

論文の内容の要旨

論文題目 病原性真菌 *Candida albicans* の 1,3- β -D-グルカンシンターゼ
及びその阻害剤に関する研究

氏 名 根東 攝

Candida albicans は生体内常在真菌として健康人の口腔、咽頭、腸管粘膜、膣などに存在しており通常は無害である。しかしながら生体防御能が低下した時に異常に増殖し内因性感染症としてカンジダ症を発症する。エイズの蔓延、抗生物質の連用、癌化学療法や免疫抑制剤、移植医療などの医療の高度化に伴い、こうした日和見感染症としての深在性真菌症は現在増加傾向にある。

真菌感染症の治療薬としては、ポリエン類、アゾール類およびピリミジン類が使われているが、それぞれ、腎毒性、殺真菌効果の弱さと薬剤相互作用および耐性菌の出現、肝毒性と耐性菌の出現、といった理由で使用には問題点が残る。こうした現状から新たな標的をもつ有効な抗真菌剤の開発が切望されている。

真菌の細胞壁は主に β -D-グルカン、マンノプロテインおよびキチンで構成されており、これらは互いに結合して層構造を形成し、細胞の強度の維持および形態形成に重要な役割を果たしている。 β -D-グルカンには、1,3- β -結合型と1,6- β -結合型が存在し前者は細胞壁重量の約半分を占め、1,3- β -D-グルカンシンターゼ (EC.2.4.1.34: UDP-Glucose: 1,3- β -D-glucan 3- β -D-glucosyl-transferrase) によって合成される。この酵素は出芽酵母において、16 回膜貫通ドメインを持つ触

媒サブユニット (Fks1p/Fks2p) 及び、調節サブユニットである低分子 G 蛋白質 Rho1p で構成されていると考えられており、*C. albicans* からは触媒サブユニットの相同遺伝子 *GSCI* が同定されている。また 1,3-β-D-グルカンシンターゼは、1) 1,3-β-D-グルカンシンターゼが細胞増殖に必須であること、2) 他の病原性真菌でも同様な機構で 1,3-β-D-グルカンが合成されていると予想されることから、多くの病原性真菌に有効な薬剤の開発が期待できること、3) 動物細胞には細胞壁が存在しないことから、副作用の心配が少ないこと、4) 細胞膜上に存在することから、必ずしも薬剤が細胞内に入る必要がないこと、などの理由から抗真菌剤の優れた標的分子として注目されている。そこで本研究では、病原性真菌 *C. albicans* において 1,3-β-D-グルカンシンターゼの調節因子の同定とその解析を行い、さらに 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤アエロスリシン 3 の作用様式の解明を試みた。また新規阻害剤を同定し、その阻害剤の阻害メカニズムの解析及び薬効の評価を行った。

1、*C. albicans* *RHO1* 遺伝子の同定と 1,3-β-D-グルカンシンターゼの活性調節

出芽酵母において *RHO1* 遺伝子産物が 1,3-β-D-グルカンシンターゼの調節因子として機能しているとの知見から、病原性真菌 *C. albicans* において *RHO1* 遺伝子を単離し、その遺伝子産物の機能解析を行った。Rho 型 G 蛋白質に保存されているモチーフ配列を基に PCR 法およびサザンブロット解析により相同遺伝子を単離した。その推定産物が出芽酵母の *RHO1* 遺伝子産物と 83% の相同性を持ち、さらに出芽酵母の *rho1* 欠損株の致死性を相補することから *CaRHO1* と命名した。続いてこの遺伝子の 1,3-β-D-グルカンシンターゼの活性調節への関与を詳細に検討した。まずプロダクトエンタラップメント法により精製した 1,3-β-D-グルカンシンターゼの活性複合体に *CaRho1p* が存在することを示した。続いて、界面活性剤・塩処理によって複合体が解離して不活化した膜画分に昆虫細胞で発現させた *CaRho1p* を加えて活性が再活性化することを示した。さらにリガンドオーバーレイ法およびケミカルクロスリンク法によって、触媒サブユニットに直接結合していることを示した。以上の結果から、本研究において単離した *CaRHO1* は出芽酵母と同様に 1,3-β-D-グルカンシンターゼの活性を制御していると結論した。

2、1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤アエロスリシン 3 の阻害機構の解析

出芽酵母の 1,3-β-D-グルカンシンターゼ触媒サブユニットは互いに機能を相補する二つの遺伝子、*FKS1*、*FKS2* にコードされており、一次構造上 88% の高い相同性を持つ。我々が同定した 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤アエロスリシン 3 は環状リポペプチド構造を持ち、Fks1p 及び Fks2p に対して異なった感受性を持つことを示した。さらにこの性質を利用してアエロスリシン 3 の作用点の同定を試みた。まず両触媒サブユニット遺伝子のキメラ遺伝子を作製し、出芽酵母の *fks1* と *fks2* の二重欠損株を形質転換してキメラ変異体を作製した。これらのアエロスリシン 3 に対する感受性を解析した結果、感受性を決定する領域が Fks1p の 1284 番目から

1357 番目までの 74 アミノ酸残基に絞られた。この領域には両触媒サブユニット間で 10 のアミノ酸の違いがあることから、Fks1p 上のこれら 10 アミノ酸をそれぞれ Fks2p の対応するアミノ酸に置換した点変異体を構築し、その感受性を調べた。その結果、Fks1p の一アミノ酸置換体 Fks1p (K1336I) が Fks2p と同様の高感受性を示すことが明らかとなった。逆に Fks2p (I1355K) は Fks1p と同様の低感受性を示した。以上の結果からこの残基がアエロスリシン 3 による阻害の作用点であると結論した。今後この残基およびそれが位置する N 末端から 4 番目の細胞外ドメインを中心にさらなる阻害メカニズムの解明が期待される。

3、新規 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤ピペラジンプロパノール類化合物の同定と解析

既知の 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤には、エキノカンジン類、アクレアシン類、パプラカンジン類および上述のアエロスリシン類がある。最近エキノカンジン類のカスポファンギン、ミカファンギンが相次いでアメリカ食品医薬品局に認可され、その臨床での効果が期待されている。しかしながらこれらはいずれも注射剤であり、そのためこれら阻害剤の使用は主に重症患者や入院患者、あるいは他の抗真菌剤に効果が得られなかった患者に限られる。それゆえに、同じ 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤でも、経口吸収性のある抗真菌剤が切望されている。また上述の阻害剤はすべて微生物抽出物から同定されており、それゆえその構造が複雑で、化学的な修飾が制限されている。そこで本研究では類縁化合物の合成がより簡便な新規骨格の阻害剤の同定を試み、経口吸収性のある 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤の同定を目指した。まず精製した 1,3-β-D-グルカンシンターゼの阻害活性を指標に薬剤スクリーニングを行い、新規ピペラジンプロパノール類化合物を同定した。さらに出芽酵母の変異体を用いた解析から、細胞内でも 1,3-β-D-グルカンシンターゼを阻害しており、かつ既知の 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤とはその阻害メカニズムが異なることを示唆する結果を得た。さらに広い抗真菌スペクトラムおよび動物モデルでの効果が確認された。今後の化学的修飾によって、経口吸収性のある抗真菌剤としての開発が期待される。

本研究により病原性真菌の *RHO1* 遺伝子が単離され、その産物が 1,3-β-D-グルカンシンターゼの調節因子として機能していることが示された。出芽酵母や分裂酵母でも同様の報告があり、真菌類の 1,3-β-D-グルカン合成メカニズムの普遍性が示唆された。この調節サブユニットも抗真菌剤の良い標的として今後の阻害剤の同定およびその臨床応用が期待される。また 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤アエロスリシン 3 の作用点が明らかになったことは、16 回膜貫通型で分子量が 200k を超える扱いが困難な膜蛋白質に対する、さらに詳細な阻害メカニズム解明の突破口になることが期待される。またこうした情報が、さらに効果の高い阻害剤の理論的創薬に役立つものと思われる。また本研究によって同定された新規 1,3-β-D-グルカンシンターゼ阻害剤ピペラジンプロパノール類化合物は、構造の新規性に加え、1,3-β-D-グルカンシンターゼに対する作用様式も新規性が示唆され、更なる最適化の後にその臨床応用が大いに期待される。