

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658077
 研究課題名（和文）生育必須遺伝子によるケミカルゲノミクス
 研究課題名（英文）Chemical genomics using yeast essential genes for identifying target molecules/pathways of bioactive compounds

研究代表者
 西村慎一（NISHIMURA SHINICHI）
 京都大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：30415260

研究成果の概要（和文）：

医薬品や研究ツールとして期待される化合物は多くあるが、それらの作用機序を明らかにすることは容易ではない。本研究では酵母をモデルに、生育必須遺伝子と化合物との化学遺伝学的相互作用を解析し、標的分子や標的経路の解明のための基盤技術の確立を目指した。2種の酵母を用いて検討したところ、複数の生物種における化合物・遺伝子間相互作用を比較することが化合物の標的経路の同定に有効であり、また、より汎用性の高いシステムの構築のためには遺伝子間ネットワーク情報の拡充が必須であると示唆された。

研究成果の概要（英文）：

There have been reported many natural and synthetic bioactive compounds. However, it is usually not easy to identify their target molecules and/or target pathways. To overcome this difficulty, we tried to construct a semi-genome wide screen system using yeast as a model system. We show that semi-genome wide system is effective for predicting the target pathway of a bioactive compound, while informatics analysis utilizing gene-gene network is indispensable for constructing a versatile prediction system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ケミカルゲノミクス、ケミカルジェネティクス、生育必須遺伝子

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物、あるいは動物が産生・含有する二次代謝産物が生物学において重要な研究ツールとなり、創薬シーズとなってきたことは、もはや疑う余地の無い事実である。それらは特定の分子へはたらきかけ、特徴的な作用を示す。ところがその標的分子・経路を

同定すること、そして化合物の有用性を評価することは、化合物とゲノム科学を組織的に融合するケミカルゲノミクス研究が盛んになってきた今日においても、容易ではない。一因として、膨大なゲノム情報に振り回されているという事実がある。

2. 研究の目的

ゲノムが解読され、遺伝学的手法が確立されている真核生物の代表的なモデル生物には酵母、線虫、ショウジョウバエなどがある。特に出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はいずれもコンパクトなゲノムを有しており、高等真核生物との間に多くの生命現象が保存されているため、ケミカルゲノミクスを行う上で優れたモデル生物である。これら二種の酵母においては、遺伝子強制発現系や遺伝子破壊株コレクションが整備されつつある。特にゲノム解読の早かった出芽酵母では、遺伝子破壊株コレクションを用いた大規模実験による化合物の作用機序解析系が多く報告されており、各種の変異株コレクションが整備されている。しかし、こういったアプローチは決して成熟しているとはいえない。多くの遺伝子の機能は依然として不明であるために直感的な情報は与えず、無機的な統計解析を行うための材料となっているに過ぎない。生理活性化合物は、生育に必須な遺伝子およびパスウェイに働きかけるはずであり、化合物の標的分子を同定するためにはすべての遺伝子をスクリーンの対象とする必要性はないはずである。また、重要なことに、生育必須遺伝子のほうがそれ以外に比べて、圧倒的に機能の報告が多い。

そこで本研究では、生理活性化合物の作用機序解析のために、前述の2種の酵母をモデルとして生育必須遺伝子にフォーカスしたケミカルゲノミクスの基盤構築を試みた。複数のモデル微生物を用いることで生物種間での化合物・遺伝子間相互作用の差異を検討し、効果的な作用機序推測システムの構築を目指した。

3. 研究の方法

出芽酵母については生育必須遺伝子の変異株コレクションを用いて生理活性化合物に対する感受性スクリーニングを行い、データ解析を行った。すなわち3'非翻訳領域にマーカー遺伝子カセットが組み込まれることで転写産物の不安定化が引き起こされ、発現レベルが低下している DAmP 変異株コレクションを用いて、化合物の感受性試験を行った。最初に化合物とその標的タンパク質をコードする変異株のペアを用いてスクリーニングに耐える培養と感受性試験の条件を検

討し、次に感受性スクリーニングを行った。得られた結果はGOなどのデータセットを用いて統計解析を行い化合物と相互作用がみられるパスウェイを同定し、これまでの知見と照らし合わせて解析した。

分裂酵母においては代表的な薬剤標的分子をコードする遺伝子について、機能低下変異株を作製し、対応する化合物に対する感受性試験を行った。変異株はプロモーター配列の置換や3'非翻訳領域への外来配列の挿入などにより作製した。

4. 研究成果

出芽酵母の生育必須遺伝子の DAmP 変異株を用いてセミ・ゲノムワイドなスクリーニングを行うために、まず、良く知られている化合物・標的遺伝子の組み合わせを用いて培養条件や化合物濃度、暴露時間などの条件の検討を行った。次に確立した実験系を用いて感受性スクリーニングを行ったところ、作用機序未知の化合物であっても複数の変異株が感受性の上昇を再現良く示し、効果的に標的経路を推測できる可能性が示唆された。例えば図1に示す化合物プロファイルは、約900の遺伝子変異株をスクリーニングし、約30の遺伝子が化合物に対して顕著な感受性の上昇を示したことを示す。これらの遺伝子情報

