

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 花田 賢太郎

研究要旨 真菌イノシトールホスホセラミド合成酵素の半自動化活性検出系を構築し、阻害剤の探索を開始した。哺乳動物細胞内セラミド輸送タンパク質のセラミド分子種特異性を明らかにした。出芽酵母より温度感受性グリセロリン脂質代謝異常変異株を多数分離した。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 西島正弘
齋藤恭子
- (2) 明治製菓(株)創薬研究部門 星子繁
- (3) 九州大学大学院理学研究院 久下理

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、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。このような状況の中で、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。

病原微生物による感染において、宿主細胞の生体膜は病原体の細胞内侵入や増殖など種々の過程で重要な役割を果たしている。本研究では、宿主細胞膜の主要構成成分である膜脂質の生合成と機能発現機構に関する研究を遺伝生化学的手法を用いて展開し、その成果を基盤に、細菌、真菌、ウイルス等の病原微生物感染成立における宿主膜脂質の役割を解明する。さらに、宿主細胞と病原微生物との間の脂質代謝経路の違いを見出し、病原微生物の脂質代謝を特異的に阻害する物質を探索・発見して、新規抗微生物薬開発のためのリード化合物とする。

本課題の研究組織において、国立感染症研究所および九州大学大学院に所属する研究者らは、哺乳動物培養細胞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。さらに、スフィンゴ脂質生合成過程で起こる脂質セラ

ミドの選別輸送を担う分子装置が宿主細胞と真核微生物との間で異なっていることも明らかにした。そして、明治製菓株式会社の創薬研究部門には、実際に数多くの抗生剤開発を行った実績があり、そのための知見と技術が集積している。

本研究組織中における役割分担は以下の通りである。国立感染症研究所細胞化学部チームは、脂質の代謝と機能の解析および宿主細胞における脂質代謝異常が病原体感染に与える影響の解析を担当する。九州大学大学院理学研究院チームは、真菌における細胞内リン脂質輸送の解析を出芽酵母をモデルとして解析し、一方で、哺乳動物細胞のホスファチジルセリン(PS)の生合成機構とその調節機構を解析する。明治製菓(株)創薬研究部門チームは、上記2チームの研究から得られた知見を基盤として、脂質代謝をターゲット部位とするような新規抗微生物剤の探索系を構築し、実際の探索を実施する。

抗真核病原体薬のターゲットとして脂質代謝は注目を集めつつある。本研究では、宿主および微生物の脂質代謝・機能に関する研究をさらに発展させることで、脂質代謝系を標的とする新規な抗病原体剤の合理的な探索系を創出し、実際にそのような新規化合物を見出すと期待される。

B. 研究方法

B-1-1) 放射性短鎖セラミドを基質に用いた *Candida albicans* イノシトールホスホセラミド合成酵素(ICPS)活性検出法

C. albicans 菌体を回収後、ガラスビーズにて破碎し、100,000×gで遠心後、ミクロソーム膜画分を回収し、これを酵素源とした。20 μlの反応液(20mM

Tris-HCl pH 7.0, 20mM KCl, 0.25%胆汁酸ナトリウム, 1.85 kBq/assay N-Acetyl-D-erythro-dihydrospingosine [4,5-³H] (³H]C₂-dhCer) (室町薬品), 1.75 μg protein(膜画分)/assay)で 1.5 時間、室温にて酵素反応を行なった後、3 μl の反応液を TLC 板にスポットし、CHCl₃/methanol/NH₄OH = 9:7:2 を展開溶媒として展開を行った。イメージングプレート、BAS3000 システム(共に富士写真フィルム社)を用いて放射活性の測定し、それを指標に酵素活性を検出した。

B-1-2) スフィンゴミエリン合成酵素(SMS)の発現酵母株を用いた IPCS と SMS の同時検出法

DNA データバンク情報をもとにヒト由来 SMS1, SMS2 cDNA をそれぞれ PCR で増幅し、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 発現用プラスミドにクローン化した。これらプラスミドを導入して、SMS 発現酵母株を作製した。SMS1 もしくは SMS2 発現酵母から調製した細胞抽出液を酵素源として、蛍光標識セラミド類似体 C₆-NBD-セラミド (C₆-NBD-Cer ; Molecular probes 社) を基質として混合し、37°C、20 分間反応させた。その後、脂質画分を Bligh & Dyer 法により抽出し、遠心減圧濃縮機を用いて濃縮乾固した。乾固した脂質画分を、展開溶媒 (CHCl₃/methanol/酢酸/水 = 25:15:4:2) を用いた TLC にて分離した。TLC にて分離した C₆-NBD-IPC あるいは C₆-NBD-SM は、その蛍光により検出した。

B-2) IPCS 阻害剤の半自動探索法

探索サンプルを分注した 96 穴プレート内で、B-1-1 に記載した条件下、酵素反応を行った後、96 チャンネルの分注ヘッドを有した自動分注器 (Multimek96 ; ベックマン社)で 3 μl の反応液を TLC 板上にスポットした。乾燥後、同じ分注器で同じスポット上に 10 μl の展開溶媒を 3 回分注することで同心円状に反応液を展開した。中心に残存した放射活性の測定を BAS 3000 システムを用いて行い、それを指標に酵素阻害活性を検出した。

B-3) セラミドの膜間転移反応の無細胞検出法

[¹⁴C]C₁₆-セラミド ([パルミトイル-¹⁴C] N-パルミトイル-D トシルセラミド/放射性セラミド = 64:16:8:1 から構成される人工膜、受容膜は PC/PE = 4:1 で構成される人工膜である。必要な量の脂質のクロロホルム溶液をポリプロピレンマイクロチューブに分取したのち、窒素ガスを吹き付けて乾固させた。乾固した脂質混合物に、供与膜調製では脂質濃度が 1.77 mg/ml になるように、受容膜調製では 5.33 mg/ml になるように緩衝液[50 mM NaCl および 1 mM EDTA を添加した 20 mM ヘペス-NaOH 緩衝液 (pH 7.4)]を加えた後、投げ込み式超音波発生器を用いて超音波処理(25°Cの水浴上で 10 分間)行った。

ついで 4°C、12,000 x g、30 分間の条件で遠心し、それぞれの上清画分を供与膜あるいは受容膜として用いた。

CERT によるセラミドの膜間転移促進活性を以下のように検出した。供与膜中セラミドの 0.4%モル等量に当たる 2 ピコモル相当の CERT 精製組換え体 (もしくは、ネガティブ対照として START ドメイン欠損 CERT 変異体(CERTAST)) と 60 μl の受容膜を、緩衝液 1 を用いて 80 μl にメスアップした。ここに 20 μl の供与膜を加えて反応を開始し、37°C で 15 分間保温した。ヒマ豆レクチン(2.5 mg/ml)を 30 μl 加え、ピペッティングにより攪拌することによって供与膜を凝集・沈降させ、転移反応を終了させた。凝集体を十分に形成させるため、氷浴上でさらに 15 分間保温したのち、4°Cで 12,000 x g、3 分間の条件で遠心した。上清をピペットで採取し、沈降した供与膜は 130 μl の 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムにて溶かした。液体シンチレーションカウンターで、上清と沈殿した供与膜の放射活性を測定することにより、セラミドの膜間転移量を測定した。タンパク因子を全く含まなくとも上清に分配される放射活性は、沈降せずに上清に残る供与膜に由来するバックグラウンド放射活性とみなして差し引いた。

B-4-1) 温度感受性酵母変異株の分離

出芽酵母 (*S. cerevisiae*) (BY4741-YNL169C, MATa leu2 Δ 0 his3 Δ 1 ura3 Δ 0 met15 Δ 0 psd2 Δ ::KAN^r あるいは BY4741-YNL169C, MATa leu2 Δ 0 his3 Δ 1 ura3 Δ 0 met15 Δ 0 psd1 Δ ::KAN^r) を YPD 液体培地、30°Cで 1 日培養し、滅菌水で 2 回洗浄後、2 x 10⁸ cells/ml となるように 3% (v/v) EMS を含む 0.1 M のリン酸緩衝液中に懸濁し、30°C、60 分間保温することにより変異を導入した。変異剤処理した酵母を YPD プレートに約 200 個のコロニーができるようにまき、23 °Cでコロニーを形成させた。このコロニーを、ベルベット布を用いたレプリカ法により新しい 2 枚の YPD プレートにレプリカし、1 枚のプレートは 23 °Cでもう一枚は 37 °Cで保温した。23 °C と 37 °Cで保温したプレートのコロニーを比較することにより、23 °Cでは増殖できるが 37 °Cでは増殖することのできない温度感受性変異株を選択した。

B-4-2) 酵母リン脂質の代謝標識と分析

酵母をセリン不含の SC(-Ser) 液体培地中、23 °C、2 日間前培養し、その一部を SC(-Ser) 培地で OD⁶⁰⁰=0.8、全量 0.4 ml となるように希釈し、37 °C、1 時間培養した。この培養液に 0.25 μCi の [¹⁴C]serine を加え、37 °C、3 時間さらに培養した。代謝標識した酵母を水で洗浄後、0.15 ml の 80%エタノールに懸濁し、80 °C、15 分加熱することによ

り酵母内在性のリン脂質分解酵素を不活性化した。加熱処理液に 0.4 ml CHCl₃, 0.4 ml methanol, 0.33 ml 0.2 M KCl を加え、激しく攪拌、遠心し、脂質を CHCl₃ 層に抽出した。CHCl₃ 層を分取、乾固し、得られた脂質を TLC (展開溶媒: CHCl₃/methyl acetate/1-propanol/methanol/0.25% KCl = 50:50:50:20:18) にて分離し、各リン脂質に取りこまれた放射活性をイメージアナライザーで分析した。

B-5) その他
 シンドビスウィルス (SIN) レプリカーゼ依存遺伝子発現に対する宿主細胞 PS の役割の解析においては、SIN レプリカーゼを構成する nsP1-4 蛋白質の遺伝子とサブゲノミックプロモーター下流に lacZ 遺伝子をコードするレプリコン RNA を PS 合成欠損 CHO 細胞変異株に導入し、PS 含量が低下する条件としない条件で培養後、細胞を回収した。細胞からホモジネートを調製し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。また、細胞から RNA も抽出し、lacZ 遺伝子特異的なプローブを用いてノザンプロット解析を行った。

哺乳動物細胞型 PS 合成酵素の相同遺伝子の比較解析は、チャイニーズハムスターの PS 合成酵素 (PSS) 1 遺伝子と相同性のある遺伝子を種々のモデル生物のゲノムデータベース上で検索し、*in silico* 解析した。

(倫理面への配慮) 本研究は、主として微生物と動物培養細胞を用いて行うものであり、これらの研究では特に倫理面で問題になることはない。なお、DNA 組換え実験については指針に従って実験を行い、培養細胞への感染実験などは P2 レベルの実験室で行った。

C. 研究結果

C-1) IPCS 阻害剤探索法および候補物質の評価系の構築

C-1-1) IPCS 阻害剤探索法の構築:

イノシトールホスホセラミド (IPC) 関連脂質は、真菌類などには存在するが哺乳動物細胞には存在しない脂質群である。IPC 合成を司る酵素・IPCS は、真菌の生育に必須の遺伝子産物であり、その阻害剤は新たな抗真菌剤候補として注目される。研究方法 B-1-1 に記述した手法により IPCS 反応を行い反応生成物を TLC 解析したところ、酵素源として用いたミクロソーム膜面分の添加濃度依存的に増加するバンドが確認でき、そのバンドは IPCS の既知阻害物質として知られている Aureobasidin A (AbA) 1 μg/ml により消失することが分かった。よってこの

反応系により IPCS 活性が検出できると判断し、HTS (High Throughput Screening) 化の検討を行うことにした。

スクリーニングのスループットを向上させる目的で、TLC の同心円状展開の検討を行なった。酵素反応後 96 チャンネル分注ヘッドの自動分注器 (Multimek96; ベックマン社) で 3 μl の反応液を TLC 板上にスポットし、乾燥後同じ場所に展開溶剤を Multimek 96 で分注し、未反応の反応基質および反応生成物を同心円状に展開した (図 1)。放射能イメージ解析システムを用い中心に残存するスポットの濃さ (PSL 値) を指標に酵素活性を測定した。この方法で AbA の濃度依存的な酵素阻害活性を検出したところ、阻害曲線が通常の TLC で検出した場合とほぼ一致したことから (図 1 B)、このアッセイ法でのスクリーニングが可能であると考えられた。

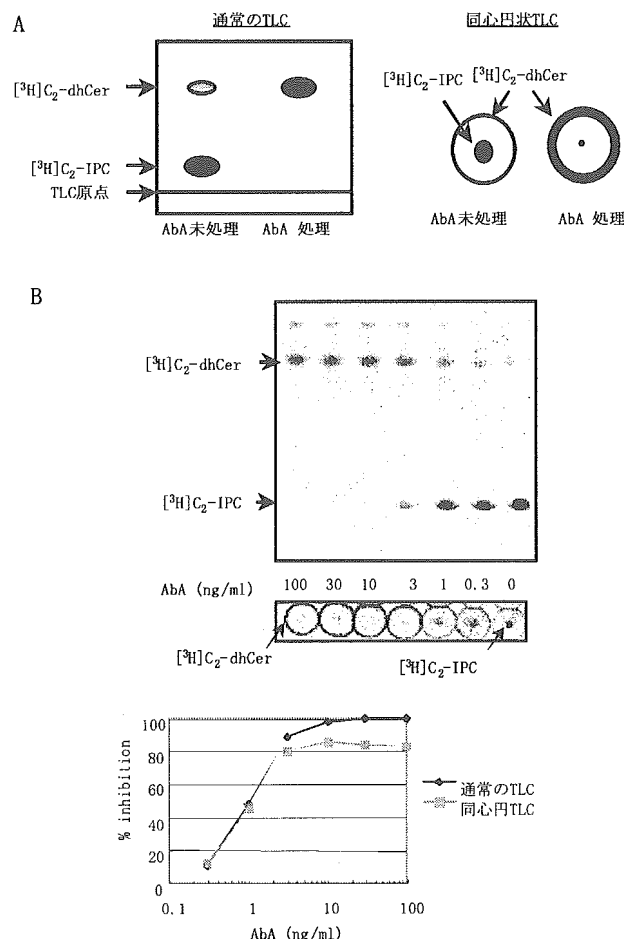


図 1 $[^3\text{H}]C_2\text{-dhCer}$ を基質とした IPCS 活性検出系 A, IPCS 反応における基質と産物の TLC 分離パターン概略図; B, 実際の TLC 分離パターンおよび $[^3\text{H}]C_2\text{-IPC}$ 生産の AbA 感受性

C-1-2) SMS 合成酵素を発現させた酵母細胞を用いた IPCS と SMS の同時検出系の構築

最近、哺乳動物由来の SMS が同定され、少なくとも

も2種類の遺伝子産物(SMS-1, SMS-2)がそれぞれにホスファチジルコリン(PC)からホスホコリンをセラミドに転移してSMを合成する反応を触媒する活性を持つことが示された。そこで、薬剤がIPCSとSMSに与える影響を同時に検出する系を構築するために、ヒト由来SMS-1またはSMS-2 cDNAをクローニングして、それらcDNAを導入した出芽酵母株を得た。その細胞破砕液を酵素源とし、また、蛍光標識セラミド類似体C₆-NBD-Cerを基質として反応させたところ、内在性IPCSによるC₆-NBD-IPC生産だけでなくC₆-NBD-SMの生産が起こり、特にhSMS-2導入株で高いC₆-NBD-SM生産が見られた(図2)。なお、空ベクターを導入した対照酵母細胞抽出液ではC₆-NBD-SMの生産は起こらず、また、C₆-NBD-IPC生産はIPCS阻害剤AbAで選択的に消失すること、そして、ヒトHeLa細胞抽出液ではC₆-NBD-SMの生産は起こるがC₆-NBD-IPC生産は起こらないことも確認した(図2)。これらことは、本実験系が、IPCSとSMSの活性を同時に検出できる実験系であることを意味している。本実験系は、IPCS阻害剤候補の特異性を評価することに有用であった(C-2-2参照)。

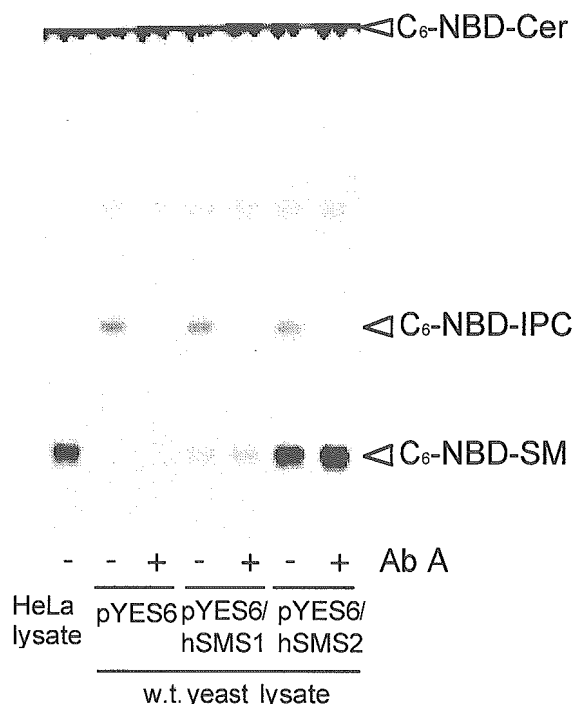


図2 IPCSとSMSの同時検出

各種酵素源を用い、1 μM AbA存在下もしくは非存在下でC₆-NBD-Cerを基質として反応後、抽出した脂質をTLCで分離し、UV照射下で検出した蛍光性脂質パターンを示した。

C-2) IPCS阻害剤のスクリーニングと候補化合物の評価

C-2-1) 人工化合物ライブラリーからのIPCS阻害

剤のスクリーニング

S. cerevisiae, *C. albicans*, *A. fumigatus*のいずれかに対して抗真菌活性を有する合成化合物のライブラリー(1,645化合物)についてスクリーニングを行った。反応系への添加化合物濃度は終濃度25 μg/ml(溶剤DMSO 5%)とした。酵素反応終了後、3 μlの反応液を2枚のTLC板にスポットし、乾燥後に同じ場所に10 μlの展開溶剤を3回分注し、同心円状に展開した。このTLC展開系では、反応基質は溶媒先端近くまで移動するが、IPC相当の反応産物は、スポット位置近くに残ったままである(図1)。そこで、中央に残存する放射活性をBAS 3000システムによりPSL値として測定し、5% DMSO添加群のPSL値を100とした時の放射活性を酵素活性(activity%)として算出した。TLC2枚とも酵素活性が50%以下であったサンプルをヒットとした。ヒット化合物の絞り込みを行なった結果4ヒット化合物を得た。4化合物ともIC₅₀が10 μg/ml程度の酵素阻害活性を示したが、Compound A以外の3化合物については他の酵素にも阻害活性を有しており非選択的な阻害物質であることが示唆されたため、Compound Aについてさらなる解析を行った。

C-2-2) Compound Aの解析

Compound Aは、研究方法B-1-1に記載したような³H]C₂-dhCerを基質とする反応系に添加すると³H]C₂-IPC相当産物の生成を抑えるが、その一方で未知の反応生成物が生じた(図3)。各種検討の結果IPCS以外の酵素反応で基質³H]C₂-dhCerと反応していることが示唆された。

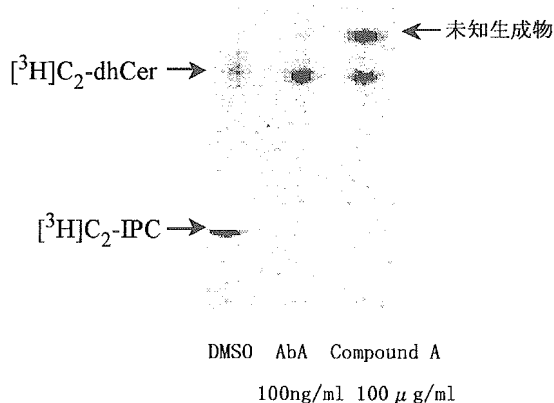


図3 C₂-dhCerからC₂-IPCへの変換反応に対するAbAとCompound Aの影響

また、C-1-2に記載したC₆-NBD-Cerを基質とした反応系においては、Compound Aは、C₆-NBD-IPCよりもC₆-NBD-SMへの変換を阻害したことから本化合物がIPCSの特異的阻害剤ではないと結論さ

