

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13086

研究課題名(和文) 海洋天然物が標的にする生体膜環境の組織的解析と再構築

研究課題名(英文) Analysis of cell membrane environments targeted by marine natural products

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性化合物の一次標的分子を同定することは、生命原理の理解においても創薬においても重要であり、タンパク質を対象にした方法論の進展が目覚ましい。しかし生体膜を標的にする場合、タンパク質にはない特殊な膜環境が化合物の標的的同定を困難にしている。生体膜では数百から数千の非常に多くの分子種が相互作用しており、同じ脂質分子種であっても環境によって挙動が異なるため、外来分子による認識が大きく変わる。本研究では分裂酵母の脂質生合成変異株を用い、膜脂質を標的にする化合物に対する感受性試験、脂質成分の分析を行った。そこから化合物がどのような脂質を標的にするのか、人工膜や合成脂質誘導体を用いて検証した。

研究成果の概要(英文)：Identification of the primary target of bioactive compounds is highly important, for understanding life at a molecular level and drug development. Many strategies for revealing protein targets of small molecules has been developed, while it is not easy to clarify how membrane-targeting molecules recognize membrane lipids. This is because a huge number of molecular species exist in the cell membrane, making specific environments that is favored/disfavored by small molecules. In this study, we tested drug sensitivity of fission yeast lipid mutants, analyzed lipids in these mutant cells, and examined how lipids are recognized by small molecules using artificial membranes and natural or synthetic lipid derivatives.

研究分野：天然物化学

キーワード：海洋天然物 生体膜 膜脂質 酵母変異株

1. 研究開始当初の背景

抗生物質にとって細胞膜は主要な標的の一つであり、現在、いくつかの化合物が感染症治療薬として用いられている。それらの作用機序を解明することは、より低濃度で作用し、副作用を低減した、さらに安全な医薬品の創出のために必須である。また、他の疾患の治療薬開発のためにも重要な知見である。ところが、脂質分子の挙動は多くの因子によって制御されているため、生体膜における化合物の作用解析は容易ではない。申請者らの経験例を挙げると、海洋放線菌が産生するヘロナミド類は飽和リン脂質を標的にする強力な抗真菌化合物であるが、この分子は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* において *erg2* や *erg31* *erg32*、*erg4* や *erg5* といったステロール生合成遺伝子を欠損する変異株に対する生育抑制効果が劇的に低下する (図 1、*J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 5209.)。あるいは、海綿が含有するセオネラミドは 3 β -ステロールを広く認識するが、この分子もエルゴステロール生合成遺伝子 *erg2* や *erg31* *erg32* の欠損株において細胞膜への結合が低下する半面、*in vitro* ではそれらの株が産生するステロールにはエルゴステロールと同程度に結合する (*Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 519.)。これらの化学遺伝学的相互作用は一見矛盾しているが、その分子基盤を明らかにす

ることで、生体膜環境における脂質分子と抗生物質との相互作用様式の理解に繋がると期待される。

2. 研究の目的

生理活性化合物の一次標的分子を同定することは、生命原理の理解においても創薬においても必須な過程であり、特にタンパク質を対象にした方法論の進展が目覚ましい。しかし生体膜を標的にする場合、タンパク質にはない特殊な膜環境が化合物の標的の同定を困難にしている。すなわち、数百から数千の非常に多くの分子種が相互作用することで脂質膜の物性が制御されており、同じ脂質分子種であっても環境によって挙動が異なるため、外来分子による認識の程度が大きく変わる。本研究では酵母遺伝子変異株が示す一見矛盾した薬剤感受性パターンを、脂質成分の解析と人工膜をもちいた相互作用解析により、抗生物質が標的にする生体膜環境の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、分裂酵母 *S. pombe* のエルゴステロールやスフィンゴ脂質などの脂質の生合成関連遺伝子の変異株を用いて、薬剤感受性プロファイルを作成し、脂質組成の比較解析を行った。得られた情報に基づき人工膜を用いて抗生物質が標的にする膜環境を解析・考察した。

