

氏 名	有田 祐子		
博士の専攻分野の名称	博士（理学）		
学位記号番号	博理工甲第 821 号		
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	分裂酵母のケミカルゲノミクスを利用した薬剤標的分子の解明に関する研究		
論文審査委員	委員長	連携教授	吉田 稔
	委員	教授	松本 幸次
	委員	連携教授	小林 俊秀
	委員	准教授	朝井 計

論文の内容の要旨

特異的な生理活性を示す化合物の細胞内標的を同定し、作用機構を解明することは、創薬リード化合物の創製に貢献するだけでなく、生物学の理解を深めるために重要である。これまでに遺伝子変異を化合物処理に置き換えた化学遺伝学の手法により、多くの興味深い活性を持つ化合物の分子メカニズムが解明され、基礎生物学の理解が飛躍的に進んできた。本研究では、分裂酵母をモデル生物として用い、海綿より単離された生理活性物質である、theonellamide (TNM) の標的分子の解明を目指し、さらに培養細胞における本化合物の作用の解析を目的とした。次に、分裂酵母の薬剤高感受性の遺伝子過剰発現株コレクションを作製し、化合物の感受性に変化を与える遺伝子を容易に取得できる実験系の構築を目指した。本研究では、これら大きく分けて 2 つの研究テーマに取り組んだ。

まず、TNM の作用機序解析を行った。TNM は八丈島沖に生息する *Theonella* 属の海綿から単離された二環状のペプチド化合物で、抗真菌活性を有するが、その作用機構は長く不明であった。先行研究により TNM は、amphotericin B や nystatin などステロール結合性化合物と類似の作用を有し、また TNM の効果に影響を与える遺伝子の解析から、1,3-β-D- グルカンの合成を阻害する FK463 との関連が示唆されていた。また TNM を分裂酵母に与えると Rho1 を介して細胞壁が過剰に合成されることが示されていた。さらに、本化合物と脂質分子との関係が示唆されていたが、直接の分子標的については未解明であった。そこで、TNM に直接結合する分子を明らかにするため、脂質分子に着目して *in vitro* における結合実験を行った。その結果、TNM は細胞膜の主要成分であるエルゴステロールと特異的に結合することがわかった。さらに、さまざまなステロールの誘導体との結合実験を行い、TNM はステロイド環の 3 位の炭素に水酸基が付加したステロール (3β-hydroxysterols) を特異的に認識することを明らかにした。

TNM の標的分子を明らかにしたので、次に細胞壁を持たない哺乳動物細胞における TNM の作用の解析を行った。動物細胞を TNM で処理した時の形態を観察したところ、細胞毒性を示さない低濃度条件下において、細胞膜上のコレステロール依存的に細胞が一過的に特徴的な形態変化を引き起こすことがわかった。さらに TNM が関与するシグナル伝達経路の一部を明らかにした。

本化合物は、filipin や amphotericin B などの既存のステロール結合性化合物とは異なる性質を示しているため、新しいクラスのステロール結合性化合物であると考えられる。そのため TNM は、脂質分子を解析す

る上で有用なプローブ分子になると考えられ、TNMによって認識されるステロールの状態や特性を調べることにより、脂質生物学における新たな知見が得られることを期待する。

次に、2つ目のテーマとして、少量の化合物を用いるのみで分裂酵母に対する感受性を評価できる化合物のプロファイリング法の構築を試みた。まず、複数の薬剤の排出を担う非特異的な薬剤排出ポンプを探索し、*bfr1* および *pmd1* を同定した。これら二つの遺伝子を欠損させた薬剤高感受性株に、過剰発現の誘導を可能にした 5,000 種類の分裂酵母の全遺伝子の一つずつを導入し、薬剤高感受性の遺伝子過剰発現株を作製した。これらの株を一度に培養して過剰発現を誘導し、それぞれの遺伝子過剰発現株の生育の差を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検出することに成功した。次に、構築した実験系を用いて、抗腫瘍剤として臨床において広く用いられている etoposide に対する遺伝子過剰発現株の感受性変化を網羅的に検出した。etoposide のプロファイルを作成したところ、予想通りトポイソメラーゼ II をコードする *top2* が過剰発現によって高感受性を付与する遺伝子として検出された。また、etoposide の作用に関わる新たな遺伝子群を同定することに成功した。さらに、etoposide は分裂酵母の細胞を伸長させる作用があり、細胞伸長は etoposide の感受性と相関することがわかった。構築したプロファイリング法は、分裂酵母に対して増殖阻害をもたらす化合物であれば解析が可能であるため、標的未知の生理活性を示す化合物を本実験系に供することで、迅速かつ簡便に、しかも低用量で大規模に標的分子および作用経路を解析することができると考えられる。さらに、薬剤が細胞外に排出されてしまうためにこれまで分裂酵母における解析が困難であった etoposide について、多剤耐性因子を欠損させることによって初めて解析を可能にした。次に、本手法を用いて TNM 感受性遺伝子の解析を行った。TNM の感受性は、すでに個々の過剰発現株に対する感受性が個別に評価されていたため、二つの異なる試験法の結果を比較したところ、マイクロアレイを用いた方法により、個別培養で感受性変化を誘導する遺伝子として同定された 32 遺伝子のうち、17 遺伝子を検出することができ、さらに個別培養で取りこぼしていたと考えられる遺伝子を新たに 10 種類同定することに成功した。これらは細胞骨格に関連する遺伝子や細胞壁合成に関与する遺伝子を多く含んでおり、TNM のステロール結合後に活性化される Rho1 経路と関連することが示唆された。

本研究で取り組んだ 2 つの研究によりケミカルゲノミクス研究の更なる重要性、有用性を示すことができたと考える。

論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成 23 年 2 月 14 日（月）15：00～16：00 に埼玉大学理学部 3 号館 2 階第 3 会議室で論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

特異的な生理活性を示す化合物の細胞内標的を同定し、作用機構を解明することは、創薬リード化合物の創製に貢献するだけでなく、生物学の理解を深めるために重要である。これまでに遺伝子変異を化合物処理に置き換えた化学遺伝学的手法により、多くの興味深い活性を持つ化合物の分子メカニズムが解明され、基礎生物学の理解が飛躍的に進んできている。本研究では、分裂酵母をモデル生物として用い、海綿より単離された生理活性物質である theonellamide (TNM) の標的分子の解明を行い、さらに培養細胞における本化合物の作用の解析を行った。また、分裂酵母の薬剤高感受性の遺伝子過剰発現株コレクションを作製し、化合物の感受性に変化を与える遺伝子を容易に取得できる実験系を新たに開発した。学位論文は以下の項目からなっている。

1. 海洋天然物 theonellamide の作用機序解析

TNM は八丈島沖に生息する *Theonella* 属海綿から単離された二環性のペプチド化合物で、抗真菌活性を有するが、その作用機構は長く不明であった。同氏の所属する研究室における先行研究によって TNM は amphotericin B や nystatin などステロール結合性化合物と類似の作用を有し、また TNM の効果に影響を与える遺伝子の解析から、細胞壁成分である 1,3-β-D- グルカンの合成を阻害する FK463 との関連が示唆されていた。実際、TNM を分裂酵母に与えると、Rho1 の活性化を介して 1,3-β-D- グルカンが過剰に合成された。一方、TNM の蛍光誘導体の局在から脂質分子との関係も示唆されていたが、直接の分子標的については未解明であった。そこで、TNM に直接結合する分子を明らかにするため、脂質分子に着目して *in vitro* における結合実験を行った。その結果、TNM は細胞膜の主要成分の一つであるエルゴステロールと特異的に結合することを見出した。さらにさまざまなステロールの誘導体との結合実験を行った結果、TNM はステロイド環の 3 位の炭素に水酸基が付加したステロール (3β-hydroxysterols) を特異的に認識することを明らかにした。次に哺乳動物細胞における TNM の作用の解析を行った。細胞を TNM で処理した時の形態を観察したところ、細胞毒性を示さない低濃度において、細胞が一過的に収縮し、フィロポディア様の突起を形成する特徴的な形態変化を引き起こすことを見出した。この効果は細胞膜上のコレステロール依存的であり、コレステロール結合後に TNM が活性化するシグナル伝達経路の一部を明らかにした。また、TNM は、filipin や amphotericin B などの既存のステロール結合性化合物とは異なる性質を示しており、新しいクラスのステロール結合性化合物であると考えられる。そのため TNM は、脂質分子を解析する上で有用なプローブ分子になると期待される。

2. 細胞の感受性変化を指標としたハイスループットな化合物プロファイル法の構築

少量の化合物を用いるのみで分裂酵母に対して感受性を変化させる遺伝子をゲノムワイドに評価できる化合物のプロファイリング法の構築を行った。まず、薬剤に対する全般的な感受性を高めるため、さまざまな薬剤の排出を行う非特異的な薬剤排出ポンプ遺伝子を探索し、分裂酵母における主要な薬剤排出ポンプとして *bfr1* および *pmdl* を同定した。これら 2 つの遺伝子を欠損させた薬剤高感受性株に、発現誘導が可能な 5,000 種類の分裂酵母の全遺伝子を一つずつ導入し、遺伝子過剰発現株ライブラリーを作製した。これらの株を全て混合培養して過剰発現を誘導し、薬剤添加時のそれぞれの遺伝子過剰発現株の生育の差を DNA マイクロ

アレイによって網羅的に検出することに成功した。次に、この方法を用いて etoposide の全遺伝子発現株の感受性プロファイルを作成したところ、過剰発現によって高感受性を付与する遺伝子として etoposide の標的分子であるトポイソメラーゼ II をコードする *top2* を検出した。また、etoposide の作用に関わる遺伝子を新たに 28 種類同定することに成功した。さらに、etoposide は分裂酵母の細胞を伸長させる作用があり、細胞伸長は etoposide の感受性と相関することがわかった。以上の結果から、本評価法は薬剤感受性を規定する遺伝子を網羅的に同定する系として優れていると結論した。そこで、この手法を用いて TNM 感受性遺伝子の解析を行った。TNM の感受性は、すでに個々の過剰発現株に対する感受性が個別に評価されていたため、二つの異なる試験法の結果を比較したところ、マイクロアレイを用いた方法により、個別培養で感受性変化を誘導する遺伝子として同定された 32 遺伝子のうち、17 遺伝子を検出することができ、さらに個別培養で取りこぼしていたと考えられる遺伝子を新たに 10 種類同定することに成功した。これらは細胞骨格に関連する遺伝子や細胞壁合成に関与する遺伝子を多く含んでおり、TNM のステロール結合後に活性化される Rho1 経路と関連することが示唆された。

以上本論文は分裂酵母の全遺伝子 ORF の発現株ライブラリーを用いた網羅的解析により、これまで作用の明らかになっていなかった海綿由来の天然物 theonellamide の標的分子および作用機序を解明したものである。その方法論として、従来のゲノムワイドな薬剤感受性遺伝子同定法の問題点を検討したうえで、DNA マイクロアレイを用い、よりハイスループットな新しい実験系の構築に成功し、その有効性を確認している。

本研究の成果は査読制のある国際誌に 2 編の論文（筆頭著者および共著者）として掲載（および掲載決定）となった。よって本審査員一同は、本論文が博士（理学）の学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と認めた。