

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25年5月25日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659219

研究課題名（和文）抗菌剤のターゲットとしてのアミノ酸合成経路

研究課題名（英文）Amino acid biosynthetic pathways as targets for anti-fungal agents

研究代表者

東江 昭夫（TOH-E AKIO）

千葉大学・真菌医学研究センター・客員教授

研究者番号：90029249

研究成果の概要（和文）：クリプトコックスの含硫アミノ酸合成経路を解明した。本菌ではシステインはセリン経路のみで合成されること、および、transsulfuration 経路によるメチオニンとシステイン間の硫黄転移反応が欠損していることが判明した。セリン経路の二つの遺伝子、serine o-acetyl transferase 遺伝子（*CYS2*）および、システイン合成酵素遺伝子（*CYS1*）を同定し、破壊株を作製した。どちらの破壊株もシステイン要求性を示した。哺乳動物はセリン経路を持たない。しかし、血液中にはシステインやグルタチオンなど *cys1* 変異体の栄養要求性を満たす量が存在する。*cys1* 変異体がマウス体内で増殖するか否かを調べるために *CYS1* 破壊株をマウスの尾静脈から感染させたところ、*CYS1* 破壊株は病原性を失っていた。この結果はシステイン合成酵素が抗-クリプトコックス剤の開発のターゲットとして有望であることを示している。

研究成果の概要（英文）：In contrast to the methionine biosynthetic pathway of *Cryptococcus neoformans*, that of cysteine remains largely unknown. Here we showed that *C. neoformans* produces cysteine solely by the serine pathway. We identified the gene encoding cysteine synthase and that encoding serine o-acetyl transferase. Each disruptant is viable and requires cysteine. We designated the gene for cysteine synthase *CYS1* and that for serine-o-acetyl transferase *CYS2*. Methionine practically did not support the growth of the *cys1D* strain and cysteine did not support the growth of methionine auxotroph *met2D*., indicating the both directions of the transsulfuration pathways are not functional in *C. neoformans*. This result placed *C. neoformans* in the unique position concerning with sulfur amino acid metabolism. The *cys1D* strain lost pathogenicity against mice and mammals do not have cysteine synthase, indicating that cysteine synthase, serine-o-acetyltransferase as well, is a promising candidate for drug development.

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	2,700,000	810,000	3,510,000

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： *Cryptococcus neoformans*, 含硫アミノ酸合成経路、システイン合成酵素、

1. 研究開始当初の背景 *Cryptococcus neoformans* (以下、クリプトコックス)配膳環境に常在する担子菌酵母菌類に属する酵母であるが、免疫機能が低下したヒトに感染して重篤なクリプトコックス症の原因となる。その治療にはアゾール系薬剤、ファンギン系薬剤など、ヒトには無く酵母に特有の代謝系酵素の阻害剤が用いられている。しかし、使用できる薬剤は限られており、耐性菌の出現もあって、新しい抗真菌剤の開発が切望されている。本申請では、*C. neoformans* の多くのアミノ酸合成酵素が生育に必須であるという観察から、これまであまり注目されてこなかったアミノ酸代謝系酵素の中から抗真菌剤のターゲットとして有望なものを選び、それを精製し、さらに、構造を解析し、活性中心の構造から阻害剤を予測し、抗菌剤の候補を得ることを考えた。

2. 研究の目的 アミノ酸合成経路を網羅的に変異誘発し、ヒトに無い酵素遺伝子について抗菌剤のターゲットとしての可能性を探る。

3. 研究の方法 パン酵母の遺伝子のホモログをクリプトコックスで同定し、その破壊株を作性する。破壊株の増殖、病原性を調べる。破壊によって病原性を失う遺伝子が次の解析の候補となる。*Agrobacterium tumefaciens* 感染による変異誘発も用いる。

(1) 遺伝子破壊

(イ) アミノ酸合成経路の遺伝子の破壊
遺伝子破壊の標的遺伝子のコード領域を *URA5* で置換した形質転換用ドナーDNAをPCR(polymerase chain reaction)法により作製し、ボンバードメントによって野生型株に導入する(1, 2)。先行実験では、調べた遺伝子のうち *LYS2* は破壊できたが、*LEU2*、*TRP1*、*TRP5*、*ARO7*、*MET3* および *MET6* は必須遺伝子であったので、ロイシン、トリプトファン、芳香族アミノ酸、アルギニン、メチオニン合成経路の全ての遺伝子を標的遺伝子とする。一倍体野生型株の遺伝子型は α *ura5 ku70::NEO*、二倍体野生株の遺伝子型は a/α *ura5/ura5 ku70::NEO/ku70::NEO lys2/+ +/ade2* である。*Ura+*形質転換体の中から、相同組換えによる遺伝子破壊株を選ぶ。パン酵母と違って *C. neoformans* では相同組換えの頻度が低いので、

