

薬剤感受性出芽酵母を用いた抗真菌薬シード化合物の探索

Search for antifungal seed compounds using a multi-drug sensitive budding yeast

○坂井 克行¹、廣瀬 友靖^{1,2}、岩月 正人^{1,2}、知念 拓実³、木村 徹¹、須賀 拓弥^{1,2}、野中 健一^{1,2}、中島 琢自^{1,2}、砂塚 敏明^{1,2}、臼井 健郎³、浅見 行弘^{1,2}、大村 智²、塩見 和朗^{1,2} (¹北里大院感染制御、²北里大生命研、³筑波大生命環境科学)

○Katsuyuki SAKAI¹, Tomoyasu HIROSE^{1,2}, Masato IWATSUKI^{1,2}, Takumi CHINEN³, Toru KIMURA¹, Takuya SUGA^{1,2}, Kenichi NONAKA^{1,2}, Takuji NAKASHIMA^{1,2}, Toshiaki SUNAZUKA^{1,2}, Takeo USUI³, Yukihiro ASAMI^{1,2}, Satoshi OMURA², Kazuro SHIOMI^{1,2} (¹Kitasato Univ. graduate school of infection control sciences, ²Kitasato Univ. kitasato institute for life sciences, ³Tsukuba Univ. graduate school of life and environmental sciences)

【背景と目的】出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は薬剤のスクリーニング、ターゲットの同定や生物活性物質の評価を含むケミカルバイオロジー研究で広く使用されている。しかしながら、*S. cerevisiae* は低い薬剤透過性、及び細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの亢進により高い薬剤耐性を示し、化合物の探索や解析を困難にしている。したがって、薬剤感受性を有した *S. cerevisiae* を利用すればこれまでにスクリーニングされてこなかった化合物を探索することが可能になると考えられる。そこで、薬剤排出ポンプである ATP binding cassette (ABC) transporter の発現に関わる 12 個の遺伝子を破壊し、さらに薬剤膜透過性に関わる ergosterol 合成遺伝子を誘導発現型にした薬剤超感受性の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6¹ を利用して、微生物二次代謝産物から新しい抗真菌薬シード化合物を探索することを目的に研究を行った。

【方法】ABC transporter に関わる遺伝子を 4 個破壊した *S. cerevisiae* BY25929 (4 遺伝子破壊株) と 12 個破壊した *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 (12 遺伝子破壊株) を利用しペーパーディスク法により微生物培養液からスクリーニングを行った。12 遺伝子破壊株にのみ阻止円を形成するサンプルを選抜し、選抜したサンプルについて生産菌の培養及び精製、単離、構造解析を行った。

【結果と考察】上記の方法で糸状菌及び放線菌培養液計 4,656 サンプルのスクリーニングを行い、スクリーニング通過サンプルを 2 サンプル見出した。スクリーニング通過サンプルの糸状菌 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物より新規化合物の pestynol (Fig. 1) を 33 mg 取得した。Pestynol の平面構造は高分解能 ESI-MS 及び各種 NMR により決定した。続いて、pestynol のシクロヘキセン環内の絶対立体配置を改良モッシャー法によりすべて *R* 体であると決定した。Pestynol の抗菌活性評価はペーパーディスク法で行い、グラム陽性菌、グラム陰性菌、マイコプラズマ、酵母及び糸状菌に対して行った。Pestynol は複数のグラム陽性菌及び 12 遺伝子破壊株、ムコールに対して抗菌活性を示した。また、12 遺伝子破壊株の親株である *S. cerevisiae* BY4741 株に対して抗菌活性を示さなかったことより、薬剤排出機構を破壊した出芽酵母である 12 遺伝子破壊株を用いることで初めて取得することができた。

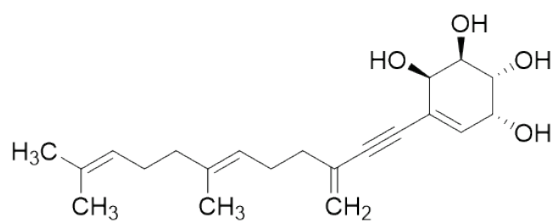


Fig. 1 Pestynolの化学構造

1) Chinen, T., Nagumo, Y. & Usui, T. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **60**, 160–162 (2014)

farnesylcyclohexenetetraol, ATP-binding cassette transporter, multi-drug sensitive budding yeast