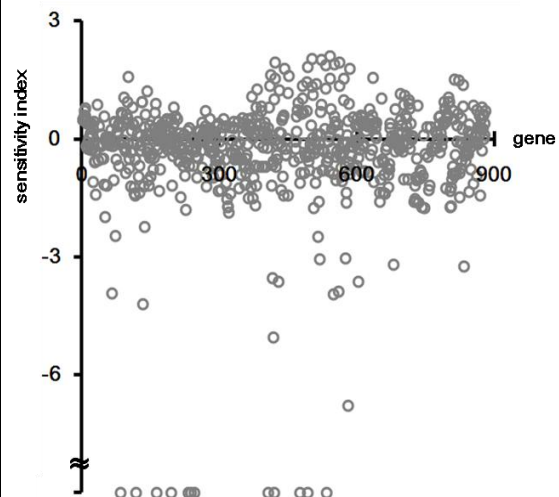


図1. 出芽酵母の生育必須遺伝子をスクリーニングした一例。x軸は遺伝子を示し、y軸は変異株の化合物に対する感受性を数値化したもので、数値が小さいほど感受性が上がることを示す。約900の遺伝子変異株をスクリーニングすることで変異により顕著な感受性の上昇を示す約30の遺伝子が同定された。

報をもとに、作用機序の推測が可能になると期待された。しかし単独の化合物プロファイルに対して G0 タームを用いた統計解析を適用しても必ずしも標的経路が推測できるとは限らないことが明らかとなった。これは包括的な遺伝子間ネットワークなどのオミックス情報を取り入れて化合物プロファイルを評価することの必要性を示唆している。

次に分裂酵母について、複数の生理活性化合物を用いて、対応する標的遺伝子の発現量低下変異株がどのような感受性変化を示すか検討した。変異株をプロモーター配列の置換と 3' 非翻訳領域への外来配列の挿入の二種の方法で作製したところ、脂質合成タンパク質や細胞骨格タンパク質をコードする遺伝子の 3' 非翻訳領域への外来配列の挿入変異株は、それぞれの機能阻害化合物に対して感受性が顕著に上昇した。出芽酵母においては本方法論が有効であることは知られていたが、分裂酵母における有効性は本研究で初めて示され、変異株コレクションが作製されれば貴重なツールとなることが期待される。しかし、試した全ての化合物・遺伝子ペアにおいて相互作用が認められたわけではなかった。このことから変異株コレクションを用いた感受性試験による化合物のプロファイル化が重要であることが示唆された。

最後に出芽酵母と分裂酵母の比較を試みた。すると同じ表現型を引き起こす化合物の場合でも化合物プロファイルは一致しないことが明らかとなった。例えば、生育に必須な機能であっても遺伝子が重複していれば必須遺伝子ではなく、そういった遺伝子は破壊しても該当する機能を阻害する化合物への感受性は上昇しない。図 1 で示す出芽酵母を用いて得られた化合物プロファイルには細胞極性を司る Cdc42 タンパク質の活性化因子が含まれている。しかし分裂酵母は Cdc42 の活性化因子を 2 つ持つため、それらをコードする遺伝子は生育必須遺伝子ではない。当該化合物は詳細な検討の結果、分裂酵母において Cdc42 の活性化を阻害することが示されたが、分裂酵母において Cdc42 の DAMP 変異株や shut off 変異株は感受性上昇を示さず、分裂酵母を用いたスクリーニングだけでは標的経路が推測できなかつた可能性がある。こういった問題点を克服するためには複数の生物種の結果を比較することが有効であ

ることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 5 件)

①杉山龍介、西村慎一、森夕希子、尾仲宏康、掛谷秀昭. 放線菌の複合培養によって得られる新規テトラヒドロキノリン誘導体に関する研究. 日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会. 2012 年 6 月 7 日, 京都市.

②西村慎一、掛谷秀昭. 生体膜を解析する化学遺伝学. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム-天然物化学の新しい潮流-. 2012 年 3 月 29 日. 札幌市.

③杉山龍介、西村慎一、森夕希子、尾仲宏康、掛谷秀昭. 放線菌が生産する新規テトラヒドロキノリン誘導体の単離・構造解析. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 30 日, 札幌市.

④Nishimura, S. Marine natural products targeting cellular membrane. 7th U.S.-Japan Seminar on Marine Natural Products: Cross-Disciplinary Expansions in Marine Bioorganic Chemistry. 2011, Dec. 14. Okinawa, Japan.

⑤越智純子、西村慎一、掛谷秀昭. 分裂酵母における細胞膜ステロールの局在制御の解析. 酵母遺伝学フォーラム・第 44 回研究報告会. 2011 年 9 月 5 日, 福岡市.

[図書] (計 1 件)

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. 49, 295-297, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

掛谷秀昭、西村慎一、杉山龍介、尾仲宏康. 「新規抗真菌剤」特願 2012-170361 号 (2012 年 7 月 31 日出願).

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 慎一 (NISHIMURA SHINICHI)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：30415260

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし