

氏名（本籍）	いし 井 ^{あきら} 晶（東京都）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第1087号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	イネいもち病菌を用いた薬剤標的分子解析法 によるロキシスロマイシンの真核生物にお ける作用点の探索

論文審査委員	（主査）教授 鎌倉 高志
	教授 菅原二三男 教授 松永 幸大
	教授 早川 洋一 教授 島田 浩章

論文内容の要旨

新規薬剤の開発は、リード化合物を天然物から単離する手法が主流であったが、有用なリード化合物は減少傾向にある。そこで、近年はヒトゲノムの解読やケミカルライブラリーの構築などによりコンピュータによる化合物のデザインや化合物の構造から標的を推定する等、新たな手法での創薬が広がりを見せている。これにより効率に医薬品の開発が進むことが期待されていたが、現在も新薬開発には莫大な費用が必要であり、開発は難航している。そこで、すでに医薬品として使用されており、安全性が確認できている既存の薬剤を利用した新薬の開発が注目されつつある。例えば、免疫抑制剤として使用されているシクロスポリンにC型肝炎抑制作用が見出され、シクロスポリンに似た構造のより抗C型肝炎抑制効果の高い薬剤が開発されている。他にも、リファンピシンは原核生物のRNA合成阻害作用が知られているが、作用点未同定の血管新生抑制作用等の抗癌作用も報告されている。このように、既存の薬剤に新たな薬効が発見される場合だけでなく、現在治療に用いられている薬の中にも作用機序が不明な有用な作用が存在している場合も少なくない。ヒトに対する治療薬だけでなく農薬等もヒトに対する副作用や環境負荷の少ないものが求められており、知見の多い既存薬の応用は有用であると考えられる。より効果の高い薬剤の開発や安全性の根拠にもなる作用機序の解明といった薬剤の研究開発に作用点の特定は重要な役割を担うことから、より効率の良い作用点解析手法の開発が必要とされている。本研究では、真菌であるイネいもち病菌に対する細胞分化抑制作用の指標とし、分子間相互作用解析系として非常に感度の高いファージディスプレイ法を薬剤の標的候補分子の探索に用いた。この手法は、1つの解析系で様々な化合物の解析ができ、イネいもち病菌に対する阻害効果を調べるため、真菌に対する新たな薬効を発見できる可能性がある。

また、これまでの手法では解析困難であった弱い結合まで解析できるという利点がある。

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) はイネに深刻な被害をもたらす植物病原菌であり、植物病原菌のモデル生物でもある。イネいもち病菌は、感染時に宿主体上で孢子 (分生子) から発芽管を伸長させ、その先に付着器と呼ばれるドーム状の器官を分化させることで植物体内に侵入する。この付着器形成は 1 細胞の比較的単純な細胞分化であり、付着器が形成される際に細胞分裂を伴う。細胞分化や細胞分裂には多くの遺伝子が関与しており、代謝異常や部分的な DNA 合成阻害など様々な要因でイネいもち病菌の付着器形成は阻害される。そのため、化合物が真核生物に対し生理活性作用を持つかということや付着器形成阻害効果を指標に調べることができる共に、付着器分化は感染特異的の器官であるため付着器分化阻害の標的が解析できれば抗いもち薬や抗真菌剤へ応用できると考えた。また、付着器形成は疎水性の人工固体基質上でも誘導できるため、比較的簡便に薬剤の影響を調べることができるという利点がある。そこでまず、既存の薬剤の新たな効用や真核生物に対する作用点の有無を解析することを目的に複数の化合物についてイネいもち病菌の付着器分化に対する作用を調べた。その結果、今回調べたマクロライド系抗生物質のほとんどで付着器分化阻害効果が見られた。その阻害効果は 14 員環のものでは比較的強く、16 員環のものでは弱いか効果がないという結果であった。これは抗炎症作用等真核生物で見られていたマクロライド系抗生物質における未解明の作用と傾向が一致していた。そのため、

イネいもち病菌における作用点だけではなく真核生物に共通する作用点が解析できる可能性が考えられた。今回調べたマクロライド系抗生物質の中で付着器分化抑制作用が強く、治療薬として使用されているロキシスロマイシン (RXM) に注目し、イネいもち病菌を用いて解析を行った。RXM は 14 員環マクロライド系抗生物質であり、原核生物のタンパク質合成阻害剤として知られる。一方で真核生物であるヒトやマウスなどにおいて炎症性サイトカインの抑制や血管新生抑制、消化管運動機能亢進作用といった作用が報告されている。しかし、真核生物に対しては、RXM がモチリンのアゴニストとして消化管運動機能亢進に関与する以外作用機序はほとんど解明されていない。今回、イネいもち病菌に対して付着器分化阻害という新たな作用が見出せた。この作用点を解析できれば抗いもち菌薬や抗真菌剤への応用やイネいもち病菌の付着器分化機構解明に貢献できると考えた。また、もし真核生物で共通の作用点を有しているなら新薬開発にも非常に有用であると考え、RXM の分子標的の探索を行った。

標的分子探索には T7 ファージディスプレイ法を用いた。ファージディスプレイ法はファージに DNA ライブラリーを導入し、外殻に様々なペプチドを提示させ、薬剤などと結合したファージを選抜、増幅させることで特定の分子と相互作用するペプチドを検出する方法である。そのため、1 分子のファージからでも大腸菌を用いて増幅させることができるため非常に感度に優れている。さらに、イネいもち病菌はゲノム内に非コード領域が少ないため、cDNA の代わりにゲノム断片をライブラリーとして使用することができた。ゲノムライブラリーは、すべての遺伝子がほぼ偏りなく含まれているため、cDNA を用いる際問題となる特定の時期にのみ発現している遺伝子や発現量の少ない遺伝子も解析できるという利点がある。T7 ファージディスプレイ法による解析により、RXM の標的候補タンパク質として、いもち病菌機能未知タンパク質や DNA ポリメラーゼなど 4 つの候補分子が得られた。その中の 1 つに真核生物で広く保存されている CDC27 のホモログと推定された遺伝子 *PoCDC27* があった。*PoCdc27* について機能解析は行われていなかったが、ヒトや酵母などにおいて CDC27 は有糸分裂後期のチェックポイントを担っているユビキチンリガーゼ anaphase promoting complex (APC) を構成するサブユニットの 1 つとして

知られている。イネいもち病菌において *PoCDC27* の発現量を RT-PCR により解析したところ、付着器形成時に強く発現していることが分かった。RXM は付着器形成を抑制したことから標的分子は付着器形成時に発現していることが考えられ、さらに付着器分化には細胞分裂が関与することから *PoCdc27* はイネいもち病菌における RXM の標的分子として期待できた。

RXM がイネいもち病菌において *PoCdc27* の機能を阻害しているならば、*PoCDC27* 遺伝子破壊株では RXM 未添加でも付着器分化が抑制され、過剰発現株では RXM の作用が緩和されると仮定し *PoCDC27* の各変異株を作成し、解析を行った。2 回相同組換えによる遺伝子破壊を行ったが、候補株を 400 株解析しても完全な破壊株を得ることはできなかった。多くの生物で *CDC27* を含む APC の構成サブユニットは生育に必須であるという知見もあり、*PoCdc27* はイネいもち病菌の生育に必須である可能性があった。しかし、遺伝子の上位領域が組換えにより変化し、付着器分化時に *PoCDC27* の発現量が野生株に比べ低下したノックダウン株が得られた。このノックダウン株では RXM を添加しても付着器形成能は低下せず、RXM に対する感受性が低下していた。さらに過剰発現プロモーターの下流に *PoCDC27* をつないだベクターを作成し、野生株に導入することで過剰発現株を作成した。この過剰発現株では野生株と比較して、付着器形成能や菌糸成長、RXM の感受性いずれにおいても明確な差は観察されなかった。これらの結果から RXM の作用について *PoCdc27* が関与しているが、予想とは異なり *PoCdc27* の機能を阻害しているのではないということが示唆された。さらなる解析のため、*PoCDC27* の発現量が低下した変異株に過剰発現ベクターを導入し、*PoCDC27* 相補株を作成した。相補株に RXM を作用させたところ、野生株と同程度の感受性を示した。以上の結果から、RXM の付着器分化阻害作用には *PoCdc27* の存在が必要であることが示唆された。この場合、RXM の作用モデルとしては *PoCdc27* と複合体を形成することで他の因子に作用し、付着器分化を抑制したのではないかと考えられた。

本研究ではイネいもち病菌における RXM の標的探索を行いヒトにまで広く保存されている *CDC27* と相同性の高い *PoCdc27* を RXM の標的として見出したが、ヒト *CDC27* が RXM の標的分子であるか解析を行うことはできなかった。ヒトにおいても *CDC27* が RXM の標的分子であれば、RXM の作用機序解明や新薬への応用に貢献できる可能性がある。本研究で用いた手法は、イネいもち病菌の分化に影響を与える生理活性物質に広く応用可能であり、これまで解析困難であった副作用のような弱い作用の解析が可能である。さらに今回解析した RXM のように薬剤がタンパク質の機能を阻害するものでない場合も作用点特定につながり得る。そのため、様々な化合物に対し、網羅的に解析を進めることでイネいもち病菌や真菌全体に対する新たな薬効や真核生物における未解明の作用点を解明できるかもしれない。

論文審査の結果の要旨

新規薬剤の開発は、植物や微生物などから天然のリード化合物をスクリーニングによって見出す手法が長年主流であったが、有用な化合物の発見は年々困難になっている。近年はゲノム情報やケミカルライブラリーを利用した網羅的な化合物標的の探索や、化合物のデザインによる新たな手法での創薬に注力されている。こちらの方法も、現状では当初期

待されたまでの成果が得られておらず、新薬の開発は依然として容易ではない。そこで、すでに医薬品として使用されており、安全性が確認できている既存の薬剤を利用した新薬の開発が注目されつつある。実際に、現在治療に用いられている薬の中から新たな薬効が発見される場合は少なくない。ヒトに対する治療薬だけでなく農薬等にもヒトなど他の動物に対する有害性や環境負荷の少ないものが求められており、知見の多い既存薬の応用は有用である。これらの既存薬の新たな薬効については、その作用機作が明らかになっていないものも多い。薬剤の作用機序の解明はより効果の高い薬剤の開発や安全性の根拠にもなる重要な情報であり、優れた作用点解析手法の開発が必要とされている。本研究では、真菌であるイネいもち病菌に対する細胞分化抑制作用を薬剤作用の指標とし、分子間相互作用解析系として非常に感度の高いファージディスプレイ法を薬剤の標的候補分子の探索に用いた。この手法は、多くの遺伝子が関与している細胞分裂を伴う細胞分化の現象を利用した1つの解析系で様々な化合物の解析ができ、イネいもち病菌に対する阻害効果を調べるため、真核生物に対する新たな薬効を発見できる可能性がある。

まず、既存の薬剤の新たな効用や真核生物に対する作用点の有無を解析することを目的に複数の化合物についてイネいもち病菌の付着器分化に対する作用を調べた。その結果、14員環マクロライドに強い付着器分化阻害活性が見られたが、この作用は抗炎症作用等真核生物で見られていたマクロライド系抗生物質における未解明の作用と傾向が一致していたため、真核生物に共通する作用点が解析できる可能性が考えられた。マクロライド系抗生物質の中で付着器分化抑制作用が強く、実際に治療薬として使用されているロキシシロマイシン (RXM) に注目し、イネいもち病菌を用いて解析を行った。RXM は原核生物のタンパク質合成阻害剤として知られるが、真核生物に対する作用は、この作用機作では説明ができないことから、この作用点の解明には興味が持たれ、その作用点は薬剤の分子標的としても有望である可能性が考えられたため RXM の分子標的探索を行った。

ファージディスプレイ法はファージに DNA ライブラリーを導入し、外殻に様々なペプチドを提示させ、薬剤などと結合したファージを選抜、増幅させることで特定の分子と相互作用するペプチドを検出する方法である。通常の本手法では、DNA ライブラリーとして cDNA ライブラリーか、合成ランダム DNA 断片を用いるのであるが、本研究では真菌ゲノムがコンパクトな構造をしており、全塩基配列の 50%程度にコード領域を持っていることを利用して、ゲノムライブラリーを用いた。ゲノムライブラリーは、すべての遺伝子がほぼ偏りなく含まれているため、cDNA を用いる際問題となる発現時期が不明の遺伝子や発現量の極めて少ない遺伝子もそれらの問題を考慮しないで解析できるという利点がある。この解析により、RXM の標的候補タンパク質として PoCdc27 が得られた。PoCdc27 について機能解析は行われていなかったが、ヒトや酵母などにおいてそのオルソログと思われる CDC27 は有糸分裂後期のチェックポイントを担っているユビキチンリガーゼ anaphase promoting complex (APC) を構成するサブユニットの 1 つとして知られている。RXM は付着器形成を抑制したことから標的分子は付着器形成時に発現していることが考えられ、さらに付着器分化には細胞分裂が関与することから PoCdc27 はイネいもち病菌における RXM の標的分子として期待できた。

PoCdc27 のノックダウン株が得られ、同過剰発現株との形質を比較したところ、RXM はイネいもち病菌において PoCdc27 の機能を阻害して作用しているのではなく、RXM が

PoCdc27 と複合体を形成し、その複合体が他の因子に作用し、付着器分化を抑制したのではないかということが強く示唆された。このような作用機序の薬剤は、ファンクショナルゲノミクスを用いた網羅的解析では見いだすことができないことから、本手法の有効性が示されたのではないかと考えている。

上記の結果と推論は、真菌の分化を利用した薬剤作用点解析系の有効性を示しており、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。