

平成15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

目 次

課題番号		
20030895A KH21009	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	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

研究要旨

(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 は PSS2 のセリン結合部位とは異なる部位に結合して PSS2 活性を阻害することが示唆された。(2) PS 合成酵素 1 の活性部位及び調節部位の探索: PSS1 の酵素活性或いは酵素発現量、及び活性調節に関わるアミノ酸残基をそれぞれ 13 残基、6 残基同定した。活性部位は一次構造上中央部の領域で膜内に及んで構成され、活性調節部位とは別に存在していることが示唆された。(3) 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 の遺伝子発現に PS が特異的に関与することを見いだした。レプリカーゼにより RNA が合成されてからその RNA が翻訳されるまでの間に、PS が関与する過程があると考えられた。(4) 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行なっている。現在までに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。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 齊藤恭子
- (2) 明治製菓(株) 創薬研究部門 星子 繁

A. 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。

B. 研究方法

B-1 PS 合成酵素活性の測定

組換え型精製 PS 合成酵素 2 (PSS2) を酵素源として用いた。精製酵素 0.5 ng を、50 mM HEPES-Na (pH7.5)、5mM CaCl₂、1.25 mg/ml phosphatidylethanolamine (PE) と各種濃度の [¹⁴C]serine と PS を含む反応液 (100 μl) 中で 37°C、30 分間インキュベートし、脂質画分に取り込まれた放射活性を測定することにより、PS 合成酵素活性を測定した。

B-2 PS 合成酵素 1 の活性部位及び調節部位の探索

PS 合成酵素 (PSS) 1 と PSS 2 に共通する 138 アミノ酸残基のうち、極性アミノ酸 66 残基がそれぞれアラニンに置換された変異型 PSS1 をコードする 66 種のプラスミドを構築した。これらを CHO-K1 細胞に一過性に過剰発現させ、PS 添加培地、非添加培地における PS 合成を比較する一方、細胞抽出液を調製し、セリン塩基交換活性を測定した。

B-3 SIN の遺伝子発現における PS の役割

レポーター遺伝子として lacZ 遺伝子をコードする SIN レプリコン RNA を細胞に導入した後、細胞内の β ガラクトシダーゼ活性を測定することにより、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現を検出した。レプリコン RNA 導入細胞から $100,000\times g$ 遠心で沈澱膜画分と上清を得た後、レプリカーゼ構成蛋白質 nsPl に対する抗体を用いて各画分のイムノブロット解析を行い、nsPl の膜分布を調べた。レプリコン RNA 導入細胞から RNA を抽出し、lacZ 特異的プローブを用いてノザンブロット解析を行い、レプリカーゼによって合成された lacZ mRNA 量を調べた。

B-4 リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

B-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)、 $[^3\text{H}]$ -glycerol-3-phosphate(G3P) (室町薬品)、 $[^3\text{H}]$ -serine (アマシャムバイオサイエンス)、マイクロシンチ E (パーキンエルマー)。

B-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。

B-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 $100,000\times g$ 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 $100,000\times g$ で遠心後、膜画分を回収した。

B-4-4) PGP 合成酵素活性の検出： $50\mu\text{l}$ の反応液 ($0.1\text{ M Tris-HCl pH } 8.0$, $1\% \text{ Triton X-100}$, 0.1 M MgCl_2 , 40 nM CDP-DG , $1.85\text{ kBq/assay } [^3\text{H}]\text{-glycerol-3-phosphate}$, $0.07\mu\text{g protein(膜画分)/assay}$) で 1.5 hr 室温にて酵素反応を行なった後 $50\mu\text{l}$ の 1 N HCl in MeOH を添加し反応を停止させた。 $100\mu\text{l}$ 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 $^3\text{H-PGP}$ 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： $50\mu\text{l}$ の反応液 ($0.1\text{ M potassium phosphate buffer pH } 7.4$, $0.1\% \text{ Triton X-100}$, 1 mg/ml BSA , 250 nM CDP-DG , $3.7\text{ kBq/assay } [^3\text{H}]\text{-serine}$, $0.16\mu\text{g}$

protein(膜画分)/assay) で 1.5 hr 、室温にて酵素反応を行なった後 $50\mu\text{l}$ の 1 N HCl in MeOH を添加し反応を停止させた。 $100\mu\text{l}$ 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 $[^3\text{H}]\text{-PS}$ 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。

(倫理面への配慮)

本研究においては倫理面で特に配慮する実験は含まれていない。

C. 研究成果

C-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。また、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。さらに昨年度、組換え型の PS 合成酵素 2 を SDS-PAGE 上では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、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。本年度は、PS による PSS2 の活性阻害機構を明らかにする目的で、精製 PSS2 を用いて PS 存在下と非存在下における酵素反応を反応速度論的に解析した。具体的には、PS 存在下と非存在下における PSS2 活性の容量依存性、時間依存性、基質 (セリン) 濃度依存性等を比較した。その結果、PS はセリンに対して非拮抗的に PSS2 活性を阻害することが明らかとなった。このことから、PS は PSS2 のセリン結合部位とは異なる部位に結合して PSS2 活性を阻害することが示唆された。

