

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24年 6月 4日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580108

研究課題名（和文） カルシウムシグナルの遺伝子変異酵母に作用する新規生物活性物質の分子標的の研究

研究課題名（英文） Studies on molecular targets of new biological compounds having activity against the mutant yeast involving calcium signaling

研究代表者 木村 賢一（KIMURA KEN-ICHI）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30344625

研究成果の概要（和文）：新規物質benzophomopsin Aは、1.25 μ g/discで遺伝子変異酵母に対し作用したが、カルシニューリンを100 μ Mで阻害しなかった。9-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanateは、GSK-3 β をATP拮抗的に $K_i = 10.5 \mu$ Mで阻害し、一方falcarindiolは、ATP非拮抗型（ $K_i = 86.9 \mu$ M）でペプチド基質拮抗型（ $K_i = 46.5 \mu$ M）であった。Pisiferdiolは、酵母に対してカルシニューリンの発現を抑制した。

研究成果の概要（英文）：A new compound, benzophomopsin restored the growth activity of the yeast mutant strain (*zds1 Δ erg3 Δ pdr1/3 Δ*) at 1.25 μ g/disc and has no inhibition activity against calcineurin at 100 μ M. 9-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate inhibited GSK-3 β with ATP competitive manner on $K_i = 10.5 \mu$ M and falcarindiol inhibited GSK-3 β with ATP non-competitive manner on $K_i = 86.9 \mu$ M and the peptide substrate competitive manner on $K_i = 46.5 \mu$ M. Pisiferdiol decreased the expression of calcineurin in the mutant yeast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：*Saccharomyces cerevisiae* (*zds1 Δ erg3 Δ pdr1/3 Δ*), Ca²⁺-signaling, benzophomopsin A, 9-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate, falcarindiol, pisiferdiol, GSK-3 β , calcineurin

1. 研究開始当初の背景

受精、免疫、神経系など種々の重要な細胞機能の調節に関わる新たなCa²⁺シグナル伝達阻害剤を、Ca²⁺感受性かつ薬剤超感受性の遺伝子変異酵母 (*zds1 Δ erg3 Δ pdr1/3 Δ*) が、そのCa²⁺シグナル伝達に関わるいずれかの分子標的が阻害された結果示す特徴的な生育円

という表現型を用い、微生物の単離化合物に求めた。本研究では、構造の異なる新規物質の分子標的の解析を、合成致死の性質を有する遺伝子破壊酵母や野生型酵母の特徴的な生理的性質に加え、結合タンパク質の手法を用いることで明らかにすることを目的とし、その解析の結果、有効な可能性のある病態が明

らかとなり、将来的には医薬品などとして国民の健康に寄与することを考えている。

2. 研究の目的

Ca²⁺感受性かつ薬剤超感受性の遺伝子変異酵母 (*zds1Δ erg3Δ pdr1/3Δ*) に対して生育円活性を示した各種天然有機化合物の分子標的を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

酵母の Ca²⁺シグナル伝達に関わり、ヒトの病気とも関わる標的分子は、①Ca²⁺チャネル (高血圧・狭心症)、②カルシニューリン (免疫抑制、アレルギー)、③MAP キナーゼや PKC がん)、④GSK-3β (アルツハイマー病、2型糖尿病) などが知られている (Y. Ogasawara, *et al.*, *J. Antibiotics*, 61, 496-502 (2008)、図 1)。これらのいずれかを阻害する物質は遺伝子変異酵母の細胞周期を動かさず、即ち酵母が生育できて生育円を示すことから、①～④の標的分子を中心に研究を進めた。

