

201009027A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

キャンディン系抗真菌化合物の生合成経路を利用した
新規抗真菌化合物の創出のための基盤的研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成23（2011）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

キャンディン系抗真菌化合物の生合成経路を利用した

新規抗真菌化合物の創出のための基盤的研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成23（2011）年 3月

目次

I. 総括研究報告書	1
------------------	---

研究代表者：星野泰隆（国立感染症研究所 生物活性物質部 主任研究官）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	6
--------------------------	---

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業））
総括研究報告書

キャンディン系抗真菌化合物の生合成経路を利用した新規抗真菌化合物の創出のための
基盤的研究

研究代表者 星野 泰隆（国立感染症研究所 主任研究官）

要旨

キャンディン系の抗真菌化合物の生合成遺伝子に関する情報は、今までに報告がない。そこで、ゲノムスキニングという手法を用いて、まず次世代シーケンサーによりキャンディン系抗真菌化合物であるアクレアシンの生産菌のゲノム情報を取得し、次にパイオインフォマティクスの手法により、いくつかのアクレアシンの生合成遺伝子の候補を取得した。その中の候補遺伝子が、アクレアシンの環状ペプチド部分を生合成する酵素をコードしている遺伝子と予想された。次にこの候補遺伝子の破壊株を作成し解析を行った結果、破壊株ではアクレアシンの生産が見られなかったことから、この遺伝子はアクレアシンの生合成遺伝子と判明した。次に、キャンディン系抗真菌化合物の耐性遺伝子に関して解析を行ったところ、1,3- β -glucan synthase (FKS1) は、耐性型ではなく野生型を示しており、新しい耐性を有していると考えられる。これらの結果から、キャンディン系抗真菌化合物の生合成に関与する遺伝子が明らかになった。

A. 研究目的

医療の進歩と高度化が相まって多くの人命が救われている。一方で、高齢者や薬剤等によって免疫力の低下した易感染者が年々増加傾向にあり、真菌症の中でも深在性真菌症の治療の必要性が高まってきている。現在、深在性真菌症の治療に関しては、アゾール剤、アンホテリシンBリポソーム製剤、キャンディン系抗真菌薬が主に利用されているが、その問題点としては、アスペルギルス症の増加、アゾール剤への感受性の低下や耐性化、ブレークスルー真菌症等があげられる。これらに対する既存の薬剤の成績は一定の効果はあるが、十分に満足できるものではない。このような状況から、新たな抗真菌薬の臨床導入が待たれて

いる。そこで我々は、今まで未解明であるキャンディン系化合物の生合成機構を解明し、生合成経路の改変による新たなキャンディン系抗真菌化合物の創製を目指す。

B. 研究方法

1) キャンディン系抗真菌活性物質生産株のゲノムスキニングを用いた解析

キャンディン系抗真菌活性物質アクレアシンを生産することが報告されている *A. aculeatus* のゲノム情報から、アクレアシンの生合成遺伝子の情報を得るためにゲノム解析を行った。

A. aculeatus のゲノムシーケンスは、迅速かつ大量の配列が得られる次世代シーケンサーを利用して行った。得られる大

量のシーケンス情報をアッセンブルし、配列情報を得た。得られたゲノム配列情報を用いて、アクレアシン合成に必要であると推定されるポリケチド合成酵素（PKS、脂肪酸側鎖部位）や非リボソームペプチド合成酵素（NRPS、環状ペプチド部位）をコードする遺伝子を指標とし、バイオインフォマティクスの手法を用いて探索した。また、配列情報から得られた各酵素の機能ドメイン解析により、アクレアシン合成遺伝子を推定した

2) アクレアシンの生産性の向上の検討

生産株へキャンディン系抗真菌薬の耐性遺伝子を導入し、生産性の向上を試みるために、*A. aculeatus*の薬剤耐性を検討した。また、キャンディン系抗真菌薬へ耐性、低感受性を付与すると報告のあるキャンディン系の抗真菌薬のターゲット酵素であるFKS1（1,3- β -glucan synthase）の変異に関して解析を行った。

3) アクレアシン合成遺伝子の解析

ゲノムスキニングの結果から予測されたアクレアシン合成に関与する候補遺伝子1について解析を行った。候補遺伝子1の破壊株を、アグロバクテリウムを用いた形質転換系により作成した。得られた破壊株のアクレアシン生産性に関しては、HPLCを用いて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究課題に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律”に該当するため、国立感染症研究所 組換えDNA実験実施規則にしたがって、遺伝子組換え実験申請を行い、然るべき拡散防止措置を行使した。研究を進める上で各実験施設の責任者の管理、監督の下に実験を行い、必要に応じて安全主任者の助言や指導を受けた。

また、本研究課題は、臨床研究および動物実等を行わないため、倫理面の問題がない。

C. 研究結果

1) キャンディン系抗真菌物質生産株のゲノムスキニングを用いた解析

1) キャンディン系抗真菌物質アクレアシンを生産する*Aspergillus aculeatus*のゲノム解析は、次世代シーケンサーから約1億8000万本のリードが得られ、このリードをアッセンブルし、長さが1kb以上のもので1万5000本程度になり、最長のもので約300kbのコンティグを形成した。

ここで得られたゲノム配列情報をもとに、アクレアシン合成に関与する遺伝子の推定をバイオインフォマティクスの手法を用いて行った結果、いくつかの候補遺伝子を含んだコンティグを取得した。このコンティグには、PKS、NRPS、p450やトランスポーターなどをコードする遺伝子の存在が予測できた。

得られた候補遺伝子の中で、非リボソームペプチド合成酵素をコードする遺伝子（候補遺伝子1）の機能ドメインの解析では、アクレアシンの構成成分であるアミノ酸の個数と同数の機能ドメインの存在が明らかになった。

2) アクレアシンの生産性の向上の検討（1,3- β -glucan synthase (FKS1)の解析）

カナマイシンの生産菌に、カナマイシン耐性遺伝子である6'-N-acetyltransferaseを導入することにより、カナマイシンの生産量が向上したという報告がある（J Antibiot. 39, 128-135, 1986）。同様に、耐性を導入することによる生産性の向上を試みるために、ゲノム解析の結果から、キャンディン系抗真菌薬耐性の付与の報告のあるFKS1の変異に関して解析を行った。解析の結果、本菌株のFKS1のアミノ酸配列は、今までに報告されている耐性を付与す

るアミノ酸の置換が導入されていないことが判明した。

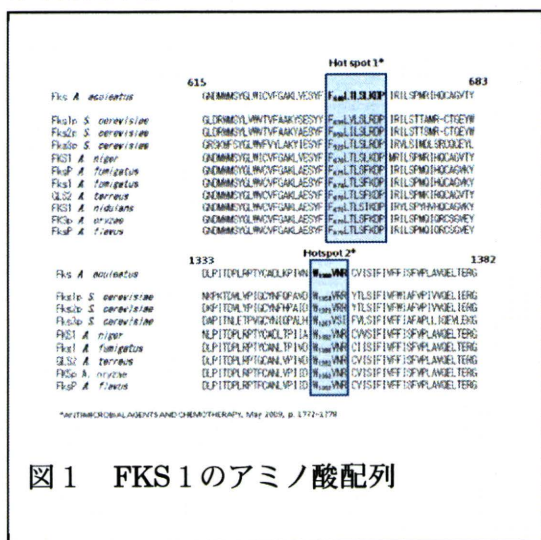


図1 FKS1のアミノ酸配列

3) アクレアシン生合成遺伝子の解析

ゲノムスキニングの結果から、アクレアシン生合成に関与する遺伝子を推定することができ、その中の候補遺伝子1について解析を行った。候補遺伝子1の破壊株をアグロバクテリウムを用いた形質転換系により作成し、得られた破壊株のアクレアシン生産性をHPLCにより解析したところ、生産性が消失していた。このことから、候補遺伝子1が生合成に関与すること判明した。

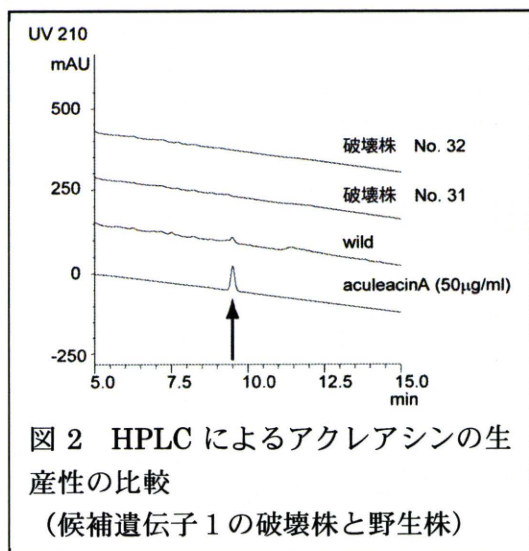


図2 HPLCによるアクレアシンの生産性の比較
(候補遺伝子1の破壊株と野生株)

D. 考察

ゲノムスキニングという手法を利用し、キャンディン系抗真菌化合物アクレアシンの生合成に関与すると予想されるいくつかの遺伝子を見出すことができた。アクレアシンの構造から予測される生合成過程と一致していること示された。また、この中の候補遺伝子1は、アクレアシンの母骨格である環状ペプチドを生合成すると予想され、この遺伝子の破壊株の解析では、アクレアシンの生産性が消失したことから、この候補遺伝子1は、アクレアシンの生合成に関与していることが判明した。キャンディン系化合物の生合成に関する環状ペプチド部分の生合成が明らかになったと言える。

生産菌の耐性メカニズムに関しては、FKS1の変異による耐性ではなく、今までとは異なった耐性のメカニズムである可能性が本年度の結果から示された。このことは、非常に興味深く、*Aspergillus fumigatus*等の臨床で問題になっている種においても、本菌株と同様の耐性メカニズムが問題になる可能性は否定できないことから、耐性のメカニズム解析を進める必要がある。

以上のように、従来の方法ではなく、ゲノムスキニングという菌株全体のゲノム情報を取得し解析を行う方法により、生合成だけでなく薬剤耐性など複数のアプローチを迅速に行うことができ、非常に有効な手段であった。

E. 結論

キャンディン系抗真菌化合物の生合成に関する情報は、A. A. Adefaratiらの報告(*J. Am. Chem. Soc.*, 113, 3542–3545, 1991)以外になかったが、新しい解析手法であるゲノムスキニングを利用することにより、アクレアシンの生合成遺伝子を迅速に特定することができた。また、薬剤耐性に関しても新たな耐性メカニズムの存在す

る可能性が示された。今後、本研究の成果により、新しいキャンディン系抗真菌化合物の今後さらなる開発に貢献できるといえる。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yasutaka Hoshino, Kazuhiro Chiba, Keiko Ishino, Toshio Fukai, Yasuhiro Igarashi, Katsukiyo Yazawa, Yuzuru Mikami, and Jun Ishikawa. Identification of Nocobactin NA Biosynthetic Gene Clusters in *Nocardia farcinica*. J. Bacteriol. 193:441-8, 2010.

2. 学会発表

星野泰隆. 新しい抗生物質の探索研究. 第54回日本医真菌学会総会. 10月16-17日, 2010年, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasutaka Hoshino, Kazuhiro Chiba, Keiko Ishino, Toshio Fukui, Yasuhiro Igarashi, Katsukiyo Yazawa, Yuzuru Mikami, and Jun Ishikawa	Identification of Nocardin NA Biosynthetic Gene Clusters in <i>Nocardia farcinica</i>	Journal of Bacteriology	193	441-448	2011

