

出芽酵母遺伝子破壊株を用いた新規化合物 JBIR-19 の作用標的探索

2010 年修了 学生証番号：86315 先端生命科学専攻 生命応答システム分野 小川 勇人

キーワード： *Saccharomyces cerevisiae*, JBIR-19, target screening, gene-deletion mutants

指導教官：大矢 禎一

序論

単細胞真核生物である出芽酵母は細胞内構造や機能の多くがヒトと共通しており、大量培養や遺伝子操作が容易であるという利点を有する。これらの利点を生かして、出芽酵母は創薬シード化合物のスクリーニングや作用標的の同定に用いられている。近年、我々の研究室では、出芽酵母細胞の形態変化に着目した化合物評価系を考案した (Kozone *et al.*, 2009)。これは出芽酵母細胞の形態が遺伝子機能を反映する (Ohya *et al.*, 2005) ことから、細胞の形態変化を引き起こす化合物をスクリーニングすれば、細胞形態に影響する遺伝子の機能を阻害する化合物を得られるはずであるというコンセプトに基づくものである。例えば、細胞周期における M 期への進行や細胞壁の合成、あるいはエンドサイトーシスに関わる遺伝子の欠損株では、芽が細長くなるという細胞形態変化を引き起こす (Watanabe *et al.*, 2009) ことから、芽の細長さを指標にしてこれらの機能を制御する化合物を単離できると考えられる。Kozone ら (2009) は、出芽酵母の野生型細胞を処理したときに細長い細胞への形態変化を引き起こす化合物をスクリーニングし、昆虫病原菌

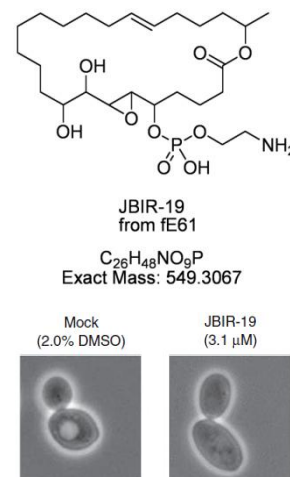


図 1. JBIR-19 の構造式と JBIR-19 処理時の出芽酵母野生型細胞の形態 (Kozone *et al.*, 2009)

Metarhizium sp.fE61 の抽出液から 24 員環の新規化合物 JBIR-19 (図 1) を同定した。本研究では、JBIR-19 の作用機構を解明するために、出芽酵母遺伝子破壊株を用いて JBIR-19 の作用標的の同定を試みた。

結果と考察

1. JBIR-19 に対して特異的に感受性を示す遺伝子破壊株の検出

JBIR-19 の作用機構と作用標的を解明するために、JBIR-19 に対して特異的に感受性を示す出芽酵母の遺伝子破壊株をスクリーニングした。1,133 の必須遺伝子ヘテロ破壊株の混合プールおよび 4,548 の非必須遺伝子ホモ破壊株の混合プールを JBIR-19 存在下と非存在下で培養し、JBIR-19 存在下で相対的に増殖遅延を示す遺伝子破壊株を、各遺伝子破壊株に固有の DNA タグ配列に対するマイクロアレイで検出した。その結果、3 つの必須遺伝

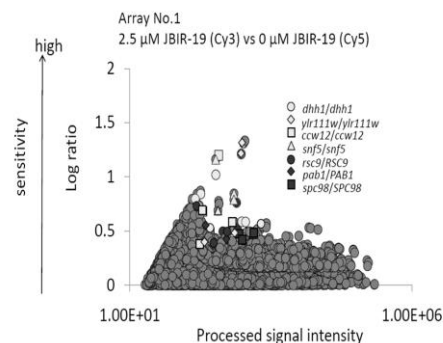


図 2. JBIR-19 存在下で相対的に増殖遅延を示す遺伝子破壊株 Log ratio の値が大きいほど感受性が高いことを表す。

子ヘテロ破壊株と 4 つの非必須遺伝子ホモ破壊株が 6 回の独立したタグアレイ実験において JBIR-19 に対して著しく感受性を示した (図 2)。また、個別の培養によって、*DHH1* 遺伝子破壊株が JBIR-19 に対して著しく且つ濃度依存的に感受性を示した (図 3)。JBIR-19 処

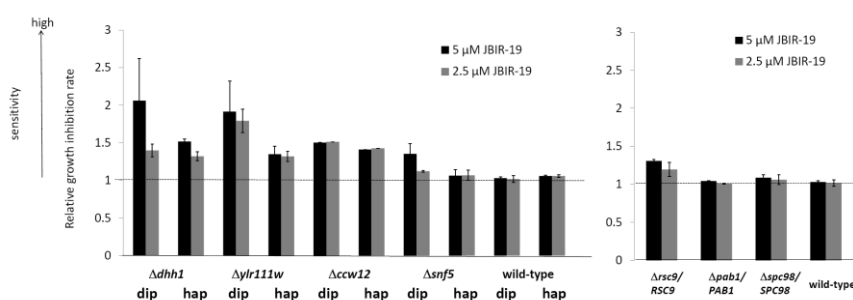


図 3. *Δdhhl1* が JBIR-19 に対して著しく濃度依存的に感受性を示す パーコッドアレイ実験において、JBIR-19 に対して著しく感受性を示した遺伝子破壊株 (図 2) を対象とした。左が非必須遺伝子破壊株 (dip はホモ二倍体、hap は一倍体)、右が必須遺伝子破壊株の感受性を表す。縦軸の値が大きいほど感受性を表す。Relative growth inhibition rate = (JBIR-19 存在下培養の倍加時間)/(非存在下培養の倍加時間)。

理と *DHH1* 遺伝子の破壊の組み合わせで酵母の感受性を示したことから、JBIR-19 の標的は、その遺伝子破壊を *DHH1* 遺伝子破壊と組み合わせたときに致死性を示す（すなわち *DHH1* と合成致死性を示す）ことが予想された。

2. JBIR-19 は $\Delta dhh1$ 細胞において、G1/S サイクリン *CLN2* mRNA の蓄積を遅らせた

DHH1 は mRNA プロセッシングや翻訳過程に関わると考えられている DEAD-box ヘリカーゼをコードする遺伝子である

(Coller *et al.*, 2001)。また、UV 照射条件下では、 $\Delta dhh1$ 細胞において *CLN2* mRNA の蓄積が遅れることなどから、また、G1/S 期における DNA 損傷チェックポイントからの脱出に必要と考えられている (Bergkessel *et al.*, 2004)。さらに、 $\Delta dhh1$ ホモ二倍体破壊株はブレオマイシンなどの DNA 損傷剤もしくはは損傷する条件に対しても感受性を示す (Hellenmeyer *et al.*,

2008)。そこで、JBIR-19 と DNA 損傷条件が細胞に与える効果が類似しているという仮説を立てた。この仮説が正しければ、ブレオマイシン処理細胞では JBIR-19 処理細胞と同様細長い細胞形態が観察され、一方、JBIR-19 で処理した $\Delta dhh1$ 細胞では UV 照射時と同様 *CLN2* mRNA の蓄積が遅延するはずである。そこで、JBIR-19 もしくは DNA 損傷剤ブレオマイシンで処理した $\Delta dhh1$ ホモ二倍体細胞と野生型二倍体細胞の形態を観察したところ、どちらの化合物に関しても、

化合物で処理していない細胞に比べて細胞の芽が細長くなった (図 4)。また、JBIR-19 で処理した $\Delta dhh1$ 細胞における *CLN2* mRNA 量を Northern blotting によって調べたところ、JBIR-19 で処理した $\Delta dhh1$ 細胞において、処理していないものに比べて、*CLN2* mRNA の蓄積が 15~30 分ほど遅れていることが分かった (図 5)。このことから、 $\Delta dhh1$ 細胞において、JBIR-19 が G1 期から S 期への移行を遅らせていると考えられる。

本研究で得られた結果より、JBIR-19 の出芽酵母細胞内の作用標的は次の 3 つの特徴をもつタンパク質であると示唆された。

- 1) その遺伝子破壊株が *DHH1* と合成致死性を有する。
- 2) G1 期から S 期への移行に関わる。
- 3) 遺伝子の欠損によって、細胞の芽が細長くなる。

まとめ

JBIR-19 の細胞内における作用標的の同定を目的として、JBIR-19 に対して特異的に増殖遅延を示す遺伝子破壊をスクリーニングし、*DHH1* 遺伝子破壊株を得た。また、 $\Delta dhh1$ 株の解析から、JBIR-19 の作用機構を解明するための手掛かりが得られた。

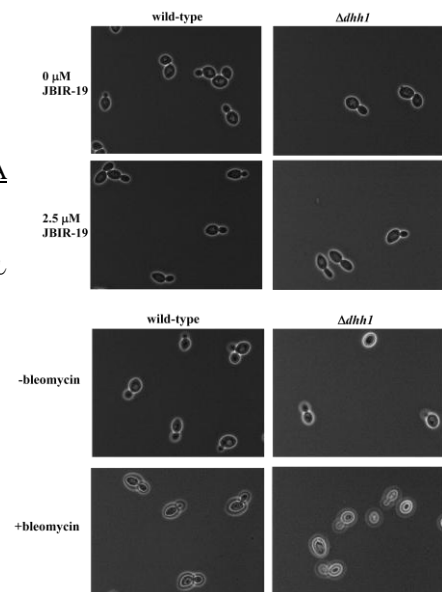


図 4. JBIR-19 もしくはブレオマイシン処理時の $\Delta dhh1$ 細胞の芽は細長くなる 酵母を各条件で 24 時間培養して、位相差顕微鏡で観察した。

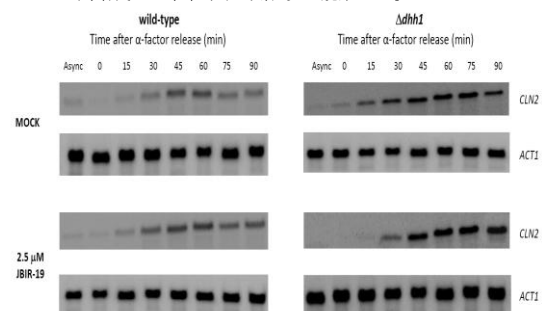


図 5. JBIR-19 で処理した細胞において、*CLN2* mRNA の蓄積が遅れている 対数増殖期にある一倍体細胞を α -factor によって 2 時間処理し、G1 期で停止させる。その後、JBIR-19 存在下もしくは非存在下の培地にリリースしてから 15 分おきに細胞を回収する。RNA を抽出して、1 レーンにつき 5 μ g をプロットした。