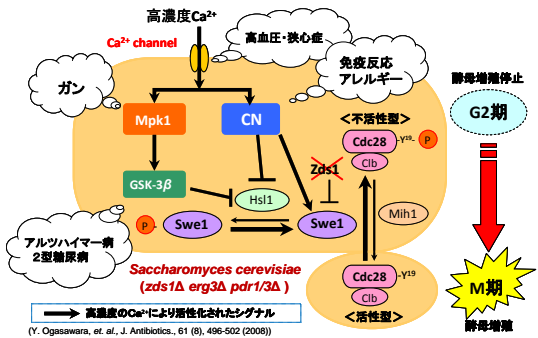


図 1. 酵母の Ca²⁺シグナル伝達と疾病との関係

(1) 活性物質の *cnb1Δ* と *mpk1Δ* への致死効果試験

図 1. に示すように、カルシニューリン経路と MAP キナーゼ経路はパラレルに作用するため、そのいずれの経路に作用しているか調べるため、合成致死の関係にある遺伝子破壊酵母 *cnb1Δ* 株と *mpk1Δ* 株に対する物質の致死効果を調べる (T. Nakamura, *et al.*, *Mol Gen Genet* 251, 211-219 (1996))。

- ① *cnb1Δ* > *mpk1Δ* : MAP キナーゼ経路に作用
- ② *cnb1Δ* < *mpk1Δ* : カルシニューリン経路に作用
- ③ *cnb1Δ* = *mpk1Δ* : 両方に作用、あるいはその上流か下流に作用

(2) 活性物質の野生酵母に対する塩化リチウム感受性試験

カルシニューリンは塩ストレス応答に関わっており、カルシニューリン阻害剤は、塩化リチウム添加培地の野生酵母に対し致死活性を有する。そこで、活性物質がカルシニューリンを阻害するか検討をつける (T.

Nakamura, *et al.*, *EMBO. J.*, 12, 4063-4071. (1993))。

(3) カルシニューリン反応

市販のカルシニューリン測定キットの酵素量と基質量を減らして反応時間を長くした、図 2 の反応系 (Y. Ogasawara, *et al.*, *J. Antibiotics*, 61, 496-502 (2008)) で測定した。

63 μl	H ₂ O
25 μl	Calmodulin (終濃度 0.0625 μM)
5 μl	Calcineurin (20 unit)
2 μl	Test sample (control ; MeOH)
5 μl	R II phosphopeptide (終濃度 37.5 μM)

最終容量 100 μl
↓ 37°C、360 min
100 μl BIOMOLGREENTM Reagent
↓ 30 min 発色
吸光度測定 (A₆₅₀)

図 2. カルシニューリンの反応系

(4) GSK-3β 反応

市販のヒト GSK-3β とペプチド基質を用い、図 3 に示す反応系で GSK-3β 反応を測定した (J. Yoshida *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 136-139 (2011))。

10.0 μl	(5×)	Reaction buffer	10.0 μl	(5×)	Reaction buffer
8.0 μl		H ₂ O	8.0 μl		H ₂ O
5.0 μl	200 μM	PGS2	5.0 μl	(1×)	Reaction buffer
5.0 μl	0.0044 unit	GSK3β	5.0 μl		Solution buffer
2.0 μl		Sample	2.0 μl		Sample

↓ プレインキュベーション 30°C、5 min
20.0 μl 12.5 μM ATP、25 mM MgCl₂ 混合溶液

計 50 μl
↓ インキュベーション 30°C、180 min
↓ + Kinase-Glo Reagent (50 μl/well)
↓ 25°C、10 min
↓ 相対化学発光量 (RLU) を測定

阻害活性 (%)

$$= ((RLU②_{サンプル} - RLU①_{サンプル}) / (RLU②_{コントロール} - RLU①_{コントロール})) \times 100$$

$$\text{酵素反応速度 } v \text{ (nmol/min/mg)} = (RLU② - RLU①) / 180 / 0.025$$

図 3. GSK-3β の反応系

(5) ウェスタンブロット

酵母内のタンパク質発現の状態をウェスタンブロット法にて測定した(N. Aburai, *et al.*, *Phytomedicine*, 17, 782-788 (2010)).

