

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05738

研究課題名(和文) 真菌の先端成長因子の解明と抗真菌薬探索系の構築

研究課題名(英文) Elucidation of tip growth factor of fungi and construction of screening system for antifungal agents

研究代表者

飯田 泰広 (Iida, Yasuhiro)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：40329305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真菌が先端成長を行うという特徴に着目し、これを阻害する物質は新たな選択毒性を有する抗真菌薬のシード化合物になると考え、そのターゲットとなる因子を評価する系の構築に取り組んだ。先端に輸送されるグルカナーゼ(BGL-2)にGFPを融合させたタンパク質を酵母で発現させ、その先端(出芽部位)への輸送の評価を行った。その輸送を阻害する因子を評価するために輸送因子の欠損体を用いて取り組んだ結果、Ypt11欠損株においては先端への局在が見られなくなることが示された。また、菌糸型と酵母型を有する二形成真菌の*C. albicans*を供試菌として同様に先端成長を評価するシステムの構築に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BGL-2の局在が出芽部という事に加え、分裂する部位にも局在している新しい知見を得ることができた。また、先端成長に関連する因子を評価する系を構築できたことから、選択毒性を有する薬剤探索のための基盤技術が構築できた。真菌の先端成長は分解と合成のバランスにより成立していると考えられており、この技術を応用することで、合成酵素の局在や可視化も可能となり、先端成長のメカニズム解明への一助になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the characteristic of fungi to grow at the tip, we thought that substances that inhibit this would be seed compounds for antifungal drugs with new selective toxicity, and we investigated on the construction of a system to evaluate the target factors. A protein in which GFP was fused with glucanase (BGL-2) transported to the tip was expressed in yeast, and the transport to the tip (budding site) was evaluated. As a result of investigation with a deficient transport factor to evaluate the factor that inhibits the transport, it was shown that localization to the tip was not observed in the Ypt11 deletion variant. We also tried to construct a system for evaluating tip growth using *C. albicans*, a dimorphic fungus with hyphae and yeast types, as a test fungus.

研究分野：農芸化学

キーワード：抗真菌 *Saccharomyces cerevisiae* *Candida albicans* 先端成長 グルカナーゼ 局在評価

1.研究開始当初の背景

深在性真菌症は罹患すると重篤化し死亡率が高いため問題となっているが、上市されている抗真菌剤は4種9剤と少なく、新たな薬剤が望まれている。しかし、真菌がヒトと同じ真核生物であるため、選択毒性を得ることが難しく、開発が進んでいないことが現状である。本研究では、真菌が先端成長を行うという特徴に着目し、これを阻害する生理活性物質は成長を抑制し、新たな選択毒性を有する抗真菌薬のリード化合物になると考えている。

2.研究の目的

すでに先端成長に必須なタンパク質の局在を蛍光により可視化することに成功しており、本研究では、それを利用して当該タンパク質の輸送に関わる因子を可視的に評価するスクリーニング系を構築し、先端成長に必須な輸送因子を解明することを目的としている。このような因子を見出すことができれば、それをターゲットとした阻害剤スクリーニングを行うことにより、選択毒性の高い新規抗真菌薬のリード化合物の取得が期待できると考えている。

3.研究の方法

(1) 先端成長評価システムの構築と安定性の評価

真菌の先端成長には、細胞壁の分解と合成を行いつつ進んでいくと考えられており、先行実験において先端成長に必須なタンパク質としてグルカナーゼ(BGL-2)と緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合したタンパク質の先端輸送の評価を行っている。しかし、発現が一過性ではなく、安定的に継代して同様の状態を維持する必要があるため、より適した系の構築に取り組んだ。具体的には、先端への輸送のみならず、細胞周期を通しての局在状況の評価と長期安定性の評価に取り組むことと、その結果を考慮して系の改良に取り組んだ。

(2) 酵母の遺伝子欠損株を用いた先端成長時小胞輸送に関する因子の探索

(1)において安定した評価系を構築できたため、この評価システムを応用し、酵母の遺伝子欠損株を用いて先端成長時小胞輸送に関する因子の探索を行うこととした。この遺伝子欠損株を用いた先端成長時小胞輸送関連因子のスクリーニングでは、小胞輸送の主要制御因子である YPT/Rab タンパク質の1つである Ypt11 と、細胞膜に小胞をつなぎとめる役割を持つ exocyst complex のサブユニットのうちの Sec5、Sec6、Sec8 を選定した。*Saccharomyces cerevisiae* BY24036 株は、YPT11 が TRP1 に置き換わった株である。この Ypt11 は、Rab GTPase のうちの1つである。また、Myo2 結合するタンパク質で、細胞分裂時のミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体の母細胞から出芽部分への輸送に関与していることが知られている。また、Ret2 と呼ばれる COPI 小胞を形成するコートタンパク質複合体のサブユニットの一つであることが知られている。細胞小器官輸送だけでなく、小胞の輸送に関与している可能性があるため、BGL-2 の輸送にも関与することが予想される。また、*S. cerevisiae* BY28421, 28422, 28423 株は、分泌小胞を細胞膜につなぎとめる役割を持つ、

exocyst complex のサブユニットのうちの 1 つに変異が入った株である。現在、exocyst complex には、Sec3、5、6、8、10、15、Exo70、84 の 8 つのサブユニットがあることが知られている。このうちの Sec10、15 には、ヒトとの間で homolog があることが知られているが、そのほかのサブユニットである Sec3、5、6、8、Exo70、84 に関してはまだ報告がないため酵母特異的に見られる因子のうちの 1 つであることが考えられる。本研究では、pYES2-BGL2-EmGFP を *S. cerevisiae* BY24036、と *S. cerevisiae* BY28421、BY28422、BY28423 株のそれぞれに形質転換させ、BGL-2 の局在評価（先端部への輸送評価）を行った。

(3) *Candida albicans* を供試菌として用いた先端輸送評価系の開発

これまで評価してきた酵母を供試菌とした先端成長は出芽と同義となる可能性があるため、酵母型と菌糸型の両方の生育が可能な二形成真菌である *Candida albicans* を供試菌として用いた先端輸送評価系の開発を試みた。菌糸型を観察するための条件検討を行うと併に、*C. albicans* へのベクターの最適化（タンパク質の輸送配列が酵母と異なっている、ロイシンの CUG コドンがセリンをコードしているためコドンの最適化を行うなど）を行って目的配列のクローニングに取り組んだ。ベクター構築後、エレクトロポレーションにより導入後傾向の局在評価に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 先端成長評価システムの構築と安定性の評価およびその改良

発現が一過性ではなく、安定的に継代して同様の状態を維持する必要があるため、より適した系の構築に取り組んだ。まず、先端への輸送のみならず、細胞周期を通しての局在状況を評価した結果、図 1 に示すように、融合タンパク質が局在した部位から出芽し、娘細胞の細胞壁全体分布後、分離する部位にも局在することが示された。一方、長期安定性に関しては、酵母の継代を続けるにつれて生育が遅くなるとともに融合タンパク質の発現が悪くなる傾向が見られ、最終的には酵母が生育しなくなることが示された。詳細を調べた結果、継代を重ねるたびに酵母の染色体由来の BGL-2 の発現が少ない株をセレクションしてしまい、

融合タンパク質の発現を誘導しないと生育できない状態であることが示唆された。BGL-2 は細胞壁分解酵素であり、その発現が増えると自己溶解を起こすため

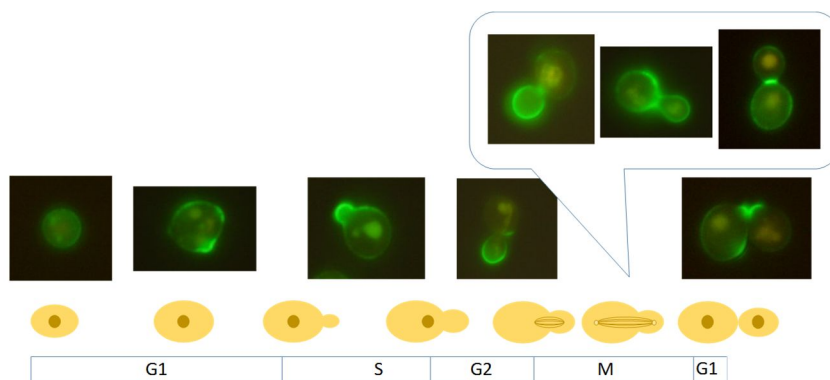


図1. BGL-2-GFP融合タンパク質内の細胞内での局在評価

このような結果を招いたと考えられたため、BGL-2 の活性部位の 2 か所のグルタミン酸をいずれもアラニンに変異させたもの (E124A、E233A) やアスパラギン酸に変異させたもの (E124D、E233D) BGL-2 を除去してシグナルペプチドに直接 GFP を接続させたものやシグナルペプチドに GFP と BGL-2 由来の細胞壁結合配列を付加したものなどのベクターを構築、組み換えた酵母における局在評価や長期安定性の評価を行った。その結果、図 2 に示すように、BGL の変異導入によらず、BGL を含まないものは細胞内全体に拡散してしまい、BGL を有しているものは局在している傾向が得られた。また、E124A、E233A の変異を導入したものが観察に最適であること、継代を繰り返しても安定的に生育、局在を示すことが例証された。

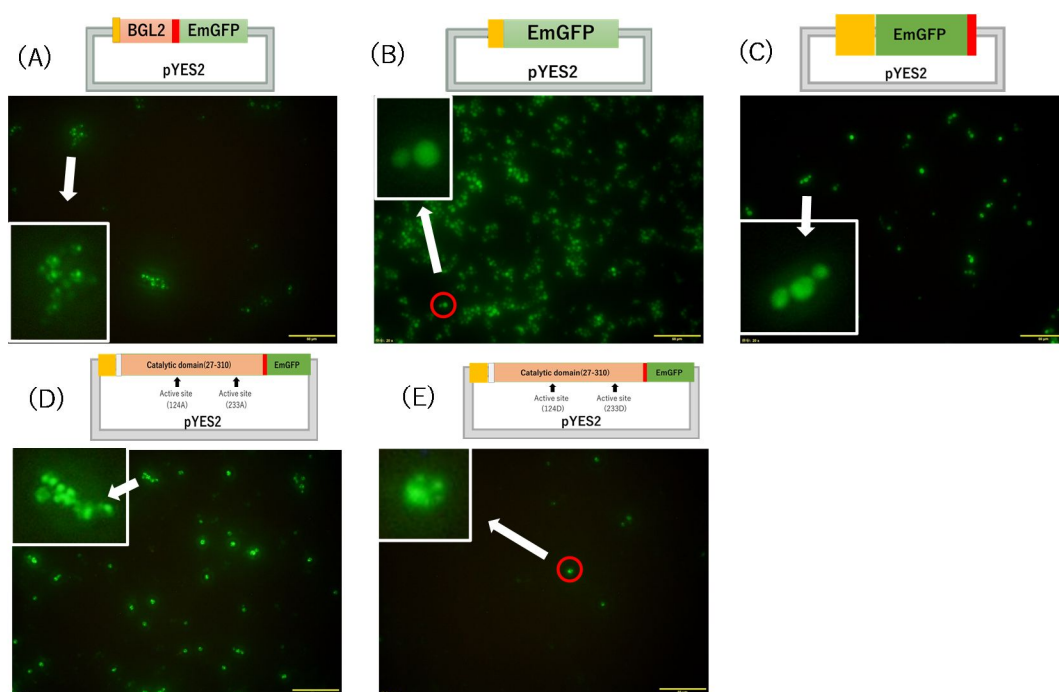


図2. 変異型BGL-2等の局在評価

(2) 酵母の遺伝子欠損株を用いた先端成長時小胞輸送に関する因子の探索

先端輸送を評価する系を用いて、その輸送因子に関する評価に取り組んだ。使用した株は 4 株で、それぞれ *ypt11* の変異株 (BY24036) *sec5* の変異株 (BY28421) *sec6* の変異株 (BY28422) *sec8* の変異株 (BY28423) であり、それぞれに GFP を融合した BGL-2 を有するベクター (pYES2-BGL2-EmGFP) を形質転換して評価を行った。その結果、目的の形質転換酵母が得られたのは BY24036 株のみであり、*sec* 関連の遺伝子欠損株に関しては形質転換体を得ることができなかった。そのため、BY24036 株とこれまで用いていた欠損の無い株 (INVScI 株) で局在評価を行った (図 3)。その結果、YPT11 欠損株では局在が見られ

なかったことより、当該遺伝子は先端輸送阻害物質探索用の因子になり得ると考えられるが、当該遺伝子はヒトの遺伝子とホモロジーがあることが知られており、真菌特異的な阻害が可能であれば有用なものになると思われるが、阻害剤探索のための因子として選定するためにはホモロジーの報告がないものであることの方が望ましいと考えており、sec 関連遺伝子等での検討を含め今後継続していきたいと考えている。

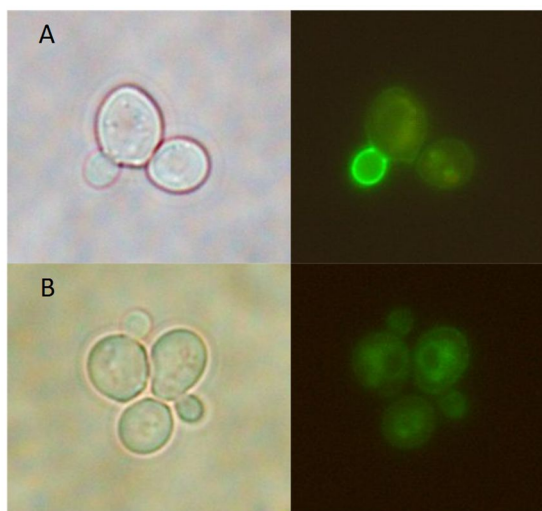


図3. BGL-2融合タンパク質の*S. cerevisiae* INVSc1およびBY24036株における局在評価 (A: INVSc1, B: BY24036Δypt11)

(3) *Candida albicans* を供試菌として用いた先端輸送評価系の開発

酵母型と真菌型を調整するための培地と培養時間、初期菌濃度などの検討を行った。様々な条件検討の結果、メチオニン合成培地で細胞数 4×10^6 cells/mL の条件で菌糸形成誘導を行った 48 時間後が最も菌糸形成率が高く、局在評価に最も適していると考えられた。次に、先端に輸送されることがわかっている Bgl2 (グルカナーゼ) に GFP (緑色蛍光タンパク質) を融合させた形質転換体を得るためのベクターを行った。輸送配列が酵母と異なっている点、また、ロイシンの CUG コドンがセリンをコードしているなど独特の配列を有しているため最適化を行って目的配列をクローニングした。目的配列をベクターに組み込み、エレクトロポレーション法で形質転換を行い、栄養要求性によるセレクションを行った。得られたコロニーに対して、発現誘導を行い、蛍光観察を行った。しかし、菌糸型への制御、ベクターの構築までは確認できたが、蛍光観察の結果、局在状況を含め蛍光を観察することができなかった。そのため、プロモーターを Lac プロモーターからガラクトース誘導型のプロモーターに変更した結果、図 4 に示すように、菌糸型の先端に向けて小胞が運ばれているように見える結果を得ることができた。しかし、組換え体を安定に保持できていないためか、再現性に難を抱えている。また、(2)と同様にこの評価系の検討を続けるとともに、siRNA を用いた先端成長の因子を選定するための系の構築を引き続き進めていく予定である。

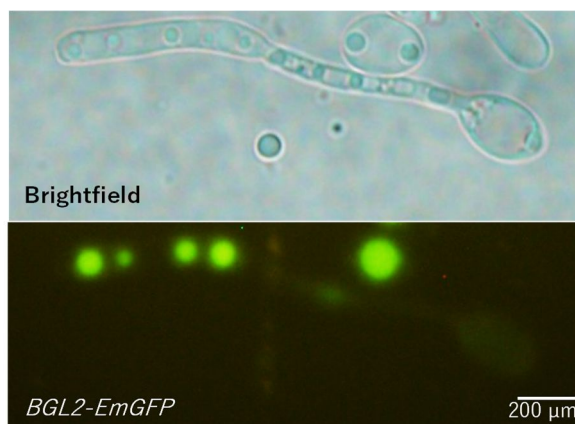


図4. *C. albicans*における先端成長評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小山 菜穂、飯田 泰広	4. 巻 2
2. 論文標題 深在性真菌症に対する抗真菌剤と新規ターゲット	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 69-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小山 菜穂、飯田 泰広
2. 発表標題 新規抗真菌活性物質探索系の構築とその応用
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naho Koyama, Yasuhiro Iida
2. 発表標題 Development of a Novel Evaluation System of Tip Growth for Antifungal Compounds with Use of Candida albicans
3. 学会等名 PRiME2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro Iida, Naho Koyama, Eriko Mori, Takuya Chiba, Anzu Tsutsumi, Ayumi Kida
2. 発表標題 Development of evaluation system of fungal tip growth for screening of antifungal agents with use of Candida albicans.
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山 菜穂、森 英里子、喜田 亜由美、飯田 泰広
2. 発表標題 新規抗真菌活性物質探索系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naho Koyama, Takuya Chiba, Ayumi Kida, Yasuhiro Iida
2. 発表標題 Vector construction for a novel evaluation system for antifungal active compounds with the use of <i>Candida albicans</i>
3. 学会等名 13th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eriko Mori, Saki Ito, Anzu Tsutsumi, Ayumi Kida, Yasuhiro Iida
2. 発表標題 Development of an Evaluation System for Antifungal Agents Targeting Vesicle Transport Inhibition
3. 学会等名 13th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木智佳穂、小山菜穂、飯田泰広
2. 発表標題 C. albicansを用いた新規抗真菌活性物質探索系の構築
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第47回年次大会(オンライン)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 被験物質が有するサバイピンとサバイピン以外のタンパク質との複合体形成阻害作用の評価方法及び複合体形成阻害剤	発明者 飯田泰広、齋藤宇伸、長谷部 佑亮、濱幸菜、城本春菜	権利者 学校法人 幾徳学園
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-205065	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------