

天然化合物 Hitachimycin の作用機構解析

岩井 南会子 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

Hitachimycin は *Streptomyces* sp. KG-2245 株から単離された抗菌・抗腫瘍活性を示す天然物である (Fig. 1) ¹⁾。これまで酵母細胞膜上の P-type H⁺-ATPase である Pma1p を阻害することで抗真菌作用を示すことを示唆する報告があるものの、詳細な作用機構は不明のままである ²⁾。近年、東京工業大学の工藤・江口らは hitachimycin の生合成遺伝子クラスターを明らかにし、合成の初発酵素である phenylalanine-2,3-aminomutase 遺伝子 HitA を破壊すると、hitachimycin 合成が見られなくなることを報告した ³⁾。さらに HitA 本来の基質である L-phenylalanine の代わりに類縁化合物を用いることで、hitachimycin の phenyl 基を他の官能基に置換した 8 種類の hitachimycin 生合成類縁体を得ている。そこで今回、hitachimycin 類縁体の 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値)、及び出芽酵母への作用を検討することとした。

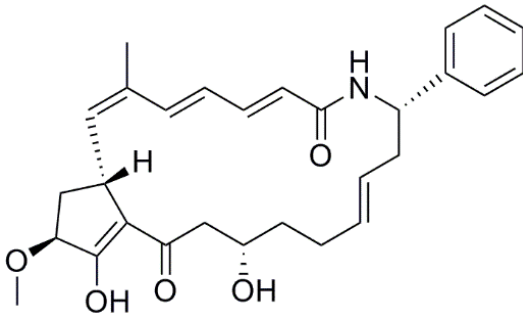


Fig.1 Hitachimycin の構造

【材料・方法】

出芽酵母株

多剤超感受性酵母 OTA017 (BY4741 *pdr3Δ0 pdr8Δ0 pdr1Δ0 yrr1Δ0 snq2Δ0 pdr5Δ0 pdr10Δ0 yor1Δ0 pdr15Δ0 pdr11Δ0 pdr12Δ0 aus1Δ0 RME1 (ins-308A)*) を用いた。Pma1p の局在解析では OTA017 *PMA1-yeGFP-His3MX6* を、Pma1p 精製には W303-1A 系統の株を用いた。

50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値) 測定

対数増殖期にある OTA017 に、DMSO または hitachimycin 類縁体を 8 時間処理した後、595 nm の吸光度を測定した。DMSO 処理酵母の増殖率を 100% とし、IC₅₀ 値を算出した。

オルガネラ、及び Pma1p 局在観察

対数増殖期にある OTA017 に、DMSO または hitachimycin を 3 時間処理後、quinacrine を 15 分間処理することで酸性オルガネラを、また Alexa Fluor 594-conjugated concanavalin A を 5 分間処理することで細胞壁を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。また、Pma1p の局在観察は対数増殖期の OTA017 *PMA1-yeGFP-His3MX6* を用い、DMSO または hitachimycin を 3 時間処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。

Pma1p の精製条件検討

Hitachimycin による Pma1p 阻害活性を測定するため、精製条件を検討した。膜上にある別の H⁺-ATPase である V-ATPase と分けて精製する条件を調べるため、V-ATPase 構成タンパク質である Vma7p に Flag タグを融合した Pma1p-GFP 発現株 W303-1A *PMA1-yeGFP-His3MX6 VMA7-2Flag-KanMX6* を構築して実験に用いた。対数増殖期の細胞をガラスビーズで破碎し、細胞抽出液をスクロース密度勾配超遠心で分画して Pma1p を精製した。

【結果・考察】

50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値) 検討

ほとんどの hitachimycin 類縁体で IC₅₀ 値はおおよそ 1~2 μM であり、hitachimycin と同程度の細胞増殖阻害を示した。

酸性オルガネラ、及び Pma1p 局在検討

通常 quinacrine は酸性オルガネラである液胞に蓄積するが、hitachimycin 処理細胞では液胞を除く細胞質や、細胞質全体に蓄積していた。このことは、hitachimycin が細胞内 pH 恒常性を攪乱することを示唆している。また、細胞膜や液胞に局在する Pma1p が、hitachimycin 処理では細胞質にドット状に点在するように局在変化した。以上の結果は、hitachimycin が Pma1p の局在変動を誘導することにより、細胞内 pH を攪乱する可能性を示唆している。

Pma1p の精製

各画分に含まれる Pma1p、Vma7p をウェスタンブロットで確認したところ、Pma1p が Vma7p とは異なる画分に精製できていることを確認した。現在、精製した Pma1p の ATPase 活性測定法を検討しており、ATPase 活性測定系が構築でき次第、hitachimycin による阻害を検討する予定である。

【参考文献】

- 1) *J. Antibiot.*, **41**, 614 (1988)
- 2) *J. Cheminform.*, **10**, 6 (2018)
- 3) *ChemBioChem*, **16**, 6 (2015)