4. 研究成果

(1) Benzophomopsin A

①単離精製と構造決定

研究分担者の塩野が、植物寄生糸状菌から既知物質の xyrainol と共に単離した (Y. Shiono, *et al.*, *J. Antibiotics*, 62, 533-535 (2009)、図 4)。

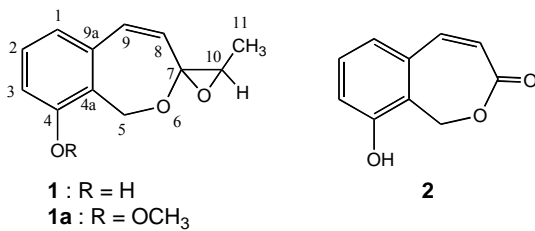


図 4. Benzophomopsin A (1) と xyrainol (2) の構造

②遺伝子変異酵母に対する活性

分子内にエポキシド構造を有する benzophomopsin A は遺伝子変異酵母に対し濃度依存的に生育活性を有したが、xyrainol は同濃度で活性は認められなかった。

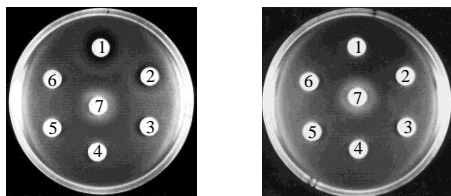
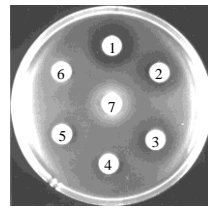


図 5. Benzophomopsin A (左) と xyrainol (右) の遺伝子変異酵母に対する活性

(2) 9-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (9-MSITC)

①遺伝子変異酵母に対する活性

ワサビ由来の 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MSITC) も阻止円の周りに薄い生育円活性という、GSK-3 β 阻害剤に類似の表現型を示したが、最も活性が強かった 9-MSITC の遺伝子変異酵母に対する活性を図 6 に示した。



- 1: 9-MSITC (4 μ g/disc)
- 2: 8-MSITC (4 μ g/disc)
- 3: 7-MSITC (4 μ g/disc)
- 4: 6-MSITC (4 μ g/disc)
- 5: 6-MSITC (4 μ g/disc)
- 6: 6-MTITC (4 μ g/disc)
- 7: FK506 (0.02 μ g/disc)

図 6. MSITC 各種の遺伝子変異酵母に対する活性

②GSK-3 β に対する活性

各種イソチオシアネート類の、ヒト GSK-3 β に対する阻害活性 (IC₅₀ 値) を図 7 に示した。

Isothiocyanate	GSK-3 β inhibition (IC ₅₀ , μ M)
9-MSITC	18.6
8-MSITC	21.5
7-MSITC	40.0
6-MSOITC	54.8
6-MSITC	70.3
6-MTITC	>200.0
4-MSITC	>200.0

図 7. イソチオシアネート類の構造と GSK-3 β に対する活性

③9-MSITC の GSK-3 β に対する阻害形式

図 8 に、9-MSITC の GSK-3 β に対する Lineweaver-Burk plot を示した。9-MSITC は、基質 ATP に対し拮抗阻害を示し、Ki=89.6 μ M であった。

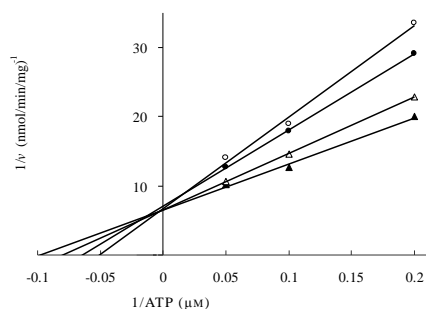


図 8. 9-MSITC のヒト GSK-3 β に対する Lineweaver-Nurk Plot.

(3) Falcarindiol

①遺伝子変異酵母に対する活性

セリ科野菜とウド由来の falcarindiol は、阻止円の周りに薄い生育円活性という、GSK-3β 阻害剤に類似の表現型を示したが、GSK-3β 阻害剤や 9-MSITC の場合より生育円の強度は強かった。

