

論文内容の要旨

論文題目 β -1,6-glucan 生合成阻害物質の発見とその性状解析

氏名 北村 昭浩

【背景】

病原性真菌は皮膚や粘膜の比較的軽度の感染症から生命を脅かす深在性真菌症まで多様な疾患の原因菌であり、臨床現場に様々な問題をなげかけている。これに対し、既存の抗真菌薬は数、種類ともに限られており、新規作用機作を有する薬剤の開発が望まれている。真菌細胞に特徴的な細胞壁は選択性の観点から魅力的な標的である。真菌細胞壁は主に β -1,3-glucan、 β -1,6-glucan、マンナンおよびキチンで構成されているが、マンナン合成経路は真核生物に共通性が高いため抗真菌薬の標的として好ましくなく、 β -1,3-glucan およびキチンはすでに複数の阻害物質の報告がある。一方、 β -1,6-glucan の生合成経路は比較的最近になって解析が進んだ経路であり、真菌選択的で生育に必須な酵素が複数あると考えられているものの阻害物質の報告は無い。そこで、筆者らは β -1,6-glucan 生合成阻害物質の獲得を目的とした本研究に着手した。

【病原性真菌における *KRE6* ホモログのクローニング】

まず、 β -1,6-glucan 阻害物質に期待される抗真菌スペクトルを検証する目的で、その合成酵素の一つと考えられている *KRE6* の種々の病原性真菌における存在を検証した。その結果、*Candida albicans* (代表的な病原性酵母) および *Aspergillus nidulans* (菌糸状真菌) でのホモログの存在が確認された。また、種々の *Candida* 属菌種から *KRE6* ホモログの一部 (あるいは全部) をクローニングして遺伝子配列を比較した結果、これらのホモログ間での高い相同性が確認されたことから、 β -1,6-glucan 阻害物質は幅広く真菌に作用する可能性が高いと考えられた。

【 β -1,6-glucan 阻害物質獲得のためのアッセイ系の確立】

次いで、 β -1,6-glucan 阻害物質獲得のためのアッセイ系の確立に着手した。アッセイ系確立のための最大の問題点はその生合成に関与する遺伝子の情報は多数あるが、各遺伝子がコードしている酵素の具体的な機能が明らかにされていないことである。このため、酵素レベルでのアッセイ系の確立は現状では困難である。一方、 β -1,6-glucan の酵母細胞内での役割に関しては多くの知見が得られていた。 β -1,6-glucan は細胞壁タンパク質の一部を固定するためのアンカーとしての役割を担っており、 β -1,6-glucan の生合成が不十分になるとこれらの細胞壁タンパク質は細胞外へ流出する。また、これらの細胞壁タンパク質は特徴的な配列を持つ遺伝子にコードされた GPI タンパク質とよばれるものであり、この配列の特徴を利用して任意のタンパク質を細胞壁 (あるいは細胞膜) に固定化する技術が確立されていた。これらの知見を応用し、筆者らは真菌細胞壁 (または細胞膜) に Green Fluorescent Protein (GFP) を固定したアーミングイーストを作出し、薬剤作用時にアーミングイーストから流出する GFP の量を指標と

して β -1,6-glucan 合成阻害物質をスクリーンするアッセイ系を確立した。本アッセイ系の資質を既存抗真菌薬および各種遺伝子破壊株を用いて評価した結果、本アッセイ系では β -1,6-glucan に加えて β -1,3-glucan、マンナン等の細胞壁成分合成に関与する種々の酵素の阻害物質を幅広くスクリーンできる一方、タンパク質、核酸、脂質等を標的とする阻害物質はスクリーンされないことが示唆された。また、各種遺伝子破壊株から流出した GFP の分子量を比較した結果、破壊した遺伝子に依存した特徴的な分子量変化が観察された。したがって、薬剤作用時に流出した GFP の分子量を観察することにより、その薬剤のおおまかな作用機作の推定も可能と考えられた。以上の結果から、本アッセイ系は β -1,6-glucan を含む真菌選択的な標的を有する新規物質を早期に選抜できるスクリーニング系であると考えられた。

【 β -1,6-glucan 阻害物質の獲得】

そこで、本アッセイ系を用いて低分子ライブラリー約 10 万検体を対象とした HTS (High Throughput Screening) を実施した結果、興味深いプロファイルを有する D75-4590 を獲得することができた。*S. cerevisiae* を用いて D75-4590 の作用機作解析を行なった結果、D75-4590 の作用により 1) [14 C]glucose の β -1,6-glucan 画分への取り込み量が選択的に減少する、2) 細胞外に流出したタンパク質に付加されている β -1,6-glucan が著しく減少する、3) β -1,6-glucan 関連遺伝子破壊株に見られる特徴的な形態変化(多出芽形態)を示すことなどが明らかとなった。さらに、D75-4590 耐性菌を作出して遺伝子変異を解析した結果、*KRE6* の変異による顕著な耐性化が確認された。以上の結果から、D75-4590 は Kre6p を一次作用点とする特異的な β -1,6-glucan 合成阻害剤であると考えられた。

【D75-4590 誘導体の抗真菌活性評価】

旧第一製薬内で種々の D75-4590 誘導体が合成され、D11-2040、D21-6076 等の高い抗真菌活性を示す化合物が獲得された。これらの化合物の抗真菌活性プロファイルを多面的に評価した結果、以下の事実が明らかとなった。

1. D75-4590 誘導体は *in vitro* で *Candida* 属に幅広く活性を示し、既存薬耐性菌にも有効だが、*Cryptococcus neoformans* や菌糸状真菌に対しては活性を示さない。
2. D11-2040 および D21-6076 はどの *Candida* 属菌種に対しても非常に低濃度で作用を示すが、その増殖阻害率は菌種により大きく異なり *C. albicans* や *Candida tropicalis* に対する効果は非常に弱い。
3. D21-6076 は *C. albicans* および *Candida glabrata* のマウス全身感染モデルで明瞭な薬効を示す。
4. *C. albicans* に対して D11-2040 と既存抗真菌薬とを併用すると、既存薬の MIC 値を低下させる、作用を増強するなどの種々の効果が *in vitro* および *in vivo* で観察される。
5. D11-2040 と既存抗真菌薬との *in vitro* での併用効果は *C. neoformans* や *Aspergillus fumigatus* においても、弱いながら認められる。

以上の結果から、D75-4590 誘導体は少なくとも *Candida* 属に幅広く効果を示すとともに、

既存薬の効果を増強する特性も有り、新規抗真菌薬母核としての十分な有用性があると考えられた。

【D21-6076 の薬効発現機序解析】

D21-6076 の *C. albicans* に対する *in vitro* 増殖阻害作用は弱いにもかかわらず、明瞭な *in vivo* 薬効が認められたことから、D21-6076 の *in vivo* 薬効には増殖阻害活性以外の効果が発現していることが推察された。そこで、D21-6076 の薬効発現機序解析に着手した。*C. albicans* の病原性に関与する種々のタンパク質は β -1,6-glucan を介して細胞壁に固定化されていることが種々の文献情報で明らかとなっている。D21-6076 の作用によりこれらのタンパク質は細胞外に流出すると考えられることから、本化合物の *in vivo* の効果は真菌症の発症機序に対する阻害作用に起因する可能性があると考えられた。そこで、*C. albicans* の動物細胞への定着、菌糸状生長といった発症に必須な現象を模倣した種々の *in vitro* 系で D21-6076 を評価した結果、いずれの評価系においても強い阻害効果が観察されるとともに、これらの阻害作用の強さと β -1,6-glucan 阻害作用の強さに明確な相関性が観察された。以上から、D21-6076 の薬効発現には β -1,6-glucan 阻害に基づく真菌症発症機序に対する効果が深く関与していることが示唆された。

以上、筆者は本研究を通じて、真菌細胞壁を作用点とする薬剤を効率的にスクリーンするアッセイ系の開発およびこれを用いた世界初の β -1,6-glucan 阻害物質獲得に成功するとともに、その誘導体の性状および新規抗真菌薬母核としての有用性を *in vitro*, *in vivo* 両面から明らかにした。