

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23658074

研究課題名（和文） 感染性真菌に対抗できる新しい抗菌デザインタンパク質の創製

研究課題名（英文） Creation of novel antimicrobial designed proteins against infectious pathogenic microorganisms

研究代表者

植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：90183201

研究成果の概要（和文）：

既存の抗真菌薬が抱えている課題の改善策を提供する新規作用機序を有するタンパク質を創製し、併せて特異性を活用した高感度真菌症早期診断システムを構築した。真菌症の代表的な疾患のひとつである主病原真菌 *Candida albicans* に対しての有効性評価を行ったところ、*in vitro* でこのデザインタンパク質の有効性を、真菌破壊による吸光度の減少やコロニー形成能を指標にして評価検討を行ったところ、有効であるという結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

Antimicrobial peptides (AMPs) are promising antibiotics as they possess strong antimicrobial activity and very broad spectra of activity. We designed a novel AMP. We utilized *Candida albicans* as a model organism that produces secreted aspartic proteases (Saps) as a virulence attribute. The designed peptide possessed no antimicrobial activity until it was activated by Sap isozymes. Furthermore, it demonstrated selective antimicrobial activity against *C. albicans*, but not against *Saccharomyces cerevisiae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：抗真菌薬、抗菌ペプチド、デザインタンパク質医薬、感染症、真菌症、*Candida albicans*、ペプチドライブラリー、プロテアーゼ感受性

1. 研究開始当初の背景

真菌症は感染の深度によって表在性と深在性に分類され、代表的な表在性真菌症の皮膚糸状菌症（白癬とも呼ばれ、俗にいう「みずむし」など）の発生率はあらゆる感染症の中でも最も高く、わが国でも全人口の10%以上が罹患していると推定され再発率も高

い。深在性真菌症は感染に対する抵抗力が低くなった易感染患者に日和見感染症として好発し多臓器不全（敗血症）に陥り重篤且つ致死率も高いことから深刻な問題となっており、近年の HIV 感染者や AIDS 発症者の増加、癌化学療法や臓器移植の進展による免疫抑制剤の広範な利用、免疫力の低下した高齢

者の増加が、易感染患者数の増加傾向に拍車をかけ、ますます真菌症治療は医療上の重要な課題となっている。

現在、表在性および深在性真菌症に対する既存の抗真菌薬の多くは、有効成分が病原真菌の生育に関わる細胞内の合成酵素に作用し、薬剤が当該酵素に結合することで病原真菌の生育を阻害するいわゆる化学的作用機序を有している。しかしながら、病原真菌が生き残るために防御機能を発揮し、容易に薬剤（既存薬）と酵素の結合箇所に変異を導入（耐性株の出現）し、薬剤と酵素の親和性を低下させ薬剤の有効性を低下させる問題点や、真菌がヒトの細胞と同様の真核細胞であるため、毒性を完全に抑えることが難しく、安全性の観点での問題も抱えている。このような状況から、既存薬と異なる新規作用機序を有する臨床的有用性の高い新規な抗真菌薬の開発が望まれている。

2. 研究の目的

既存の抗真菌薬が抱えている課題の改善策を提供する新規作用機序を有するタンパク質を創製し、併せて特異性を活用した高感度真菌症早期診断システム構築もめざす。デザインタンパク質は、①認識領域：真菌細胞を特異的に認識する分子からなる②抗菌ペプチド：ラクトフェリシンなどのペプチドを基本とする③リンカー：真菌が分泌する酵素などにより特異的に切断される配列からなる④抑制ペプチド：既知のマガイニンなどの抑制配列を基本とする。本タンパク質は、①の認識領域より特異的に標的真菌に接着し、真菌が増殖時に分泌する酵素（酸性プロテアーゼ）で③のリンカーが特異的に切断されることで抗菌ペプチドと抑制ペプチドが分離し、抗菌ペプチドが真菌細胞膜に穴を開け、細胞内成分を漏出させ死滅させる物理的な

作用機序を有する。

3. 研究の方法

本デザインタンパク質の創製に関わる研究では、これまでに申請者らが得ている基礎的な知見、すなわち、「抗菌ペプチドでの真菌 *Candida* への抗菌作用」、「抑制ペプチドを結合させることで病巣以外では抗菌活性は抑えられること」、「*Candida* 特異的分泌酸性プロテアーゼの種類によってリンカーの配列が異なること」をベースに、認識ペプチド（11～15 アミノ酸残基を想定）とリンカー（6～8 アミノ酸残基を想定）の最適アミノ酸配列の決定のために、ハイスループットスクリーニング（アミノ酸は 20 種類あるので、認識ペプチドは $20^{11} \sim 20^{15}$ 通りからの、リンカーは $20^6 \sim 20^8$ 通りからのスクリーニング）を行い、種々の組み合わせの検討により有効性の最適化を行う。また、薬効時間を伸ばすためにプロテアーゼ感受性を抑える修飾方法について検討し、真菌症の代表的な疾患のひとつである *Candida* 症の主病原真菌 *Candida albicans* に対しての有効性評価を行う。

4. 研究成果

既存の抗真菌薬が抱えている課題の改善策を提供する新規作用機序を有するタンパク質を創製し、併せて特異性を活用した高感度真菌症早期診断システム構築もめざした。デザインタンパク質は、①認識領域：真菌細胞を特異的に認識する分子からなる②抗菌ペプチド：ラクトフェリシンなどのペプチドを基本とする③リンカー：真菌が分泌する酵素などにより特異的に切断される配列からなる④抑制ペプチド：既知のマガイニンなどの抑制配列を基本とした。本タンパク質は、①の認識領域より特異的に標的真菌に接着し、真菌が増殖時に分泌する酵素（酸性プロテアーゼ）で③のリンカーが特異的に切断さ

れることで抗菌ペプチドと抑制ペプチドが分離し、抗菌ペプチドが真菌細胞膜に穴を開け、細胞内成分を漏出させ死滅させる物理的な作用機序を有する。具体的には、「抗菌ペプチドでの真菌 *Candida* への抗菌作用」、「抑制ペプチドを結合させることで病巣以外では抗菌活性は抑えられること」、「*Candida* 特異的分泌酸性プロテアーゼの種類によってリンカーの配列が異なること」をベースに、リンカー（6~8 アミノ酸残基を想定）の最適アミノ酸配列の決定のために、ペプチドライブラリーからハイスループットスクリーニングを行った。種々の組み合わせの検討により有効性の最適化を行い、最適リンカーを決定できた。また、薬効時間を考慮して、プロテアーゼ感受性を抑える修飾方法について検討し、真菌症の代表的な疾患のひとつである主病原真菌 *Candida albicans* に対する有効性評価を行ったところ、*in vitro* でのこのデザインタンパク質の有効性を、真菌破壊による吸光度の減少やコロニー形成能を指標にして評価検討を行ったところ、有効であるという結果を得た。

(1) モデル真菌 (*Candida* 症の主病原真菌である *Candida albicans*) に対する *in vitro* 有効性検討

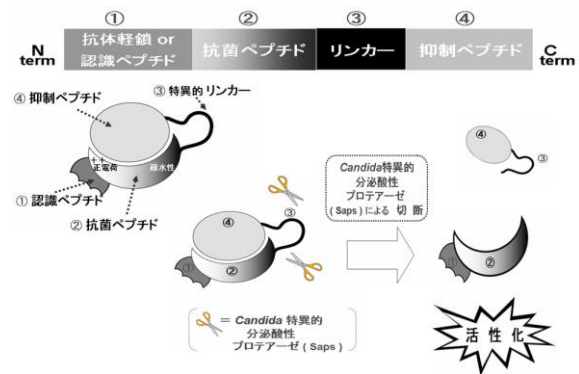
Candida albicans の細胞表層を認識するターゲット認識ペプチドと *Candida* 特異的分泌酸性プロテアーゼにより切断される最適長配列のリンカーペプチドを創製し、本菌に対する抗菌ペプチド配列及び抗菌ペプチドの活性をブロックする抑制ペプチドを、直列に配置したデザインタンパク質の *in vitro* での有効性を最適化した。具体的には、*Candida albicans* の細胞表層を認識するターゲット認識ペプチドと *Candida* 特異的分泌酸性プロテアーゼにより切断される最適

長のリンカーペプチドをコンビナトリアルバイオ工学手法により合成・選択し、これまでにない配列と特性を持つペプチドを創製した。そして、*in vitro* でのデザインタンパク質の有効性を、真菌破壊による吸光度の減少やコロニー形成能を指標にして評価検討を行った。

(2) 効率的な発酵生産系の確立

新規にデザインしたタンパク質の発酵生産による製造方法を確立した。具体的には、従来の抗菌ペプチドの合成製造としては、化学合成が主流となっている。しかし、化学合成法はペプチドの長さに応じて高コストとなり大量生産に適しているとはいえない。低コスト化を期待できる発酵製造において収量を確保する効率的な大量製造法の確立をめざした。

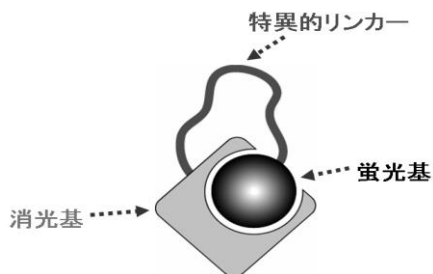
次世代デザインタンパク質 医薬



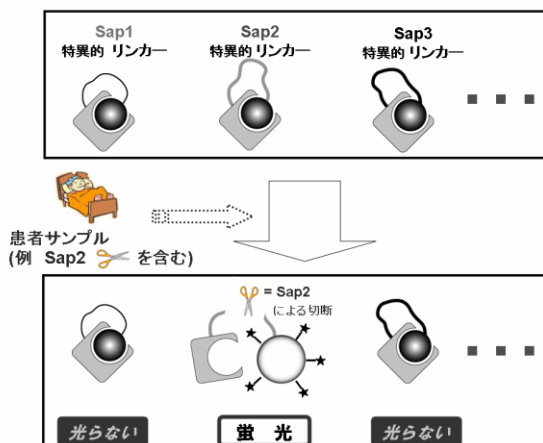
- ・ *Candida* 特異的分泌プロテアーゼに対する リンカー のハイスループットスクリーニング
⇒ デザインの最適化
- ・ 認識ペプチドのハイスループットスクリーニング
⇒ デザインの最適化
- ・ *in vitro* 有効性検討

(3) *Candida* 症に対する早期診断システムの構築

設計されたリンカーの両端に、発光基と消光基を付加したペプチドを創製し、検出感度が既存の検出感度以上の高感度検出系を構築し、かつ、15分以内で診断結果が判定できる迅速性・簡便性に優れた診断システムの構築を行った。具体的には、既存の補助診断法として普及している血清診断法では、いずれも感度/特異度に限界があり、信頼性における問題点が指摘されている。また近年、普及し始めている遺伝子診断法については、感度・簡便性の点で優れているが、必要十分な感度・特異度を示さないことが指摘されている。そこで、1の研究開発を踏まえて設計されたリンカーの両端に、発光基と消光基を付加したペプチドを合成し、このリンカーペプチドが切断されると消光から発光に変化するが、その反応時間の短縮化、消光から発光に変化する感度/特異度を、化学プローブの面からも定量的にもモニタリングし検証した。



各々の *Candida* 特異的分泌酸性プロテアーゼ (Saps) に対する 特異的リンカーの設計



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 3 件)

1. W. Aoki, N. Kitahara, N. Miura, H. Morisaka, K. Kuroda, M. Ueda, Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (ALS) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*. (査読有) FEMS Immunology & Medical Microbiology, 65, 121-124 (2012) doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00941.x
2. W. Aoki, N. Kitahara, N. Miura, H. Morisaka, Y. Yamamoto, K. Kuroda, M. Ueda, *Candida albicans* possesses Sap7 as a pepstatin A-insensitive secreted aspartic protease. (査読有) PLoS ONE, 7(2), e32513 (2012) doi:10.1371/journal.pone.0032513
3. W. Aoki, N. Kitahara, N. Miura, H. Morisaka, Y. Yamamoto, K. Kuroda, M. Ueda, Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. (査読有) J. Biochem., 150(4), 431-438 (2011) doi: 10.1093/jb/mvr073

[学会発表] (計 3 件)

1. 青木航、植田充美
日和見感染真菌 *Candida albicans* の細胞壁プロテオーム解析
日本生物工学会大会
2011年9月27日、東京、日本
2. 青木航、植田充美
日和見病原性真菌 *Candida albicans* 由来 ALS 接着タンパク質の特性解析
日本生化学会大会
2011年9月24日、京都、日本
3. W. Aoki, M. Ueda,
Characterization of ALS isozymes of *Candida albicans*, an opportunistic pathogen.
General meeting of the American Society for Microbiology
2011年5月22日、New Orleans、USA

[その他]

HP:<http://www.tenko.kais.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：90183201

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：