

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16656

研究課題名(和文)皮膚糸状菌の低分子量Gタンパク質による菌糸形成および菌糸成長制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of hyphal formation and mycelial growth by small G proteins in a dermatophyte.

研究代表者

石井 雅樹 (ISHII, Masaki)

武蔵野大学・薬学部・助教

研究者番号：10786966

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)：一般に水虫として知られる白癬は皮膚糸状菌というカビによって引き起こされ、国民の10人に1人以上が罹患していると言われるほど一般的な疾患です。皮膚糸状菌の糸状の細胞形態である菌糸は、皮膚糸状菌が病気を起こすために必要であると考えられていますが、その分子機構については未だ不明な点が多いです。本研究では、菌糸成長に関わるRac様タンパク質としてTrRac及びそのホモログTrCDC42を見出し、変異株や大腸菌で作製したタンパク質を用いて、その機能を解析しました。また、活性を定量的に試験管内で評価する系を確立し、抗真菌薬の候補となりうる阻害剤の探索を行う基盤を構築しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水虫の原因となる皮膚糸状菌を含む真菌(カビ)は、大腸菌や黄色ブドウ球菌のような細菌と異なり、真核細胞生物であり、そのため、細胞を構成する分子群はヒト細胞と良く似ています。ヒト細胞に似た特徴を持つ真菌に対する抗真菌薬の開発は抗菌薬(抗細菌薬)の開発に比べて困難であり、新たな作用標的となりうる分子が求められています。本研究は、新たな抗真菌薬作用標的としてRac様タンパク質を中心とした細胞内シグナル伝達系を提案するとともに、その阻害剤(抗真菌薬候補)を探索するための基盤の構築を行いました。本研究成果は、将来の新規抗真菌薬開発に貢献しうると期待されます。

研究成果の概要(英文)：Dermatophytosis, commonly known as athlete's foot, is caused by a fungus called dermatophytes and is so common 10% of the population is suffered. Hypha, the filamentous cell form of dermatophytes, is considered to be necessary for dermatophytes to cause the disease, but its molecular mechanism is still largely unknown. In this study, we found TrRac and its homologue TrCDC42 as Rac-like proteins involved in mycelial growth and analyzed their functions using mutant strains and proteins produced by *E. coli*. We also established a system to quantitatively evaluate their activity in vitro for the discovery of inhibitors that could be candidates for antifungal drugs.

研究分野：医真菌学

キーワード：皮膚糸状菌 Rac様蛋白異質 Rac CDC42

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白癬は国内においても非常に患者数が多く、皮膚の発赤、頭髪の脱毛、爪の肥厚などの外見上の変化だけでなく、爪の変形による歩行困難や強いかゆみを生じる他、糖尿病患者においては足部潰瘍のリスクファクターとなることが示唆されており、患者の QOL を著しく低下させる疾患である。世界的な高齢化に伴い白癬の罹患者数も増加傾向にある。現在も白癬の治療薬開発は盛んに行われており、ルリコナゾールやエフィナコナゾールといった爪白癬治療薬が開発されている。一方、それらの新薬を用いても爪白癬の完全治癒率は十分でない。また、主要な治療薬であるテルビナフィンやアゾール系抗真菌薬に対する耐性菌も報告され始めている。白癬治療薬の作用標的は非常に限られており、薬剤耐性菌の出現などにより増加が懸念される難治性の白癬を治療するためにも新規作用標的を持つ抗真菌薬の開発が望まれている。

皮膚糸状菌は名前の通り、“いと”状の菌糸と呼ばれる構造体を伸長することで、増殖している。皮膚糸状菌に対する新規作用標的薬の開発が進んでいない要因として、皮膚糸状菌の特徴的な形態形成を伴う増殖(菌糸成長)や、病原性に関わる分子機構の解明が進んでいないことが挙げられる。皮膚糸状菌がどのように正常な菌糸成長を行うかを解明することは、抗真菌薬の新規標的分子を発見する上で重要である。

低分子量 G タンパク質は、生体の正常な機能を維持するために重要な分子スイッチとしての役割を担っている。低分子量 G タンパク質である Rac は哺乳類においてはアクチンフィラメントの脱重合を調節することで、ラメリポディアと呼ばれる細胞形態変化を制御する。申請者は低分子量 G タンパク質阻害剤の皮膚糸状菌への作用を検証する中で、Rac 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。また、皮膚糸状菌のゲノム上には Rac と高い相同性(80%)を有するタンパク質がコードされており、皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質が菌糸成長に必須の役割を担っていることが示唆された。低分子量 G タンパク質の機能は、G タンパク質活性化因子である GEF、不活性化因子である GAP、活性化阻害因子である GDI といった相互作用因子によって制御されている。相同性検索の結果、ヒトの Rac 活性化因子(GEF)と皮膚糸状菌の GEF ホモログとの同一性は非常に低く(21-32%) Rac GEF は真菌に選択性の高い創薬開発のための分子標的となりうることが期待された。これまでは皮膚糸状菌の低分子量 G タンパク質の生理的意義や機能についての報告がなかったため、プリミティブな真核細胞である皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質とその活性化因子(GEF)の菌糸成長における機能は未解決の課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は皮膚糸状菌の低分子量 G タンパク質の生理的意義を明らかにするとともに、創薬における新たな分子標的を同定することにある。申請者は、本研究の予備検討において低分子量 G タンパク質 Rac の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ていた。本研究では、これまで皮膚糸状菌の菌糸成長との関与が知られていなかった Rac 様タンパク質およびその GEF に着目し、皮膚糸状菌の菌糸成長への寄与を明らかにするとともに、医薬品開発における新規分子標的の同定を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質の生理機能を遺伝学的手法により解明するとともに、生化学的手法によりタンパク質の特性を明らかにし、抗皮膚糸状菌薬の開発を目標とした糸状菌に特徴的な低分子量 G タンパク質阻害剤探索のためのスクリーニング系を指向した解析系の基盤確立を目指した。

(1) 皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質の生理的機能の解明

(1)- Rac 様タンパク質の生理機能についての遺伝学的手法による解析：

皮膚糸状菌のゲノム情報を用いて、Rac 様タンパク質の変異株を作出する。すでに得られている結果から、Rac 様タンパク質は増殖に必須の分子であると予想され、欠損株は致死であると推測された。そこで、銅イオン依存性の条件発現抑制株を作製し、各遺伝子の菌糸成長における必要性を検討した。また、Rac 様タンパク質と類似の CDC42 タンパク質についても変異株を作出し、解析した。遺伝子変異株の作出については、アグロバクテリウムを用いた形質転換法で行った。得られた株について、菌糸成長等を親株と比較した。

(1)- 大腸菌で発現させた組み替え Rac 様タンパク質による生化学的な解析：

Rac 様タンパク質が低分子量 G タンパク質として機能しうるかを生化学的に検証するために、Rac 様タンパク質の組み換え体を大腸菌で作製し、蛍光ラベルされたグアニンヌクレオチドとの結合能を定量的に検討した。さらに、予備的な検討において皮膚糸状菌の菌糸成長を阻害した Rac 阻害剤について、*in vitro* のグアニンヌクレオチド結合活性の阻害が見られるか検討した。

(2) 皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質の相互作用因子の同定と薬剤スクリーニングを見据えたアッセイ系の確立

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

(2)- Rac 様タンパク質の相互作用因子 (GEF) の同定:

確立した酵素アッセイを用いて、Rac 様タンパク質のグアニンヌクレオチド交換反応を促進する相互作用因子を探索した。一次構造から Rac 様タンパク質の GEF と推測されたタンパク質を大腸菌にて発現させ、グアニンヌクレオチド交換因子としての活性を *in vitro* のアッセイ系で測定した。

(2)- 同定した Rac GEF の菌糸成長への寄与の解析:

同定した Rac GEF の条件遺伝子発現株を作出し、皮膚糸状菌菌糸成長への寄与を遺伝学的に解析した。

(2)- Rac 様タンパク質と Rac GEF を用いた薬剤スクリーニング系の確立:

Rac 様タンパク質と Rac GEF の生化学的な検討を基に、両者の相互作用もしくはグアニンヌクレオチド交換反応を阻害する物質を探索するスクリーニング系の構築に向け条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) 皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質の生理的機能の解明

(1)- Rac 様タンパク質の生理機能についての遺伝学的手法による解析:

ゲノム上の Rac 様タンパク質の解析から皮膚糸状菌ゲノム上には Rac 及びその類縁タンパク質 CDC42 が存在することを見出した。Rac 阻害剤が菌糸成長を抑制したことから、皮膚糸状菌 Rac が菌糸成長に必須のタンパク質であろうと考え、条件発現抑制株を作出したが、Rac 抑制下においても菌糸成長の抑制は観察されなかった。そこで、Rac 欠損株の作出を試みたところ、Rac の欠損が可能であり、菌糸成長も野生株と同程度であることがわかった。このことから、阻害剤が類縁の CDC42 タンパク質を阻害することで、菌糸成長を抑制しているのではないかと考え、CDC42 の条件発現株を作出したところ、CDC42 の抑制によっても菌糸成長の顕著な抑制は見られなかった。そこで、Rac 欠損下で CDC42 の発現を抑制できる組み換え株を作出したところ、Rac 欠損下、CDC42 の発現を抑制すると顕著な菌糸成長の抑制が観察され、皮膚糸状菌の Rac と CDC42 に遺伝学的な相互作用が見られた。

(1)- 大腸菌で発現させた組み替え Rac 様タンパク質による生化学的な解析:

上記結果を受け、大腸菌での Rac 及び CDC42 タンパク質の作出を試みた。Rac は、pGEX6p-1 をベクターに用い、比較的容易に大腸菌で発現することに成功した。調製した Rac を用いた解析から、皮膚糸状菌 Rac は蛍光標識した GTP と結合することが明らかになった。CDC42 は、pCold ベクターを用いることで、少量ながら調製することに成功し、Rac 同様蛍光標識した GTP と結合した。

(2) 皮膚糸状菌の Rac 様タンパク質の相互作用因子の同定と薬剤スクリーニングを見据えたアッセイ系の確立

(2)- Rac 様タンパク質の相互作用因子 (GEF) の同定:

大腸菌で発現させた Rac タンパク質と同じく大腸菌で発現させたグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 候補の活性化ドメインを用いてグアニンヌクレオチド交換反応を行うことで、Rac GEF を同定した。同定した GEF はヒト相同因子との同一性が 27% と低く、その差に着目することで、真菌 GEF に対して選択的な薬剤開発が可能になると期待された。CDC42 についても、Rac と同様に同定した Rac GEF によって活性化されたことから、Rac 及び CDC42 が Rac GEF の下流で細胞内シグナル伝達系を相補的に制御していることが示唆された。また、皮膚糸状菌の菌糸成長を抑制した Rac 阻害剤は、試験管内で Rac GEF による Rac 及び CDC42 の活性化をも阻害した。以上のことは Rac 様タンパク質及びその GEF が皮膚糸状菌における菌糸成長を制御する新規経路を構成する分子であり、新奇創薬標的候補となることを示唆している。

(2)- 同定した Rac GEF の菌糸成長への寄与の解析:

同定した Rac GEF の条件発現抑制株を作出し、菌糸成長に対する影響を検討した。Rac や CDC42 と異なり、Rac GEF の発現は単独で菌糸成長を抑制することを見出した。さらに、ヨウ化プロピジウム処理後の蛍光顕微鏡観察の結果、Rac GEF の発現抑制により皮膚糸状菌に細胞死が引き起こされることが示唆された。

(2)- Rac 様タンパク質と Rac GEF を用いた薬剤スクリーニング系の確立:

Rac 及び Rac GEF は大腸菌を用いて比較的大量にタンパク質を得られたが、CDC42 は得られる可溶性タンパク質量が少ないという問題があった。そこで、シャペロンの同時発現や融合するタグを変更することで、発現量や可溶性を改善できないかと考えた。いくつかの条件を検討した結果、可溶性タグ ProS2 の融合タンパク質として発現させることで、活性を保持し、比較的多くのタンパク質を安定的に発現することが可能であった。これらのタンパク質を用いて 384 ウェルプレートで測定可能なアッセイ系を確立した。今後、確立したアッセイ系を用いたスクリーニン

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

グにより、皮膚糸状菌により有効で、選択的な阻害剤の発見が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Vicente 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 -

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 <i>Aspergillus novofumigatus</i> 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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1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 石井 雅樹
2. 発表標題 生物間で高度に保存されたRhoファミリー低分子量Gタンパク質の真菌特異的活性化因子による菌糸形成制御機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021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-RelAFUS2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は菌糸成長に寄与する
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は菌糸形態に寄与する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

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 Trichophyton rubrumの低分子量Gタンパク質Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac)のcell division cycle 24 (CDC24)を介した活性化と孢子発芽調節
3. 学会等名 第40回関東医真菌懇話会
4. 発表年 2019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 低分子量Gタンパク質Rac GEF抑制による皮膚糸状菌菌糸成長の阻害
3. 学会等名 第93回細菌学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------