

論文審査の結果の要旨

氏名 アブラハム アベラ ゲブレ

本論文は3章からなり、第1章は抗真菌薬が出芽酵母に与える形態変化 (Morphological Profiling of Antifungal Agents)、第2章は化合物が与える形態変化に基づく薬剤の新しい分類法の開発 (New Phenotypic Profiling Method for Identifying the Targets of Bioactive Compounds)、第3章はより低濃度の薬剤を使ってその形態変化に類似した遺伝子破壊株を探索する手法の開発 (Sensitive and High-throughput Profiling of the Responses of Antimicrobial Agents from Single Cells) について述べられている。

抗真菌剤は、真菌症の治療として用いられる開発需要の高い薬剤であり、現在広く使われている抗真菌剤は作用標的の観点から①エルゴステロールの合成阻害剤 (アゾール系・ポリエン系など)、②核酸の合成阻害剤 (ピリミジン系など)、③細胞壁の合成阻害剤 (キャンディン系薬剤など) に分けられる。創薬・薬理学の分野において薬剤効果の評価は重要であり、High Content Screening 技術の進歩に伴って、フィットネス・プロファイリングと呼ばれる変異株の増殖遅延のパターン、遺伝子発現のプロファイル、表現型プロファイリングなどが利用されてきた。これらのデータを元にして、抗真菌剤の細胞内での作用機序を推定し、副作用を軽減して新しい抗真菌剤を開発することが可能になってきている。これまでに当研究室では画像解析プログラム CalMorph を用いた High Content Imaging により出芽酵母の形態変化を多変量解析することで薬剤の効果を定量的に評価するシステムを確立し、薬剤の細胞内標的予測や、薬剤の作用機序の解明を行ってきた。そこで本論文では、抗真菌剤で処理した出芽酵母の形態変化を多変量解析して特徴を捉え、抗真菌剤のプロファイリングを行って他の薬剤と比較することにした。

第1章では、抗真菌薬の中で代表的なエルゴステロール合成経路に働く薬剤 (Fluconazole, Terbinafine, Fenpropimorph)、DNA/RNA 合成に働く薬剤 (Flucytosine) 細胞壁合成に働く薬剤 (Echinocandin B, Micafungin) を選び解析した。細胞の増殖速度を10%阻害する濃度を最大濃度とし5~6段階の濃度で薬剤処理を行った結果、特徴的な細胞形態が認められた。CalMorph により定量的な501の形態パラメータを抽出し Jonckheere 検定を行なった結果、それぞれの薬剤では濃度依存的変化が17~251パラメータにおいて有意に検出された (閾値: FDR=0.05)。さらにそこから独立する形態変化を抽出し、各クラスで共通する形態変化の特徴を定量的に捉えることができた。今回用いた化学遺伝学的手法の確からしさを検証するため、薬剤処理による形態変化と4,718の非必須遺伝子破壊による形態変化のプロファイルを比較した。各クラスの薬剤処理による形態変化は、予期した結果通り、薬剤標的が関連する経路 (エルゴステロール生合成、リボソーム RNA 合成、細胞壁合成) の欠損株と高い相関を持つことが確認できた。一方で、予期しない結果として、エルゴステロールに働く薬剤の効果と液胞 ATPase に働く薬

剤の効果、そして細胞壁に効く薬剤の効果が類似していた。さらにこのことが、エルゴステロール経路、液胞の酸性化、細胞壁合成が互いに関係していることによることを実際に検証した。

第2章では、線形判別分析 (LDA) を用いて抗真菌剤の分類を行った。まず全 501 の形態パラメータ中から薬剤効果を強く表すパラメータを選出した。その後、主成分分析で次元数を減らした後に LDA により二次元平面を作成した。その結果、最大濃度で処理したときの各薬剤の形態変化の情報はクラス毎に分類され、纏まってプロットされることがわかった。この二次元平面を使って様々な薬剤を評価するために、当研究室で過去に取得された 38 種類の薬剤データを同時にプロットしたここでのプロット位置は、一部の薬剤間において、その作用機序の類似性を強く反映していた。hyglomycin B (タンパク合成阻害剤) と hydroxyurea (DNA 合成阻害剤) は flucytosine (核酸合成阻害によりタンパク質翻訳・DNA 合成の両方が阻害) と近い位置に存在した。類似した結果は他にも幾つか確認できた一方で、作用標的が類似するにも拘わらず全く異なった形態変化をしたもの存在し (例:bleomycin:DNA 損傷剤)、薬剤の未知の作用機序の存在の可能性が示唆された。

第3章では、より低濃度の薬剤を使ってその形態変化に類似した遺伝子破壊株を探索する手法の開発を行った。より低濃度の薬剤が効果をもたらす *pdr1Δpdr3Δsnq2Δ* をバックグラウンドに持つ出芽酵母の遺伝子破壊株の中で、形態変化がよく表れていた 2000 株のハイスループット CalMorph 形態データに 726 回分の親株データを使った一般化線形モデルを当てはめて標準化した。その後、主成分分析を行って次元を減らし、形態類似度はピアソン積率相関係数を使って求めた。有意検定はボンフェローニ補正の後に片側検定 ($p < 0.05$) で行った。合計 6 種の標準的な薬剤 (Benomyl, Tunicamycin, Echinocandin B, hydroxyl urea, Bortezomib, Methyl methanesulfonate) で酵母を処理して形態変化を調べたところ、薬剤の標的経路の変異株と何も類似していた。今回の新しい方法は、より低濃度の薬剤を使ってハイスループットでの薬剤標的予測を行うシステムであり、今後の活用が期待される。

なお、本論文第1章と第2章は、金哲広、岡田啓希、久保佳蓮、大貫慎介、大矢禎一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。