

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 北村 昭浩

真菌は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。本論文は新規抗真菌剤標的として細胞壁成分の一つである β -1,6-glucan に着目し、その生合成阻害物質の獲得と解析を試みたものであり、11 章からなる。

第 1 章の序論および第 2 章の試験材料および方法に続き、第 3 章では β -1,6-glucan 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* および *Aspergillus nidulans* 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。

第 4 章では β -1,6-glucan 阻害物質獲得のためのアッセイ系の確立を試みた。 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、この配列を利用して任意のタンパク質を細胞壁（または膜）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、真菌細胞壁（または膜）に Green Fluorescent Protein (GFP) を固定したアーミングイーストを作出し、薬剤添加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することが可能であると考えられた。また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、ヒットした薬剤のおおまかな作用機作の推定も可能と考えられた。

第 5 章では、上記のアッセイ系を用いた High Throughput Screening により獲得した D75-4590 の作用機作解析を行なった。その結果、D75-4590 を *Saccharomyces cerevisiae* に作用させると 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、などの事実が示された。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。

第6章ではD75-4590誘導体であるD11-2040およびD21-6076の抗真菌活性プロファイルを多面的に評価した。その結果、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こと、*Candida albicans*に対する増殖阻害率は非常に低いもののマウス全身感染モデルでは明瞭な薬効を示すこと、既存抗真菌薬との種々の併用効果が*in vitro*および*in vivo*で認められること、などが示された。

第7章ではD21-6076の*C. albicans*マウス感染モデルにおける薬効発現機序を解析した。*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予想されることから、本化合物の*in vivo*での効果は、その真菌症発症機序に対する阻害作用に起因してい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た。第8章では総括、第9章では考察が述べられており、第10章では謝辞、第11章では引用文献が記載されている。

以上、本研究は、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、 β -1,6-glucan阻害物質の獲得、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ものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。