

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06717

研究課題名(和文) 生体膜脂質の機能攪乱を引き起こす天然物の探索と作用機序解析

研究課題名(英文) Identification of new natural products targeting cell membrane and analyses of their modes of action.

研究代表者

西村 慎一 (Nishimura, Shinichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・講師

研究者番号：30415260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜に作用する生理活性物質を天然資源より探索し、取得した4つの化合物群についてそのユニークな化学構造や生物活性、作用メカニズムの解明研究を推進した。すなわち放線菌が他種細菌との複合培養により産生する5aTHQ類が凝集体を形成して脂質膜に結合することを明らかにし、シアノバクテリア由来のamantelide Aはステロールを含有する脂質膜を新しいメカニズムで認識することを見出した。また新しい抗真菌化合物amphiolを見出し、抗真菌活性を示す特殊脂肪酸については特徴的な細胞形態変化を解析することでユニークな作用メカニズムの可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体膜を構成する膜脂質はゲノムに直接コードされておらず解析手法に限りがあることから、その機能の理解は遅れています。一方で膜脂質は感染症治療薬の標的であり、新しい膜脂質標的型の化合物が求められています。本研究では膜脂質に作用して抗真菌活性を示す新しい生理活性化合物を取得し、それらのユニークな表現型と作用メカニズムの一端を解明しました。取得した化合物を用いた膜脂質の機能理解と抗真菌剤開発への貢献が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Compounds that target the cell membrane with unique modes of action were explored from natural sources. First, 5aTHQs, actinomycete metabolites, were revealed to form aggregates and bind to lipid membranes. Notably, their membrane binding and anti-yeast activities were enhanced when congeners were mixed. This seems to explain why congeners of natural products are produced. Next, amantelide A, a marine cyanobacterial metabolite, was found to bind to lipid membranes containing sterols. Its molecular mechanism for the sterol recognition seems to be novel. Third, amphiol, an antifungal fungal pigment, was discovered. This compound may target fungal cell membrane although a precise analysis remains to be done. In addition to these findings, unique bioactivities of unusual fatty acids were investigated to suggest a highly specific molecular target for these molecules.

研究分野：天然物化学

キーワード：生理活性化合物 天然物 生体膜 膜脂質

1. 研究開始当初の背景

天然有機化合物(天然物)は医薬や農薬、研究ツールの重要なリソースであることから盛んに探索研究が行われ、現在知られている化合物数は **50 万**ともいわれる。近年では生理活性化合物の標的タンパク質を同定する様々な手法が開発されており、作用機序解析も盛んにおこなわれている。ところが、生体膜は重要な創薬標的であるにもかかわらず、そこを作用点とする天然物の研究例は限られている。ほとんどの研究手法は標的タンパク質の同定のためにデザインされているため脂質標的型天然物は見過ごされ、一方で、化合物・生体膜間相互作用の解析方法も限られていることが一因と考えられる。生体膜への親和性を指標に天然物を探索することで、ユニークな化学構造と脂質認識能を有する天然物の取得が期待された。

2. 研究の目的

本研究は生体膜に作用して抗真菌活性を示す化合物を天然資源から取得し、それらの作用発現メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

分裂酵母をモデルとして用い、微生物や海洋生物の培養液抽出物、そこから単離された化合物を対象にスクリーニングを行った。分裂酵母のエルゴステロール生合成遺伝子の欠損株は膜脂質を標的にする化合物に対して耐性を示すことが経験的に知られていることから、野生株と変異株に対してスクリー

ングサンプルが示す抗酵母活性を測定し、変異株に対して効果の低いサンプルをヒットとした。得られた化合物は表面プラズモン共鳴 (SPR) や溶血活性を測定することで化合物と膜脂質の相互作用を解析

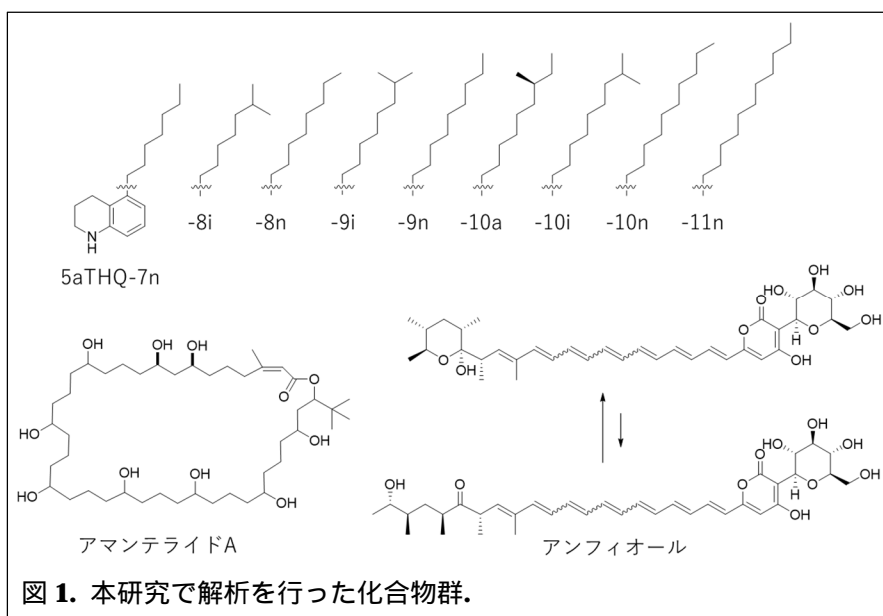


図 1. 本研究で解析を行った化合物群.

した。本研究では **4 種**の天然物を研究対象とした(図 1)。まず放線菌 *Streptomyces nigrescens* HEK616 がミコール酸含有細菌 *Tsakumurella pulmonis* TP-B0596 との複合培養によりはじめて産生する **5aTHQ** 類、次に海洋のシアノバクテリア由来の細胞毒性・抗微生物物質アマンテライド A、そして糸状菌 *Pseudogymnoascus* sp. PF1464 から単離したアンフィオールである。また、海洋放線菌より得られた特殊脂肪酸についても作用解析を行った。

4. 研究成果

(1) クリプティック天然物 5aTHQ の作用機序解析

5aTHQ 類は放線菌 *Streptomyces nigrescens* HEK616 とミコール酸含有細菌 *Tsakumurella pulmonis* TP-B0596 の複合培養によりはじめて産生される化合物群であり、分裂酵母の野生株には生育抑制を示すがエルゴステロール生合成遺伝子の欠損株には効果が顕著に低下する分子

として取得してきたものである¹。5aTHQにはアルキル鎖の構造が異なる9種の類縁化合物が存在し(図1)興味深いことに、アルキル鎖のわずかな構造の違いにより生物活性の強弱と選択性が大幅に異なる。特にアルキル鎖としてノニル基を有する5aTHQ-9nはエルゴステロール生合成遺伝子欠損株が顕著な耐性を示すことから、本化合物は脂質膜を標的にすると予想し、SPR装置を用いて脂質膜との相互作用を解析した。すると期待通り5aTHQ-9nはホスファチジルコリンを用いて作製したリポソームに結合した(図2a)。このときエルゴステロールの有無では5aTHQ-9nの膜結合能は変化せず、アシル側鎖を変化させても変化しなかった。これは本化合物が特定の脂質ドメインを認識しない可能性を示唆している。次に5aTHQ-9nの濃度依存性を検討したところ、低い濃度では結合せず、一定濃度以上で濃度依存性な脂質

