

Title	病原性真菌 <i>Candida glabrata</i> における新しい遺伝子発現制御系の確立とそれを用いた抗真菌薬開発における標的分子の評価
Author(s)	中山, 浩伸
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43115
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	なか やま ひろ のぶ 中 山 浩 伸
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 16687 号
学位授与年月日	平成14年3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	病原性真菌 <i>Candida glabrata</i> における新しい遺伝子発現制御系の確立 とそれを用いた抗真菌薬開発における標的分子の評価
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 小林 祐次 教授 前田 正知 教授 西原 力

論 文 内 容 の 要 旨

臓器移植患者や化学療法を受けているガン患者、そして、エイズ患者などの免疫機能が低下している患者では、病原性真菌に感染すると深在性全身性感染が起り、多くの場合、死亡してしまう。このような患者の数が、増加の一途であることから、深在性真菌症の予防、治療の重要性が高まっている。現在、深在性真菌症の治療薬として主に使用されているのは、azole系薬剤とpolyene系薬剤のみである。しかも、前者は、抗菌スペクトラムが狭くまた頻繁に耐性菌が出現すること、後者は、腎毒性などの強い副作用を伴うこと等の問題があり、新たな抗真菌薬の開発が急務となっている。標的分子を定めた創薬は、既存の薬剤と異なる作用機序を持つ新薬を開発するのに有効な戦略で、現在盛んに行われている。抗真菌薬の標的分子を選定する場合、その分子の生育に対する必須性、ヒトと比べての特異性、病原性への関与などが判断基準となる。特に必須性の情報は重要であるが、薬剤が実際に作用する宿主体内における必須性を調べる系が存在せず、現状では、生育環境が大きく違う試験管内での情報を基に必須性を判断している。また、多くの病原性真菌では、遺伝学的背景が複雑で、その解析を行う道具や方法が少ない。このような背景から、宿主体内においても制御可能な病原性真菌の遺伝子発現系の開発が期待されている。

深在性 *Candida* 症は、深在性真菌症のなかで、最も多くみられる。特に、*C.albicans* は、その感染者数が多く、*Candida* 症はもとより深在性真菌症を代表する真菌として古くから研究が行われている。1980年代後半に開発されたazole系薬剤は、*C.albicans* に対して効果を示すことから、幅広く使われている。その結果、深在性真菌症全体に占める *C.albicans* の感染の症例の割合は、横ばい、地域によっては減少の傾向を示したが、これら薬剤の使用は、耐性を持つ真菌の感染や新興真菌症の増加を引き起こし、新たな問題となっている。*Candida* 症においては、*C.albicans* 以外の *Candida* 属の感染が急増し、結果として深在性 *Candida* 症の患者の数は増加している。なかでも *C.glabrata* は、既存の抗真菌剤、特に、azole系薬剤に対して耐性を示すため、その治療が完全ではない。そのため、*C.glabrata* の感染患者数は急増しており、さらに、この真菌の感染と免疫力の落ちている重度な入院患者の死因との関連が指摘されているため、その感染治療法の早期確立が待たれている。

こうした背景から、*C.glabrata* を新しい抗真菌薬開発の標的に選び、テトラサイクリン (TET) で制御可能な発現系を適応して、宿主体内でも制御可能な遺伝子発現制御系の構築を行った。この発現系では、TETリプレッサー (tetR) と転写因子の転写活性化領域からなる融合転写活性化因子と、TETオペレータ配列 (tetO) と基本プロモーターをつないだキメラプロモーター (TET応答性プロモーター) から構成されている。TET非存在下では融合転写

活性化因子が *tetO* に結合しているため、TET 応答性プロモーターが活性化され、その下流の遺伝子の発現が ON になる。逆に、TET 存在下では、融合転写活性化因子の *tetO* への結合が TET によって阻害されるため TET 応答性プロモーターの転写活性化が起こらず、結果として遺伝子発現が OFF になる。そのため、構築した遺伝子発現制御系は、真菌やその宿主となる動物に対して毒性が低い TET を、外部より加えるだけで転写制御ができた。この発現制御系を用いて、抗真菌薬開発に対して有力と考えられている標的分子のうち、DNA 複製や染色体分離に関与するトポイソメラーズ II (*TOP2*)、翻訳に関わるペプチド伸長因子 3 (*TEF3*)、ergosterol 合成に関わる squalene 合成酵素 (*ERG9*) について、抗真菌薬の標的分子として適しているか否かを評価した。その結果、*TEF3* や *TOP2* は宿主体内においても試験管内と同様生育に必要であり、*TEF3*、*TOP2* 遺伝子が抗真菌剤の標的分子として適していると考えられた。しかしながら、*ERG9* では、試験管内と異なり、宿主体内の生育に必要でないことから *C. glabrata* 感染治療薬の標的分子として適していないことが示唆された。また、*ERG9* がマウス体内の生育に必要でない理由が、血清より cholesterol を取り込み、同化することで、*ERG9* の機能抑制によって起こる ergosterol の枯渇を相補することが考えられた。このことは、ergosterol の枯渇を引き起こすような既知の薬剤が、深在性真菌症の治療に効果がないことをうまく説明している。

