

Research of antifungal spectrum and mechanism of action of poacidiene, a novel diferulic compound

(新しい抗真菌剤ポアシジエンの抗真菌スペクトルと作用メカニズムに関する研究)

先端生命科学専攻 生命応答システム分野 47-206307 小川 樹

指導教員：大矢 禎一 教授

Key words: 出芽酵母, 抗真菌剤, 農薬, 形態表現型解析

【序論】

2020年に国連が発表した試算によると、30年後の世界人口100億人に相当する食糧を供給するためには、現在の1.6倍もの食糧生産が必要となる (FAO, 2019; Fedoroff, 2015)。一方、真菌に起因する植物病の農業的被害は毎年8億人分の食糧損失に相当するとされ、抗真菌農薬の開発が求められている。現在は主に、微小管、エルゴステロール、ミトコンドリア等に作用する抗真菌剤が用いられているが、薬剤耐性真菌の増加が問題視され、新たな作用メカニズムを有する抗真菌剤が求められている (Brauer *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2016)。当研究室では、出芽酵母の形態を指標としたハイスループットな薬剤スクリーニングシステムが開発され、少量の薬剤で解析速度と精度の高い標的予測が可能となり、すでに数種の既存薬剤でその予測能力の実証に成功している (Ohnuki & Ogawa *et al.*, 2022)。中でも、ポアシン酸(図1)はイネ科植物から発見された新しい抗真菌剤で、形態表現型解析から薬剤標的が細胞壁であることが示唆され、その後の調査で細胞壁に直接作用するというメカニズムが裏付けられた (Piotrowski *et al.*, 2015)。本研究で我々が調査したのはポアシジエン(図1)という、同じくイネ科植物から発見された化合物であるが、形態表現型解析では、DNA損傷応答経路と脂肪酸生合成経路という、ポアシン酸とは全く異なる薬剤標的が示唆された。これらを背景に、本研究の目的は次の2点。(1) ポアシジエンがどのような病原性真菌種に対して増殖阻害効果を示すのか調査し、農薬としての有用性を検証する (抗真菌スペクトルの解析)。(2) 遺伝子欠損株のポアシジエン感受性/耐性の情報から遺伝的相互作用を調べ、薬剤標的候補を絞り込み、それぞれの生物学的経路の活性を調査することで、ポアシジエンの細胞内標的を明らかにする (作用メカニズムの解析)。

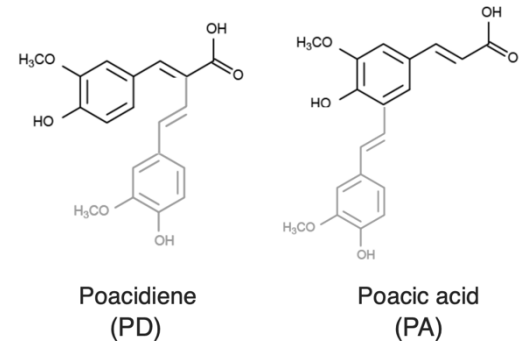


図1：ポアシジエンとポアシン酸の化学構造

【結果・考察】

(1) 抗真菌スペクトルの解析

ポアシジエンは、ポアシン酸と比較して約10倍効果的に出芽酵母の細胞増殖を抑えることが明らかになった (図2)。また、植物病原性真菌に対する阻害効果の実証実験では、豆類や野菜に感染して農業ダメージを与える *R. solani* や *A. alternata*、*A. solani* といった病原性糸状菌種、また灌漑システムに感染する水カビの仲間である *P. aphanidermatum* や *P. sojae* といった病原性卵菌種に対してもポアシジエンが有効であることが示された (図3)。

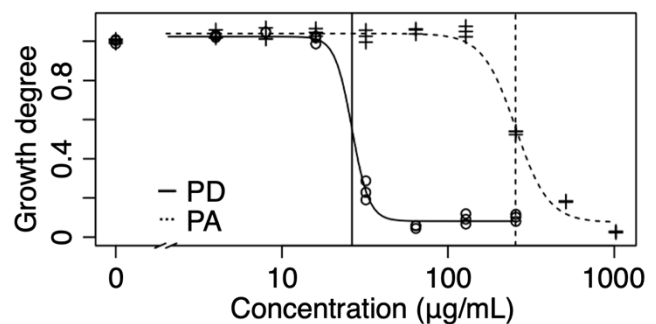


図2：出芽酵母に対するPDとPAの増殖阻害効果

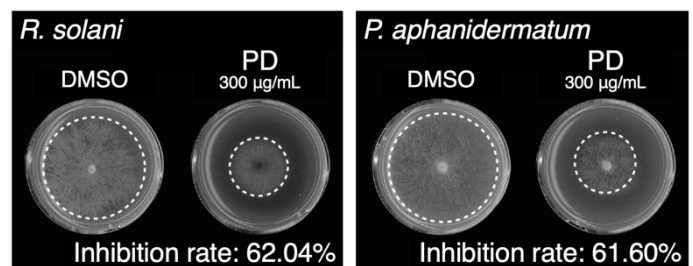


図3：植物病原性真菌に対するPDの菌糸伸長阻害効果

(2) 作用メカニズムの解析

ポアシジエンのターゲットが、脂肪酸合成経路、あるいはその周辺に存在している可能性が示唆された。はじめに形態表現型解析の結果から、ポアシジエンの標的候補として、Cul8-RING ユビキチンリガーゼ複合体 (DNA 損傷応答経路で機能) と脂肪酸合成経路の 2 つが挙げられた。次に、この 2 つの生物学的経路で働く遺伝子を欠いた変異株に対するポアシジエンの感受性調査を行った結果、いずれの変異株でもポアシジエンに対する感受性が認められたため、(a) DNA 損傷応答経路、(b) 脂肪酸合成経路、それぞれの活性を調査することとした。

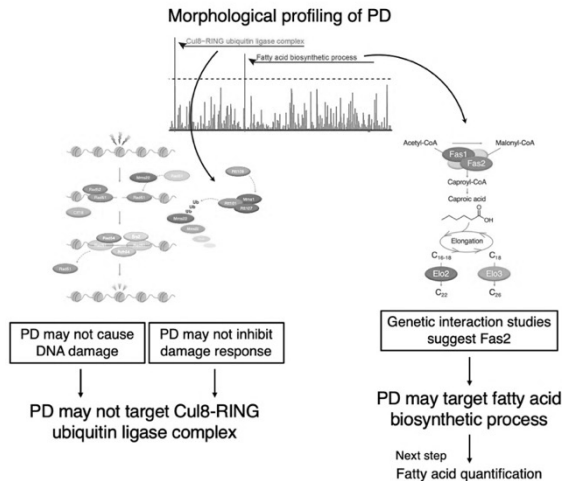


図 4：ポアシジエンの作用メカニズムのモデル

(a) DNA 損傷応答経路

当該経路の関連変異株でポアシジエン感受性が認められる理由として、次の 2 つの可能性が考えられた。①ポアシジエンが DNA ダメージを導入する、②ポアシジエンが DNA 損傷応答経路を阻害する。まず①を検証するために、ポアシジエン処理時に DNA ダメージ導入時特異的なタンパク質の増減がみられるか調べたところ、そのような現象は確認されなかった。次に②の検証として、ポアシジエン処理に伴い細胞の変異率が上昇するかどうかを調べたが、こちらも有意な変化は認められなかった。これらを受けて、DNA 損傷応答経路がポアシジエンのメインターゲットである可能性は低いと考えた (図 4)。

(b) 脂肪酸合成経路

DNA 損傷応答経路の関連変異株も含め、高い感受性を示した遺伝子間の遺伝的相互作用を調査した結果、脂肪酸合成酵素のサブユニットをコードする *FAS2* が標的候補として浮上した。脂肪酸伸長酵素をコードする *ELO3* については、*FAS2* と正の遺伝的相互作用を有することが示され、この遺伝子の変異株 *elo3Δ* に対して感受性試験を行ったところ、ポアシジエンを低濃度で処理した際に飽和細胞数が増加するという正の相互作用とみられる現象が認められた。現在は、脂肪酸合成経路あるいはその周辺がポアシジエンの標的なのではないかと推察しており、今後はポアシジエンの処理に伴い脂肪酸の生合成量が変化するかを調べる定量実験等を計画している (図 4)。

【結論】

(1) 抗真菌スペクトルの解析

ポアシジエンが、農業分野で薬剤耐性種の増加が問題視されている病原性糸状菌、卵菌類に対して増殖阻害効果を発揮することがわかり、農業開発のポテンシャルが示された。

(2) 作用メカニズムの解析

形態表現型解析が示唆した標的経路にポアシジエンが影響を与えることがわかり、なかでも脂肪酸合成経路、またはその周辺に薬剤標的が存在する可能性が高いことがわかった。

Shinsuke Ohnuki[#], Itsuki Ogawa[#], Kaori Itto-Nakama, Fachuang Lu, Ashish Ranjan, Mehdi Kabbage, Abraham Abera Gebre, Masao Yamashita, Sheena C. Li, Yoko Yashiroda, Satoshi Yoshida, Takeo Usui, Jeff S. Piotrowski, Brenda J. Andrews, Charles Boone, Grant W. Brown, John Ralph, Yoshikazu Ohya ([#] equally contributed). High-throughput platform for yeast morphological profiling predicts the targets of bioactive compounds. *npj Syst. Biol. Appl.* in press (2022).

【出願番号】特願 2021-136651 (2021.8.24) 【出願人】東京大学, ウィスコンシン大学 【発明の名称】8-8 ジフェルラ酸誘導体 【発明者】大矢禎一, 一刀かおり, 小川樹, Abraham Abera Gebre, John Ralph, Jeff Piotrowski, Fachuang Lu.