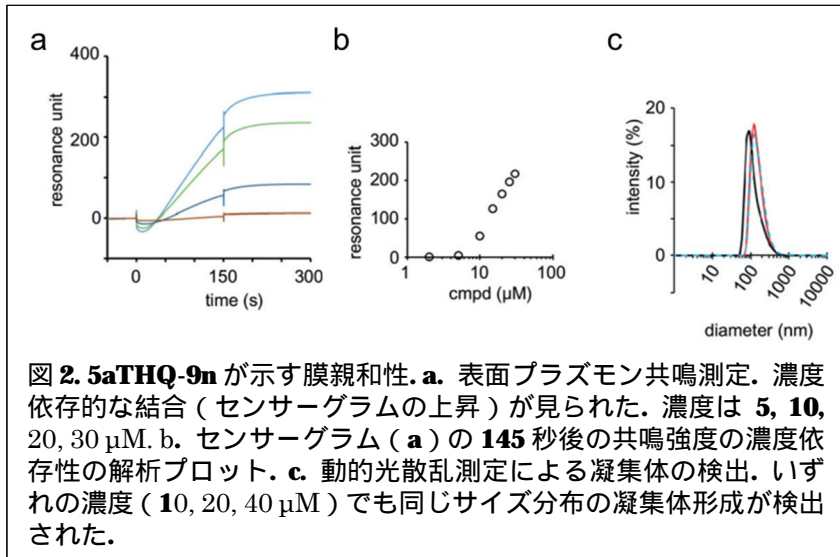


図2. 5aTHQ-9nが示す膜親和性. a. 表面プラズモン共鳴測定. 濃度依存性な結合(センサーグラムの上昇)が見られた. 濃度は5, 10, 20, 30 μM. b. センサーグラム(a)の145秒後の共鳴強度の濃度依存性の解析プロット. c. 動的光散乱測定による凝集体の検出. いずれの濃度(10, 20, 40 μM)でも同じサイズ分布の凝集体形成が検出された.

膜への結合が観察された(図2a,b)。このことは5aTHQ-9nがミセルのような凝集体を形成している可能性を示唆しており、実際、動的光散乱測定により直径50から数百nmの凝集体形成が確認された(図2c)。以上の結果から、5aTHQ-9nは凝集体を形成して脂質膜に結合する、という作用モデルが導かれた(図3)。次に他の5aTHQ類縁体について調べたところ、アルキル鎖が短いもの(5aTHQ-7n, -8n)では高濃度で凝集体を形成して脂質膜に結合すること、アルキル鎖が長いもの(5aTHQ-10n, -11n)は低濃度で凝集体を形成するが凝集体が安定すぎるせいか脂質膜への結合は検出されなかった(図3)。

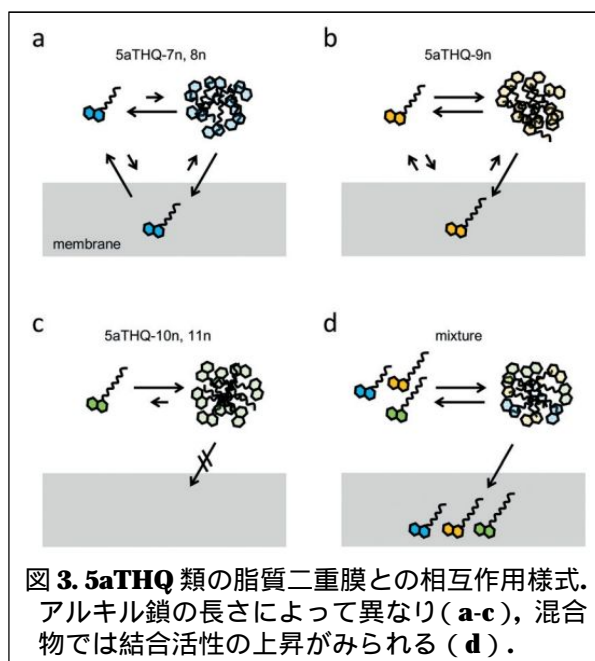


図3. 5aTHQ類の脂質二重膜との相互作用様式. アルキル鎖の長さによって異なり(a-c), 混合物では結合活性の上昇がみられる(d)。

興味深いことに、短鎖型の5aTHQ-7nと長鎖型の5aTHQ-10nを1:1で混合した時、5aTHQ-7nと同程度に生物活性を発現することが明らかとなり、このとき、脂質膜への結合も上昇していた。すなわち純品では不活性な5aTHQ-10nが存在することで、純品で活性を示す5aTHQ-7nは半分の量で、5aTHQ-7nと同等の抗酵母活性を示したのである。これは天然物が純品で産生されることの合理的な理由となりうる(図3d)。

5aTHQ類の抗酵母活性の分子メカニズムは未解明であるが、本化合物の蛍光標識体を用いて検証したところ、5aTHQは脂肪

滴に局在することが明らかとなった。重要なことに、脂肪滴を合成しない変異株は5aTHQに対する耐性を示すことから、5aTHQの生物活性発現には脂肪滴が必要である可能性が示唆された²。脂肪滴は今後、抗真菌化合物のあたらしい標的部位となるかもしれない。