4. 研究成果

薬剤感受性のプロファイル化

分裂酵母 *S. pombe* のステロールとスフィンゴ脂質の生合成と代謝に関連する遺伝子破壊株を用いて、膜脂質を標的にする化合物に対する薬剤感受性の測定を行った。ステロール生合成では図 1A にある *erg2*、*erg31* *erg32* (二重破壊)、*erg4*、*erg5* 遺伝子の破壊株、スフィンゴ脂質生合成では水酸化酵素 *sur2* の遺伝子破壊株やホスホリパーゼ C である *css1* の変異株である。化合物はステロールを標的にする化合物やスフィンゴ脂質を標的にすると報告のある化合物、および細胞膜以外の標的分子をもつ化合物である。

まずステロールを標的にする化合物に関して、ほとんどのものはエルゴステロール生合成遺伝子破壊株に活性が低下し、いくつかのものはスフィンゴ脂質生合成遺伝子破壊株にも活性低下が見られた。これは細胞膜スフィンゴ脂質の変化によりステロールの量や膜秩序が変化したものと予想される。一方でサポニン、ステロールを標的にするとされているにもかかわらず、いずれの膜脂質変異株も耐性化を示さなかった。また、シアノバクテリア由来のポリケチド化合物 AA も細胞膜を標的とする細胞形態に対する影響が見られていたにもかかわらず、いずれの脂質

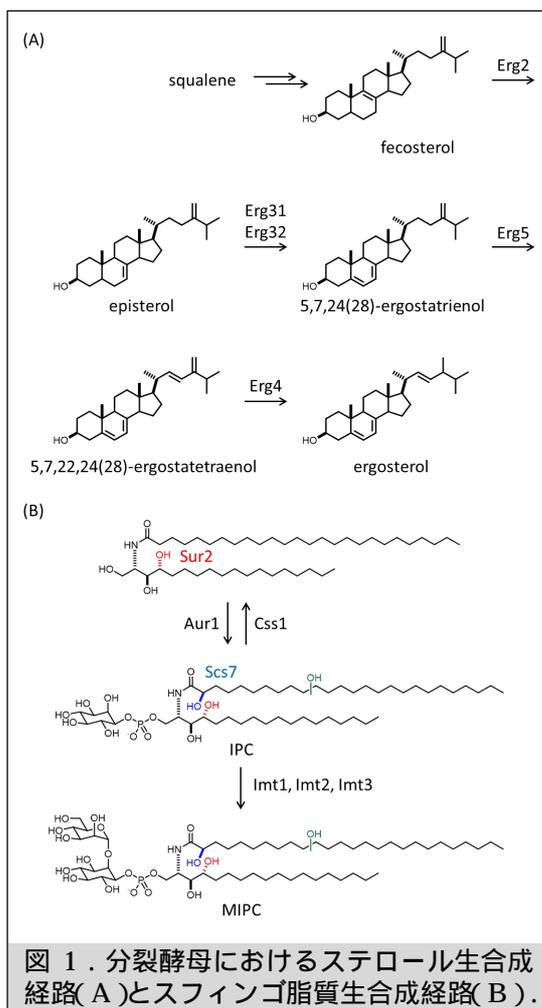


図 1. 分裂酵母におけるステロール生合成経路 (A) とスフィンゴ脂質生合成経路 (B).

