

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への 応用

所 属 国立感染症研究所 細胞化学部
研究者 西島 正弘

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 細胞化学部 久下 理、斎藤恭子、川崎清史
(2) 明治製菓(株) 創薬研究所 星子 繁

要 旨

1) PS の生合成調節に損傷を有する変異株を簡便に分離する方法を開発した。2) シンドビスウィルスの mRNA キャッピング酵素の宿主膜への結合にホスファチジルセリンの寄与は低いことが示唆された。3) バキュロウイルスの感染において gp64 エンベロープタンパク質は宿主細胞のホスファチジルイノシトールと相互作用することを明らかにした。4) ホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素とホスファチジルセリン合成酵素過剰発現大腸菌を構築し、両酵素阻害評価系と High Throughput Screening (HTS) 系を構築した。

1. 研究目的

近年、エイズ、結核、マラリアなど新興・再興感染症が、薬剤耐性菌の問題と共に、世界的規模で大問題となっており、これらの感染症問題への対策が急務となっている。そのため、ワクチン開発に加え、新しい抗微生物薬の開発が強く望まれている。しかし、ここ30年間程は画期的な抗菌並びに抗ウイルス抗生物質の発見はなされていない。このような状況の中、宿主と病原体に関する分子レベルの研究成果に立脚した戦略が、新規抗微生物薬開発においても極めて重要であることは明らかである。

ところで、我々はこの約20年の間、CHO (Chinese hamster ovary) から種々のリン脂質生合成欠損変異株の分離を行い、動物細胞膜リン脂質の生合成機構と機能に関する研究を行ってきた。そして、このような研究を通し、ある種の宿主膜リン脂質がウイルスや細菌の感染・増殖に必須であることを明らかにした。また、ホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルグリセロール (PG) などのリン脂質生合成機構が動物細胞と細菌・真菌などとの間で大きく異なることも見出した。本研究では、宿主細胞膜リン脂質の代謝・機能に関する研究をさらに発展させるとともに、上述した今までの研究成果に立脚して、病原微生物のリン脂質代謝系を標的とする薬物の開発を目指す。リン脂質を標的とする抗微生物薬の開発は極めてユニークであり、本研究が成功すれば独創的新薬に結びつくことが大いに期待できる。

2. 研究方法

2-1) ホスファチジルセリン (PS) の生合成調節機構に関する研究

PS 誘導体の PS 生合成に及ぼす効果: CHO 細胞 (2×10^6) を 24 well プレートの well に加え、1 ml F12/NCS 培地中、PS 誘導体存在下、あるいは非存在下で一晩 37 °C で培養する。培地を 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ の [^{14}C]serine を含むそれら培地に交換し、37 °C で3時間細胞を標識する。脂質を Bligh & Dyer 法で抽出した後、PS に取り込まれた放射活性を TLC とイメージアナライザーを用いて測定する。

2-2) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

2-2-1) nsP1 の細胞内分布の解析-1

細胞に nsP1 と EGFP の融合蛋白質を一過的に発現させ、その細胞内分布を蛍光顕微鏡で観察した。さらに nsP1-EGFP 発現細胞を低張液で処理してホモジナイズ後、500×g 遠心で核を除き、さらに 15,000×g 遠心で沈澱膜画分と上清に分離した。各画分について抗 GFP 抗体を用いてイムノプロット解析を行い、nsP1-EGFP の分布を調べた。

2-2-2) nsP1 の細胞内分布の解析-2

シンドビスウィルスのレプリカーゼ (nsP1~4) 遺伝子を有するリコンビナント RNA を PS を加えた培地及び加えない培地で培養した PSA-3 細胞に導入し、3-1 と同様の方法で分画した。各画分について抗 nsP1 ポロクローナル抗体を用いてイムノプロット解析を行い、nsP1 の分布を解析した。抗 nsP1 抗体はリコンビナント蛋白質を抗原に調製した。

2-3) バキュロウイルス感染に関与する細胞表面分子の解析

CHO 細胞由来のホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン生合成欠損変異株に、Ac64-CALuc または AcVSVG-CALuc バキュロウイルスを感染させ、ルシフェラーゼ活性の発現でウイルスの感染能を調べた。

2-4) リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

2-4-1) 試薬：本実験で使用した主な試薬類を以下に列記した。括弧内にはメーカー名を記した。

CDP-DG (シグマ)、[³H]-glycerol-3-phosphate(G3P) (第一化学薬品)、マイクロシンチ E (パッカード)、[³H]-serine (アマシャムバイオサイエンス)。