さらに、確立した遺伝子発現制御系を用いて、azole 系薬剤の標的分子である sterol 14 α -demethylase (*ERG11*) 遺伝子の発現抑制を行い、臨床問題になっている *C. glabrata* の azole 系薬剤に対する内在耐性について、その理由を考察した。*ERG11* 遺伝子の発現抑制による真菌への影響は azole 系薬剤添加による影響と同様であった。また、この発現抑制によって、異常 sterol が蓄積し、その結果、生育阻害が起こることが示された。しかしながら、生育阻害の度合いは大きくなく、azole 系薬剤に対して感受性が高い *C. albicans* で、観察される毒性の高い異常 sterol の蓄積とは異なっていた。これらのことから、*ERG11* は、*C. glabrata* 感染治療薬の作用点としては適さないことが予想され、*C. glabrata* に azole 系薬剤が効きにくい原因の 1 つが、*C. albicans* で見られるような毒性の高い sterol が蓄積されないことであると示唆された。ここで、*ERG11* 遺伝子の発現抑制による生育への影響は大きくないものの、ergosterol 枯渇が相補できる血清添加培地においても、その影響は観察され、生育速度が遅くなった。このことから、毒性の高い異常 sterol の蓄積を引き起こす薬剤の場合には、深在性真菌症に対する治療薬として有用であることが予想された。

このように、今回構築したテトラサイクリン応答性遺伝子発現制御系は、ある遺伝子が抗真菌剤の標的分子になるか否かを評価するのに適した手法であり、また、これを用いた研究から、分子標的を定めた創薬について新しい知見を得ることも可能であることが示された。

論文審査の結果の要旨

中山君は、深在性真菌症の増加が問題となっている昨今、新しい抗真菌薬の開発や評価に応用できる、病原性真菌に対する新しい遺伝子発現制御系の構築を行い、以下の知見を得た。

1. *C. albicans*、*C. glabrata* において、テトラサイクリン (TET) に応答する遺伝子発現系を構築し、これにより宿主体内の環境下で特定遺伝子の生育への効果を評価することを可能にした。
2. TET 応答性遺伝子発現系を用いて、*TEF3*、*TOP2*、*ERG9* が *C. glabrata* 感染治療薬の標的分子として適しているかを評価した結果、*TEF3*、*TOP2* 遺伝子は菌の宿主体内における生育に必須であり、治療薬の標的として適していることを明らかにした。一方、*ERG9* 遺伝子は試験管内の結果と異なり、宿主体内における生育に必要ではなく、*ERG9* 阻害剤は抗真菌剤として有効でないことを示した。
3. *ERG9* 発現抑制による生育阻害に対し、*C. glabrata* は外からコレステロールを取込みこれを補うことを明らかにしたことより、ergosterol の枯渇を引き起こす薬剤は *C. glabrata* 感染症には有効でないことを示した。
4. azole 系薬剤の標的分子である *ERG11* の発現抑制は、異常ステロールを蓄積することを示したが、*C. glabrata* ではこの毒性の強くない異常ステロールを利用でき、これが内在耐性の原因であることを明らかにした。また、毒性の高い異常ステロールの蓄積を誘導する薬剤は、深在性真菌症に対する治療薬として有効であることを示唆した。

以上の研究成果は、*C.albicans*、*C.glabrata*が感染した宿主体内において、生育阻害効果を示す真菌の標的遺伝子の探索を可能にし、また、この評価系を用いて今まで使用されている薬剤についての表在性と深在性に対する効き目の差異を説明することができた。今後、本研究成果に基づき有用な抗真菌薬が開発され、真菌症治療が大きく進むことが予想される。したがってこの成果は、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。