特定の反応についての情報しか得られない、という問題点が存在する。

一方、申請者は従来、原核光合成生物であるシアノバクテリアの遺伝子機能を解明するため、細胞内のクロロフィルを代謝系蛍光プローブとして用いる研究を進めてきた。ゲノム上の遺伝子の破壊株約500株について暗所から明所への移行時のクロロフィル蛍光の発光強度の変動を観察すると、その挙動はその破壊株の原因遺伝子の機能を反映することを明らかにした(Ozaki et al. 2007, *Plant Cell Physiol.* 48:451-458)。しかも、その挙動を表現型ベクトル同士のなす角として定量化し、クラスター解析を行なった場合、ゲノム上の約半数の遺伝子について機能と表現型を関連づけることができた(Ozaki and Sonoike 2009, *Photosynth. Res.*, 101:47-58)。

興味深いことに、例えば呼吸系の末端酸化酵素の阻害剤を野性株に加えて測定したものを遺伝子破壊株と同時に解析すると、阻害剤を添加した株と、末端酸化酵素の破壊株は同じクラスターに集まる。つまり、この結果は、化合物の標的タンパク質を、クロロフィル蛍光を用いて同定することができる、ということを示している。

## 2. 研究の目的

上記の状況を踏まえ、新規の薬剤スクリーニング方法を開発することにした。本研究においては、1回のスクリーニング操作において、「多様な機能活性への影響の有無」と「その化合物の標的候補」についての情報を同時に収集する方法を、植物生理学の分野から提案する。クロロフィル蛍光は、一義的には光合成の機能を反映するが、原核生物としてオルガネラを持たないシアノバクテリアにおいては代謝系が相互作用しているため、上記のように呼吸系の表現型解析にも用いることができる。期間中に、光合成や呼吸以外にどれだけ広範囲の生物機能についての情報が取得可能であるかを検討し、薬剤スクリー

ング方法の確立を行なうことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

解析には、クロロフィル蛍光 CCD カメラを用いて、2次元画像を時系列に取得し、プレート上のシアノバクテリアのパッチからの蛍光の時系列データに変換した蛍光挙動を主に用いる。この蛍光挙動が遺伝子の破壊、もしくは薬剤の添加によって変化する様子を比較することが基本となる。

具体的には、破壊株の蛍光挙動を、表現型ベクトルの角度に変換することにより定量化し、これを距離としてクラスター解析をすることにより機能と結びつける手法を確立している(Ozaki and Sonoike 2009)。

また、個々の遺伝子変異株の詳細な解析は、液体培養をしたシアノバクテリアを、高感度のクロロフィル蛍光解析装置(Water PAM)により測定することにより行った。また、光化学系量比の定量は、液体窒素温度での低温傾向スペクトルにより、また光合成活性の測定は、酸素電極による電子伝達活性の定量により行った。

## 4. 研究成果

平成22年度までに構築していたシアノバクテリアの蛍光挙動データベース(Fluorome)に、これまでに測定を重ねてきたシアノバクテリアのクロロフィル蛍光データを追加して登録し平成23年10月にバージョン2として公開した。この結果、登録されたシアノバクテリアの遺伝子破壊株の数は、全ゲノムの遺伝子の23%強に相当するまで増やすことができた。データベースはFluoromeとして独自サイトからデータベースを公開(<http://www.photosynthesis.jp/fluorome/>)してきたが、平成23年度に発足したJSTに拠点をおくバイオサイエンスデータベースセンターにも最新データを寄託し、そこから興味を持ったものが自由に全データをまとめてダウンロードすることを可能にした。

さらに、光合成とそれ以外の代謝系の相互作用によるクロロフィル蛍光への影響を把握するために、呼吸の電子伝達に参与するNDH複合体のサブユニットをコードする遺伝子破壊株と、呼吸の末端酸化酵素複合体の阻害剤であるシアン化カリウムを用いて、解析を行なった。その結果、呼吸の電子伝達鎖の上流に位置するNDH複合体の機能不全は、その下流のプラストキノールの酸化を通して光合成のステート状態に影響を及ぼし、結果としてクロロフィル蛍光挙動に大きな変化が現れることが明らかとなった。さらに、この変化は、呼吸の電子伝達鎖の最下流に位置するNDH複合体をシアン化カリウムで阻害することによって解除されることを見出した。

また、クロロフィル蛍光の変化に伴い、通

常用いられる光合成速度のクロロフィル蛍光による見積もりが不可能になることも明らかとなった。このことは、シアノバクテリアにおける光合成速度の見積もりには大きな問題点を投げかけることになった。この点は、当初の研究目的にはないものであるが、シアノバクテリアを材料とした光合成研究にとっては重要な発見である。

ここまでの研究成果により、少なくとも呼吸系に関しては、光合成系との関連のメカニズムが明らかとなり、呼吸系の阻害剤との関わり方についても情報が得られた。

平成25年度に入ってから、プレート上にパッチ状に生育させたシアノバクテリア細胞に数十種類の薬剤溶液を滴下し、二次元蛍光カメラにより各パッチからの蛍光を経時的に測定することにより、各種薬剤の細胞内代謝系への影響を評価した。この結果、アミノ酸では試した20種のほとんどで特徴的な蛍光挙動変化が見られた一方、有機酸の場合は試した7種でいずれも変化が認められなかった。この結果は、アミノ酸代謝経路の中間代謝産物と、クエン酸回路の中間代謝産物では、クロロフィル蛍光、すなわち光合成系に対する影響が大きく異なることを示しており、細胞内の代謝系の相互作用が、調べた時間範囲(15-30分)においては大きくないと結論できる。糖の場合はグルコースで特徴的な変化が見られ、解糖系とアミノ酸合成系の相互作用も大きくないと推定された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ogawa, T., Harada, T., Ozaki H. and Sonoike, K. (2013) Disruption of the *ndhF1* Gene Affects Chlorophyll Fluorescence through State Transition in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, resulting in the apparent high efficiency of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 54, 1164-1171.

〔学会発表〕(計10件)

1. 園池公毅、「シアノバクテリアの呼吸によるプラストキノンプールの還元」、ラン藻ゲノム研究交流会, 東京大学駒場キャンパス, 2011/07/02
2. Sonoike, K., Ogawa, T., Harada, T. and Ozaki, H.、「Probing metabolic interactions in cyanobacterial cells by chlorophyll fluorescence measurements」、Binational Seminar Germany-Japan "Microalgal Products: From Metabolic Fundamentals to Promising Applications", Freiburg, Germany, 2011/10/31
3. Ogawa, T., Ogawa, T., Ikeuchi, M. and Sonoike, K.、「Effect of cyanobacterial NDH complex on the redox state of

plastoquinone pool」、Japanese-Finnish Seminar 2012 "Photosynthetic Research for Sustainable Energy Production", Naantali, Finland, 2012/09/10

4. 小川敬子、小川晃男、池内昌彦、原田哲行、園池公毅、「シアノバクテリアのNADH 脱水素酵素複合体がプラストキノンプールの酸化還元状態に与える影響」、日本植物学会第76回大会, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス, 2012/09/16
5. 小川敬子、園池公毅、「シアノバクテリアの *ndhF1* 遺伝子の破壊は光合成速度を見かけ上高くする」、第4回日本光合成学会年会およびシンポジウム, 名古屋大学, 2013/05/31
6. 小川敬子、園池公毅、「NDH 複合体の変異が光合成に与える影響」、ラン藻の分子生物学 2013, かずさアカデミアホール, 2013/11/22
7. 小川敬子、園池公毅、「クロロフィル蛍光測定によるシアノバクテリアの呼吸およびCO<sub>2</sub> 取込み能の解析」、日本植物生理学会第55回年会, 富山大学五福キャンパス, 2014/03/18
8. 青木彩夏、園池公毅、「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の代謝に薬剤添加が及ぼす影響の解析」、日本植物生理学会第55回年会, 富山大学五福キャンパス, 2014/03/18
9. 立川有佳、園池公毅、「シアノバクテリア *sll0381* 遺伝子の破壊は電子伝達下流の阻害を引き起こす」、第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム, 2014/05/31
10. 小川敬子、園池公毅、「シアノバクテリアの NPQ の光強度依存性を決める要因の解析」、第5回日本光合成学会年会および公開シンポジウム, 2014/05/31

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

データベース公開アドレス:

<http://www.photosynthesis.jp/fluorome/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

園池公毅 (SONOIKE Kintake)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授  
研究者番号: 30226716

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし