

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05319

研究課題名（和文）カンジダ二形性制御機構の解明を目指したケミカルバイオロジー研究

研究課題名（英文）Chemical biology for dimorphism in *Candida* spp

研究代表者

二村 友史（FUTAMURA, YUSHI）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70525857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：カンジダの形態変化を指標に二形性（環境に応じて酵母型や菌糸型に変化する性質）を攪乱する小分子化合物を探索し、微生物代謝物Xを処理したカンジダが菌糸型に変わっていることを見出した。タイムラプス解析から本化合物はカンジダを酵母型から菌糸型に転換させているのではなく、菌糸伸長の間におこる菌糸の分枝やラテラル酵母の出芽を阻害するユニークな活性をもつことが示唆された。この化合物は化学構造的に金属イオンとキレートすることが考えられた。実際、金属塩を添加すると化合物の活性が消失した。また別のキレーターを使った解析から化合物Xの金属キレート活性が抗真菌活性に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで培養シャーレ中でカンジダの二形性を観察することは難しかったが、菌の培養条件を検討して、菌糸型→酵母型の変換を評価できるようになった。この独自の表現型スクリーニングに探索リソース（微生物培養エキスなどの天然物資源、カンジダの遺伝子変異株コレクションの遺伝子資源）を組み合わせることで、カンジダの二形性制御機構に影響を与える化合物や遺伝子を迅速に見出すことができた。得られた化合物や二形性関連遺伝子についてはカイコを使った感染モデルで薬効や病原性を評価し、新しい創薬研究の足掛かりにしたい。

研究成果の概要（英文）：To discover novel antifungal agents, we have screened for small molecules that interfere with the dimorphism of *C. albicans* based on their morphological changes and found that microbial metabolite compound X induced a hyphal form in *C. albicans*. A detailed time-lapse microscopy analysis suggested that compound X did not induce the morphological changes of *C. albicans* from yeast to hyphal form, but rather inhibited the branching of hyphae and the budding of lateral yeast during hyphal to yeast transition. Since the effects of this compound were inhibited by the addition of metal ion and other metal chelators showed a similar phenotype, metal chelating activity of this compounds is necessary for its antifungal activity, suggesting that metal chelators could be a new type of antifungal drug.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：二形性 抗真菌剤

1. 研究開始当初の背景

高度医療の普及や人口の高齢化に伴って日和見感染症が増加し、特に真菌を原因とする真菌感染症の治療は重要な課題である。真菌感染症のうち、臨床で頻度よく検出されるのはカンジダ属を原因とするカンジダ症である。これまでにキャンディン類など有効な抗真菌薬が開発されてきたものの、カンジダ症治療薬の種類は五指に足りず、抗真菌スペクトルや副作用の問題を抱えている。加えてカンジダ・オーリスなどの耐性菌の出現も報告されており、新薬の開発が急務である。カンジダは通常、酵母型で生存・増殖するが、環境(栄養飢餓、抗菌薬)に応じて酵母型あるいは菌糸型へと変換する性質「二形性」を有している。このような表現型変化を引き起こすことは古くから知られていたが、その分子機構は未だ不明な点が多かった。また、二形性が薬剤抵抗性を示すバイオフィルムの形成に関与することや二形性に関与する遺伝子変異株を作出すると、*in vivo*での病原性が低下することが報告されており、二形性制御機構を明らかにすることはカンジダの病原性を解明することにつながり、さらに新しい作用機序をもった抗真菌薬開発へと発展することが期待できた。

2. 研究の目的

日和見感染症を引き起こすヒト病原性真菌カンジダは、環境に応じて酵母や菌糸に変換する性質「二形性」を有している。この二形性はカンジダの病原性との関連が示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、自前の天然物資源(微生物培養エキスおよび理研天然化合物ライブラリー)や遺伝子資源(カンジダヘテロ接合体変異株コレクション)を使って、カンジダの二形性に影響を与える小分子化合物や遺伝子を探索し、(1)ケミカルおよびゲノムアプローチによるカンジダの二形性機構の理解、(2)新規治療薬開発に役立つリード化合物や創薬標的の提示、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 二形性を攪乱する小分子化合物のスクリーニング

