

[研究論文]

Saccharomyces cerevisiae を用いた小胞輸送阻害物質 探索系の構築と生薬スクリーニング

小山菜穂¹・飯田泰広^{1,2}

1 博士前期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

2 応用バイオ科学科

Development of a novel evaluation system of tip growth for antifungal compounds with use of *S. cerevisiae* and application of the system for the screening in herbal medicine.

Naho KOYAMA¹, Yasuhiro IIDA^{1,2}

Abstract

The infection by fungus such as yeast or mold is called mycoses. Among mycoses, deep mycoses are most likely to have more severe symptoms. To cure those deep mycoses, antifungal agents is used as a chemotherapy. However, the number of antifungal agents which can be used for treatment are only 4 classes 11 types. In addition, side effects and the appearance of resistant fungi have been confirmed for these drugs. Therefore, it is necessary to develop an antifungal agent different from the conventional antifungal agent.

Thus, we focused on a tip growth, which is a unique growth system of fungi. Tip growth is a method of growth by repeating the decomposition and the resynthesis of the cell wall. It has been reported that the cell wall-degrading enzyme β -1,3-D-Glucanase (*BGL2*) involved in this tip growth is vesicular transported from the inside of the cell to the growth point.

We consider that targeting vesicle transport during tip growth will provide selective toxicity to fungi.

The purpose of this study is to develop novel antifungal agents targeting vesicle transport of fungal tip growth. Therefore, we constructed an evaluation system for visualizing vesicle transport using *Saccharomyces cerevisiae*.

This evaluation system can visualize the vesicle transport of *BGL2* during tip growth by fusion of the green fluorescent protein (*EmGFP*) to *BGL2*. The constructed tip growth evaluation systems were applied to search for vesicle transport inhibitor in herbal medicine. As a result, vesicle transport inhibitory activity was observed in 8 Kinds of herbal medicine extract.

Keyword : antifungal agent, drug screening, tip growth

1. はじめに

酵母やカビなどをはじめとする真菌は自然界に広く生育している。更にヒトの皮膚などにも常在菌として存在している。しかし、一部の真菌は免疫力が低下したヒトに対して、日和見感染し真菌症を引き起こす原因になり得る。真菌症の主な原因菌としては、*Aspergillus* 属、*Candida* 属、*Cryptococcus* 属等が挙げられる¹⁾。真菌症は病原性真菌の

感染部位によって分類される。皮膚の表面や爪などに感染する表在性真菌症、皮膚表面にできた傷などを介して組織に感染する深部皮膚真菌症、肺や肝臓などの臓器や組織に感染する深在性真菌症の3つに分類される²⁾。これらの真菌症の中でも深在性真菌症は、症状が重篤化しやすく、直接の死因に繋がる場合もある³⁾。この深在性真菌症は1989年(4.5%)から1994年(3.2%)にかけて減少傾向にあったが、2001年(4.4%)以降、再び増加傾向にある。また近年では、

悪性腫瘍や白血病、臓器移植の治療に伴う免疫抑制剤の使用により免疫力が低下した患者や、AIDS(Acquired Immunodeficiency Syndrome)などの免疫不全患者に尿酸正真菌が日和見感染することにより、深在性真菌症を発症するケースが増加しており、大きな問題となっている⁴⁾。

深在性真菌症の治療は主に抗真菌剤を用いた化学療法が行われている^{5,6)}。しかし、臨床で使用することが可能な抗真菌剤は4クラス11種類(細胞膜合成阻害を引き起こすアゾール系、核酸合成阻害を引き起こすピリミジン系、細胞膜障害を引き起こすポリエン系、細胞壁合成阻害を引き起こすキャンディン系)のみであるため、薬剤の種類が少なく治療の選択肢が限られてしまう^{7,8)}。更に、これらの薬剤にはヒトへの副作用や薬剤耐性真菌の出現⁹⁻¹¹⁾が報告されており、深在性真菌症の治療法は未だに確立していない状況となっている。深在性真菌症の治療法を確立するためには、新たな作用機作の抗真菌剤を開発し、治療の選択肢を増やすことが重要となる。

深在性真菌症の治療法を確立するために、新たな抗真菌剤開発のための研究は多く行われているが、真菌とヒトは細胞構造が類似していることから、真菌に特異的に作用し、副作用の小さい薬剤を開発することが難しいのが現状である¹²⁾。新規の作用機作の抗真菌剤開発のための研究は、そのほとんどが有効成分を病原性真菌に添加し、該当成分の抗真菌活性を評価している。この評価法では、抗真菌活性物質を探索することは可能だが、既存の抗真菌剤と同様の作用機作やヒトに対して副作用が大きい物質を選択する可能性が高く、実際に抗真菌剤開発に繋がらないケースが多い。そこで本研究ではあらかじめ作用点を絞って物質を選択することのできる評価系の構築を目指している。作用点を真菌に特異的に作用するターゲットに絞りスクリーニングを行うことで、副作用が小さく、新しい作用機作の抗真菌活性物質を探索することが可能になり、抗真菌剤の開発に繋がりがやすくなると考えている。

本研究では、真菌に特異的な成長方法である先端成長に着目した。先端成長は、細胞壁の一点を成長点として、①細胞壁分解酵素による細胞壁の分解、②膨圧による細胞の伸長、③細胞壁合成酵素による細胞壁の再合成、この3つのステップを繰り返すことで細胞を伸長する成長方法である¹³⁾。この真菌のみで起きる先端成長の抑制をターゲットとすることで、真菌特異的に作用させることができると考えられる。先行研究において、酵母内で細胞壁分解酵素 *BGL2* を過剰発現させ、細胞壁を脆弱化させることによって既存の抗真菌剤であるアンホテリシン B(AmB)と Miconazole (MCZ)の作用を増強させることを明らかにしている¹⁴⁾。これは、*BGL2* の過剰発現により細胞壁が脆弱になっている状態で細胞膜に損傷を与える AmB や細胞膜合成を阻害する MCZ の作用が加わることにより膨圧に耐えられなくなり、当該薬剤への感受性が向上したためとされている。このことから、先端成長が新規抗真菌剤のターゲットになり得ると考えた。そこで著者らは、先端成長に関与している小胞輸送を阻害する物質を見出すことで、真

菌の先端成長を抑制でき、真菌特異的に作用する新しい薬剤の開発に繋がると考えた。

この先端成長に関与する、細胞壁分解酵素 β -1,3-D-glucanase(*BGL2*)は細胞質内から成長点である細胞壁まで小胞輸送によって運ばれることが報告されている。この *BGL2* の小胞輸送を指標とすることで、先端成長に関与する小胞輸送を阻害する物質を見出すことが可能になると考えている。

本研究では、先端成長に関与する細胞壁分解酵素 *BGL2* に緑色蛍光タンパク質 *EmGFP* を付加することで先端成長中の *BGL2* の小胞輸送を可視化できる評価系を構築した。その後、構築した評価系を用いて、生薬スクリーニングを行い小胞輸送を阻害する生薬抽出物の探索を行った。これによって、新たな作用機作の抗真菌剤の開発に繋がることが期待できる。

2. 実験

2.1 材料及び装置

本実験で用いた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 株と大腸菌・出芽酵母バイナリーベクター pYES2 は Invitrogen Inc.より購入した。DNA の切断に用いた制限酵素 Xho I 及び EcoRI、ベクターの構築に使用した In-Fusion HD Cloning Kit、PCR の際の TaKaRa Taq™ Hot Start Version は TaKaRa Bio Inc.より購入した。核酸の精製に用いた QIAquick Gel Extraction Kit は QIAGEN K.K. (Tokyo Japan)より購入した。DNA の電気泳動に用いたアガロース、LB 培地 Miller、LB 寒天培地 Miler、ガラクトース、ラフィノース、アミノ酸、AmB は NACALAI TESQUE, INC. (Kyoto Japan)より購入した。Bacto Peptone 及び Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid, Bact™ Yeast Extract (Extract of Autolysed Yeast cells)は Becton, Dickinson and company Difco から購入した。D-グルコースは Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka Japan)から購入した。D-Sorbitol は KANTO CHEMICAL CO.,INC. から、Competent cell *E. coli* DH5 α は Cosmo Bio Co., Ltd.からそれぞれ購入した。ミカファンギンナトリウム(MCFG)は Astellas Pharma Inc., 5-フルシトシン(5-FC)と MCZ は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., ジメチルスルホキシドと Nocodazole、は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, DAPI は Funakoshi Co., Ltd. から購入した。生薬スクリーニングに使用した生薬は Tochimoto Tenkaido Co., Ltd.から購入した。その他の試薬は、特級および生化学グレードで購入し使用した。電気泳動後のサンプルはゲル撮影装置 ChemiDocXRS (BioRAD)にて分析した。核酸の精製及び集菌に用いた遠心機は LC-100 (TOMY DIGITAL BIOLOGY CO., LTD. Tokyo Japan)をそれぞれ用いた。エレクトロポレーションには Bio-Rad Laboratories, Inc.の MicroPulser™ と Gene Pulser® Cuvette を用いた。酵母の培養には TOKYO RIKAKIKAI CO, LTD の LTI-400E を用いた。*EmGFP* の発

現確認には Olympus Corporation の Confocal laser scanning microscope (FV1000D IX81) と Fluorescent Microscope (CKX 41) を用いた。

2.2 小胞輸送観察のためのベクター構築

研究室が保有する pYES2 に *BGL2* が導入された pYES2-*BGL2* を保有する *E. coli* DH5 α からアルカリミニプレップ法を用いて pYES2-*BGL2* のプラスミド抽出を行った。次に pYES2-*BGL2* 上の *BGL2* の終止コドン を削除するために Inverse PCR を行った。反応条件は、94 °C 1min (初期熱変性)、94 °C 30 sec (増幅：熱変性)、50 °C 30 sec (増幅：アニーリング)、72 °C 7 min30 sec (増幅：伸長反応)、72 °C 2 min (最終伸長反応)、4 °C (保存) で増幅反応を 30 サイクルで行った。プライマーは Fw : AATTCTGCAGATATCCATCACACTG, Rv : ACTTTTCAGTGTTCAGGTTCTC を用いた。更に終止コドンを取り除いた pYES2-*BGL2* の C 末端に EcoR I の認識配列(5'-GAATTC-3') を、*BGL2* の C 末端に EcoR I 配列をそれぞれ PCR で付加した。プライマーは Fw : AATTCTGCAGATATCCATCACACTG, Rv : GCA GAATTCTGA AAAGTCACA GTCCAAGG を用いた。その後、EcoR I の配列が正しく挿入されていることを確認するために DNA シークエンス法を用いて配列の解析を行った。DNA シークエンスにはプライマー Fw : CTGGTAAGCAAGTCGGTACTG を用いた。

次に、In-fusion 法を用いて pYES2-*BGL2* に *EmGFP* 配列を導入した。*EmGFP* 配列にベクターと相補的な配列を付加するために pGLO を鋳型として PCR を行った。アニーリング温度を 61 °C、伸長時間 2 min で反応を行った。またプライマーは Fw : GACTGTGACTTTTCAATGGCTAGCAAAG, Rv : GATATCTGCAGAATTTTCTTTGTAGAGCTC を用いた。In-fusion 反応は PCR チューブに pYES2-*BGL2* (15.1 ng/ μ L) 13.0 μ L, In-Fusion 用 *EmGFP* (15.9 ng/ μ L) 3.0 μ L, 5 \times In-Fusion HD Enzyme remix 4.0 μ L を加え、50 °C, 15 min で行った。In-fusion 反応後の pYES2-*BGL2-EmGFP* をコンピテントセル(*E. coli* DH5 α)へヒートショック法を用いて形質転換した。得られた形質転換体より、プラスミドを抽出し、制限酵素処理(Xho I 37 °C, overnight)を行い、アガロース電気泳動にて pYES2-*BGL2-EmGFP* が構築できていることを確認した。更に DNA シークエンス法を用いて配列の確認を行った。

2.3 形質転換体 *S. cerevisiae* の作製及び *BGL2-EmGFP* の発現確認

S. cerevisiae INVSc1 を YPD 液体培地 5 mL に植菌し一晩培養した。培養液を 4 °C, 3000 \times g で集菌後、上清を破棄し、1 M ソルビトール溶液を加え懸濁し、3000 \times g, 5 min, 4 °C で洗浄した。この洗浄ステップを 3 回繰り返した。洗浄後、氷上で冷やした 1 M ソルビトール溶液を 1.0 mL 加え、マイクロチューブへ移し集菌した。40 μ L の 1M ソルビトールを加え懸濁し菌懸濁液を作製した。菌懸濁液にプラスミド DNA (100 ng) を加え攪拌し、冷却した

エレクトロポレーション用キュベットに全量に移した、エレクトロポレーション (Preset conditions: 1.50 kV,

1 pulse) を行った。その後、360 μ L の 1 M ソルビトール溶液を加え、選択培地 SC-ura2%ラフィノース培地に塗布し、コロニーが形成されるまで培養した。

得られたコロニーより、コロニー PCR を行い、目的のベクターを保持した形質転換が得られたことを確認した。

得られた形質転換体を選択培地 SC-ura2%ラフィノース培地で一晩前培養した後、誘導培地 SC-ura 2%ガラクトース/1%ラフィノース培地で 16 時間誘導培養を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて *BGL2-EmGFP* が発現していることを確認した。

2.4 最小発育阻止濃度 (MIC) 試験及び既存薬剤添加時の蛍光局在観察

MIC 試験を行うために pYES2-*BGL2-EmGFP* ベクターを保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を SC-ura2%ラフィノース培地 5 mL に植菌し 21 時間、30 °C で振とう培養した。SC-ura2%ラフィノース培地 40 mL に前培養液 400 μ L 植菌し 40 時間、30 °C で振とう培養し、本培養液を作製した。その後、血球計算版を用いて菌数 2.0×10^6 cells/mL に調製した。各抗真菌薬の微量希釈系列の作成するために 96 well プレートのレーン 1 からレーン 11 に SC-ura2%ラフィノース液体培地を 50 μ L ずつ分注した。コントロールとして、レーン 12 には 100 μ L 分注した。各濃度に揃えられた 4 種類の抗真菌薬(MCFG:32 μ g/mL, AmB:256 μ g/mL, 5-FC:256 μ g/mL, MCZ: 2048 μ g/mL)をレーン 1 に添加し、ピペティング後、50 μ L をレーン 2 に移した。同様の操作を 11 レーンまで行い、2 倍希釈系列を作成した。抗真菌剤の 2 倍希釈系列を作成した 96 well プレートのレーン 1 からレーン 11 の各 well に真菌における MIC 試験で一般的に用いられる菌数(終濃度 1.0×10^6 cells/mL)になるように菌液を 50 μ L を添加した。このプレートを 27 °C で一晩培養し、MIC を決定した。

また、各抗真菌薬の MIC の 2 分の 1 の濃度における小胞輸送の阻害を観察するために、菌液 100 μ L をマイクロチューブに回収し、集菌した。SC-ura2%ガラクトース/1%ラフィノース培地 100 μ L を加え懸濁し、2 時間、30 °C で培養し、顕微鏡観察を行った。

小胞輸送阻害物質であるノコダゾール添加時の *BGL2-EmGFP* の局在を観察するために菌数 1.0×10^6 cells/mL の菌液 1 mL を試験管に加え、終濃度 5 μ g/mL になるように DMSO で溶解したノコダゾール溶液(500 μ g/mL)を 10 μ L 添加し 5 時間、30 °C で振とう培養した。培養後、上清を廃棄した後、SC-ura2%ガラクトース/1%ラフィノース培地 1 mL を加え、2 時間、30 °C で培養し、蛍光顕微鏡を用いて *BGL2-EmGFP* の局在を観察した。

2.5 スクリーニング条件の検討

pYES2-*BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を SC-ura2%ラフィノース培地 5 mL で 21 時間、30 °C で

振とう培養した。その後、SC-ura2%ラフィノース培地 40 mL に前培養液 400 μ L を加えこれを 40 時間、30 $^{\circ}$ C で振とう培養した。次に血球計算版を用いて、菌数 1.0×10^6 cells/mL, 2.0×10^7 cells/mL に調整した。各濃度の菌液を試験管に 5 mL 加え、ノコダゾールを終濃度 5 μ g/mL になるように添加し、1, 2, 3, 4, 5 時間培養した。その後、SC-ura2%ガラクトース/1%ラフィノース培地に置換し、2 時間誘導培養した。誘導培養後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて出芽している酵母のうち出芽点や分裂部に *EmGFP* が局在している個体の数割合(出芽率)を算出した。

2.6 生薬スクリーニング

pYES2-*BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を S SC-ura2%ラフィノース培地 5 mL に懸濁し 21 時間、30 $^{\circ}$ C で振とう培養した。その後、SC-ura2%ラフィノース培地 40 mL に前培養液 400 μ L 加えこれを 40 時間、30 $^{\circ}$ C で振とう培養した。その後、血球計算版を用いて菌数 2.0×10^7 cells/mL に調整した。

スクリーニングに使用する生薬は、本研究室が保有している 100 種類の生薬をそれぞれ 5 mg 電子天秤で計量し、マイクロチューブに入れ、DMSO 100 μ L で溶解し、生薬抽出物を調製した。溶解しにくい生薬は、氷水をいれた超音波器を用いて破碎し、溶解した。

24 ウェルプレートに 2.0×10^7 cells/ml の菌液 1 mL を入れ、生薬抽出物 2 μ L (終濃度 100 μ g/mL) を添加した。24 ウェルプレートのサンプルをウェルシェイカーにて 30 $^{\circ}$ C、300 rpm で 5 時間培養した。その後 SC-ura2%ガラクトース/1%ラフィノース培地に置換した後、生薬抽出物 2 μ L (終濃度 100 μ g/mL) を添加し、30 $^{\circ}$ C で 2 時間誘導培養した。その後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、*BGL2-EmGFP* の局在を評価した。

3. 結果及び考察

3.1 小胞輸送観察のためのベクター構築

In-fusion 反応により、得られた pYES2-*BGL2-EmGFP* を大腸菌 DH5 α 株に形質転換後、プラスミド抽出を行い、DNA シークエンス法を用いて目的のベクターが構築できていることを確認した。その結果、予想される配列と 100% 一致し、目的のベクターが構築できたことを確認した。

3.2 形質転換体 *S. cerevisiae* の作製及び *BGL2-EmGFP* の発現確認

3.1 の実験により得られた pYES2-*BGL2-EmGFP* を酢酸リチウム法をもちいて *S. cerevisiae* INVSc1 に形質転換を行った。*S. cerevisiae* INVSc1 は、ウラシル栄養要求株であるためウラシル非存在下では生育できない。そのためウラシル合成酵素をコードする pYES2 が形質転換されることでウラシル非存在下で生育が可能となり、セレクションをかけることができる。形質転換の結果 SC-Ura 培地(ウラシル非存在下)にて、コロニーを得ることができた。

得られた形質転換体 pYES2-*BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株が正常に機能することを確認するために、形質転換体をガラクトース存在下で誘導培養し、*BGL2-EmGFP* の発現確認を共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った(Fig. 1)。形質転換体を誘導培養し蛍光顕微鏡で観察を行った結果、*S. cerevisiae* INVSc1 内で *BGL2-EmGFP* が発現していることを確認することができ、pYES2-*BGL2-EmGFP* が正常に機能していることが分かった。

3.3 MIC 試験及び既存薬剤添加時の蛍光局在観察

pYES2-*BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株に対する既存の抗真菌薬の MIC を決定するために、既存の抗真菌薬 4 種類をそれぞれ添加し MIC 試験を行った。その結果、得られた MIC は、AmB では 1.0 μ L/mL, MCZ では 32 μ g/mL, MCFG では 0.175 μ g/mL, 5-FC では 4 μ g/mL であった。

次に、既存の抗真菌剤添加時の蛍光局在を観察するために、得られた MIC の 2 分の 1 の濃度の抗真菌剤を pYES2-*BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株に添加し、蛍光顕微鏡観察を行った(Fig. 2)。コントロールである薬剤を添加していない *S. cerevisiae* では、*EmGFP* が先端部や分裂部に局在している酵母が多く、出芽している個体のうち先端部や分裂部に *BGL2Em-GFP* の局在率は 89.8%を示した[Fig. 2(a)]。また、既存の抗真菌剤を添加した酵母においても、薬剤の作用で形態変化などは見られたが、コントロールと同様に先端部や分裂部に蛍光の局在がみられた

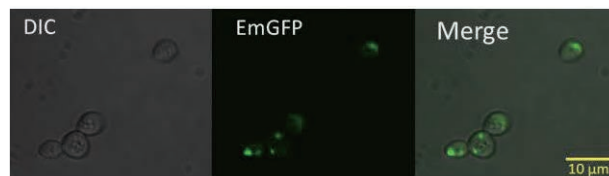


Fig. 1 Expression of *BGL2-EmGFP* novel evaluation system of tip growth

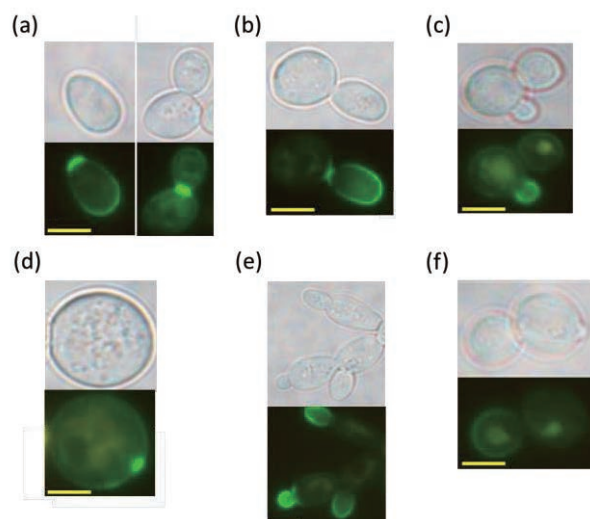


Fig. 2 Changes in the localization of *BGL2-GFP* due to the addition of existing antifungal agents.

(a)Control (b)AmB (c)MCZ (d)MCFG (e)5-FC (f) Nocodazole. Scale bar = 5 μ m.

[Fig. 2(b-e)]. これは *BGL2-EmGFP* の小胞輸送が問題なく行われていることを示している。一方で、小胞輸送阻害剤であるノコダゾールを添加した場合、先端部や分裂部に蛍光の局在している個体は非常に少なく局在率は 21.5%であった[Fig. 2(f)]. 以上の結果より、既存の 4 種類の抗真菌剤は、作用点が細胞壁や細胞膜、核酸の合成阻害であるため、小胞輸送は阻害されず *BGL2-EmGFP* が局在する表現型が得られたと考えている。一方で小胞輸送を阻害するノコダゾールにおいては、*BGL2-EmGFP* が先端部や分裂部に蛍光が局在しない表現型を得られたと考えている。以上の結果より、*BGL2-EmGFP* の小胞輸送が阻害された場合のみで、*EmGFP* の局在の変化が確認できることが明らかになった。よって、この評価系を用いることで細胞壁分解酵素の小胞輸送を標的に、*BGL2-EmGFP* の局在の有無でスクリーニングが行えることが示唆された。

3.4 スクリーニング条件の検討

局在率を定量するにあたり、出芽状態の数が多いタイミングと薬剤処理をしてから、その効果が現れる時間の検討を行った。まず、菌数 1.0×10^6 cells/mL, 2.0×10^7 cells/mL の条件でノコダゾールを終濃度 $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように添加、5 時間培養した。1 時間毎にランダムに 3 か所を観察し、出芽している細胞のうち *BGL2-EmGFP* が局在している細胞の割合(局在率)を算出した(Fig. 3)。その結果、菌数 1.0×10^6 cells/mL の条件では、全ての時間で、高い局在率を示した。これは、 1.0×10^6 cells/mL では出芽している状態の細胞が少なかつたため、正確な局在率を算出することができなかつたためであると考えられる。

菌数 2.0×10^7 cells/mL では 1 から 4 時間培養したものでは、蛍光が局在している細胞が多く、高い局在率が得られた。これらは、培養 4 時間では G2/M 期に到達しないために、小胞輸送が停止されない可能性が示唆された。一方で、菌数 2.0×10^7 cells/mL で 5 時間培養したものでは、酵母が細胞分裂直前の形態で停止しており、蛍光が局在している個体が少ないことが分かった。以上よりノコダゾール添加後、5 時間培養を行うことで、小胞輸送が阻害されることが示唆された。また、ノコダゾールを添加しない条件で培養した酵母では、5 時間培養しても高い局在率が得られ、正常に生育していた(Fig. 3 5h cont.)。

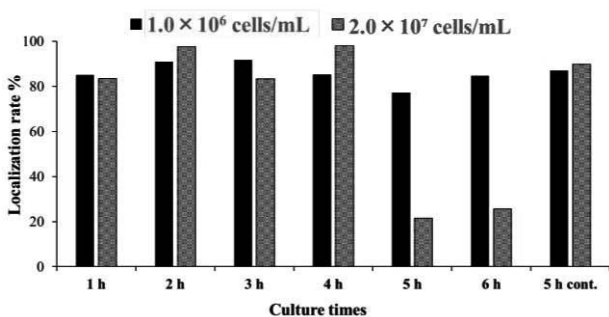


Fig. 3 Examination of screening conditions for pYES2-BGL2-GFP in *S. cerevisiae* INVSc1

以上の結果より、 1.0×10^6 cells/mL では菌数が少なく、 2.0×10^7 cells/mLの方がスクリーニング条件に適していると考えた。よって、スクリーニングの条件を菌数 2.0×10^7 cells/mL、培養時間 5 時間で行うこととした。また、ポジティブコントロールとして終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のノコダゾールを添加することとした。

3.5 生薬スクリーニング

pYES2-BGL2-EmGFPを保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を用いて生薬スクリーニングを行った。生薬抽出物中より、小胞輸送を阻害する物質を見出すために、100 種類の生薬抽出物をそれぞれ終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、蛍光顕微鏡を用いて *BGL2-EmGFP* の局在を観察し、局在率を算出した(Fig. 4)。その結果、局在率が 30%未満であった生薬が 9 種、30%以上 70%未満を示した生薬が 8 種、

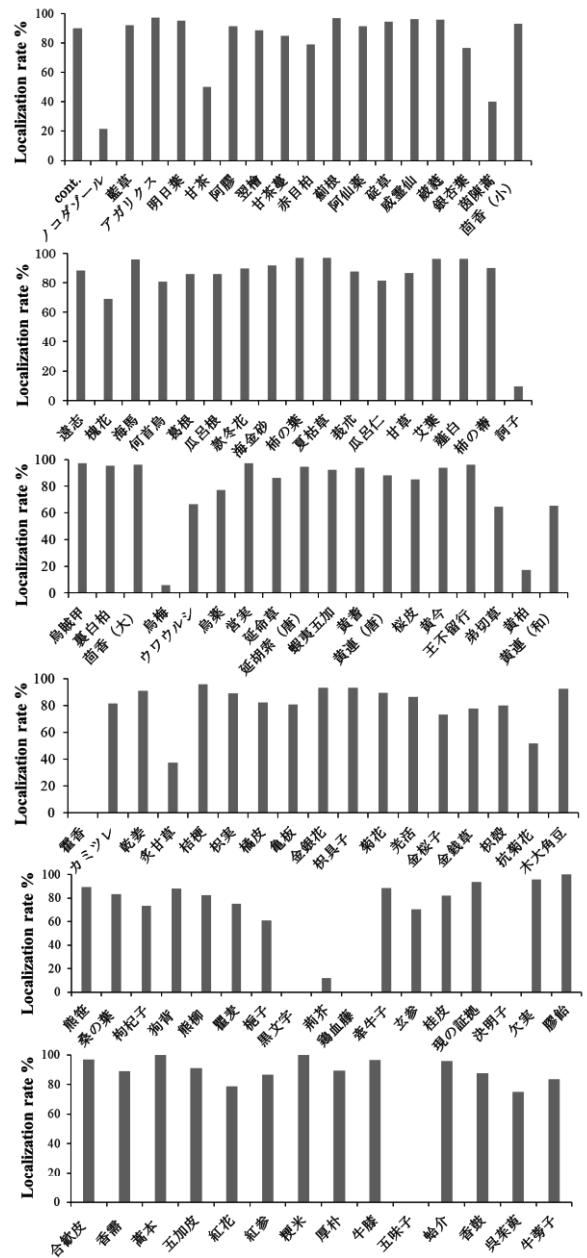


Fig. 4 Results of herbal medicine screening using pYES2-BGL2-GFP in *S. cerevisiae* INVSc1

70%以上を示した 82 種、計測不能(生育阻害)が 1 種であった。

100 種類の生薬スクリーニングの結果で示したように、ネガティブコントロールであるノコダゾールの局在率は約 20%であった。誤差が約 10%と見込んで、局在率が 30%未満を示した生薬 9 種類(烏梅、黄柏、訶子、藿香、黒文字、荊芥、鶏血藤、決明子、五味子)を同条件で 3 回実験を行い再現性の確認を行った。その結果、*BGL2-EmGFP* の局在率が 30%未満を示したのは、烏梅、訶子、藿香、黒文字、荊芥、鶏血藤、決明子、五味子の 8 種類であった。

以上の結果より、*pYES2-BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を用いた *BGL2* の小胞輸送を指標とした小胞輸送阻害評価を行った結果、烏梅、訶子、藿香、黒文字、荊芥、鶏血藤、決明子、五味子の 8 種類の生薬抽出物中に小胞輸送を阻害する可能性のある物質が含まれていることが示唆された。

4. 結論

細胞壁分解酵素 *BGL2* の小胞輸送を標的とした小胞輸送阻害物質評価系である *pYES2-BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を構築することができた。この評価系では細胞壁分解酵素の小胞輸送を標的に、蛍光の局在の有無でスクリーニングが行えるため、スクリーニングの段階で小胞輸送を阻害する物質のみを探索することが可能となる。従来の抗真菌剤の開発研究で行われているスクリーニングでは、そのほとんどが、効果があることが示唆された物質を病原性真菌に添加することで抗真菌活性の有無を調べた後に、抗真菌活性を有する物質がどこに作用しているかを調べている。このようなスクリーニングでは、既存の抗真菌剤と同じ作用機作の物質や、ヒトに対して副作用が大きい物質を探してしまう可能性が高くなる。一方で、本研究で構築した評価系では従来の作用機作とは異なる、またヒトには無い小胞輸送を阻害する物質を見出すことが可能となるため、ヒトへの副作用が出にくいまたは小さく抗真菌剤になり得る物質を探索することが可能となる。

また、*pYES2-BGL2-EmGFP* を保有する *S. cerevisiae* INVSc1 株を用いてスクリーニングの条件の確立し小胞輸送阻害物質探索系を構築することができた。さらに、この評価系を用いて 100 種類の生薬スクリーニングを行った結果、8 種類の生薬で先端成長に關与する小胞輸送を阻害する可能性を示した。この 8 種類の生薬から成分を分離し、抗真菌活性物質を調べることで、従来の作用機作とは異なる、真菌の先端成長を阻害する物質を得ることができると考えられる。今後、単離した物質の抗真菌活性を調べたり、実際の病原性真菌への効果を評価することで、副作用の小さい抗真菌剤開発に繋げていきたいと考えている。

文献

- [1] Hikaru Kume, Toshikazu Yamazaki, Tomiteru Togano, Michiko Abe, Hiroyuki Tanuma, Seiji Kawana, Masahiko Okudaira: Epidemiology of Visceral Mycoses in Autopsy Cases in Japan: Comparison of the Data from 1989, 1993, 1997, 2001, 2005 and 2007 in Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan, Medical Mycology Journal, 52, 117-127, (2011).
- [2] 伊藤 章: 真菌症のすべて～最新知見からの現状と展望～, 医療ジャーナル社, 34, (1998).
- [3] 吉田 稔: 血液疾患領域での voriconazole の位置づけ, 日本化学療法学会雑誌, 53, 51-55, (2005).
- [4] 松本 哲, 波多野 和男, 牧 克之: 抗真菌薬の基礎, 日本薬理学雑誌, 130, 45-51, (2007).
- [5] 藤井暢弘, 山本友子: 図解 微生物学・感染症・化学治療, 株式会社南山堂, 524, (2014).
- [6] 山口英世: 病原真菌と真菌症, 株式会社南山堂, 110-155, (2007).
- [7] William Hope, George L Drusano, John H Rex: Pharmacodynamics for antifungal drug development: an approach for acceleration, risk minimization and demonstration of causality, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 71, 3008-3019, (2016).
- [8] Shigeru Kohno, Kazuo Tamura, Yoshihito Niki, Koichi Izumikawa, Shinichi Oka, Kenji Ogawa, Junichi Kadota, Katsuhiko Kamei, Yoshinobu Kanda, Tetsuya Kiuchi, Kazutoshi Shibuya, Syunji Takakura, Toru Takata, Yoshio Takesue, Katsuji Teruya, Issei Tokimatsu, Takahiro Fukuda, Shigefumi Maesaki, Koichi Makimura, Hiroshige Mikamo, Kotaro Mitsutake, Yoshitsugu Miyazaki, Masaaki Mori, Akira Yasuoka, Keiko Yano, Noboru Yamanaka, Minoru Yoshida: Executive Summary of Japanese Domestic Guidelines for Management of Deep-seated Mycosis 2014, Medical Mycology Journal, 57, 17-163, (2016).
- [9] 内田 勝久, 澤江 義郎, 竹迫 一任, 堀 康宏, 大屋 哲, 吉田 稔, 宮崎 義継, 松森 浩士, 水兼 隆介, 河野 茂, 山口 英世: 総説 深在性真菌症治療薬開発の問題点, 日本医真菌学会雑誌, 43, 239-247, (2002).
- [10] Anuradha Chowdhary, Shallu Kathuria, Jianping Xu, Jacques F. Meis: Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health, PLOS Pathogens, 1-5, (2013).
- [11] Eveline Snelders, Henrich A. L van der Lee, Judith Kuijpers, Anthonius J. M. M Rijs, János Varga, Robert A Samson, Emilia Mellado, A. Rogier T Donders, Willem J. G Melchers, Paul E Verweij: Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread, PLoS Medicine, 5, 1629-1637, (2008).
- [12] 齋藤 厚, 那須 勝, 江崎 孝行: 標準感染症学 第2版,

243, 株式会社 医学書院, (2008).

- [13] 日本菌学会 編集: 菌用語集, メディカルパブリッシャー, 136, (1996).
- [14] 喜田 亜由美, 池田 貴幸, 瀬戸 大貴, 飯田 泰広: 既存抗真菌剤の β -1,3-グルカナーゼ過剰発現組換え酵母への影響評価, YAKUGAKU ZASSHI, 138, 837-842, (2018).

謝辞

本研究は JSPS 科研費 19K05738 の助成を受けたものです。