れた。なお、CHO 細胞を用いた代謝標識実験によって、Compound A は SMS の選択的阻害剤ではないことも明らかにした。

C-2-3) 微生物培養液からの IPCS 阻害剤のスクリーニング

新たな阻害物質を求めて微生物培養液からのスクリーニングも進めている。その過程の中で、AbA 生産株の培養液が当スクリーニング系でヒットすることが確認できた。現時点で 2,000 サンプルのスクリーニングが終了しており、ヒットサンプルの解析中である。

C-3) セラミド輸送タンパク質 CERT の解析

主要膜リン脂質の一つであるスフィンゴミエリン (SM) の生合成では、小胞体で合成されたセラミドがゴルジ体に移行して SM へと変換される。我々は、細胞内セラミド選別輸送の欠損 CHO 細胞変異株を分離・解析し、その欠損を回復する遺伝子をクローニングする手法を通じて、セラミド選別輸送を担う特異的因子 CERT の同定に成功した。CERT は、小胞体に会合するドメイン、ゴルジ体に会合するドメイン、およびセラミドを脂質膜から特異的に引き抜くドメインを持つことを明らかにしてきた。

本年度は、人工膜を用いた膜間脂質転移アッセイによって CERT の基質認識選択性を詳細に解析した。その結果、CERT は、(1)セラミドの 4 つの立体化学異性体のうち、天然型の *D-erythro*-セラミドのみを認識し、(2)スフィンゴシン、SM、コレステロールなどの他の脂質は認識できない。ただし、ジアシルグリセロールはわずかに認識する一方、(3)ジヒドロ型およびファイト型セラミドは認識し、また、様々なアミド鎖長のセラミドも認識することが明らかとなった (図 4)。

また、CERT とセラミド基質の結合比は、1 対 1 であることも明らかにした。さらに、我々が以前開発したセラミド輸送阻害剤・HPA12 は、CERT のアンタゴニストであることも示した。

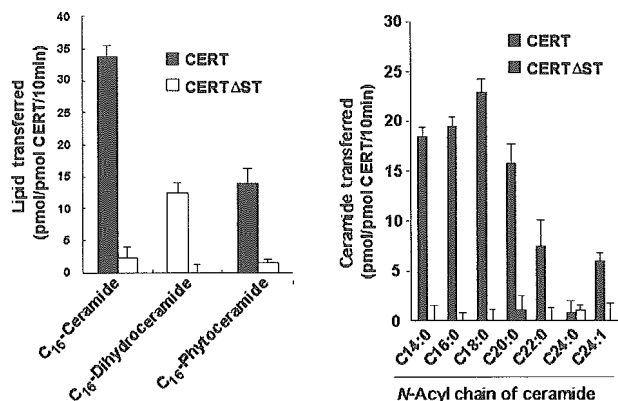


図 4 CERT が触媒する様々なセラミド分子種の膜間転移

C-4) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

酵母における主要リン脂質ホスファチジルコリン (PC) とホスファチジルエタノールアミン (PE) は、いずれも、特定の培養条件下では、ホスファチジルセリン (PS) を前駆体として合成される (図 5)。

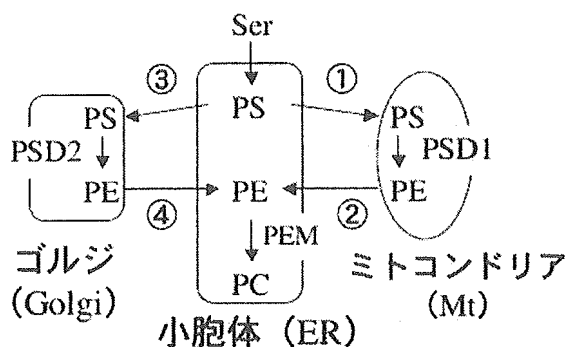


図 5 出芽酵母における PS 輸送経路

この代謝経路において PS は、図 5 に示されるように、小胞体で合成された後に、ミトコンドリアあるいはゴルジ (正確にはゴルジと液胞) に輸送される (経路 1 と 3)、それぞれに局在する PS 脱炭酸酵素 (PSD) 1 あるいは 2 の作用により PE に変換される。さらにこれらコンパートメントで合成された PE は、小胞体に戻され (経路 2 と 4)、PE メチル化酵素 (PEM) により PC に変換される。本研究では、まず、これら 4 種類のリン脂質輸送経路のいずれかに損傷を有する酵母変異株の分離を試みた。

ミトコンドリアあるいはゴルジが関与する PS の代謝反応を選択的に解析する目的で、リン脂質輸送経路 1 あるいは 2 損傷変異株の分離には、PSD2 を欠損した酵母を親株として用い、一方、経路 3 あるいは 4 損傷変異株の分離には、PSD1 欠損株を親株として用いた。これらの酵母を親株として用いることにより、経路 1 ~ 4 の損傷変異株はそれぞれ表 1

