

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 30 年度 博士課程進学
氏名 富田 啓介
指導教員 野尻 秀昭

論文題目 イネが生産する抗菌性化合物モミラクトンの作用機序に関する研究

第1章 序論

自ら移動することが出来ない植物が刻々と変化する外部環境に対応すべく獲得した機構の一つに、多様な二次代謝産物の生産が挙げられる。それらの中には高い生物活性を有し、周囲に生育する他の生物とのコミュニケーションツールとして用いられるものも存在する。その活性の高さから、植物由来の様々な化合物は医薬品等に利用されてきたが、その一方で、殆どの化合物はその活性の報告がなされるにとどまり、作用メカニズムが解明された例は少ない。

イネが生産する二次代謝産物にモミラクトンがある。モミラクトンはイネ籾殻から単離されたジテルペン化合物であり、植物や真菌の生育を抑制する。また、モミラクトン生産量が低下したイネ変異体はアレロパシー活性や病害抵抗性が低下することから、モミラクトンが実環境中においてもその活性を発揮し、イネの生存と繁栄に重要な役割を果たしていると考えられる。更に、モミラクトンは抗腫瘍活性など動物細胞に対しても活性を有することも報告されている。このように、モミラクトンは様々な生物種に対する活性をもつが、その作用機序に関する知見は殆ど得られていない。

また、興味深いことに、イネのようなモミラクトン生産植物に対しては、モミラクトンの生育阻害効果が殆ど認められない。植物が自ら生産する二次代謝産物の生物活性を回避する機構には、輸送体による細胞外への排出や糖鎖修飾を介した無毒化等いくつか報告例があるが、標的タンパク質の変異による耐性化等、化合物の作用感度の変化と関連したものも存在する。モミラクトンの作用機序解明を行うなかで、耐性機構に関する知見も得られることが期待出来る。

モミラクトンは未利用バイオマスである籾殻から抽出可能であり、様々な生物活性を有していることから、農薬や医薬等への利用が期待される。また、モミラクトンに対する耐性メカニズムが明らかになれば、耐性を付与する形質とモミラクトンを併用することで、作物の生育を阻害せずに雑草のみを防除することも可能となる。そこで本研究では、モミラクトンが有する生物活性の発現メカニズムを解明することを目的とした。

第2章 モミラクトンの酵母に対する抗菌活性の評価

モミラクトンの作用機序の追究には、多様な変異体リソースが整備され、化学遺伝学的手法による生理活性物質の作用機序探索に最適なモデル生物である酵母（出芽酵母と分裂酵母）を用いた。まず両酵母のモミラクトン感受性を調べたところ、モミラクトンはどちらの生育も抑制したが、分裂酵母が10倍程度高い感受性を示した（分裂酵母の生育に対するモミラクトン B の $IC_{50} = 1.29 \mu M$ ）。また、両酵母に対する抗菌活性はモミラクトン A よりも B の方が3倍程度高かった。そのため、分裂酵母とモミラクトン B を用いて更に解析を進めた。

次に、モミラクトンが分裂酵母に与える影響を形態観察により解析した。カルコフルオールホワイトによるセプタム染色およびRFP融合ヒストン H3 発現株を用いた核の観察から、モミラクトンがマルチセプタム等の異常なセプタム形成を引き起こし、分裂酵母の細胞分離を阻害していることが明らかになった。また、モミラクトンが分裂酵母の形態を大きく変化させたことから、mCherry 融合アクチン結合ペプチド LifeAct 発現株と GFP 融合 α チューブリン発現株を用いて細胞骨格であるアクチンの局在と微小管の構造を観察した。すると、アクチンの局在に大きな変化は見られなかった一方、細胞頂端において湾曲した微小管が観察された。

第3章 モミラクトン感受性に関与する分裂酵母遺伝子の探索

本章では、モミラクトンが標的とする分子やパスウェイの探索を目的とし、分裂酵母の様々な変異体リソースからモミラクトン感受性が変化する株をスクリーニングした。

分裂酵母 ORF 過剰発現株ライブラリーからのモミラクトン B 耐性株のスクリーニング

約 5000 株の過剰発現株が混合されたライブラリーをモミラクトン B 含有寒天培地に塗布し、耐性株を約 650 コロニー得た。耐性株に組み込まれている ORF を全て解析したところ 5 遺伝子が同定され、その内 3 遺伝子 (*pmd1*, *caf5*, *pap1*) の過剰発現株は顕著なモミラクトン B 耐性を示した。*Pmd1* と *Caf5* は多剤耐性に関与するトランスポーターであり、*Pap1* は薬剤処理や酸化ストレスに応答する転写因子で、*pmd1* や *caf5* 等のトランスポーターの発現を正に制御していることから、得られた因子はモミラクトンを細胞外に排出することにより耐性に寄与していると考えられる。

分裂酵母遺伝子破壊株ライブラリーからのモミラクトン B 感受性変化株のスクリーニング

分裂酵母遺伝子破壊株約 2000 株を混合したライブラリーをモミラクトン B 添加培地中で培養した後、培養液からゲノム DNA を抽出し、各破壊株に付与されたバーコード配列を PCR 増幅して次世代シーケンサーに供した。そして、各破壊株のモミラクトン B 感受性をバーコード配列のリード数から評価した。破壊することでモミラクトン B 感受性が変化した遺伝子群において濃縮されるオントロジーを解析すると、高感受性化した遺伝子群では微小管重合阻害剤チアベンダゾールへの感受性やセプタム形成、細胞質分離に関与する遺伝子が濃縮されており、2章で行った形態観察の結果と矛盾しなかった。また、耐性化した

遺伝子群にはリボソームのサブユニットが多く存在していた。このことから、モミラクトンが翻訳を阻害しており、元々翻訳に異常をきたしていると予想されるリボソームサブユニット破壊株ではモミラクトンの見かけ上の効果が弱まった可能性が示唆される。翻訳が停滞したリボソームのサブユニット乖離を誘導することで翻訳の品質管理に寄与する RQT 複合体のサブユニット *SPAC1A6.06c* の破壊株が本スクリーニングにおいて最もモミラクトン高感受性を示したこともこの可能性を支持する。

分裂酵母 EMS 変異株からのモミラクトン耐性株のスクリーニング

分裂酵母野生型株に変異原である EMS を処理することでモミラクトン B 耐性を示すようになった変異株を 14 株取得した。内 10 株について、耐性に関与しない変異を減らすために戻し交配を行った後、ゲノム DNA を次世代シーケンサーに供した。その結果、モミラクトン B 耐性株においてタンパク質のアミノ酸配列が変化するような変異が生じていた遺伝子が 38 存在した。その内の 25 遺伝子の破壊株のモミラクトン B 感受性を評価したところ、*hba1* と *atp2* の破壊株が顕著な耐性を示した。

Hba1 は *Pap1* の核外輸送を担うことから、*hba1* の破壊によるモミラクトン B 耐性は、核に蓄積した *Pap1* によるトランスポーターの発現亢進によると考えられる。

一方、ATP 合成酵素サブユニットである *atp2* の破壊株がモミラクトン B 耐性を示したことから、モミラクトン B 感受性と呼吸との関連を調べた。すると、ATP 合成酵素の他のサブユニット、一部の電子伝達系構成因子の破壊株がモミラクトン耐性を示した。モミラクトン B 耐性は野生型株に呼吸阻害剤アンチマイシン A を処理した際にもみられた。また、呼吸活性化の表現型を示す *pka1*, *git3* 破壊株は反対にモミラクトン B 高感受性を示したことから、モミラクトン B 感受性と呼吸活性との間に相関がみられた。ここから、呼吸活性と密接に関連し、生育に影響を与える因子の一つである ROS のモミラクトンの作用への関与を疑った。モミラクトン B が細胞内 ROS レベルに与える影響を解析したところ、モミラクトン B は細胞内の ROS レベルを減少させた。また、過酸化水素や ROS 誘導剤であるメナジオンはモミラクトン B による生育阻害を抑制した。近年、酸化ストレスだけでなく、細胞内の酸化還元状態が還元側に傾いた状態（還元ストレス）も細胞にとって有害であることが明らかになりつつあることから、モミラクトンは細胞内の ROS を減少させることで抗菌作用を発揮している可能性が示唆された。

第4章 モミラクトン分子プローブ創成を指向した構造活性相関研究と

モミラクトン B 結合因子の探索

モミラクトン結合タンパク質の探索

現在のところ、モミラクトンの構造活性相関に関する情報は殆ど存在しない。そこで、光反応性のジアジリン基を導入したビーズとモミラクトン B の混合物に紫外線を照射することでモミラクトン B を官能基非依存的にビーズに固定した。作製したモミラクトン B ビーズを用いてプルダウンアッセイを行い、ビーズ結合タンパク質として推定 NAD(P)H 脱水

素酵素 Obr1 を同定した。しかし、プルダウンアッセイ時にモミラクトン B をコンペティターとして加えても Obr1 とモミラクトン B ビーズとの結合は減衰せず、さらに *obr1* 破壊株のモミラクトン B 感受性が野生型株と変わらないことから、Obr1 をモミラクトン B 結合タンパク質と結論付けることは出来なかった。

モミラクトン誘導体の合成と構造活性相関

活性を保持した分子プローブを合成するため、様々な位置への修飾を介したモミラクトンの誘導体化を検討した。種々の反応を試した結果、図 1 に示す誘導体 (4)~(7) の合成に成功した。内生モミラクトン類と合成した誘導体 ((1)~(6)) に関して、分裂酵母に対する抗菌活性とシロイヌナズナに対するアレロパシー活性を評価した。その結果、いずれの誘導体も抗菌活性は大きく低下したものの、興味深いことに (5) のアレロパシー活性は高く保持されていた。(7) についても活性を維持した誘導体候補として着目している。

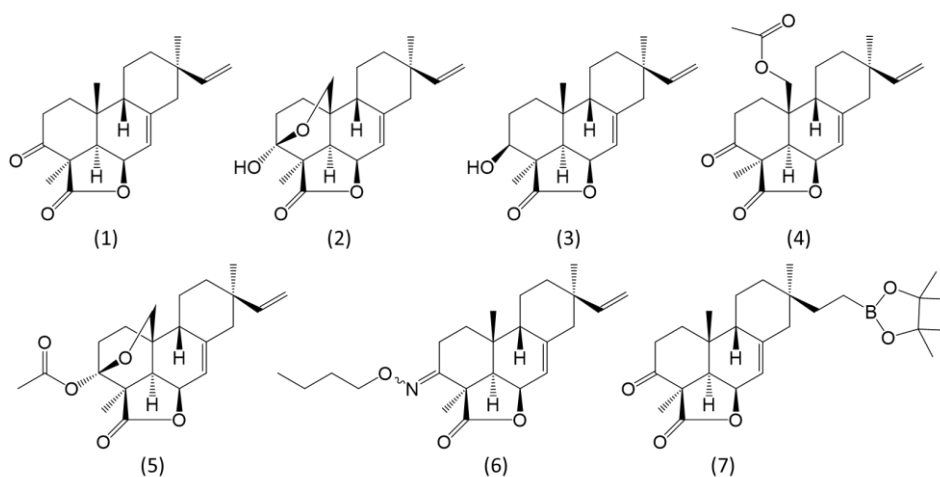


図 1 内生モミラクトン類 (1)~(3) と、本研究で合成したモミラクトン誘導体 (4)~(7)

第5章 総括と展望

本研究では、まったく未知であったモミラクトンの抗菌活性の発現メカニズムに関して、細胞内の ROS レベルの減少というユニークな作用機構を提唱した。また、モミラクトンが微小管構造や翻訳にも影響を与えている可能性が示唆された。さらに、アレロパシー活性を保持した誘導体をはじめ複数のモミラクトン誘導体の合成に成功し、抗菌・アレロパシー活性それぞれの構造活性相関に関する情報が得られた。本研究で得られた知見は、モミラクトンの作用メカニズムの全体像の理解やモミラクトン分子プローブの開発、さらにはモミラクトンが持つアレロパシー活性と耐性のメカニズム解明の基盤となることが期待される。