(2) 海洋シアノバクテリア由来の細胞毒性・抗微生物活性物質アマンテライド A

アマンテライド A は米国・フロリダ大の **Luesch** 博士らによって見出されたポリオール化合物である³。本化合物は動物培養細胞、バクテリア、真菌など広い生物種に増殖阻害活性を示す。細胞形態を観察したところ細胞膜を標的にしている可能性が示唆され、本研究ではその膜親和性を評価した。上述の **5aTHQ** 類と同様に **SPR** を用いて検討したところ、本化合物はホスファチジルコリンで作製した脂質膜に結合し、その結合はステロールの含有によって上昇することが明らかとなった。しかし他のステロール結合化合物とは異なる傾向が見出された。すなわち、一般に、ステロールを認識する化合物は 3 位水酸基の立体構造を厳密に認識するため 3 位水酸基の立体化学が反転したエピコレステロールには結合しないが、アマンテライドの膜親和性はコレステロールやエルゴステロールだけでなく、エピコレステロールによっても上昇した。認識機構は未解明であるが、既存のステロール化合物とは異なるステロール認識機構があると考えられる。なお、アマンテライド A の 33 位水酸基がアセチル化されたアマンテライド B は生物活性も膜親和性もほぼ完ぺきに喪失することから、アマンテライド A による厳密なステロール認識機構の存在が期待できる⁴。

(3) 糸状菌が産生する抗真菌化合物アンフィオール

1900 余りの糸状菌培養液抽出物を対象に生体膜標的型の抗真菌化合物を探索し、***Pseudogymnoascus sp. PF1464*** が産生するオレンジ赤色の色素を単離した。本化合物は平衡状態で存在し、**NMR** により解析したところケト・アセタールの平衡が存在することが明らかとなった。各種 **NMR** スペクトルの解析により平面構造を決定し、立体化学は化学分解・修飾を経たスペクトル解析や **CG-MS** 解析により決定した。本化合物はバクテリアには生育阻害活性を示さず、病原性真菌である ***Candida albicans*** や ***Aspergillus fumigatus*** に対して低濃度で生育阻害活性を示した。分裂酵母においても顕著な生育阻害活性を示し、エルゴステロール生合成遺伝子の欠損株に対する生育阻害活性が低下することから生体膜を標的にしている可能性が高いと考えられるが、その分子メカニズムの解明は今後の課題である⁵。

(4) 海洋放線菌より得られた特殊脂肪酸

海洋由来の放線菌培養液抽出物からスクリーニングを行うことで得られていた特殊脂肪酸について、その作用機序解析を進めた。本化合物は野生株の分裂酵母に対して増殖抑制活性を示すがエルゴステロール生合成遺伝子の欠損株に対してはまったく活性を示さず、膜脂質を標的にしている可能性が示唆されていた。化合物による細胞形態の変化を観察したところ、隔壁形成や染色体分配に異常が見られ、細胞膜エルゴステロールの極性が低下していることが分かった。さらに核膜の形態も異常を生じていた。ケミカルゲノミクス解析を行うと、細胞分裂に關与する因子の欠損株が特殊脂肪酸に耐性を示すことが明らかとなり、細胞分裂異常が特殊脂肪酸による増殖抑制の原因であることが示唆された。詳細な分子機構の解明は今後の課題であり、リポドミクス解析などと融合することで包括的に解析を進める予定である。

引用文献

1. Sugiyama, R. *et al.* 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Org. Lett.* **17**, 1918-1921 (2015).
2. Sugiyama, R. *et al.* Chemical Interactions of Cryptic Actinomycete Metabolite 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines through Aggregate Formation. *Angew. Chem. Int.*

Ed. 58, 13486-13491 (2019).

- 3. Salvador-Reyes, L.A., Sneed, J., Paul, V.J. & Luesch, H. Amantelides A and B, Polyhydroxylated Macrolides with Differential Broad-Spectrum Cytotoxicity from a Guamanian Marine Cyanobacterium. *J. Nat. Prod.* **78**, 1957-1962 (2015).**
- 4. Elsadek, L.A. *et al.* Genomic and targeted approaches unveil the cell membrane as a major target of the antifungal cytotoxin amantelide A *ChemBiochem* **22**, 1790-1799. (2021).**
- 5. Fujita, K. *et al.* Amphiol, an Antifungal Fungal Pigment from *Pseudogymnoascus* sp. PF1464. *J. Nat. Prod.* **84**, 986–992 (2021).**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

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 Fujita Kohei, Ikuta Misa, Nishimura Shinichi, Sugiyama Ryosuke, Yoshimura Aya, Kakeya Hideaki	4. 巻 84
2. 論文標題 Amphiol, an Antifungal Fungal Pigment from Pseudogymnoascus sp. PF1464	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 986-992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c01010	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 Nishimura, S. & Matsumori, N.	4. 巻 37
2. 論文標題 Chemical diversity and mode of action of natural products targeting lipids in the eukaryotic cell membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Prod. Rep.	6. 最初と最後の頁 677-702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NP00059C	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 Yoshimura, A., Nishimura, S.*, Suzuki, T., Hattori, A., Dohmae, N., Kato, T. & Kakeya, H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Isolation, Structure Elucidation, and Conformational Regulation of Myropeptins, Lipopeptides from the Fungus Myrothecium roridum.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Lett.	6. 最初と最後の頁 7524-7528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b02801	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 Sugiyama, R., Nakatani, T., Nishimura, S., Takenaka, K., Ozaki, T., Asamizu, S., Onaka, H. & Kakeya, H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Chemical Interactions of Cryptic Actinomycete Metabolite 5 Alkyl 1,2,3,4 tetrahydroquinolines through Aggregate Formation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 13486-13491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201905970	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 西村慎一, 掛谷秀昭 & 松森信明.	4. 巻 56
2. 論文標題 生体膜を標的にする天然有機化合物 -天然物による厳密な脂質認識とそれに基づく表現型-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 678-685.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 西村慎一	4. 巻 29
2. 論文標題 ビーチまで徒歩10秒. スクリプス海洋研究所で天然物化学を考える.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MEDCHEM NEWS	6. 最初と最後の頁 8-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shinichi Nishimura, Ryosuke Sugiyama, Takahiro Nakatani, Kei Takenaka, Taro Ozaki, Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka, & Hideaki Kakeya.
2. 発表標題 Chemical Interactions of Actinomycete Metabolite 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines through Aggregate Formation.
3. 学会等名 Gordon Research Conference -Marine Natural Products- (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村慎一
2. 発表標題 微生物二次代謝物のインタープレイ
3. 学会等名 新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第4回若手シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村慎一, 菅長昭文, 松山晃久, 吉田稔, 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. Cortes, Juan. C. Ribas.
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 総合画像研究支援 (IIRS) 創立十五周年記念シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichi Nishimura, Akifumi Suganaga, Akihisa Matsuyama & Minoru Yoshida.
2. 発表標題 Comprehensive analysis of the mechanism of action of theonellamides, marine-derived antifungals, based on fission yeast ORFeome.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference, Chemical Biology & Drug Discovery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村慎一.
2. 発表標題 海洋天然物セオネラミドを用いた生体膜脂質の機能解析.
3. 学会等名 第7回 バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichi NISHIMURA, Akifumi SUGANAGA, Akihisa MATSUYAMA & Minoru YOSHIDA.
2. 発表標題 Chemical genetic analysis of sterol-regulated proteins using fission yeast ORFeome.
3. 学会等名 10th International Fission Yeast Meeting Pombe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村慎一、菅長昭文、松山晃久、吉田稔.
2. 発表標題 ステロールの機能変調により局在変化を受ける分裂酵母タンパク質の網羅的探索.
3. 学会等名 第60回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅長昭文、西村慎一、松山晃久、吉田稔.
2. 発表標題 分裂酵母ORFeomeを利用した海洋天然物セオネラミドの作用機序研究.
3. 学会等名 第19回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星川陽次郎、西村慎一、Sheena Li、八代田陽子、Charles Boone、吉田稔.
2. 発表標題 特殊脂肪酸とそのモノアシルグリセロール体が示す抗真菌活性の作用機序の解明.
3. 学会等名 第19回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村慎一、杉山龍介、仲谷崇宏、尾崎太郎、浅水俊平、尾仲宏康、掛谷秀昭.
2. 発表標題 微生物の複合培養で得られる5aTHQの膜親和性と生物活性.
3. 学会等名 第60回 天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村慎一
2. 発表標題 真菌膜脂質の機能攪乱分子を用いたケミカルバイオロジー：於京都 -> サンディエゴ -> 東京
3. 学会等名 第29回 新薬創製談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村慎一
2. 発表標題 分裂酵母をもちいた生体膜標的型分子の探索と機能解析
3. 学会等名 第194回 酵母細胞研究会例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村慎一
2. 発表標題 放線菌代謝産物5aTHQが示す膜親和性
3. 学会等名 第9回発酵学フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村慎一
2. 発表標題 海洋天然物セオネラミドによるステロールの可視化と機能変調
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（招待講演）
4. 発表年 2019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			
米国	フロリダ大学			