

## 生物機能開発研究所

## 平成 30 年度プロジェクト成果報告

プロジェクト名：

エクトインによる真核生物ストレス耐性機構の解明と新たな産業利用基盤の展開 [ 2 年目 ]

課題 : エクトインによる真核生物ストレス耐性機構の解明と新たな産業利用基盤の展開

担当 : 金政 真・堤内 要

生物は様々な環境ストレスから細胞を保護するために防御機構を有している。浸透圧ストレスは塩などが高濃度の環境に生物が暴露されることによって引き起こされる。生物は様々な適合溶質を細胞に蓄積することで浸透圧耐性を実現している。原核生物では、好塩細菌等においてエクトインが適合溶質として知られている。細胞内にエクトインを蓄積することで浸透圧耐性を細胞に付与する。また、生体高分子を安定化することにより細胞を保護する。一方、糸状菌などの真核微生物ではエクトインの生産は報告されていない。そこで本研究では昨年度に引き続き、真核生物におけるエクトインの生産性について知見を得ることを目的として分析を行った。また、エクトイン生産誘導条件についても調べた。昨年度我々が構築したジルコニアビーズ破碎による試料調製法を用いて糸状菌、担子菌、植物について LC-MS/MS 分析した。その結果、他の真核生物においてもエクトインを検出した。本研究では、初めて哺乳類以外の真核生物のエクトインを検出することに成功した。

課題 : LC-MS/MS を用いたエクトインの定量分析における試料前処理法の検討

担当 : 堤内 要・金政 真

エクトインは細菌が高ストレス条件下で生存する際に誘導産生される環状アミノ酸で、タンパク質や核酸等を安定化すると同時に、細胞に蓄積して浸透圧調節をすることで防御機構を発揮する適合溶質である。最近、共同研究者の金政らによって、これまで確認されていた原核生物以外でも生成されていることが発見され、大変注目を集めている。昨年度当研究室では、 $H_2$ -Pd/C- $D_2O$  反応系による H-D 交換反応を用いた重水素化エクトインの合成を行い、LC-MS/MS 測定への応用を検討した。エクトインの重水素化物を内部標準に用いて、LC-MS/MS によるエクトインの定量分析を検討し、その有用性を確認できたものの、高塩濃度で培養された微生物などの試料では測定試料溶液に含まれる塩が測定を妨害してしまい、信頼性の高いデータを得られないといった問題があった。そこで今年度は試料中のエクトインを塩からできるだけ分離することを目標とした前処理方法を検討した。その結果、グラファイトカーボン製の固相抽出カラムを用いることで塩の影響を大幅に抑えられることを確認することができた。

プロジェクト名：

天然素材・微生物及び既知 AMPK 活性化物質類縁体からの新規 AMPK 活性化物質の探索とその構造解析 [1 年目]

課題：天然素材・微生物起源の AMPK 活性化物質候補の調製

担当：塚本義則

H30 年度は天然物・微生物起源の AMPK 活性化物質候補のアッセイ用サンプルの調製を行った。具体的には、天然物起源については、農作物（果実、茶、大豆、レンコン、樹木の花・葉など）、微生物起源については、イソフラボン資化性菌及びその培養物、テルペン系炭化水素資化性菌、多糖・オリゴ糖生産菌、酢酸耐性菌及びアシルグリセロール類を原料の脂質抽出物の DMSO 溶解サンプルを合計 441 サンプル調製した。

これらの調製サンプルの一部を用いて AMPK 活性化物質の検索の前段階としての「糖の取り込み試験」を行って、糖取り込みが活性化されたものを AMPK 活性化候補物質として選択するプロトコールとした。具体的には、L6（ラット筋骨細胞）、AML12（マウス肝細胞）及び HepG2（ヒト肝細胞）の 3 種類の細胞を用いて、nepodin をポジティブコントロールとしたバイオアッセイ系で対照に対して有意な糖の取り込みを引き起こしたサンプルを次の AMPK 活性試験に移した。第一段階として、有機合成とリパーゼによる酵素合成を組み合わせた方法で作製された 11 種類のアシルグリセロール（モノアシルグリセロール 2 種類、ジアシルグリセロール 5 種類、トリグリセロール 4 種類）をアッセイした結果、2 種類で対照と比べて有意に糖の取り込みが促進されることが分かった。今後は残りの試作サンプルの糖の取り込み並びに AMPK 活性化試験を行い、既知のノベルチンやネポジンよりも優れた AMPK 活性化物質をスクリーニングし、効果が最大の物質についてはその構造解析を行っていく予定である。

課題：AMPK 活性化物質の類縁体の有機合成

担当：堤内 要

本研究では、AMPK 活性化物質、特にノビレチンの類縁体合成を検討した。ノビレチンは 3,4,5-トリメトキシフェノールを出発物質として 12 段階の反応で合成することができる。ゆえに、その途中で異なる反応試薬を用いれば、容易に類縁体の合成を達成することができると考えた。初めに 3,4,5-トリメトキシフェノールのメチル化を行った。ヨードメタンと炭酸カリウムを用いたメチル化反応は定量的に進行し、1,2,3,5-テトラメトキシベンゼンを得ることができた。その後、塩化アセチルと塩化アルミニウムを用いて Friedel-Crafts アシル化反応を行ったところ、文献通り 2-ヒドロキシ-3,4,6-トリメトキシアセトフェノンが得られたが、副生成物も単離して構造解析を行ったところ、予期せぬ化合物が生成したことが明らかになった。構造解析が正しければ新規化合物とみなせるものであるため、この化合物を用いて類縁体合成を行うなどの計画を立て、合成研究を進めた。

課題 : AMPK 活性化物質の単離精製と AMPK 活性化のバイオアッセイ  
担当 : 塚本義則・禹濟泰・大西素子・堤内要・米澤貴之・渡辺章夫

AMPK はエネルギー代謝に深く関わる重要な細胞内シグナル分子であり、その活性化化合物は肥満や糖尿病などの生活習慣病の予防や改善に有用である。我々が見出した AMPK 活性化化合物の一つであるネポジンの効率的な製造原料として、タデ科のギシギシ (*Rumex japonicus*) の他、近縁種について、採取地域や栽培条件の違いと、活性成分化合物であるネポジンその他の含有量について調査した。また、沖縄素材を中心に、柑橘類 (シークワサー, タチバナ, ポンカンなど)、黒ウコン、クベバコショウなどの素材に着目して、それらの素材を入手し、抽出物サンプルの作製を行った。これらの素材エキスについては、今後、活性試験に供して、新規 AMPK 活性化化合物の取得を目指す予定である。一方、ネポジンの作用メカニズム解析として、ネポジンの部分構造化合物を入手し、筋管細胞の糖取り込みを指標にその活性を評価することで、構造活性相関についての解析を行った。

---

課題 : PPM1 プロテインホスファターゼを標的とした新規 AMPK 活性化物質の探索と作用機序の解明  
担当 : 大西素子

AMP 活性化キナーゼ (AMPK) は細胞におけるエネルギー代謝の主要な制御因子の 1 つであり、細胞内の AMP レベルが上昇することによって活性化されるとともに、リン酸化/脱リン酸化により活性が制御されている。Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>依存性プロテインホスファターゼ A (PPM1A) および PPM1B は AMPK の触媒サブユニットである  $\alpha$  サブユニット (AMPK  $\alpha$ ) の Thr172 を脱リン酸化することによって、不活性化することが知られている。すなわち PPM1A および PPM1B を阻害することによって、AMPK の活性を上昇できる可能性がある。PPM1A に対する有効な阻害剤は未だ見出されていないため、これを探索することを目的として研究を行った。

PPM1A および PPM1B は N-ミリスチル化やリン酸化といった翻訳後修飾を受けることがわかっている。最近、細胞内における AMPK  $\alpha$  の脱リン酸化にはこの N-ミリスチル化が必用不可欠であることが報告された。しかしながら大腸菌で発現した哺乳類の PPM1A または PPM1B は、翻訳後修飾を受けないと考えられる。そこで哺乳類の細胞内におけるものとのできる限り近い状態の酵素を得るため、今年度はまず、ヒト PPM1A および PPM1B の cDNA をクローニングし、PPM1A または PPM1B cDNA を挿入した組換えバキュロウイルス DNA を作製した。これを昆虫細胞の Sf21 細胞に transfection して組換えバキュロウイルスベクターを作製、十分増殖させた後、Sf21 細胞に感染させて PPM1A および PPM1B 発現系を構築した。今後、ウイルスストックのタイターを決定するとともに、発現条件および精製条件の最適化を行い、得られた酵素を用いて阻害剤を探索する。