

201108021A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成24（2012）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23年度 総括研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成24（2012）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）

# 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

キャンディン系抗真菌化合物の生合成遺伝子はいまだ解明されていない。このことから、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、次にバイオインフォマティクス的手法により、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判明した。この遺伝子の機能解明を進めており、さらに候補遺伝子の周辺領域の遺伝子に関して、バイオインフォマティクスを利用した解析により、新たに生合成に関与する遺伝子を予測することができた。また、生合成遺伝子の改変による新規抗真菌物質の創製のための高効率遺伝子操作系を確立した。この系は、野生株と比較して相同組換え能が約10倍になり、効率的に遺伝子操作が可能になった。生産株のキャンディン耐性は、既知の耐性メカニズムと異なると考えられたことから、生産株のゲノムライブラリーを作成し、キャンディン系抗真菌化合物に対する耐性化したと考えられるクローンを取得した。これらは現在解析中であり、これらのクローンの解析により新たな耐性メカニズムが明らかになる可能性がある。

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、ブレイ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。

本年度は、昨年度の成果から判明した生合成遺伝子（候補遺伝子1）の機能解析およびその他の生合成に関与する遺伝子の機能解明と生合成経路の改変による新奇キャンディン系抗真菌化合物の創製のための効率よい遺伝子操作系の開発を目的とした。

## B. 研究方法

### 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

昨年度、次世代シーケンサーを利用して行った *A. aculeatus* のゲノムシーケンシングから得られた塩基配列情報をもとに、アクレアシンの生合成に関与すると予想される遺伝子の予測を行った。遺伝子の予測は、バイオインフォマティクス的手法を用いて、相同性検索 (BLAST)、ドメイン解析 (Pfam)、多重整列解析 (Clustal) および遺伝子予測 (GeneMark) 等の解析を用いて解析を行った。

### 2) 生産株のキャンディン系抗生物質耐性に関する遺伝子の解析

生産株における自己耐性機構を解明するため、キャンディン系抗真菌薬の耐性に関与すると他の菌で報告のある 1,3- $\beta$ -glucan synthase の配列の解析を行った。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領域（遺伝子）を見出すため、ゲノムライブラリーの作成を行い、耐性を付与する領域の同定を試みた。

### 3) アクレアシン生合成遺伝子の解析

アクレアシン生合成に関与している候

補遺伝子1について解析を行った。候補遺伝子1に含まれる機能ドメインにアミノ酸を活性化するアデニル化ドメインが6つ存在する。このアデニル化ドメインを大腸菌で発現させた。得られたタンパク質により、各ドメインの基質特異性の解析を行った。

### 4) 高効率の遺伝子操作系の開発

昨年度までに、アグロバクテリウムを用いた形質転換系により作成していたが、野生株では、相同組換えの頻度は著しく低いことから、相同組換え能の高い株の確立を行った。これは、生合成遺伝子の改変による新規抗真菌物質の創製のために必要であるためである。近年、非相同組換えに関わるヘテロダイマータンパク質 (Ku70/80) や Lig4 ホモログを破壊することで糸状菌でも高い頻度で相同組換えが起こることが示されており、その中で、我々は、ligD (DNA ligase 4) の破壊し非相同組み換え能を落すことにより、相同組み換えの効率を上げる方法を行った。

(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験を行わないため、倫理面の問題は

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

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を用いて昨年度行ったが、ここから得られた配列情報の詳細な解析を継続して行った。Aculeacinの生合成に関与すると予想される非リボゾーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) をコードする候補遺伝子1の周辺領域の遺伝子に関して機能予測を試みた。周辺領域に存在する遺伝子は、PKS、p450、水酸化酵素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。

これらの遺伝子のうち水酸化酵素やP450などは、アクレアシンの構造に存在する水酸基の導入を行っていると予想された。したがって、これらの遺伝子もアクレアシンの生合成に関与していると予想された。

### 2) 生産株のキャンディン系抗生物質耐性に関する遺伝子の解析

① 耐性を付与する機構は、ターゲット酵素である 1,3- $\beta$ -glucan synthase (FKS1) の変異よることが判明してことから、ゲノム情報を用い FKS1 の解析を行った。本菌株の FKS1 のアミノ酸配列は、耐性を付与するアミノ酸の変異が導入されていないことが判明し、今までとは異なった耐性のメカニズムである可能性が示された。FKSI の変異以外に、FKSI が感受性の配列で、耐性を示す事例がい

くつかある。例えば、*Cryptococcus neoformans* では、本菌株と同様に FKSI のアミノ酸配列は感受性を示し、細胞分画中のグルカン合成酵素活性も感受性を示しているが、MIC 値は 64  $\mu$ g/ml 以上であり、耐性を示す何らかの要因が考えられる (Antimicrob Agents Chemother 49: 2851-2856, 2005.)。同様に、*Fusarium* においても決め手となる耐性機構は見つかっていない。(Eukaryot Cell 5: 1036-1042, 2006.)

② ①の結果から、今までとは異なる耐性メカニズムが予想できることから、*A. aculeatus* のゲノムライブラリーを大腸菌で作成し、それらを *Aspergillus* に導入し、aculeacin 耐性化クローンのスクリーニングを行った。結果、数百のクローンを取得し、その中の約 100 クローンに関して選抜した。耐性機構解明のため、これらのクローンに関して解析を進めている。

### 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、候補遺伝子1について解析を行った。補遺伝子1の破壊株を作成しアクレアシン生産性を検討したところ、生産性が消失したことから、候補遺伝子1が生合成に関与すると判明した。次に、候補遺伝子1から翻訳されるたんぱく質の機能ドメインの解析を行った。取り込まれるアミノ酸を活性化するアデニル化ドメインを大腸菌で発現させた。現在までに2つのドメインの発現に成功し約200  $\mu$ g のタンパクを得た。現在、解析を進めている。

### 4) 高効率の遺伝子操作系の開発

生合成遺伝子の改変による新規抗真菌物質の創製のための高効率な遺伝子操作

系の開発を行った。野生株では相同組み換え能が低いことから、*ligD*(DNA ligase 4)の破壊し非相同組み換え能を落すことにより、相同組み換えの効率を上げる。アグロバクテリウムを用いた系を利用し*ligD*の破壊株を得た。今回作成した相同組み換え能の高い $\Delta$ *ligD*株では、10倍程度野生株より形質転換能が向上した(相同組換え効率; $\Delta$ *ligD*株:30%、野生株:2%)。こまた、相同組換え高効率株のアクレアシンの生産性は、野生型と変わらないことをLS-MSにより確認した。

#### D. 考察

第二世代のゲノムシーケンサーにより迅速にゲノム解析をすることが可能になったことから、我々はキャンディン系抗真菌化合物を生産する*A. aculeatus*のゲノム解析を行った。得られた配列情報から、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遺伝子を現在までに予測することができた。さらに、ゲノム情報を利用し、バイオインフォマティクスの手法を用いることにより、新たにいくつかの候補遺伝子を予測することができた、これらは、アクレアシンの構造情報と一致しており、生合成に関わっていることが容易に推測できた。

昨年度の成果として、候補遺伝子1の破壊株の解析により、本遺伝子がアクレアシンの生合成に関わっていることを証明したが、今回予測された遺伝子などについても今後遺伝学的手法を用いた証明が必要である。さらに、生合成経路の改変を目指すことから、これらの候補遺伝子の生合成

経路での反応の詳細な解析が今後必要である。

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昨年度の結果で示されたが、このことは、非常に興味深い。現在臨床では、キャンディン系抗真菌薬が多くの場合で利用されてきている。そのなかで、耐性菌の報告のある*Aspergillus fumigatus*や薬剤の効かない*Cryptococcus*属菌などにおいても、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。

キャンディン系抗真菌化合物の生合成経路を用いた改変を行うに当たり、効率の良い遺伝子操作系などが必須である。そこで糸状菌や酵母で、工業利用や遺伝学のモデルになった種などで利用されている、遺伝子操作方法などを、*A. aculeatus*に導入し、効率の良い遺伝子操作系を開発した。今回作成した相同組換え能を高めた*LigD*破壊株では、非常に効率の良い遺伝子組換えが可能になることが明らかになった。この系を利用して、今後生合成経路の改変を行う予定である。

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に対して有効であり、遺伝子操作系の開発においてもゲノム情報を利用することが可能であり、非常に有効であった。



## E. 結論

カビの二次代謝産物の生合成の情報は、放線菌などのバクテリアと比較すると、非常に少ないのが現状である。その中で、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) など少数である。本研究において我々は、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。さらに、バイオインフォマティクスを利用した詳細な解析によって、昨年度見出した生合成遺伝子以外のいくつかの遺伝子を見出すことができた。

また、生産菌の薬剤耐性の解析や、生合成遺伝子の改変に必要である遺伝子操作系の開発なども進めた。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、健康危険情報として報告すべきものはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Ishino K, Shibuya K, Hoshino Y, Ishikawa J. A Role of LtsA in Virulence of *Nocardia farcinica*. IUMS 2011 Sapporo. September 6–10, 2011, 札幌.

2) Hoshino Y, Chiba K, Ishino K, Ishikawa J. Nocobactin NA

Biosynthesis Gene Clusters in *Nocardia farcinica*. The 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. December 11–15, 2011, Puerto Vallarta, Mexico.

3) 星野泰隆. *Nocardia farcinica* のゲノム情報から見出したシデロフォア. 細菌学会 インターラボセミナー. 12月10日, 2011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

