

■ 研究課題名

糸状菌比較ゲノム情報に基づく新規抗菌剤の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① *Aspergillus* 属菌のゲノム情報に基づく薬剤標的の特定
（◎阿部 敬悦／国立大学法人東北大学）
- ② モデル糸状菌情報を活用した抗いもち病菌剤探索システムの構築
（西村 麻里江／（独）農業生物資源研究所）
- ③ 化合物ライブラリーの供給および抗菌剤の最適化と実用化
（永山 孝三／クミアイ化学工業株式会社）
- ④ 標的の特定および薬剤-標的相互作用解析システムの構築とキット化
（牧野 徹 (H17-18)／株式会社ノバスジーン；
中村 誠 (H19)、坂内 誠 (H20-21)／オリンパス株式会社）

■ 研究の目的

農業用殺菌剤の国際市場では新剤の継続的創出が望まれている。そこで、異分野技術（糸状菌ゲノム科学、情報科学、合成化学、農薬科学、工学）を結集して、糸状菌類の特定標的に作用する新剤の高速探索システムを構築し、本システムを用いて見出した新規作用性を有する農業用殺菌剤のリード化合物を最適化して、新規抗菌剤の創出・実用化を目指す。本研究を通じて、連続的に新剤の創出が可能なゲノム創農薬パイプラインを確立する（図1）。

■ 主要な成果

- ① 高速スクリーニング (HTS) に対応可能な化合物ライブラリーの構築：HTS に対応可能な目的指向型化合物ライブラリー（4万化合物）を構築した。
- ② イネいもち病菌マイクロアレイの開発：ブロード研究所の予測遺伝子情報および既存の市販アレイの搭載遺伝子に比べて農業生物資源研 EST 配列へのヒット率が高く、実験結果も既存アレイに比べ定量 PCR との対応が良い世界最高水準のマイクロアレイを独自開発した（図2）。
- ③ レポーターアッセイ系の構築：シグナル伝達作動薬探索用レポーターアッセイ系を構築し、大量スクリーニングを行って、高浸透圧応答 (HOG) 経路に働く薬剤候補を得た（図3-5）。
- ④ 分子間相互作用解析技術の構築：1分子蛍光分析装置を用いて HOG 経路に作用する薬剤の迅速スクリーニング法を確立した。また、シグナル伝達系を対象に蛍光標識 ATP を用いることにより、タンパク質の ATP 結合性評価を可能にし、創薬標的としての ATP 結合阻害剤評価系を構築した。
- ⑤ 化合物応答データベースの構築：遺伝子発現情報と表現型情報を格納し、相互検索とローカルマシンで高度な統計解析を行うためのインターフェース群も整備された、世界でも類のない革新的な化合物応答データベース「IDEA」を構築した（図6-10）。
- ⑥ 新規作用性化合物の発見：構築した HTS 系を活用してカルボン酸系抗菌化合物を発見し、それがシグナル伝達系 HOG 経路のこれ迄にない阻害剤であることを明らかにした。本周辺化合物は、真菌類のシグナル伝達研究における有用なプローブとして活用できる。
- ⑦ 細胞壁構築経路 (CWI 経路) の標的の特定：糸状菌の CWI 経路が α -1, 3-グルカン (AG) 合成酵素遺伝子の転写制御に特化されていることを明らかにし、イネいもち病菌のステルス因子としての AG の発見に繋がった。本成果は「2009 年農林水産研究成果 10 大トピックス」に選ばれた (<http://www.s.affrc.go.jp/docs/10topics.htm>)（図11）。
- ⑧ レポーター株によるシグナル伝達作動薬の HTS 探索と「IDEA」への統計照合を併用した、

継続性・拡張性のある新規創農薬パイプラインを開発実用化した(図12)。

■ 公表した主な特許と論文

- ① 特願 2009-074728：新規レポーター遺伝子を用いたスクリーニング方法：東北大学、農業生物資源研究所、クミアイ化学工業(株)
- ② 特願 2009-079050：検索装置および検索プログラム：東北大学、農業生物資源研究所、クミアイ化学工業(株)、オリンパス(株)
- ③ Fujioka, T., *et al.*, MpkA-Dependent and -Independent Cell Wall Integrity Signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 6, 1497-1510 (2007)
- ④ Fujikawa, T., *et al.*, Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Molecular Microbiology*, 73, 553-570 (2009)

■ 今後の展開方向

- ① ゲノム創農薬パイプラインの活用：マイクロアレイと化合物応答データベース「IDEA」を活用した作用点推定および標的探索機能並びにレポーターアッセイ系を用いた薬剤探索システムとを併用することで、これまでにないゲノム創農薬パイプラインを構築した。本研究成果は医農薬創製における有用なツールとして、抗菌剤3.3兆円市場へ向けた新薬開発に活用されるものと期待でき、商業的利用の準備段階に入っている。
- ② イネいもち病菌マイクロアレイの活用：本事業において独自に開発したイネいもち病菌マイクロアレイは、既存製品と比べ高精度かつ高性能でいまだに世界最高水準のアレイであり、抗菌剤開発、薬剤耐性獲得のメカニズムの解明等、産業面・学術面からも今後の活用が期待される。
- ③ α -1, 3-グルカン (AG) の活用：*Aspergillus*属糸状菌のCWI研究、いもち病菌の細胞壁研究から、AGが動植物で糸状菌感染時の免疫攻撃を回避するステルス因子として機能することを明らかにした。本成果を活用してAGを標的とした医農薬の開発や病害抵抗性作物の育種などが考えられる。一方、麴菌からAGを大量生産する技術(100gAG生産/100kg麴)を確立し、AG及びAGを除去した β -1, 3-グルカン (BG) などの素材の工業的利用開発にも着手しており、素材分野として新領域の開拓も期待される。
- ④ 分子間相互作用解析技術の活用：1分子蛍光分析装置を用いて、HOG経路のタンパク質間相互作用に作用する薬剤の迅速スクリーニング系を構築した。本方法を応用することで、他のタンパク質間相互作用評価も可能であり、蛍光標識ATPを用いたATP結合性タンパク質の評価やプロテインキナーゼC (PKC) の活性評価にも活用できる。
- ⑤ 抗菌化合物の開発：カルボン酸系抗菌化合物は構造改変を行ない、実用化を目指す。

■ 問い合わせ先

- ① ゲノム創農薬パイプライン、 α -1, 3-グルカン：東北大学未来科学技術共同研究センター (022-795-3205；kabe@niche.tohoku.ac.jp)
- ② イネいもち病菌マイクロアレイ、抗菌化合物：クミアイ化学工業株式会社・(株)ケイ・アイ研究所 (0538-58-0141；yoshimura@ki-chem.co.jp)
- ③ イネいもち病菌、ステルス因子：農業生物資源研究所植物・微生物間相互作用研究ユニット (029-838-8461；marie@affrc.go.jp)
- ④ 「IDEA」、分子間相互作用解析技術：オリンパス株式会社医療技術開発本部 (0426-91-7429；m_bannai@ot.olympus.co.jp)

■ 研究成果の具体的図表

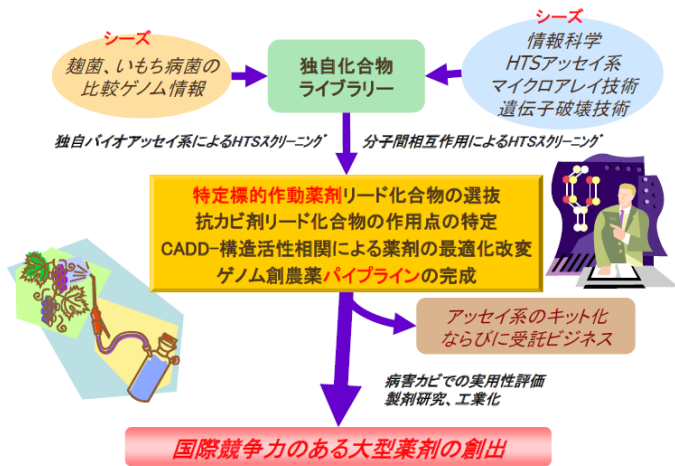


図1. 研究の目的

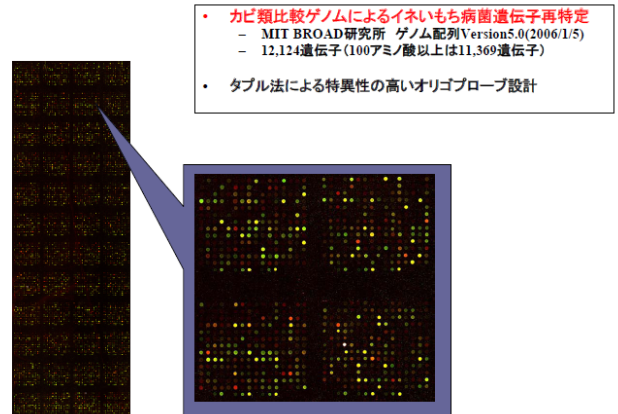


図2. イネいもち病菌マイクロアレイの作製



図3. シグナル伝達系とレポーター

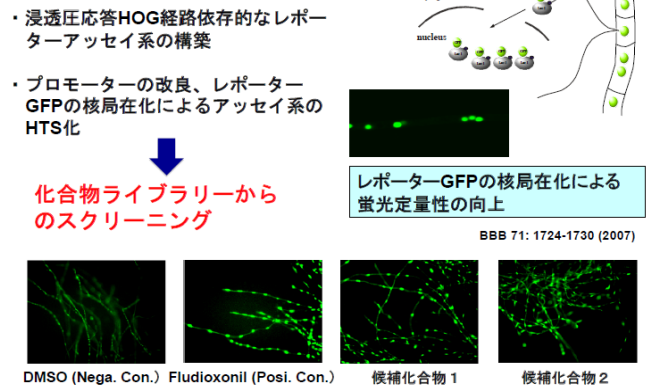


図4. レポーターアッセイ系を用いた薬剤スクリーニング

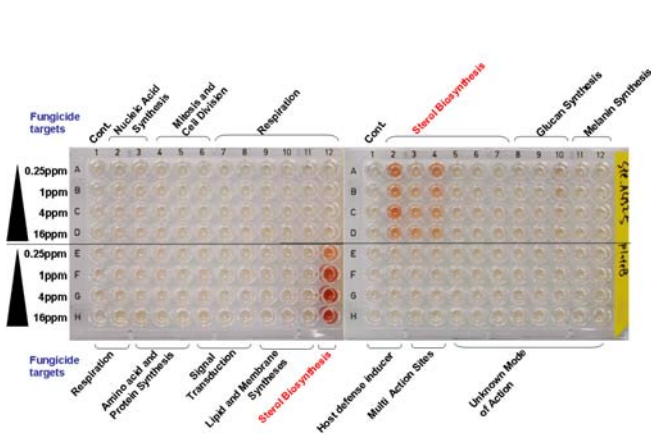


図5. レポーターアッセイ系の実例

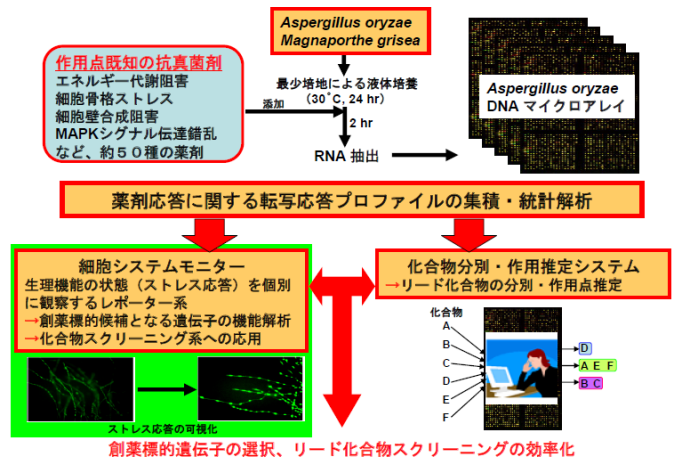


図6. 糸状菌マイクロアレイを活用した創薬支援システムの構築

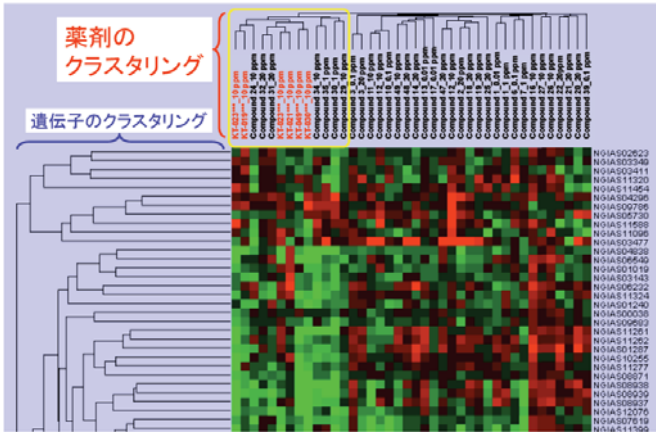


図7. 薬剤のクラスタリングの例

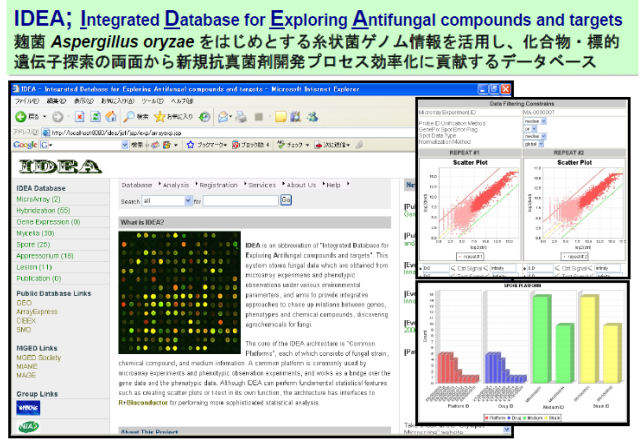


図8. 化合物応答データベース (IDEA) の構築

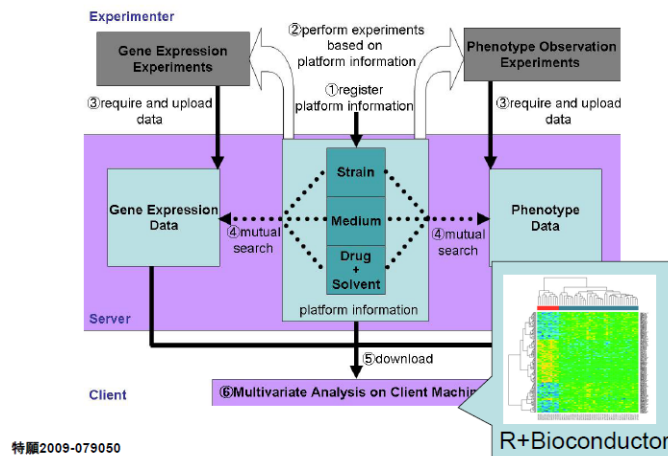


図9. IDEA システムの概要

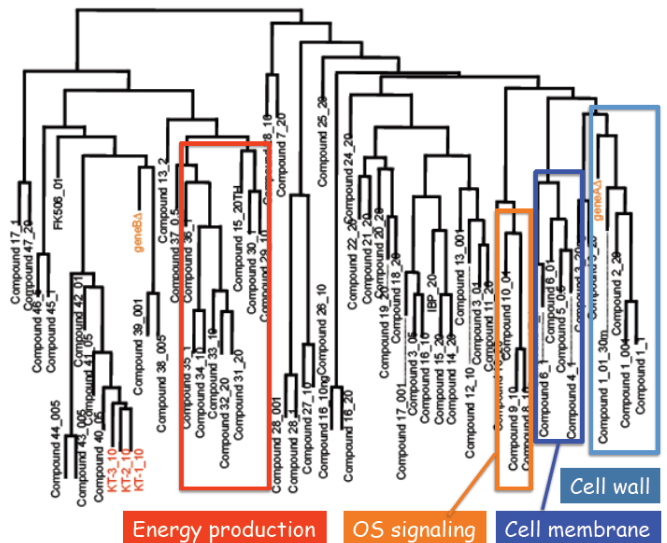


図10. IDEA を用いた薬剤プロファイリングからのリード化合物探索

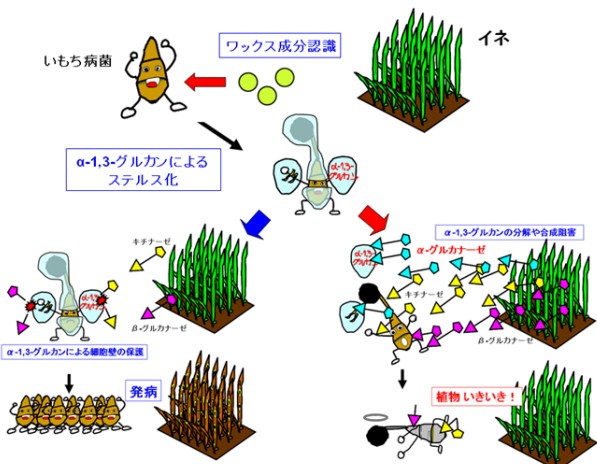


図11. カビの「ストレス作戦」

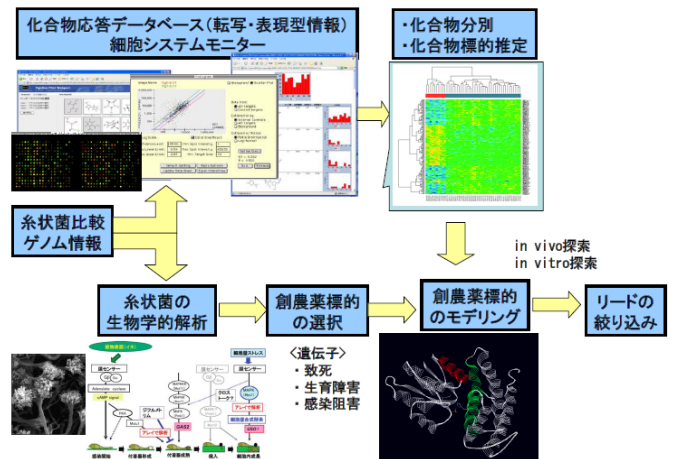


図12. 抗真菌剤ゲノム創農業パイプラインのフロー