コロニーPCRによって破壊株を選抜する際、姉妹選択法(3)を適用する。標的遺伝子の破壊が致死的になる場合、*URA+*形質転換体は一倍体株では得られず、二倍体の相同染色体上の一方の対立遺伝子が破壊されたものが得られる。PCRで選抜された候補についてはDNAを抽出してさらにPCRあるいはサザン法によって遺伝子破壊を確認した後、二倍体を孢子形成させ担子孢子を分離する。こうして得られた子孫のなかに、*URA+*が得られない場合、破壊された遺伝子は必須遺伝子であると判断される。

(ロ) アミノ酸、ペプチド透過酵素遺伝子の破壊

C. neoformans のアミノ酸合成をブロックしても、感染動物から要求アミノ酸が供給されて増殖が回復されることもあり得る。そのような場合を想定して、アミノ酸やペプチドの透過酵素の阻害剤も検討する。パン酵母のアミノ酸透過酵素(*GAPI*, *CANI*, *LYPI*)のホモログを *C. neoformans* ゲノムからクローニングし、上述の方法で破壊する。同様に、オリゴペプチド透過酵素遺伝子 *OPT1* および *OPT2* も破壊する。破壊株の増殖特性を調べる。

(ハ) アミノ酸合成の一括制御(general amino acid control)に関わる遺伝子の破壊

C. neoformans でアミノ酸の一括制御(4)が働かどうかわかっていないのでこの制御の存在を検討するためにパン酵母遺伝子のホモログを破壊してその表現型を調べる。転写因子 *Gcn4* のホモログは *C. neoformans* ゲノム中に得られなかったため、ホモログが存在する *Gcn2* をコードする遺伝子の破壊株を作製する。破壊株におけるアミノ酸合成系酵素遺伝子のうち数種類について、その転写量をノーザンハイブリダイゼーション法によって調べる。この遺伝子はパン酵母では非必須遺伝子であるが、*C. neoformans* では必須遺伝子の可能性があり、アミノ酸の一括制御系遺伝子が本申請の目的とするターゲットとなり得るかのテストケースとなり得る。

(ニ) ハイポモルフ型のアミノ酸要求性変異体の分離と感染実験

あるアミノ酸合成経路の遺伝子が必須遺伝子である場合、その遺伝子の破壊株は感染実験に用いることはできない。感染実験には酵素

活性が低下した、いわゆる、ハイポモルフ型の変異が有用である。この種の変異体を分離するために、*C. neoformans* ゲノムに *Agrobacterium tumefaciens* の T-DNA を挿入して変異を誘発し、アミノ酸要求性変異体を分離する。T-DNA の挿入はヌルに近い変異からハイポモルフ型までいろいろな変異をひき起こすことが知られている。どのアミノ酸を要求するかを調べた後、T-DNA の挿入部位を inverse PCR 法によって決定する。

(ホ) 感染実験

遺伝子破壊あるいは T-DNA 挿入によって得られたアミノ酸要求性変異体についてはマウスへの感染実験を行う。感染性が失われた変異体が見つかった場合、次の項目について調べる。

- (i) 感染マウス体内での分布
- (ii) 臓器内での増殖
- (iii) マクロファージや上皮細胞への接着能
- (iv) マクロファージのファゴソームへの取り込みとそこでの生存

4. 研究成果 (1) アミノ酸要求性変異体の分離：要求性変異として分離できなかった理由が幾つか判明した。(あ) 要求量が多い。透過性が分解がその要因と推定された。(い) 透過酵素が通常の YNB 培地では窒素カタボライト抑制による制御を受けることによる。この例として *ilv1* 変異体を得られた。(2) メチオニン-システイン合成経路 本経路は図 1 に示すように、3 つブロック、セリン経路、メチオニン経路、および、硫黄転移反応) からなっている。1 つの生物種が全てのブロックを持つわけではなく、パン酵母とキャンジダ グラブラータはセリン経路を持たず、システインは硫黄転移反応によってホモシステインから作られる。多くの子囊菌酵母とカビは 3 つのブロックを全て持つ。分裂酵母は硫黄転移反応の一部、シスタチニンβ-シターゼとシスタチニル-リアーゼを欠損している。ちなみにヒトではセリン経路を持たず、システインはメチオニンから硫黄転移反応によって合成される。ヒトではメチオニンは必須アミノ酸であるが、システインはそうではない。担子菌類ではメチオニン-システイン合成経路に関するコンプレキシブな研究はなされておらず、本研究が最初である。

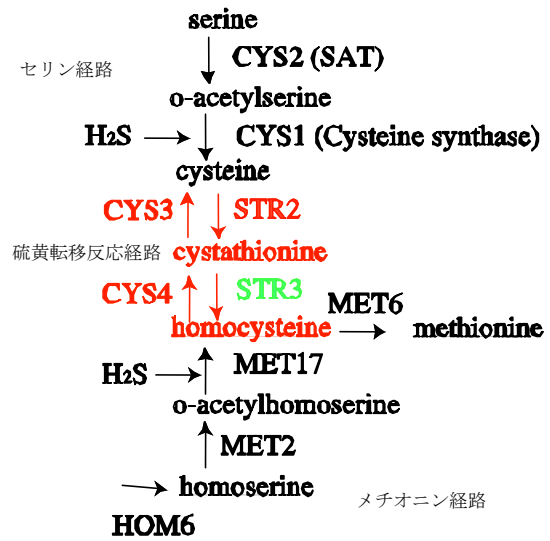


図 1. メチオニン-システイン合成経路

クリプトコックスのシステイン合成が硫黄転移反応によるか否かを調べるために、パン酵母の CYS4 遺伝子のホモログとしてクリプトコックスの CYS4 遺伝子を同定し、破壊株を biolistic transformation によって作製した。遺伝子破壊が正確に行われたことを PCR 法によって確信した (図 2)。

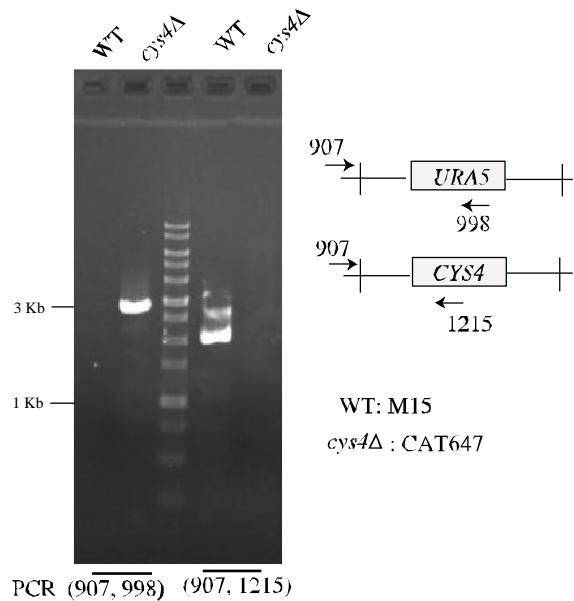


図 2. CYS4 遺伝子破壊の証明。野生型と破壊株の候補 (*cys4*Δ) からゲノム DNA を調製し鑄型として用い、プライマー 907 と 998 のペア、プライマー 907 と 1215 のペアで PCR を行った。増幅された DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で検出した。

CYS4 破壊株の増殖試験を行ったところ、この株は最小培地上で生育し、システイン要求性

を示さなかった。この結果はクリプトコックスではシステインは硫黄転移反応によって合成されるのではないことを示している。この結果は、また、クリプトコックスのシステインはセリン経路で合成されることも示唆している。そこで、クリプトコックスのセリン経路遺伝子の同定を試みた。

大腸菌のシステイン合成酵素のホモログをクリプトコックスゲノム中で探したところ、2つの ORF がヒットした。これらの遺伝子の内一つを破壊したところ、システイン要求性を示さなかった。この遺伝子を *CSL1* と名づけ、これ以後の解析は行っていない。もう一方の遺伝子についてクリプトコックスの一倍体を宿主に破壊株を作性しようとしたが成功しなかった。そこで、二倍体を宿主に遺伝子破壊を行ったところ、目的の破壊遺伝子に関して雑種が得られた。この雑種二倍体を孢子形成させ、担子孢子をマイクロマニピュレーターで分離した。孢子クローンの中に、システイン要求性の子孫が分離していた。この遺伝子を *CYS1* と命名した。図3に *CYS1* 破壊の証明を示す。また、図4にこの破壊株がシステイン要求性であることを示す。