C-2 PS 合成酵素 1 の活性部位及び調節部位の探索

我々はこれまでに PSS1 の Arg-95 がこの酵素

の PS によるフィードバック制御に重要なアミノ酸残基であることを明らかにしている。しかしながら、PSS1 にはバクテリアや酵母の PS 合成酵素を含め既知酵素との類似性がないことから、活性部位及び調節部位、あるいはその分子機構に関してほとんどが未知である。そこで本研究では PSS2 との間にみられるアミノ酸配列上の約 32 % の相同性に着目し、両者に共通する極性アミノ酸 66 残基を逐一アラニンに置換してそれら変異の及ぼす影響について検討することにより、酵素活性に関わるアミノ酸残基および活性調節に関わるアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、アラニン置換により PS 合成活性或いは酵素発現量を著しく低下させるもの、PS 合成調節に異常を生ずるものをそれぞれ 13 残基、6 残基見出し出した。これらの中に酵素活性、活性調節双方に影響するものはなかった。

C-3 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

我々はこれまでに、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 CHO 細胞の PS 合成変異株を利用して、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現に PS または PE が関与することを見いだしている。今年度は PS 含量のみを減少させることができる別の PS 合成変異株 (PSB-2) を利用し、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現への PS の関与を解析した。その結果、PSB-2 株における SIN レプリカーゼによる遺伝子発現は、PS 含量が特異的に減少する培養条件で低下することを見いだした。一方、全て細胞の装置を利用する SV40 プロモーター依存の遺伝子発現は、同条件の PSB-2 株において低下しなかったことから、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現機構特異的に PS が関与することが示唆された。

次に、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現のどの過程に PS が関与するのかを解析した。レプリカーゼは膜に結合しているが、その膜結合はレプリカーゼを構成する nsP1 蛋白質が担うことが示唆されている。そこで nsP1 の膜画分への分布を調べたが、膜分布は PS 含量の低下により影響を受けず、レプリカーゼの膜結合阻害が原因で遺伝子発現が低下したのではないと推察された。また、PS 含量が低下した PSB-2 株において、レプリカーゼによって合成された RNA 量は正常レベルであった。SV40 プロモーターによる遺伝子発現の結果から、PS 含量が低下していても細胞の蛋白質合成能は低下していないと考えられた。以上の結果からレプリカーゼにより RNA が合成されてからその RNA が翻訳されるまでの間に、PS が関与する過程があると考えら

れた。

C-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た。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(微生物ブロスライブラリー)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、それらの阻害物質の抗微生物薬としての開発可能性を検討しながら化合物の評価を行なった。

今回は微生物ブロスライブラリーを用いて PGP 合成酵素阻害物質のスクリーニング、精製、構造解析を行なった結果、Compound X、Compound Y という 2 化合物の同定に至った(表 1)。両化合物とも大腸菌由来 PGP 合成酵素に対し IC₅₀ 値 6 μ g/ml の阻害活性を有するが、大腸菌由来 PS 合成酵素に対してはそれぞれ 50、100 μ g/ml の IC₅₀ 値を示し、PS 合成酵素よりも PGP 合成酵素に選択的な阻害物質であることが示唆された。Compound X はグラム陽性菌に対し抗菌活性を示したが、グラム陰性菌の大腸菌に対しては抗菌活性を示さなかった。また増殖した枯草菌液に Compound X を添加すると溶菌が起こることが分かった。一方、Compound Y はグラム陽・陰性菌とも弱い抗菌活性しか示さなかった。動物細胞に対する影響については両化合物とも 33 μ g/ml で HepG2 に細胞障害性を示さなかった。

D. 考察

D-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

本研究により、PS は PSS2 のセリン結合部位とは異なる部位に結合して PSS2 活性を阻害することが示唆された。従って、PS による PSS2 の活性阻害は、単純なプロダクト阻害ではなく、PSS2 に PS が結合する活性調節部位が存在するものと考えられる。この推定活性調節部位は、細胞内の PS レベルを感知するセンサー部位として機能している可能性があり、今後その実体を明らかにしたい。

D-2 PS 合成酵素 1 の活性部位及び調節部位の探索

PSS1 の酵素活性或いは酵素発現量、及び活性調節に関わるアミノ酸残基をそれぞれ 13 残基、6 残基同定した。活性部位は一次構造上中央部の領域で膜内に及んで構成され、活性調節部位とは別に存在していることが示唆された。