に示す表現型を示すと予想できる。すなわち PSD2 欠損株を親株として用いた場合、経路 1 損傷株は PE と PC の合成の両者が低下すると予想され、経路 2 損傷株は PC の合成のみが低下すると予想される。一方、PSD1 欠損株を親株として用いた場合、経路 3 損傷株は PE と PC の合成の両者が低下すると予想され、経路 4 損傷株は PC の合成のみが低下すると予想される。また、経路 1~4 によるリン脂質輸送は、いずれも細胞増殖に必須の反応と予想される。そこでまず、これらのリン脂質輸送が制限温度 (37°C) において異常となる変異株を濃縮する目的で、許容温度 (23°C) では増殖することができるが制限温度 (37°C) では増殖することのできない温度感受性変異株のコレクションを PSD1 欠損株と PSD2 欠損株を用いて構築した。(変異剤処理した PSD1 欠損株および PSS2 欠損株から、それぞれ約 800 株と 1,200 株の温度感受性変異株を分離した。) 次に、各温度感受性変異株それぞれ全て (約 2,000 株) を、制限温度において放射性セリンで代謝標識し、新規に合成された PS の PE と PC への変換を調べることにより、表 1 に示す表現型を示す変異株を検索した。

その結果、リン脂質輸送経路 1, 2, 3, 4 に損傷を有することが期待される変異株をそれぞれ約 40 株、4 株、約 10 株、1 株分離することに成功した。

親株	損傷経路	表現型
PSD 2 欠損株	① ER → Mt	PE ↓, PC ↓
	② Mt → ER	PC ↓
PSD 1 欠損株	③ ER → Golgi	PE ↓, PC ↓
	④ Golgi → ER	PC ↓

表 1 PS 輸送経路の損傷と予測される表現形

C-5) その他

上述した他にも、以下のような結果を得た。

PS 合成酵素 1 と 2 は、いずれもそのアミノ酸配列から、小胞体膜を複数回 (9 ないし 10 回) 貫通する膜酵素と推定されているものの、その生体膜への挿入様式 (膜トポロジー) は不明である。そこで、PS 合成酵素 1 および 2 の N 末に FLAG タグ、C 末に HA タグを連結した組換え体の免疫蛍光顕微鏡観察により、PS 合成酵素 1 および 2 の N 末と C 末がともに小胞体膜の細胞質側に露出されていることを明らかにすることができた。PS 合成酵素 1 と 2 の両者は小胞体膜を 10 回貫通し、その N 末端と C 末端

がいずれも小胞体の細胞質側に露出していることが示唆された。

PS 合成酵素 1 の精製は未だ報告されていない。エピトープ・タグを付加させた PS 合成酵素 1 を HeLa 細胞で発現させ、その膜面分から PS 合成酵素 1 を可溶化して、部分精製することに成功した。

チャイニーズハムスターの PS 合成酵素 (PSS) 1 遺伝子とアミノ酸配列相同性のある遺伝子がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) など、多岐にわたる多細胞生物で保存されていることを示唆した。昨年度までのアラニン置換変異型酵素の解析で明らかになった酵素活性及び活性調節に関わるアミノ酸残基についてみると、酵素活性に関わるもの 8 残基は上述の生物すべてで保存されていた。

シンドビスウィルス (SIN) レプリカーゼ依存性遺伝子発現系において、レポーター遺伝子産物の生産量は、宿主細胞の PS レベルが低下すると対照レベルの約 50%に低下したが、レポーター遺伝子 mRNA 量は変化はなかった。従って、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であると考えられた。

D. 考察

D-1) ICPS 阻害剤探索法および候補物質の評価系の構築

スフィンゴ脂質は真菌の生育に重要な役割を担っており、その生合成系は動物細胞と真菌で異なっていることから抗真菌薬の標的として注目されている。スフィンゴ脂質生合成系の中でも ICPS は真菌の生育に必須であり、さらに、この酵素の活性を阻害することで抗真菌活性を示す天然物として Aureobasidin A (AbA)、Khafrefungin、Rustmicin が実際に見出されていることから、抗真菌薬の標的として魅力的である。しかし、この酵素のアッセイ法は、未反応の基質と反応生成物を分離し反応生成物のみを検出することが困難なため、HTS 化した報告はなかった。報告のあるスクリーニング法は、ラジオアイソトープで標識されたイノシトールの菌体への取り込みを指標にしたスクリーニングが主なものであり、酵素アッセイによる大規模なスクリーニングはあまり実施されていないと予想される。

今回の研究により放射性短鎖セラミド・ $[^3\text{H}]\text{C}_2\text{-dhCer}$ を基質として酵素反応を行い、TLC 展開をす

ると、基質と反応生成物をきれいに分離できることが分かった。しかし、通常の TLC 展開でスクリーニングを実施するとスループットが悪く、多量の検体を処理するのは不可能であった。そこで今回 96 チャンネル分注ヘッドの自動分注器を用いて、酵素反応液を同心円状に TLC 展開することで未反応の反応基質と反応生成物を分離し、酵素活性を 96 穴フォーマットで検出できるスクリーニング系を構築した。この系では、AbA 数 ng/ml での酵素阻害を検出できることから、検出感度も良いことが分かった。これにより比較的多量な検体をスクリーニングにかけることが可能となった。

一方、IPCS 阻害剤候補の特異性を予備的に評価する実験系として、IPCS/SMS 同時検出系を構築した。ヒト由来 SMS-1 または SMS-2 を出芽酵母で発現させ、細胞破砕液を酵素源、蛍光標識セラミド類似体 C_6 -NBD-Cer を基質とすることで、IPCS と SMS の活性を簡便に同時検出可能となり、この系は IPCS 阻害剤候補の特異性評価に実際に利用できた。

