

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790411

研究課題名（和文）チェックポイントキナーゼを標的とする抗真菌物質の基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research of an antifungal agent targeting to checkpoint kinases

研究代表者

津田 香代子（TSUDA KAYOKO）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：30444524

研究成果の概要（和文）：

本研究では抗真菌薬の標的候補因子に深在性真菌症の原因菌として知られる *Candida albicans* の生存に必須なプロテインキナーゼである CaMps1p (mono-polar spindle-1) に着目し、その活性阻害物質として得られた LY83583 について解析を行った。LY83583 はヒトホモログである hMps1p への活性阻害効果は持たず、CaMps1p 特異的に作用し、*C. albicans* の増殖に影響を与えていることを明らかにした。新しい作用機序を持つ抗真菌物質の発見と同時に、既知のグアニル酸シクラーゼ阻害剤である LY83583 の新しい標的分子の発見に繋がる研究となった。

研究成果の概要（英文）：

Aiming to find new antifungal agents, this study focused on CaMps1p, an essential protein kinase in *Candida albicans* causing deep microsis. Through our *in vitro* screening, LY83583 was found to block kinase activity of CaMps1p but not human ortholog hMps1p. Specific effect of LY83583 resulted in growth inhibition of *C. albicans*. This study not only revealed a new antifungal agent but also led to find another target of LY83583, a well-known inhibitor of guanylate cyclase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

臓器移植や癌化学療法等の医療の高度化、エイズ患者の増加、生活習慣病の蔓延等の原因によりカビによる全身性の感染症である深在性真菌症は増加の一途を辿っており、年々問題が深刻になってきている。しかし、実際

に臨床で使われている抗真菌剤はまだ 10 種類に充たず、抗菌剤の約 160 種類に比べ治療選択の幅がはるかに狭い。真菌はヒトと同じ真核生物であることが選択毒性を有する新薬の開発を困難にしているのである。しかし、既存の抗真菌剤においてすら強い副作用や、

薬剤耐性問題が浮上している今、早急な新薬開発の必要性に迫られている。つまり、「新しい作用機作を持ち」「副作用がなく」「広い抗菌スペクトラムを有する」という性質を兼ね備えた新しい治療薬の開発が必要である。本研究では、病原真菌のモデルとして、深在性真菌症の中で最も大きな割合を占めているカンジダ症の主要原因菌である *Candida albicans* を使用した。

申請者らのグループは、*C. albicans* にコードされている 93 種類のプロテインキナーゼのうち既に論文等で報告されていた 19 種類を除いて、74 種類のプロテインキナーゼについて遺伝子破壊を試みた。MPS1 は遺伝子破壊株が取得できなかったプロテインキナーゼの 1 つであった。MPS1 は元々、酵母の細胞分裂において紡錘体極複製に必須な因子として見つけられた (EMBO J., 14, 1655-1663, 1995) が、現在は細胞分裂におけるチェックポイントキナーゼとしての機能が次々と明らかになってきており、癌化との関連も示唆され、抗癌剤の標的候補としても見なされている。

ヒトホモログとの相同性も比較的低い(36% identity)ことから、抗真菌剤の新たなターゲット候補として、カンジダ MPS1 タンパク質 (CaMps1p) のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* キナーゼ活性評価系を確立させた。この評価系を用いて機能既知及び未知の化合物数千種について CaMps1p のキナーゼ活性阻害効果を検証したところ、グアニル酸シクラーゼ阻害剤である LY83583 が強く CaMps1p キナーゼ活性を低下させることが分かった。

2. 研究の目的

Candida albicans の生存に必須のプロテインキナーゼ CaMps1p (mono-polar spindle-1) を標的とし、そのキナーゼ活性阻害を指標に見出した LY83583 が抗真菌剤候補になる可能性を検証した。MPS1 は最初に酵母で発見された細胞周期の有糸分裂の際に働くチェックポイントキナーゼであるが、*C. albicans* においては機能未知である。一方、LY83583 は *C. albicans* の生育阻害効果を有するが、その標的は不明である。そこで LY83583 の標的が CaMps1p であり、そのキナーゼ活性の阻害が *C. albicans* の細胞死を誘導しているかを検証し、副作用や抗真菌薬としての臨床利用の可能性について検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) リコンビナントキナーゼタンパク質の作製
C. albicans の生存に必須なキナーゼである CaMps1p、及びそのヒトオルソログである hMps1p のキナーゼドメインをコードするプ

ラスミドをそれぞれ作製し、大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、His-tag 融合タンパク質 CaMps1 Δ N、hMps1p Δ N として発現させた。不溶性タンパク質として発現した CaMps1 Δ N、hMps1p Δ N を 8M 尿素で可溶化し、Ni Sepharose (GE Healthcare) にて精製後、希釈透析法によるリフォールディング処理を行った。

(2) *in vitro* キナーゼ活性測定
MBP (ミエリン塩基性タンパク質) を基質としたキナーゼ活性評価系を構築し、リコンビナントキナーゼタンパク質 CaMps1p Δ N 及び hMps1p Δ N の活性を確認した。検出は反応後タンパク質を SDS-PAGE にて展開し、ゲル中のリン酸化タンパク質を Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (invitrogen) で蛍光染色することにより行った。

(3) LY83583 の CaMps1p キナーゼ活性の特異的阻害作用の *in vitro* 検証

(2) で構築した活性評価系にて 10 μ M ~ 0.1 μ M の LY83583 による CaMps1p キナーゼ活性阻害効果を検証した。次に LY83583 による CaMps1p への阻害効果が特異的であるかを明らかにするために hMps1p への LY83583 の影響、及び、CaMps1p への hMps1p の阻害剤 (staurosporine, SP600125) の影響を検証した。

(4) LY83583 の *C. albicans* 増殖に与える影響の検証

① 増殖阻害効果の経時的測定

一晚培養した *C. albicans* 菌液を YPD 培地にて 200 倍希釈し、LY83583 の濃度 0、1、5、10、50、100 μ M 存在下で 30°C 培養を行い、660nm における吸光度 (OD660) を経時的に測定し、各阻害剤処理条件での増殖度をコントロールと比較した。

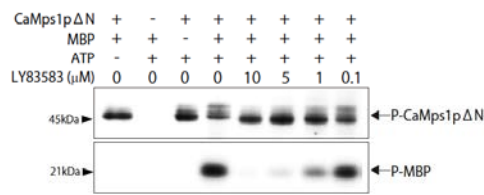
② hMps1p 阻害剤、及びグアニル酸シクラーゼ阻害剤の *C. albicans* 増殖への影響の検証

一晚培養した菌液を各阻害剤を含む YPD 培地にて 200 倍希釈し、30°C で 8 時間培養後、菌液を段階希釈し、それらの一定量を YPD プレート培地にスポットし一晚培養後、増殖コロニーをコントロールと比較観察した。

4. 研究成果

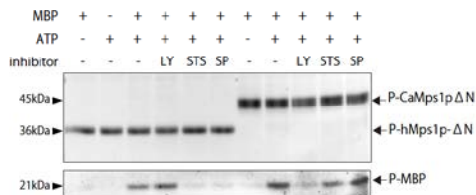
まず、キナーゼ活性評価系においてリコンビナントタンパク質である CaMps1p キナーゼドメイン (CaMps1p Δ N) のリン酸化活性はリン酸化 MBP の検出により確認できた (図 1)。そして、リン酸化 MBP 量は LY83583 の濃度が高くなるに伴って減少した。LY83583 は CaMps1p キナーゼ活性を濃度依存的に阻害することが分かった (図 1)。

図1 LY83583のCaMps1p ΔNへのリン酸化活性阻害効果



CaMps1のヒトオルソログであるhMps1についてはすでに staurosporine (STS) や

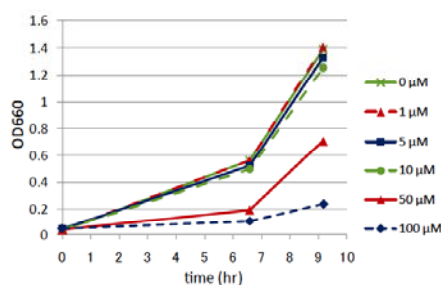
図2 CaMps1p、hMps1pへの各阻害剤の阻害効果



SP600125 (SP)をはじめとする阻害剤が報告されている。そこで、これら阻害剤が CaMps1 キナーゼ活性には影響を及ぼすか、また、LY83583 (LY) は hMps1 活性を阻害するかを検証した (図2)。その結果、LY は hMps1 のキナーゼ阻害活性を示さず、CaMps1 は SP、STS によって活性が阻害されない事が分かった。LY83583 は、ヒト由来の他プロテインキナーゼ (EGFR, VEGFR 等) への阻害効果を示さないことも確認している (データ示さず)。LY83583 は CaMps1p 特異的に活性阻害効果をもつ事が明らかになった。

次に LY83583 の *C. albicans* 増殖能への影響について検証した。その結果 50 μM 以上の濃度で増殖阻害効果を示すことが分かった (図3)。

図3 LY83583の*C. albicans*増殖阻害効果



STS, SP についても *C. albicans* 増殖能への影響を検証した (図4)。LY83583 では図3の結果と同様、50 μM 以上で増殖阻害が認められた。SP600125 (SP) は増殖には全く影響を及ぼさなかったが、Staurosporine (SP) は 100 μM において若干の阻害効果を示した。Staurosporine は非選択的なキナーゼ阻害剤であり、様々なキナーゼの活性を阻害することが知られているため、CaMps1p ではない *C. albicans* にとって生存に必須なキナーゼを阻害したことが増殖阻害を引き起こしたことが考えられる。

が考えられる。

LY83583 はグアニル酸シクラーゼ阻害剤として知られている。そこで、他のグアニル酸シクラーゼ阻害剤である methylene blue と ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxaline-1-one) の *C. albicans* 増殖への影響を検討した結果、共に、阻害効果は認められなかった (図5)。現在のところ、グアニル酸シクラーゼをコードする遺伝子は *C. albicans* ゲノムで見つかっていない。つまり、CaMps1p は LY8358 の新しい標的因子であることが明らかになった。

図4 hMps1阻害剤の*C. albicans*増殖への阻害効果

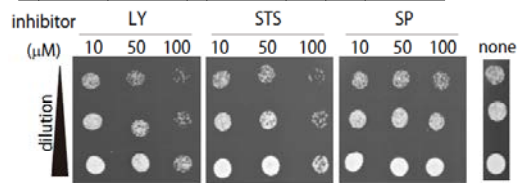
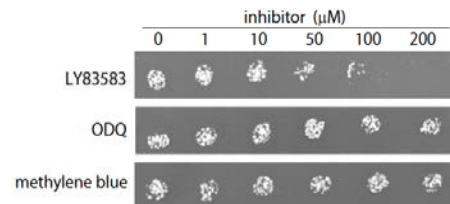


図5 グアニル酸シクラーゼ阻害剤の*C. albicans*増殖への阻害効果



LY83583 そのものはヒト正常細胞、がん細胞共に細胞毒性を示し、そのままでは抗真菌剤として使用できない事が確認された (データ示さず) が、LY83583 と CaMps1p との特異的な結合様式を解明することが新抗真菌薬開発につながるラショナルドラッグデザインに貢献できることが予想された。既に hMps1 ではいくつかの阻害剤との結合様式の報告がなされている。それを元にした計算ソフトによるシミュレーション解析から CaMps1 についても LY83583 との結合に関わるアミノ酸が推定された。これらについての解析及び、CaMps1 の結晶構造の解明に向けた解析が進行している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Kayoko Tsuda, Naoyuki Nishiya, Takashi Umeyama and Yoshimasa Uehara, Identification of LY83583 as a specific inhibitor of *Candida albicans* MPS1 protein kinase, Biochem Biophys Res Commun. 409,

418-423, 2011、査読有

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 香代子 (TSUDA KAYOKO)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：30444524