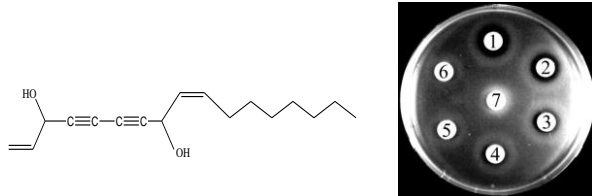


図 9. Falcarindiol の遺伝子変異酵母に対する活性

③ Falcarindiol の GSK-3β に対する阻害形式

図 10 に、falcarindiol の GSK-3β に対する Dixon-plot を示した。Falcarindiol は、基質 ATP に対し非拮抗阻害 (図 10 (上)、 $K_i=89.6 \mu\text{M}$) を示し、ペプチド基質に対し拮抗阻害 (図 10 (下)、 $K_i=89.6 \mu\text{M}$) を示した。

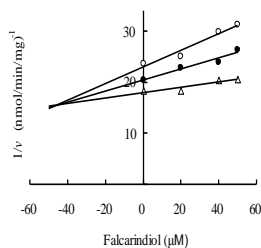
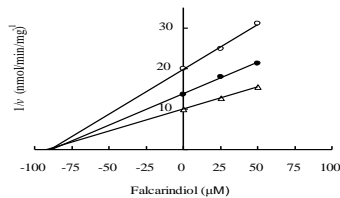


図 10. Falcarindiol のヒト GSK-3β に対する Dixon-plot.

(4) Pisiferdiol

① 遺伝子変異酵母に対する活性

Pisiferdiol は、マウス PP2Cα の活性化物質として見出され、HL60 細胞に p38 の脱リン酸化を促進してアポトーシス誘導細胞死を引き起こすことを明らかにしているが、遺伝子変異酵母に対しても濃度依存的に生育活性を示した。

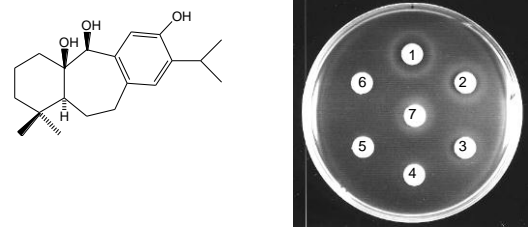


図 11. Pisiferdiol の構造と遺伝子変異酵母に対する活性

② 遺伝子破壊酵母 *mpk1Δ* 株と *cnb1Δ* 株に対する活性 (合成致死)

Pisiferdiol は、*cnb1Δ* 株よりも *mpk1Δ* 株に対し強く生育阻害 (阻止円) を示すことからカルシニューリン経路に作用していることが示唆された。

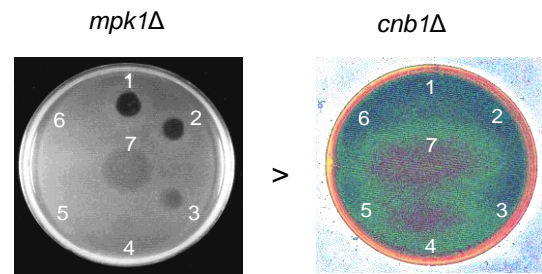


図 12. Pisiferdiol の *cnb1Δ* 株と *mpk1Δ* 株に対する活性

③ 野生酵母に対するリチウム塩感受性試験

カルシニューリンは塩ストレスの緩和に作用しており、カルシニューリン阻害剤はリチウムなどの塩の存在下で野生株に致死効果を示す。Pisiferdiol も、FK506 と同様に LiCl 存在下の野生株にのみ致死効果を示した。

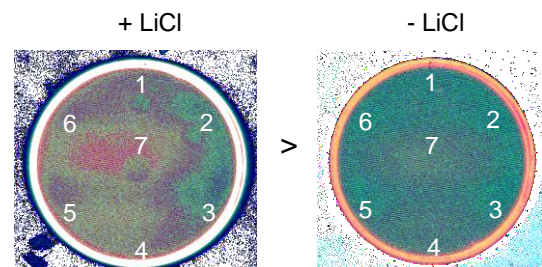


図 13. Pisiferdiol の LiCl 存在下 (左) と非存在下 (右) での野生株に対する致死効果

④ カルシニューリン阻害とカルシニューリン発現に対する影響

②と③の実験より、pisiferdiol は酵母のカルシニューリンを阻害することによって、

遺伝子変異酵母の Ca^{2+} シグナル伝達阻害活性（遺伝子変異酵母の生育活性）を有することが考えられた。以前の我々の実験でマウス PP2B（カルシニューリン）は $300 \mu\text{M}$ でも阻害しなかったため、酵母におけるカルシニューリンを含めた細胞周期に関わるタンパク質の発現をウェスタンブロットにて調べた。図 14 に示すように、cnb1p の発現が濃度以前に抑制され、その結果細胞周期に負に働く Swe1p や Cdc25p が減少していた。

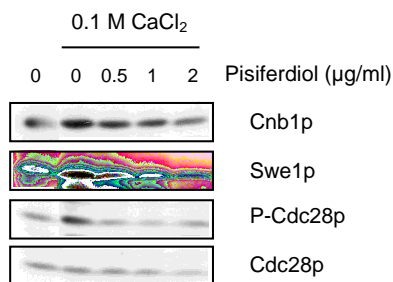


図 14. Pisiferdiol の遺伝子変異酵母のタンパク質発現に対する影響

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 3 件）

1. Yoshida, J., Nomura, S. Nishizawa, N., Ito, Y. and Kimura, K. (2011)
Glycogen synthase kinase-3 β inhibition of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabia Japonica* Matsum). Biosci. Biochem. Biotechnol., 75, 136-139.
2. Shiono, Y., Nitto, A., Shimanuki, K., Koseki, T., Murayama, T., Miyakawa, T., Yoshida, J. and Kimura, K. (2009)
A new benzoxepin metabolite isolated from endophytic fungus *Phomopsis* sp. J. Antibiot., 62, 533-535.
3. 塩野義人, 木村賢一 (2009)
植物内生糸状菌類から創薬シード分子を

探す、化学と生物、47、390-396.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. 油井信弘、宮川都吉、大西素子、木村賢一 (2011)
サワラの球果由来 Pisiferdiol と Ca^{2+} シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母株に対する生育円活性、第 55 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会（つくば）、2011 年 11 月 19 日～11 月 21 日、p359-361.
2. 吉田潤、諏訪紗央里、伊藤芳明、宮川都吉、木村賢一 (2010)
山菜のウドとセリ科野菜に含まれる GSK-3 β 阻害物質 falcarindiol の糖尿病に対する効果、第 15 回日本フードファクター学会（仙台）、2010 年 10 月 4 日～5 日、p74.
3. 油井信弘、宮川都吉、大西素子、木村賢一 (2010)
PP2C 活性化物質 Pisiferdiol の Ca^{2+} シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母に対する作用メカニズムの解析、第 5 回日本ケミカルバイオロジー学会（横浜）、2010 年 5 月 18 日～19 日、p140.
4. Shiono, Y. and Kimura, K. (2010)
Chemical investigation on biological active compounds from endophytic fungi、2010 年度日本農芸化学会シンポジウム（東京）、2010 年 3 月 27 日～30 日、シ 24.
5. 木村賢一 (2009)
遺伝子変異酵母を用いた新たなバイオブローブの探索とその分子標的研究、いわて海洋バイオテクノロジー研究会 研究交流技術セミナー（釜石）、2009 年 8 月 6 日.
6. 吉田潤、宮川都吉、木村賢一 (2009)、 Ca^{2+} シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母の阻害剤に対する表現型と標的分子と

の関連性、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会（神戸）、2009年5月18日～5月19日、p137.

〔図書〕（計 1 件）

1. Shiono, Y. and Kimura, K. (2012)
16 Endophytic microorganisms as a source of bioactive compounds, Bioactive Compounds from Natural sources (2nd Edition), Edited by Corrado Tringali, Taylor & Francis, 551-577.

〔その他〕

ホームページ等

岩手大学（木村賢一）：

<http://univdb.iwate-u.ac.jp/openmain.jsp>

山形大学（塩野義人）：

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/kyouindata.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 賢一 (KIMURA KEN-ICHI)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：3 0 3 4 4 6 2 5

(2) 研究分担者

塩野 義人 (SHIONO YOSHIHITO)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：8 0 3 6 1 2 7 8