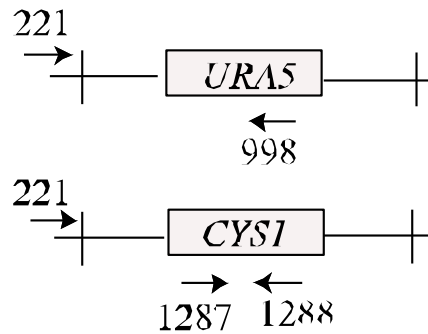


図3. *CYS1* 遺伝子破壊の証明。

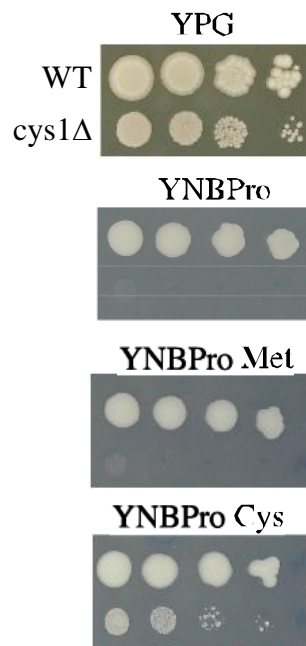


図4. *CYS1* 破壊株の要求性試験。

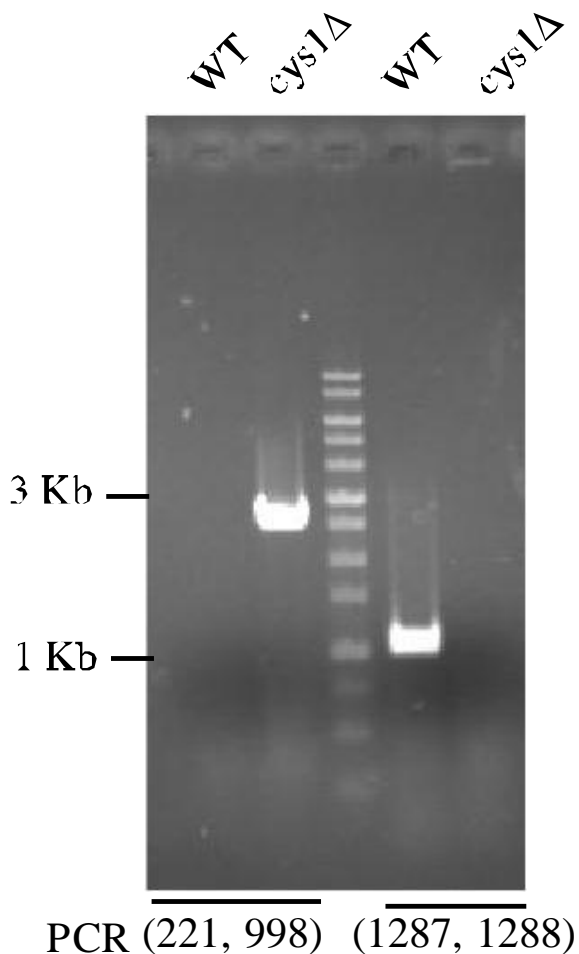


図4の結果から、*CYS1* 破壊株のシステイン要求性はメチオニンで満たされないことがわかる。すなわち、硫黄転移反応のホモシステインからシステインへの経路は機能していない。硫黄転移反応のシステインからホモシステインへの反応について、メチオニン要求性株 (*met2*) のメチオニン要求性がシステインで満たされるか否かで調べたところ、否であった。以上の結果から、クリプトコックスではシステインはセリン経路のみで合成され、メチオニン-システイン間の硫黄転移反応経路の遺伝子は存在するが、機能していないことが分かった。メチオニン合成とシステイン合成が全く独立に行われるのは前例がない。

ヒトはセリン経路を持たない。故にセリン経路の酵素の阻害剤は抗-クリプトコックス剤の有望な候補となる。そのためには、破壊株が病原性を失うことが条件である。そこで、

*CYS1*破壊株を用いてマウスへの感染実験を行った。*CYS1*破壊株はマウスへの感染性を失っていた。この結果は、*CYS 1*破壊株はマウス体内のシステインを利用できないことを示している。今後、*cys1*/*+*二倍体と $+/+$ 二倍体のセットを用いてクリプトコックスのシステイン合成酵素阻害剤のスクリーニングへと進展させたい。

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)

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東江 昭夫 (TOH-E AKIO)
千葉大学・真菌医学研究センター・
客員教授
研究者番号：90029249

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし