

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(現感染症研究所) 星子 繁

要 旨

(1) スファチジルセリン (PS) の生合成調節機構に関する研究: 組み換え型の CHO 細胞 PS 合成酵素 2 を SDS-PAGE 上ではほぼ単一バンドになるまで精製することに成功した。精製酵素の活性が外因性 PS により阻害され、PS 生合成のフィードバック制御に合成酵素と PS との直接の相互作用が重要であることが示唆された。(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(SIN)レプリカーゼによる遺伝子発現において、転写後の調節に宿主細胞膜のホスファチジルセリン (PS) またはホスファチジルエタノールアミン (PE) が関与することが示唆された。レプリカーゼの構成蛋白質の一つ、mRNA キャッピング酵素 nsP1 は、宿主細胞において膜の PS または PE に結合することが示唆された。(3) リン脂質代謝を標的とする抗微生物薬の探索: ホスファチジルグリセロリン酸 (PGP) 合成酵素、ホスファチジルセリン (PS) 合成酵素阻害物質スクリーニングを HTS ロボットシステムを用いて開始した。現在いくつかの阻害物質を得ており、抗微生物薬としての可能性の見極めを行なっている。

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をも見出した。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) PS 合成酵素 2 の精製

PS 合成酵素 2 の cDNA を用い、同酵素の C 末端に FLAG ペプチドと HA ペプチドを連結した組み換え型酵素 (FH-PSS2) を産生する CHO 細胞 (CHO/FH-PSS2) を構築した。CHO/FH-PSS2 細胞より膜画分を調製し、膜タンパク質を界面活性剤 (Sucrose monolaurate) で可溶性化後、抗 FLAG 抗体ビーズとインキュベーションした。抗 FLAG 抗体ビーズに特異的に結合したタンパク質を過剰の FLAG ペプチドを用いてビーズより溶出し、続いて抗 HA 抗体ビーズとインキュベーションした。抗 HA 抗体ビーズに特異的に結合したタンパク質を過剰の HA ペプチドを用いてビーズより溶出し、

精製酵素画分とした。

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) レプリカーゼによる遺伝子発現の解析

SIN レプリカーゼ遺伝子とその下流にレプリカーゼ特異的プロモーターと lacZ 遺伝子をコードするレプリコン RNA を PSA-3 細胞に導入し、破壊した後、β ガラクトシダーゼ活性を測定した。また、細胞から RNA を抽出し、lacZ 特異的プローブを用いてノザンプロット解析を行った。

2-2-2) nsP1 の細胞内分布の解析

SIN レプリコン RNA を導入した PSA-3 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 100,000×g 遠心で沈殿膜画分と上清に分離した。各画分について抗 nsP1 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。

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リンイノシトール、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ィ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) (室町薬品)、マイクロシンチ E (パーキンエルマー)、[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。

2-4-5) 上記反応系に化合物を終濃度 10 μg/ml で添加し、各酵素の阻害物質のスクリーニングを行なった。スクリーニングにはベックマン社製ロボットシステムを用いた。

2-4-6) TLC 解析：反応生成物の検出のため反応液を TLC で展開し(CHCl₃: MeOH: H₂O=65: 25: 4)、イメージアナライザーで画像解析を行なった。

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

生体膜の基本骨格であるリン脂質二重層は様々なリン脂質分子から構成されており、形質膜や細胞内の各オルガネラ膜がそれぞれ固有の機能を発現するためには、それら生体膜のリン脂質の量と組成が正常に維持されている必要があるものと推定される。しかしながら現在、生体膜リン脂質の量と組成の制御の基盤となる機構は不明であり、また各リン脂質分子の生合成調節機構もほとんど理解されていない。我々は以前、動物細胞の主要リン脂質の一つであるホスファチジルセリン (PS) の生合成が、PS によるフィードバックコントロールを受けることを見いだした。さらに、このコントロール

は、PS 合成酵素遺伝子の転写や翻訳レベルでのコントロールではなく、PS による PS 合成酵素活性のコントロールによることも明らかにした。この PS による PS 合成酵素活性の制御機構には現在不明な点が多く存在し、PS が PS 合成酵素と直接相互作用するのか、あるいは制御を仲介する何らかの因子が存在するのかも不明である。そこで我々は、PS による PS 合成酵素活性の制御機構を精製酵素を用いて解析することを目的に、同酵素の精製を試みた。酵素の精製は、FLAG と HA ペプチドを連結した組み換え型の PS 合成酵素 2 を CHO 細胞において発現させ、それらペプチドに対する抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより行った。その結果、同酵素を SDS-PAGE 上でほぼ単一バンドになるまで活性を保ったまま精製することに成功した。さらに、精製酵素の活性が外因性の PS により阻害されることを明らかにした。従って、PS 合成酵素と PS の直接の相互作用が、細胞内の PS 量を正常に維持するために重要であることが示唆された。

3-2) シン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

3-2-1) PS 合成変異株における SIN レプリカーゼによる遺伝子発現の解析

アルファウィルスレプリカーゼは4つの非構造蛋白質 (nsP1~4) から構成され、nsP1 (mRNA キャッピング酵素) を介して細胞内の膜に結合することが示唆されている。In vitro の実験から nsP1 が PS をはじめとする酸性リン脂質と結合することが見いだされ、その結合が nsP1 の酵素活性に必要であることが報告されている。以前我々は、CHO 細胞の PS 合成変異株 PSA-3 を利用してアルファウィルスの一つである SIN レプリカーゼによる遺伝子発現に、宿主細胞膜の PS 又は PE が重要であることを示唆する結果を得た。PS (または PE) の役割をより明確にするために、レプリカーゼ遺伝子とそれに特異的なプロモーター下に配したレポーター遺伝子 (lacZ) を有する SIN レプリコン RNA を PSA-3 株に導入し、レプリカーゼの転写産物 (lacZ mRNA) を解析した。PSA-3 株は PS 要求株であり、PS を添加せずに培養すると細胞内の PS とホスファチジルエタノールアミン (PE) の含量が低下するという性質を有する。PS を添加した細胞に比べ、PS 無添加の細胞では発現した β ガラクトシダーゼ活性が約 30% に低下していたが、lacZ mRNA のサイズとレベルに差はなかった。PS を添加した PSA-3 細胞と無添加の同細胞で、蛋白質の翻訳能に差はないことが別の実験から示唆された。以上の結果から、SIN レプリカーゼ依存の遺伝子発現において、宿主細胞の PS または PE は転写後調節に関与していることが考えられた。

3-2-2) SIN mRNA キャッピング酵素 nsP1 と宿主細胞膜ホスファチジルセリン (PS) との結合

nsP1 が主要な酸性リン脂質である PS に、実際に細胞内で結合するかどうかの手がかりを得るために、SIN のレプリコン RNA を使って nsP1 を CHO 細胞の PS 合成変異株 PSA-3 に発現させ、膜への分布を調べた。PS を添加して培養した PSA-3 細胞では約 90% の nsP1 が膜に結合していたが、PS を添加せずに培養した同細胞では、膜に結合した nsP1 わずかに減少し、約 80% となった。nsP1 はパルミトイル基で修飾され、これが nsP1 の膜への強固な結合を担うことが示唆されている。そこでパルミトイル修飾を受けない変異を導入した変異体 nsP1 も同様に PSA-3 株に発現させ、膜への分布を調べた。PS を添加した細胞では変異体 nsP1 の約 80% が膜に結合していたのに対し、PS を添加しない細胞では、膜結合していた nsP1 は全体の約 60% へと減少した。すなわち、PS、PE 含量が低下した細胞における nsP1 の膜結合の減少が、変異体 nsP1 では顕著に観察された。これらの結果から、nsP1 が細胞膜の PS または PE と結合することが示唆された。

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作用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

研究方法に示した手法により PGP 合成酵素、PS 合成酵素の阻害物質のスクリーニングを行なっている。スクリーニング源として単品の化合物をライブラリー化したもの(化合物ライブラリー)、および微生物培養液をライブラリー化したもの(微生物プロスライブラリー)を用いた。PGP 合成酵素、PS 合成酵素ともいくつかの阻害物質を得ており、現在それらの阻害物質が今後抗微生物薬として開発可能かを検討しながら化合物の絞り込みを行なっている。

PS 合成酵素の阻害物質スクリーニングで得た阻害物質の1つである *Compound A* は PS 合成酵素に対して IC_{50} 値 $0.2 \mu\text{g/ml}$ の阻害活性を有しているが PGP 合成酵素に対する IC_{50} 値は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上であり、PS 合成酵素に特異的な阻害物質であることが示唆された。TLC 解析でも反応生成物である PS が *Compound A* 添加群で減少していることを確認した。しかしスクリーニングで使用した PS 合成酵素の酵素源である大腸菌に対する *Compound A* の抗菌活性を調べたところ $30 \mu\text{g/ml}$ で抗菌活性を示さなかった。

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。今回、PS 合成酵素と PS との直接の相互作用が PS 生合成のフィードバック制御に重要であることが示唆されたが、現在、PS による PS 合成酵素の活性阻害が単純なプロダクト阻害によるのか、あるいはアロステリック効果によるものかが不明である。今後この点を明らかにし、PS の生合成調節機構をさらに深く理解したいと考えている。

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

SIN レプリカーゼによる遺伝子発現において、転写後の調節過程に PS、または PE が関与することが示唆された。mRNA キャッピング酵素 nsP1 は PS により活性化されることを考えると、PS 含量の低下が nsP1 による RNA のキャッピングを阻害し、翻訳が阻害されたという可能性が考えられた。一方、無細胞系で見つかった nsP1 と PS との結合が実際に細胞内でもおこなっていることを示唆する結果も得られた。nsP1 と PS との結合が nsP1 の酵素活性にどのような影響をあたえるかについては、今後の検討課題である。

4-3) 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

マイクロシンチ E というシンチレーションカクテルを用いる手法により、HTS ロボットシステムによるスクリーニングを精度よく行なうことが可能となった。現在スクリーニング継続中であるが PGP 合成酵素、PS 合成酵素ともいくつかの阻害物質が得られている。しかしこのスクリーニング系で得られる物質は酵素阻害物質であり、*Compound A* の例のようにそれがそのまま抗微生物活性を有しているとは限らない。酵素阻害物質が菌の膜を透過することができずターゲットに到達できないことが理由の一つとして考えられる。当スクリーニングで得られた阻害物質についても抗微生物活性や動物細胞に対する毒性等を検討し、抗微生物薬となり得るかを判断していく予定である。

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関する研究

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。さらに、組み換え型の PS 合成酵素 2 を SDS-PAGE 上でほぼ単一バンドになるまで精製することに成功した。精製酵素の活性が外因性 PS により阻害され、PS 生合成のフィードバック制御に合成酵素と PS との直接の相互作用が重要であることが示唆された。

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

SIN レプリカーゼによる遺伝子発現において、宿主細胞膜の PS または PE は転写後調節に関与し

ている可能性が考えられた。PS 合成変異株を用いて nsP1 が細胞内で PS または PE に結合することを示唆した。SIN 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ており、今後その過程の同定、解析についてもすすめたい。

5-3) 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

HTS ロボットシステムによる PGP 合成酵素及び PS 合成酵素の阻害物質スクリーニングを開始し、両酵素ともいくつかの阻害物質を得た。得られた阻害物質が今後抗菌薬となり得るかを見極めると同時にスクリーニングを継続する。

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
- 7) K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J. Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, and Y. Natori. A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 7669-7674, 2002
- 8) S. Yasuda, M. Nishijima, and K. Hanada. Localization, topology, and function of the LCBI subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells
J. Biol. Chem., 278, 4176-4183 (2003)