D-2) IPCS 阻害剤のスクリーニングと候補化合物の評価

$[^3H]C_2$ -dhCer を反応基質として同心円 TLC を行うスクリーニング系によりスループットは格段に上がったが、大量の合成化合物ライブラリー全てについてスクリーニングを実施するのは困難であったため、まず抗真菌活性を有する化合物のライブラリーを優先してスクリーニングすることにした。その結果、候補化合物 Compound A を得た。

Compound A 添加条件で酵素反応を行うと $[^3H]C_2$ -IPC の生成が阻害されることが TLC 解析で確認されたが、その一方で未知の反応生成物が生じていることが分かった。その未知の反応生成物は AbA による阻害の場合は生じなかった。各種検討の結果、IPCS 以外の酵素反応で Compound A と基質 $[^3H]C_2$ -dhCer が反応していることが示唆された。Compound A の特異性について、 C_6 -NBD-Cer を基質とした IPCS/SMS 同時アッセイ系を用いて評価したところ、本化合物は C_6 -NBD-IPC、 C_6 -NBD-SM 両者の生産に影響を示した。これより、当候補物質が IPC 合成の特異的阻害剤ではないことが明らかになるとともに、IPCS/SMS 同時アッセイ系が IPCS 阻害剤候補物質の特異性の評価に有効であることも示された。Compound A は *C.albicans* に対し最小阻害濃度で 6.25 μ g/ml の抗真菌活性を有しているが、これは IPCS 阻害によるものではなく、他の作用機序によるものと考えられる。また動物細胞に対する障害性もあることから抗真菌薬としての可能性は低いと判断し、

それ以上の解析を中止した。

新たな酵素阻害物質を求め、微生物培養液をスクリーニング源としたスクリーニングを実施している。既知の IPCS 阻害物質は全て天然物由来のものであり、微生物生産物質に未知の阻害物質が存在することは大いに期待できる。

D-3) セラミド輸送タンパク質 CERT の解析

セラミドの 4 つの立体化学異性体のうち、天然型の D-erythro-セラミドのみが CERT によって膜間転移促進され、さらに、ジヒドロ型、ファイト型セラミドおよび様々なアミド鎖長のセラミドの人工膜間転移も CERT によって促進されることから、CERT は天然に存在する様々なセラミドを膜間転移に関わっていることが示唆された。また、CERT はわずかながらジアシルグリセロールの人工膜間転移を促進するので、CERT はゴルジ体にセラミドを運んで SM に変換させるだけでなく、SM 合成の際に生ずるジアシルグリセロールを小胞体などに運んでいるのかもしれない。

また、我々が以前開発したセラミド輸送阻害剤・HPA12 は、CERT のアンタゴニストであることも明らかになった。脂質代謝を制御する化合物は、医薬へと利用されているものもある。特異的な脂質輸送タンパク質を分子標的とする薬剤が存在しえることを示した本研究成果などから、今後、脂質選別輸送というステップも医薬開発の必要な標的として認識されていくであろう。

D-4) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

これまでに、国内外のいくつかの研究室で酵母からリン脂質輸送変異株を分離することが試みられているが、部分的損傷を有する変異株しか分離されていない。この原因は、その分離法に重大な欠点、すなわちリン脂質輸送の欠損が酵母に致死性をもたらすことを考慮していない欠点があるためと考えられる。本研究ではその欠点を含まない新しい方法で変異株分離を行い、多数のリン脂質輸送損傷変異株の候補が得られた。従って、これら目的変異株の候補には、リン脂質輸送において極めて重要な役割を担う遺伝子の変異株が多数含まれていると考えており、それら変異株の解析から、リン脂質の細胞内輸送機構に関する理解が飛躍的に深まることが期待される。

我々が行った変異株のスクリーニング法では PS 脱炭酸酵素やホスファチジルエタノールアミン・メチル基転移酵素などの合成酵素変異株も得られることが予想されるが、それらは、今後、酵素活性を測

定することにより簡単に排除できるものと考えられる。さらに今後、得られた各変異株が、リン脂質オルガネラ間輸送のどのステップにどの様な損傷を有するのかを明らかにし、また、得られた各変異株のリン脂質輸送損傷の原因遺伝子を同定することにより、リン脂質輸送に関与する様々な遺伝子 (Phospholipid Intracellular Transport から PIT 遺伝子群と命名する予定である) を明らかにする予定である。この時、目的遺伝子は、変異株の増殖に関する温度感受性を相補できる遺伝子として簡便に同定できるものと考えられる。また、変異株の損傷のマルチコピーサプレッサー遺伝子や変異株に合成致死性 (synthetic lethal) を与える変異遺伝子など、PIT 遺伝子群をさらに網羅的に同定・分離することも可能かもしれない。将来、得られた各 PIT 遺伝子の遺伝子産物の性状解析 (細胞内局在の同定、1 次配列から予想される機能の検証・確認、相互作用するタンパク質あるいはリン脂質の同定、推定高次構造の決定等) を行うことにより、リン脂質のオルガネラ間輸送の分子メカニズムの全貌を明らかにできると期待できる。