微生物培養エキスや理研天然化合物バンク NPDepo の化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。カンジダアラビカンス JCM1542 株を RPMI 培地に播種し、サンプルを添加 24 時間後に菌の生存率を測定した。増殖を 80%以上阻害したサンプルについてはサンプルが誘導する形態変化をタイムラプスで観察し、二形性に与える影響を検討した。

(2) 二形性を攪乱する遺伝子のスクリーニング

カンジダアラビカンスのヘテロ遺伝子破壊株ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。各変異株を RPMI 培地に播種し、24 時間後に菌の生存率測定と形態観察を実施した。一次スクリーニングでは菌株の正確な菌数を合わせず、十分に培養した菌液を一律の希釈率で薄めて播種した。二次スクリーニングでは、濁度で菌株の播種数を調整して検討を実施した。

4. 研究成果

カンジダは標準的な YPD 培地では酵母型で増殖するが、pH や栄養素を変えた特殊培地(Lee's, Spider など)では、酵母型から菌糸型に変化することが報告されている。ただし、これらの条件を実際に試すと一時的な変化しか検出できず、二形性を攪乱する小分子や遺伝子を大規模に探索することは困難だった。私たちは培養条件検討の過程で、RPMI 培地では酵母から一旦菌糸になった後、分岐の所々から酵母が出芽することを見出した。すなわち、*in vitro*で「菌糸⇄酵母」の変換を観察できるようになった。そこで、3,600 種の微生物エキス、NPDepo の 15,000 種の化合物から二形性を攪乱する物質を探索した。その結果、一放線菌の培養エキスを添加すると通常は酵母型と菌糸型で増殖するカンジダが菌糸型のみになることを見出した(図1)。本菌株の培養エキス(7L)を種々のカラムクロマトグラフィーを使って単離精製を行い、活性物質として化合物 X と同定した。

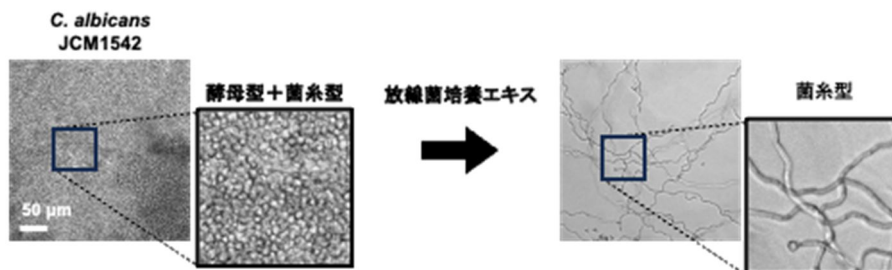


図1. 放線菌培養エキスはカンジダに特徴的な形態変化を誘導する

本化合物がどのようにしてカンジダの形態を変化させるのかを検討した。コントロールではまず擬菌糸を伸ばし、播種後 8 時間で枝分かれが増え、ラテラル酵母が発生して、酵母型で増殖した。一方、化合物 X 処理では擬菌糸を作る過程まではコントロールと同じように成長したが、

分枝や酵母の出芽は観察されず、そのまま菌糸型で伸長しつづけた。また化合物 X を除去すると酵母の出芽が見られたことから、この化合物はカンジダを酵母型から菌糸型へ変えているのではなく、菌糸型から酵母型への転換を抑制するユニークな物質であることが示唆された。

この化合物は化学構造的に金属イオンとキレートすることが考えられた。実際、金属塩を添加したところ、化合物の活性が消失した。また別のキレート剤の効果を検討すると、化合物 X に似た表現型を示した。したがって、化合物 X の金属キレート活性が抗真菌活性に重要であることが示唆された。

ゲノムアプローチでは、約 5000 種のカンジダ遺伝子変異株を 1 株ずつ培養して、二形性に影響を与える遺伝子変異を探索した。1 次スクリーニングでは酵母型あるいは菌糸型だけの形態を示したもや酵母や菌糸の存在比が変わるもの、通常の菌とは全く異なる形態を示すものなどを集めたところ、約 400 株がヒットした。再現性や活性の強さを確認したところ、顕著な二形性攪乱活性を示すものは 47 株が残った。現在、これらの変異株の *in vivo* での病原性について検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nogawa Toshihiko, Kato Naoki, Shimizu Takeshi, Okano Akiko, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Koshino Hiroyuki, Osada Hiroyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Wakodecaline C, new tetrahydrofuran-fused decalin metabolite isolated from fungus <i>Pyrenochaetopsis</i> sp. RK10-F058	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 346 ~ 350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-023-00613-2	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 -

1. 著者名 LIU ZIYU, OKANO AKIKO, SANADA EMIKO, FUTAMURA YUSHI, NOGAWA TOSHIHIKO, ISHIKAWA KOSUKE, SEMBA KENTARO, LI JIANG, LI XIAOMENG, OSADA HIROYUKI, WATANABE NOBUMOTO	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification of microbial metabolites that accelerate the ubiquitin-dependent degradation of c-Myc	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Research	6. 最初と最後の頁 655 ~ 666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32604/or.2023.030248	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 -

1. 著者名 Kato Naoki, Ebihara Kana, Nogawa Toshihiko, Futamura Yushi, Inaba Kazue, Okano Akiko, Aono Harumi, Fujikawa Yuuta, Inoue Hideshi, Matsuda Kazuhiko, Osada Hiroyuki, Niwa Ryusuke, Takahashi Shunji	4. 巻 18
2. 論文標題 cis-Decalin-containing tetramic acids as inhibitors of insect steroidogenic glutathione S-transferase Noppera-bo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0290851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0290851	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10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青野 晴美、二村 友史、堀 康宏、室井 誠、平野 弘之、本田 香織、西浦 正芳、侯 召民、木野 邦器、長田 裕之
2. 発表標題 抗カンジダ物質TPPBの構造活性相関とタンパク質-化合物間相互作用解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yushi Futamura
2. 発表標題 Phenotypic screenings, iHOPE and MorphoBase, for antifungal discovery
3. 学会等名 The URICAS2024 conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二村 友史、堀 康宏、長田 裕之
2. 発表標題 低分子量G タンパク質RH01 をターゲットとする新規真菌細胞壁合成阻害物質の発見
3. 学会等名 第67回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yushi Futamura, Harumi Aono, Rachael Uson-Lopez, Yasuhiro Hori, Makoto Muroi, Hiroyuki Hirano, Masayoshi Nishiura, Zhaomine Hou, Hiroyuki Osada
2. 発表標題 A novel inhibitor of fungal cell wall synthesis that targets RH01 small GTPase
3. 学会等名 5th KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二村 友史
2. 発表標題 表現型を活用した抗真菌剤の探索研究
3. 学会等名 第33回 新薬創製談話会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二村 友史
2. 発表標題 表現型解析で拓く抗真菌剤探索
3. 学会等名 理研 早稲田シンポジウム2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二村 友史、青野 晴美、山本 甲斐、清水 猛、ウソン-ロベス レイチェル、堀 康宏、木野 邦器、長田 裕之
2. 発表標題 カンジダの二形性を阻害するSFの作用機序解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青野 晴美、二村 友史、堀 康宏、室井 誠、平野 弘之、西浦 正芳、侯 召民、木野 邦器、長田 裕之
2. 発表標題 抗カンジダ物質TPPBの作用機序解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二村 友史、ウソン - ロベス レイチェル A.、青野 晴美、堀 康宏、室井 誠、平野 弘之、西浦 正芳、侯 召民、長田 裕之
2. 発表標題 カンジダの細胞形態変化を指標とした抗真菌剤の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二村 友史、ウソン - ロペス レイチェル A.、青野 晴美、堀 康宏、渡邊 慶子、室井 誠、平野 弘之、西浦 正芳、侯 召民、長田 裕之
2. 発表標題 カンジダ細胞の表現型変化を指標とした抗真菌剤の探索
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021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
---------	---------