D-3 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 PS が関与しているのは、RNA が合成されてから翻訳されるまでの過程、具体的には翻訳に必要な RNA の修飾や構造変化、または膜上で合成された RNA が翻訳の場へ輸送される過程であると考えられた。この過程に関与する SIN 蛋白質のうち、具体的にどの蛋白質の役割に PS が必要なのかは、今後の解析により明らかにしたい。

D-4 リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

大腸菌 PGP 合成酵素の構造遺伝子 *pgsA* は必須遺伝子であり、その破壊株は生育できないことがわかっている。しかし、外膜主要リポ蛋白質 (Lpp) の構造遺伝子 (*lpp*) の欠損変異が共存すると致死性が抑制される。両遺伝子が欠損した株ではホスファチジルグリセロール (PG) とカルジオリピン (CL) が共に検出限度以下であるが LB 培地で生育可能となる (低浸透圧培地、最少培地では生育できない)。LPP の前駆体であるプロ LPP は PG からジアシルグリセリル基を受け取り修飾され、シグナルペプチダーゼで切断されて成熟 LPP となる。PG が不足するとプロ LPP が蓄積し、それがペプチドグリカン層に悪影響を及ぼすことで菌が溶菌すると考えられている。

今回の実験で、増殖した枯草菌液に *Compound X* を添加すると溶菌が起こることが分かった。これは *Compound X* の添加により枯草菌の細胞壁に障害が生じていることを示唆している。*Compound X* がグラム陽性菌に対して示した抗菌活性が PGP 合成酵素阻害によるかどうかの直接的な証明はないが、枯草菌に対し溶菌活性を示すことから PGP 合成酵素阻害が抗菌活性に関与している可能性も考えられる。

Compound Y は *Compound X* と同程度の酵素阻害活性を有しながらグラム陽・陰性菌とも弱い抗菌活性しか示さなかった。この理由については明確ではないが、なんらかの理由で化合物が標的酵素に到達できないことによると考えられる。

E. 結論

E-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 は PSS2 のセリン結合部位とは異なる部位に結合して PSS2 活性を阻害することが示唆された。

E-2 PS 合成酵素 1 の活性部位及び調節部位の探索

PSS1 は疎水性分析の結果、疎水性が極めて高く、膜を複数回貫通する膜内在性酵素と予測さ

れている。今回同定されたアミノ酸残基の Hydropathy prot 上の位置を検証したところ、酵素活性或いは酵素発現量に関わるアミノ酸残基は、いずれも疎水性の高い領域に分布しており、中でも酵素発現量には影響しないものは、全て一次構造上中央付近に集中していた。本酵素が基質とする既存リン脂質は膜の脂質二重層由来と考えられることから、これらの領域で活性部位が構成されている可能性が示唆された。一方、精製 PSS2 による解析から PS 生合成のフィードバック制御は PS の直接作用によるものと示唆されているが、今回、活性調節に関わるアミノ酸残基の多くが、活性に関わるアミノ酸残基から離れていたことから、活性調節部位は活性部位と別にあり、アロステリック効果による制御であることが示唆された。

E-3 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 の遺伝子発現に PS が特異的に関与することを見いだした。レプリカーゼにより RNA が合成されてからその RNA が翻訳されるまでの間に、PS が関与する過程があると考えられた。

E-4 リン脂質を標的とする抗微生物薬の探索

微生物ブロスライブラリーを用いて PGP 合成酵素阻害物質のスクリーニングを行なった結果、2 つの阻害物質を同定した。そのうちの 1 つはグラム陽性菌に対して抗菌活性を有しており、菌を溶菌させる活性もあることがわかった。それらの活性が PGP 合成酵素阻害によるかどうかを現在解析している。また新たな候補化合物をもとめスクリーニングを継続している。

F. 研究発表

1. K. Hanada and M. Nishijima: Purification of mammalian serine palmitoyltransferase, a hetero-subunit enzyme for sphingolipid biosynthesis by affinity-peptide chromatography, *Methods in Molecular Biology: Membrane Protein Protocols*, Edited by S. Selinsky, Human Press, 163-174, 2003
2. K. Kawasaki and M. Nishijima: Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from cultured mammalian cells, *Methods in Molecular Biology: Membrane Protein Protocols*, Edited by S. Selinsky, Human Press, 175-186, 2003
3. O. Kuge and M. Nishijima: Biosynthetic

regulation and intracellular transport of
phosphatidylserine in mammalian cells, J.
Biochem., 133, 397-403, 2003

4. O. Kuge, K. Hasegawa, T. Ohsawa, K. Saito,
and M. Nishijima: Purification and
characterization of Chinese hamster
phosphatidylserine synthase 2, J. Biol.
Chem., 278, 42692-42698, 2003

平成15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16年9月30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