

2012/0010A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成25（2013）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24年度 総括研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成25（2013）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過程は、いまだ解明されていない部分があることから、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、バイオインフォマティクスを利用した解析により、アクレアシンの環状ペプチド部分を生合成する酵素や取り込まれるアミノ酸を生合成する修飾酵素などをコードしている遺伝子と判明している。今年度は、これらの遺伝子の機能解明を進め、さらに生合成経路の全体像に迫った。また、これまでの研究成果から生合成経路を改変し、新規キャンディン系化合物の生産を試みた。また、アクレアシン生産株の生産能の向上を目的とし、キャンディン耐性を示す遺伝子変異の導入を行った結果、変異導入株ではキャンディン系化合物に対して耐性が向上が確認された。

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。

本年度は、これまでの研究成果から判明した生合成遺伝子（候補遺伝子）の機能解析および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を目的とした。

## B. 研究方法

### 1) アクレアシン生合成遺伝子の解析

アクレアシンの母骨格である環状ペプチド鎖部分の生合成過程を明らかにするために、母骨格に取り込まれるアミノ酸の修飾を行う酵素（酸化酵素や還元酵素等）をコードする遺伝子の破壊を行った。破壊株の作成は、*Agrobacterium* を用いた形質転換法を利用した。相補株は、*Aspergillus* の自立複製型の plasmid を用いて、相補を行った。作成した株におけるアクレアシンの生産性の検討は、バイオアッセイおよび LC-MS により確認した。

### 2) 生産株のアクレアシンの生産性とキャンディン系抗生物質耐性の関係

生産株のゲノム解析の結果から、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 (FKSI) の配列の変異が認められなかった。したがって、抗生物質の主要な生産菌で報告のある、耐性の向上による生産性の向上を糸状菌においても検討を行った。したがって、生産株へキャンディン系抗真菌薬への耐性を付与し、低感受性化させることにより、生産性の向上を試みた。

### 3) 生合成遺伝子の改変による新規抗真菌物質の創製

これまでの研究成果から判明した生合成経路を人為的に改変し、新規化合物の生産を行うという方法である。改変に関しては、環状ペプチド鎖部分の特殊なアミノ酸の生合成に関わると予想される経路を改変し、本来取り込まれるアミノ酸以外のアミノ酸を取り込ませ、新規化合物の生産をさせた。改変部分に関して、

生合成に関与する遺伝子を破壊し、本来の生合成では得ることのできないアクレアシンの部分構造をなすアミノ酸以外のアミノ酸が取り込まれた化合物を予想し代謝物の生産を行った。代謝産物に関しては、LC-MSにより分析を行った。

(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) アクレアシン生合成遺伝子の解析

母骨格に取り込まれるアミノ酸の修飾を行う酵素（酸化酵素）をコードする遺伝子の破壊を行った。破壊株のアクレアシンの生産性を LC-MS により確認したところ、生産は確認されなかった。相補株では、アクレアシンの生産性が回復することが明らかになった。したがって、破壊を行った酸化酵素をコードする遺伝子は、アクレアシンの生合成に関与していることが明らかになった。

### 2) 生産株のアクレアシンの生産性とキャンディン系抗生物質耐性の関係

キャンディン系抗真菌薬の耐性に関与

する報告のあるFKSIのアミノ酸配列の変異は、本菌株では認められていないことから、FKSIに耐性に関与するアミノ酸の変異を導入し耐性化を試みた。結果、キャンディン系抗真菌化合物（ミカファンギン、キャスポファンギン等）に対して耐性度が野生株と比較して向上した。本菌株のアクレアシンの生産性に関しては、現在検討中である。

### 3) 生合成遺伝子の改変による新規抗真菌物質の創製

生合成に関与する、環状ペプチド鎖の部分にあるアミノ酸の部分構造を変異させるために、取り込まれるアミノ酸の生合成に関与すると予想される遺伝子の破壊株を用いて、環状ペプチド鎖部分の異なる新規アクレアシンの生産を試みた。結果、遺伝子破壊株において、野生株では、生産されていない化合物を生産していることが判明した。この化合物の分子量は、LC-MSで検出したところアクレアシンAでは、 $[M+H]^+$   $m/z$  1036.5と比較して、分子量16少ない $[M+H]^+$   $m/z$  1020.5であった。これは、アクレアシンAから酸素原子が1つ少なくなったものと予測された。酸素原子の消失部位の特定は、LC/MS/MSを用いて現在解析中である。また、培養菌体からのMeOH抽出物のペーパーディスクアッセイでは、抗真菌活性が認められなかった。このことから、この化合物は、アクレアシンAと比較して活性が低下していると思われる。

### D. 考察

我々は、次世代シーケンサーにより迅速にゲノム情報を取得し、バイオインフォ

マティクス的手法を用いることにより、二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを予測し、生合成遺伝子であることを明らかにしてきた。これらの結果は、昨年Ralph A. Cachoらにより報告されたEchinocandin Bの生合成遺伝子クラスターの情報 (*J Am Chem Soc.* 134, 16781-90, 2012) と一致している。さらにアクレアシンとechinocandinBは、共通の構造（取り込まれるアミノ酸や環状リポペプチド）を有することから、生合成遺伝子の各々の相同性が高い値を示したと考えられる。しかし、これまでの報告では、明らかになっていない部分もあることから、予測された遺伝子などに関し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必要である。

アクレアシン生産菌は、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までの結果で示した。そこで、本菌株にFKSIの変異により耐性を付与し、アクレアシンの生産性を向上させることを行ったが、変異型FKSIの導入により野生株と比較してキャンディン系抗生物質に対する耐性度が向上していることがわかる。耐性度の向上が劇的な耐性化は起こらず、数倍程度の耐性の向上までにとどまった。今回利用した、FKSIの耐性に関与するFKSIの変異は、*Candida*や*Aspergillus*で報告をもとに変異が起りやすいHot spot 1の領域のうちセリンからプロリンへの置換した変異型FKSIを用いたのだが、この変異だけではこれまでの報告の

様な劇的な耐性度の向上は起きていない。したがって、FKSIの報告のある変異導入のみでは高度耐性化によるキャンディン系抗生物質の生産性の向上は難しく、これまでの高度耐性株の報告にあるキチンの生合成の向上などの要因なども追加することにより可能になるのではないだろうか。生産性に関しては、今後検討が必要である。

生合成に関与する環状ペプチド鎖の部分にあるアミノ酸の部分構造を変異させるために、取り込まれるアミノ酸の生合成に関与すると予想される遺伝子の破壊株を用いて、環状ペプチド鎖部分の異なる新規アクレアシンの生産を試みた。今回は、オキシゲナーゼをコードする遺伝子を破壊したことから、検出した化合物の分子量がアクレアシンと比較して、16少ないことは、予想した化合物と一致する。今後、この化合物の変異位置の特定をすることにより、生合成経路の詳細が明らかになると考えられる。また、バイオアッセイの結果から、この化合物は、アクレアシンAと比較して活性が低下している可能性があるため、今後、変異部位と活性との関係を詳細に検討することにより、母骨格の活性構造相関の情報が得られると考えられる。

#### E. 結論

これまでに多くの二次代謝産物の生合成経路が解明され、情報が蓄積されてきている。しかし、それらのほとんどが放線菌やその他のバクテリアの情報であり、真核生物のカビや植物などでは解明されている物が少ないのが現状である。そこで、我々

は糸状菌の生産するキャンディン系抗生物質の生合成経路を明らかにするために、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、生合成遺伝子を見出すことができた。さらに、生合成経路に関わるいくつかの遺伝子に関して明らかにした。

以上のように、これまでのキャンディン系抗真菌化合物の生合成の情報から、人為的改変した生合成経路変異株を用いて、新たな化合物を生産させることが可能であることを示すことができた。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) 村山琮明, 山田 剛, 榎村浩一, 星野泰隆, 石川 淳, 廣瀬 大, 小川吉夫.  
*Trichophyton mentagrophytes sensu lato* の核型解析

日本菌学会関東支部会 平成24年度年次大会, 4月21日, 2012年. 千葉

2) S. Y. Murayama, T. Yamada, K. Makimura, Y. Hoshino, J. Ishikawa, M. Kuroda, D. Hirose, Y. Ogawa and S.



Watanabe

Electrophoretic Karyotyping of Trichophyton mentagrophytes sensu lato 18th Meeting of International Society for Human and Animal Mycology. 6/11-15, 2012. Germany

3) 石野敬子, 渋谷健太, 星野泰隆, 井口光孝.

病原性放線菌ノカルジアのLtsA の宿主細胞応答への関与.

第56回日本薬学会関東支部大会 10月13日, 2012年, 東京.

4) 星野泰隆, 石野敬子, 石川 淳. *Nocardia farcinica* のゲノム情報から見出したシデロフォア. 第61回日本感染症学会東日本地方回学術集会/第58回日本化学療法学会東日本支部総会/第95回日本細菌学会関東支部総会. 10月10-12日, 2012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