D-5) その他

PS 合成酵素 1 は、その推定アミノ酸配列から、生体膜を 9 回か 10 回貫通する膜内在性タンパク質であると推定されていた。PS 合成酵素 1 の N 末に FLAG タグ、C 末に HA タグを連結した組換え体の免疫蛍光顕微鏡解析を行った本研究により、PS 合成酵素 1 の N 末と C 末がともに小胞体膜の細胞質側に露出していることが示された。従って、PS 合成酵素 1 は生体膜を偶数回すなわち 10 回貫通しているものと示唆される。このことが正しいとすると、我々がこれまでに明らかにした PS 合成酵素 1 の活性に重要な役割を持つアミノ酸残基 8 個は、すべて小胞体膜脂質二重層の中央から内層に配置され、一方 PS 合成酵素 1 の活性制御に重要な役割を持つアミノ酸残基がすべて小胞体膜の外側 (細胞質側) に配置されることとなる。このことは、PS 合成酵素 1 が、小胞体細胞質側で PS の量を検知し、その必要に応じて小胞体内腔側で PS を合成するのではないかと想像させ、今後その証明が重要な研究課題の 1 つである。

近年次々と明らかとなっている多くのモデル生物のゲノム情報を基に、チャイニーズハムスターの PSS1 遺伝子の相同遺伝子を検索したところ、多くの多細胞生物のゲノムに当該遺伝子の候補が存在した。今日までに塩基交換反応による PS 合成活性が確認されているのはチャイニーズハムスターとマウ

スの PSS1 及び PSS2 であるが、哺乳動物細胞に限らず多くの多細胞生物で塩基交換反応により PS が合成されている可能性が示唆された。従って、細菌、真菌型の PS 生合成経路の特異的な阻害は、他の生物への毒性が極めて低いことが予想され、ヒトのみならず植物、魚類を対象として農業、漁業 (養殖) に向けた抗微生物薬開発への応用も期待できるかもしれない。

シンドビスウィルス (SIN) レプリカーゼ依存性遺伝子発現系において、レポーター遺伝子産物の生産量は、宿主細胞の PS レベルが低下すると対照レベルの約 50% に低下したが、レポーター遺伝子 mRNA 量は変化はなかった。従って、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であると考えられた。

E. 結論

E-1) ICPS 阻害剤探索法および候補物質の評価系の構築

真菌スフィンゴ脂質合成系を標的とした新規抗真菌薬の探索を目的とし、IPCS 活性を 96 穴フォーマットで検出することに成功した。これにより、比較的多量な検体を IPCS 阻害剤スクリーニングにかけることが可能となった。一方、IPCS と SMS の活性を同時検出可能な無細胞アッセイ系を構築し、それを IPCS 阻害剤候補化合物の特異性評価一次試験に利用した。

E-2) IPCS 阻害剤のスクリーニングと候補化合物の評価

明治製菓チームが化合物ライブラリーのスクリーニングから IPCS の阻害剤候補として Compound A を見出し、この化合物の特異性を感染症研究所チームが 'IPCS/SMS 同時検出系' などを用いて評価し、本化合物は IPCS や SMS の特異的阻害剤ではないことを迅速に明らかにした。このような分担研究チーム間の連携によって、阻害剤候補化合物の効率的な適正評価体制が樹立できたものと考えている。

化合物ライブラリー、微生物培養液をスクリーニング源として ICPS 阻害剤のスクリーニングを現在さらに進めている。

E-3) セラミド輸送タンパク質 CERT の解析

CERT は、さまざまな脂質群の中でセラミドおよびその類似体を選択的に認識して膜間転移を促進することが明らかとなった。また、我々が以前開発

したセラミド輸送阻害剤・HPA12 は、CERT のアンタゴニストであることも明らかになった。

E-4) 酵母変異株を用いた細胞内リン脂質輸送機構の解明

PS の小胞体からミトコンドリアへの輸送に損傷を有する酵母変異株の候補を約 40 株、PS の小胞体からゴルジ体への輸送に損傷を有する酵母変異株の候補を約 10 株、PE のミトコンドリアから小胞体への輸送に損傷を有する酵母変異株の候補を 4 株、PE のゴルジ体から小胞体への輸送に損傷を有する酵母変異株の候補を 1 株、分離した。

E-5) その他

PS 合成酵素 1 と 2 の両者は小胞体膜を 10 回貫通し、その N 末端と C 末端がいずれも小胞体の細胞質側に露出していることを示唆した。

PS 合成酵素 1 の部分精製に成功した。

哺乳動物 PS 合成酵素ホモログは多細胞生物以上で出現することを示唆した。

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であると結論した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Keigo Kumagai, Satoshi Yasuda, Kazuo Okemoto, Masahiro Nishijima, Shu Kobayashi, and Kentaro Hanada

CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides.

J. Biol. Chem. 280, 6488-6495 (2005)

Tomoko Ohsawa, Masahiro Nishijima, and Osamu Kuge
Functional analysis of Chinese hamster phosphatidylserine synthase 1 through systematic alanine mutagenesis.

Biochem. J. 381, 853-859 (2004)

2. 学会発表

熊谷圭悟、西島正弘、花田賢太郎

セラミド輸送タンパク質 CERT の基質特異性

第 77 回日本生化学会大会 2004 年 10 月 (横浜)

友廣志穂、北田 栄、久下 理

ホスファチジルセリンによるホスファチジルセリン合成酵素 2 の活性制御

第 77 回日本生化学会大会 2004 年 10 月 (横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし