



## 第一章 diocatin A の真菌に対する生物活性

*Streptomyces* sp. SA-2581 株の生産する DotA は、ヒトのジペプチジルペプチダーゼ II の阻害剤として単離された化合物であるが、筆者は DotA が *A. parasiticus* に対してアフラトキシン生産抑制活性を示すことを見出した。DotA は液体静置培養条件下で *A. parasiticus* 及び *A. flavus* のアフラトキシン生産を IC<sub>50</sub> 値 4.0 μM、5.5 μM でそれぞれ阻害した。50 μM の高濃度においてもカビの生育はほとんど抑制しなかったが、同濃度の寒天培地上では分生子の形成を抑制した。DotA は、アフラトキシン生合成経路のごく初期の中間体である norsolorinic acid の生産も阻害し、norsolorinic acid より上流の生合成過程に作用することが示された。定量 PCR 法により、アフラトキシン生合成関連遺伝子の mRNA レベルを解析した結果、DotA はアフラトキシン生合成酵素 PKSA、OMTA、VER-1 及び転写調節因子 AFLR をコードする遺伝子の転写を抑制した。よって、DotA はアフラトキシン生合成酵素を阻害するのではなく、その生産調節機構に作用することが示された。

DotA は *A. parasiticus* のコウジ酸生産を大幅に促進する活性を示し、*Aspergillus nidulans* に対してもステリグマトシスチン生産阻害及び分生子形成阻害活性を示した。また、*Saccharomyces cerevisiae* に対しては最少培地で生育抑制活性を示した。これらの結果から DotA は真菌の一次代謝、二次代謝及び分化に対し多面的な効果を示す化合物であることが明らかとなった。

## 第二章 diocatin A の作用機構解析

### 1) フォトアフィニティープローブを用いた DotA の標的分子の探索

DotA と相互作用するタンパク質を探索するため、C 末端アミノ酸をリジンに置換した DotA 誘導体から、光反応性のアジド基とビオチン残基を有するプローブを調製した。プローブと *A. parasiticus* 菌体抽出液をインキュベートした混合物に UV を照射した後、タンパク質を抽出し、プローブの結合したタンパク質のビオチン残基をウェスタンブロッティング法により検出した。競合試験により特異性を調べ、DotA と特異的に結合すると予想されるタンパク質を二次元電気泳動法により精製した。精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列解析を行ったが、DotA の作用と関連すると考えられるタンパク質を同定することは出来なかった。

### 2) DotA 耐性酵母の取得

DotA は富栄養の YPD 培地では酵母 *S. cerevisiae* の生育に対して全く影響を与えないが、グルコースと Yeast nitrogen base のみを含む最少培地では 12.5 μM の添加でその生育を完全に抑制した。アフラトキシン生産阻害活性の強さが異なる 3 種の DotA 誘導体を用いた実験の結果、アフラトキシン生産阻害活性と酵母に対する生育抑制活性には相関が見られた。そこで、酵母に対する生育抑制活性の作用機構解析の結果が、アフラトキシン生産阻害活性の作用機構解明に応用出来ると考え、酵母を用いた解析に着手した。酵母に対する生育抑制活性を指標とし、cDNA 発現ライブラリーを用いた DotA 耐性株の取得を試みた。その結果、*cup9*、*rad13*、*pho2* が DotA 耐性遺伝子として得られた。これら 3 遺伝子のいずれの過剰発現株も、DotA を 50 μM 添加した培地において生育が見られた。CUP9 は、ジ及びトリペプチドトランスポーター PTR2 の転写抑制を、RAD13 は CUP9 のユビキチン-プロテアソーム系による分解に関与する。よって *cup9* 及び *rad13* 過剰発現株は、PTR2 の発現量が下がり、トリペプチドに類似した DotA の取り込みが抑制された結果、耐性となることが予想された。

転写活性化因子である PHO2 は、3 種の転写因子 PHO4、BAS1、SWI5 とヘテロダイマーを形成し、それぞれリン酸代謝関連タンパク質、プリン・ヒスチジン生合成酵素、接合型変換に関わるヌクレアーゼをコードする遺伝子の転写を活性化するが、*pho4*、*bas1*、*swi5* の過剰発現株を用いた実験より、DotA 耐性は PHO2 で知られる既知経路の活性化によるものではないことが示された。そこで *pho2* 過剰発現により転写が変化する PHO2 下流の遺伝子を網羅的に調べるために、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、*pho2* 過剰発現株で野生株より転写が上昇している遺伝子の中には、DotA 耐性に関与していると予想されるものはそれぞれの遺伝子の破壊株を用いた実験で見出せなかったが、*ptr2* 遺伝子の転写量の減少が見られた。このことから、*pho2* 過剰発現による DotA 耐性の機構は *cup9* 過剰発現と同様の DotA 取り込み量の減少によるものであると推定された。以上、酵母を用いた DotA の作用機構の解析では、DotA の取り込みに関する機構が明らかになったが、その細胞質内での作用に関しては新たな知見は得られなかった。

### 第三章 blasticidin A の作用機構解析

#### 1) BcA 耐性酵母の取得

BcA は酵母に対して生育抑制作用を示し、その MIC 値は 1  $\mu$ M である。BcA は 3  $\mu$ M 以上の濃度においてはカビに対しても生育抑制作用を示すため、酵母における解析結果がカビにも応用出来ると考え、酵母を用いた解析を試みた。ゲノムライブラリーを用いたマルチコピーサプレッサーの取得実験を行ったところ、多剤耐性のトランスポーターである *ylr046c* が BcA 耐性遺伝子として得られた。次に、cDNA 発現ライブラリーを用いて耐性株のスクリーニングを行った。その結果、新たに *bmh1/2* 及び *cmk2* が BcA の生育抑制作用に対するマルチコピーサプレッサーとして得られた。BMH1/2 は 14-3-3 タンパク質であり、200 種以上のリン酸化タンパク質に結合し、シグナル伝達に重要な役割を果たす。*Bmh1/2* は、TOR 阻害剤のラパマイシン(Rap)の酵母に対する生育抑制作用のマルチコピーサプレッサーとして報告されていることから、BcA と Rap の作用機構の類似性を調べた。TOR の制御下にある遺伝子の転写量の増減を Rap と BcA 処理の場合で比較した。その結果、遺伝子転写量の変化のパターンが両者では異なっており、BcA の作用は Rap と異なることが示唆された。CMK(カルモジュリン依存性キナーゼ)2 は、基質が未同定でその機能が解明されておらず、BcA 耐性の機構を調べる手がかりは得られていないが、BMH1/2 と CMK2 の両者ともにリン酸化タンパク質に関与することが、BcA の作用に関連する可能性が考えられた。

#### 2) 蛍光二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)による解析

BcA による酵母菌体内のタンパク質のリン酸化レベルや発現量の変化を網羅的に解析するために、2D-DIGE による解析を試みた。その結果、BcA 処理によって 4 種のリボソーム構成タンパク質の発現量の減少が見られ、またイニシエーションファクター、リリースファクター、リボソーム結合シャペロンの各タンパク質についてリン酸化によると予想される等電点のシフトが観察された。このことから、BcA はリボソームに影響を与え、タンパク質翻訳を阻害することが予想された。酵母ガラクトース誘導系を応用したタンパク質合成活性の評価系を用いた実験の結果、BcA はシクロヘキシミド(Chx)やブラストサイジン S(BcS)と同じようにタンパク質合成阻害活性を有することが明らかになった。

### 3)既知のタンパク質合成阻害剤との比較

Chx、BcS が酵母に与える影響を 2D-DIGE で解析したところ、BcA の場合と同様のリボソームタンパク質の減少が見られた。この結果から、リボソームタンパク質の減少はタンパク質合成阻害剤に共通して見られる現象であり、1 分間に約 2000 個という高速で合成されるリボソームタンパク質の合成阻害が、タンパク質の中でも特に顕著に観察されることによって生じると予想された。しかし、翻訳関連因子のリン酸化によると予想される等電点のシフトが BcS 及び Chx では見られなかった。このことから、BcA はこれら薬剤と異なった作用機構でリボソームのタンパク質合成活性を阻害していると予想される。その機構を解析するために、翻訳関連因子のリン酸化酵素の活性調節機構に BcA が与える影響を現在調べている。また、BcS が *A. parasiticus* のアフラトキシン生産を IC<sub>50</sub> 値 28 μM(BcA は 0.25 μM)で特異的に阻害することから、タンパク質合成阻害活性がアフラトキシン生産阻害活性と関連していることが推察された。

### 第四章 *A. flavus* を用いたプロテオーム解析

BcA 及び DotA が *A. flavus* の菌体内タンパク質に与える影響を 2D-DIGE により解析した。DotA、BcA、BcS を培養開始段階に添加し、アフラトキシン生産開始前の培養 24 時間目と生産中の 36 時間目で菌体を回収し比較を行った。その結果、いずれの薬剤添加サンプルにおいてもコントロールに比べ、アフラトキシン生合成酵素の発現量の減少が確認された。その他 3 種の薬剤添加サンプルで共通して発現が減少しているタンパク質を 6 個同定したが、いずれも機能が未知であった。DotA 添加サンプルのみで 40~50%減少していたものとして、カタラーゼ、グルタチンレダクターゼが同定された。両者は酸化ストレスに応答するタンパク質で、酸化ストレスとアフラトキシン生産の関連は古くから知られていることより、DotA は酸化ストレス応答に関与する転写因子等の活性を調節する機構に作用する可能性が考えられた。また、DotA 添加サンプルにおいて、脂肪酸β酸化に関わるアシル CoA シンターゼ、グリオキシル酸経路に関与するギ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸合成を行うグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸を開裂してアセチル CoA の供給をする ATP-クエン酸リアーゼ、エタノール代謝系の酵素であるアルデヒドデヒドロゲナーゼといった TCA サイクルに関与するタンパク質の減少が見られた。これは DotA により酸化ストレス応答タンパク質が減少した結果、過酸化物を生産する電子伝達系の活性が低下したためであると考えられる。

現在、DotA が酸化ストレス応答の調節因子の発現に与える影響の解析を行っている。また、BcA、BcS のタンパク質合成阻害活性とアフラトキシン生産阻害活性の関連を明らかにするために、両者で共通して発現量が減少する機能未知のタンパク質の機能解析を行っている。

### 参考文献

Yoshinari, T., Akiyama, T., Nakamura, K., Kondo, T., Takahashi, Y., Muraoka, Y., Nonomura, Y., Nagasawa, H., Sakuda, S. (2007) Microbiology. Vol. 153, pp. 2774~2780