変異株にも感受性低下は見られなかった。

細胞内に標的分子を有する化合物は一般に脂質生合成遺伝子破壊株に対して感受性が上がることが知られているが、本研究ではいくつかの化合物においては生育抑制効果が低下することが明らかになった。すなわち脂質生合成阻害剤や DNA を標的にする化合物の感受性が脂質生合成遺伝子破壊により低下するなど、興味深い相互作用がみられた。

膜脂質の成分解析

出芽酵母のステロール生合成変異株が含有するステロールの種類はよく調べられているが、分裂酵母についての報告例は限られている(Iwaki, T. *et al. Microbiology* **2008**, 154, 830.)。ステロールの生合成変異株から抽出したステロールを LCMS により分析すると、出芽酵母の組成とはマイナーではあるが異なることが明らかになった。例えば *erg2* 遺伝子の破壊株についてステロールを精製し NMR で構造を解析すると、出芽酵母ではみられない ergosta-8,22-dienol が含まれていた。これは側鎖の酸化酵素 (Erg4 と Erg5) の触媒活性の差を示唆している。

本研究ではさらにステロールの代謝物であるステロールエステルも抽出・分析した。すると LCMS では一つのメジャーな分子種が検出された。それについては UV 吸収と分子量から構造が予想された。そこで化学合成により予想された分子を取得し、LCMS の溶出時間を比較したところ、細胞由来の成分と一致した。このことから分裂酵母の主なステロールエステルの同定に至った。スフィンゴ脂質についても検討の必要があるが、現時点では検出系の構築には至らず、分子種の特定は今後の課題である。細胞からの抽出、検出方法が確立されれば、各種の遺伝子破壊株を用いることで水酸化の有無などの細かい構造の差異も明らかになることが期待できる。

化合物・脂質膜相互作用の解析

棘皮動物由来のサポニンとシアノバクテリア由来のポリケチド化合物はステロールを標的とすると考えられたが、分裂酵母の脂質変異株に対する感受性が低下することはなかった。これはエルゴステロールを標的にするポリエン系抗真菌化合物とは異なる傾向であった。そこでそれらについて人工脂質二重膜を用いてステロールとの相互作用様式の解析を行った。

棘皮動物由来のサポニンに限らずサポニンは一般にステロールを認識する。そこで植物由来のサポニンも合わせて 3 種の化合物を解析した。サポニンによる脂質膜認識機構を明らかにするため、天然型に加えて各種のステロール合成誘導体を用いて親和性試験を行った。手法は、溶結活性を指標にしたカウンターアッセイである。サポニンは低濃度で

溶結活性を引き起こすが、その活性は遊離のコレステロールやコレステロールを含有させたりリポソムによって阻害される。この試験を種々の酵母変異株に由来するステロールや合成ステロールアナログについて試験した。するとステロール構造を大きく改変した場合にもサポニンによる溶血活性は阻害された(図 2、ステロール誘導体)。興味深いことに遊離のステロールであればコレステロールと合成ステロールアナログは同程度の溶結活性阻害を示したが、リポソムに組み込むとコレステロールの方が 10 倍ほど低い濃度で効果を示した。また、水酸基が α 位を向くエピマーは遊離でもリポソムに組み込んだ時にも溶血活性の阻害を全く示さなかった。これらの結果はステロールの膜中での配向がサポニンによるステロールの認識に影響を与えており、生体膜においてはスフィンゴ脂質やたんぱく質の共存によるステロールの配向も薬剤感受性に影響を与える可能性を示唆している。

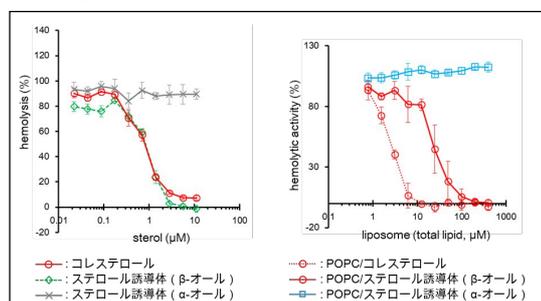


図 2. サポニンとステロールとの相互作用解析。遊離のステロール(左)及びステロールを組み込んだリポソム(右)の存在下、サポニンの溶結活性を測定した。コレステロールは遊離でもリポソムに組み込んでサポニンの溶結活性を阻害した。合成したステロール誘導体は水酸基が β 位を向いている場合と α 位を向いている場合とで大きく異なる結果を示した。

次にシアノバクテリア由来のポリケチド化合物 AA について解析した。フロリダ大学の共同研究者から供与された本化合物は予備的な試験からステロールに結合する可能性が示唆されていた。そこでステロールの有無で脂質膜への親和性の変化を表面プラズモン共鳴により解析した(図 3)。すると確かに、POPC のみで作製したリポソムよりもステロールを含有させた場合の方が結合量は高く、速度論解析からは乖離定数が数十倍から数百倍低下することが明らかになった。これは真菌が含有するエルゴステロールだけでなくヒトのコレステロールでも同様の結果であった。ところが 3 位水酸基の異性体にも強く結合する様子が見られ、化合物 AA はステロールの炭化水素骨格を認識する可能性が示唆された。申請者の知る限り、ステロールを認識する化合物は 3 位水酸基の立体

化学を厳密に認識する。本化合物がどのようにステロールのリジッドな炭化水素骨格を認識しているのか、その原子レベルでの機構に興味を持たれる。

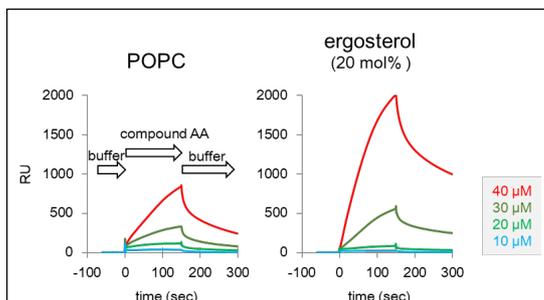


図 3. ポリケチド化合物 AA と脂質二重膜との相互作用解析. POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) を用いた場合 (左) とそこにエルゴステロールを 20 モル%添加した場合とでは結合量も速度も異なることが明らか

以上、本研究では分裂酵母の脂質生合成変異株を用い、膜脂質を標的にする化合物に対する感受性試験、脂質成分の分析を行った。そこから化合物がどのような脂質を標的にするのか、人工膜や合成脂質誘導体を用いて検証し、サポニンやポリケチド化合物の脂質認識様式についての知見を得た。今後、スフィンゴ脂質の成分情報を取得することで、より生体膜を模した人工膜を作製し、化合物の生体膜中での脂質認識機構を明らかにできると期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

西村慎一、伊藤愛理、高橋伸明、掛谷秀昭、「サポニンとステロールの分子間相互作用における炭化水素平面と水酸基の重要性」日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会 (2017) .

西村慎一、徳倉将人、掛谷秀昭、松永茂樹、大隅正子、生瀬義久、Vanessa S. D. Carvalho、Juan C. G. Cortés、Juan. C. Ribas 「ステロールを標的にする抗真菌化合物セオネラミドによる細胞壁異常」酵母遺伝学フォーラム 第 50 回研究報告会 (2017) .

生田実沙、伊藤愛理、西村慎一、掛谷秀昭「スフィンゴ脂質の機能解明を目指した化学遺伝学的解析：エキノマイシン類の取得とその表現型」酵母遺伝学フォーラム 第 50 回研究報告会 (2017) .

西村慎一「放線菌のクリプティック代謝物 5aTHQ による凝集体形成と脂質関連活性」京都大学 生理化学研究ユニット 第 7 回シンポジウム (2017) .

Shinichi Nishimura, Ryosuke Sugiyama, Takahiro Nakatani, Taro Ozaki, Shumpei

Asamizu, Hiroyasu Onaka, Hideaki Kakeya. 'Aggregate formation and lipid-related activity of 5aTHQs, cryptic actinomycete metabolites.' 日本化学会年会 Asian International Symposium -Medicinal Chemistry- (2018).

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/sc-molsci/>

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/Lab_Microbiology/

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