

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06550

研究課題名(和文) 真菌の病原性に関わるシグナル伝達経路の同定と真菌治療薬の新規標的探索

研究課題名(英文) Identification of signaling pathways involved in fungal pathogenicity and search for novel targets for antifungal drugs

研究代表者

堅田 利明 (KATADA, Toshiaki)

武蔵野大学・薬学研究所・名誉教授

研究者番号：10088859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真菌(カビ)が引き起こす感染症により、全世界で年間150万人以上のヒトが亡くなっていると推計されている。本研究では、真菌が感染症を引き起こす要因となる細胞内シグナル伝達系を明らかにし、創薬標的とすべく、これまでに見出したRac/CDC42経路を介した細胞形態制御機構の理解を拡大させ、抗真菌薬のリード化合物の探索を行った。その結果、Rac/CDC42下流のエフェクターCla4が正常な菌糸成長に必要なことを見出した。また、皮膚糸状菌Rac/CDC42の活性化を阻害する化合物やCla4のキナーゼ活性を阻害する化合物を同定し、それらの化合物が菌糸成長を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの抗真菌薬は、ヒトと同じ真核細胞という制約から、真菌に特有な細胞壁-1,3グルカン、細胞膜エルゴステロール合成酵素の阻害薬、あるいはピリミジン系核酸合成阻害薬という状況で、抗菌薬や抗ウイルス薬の開発とは異なり、抗真菌薬の標的部位は極めて限定された状況にある。したがって、真菌の病原性獲得といった新しい視点から、シグナル伝達系に創薬標的を求める探索研究は、ユニークなアプローチであり、これまでにない新たな発見を生み出せるものと考えられる。菌糸成長を標的として、同定したRacやCDC42の周辺分子を阻害する低分子化合物は新規作用標的を有する抗真菌薬のリード化合物となるものと期待される。

研究成果の概要(英文)： It is estimated that more than 1.5 million human deaths occur annually worldwide due to fungal infections. In this study, we sought to elucidate the intracellular signaling pathways that cause fungal infections, and to identify lead compounds for antifungal drugs by expanding our understanding of cell morphology regulation mechanisms via the Rac/CDC42 pathway. We found that the effector Cla4 downstream of Rac/CDC42 is required for normal mycelial growth. We also identified compounds that inhibit the activation of dermatophyte Rac/CDC42 and the kinase activity of Cla4, and found that these compounds inhibited mycelial growth.

研究分野：生化学

キーワード：Gタンパク質 エフェクター 細胞内シグナル伝達 真菌

1. 研究開始当初の背景

真核生物に属する真菌による感染症によって、世界で年間 100 万人以上が死亡する。この数はマラリアによる死者よりも多い。また、脂漏性皮膚炎や表在性感染症などの皮膚疾患やアレルギー性気管支肺アスペルギルス症や夏型過敏性肺炎といったアレルギー性疾患などの非致死性疾患を含めた患者数は世界で数億人に達すると考えられており、新しい真菌性疾患に対する治療薬の開発が望まれている。病原性細菌やウイルスに対しては、ヒトと大きく異なる病原体構成成分の合成・代謝系酵素を標的として、これまで極めて特異性の高い抗菌薬・抗ウイルス薬が開発されており、この半世紀の間に創薬の標的に向けた研究が大きく進展した。しかしながら、病原性真菌に向けては、ヒトにはない細胞壁の β -1,3 グルカン、真菌に特有な細胞膜成分としてのエルゴステロール(ヒトではコレステロール)を標的とした膜障害薬、エルゴステロール合成酵素の阻害薬、あるいは特異性の劣るピリミジン系核酸合成阻害薬という状況で、抗菌薬や抗ウイルス薬の開発とは異なり、ヒトと同じ真核細胞という制約から、抗真菌薬の標的部位は極めて限定されている。さらに、これらの限定的な標的部位に対する薬剤耐性真菌も世界的に報告され問題視されてきている。

本研究では、いまだに明らかでない真菌の病原性発現機構が、どのようなシグナル伝達経路により支配されているのかに焦点をあてる。本研究の進展は、真菌の感染拡大阻止に向けた基礎的分子基盤を提供することによって、今日の医療現場における真菌性疾患に対する新しい治療法の開発に対して多大な貢献ができると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、真菌において病原性発揮に必須となる菌系の形成・伸長などの形態変化に着目し、真菌の細胞増殖や菌類に特異的な生理活性物質を介したクロストークのシグナル伝達系という視点から、真菌の病原性獲得機構の分子基盤を解明するとともに、それを標的とした新たな抗真菌薬候補化合物の探索を行った。真菌が“病原性”を獲得する際の分子基盤の理解と新たな創薬標的の探索に向けて、第一に真菌の形質転換と細胞増殖に関わるシグナル受容・応答機構の解明を目指す。真菌の病原性獲得を、真菌の形態形成・細胞増殖やシグナル伝達系という視点から解析しようとする研究は新奇性が高く、また、申請者によるヒトを含む高等真核生物を対象とした広範なシグナル伝達研究の豊富な経験は、最も“プリミティブな真核生物である真菌”のシグナル伝達系を比較論的に解析・理解する上で極めて優位な状況となる。

第二に、今日の医療現場における“真菌性疾患”に対する新しい治療法の確立に向けて多大な貢献をすると期待される。これまで病原性細菌やウイルスに対しては、ヒトと大きく異なる病原体構成成分の合成・代謝系酵素を標的として、極めて特異性の高い抗菌薬や抗ウイルス薬が開発されており、この半世紀の間に大きな研究の進展が見られる。しかしながら、病原性真菌に向けては、ヒトと同じ真核細胞という制約から、細胞壁の β -1,3 グルカン合成酵素、真菌に特有な細胞膜成分としてのエルゴステロール(ヒトではコレステロール)に直接結合し膜を障害する薬剤、エルゴステロール合成酵素の阻害薬、あるいは特異性の劣るピリミジン系核酸合成阻害薬という状況で、抗菌薬や抗ウイルス薬の開発とは異なり、抗真菌薬の標的部位は極めて限定されている現状にある。したがって、真菌の病原性獲得といった新しい視点から、ヒトとは異なるシグナル伝達系に創薬標的を求め本探索研究は、新奇抗真菌薬の展開に向けて実現可能性の高いユニークなアプローチであり、独創性の高いものである。

3. 研究の方法

生化学、遺伝学、及び細胞生物学的な手法を用いて、真菌の病原性獲得において鍵となるシグナル伝達系の分子基盤の解明を目指し、これまで行ってきた哺乳類のシグナル伝達系に關与する分子群の酵素活性、細胞内局在、タンパク質構造解析などの手法を基盤として、真菌のシグナル伝達機構に携わる分子群の特性を解析した。

病原性真菌の形態形成は、宿主に対する病原性に関与する。真菌の形態形成を司る分子の探索を行うために、病原性真菌である皮膚糸状菌をモデルとしてシグナル伝達経路の阻害剤を用いた表現形の評価・探索を行った。さらに、細胞形態形成に関与する生物間で共通して見られるシグナル伝達経路に着目し、その経路を構成するタンパク質の相同性因子の欠損株または条件発現株をアグロバクテリウムを用いた形質転換法により作出し、これらの変異株の形態形成の異常及びシグナル伝達経路における不調和をケミカルバイオロジー的手法と並行して遺伝学的に検討した。

見出された形態形成に関与する遺伝子産物について、大腸菌を用いて組換えタンパク質を作出し、生化学的な解析を行った。得られたタンパク質を含むシグナル伝達経路の全体像を理解するために、相互作用因子を相同性検索、プルダウンアッセイなどを用いて同定し、新たに見出したそれらの分子についても遺伝子の条件発現抑制株などを用いた遺伝学的解析や精製タンパク質を用いた酵素活性の解析により機能を解明した。

上記検討で得られたタンパク質について、*in vitro*における酵素活性の抑制度合いを評価し

たスクリーニングを行い、真菌のシグナル伝達経路を構成する分子に対して比較的活性の高い阻害剤を探索した。真菌のシグナル伝達系のタンパク質に阻害活性を有していた化合物については、真菌細胞の菌糸形成に対する阻害能を *in vivo* で評価することで、菌糸成長を抑制する新しい抗真菌薬のリード化合物としての可能性を検討した。

4. 研究成果

これまで、病原性真菌のモデルとして皮膚糸状菌の Rac 及び CDC42 (p21 と呼ばれる) が菌糸成長に関与することを明らかにしてきた。そこで、既存のヒト Rac1 及びヒト CDC42 の阻害剤の培地への添加によって皮膚糸状菌の孢子からの発芽及び菌糸成長の抑制が見られるかを検討した。検討した 10 種類の阻害剤のうち 4 種類で孢子の発芽を抑制した。さらに、*in vitro* でのグアニヌクレオチド交換因子 (GEF) による Rac 及び CDC42 のグアニヌクレオチド交換反応の活性化を抑制するか検討したところ、上記 4 種類の化合物のうち 2 種類が Rac 及び CDC42 の蛍光標識グアニヌクレオチド取り込み活性を阻害した。これらの化合物は、真菌 Rac 及び CDC42 の活性化を阻害する化合物として、真菌の細胞内シグナル経路を解析するツールとして、また、新たな抗真菌活性を有する化合物開発のためのリード化合物として有用であると期待される。

次に、Rac 及び CDC42 が制御する細胞シグナル伝達系における下流分子候補を探索する目的で、Rac 及び CDC42 の相互作用ドメインとして知られる CDC42- and Rac-interactive binding (CRIB) domain を有する皮膚糸状菌のタンパク質を相同性検索を用いて探索した。ヒト p21-activated kinase (PAK) 1 の CRIB ドメインと類似の配列を有する皮膚糸状菌のタンパク質をコードする遺伝子として 2 種類の p21-activated kinases (PAKs) 候補遺伝子を見出した。それぞれ、他の生物種で知られる PAK 同様にタンパク質の N 末端側に CRIB ドメインを有し、C 末端側にキナーゼドメインを有していた。また、見出した PAK 候補の一つで、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸との結合に関与することが知られる PH ドメインを有しているタンパク質を酵母の相同因子の名前から Cla4 タンパク質とした。見出した PAK について銅イオン応答性プロモーターを用いた条件発現抑制株を作出し、菌糸成長への寄与を検討した。条件発現抑制株では、いずれの PAK 遺伝子についても発現抑制した際に、明らかな菌糸成長の変化は観察できなかった。これは、低発現でも機能しうるプロテインキナーゼの特性のため、今回使用した銅イオン応答性プロモーターによる制御は十分ではなく、抑制条件でも漏出した転写産物が菌糸成長において十分に機能してしまったと考えられた。他の条件発現系を検討するため、テトラサイクリン応答性のプロモーターを PAK 遺伝子上流に組み込んだ株も作成したが、銅イオン応答性プロモーターと同様に、抑制条件下においても顕著な菌糸成長の抑制は見られず、むしろ発現を促進した際に部分的な菌糸成長の抑制が見られた。一方、皮膚糸状菌 PAK の一つである Cla4 を欠損した株では、菌糸成長が顕著に抑制されていた。

真菌の PAK が菌糸成長に寄与することが示唆されたことから、真菌の PAK を阻害しうる化合物の探索を目指した。ヒト PAK 阻害剤による真菌菌糸成長抑制効果を検討した結果、複数の PAK 阻害剤が皮膚糸状菌の菌糸成長を阻害することを見出した。これらの阻害剤の中で、ヒト CDC42-PAK1 相互作用を阻害することが報告されている IPA-3 の *in vitro* での活性を評価するため、ブルダウンアッセイにより真菌 p21-PAK 相互作用の阻害活性を検討した。N 末端に His tag と TF tag を融合し、大腸菌で発現させた Cla4 全長タンパク質と、同じく大腸菌で発現させた C 末端脂質修飾部位を除去した Rac タンパク質を Ni²⁺ を結合させた樹脂でブルダウンしたところ、IPA-3 を添加したサンプルでは Rac のブルダウンされる量が IPA-3 の用量依存的に減少した。このことから、IPA-3 が真菌 Rac-PAK 相互作用を定量的に阻害することを明らかにした。次に IPA-3 が真菌の Rac-PAK 相互作用だけでなく、PAK の酵素活性も抑制するか検討した。皮膚糸状菌のゲノムに 3xHA タグ融合 Cla4 タンパク質をコードする DNA 配列を挿入し、本菌の細胞破砕液から抗 HA 抗体で 3xHA-Cla4 タンパク質を免疫沈降した。本タンパク質試料には、前出の Rac タンパク質依存的な ATP の消費能が観察された。IPA-3 を免疫沈降した 3xHA-Cla4 を含む酵素反応系に添加すると、Rac 依存的な *in vitro* の ATPase 活性の阻害作用が見られ、p21-PAK 相互作用を阻害するという結果を支持するデータが得られた。また、他の PAK 阻害剤及びその類縁体についても ATPase 活性の阻害能を検討した結果、哺乳類 PAK4 のキナーゼ活性を阻害することが知られている FRAX486 が本活性を阻害することを見出した。FRAX486 を培地に添加すると皮膚糸状菌の菌糸成長が抑制された。*in vivo* における IPA-3 及び FRAX486 の標的を推測する目的で、Cla4 遺伝子の欠損株におけるこれらの化合物の菌糸成長抑制活性を検討したところ、IPA-3 及び FRAX486 を培地中に添加しても、Cla4 欠損株の菌糸成長に付加的な抑制は見られなかった。一方、エルゴステロールの合成酵素阻害剤テルピナフィンやイトラコナゾールなどの別の標的を有する化合物では Cla4 欠損株に対して付加的な菌糸成長の抑制活性を示した。これらのことから、IPA-3 及び FRAX486 が *in vivo* でも Cla4 を標的とし、皮膚糸状菌の菌糸成長を抑制することが示唆された。

以上の結果から、皮膚糸状菌 Rac/CDC42-Cla4 経路が、菌糸成長抑制活性を有する低分子化合物の新規作用標的となることが示唆された。また、本研究から、真菌の Rac/CDC42 及び PAK を *in vitro* で阻害し、真菌の菌糸成長を抑制する化合物が複数見出された。各種タンパク質の活性をハイスループットに検出する系の確立は更なる条件検討を必要とするが、これらの化合物をリード化合物として、真菌のタンパク質に親和性が高く、かつ特異的な阻害剤を同定することで、新たな抗真菌薬候補が発見されると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chiyoda Hirohisa, Kume Masahiko, del Castillo Carla Cadena, Kontani Kenji, Spang Anne, Katada Toshiaki, Fukuyama Masamitsu	4. 巻 17
2. 論文標題 Caenorhabditis elegans PTR/PTCHD PTR-18 promotes the clearance of extracellular hedgehog-related protein via endocytosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Araki Makoto, Yoshimoto Kaho, Ohta Meguri, Katada Toshiaki, Kontani Kenji	4. 巻 297
2. 論文標題 Development of a versatile HPLC-based method to evaluate the activation status of small GTPases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101428 ~ 101428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Kazuki, Ishii Masaki, Yaguchi Takashi, Katada Toshiaki, Ichinose Koji, Ohata Shinya	4. 巻 596
2. 論文標題 epi-Aszonalenin B from Aspergillus novofumigatus inhibits NF- κ B activity induced by ZFTA-RELA fusion protein that drives ependymoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 104 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Herranz-Perez Vicente, Nakatani Jin, Ishii Masaki, Katada Toshiaki, Garcia-Verdugo Jose Manuel, Ohata Shinya	4. 巻 12
2. 論文標題 Ependymoma associated protein Zfta is expressed in immature ependymal cells but is not essential for ependymal development in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05526-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 澤田 悠佳, 石川 和樹, 石井 雅樹, 大畑 慎也, 矢口 志, 堅田 利明, 市瀬 浩志
2. 発表標題 Aspergillus属真菌由来の抗Rhizopus oryzae活性物質の探索 第1報
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki ISHIKAWA, Shinya OHATA, Masaki ISHII, Takashi YAGUCHI, Toshiaki KATADA, Koji ICHINOSE
2. 発表標題 Exploratory research of bioactive compounds from Fungi Aspergillus species to address unmet medical needs
3. 学会等名 The 11th JSP-CSP-KSP Joint Symposium of Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島瑠莉, 石井雅樹, 堅田利明, 大畑慎也
2. 発表標題 上衣腫原因融合タンパク質ZFTA-ReIAFUS2の核移行機構
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 理佳, 石井 雅樹, 高橋沙由美, 堀越えみり, 宇賀 英子, 大畑 慎也, 堅田 利明
2. 発表標題 皮膚糸状菌Rac及びCDC42の 菌糸成長における機能解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井雅樹、山田剛、宇賀英子、 堅田利明、大畑慎也
2. 発表標題 皮膚糸状菌Rhoファミリータンパク質及びそのGEFは菌系成長に寄与する
3. 学会等名 第103回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井雅樹、大畑慎也、山田剛、宇賀英子、 堅田利明
2. 発表標題 皮膚糸状菌p21-activated kinase PAKは菌系形態に寄与する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関