

2012/00/0B

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～24年度 総合研究報告書

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22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 星野 泰隆

平成25（2013）年 3月

目次

I. 総合研究報告書	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. 総合研究報告書

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））
総合研究報告書

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

これまでに数多くの抗生物質の生合成研究がなされてきたが、そのほとんどが抗生物質をはじめとする二次代謝産物の主要な生産菌である放線菌の情報であり、酵母や糸状菌などの情報は多くない。そこで我々は、キャンディン系抗真菌化合物に着目し、生合成経路を明らかにし、その情報を利用し新規化合物を生産させる試みを行った。実際に、第2世代シークエ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。これらの遺伝子の機能解明を進め、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を明らかにした。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、生合成経路の改変を人為的に行い、新規キャンディン系化合物の生産を行った。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。以上のように、キャンディン系抗真菌化合物の生合成の情報を第2世代シークエンサーを用いて迅速に取得し解析を行い、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。

A. 研究目的

今日では、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、高齢者人口や薬剤等によって免疫力の低下したによる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。し

かし、抱える問題点として、アスペルギルス属による真菌症の増加（日本医真菌学会雑誌、47、15-24、2006）、アゾール系抗真菌薬に対する低感受性や耐性を示すカンジダ属菌の分離率の変化（J. Antimicrob. Chemother. 53、283-289、2004）、ブレークスルー真菌症（Clin. Infect. Dis. 42、753-757、2006）や輸入真菌症（日本医真菌学会雑誌 46、17-20、2005）などがあげられる。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した。

実際に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株である *Aspergillus aculeatus* を使用し、ゲノムスキニングの手法と次世代シーケンサーを用いたゲノム解析によって行い、アクレアシンの生合成経路にかかわる遺伝子の推定を行う。その結果を踏まえて、アクレアシン生合成経路を解明し、その応用として生合成経路の改変による新規キャンディン系抗真菌化合物の取得を目的とし本研究を進めた。

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、アクレアシン生合成に必要なであると推定されるポリケチド生合成酵素 (PKS、脂肪酸側鎖部位) や非リボソームペプチド生合成酵素 (NRPS、環状ペプチド部位)

をコードする遺伝子を指標とし、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) 等の解析のバイオインフォマティクス的手法を用いて解析を行った。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、アクレアシン生合成遺伝子を推定した。

2) 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予測されたアクレアシン生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、LC-MSを用いて解析した。

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った。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。

4) 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 *Candida* や *Aspergillus* で報告のある 1,3- β -glucan synthase (FKSI) の配列の解析を行った。さらに、*A. aculeatus* の薬剤耐性を検討した。

5) 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

生産株では、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 FKSI の配列に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において報告のある、自己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した。実際には、耐性型の FKSI (変異型 FKSI) を生産株へ導入し、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。

6) 高効率の遺伝子操作系の開発

野生株を用いたアグロバクテリウム形質転換系では、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等を行わないため、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行い、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以上のコンティグで1万5000本程度になり、最長のもので約300kbであった。ここから得られた配列情報の詳細な解析を行い、アクレアシン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を予測した。さらにその周辺領域の遺伝子に関して機能予測を試みた結果、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された。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できることから、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) 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する遺伝子と予測した遺伝子のうち、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するNRPSをコードする遺伝子と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。相補株は、*Aspergillus*の自立複製型のplasmidを用いて、相補を行った。得られた破壊株のアクレアシン生産性をHPLCおよびLC-MS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、これらの候補遺伝子が生合成に関与すること判明した。

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抽出物のペーパード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。

4) 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

耐性を付与する機構は、ターゲット酵素である1,3- β -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の存在もしくは、耐性ではない可能性が示された。

5) 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。

6) 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

我々はキャンディン系抗真菌化合物を生産する *A. aculeatus* のゲノム解析を第二世代のゲノムシーケンサーにより迅速に行い、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遺伝子を予測し、遺伝子破壊等により機能解析を行った。これらの遺伝子は、近年報告された Ralph A. Cacho らの 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) と一致している部分もあり、アクレアシンも Echinocandin B 同様な生合成過程を経る予測できる。しかし、未だ解明されていない水酸化部位や特殊なアミノ酸の生合成に関しては、今後明らかにする必要がある。

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が、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。このことから、人為的に生合成経路を改変することにより、新たな化合物の生産が可能であると考えられる。これは、今後の新規キャンディン系化合物の人為的生合成経路の改変による生産の可能性を示すことができた。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、母骨格の活性構造に関する情報が得られると考えられる。

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結果で示されたが、このことは、非常に興味深い。これまで、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 μ 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.) 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さら

に進める必要性がある。

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り、今後利用可能であるといえる。

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。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、生合成遺伝子を以外のいくつかの遺伝子を見出すことができた。この情報を用いて、人為的に生合成経路の改変を行うことにより、野生株の生産していない新たなキャンディン系化合物の生産を行うことができた。さらに、生産菌の薬剤耐性の解析や、生合成遺伝子の改変に必要な遺伝子操作系の開発も行った。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

本研究期間中に、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

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

1) 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.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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

6) 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

7) 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.

8) 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

