

2008年3月修了

先端生命科学専攻 生命応答システム分野

学生証番号 66520 氏名 小泉 貴弘

指導教員 大矢 禎一 教授

キーワード : cerevisiae, haploinsufficiency, drug, yeast

天然化合物は化学構造や生物活性が多様であるため、創薬資源として高い可能性を秘めている。実際に、市場に出回っている薬剤のほとんどは天然物か天然物をモデルとして化学合成された誘導体である。しかし、現在使用されている薬剤は生体内の作用標的やその作用機構が未知のまま使用されているものも多く、細胞内における薬剤の標的タンパク質を同定することは、その薬理作用の分子機構を解明する上で極めて重要である。現在のところ、薬剤標的タンパク質の体系的な同定方法は確立していないが、近年、出芽酵母を用いたケミカルゲノミクス的な手法で薬剤標的の同定や作用機構の解明が試みられている。例えば、薬剤標的タンパク質をコードする遺伝子のコピー数が減少している二倍体ヘテロ型遺伝子破壊株がその薬剤に対して高い感受性を示すという、薬剤誘導型ハプロ不全性(drug-induced haploinsufficiency)を用いて、薬剤処理の有無で生じる増殖の差を多数の遺伝子破壊株を用いてプロファイリングすることで、その薬剤の標的タンパク質を同定する方法(HIP assay)が提案された(Lim *et al.*, 2003; Giaever *et al.*, 1999)。

そこで、本研究では、薬剤誘導型ハプロ不全性 を天然化合物スクリーニングに取り入れ、天然化合物のスクリーニングとその標的タンパク質の同定を同時並行的に行うことにより、有用化合物とその標的タンパク質を取得することを目的とした。

【結果と考察】

ストラテジー

薬剤誘導型ハプロ不全性 を用いた天然化合物スクリーニングのストラテジーを図 1 に示す。このスクリーニング系の利点として以下の 4 点が挙げられる。(1)標的遺伝子をあらかじめ選択することで、得たい作用活性を持つ化合物を効率よくスクリーニングできることが期待される。(2) 二倍体ヘテロ型遺伝子破壊株を用いて増殖を指標にスクリーニングを行うことにより、必須遺伝子を対象 とすることが可能になる。(3)薬剤に対する前提知識がなくてもアッセイを行うことが可能である。(4)96 well microplate 上などでスループットの高いアッセイが可能である。

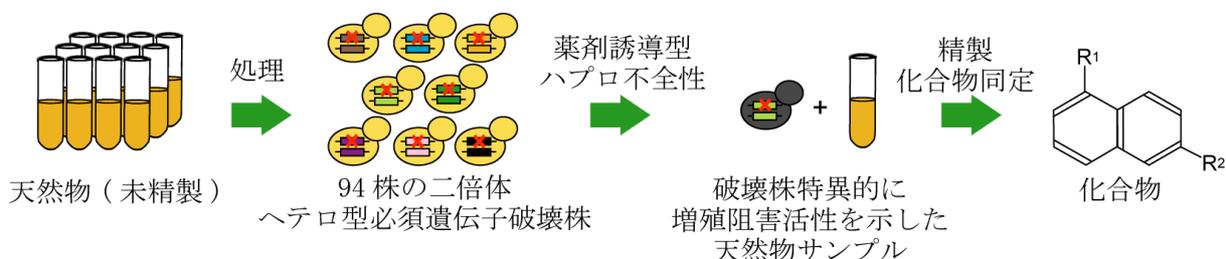


図 1. 薬剤誘導型ハプロ不全性 スクリーニングのストラテジー(3rd STEP~4th STEP)

天然化合物スクリーニング

日本の土壌に生息しているカビや放線菌の細胞抽出物 4960 サンプルを対象に、天然化合物スクリーニングを行った(表 1)。まず、サンプル濃度 5%(v/v)で野生型株に対する細胞毒性を確認した(1st STEP)。次に、野生型株に対する最小増殖阻害濃度を決定した(2nd STEP)。決定した作用濃度を基にして、94 の二倍体ヘテロ型必須遺伝子破壊株を対象に薬剤誘導型ハプロ不全性スクリーニングを行った(3rd STEP)。そして、最後に破壊株特異的な増殖阻害を示したサンプルから化合物の単離・同定を行った(4th STEP: 産総研・新家研との共同研究)。その結果、reticulol、neocarazostatin A、neocarazostatin B、tensidol B、cycloheximide、barceloneic acid、3874H1 の 7 種の化合物が 94 株の二倍体ヘテロ型必須遺伝子破壊株のいずれかに対し特異的に増殖を阻害する、すなわち薬剤誘導型ハプロ不全性を示す化合物として同定された。

neocarazostatin A の標的遺伝子産物の探索

天然化合物スクリーニングで同定された化合物のうち、抗菌活性や細胞毒性の報告がなく、新規の作用機序をもつと考えられる neocarazostatin A に注目して薬剤標的の探索を行った。まず、標的遺伝子の探索対象を 1112 ある全ての必須遺伝子に拡大し、薬剤誘導型ハプロ不全性スクリーニングを行った(図 2)。その結果、*sec7/SEC7*, *spc98/SPC98*, *gsp1/GSP1*, *yjr023c/YJR023c* の 4 株が、neocarazostatin A に対して高い感受性を示すことがわかった。この中で、Ran-transport protein をコードする *GSP1* については、Gsp1p の機能が失われると核移行シグナル(NLS)を持つタンパク質の核への局在が阻害されることが報告されている(Schlenstedt *et al.*, 1995)。そこで、野生型株および *gsp1/GSP1* 株を neocarazostatin A 処理した時の NLS-GFP の局在を観察した。その結果、neocarazostatin A 処理細胞においても NLS-GFP の核への局在が観察され、neocarazostatin A は Gsp1p の機能を阻害していないことがわかった(図 3)。このことから、neocarazostatin A の標的遺伝子は *GSP1* ではなく、他の候補遺伝子のいずれかであることが示唆された。

【まとめ】

薬剤誘導型ハプロ不全性を用いた天然化合物のスクリーニングを試み、neocarazostatin A を含む 7 個の化合物を得た。neocarazostatin A について、標的の同定を試み、候補を 3 つまで絞り込んだ。今後は、neocarazostatin A および他の薬剤の標的遺伝子の同定を完了させることで、このスクリーニングの有効性を示せると考えられる。

表 1. スクリーニングの進捗状況

STEP	陽性サンプル / 試験サンプル
1	482 / 4960
2	280 / 482
3	15 / 280
4	7 / 15

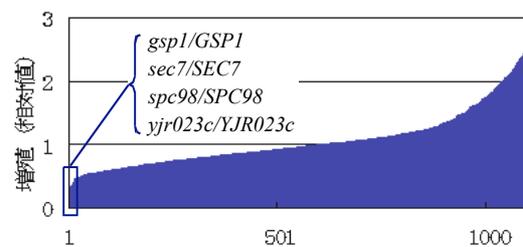


図 2. 必須遺伝子破壊株 1112 株に対する薬剤誘導型ハプロ不全性の確認

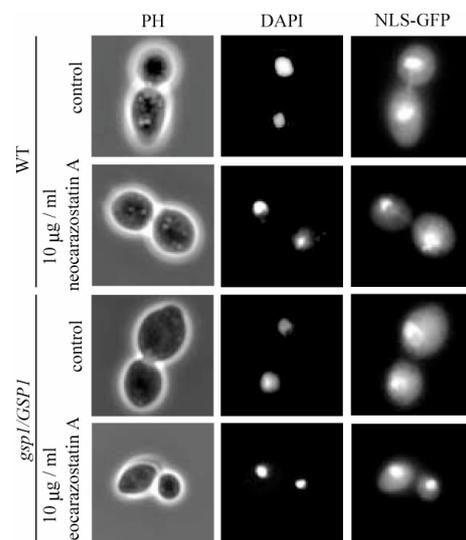


図 3. neocarazostatin A 処理した細胞における NLS-GFP の核局在の確認