2-4-2) PGP 合成酵素遺伝子を導入した大腸菌および PS 合成酵素遺伝子を導入した大腸菌は埼玉大学理学部より分与された株を使用した。

2-4-3) PGP 合成酵素調製：PGP 合成酵素の遺伝子を導入した大腸菌 Pgs-A 株にアラビノースで誘導を行い、菌体を回収後、超音波にて破碎し、超遠心機にて 100,000×g で遠心後、膜画分を回収した。

PS 合成酵素調製：PS 合成酵素の遺伝子を導入した大腸菌 GN10/pPSS 株に IPTG で誘導を行い、菌体を回収後、超音波にて破碎し、超遠心機にて 100,000×g で遠心後、膜画分を回収した。

2-4-4) PGP 合成酵素活性の検出：50 μl の反応液(0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1 % Triton X-100, 0.1 mM MgCl₂, 40 nM CDP-DG, 1.85 kBq/assay ³H-glycerol-3-phosphate,膜画分)で室温にて酵素反応を行なった後 50 μl の 1 N HCl in MeOH を添加し反応を停止させた。100 μl のマイクロシンチ E を添加、攪拌することにより生成した ³H-PGP を有機層に抽出し、そのまま放射活性を測定し PGP 合成酵素活性を検出した。

PS 合成酵素活性の検出：50 μl の反応液(0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 0.1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 1.0 μM CDP-DG, 3.7 kBq/assay ³H-serine, 0.16 μg protein(膜画分)/assay)で 1.5 hr、室温にて酵素反応を行なった後 50 μl の 1 N HCl in MeOH を添加し反応を停止させた。100 μl のマイクロシンチ E を添加、攪拌することにより生成した ³H-PS を有機層に抽出し、そのまま放射活性を測定し PS 合成酵素活性を検出した。

3. 研究成果

3-1) ホスファチジルセリン (PS) の生合成調節機構に関する研究

我々は以前に、動物細胞におけるホスファチジルセリン (PS) 生合成が PS によるフィードバック制御を受けることを明らかにした。また CHO-K1 細胞から PS の生合成調節に損傷を有する変異株 (#29 株) を分離し、その解析から、PS によるフィードバック制御は、PS 合成酵素遺伝子の転写や翻訳の過程での制御ではなく、PS による PS 合成酵素の酵素活性制御が非常に重要であることを明らかにした。さらに、PS による PS 合成酵素の活性制御は、PS と PS 合成酵素との直接の相互作用ではなく、制御を仲介する何らかの因子が存在する可能性を示唆する実験結果を得ている。本年度は、PS の生合成調節機構をさらに詳細に明らかにすることを目的に、PS の生合成調節に損傷を有する様々な変異株を簡便に分離する方法の開発を、#29 株をモデル細胞に用いて試みた。#29 株は、野生株 CHO-K1 と異なり、その PS 合成が外因性の PS により制御されない。これまでに、種々の PS 誘導体の #29 株と CHO-K1 株の細胞増殖に対する影響を調べたところ、PS 誘導体の一つであるアルキルリゾ PS (ALPS) が、野生株 CHO-K1 の増殖を停止させるが、#29 株の細胞増殖には影響を及ぼさないことを見いだした。さらに、ALPS は、CHO-K1 株の PS 合成を著しく抑制するが、#29 株は、ALPS 存在下でも正常レベルの PS を合成することを見いだした。従って、PS の生合成調節に損傷を有する変異株を、ALPS 耐性変異株として簡便に分離することが可能と思われる。現在、この簡便な方法を用い、様々な新たな PS 生合成調節変異株を分離することを試みている。

3-2) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

チャイニーズハムスター卵巣由来（CHO）細胞の PS 合成欠損変異株 PSA-3 は、PS を添加した培地では正常なリン脂質組成を示すが、PS を添加していない培地で培養すると、PS 並びに PS を前駆体として合成されるホスファチジルエタノールアミン（PE）含量が低下する。この性質を利用して、昨年度はシンドビスウィルスレプリカーゼによる RNA 合成に、宿主細胞膜の PS または PE（あるいは両方）が重要であることを示唆する結果を得た。シンドビスウィルスでは 4 つのウィルス非構造蛋白質（nsP1~4）からなるレプリカーゼ複合体が、nsP1（mRNA キャッピング酵素）を介して細胞内の膜に結合し、RNA 合成を触媒することが示唆されている。そこで今年度は、PS を添加していない培地で培養した PSA-3 株に見られたレプリカーゼ活性の低下の原因として nsP1 の膜結合能の低下を考え、PSA-3 株における nsP1 の膜分布を解析した。

3-2-1) nsP1-EGFP の細胞内分布

PS を加えていない培地及び PS を添加した培地で培養した PSA-3 株に発現させた nsP1-EGFP の蛍光は、いずれも形質膜と細胞内の小胞に観察され、大差はなかった。また nsP1-EGFP 発現 PSA-3 細胞を分画し、nsP1-EGFP の分布を調べると、培地への PS 添加の有無にかかわらず、nsP1-EGFP は 15,000×g 沈澱膜画分にほぼすべてが回収され、分布に差は認められなかった。

3-2-2) nsP1 の細胞内分布

3-2-1 の結果では、EGFP が nsP1 の膜結合能に影響した可能性が考えられたので、3-2 の方法により PSA-3 株に発現させた nsP1 そのものの分布を抗 nsP1 抗体を使って調べた。その結果、培地への PS 添加の有無に関わらず、nsP1 は 15,000×g 沈澱膜画分にほぼすべてが回収され、差はなかった。

3-3) バキュロウイルス感染に関与する細胞表面分子の解析

バキュロウイルスは何らかの脂質を介して哺乳動物細胞に感染することが示唆されていた。そこで、CHO 細胞のホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン生合成欠損変異株を用いてこの点をさらに詳細に検討した。その結果、バキュロウイルスの感染において gp64 エンベロープタンパク質は宿主細胞のホスファチジルイノシトールと相互することを明らかにした。

3-4) リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

上記手法により酵素抽出液の調製法およびラジオアイソトープを用いた PGP 合成酵素活性の検出法を構築した。放射活性のマイクロシンチ E への移行がアラビノースによる誘導を行なった組換え体抽出液を用いた場合にのみ観察されたことからその放射活性の移行は PGP 合成酵素の活性によることが示された。また酵素反応液のマイクロシンチ E 抽出物中の PGP 生成が TLC 及び LC/MS で確認されたことからマイクロシンチ E へ移行した放射活性は ³H-PGP であることが示唆された。マイクロシンチ E を用いた上記の手法は反応生成物と未反応の標識化合物との分離操作を必要としないホモジニアスアッセイであり、ロボットシステムを用いた HTS に最適である。そこでロボット化のための最適化を行い良好な S/N 比を得られる実験条件が確立できた。

PS 合成酵素に関しても同様に上記手法により酵素抽出液の調製法およびラジオアイソトープを用いた酵素活性の検出法を構築している。放射活性のマイクロシンチ E への移行が IPTG による誘導の有無で有意な差を示すことを確認した。

4. 考 察

4-1) ホスファチジルセリン（PS）の生合成調節機構に関する研究

リン脂質の生合成調節は、生体膜の形成・機能維持に必須であり、遺伝子の複製やタンパク質の機能発現等と同様に、細胞がその生命を維持し、それぞれの細胞が独自の機能を営むために必要不可欠な生体内反応である。しかしながら、リン脂質の生合成調節に関する知見は、現在なお非常に限られており、多数の基本的で重要な問題がこの研究分野では未解決のままとなっている。本研究により、多数の PS 生合成調節変異株が得られれば、リン脂質の生合成調節機構の解明の突破口となるものと期待できる。また、リン脂質の生合成調節機構を分子レベルで明らかにできれば、その調節をターゲットにした新規抗細菌薬、抗真菌薬の開発が可能となると思われる。

4-2) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

PS 添加と無添加の培養条件の違いで、PSA-3 株における nsP1 の膜結合に差がないことから、シンドビスウィルスレプリカーゼの膜への結合に PS の寄与は低いものと考えられた。以上の結果から、PS 無添加の PSA-3 株で認められたシンドビスウィルスレプリカーゼ活性の低下の原因は、レプリカ

一ゼの膜結合能の低下ではないと考えられた。nsP1 あるいはその他のレプリカーゼ構成蛋白質の酵素活性に PS が重要であるために、レプリカーゼ活性の低下がおこる可能性が考えられた。

4-3) バキュロウイルス感染に關与する細胞表面分子の解析

バキュロウイルスの感染において gp64 エンベロープタンパク質は宿主細胞のホスファチジルイノシトールと相互することが示された。今後、種々のウイルスについて脂質が受容体となるか否かを検討し、その結合を阻害する薬物を検索したい。

4-4) リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

PGP 合成酵素、PS 合成酵素の文献上報告されている酵素活性検出法は反応生成物をクロロホルムで抽出する方法である。だがこの方法ではクロロホルム画分のみを分離しその放射活性を測定する必要があり、両酵素の阻害物質を多量のサンプルの中から探索しようとする本研究の目的には適当ではない。マイクロシンチ E は脂溶性の高い物質を抽出できるシンチレーションカクテルであり、水層と有機層の分離をせずに放射活性を測定できるため、ロボットシステムを用いた HTS に有利である。今回 PGP 合成酵素の反応生成物である PGP がマイクロシンチ E で抽出可能であることを確認できたことから、ロボットシステムを用いての PGP 合成酵素阻害物質のスクリーニングが可能となった。今後化合物ライブラリー・微生物培養液ライブラリーからの阻害物質のスクリーニングを開始し、リン脂質代謝を標的とする抗微生物薬となり得るリード化合物の探索を行なう。PS 合成酵素に関しても同様にアッセイ系を構築し阻害物質のスクリーニングを開始する。

5. まとめ

5-1) ホスファチジルセリン (PS) の生合成調節機構に關する研究

PS の生合成調節に損傷を有する変異株を簡便に分離する方法を開発した。

5-2) シンドビスウィルスの感染における宿主細胞ホスファチジルセリンの役割

シンドビスウィルスレプリカーゼによる RNA 合成に宿主細胞膜の PS (または PE) が重要であることを示唆する昨年度の結果から、nsP1 の膜結合に PS(PE)が必要なのではないかと考えて研究をすすめたが、nsP1 の膜結合に PS の寄与を示唆する結果は得られなかった。今後は nsP 蛋白質の酵素活性に焦点をあて、PS の関与を解析する。また、PSA-3 株を利用して得たこれまでのデータから、シンドビスウィルスのライフサイクルの中で RNA 合成以降の過程にも PS が関与することが予想され、その過程の同定、解析についてもすすめて行く予定である。

5-3) バキュロウイルス感染に關与する細胞表面分子の解析

バキュロウイルスの感染において gp64 エンベロープタンパク質は宿主細胞のホスファチジルイノシトールと相互することを明らかにした。

5-4) リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

入手した各種酵素 (PGP 合成酵素及び PS 合成酵素) 遺伝子導入大腸菌よりそれぞれの酵素を調製し、放射性標識グリセロール 3 リン酸及びセリンを用いた PGP 合成酵素及び PS 合成酵素阻害評価系を構築し、HTS ロボットを使ったスクリーニング系を構築した。

6. 研究発表

- 1) Tani, H. Nishijima, M. Ushijima, H. Miyamura, T. and Matsuura, Y. Characterization of Cell Surface Determinants Important for Baculovirus Infection
Virology, 279, 343-353, 2001
- 2) Kawasaki, K. Kuge, O. Yamakawa, Y. and Nishijima, M. Purification of Phosphatidylglycerophosphate Synthase from Chinese Hamster Ovary Cells
Biochem. J., 354, 9-15, 2001
- 3) O. Kuge, Y. Yamakawa, and M. Nishijima Enhancement of transport-dependent decarboxylation of phosphatidylserine by S100B protein in permeabilized Chinese hamster ovary Cells
J. Biol. Chem., 276, 23700-23706, 2001
- 4) Yokoyama, K. Saitoh, S. Ishida, M. Yamakawa, Y. Nakamura, K. Inoue, K. Taguchi, R. Tokumura, A. Nishijima, M. Yanagida, M. and Setaka, M. Very-long-chain fatty acid-containing phospholipids accumulate in fatty acid synthase temperature-sensitive

mutant strains of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* fas2/lsd1 Very-long-chain fatty acid-containing phospholipids accumulate in fatty acid synthase temperature-sensitive mutant strains of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* fas2/lsd1

Biochimica et Biophysica Acta, 223-233, 1532, 2001

- 5) Yasuda, S. Kitagawa, H. Ueno, M. Ishitani, H. Fukasawa, M. Nishijima, M. Kobayashi, S. and Hanada, K. A Novel Inhibitor of Ceramide Trafficking from Endoplasmic Reticulum to the Site of Sphingomyelin Synthesis
J. Biol. Chem., 276, 43994-44002, 2001
- 6) Hanada, K. Palacpac, N.M.Q. Magistrado, P. A. Rai, G. Sakata, D. Hara, T. Chakraabarti, D. Horii, T. Nishijima, M. and Mitamura, T. Plasmodium falciparum Phospholipase C Hydrolyzing Sphingomyelin and Lysocholinephospholipids: A Possible Target for Malaria Chemotherapy Plasmodium falciparum Phospholipase C Hydrolyzing Sphingomyelin and Lysocholinephospholipids: A Possible Target for Malaria Chemotherapy
J. Exp. Med., 195, 23-34, 2002

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社