

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	青木航
論文題目	Studies on the virulence factors of <i>Candida albicans</i> and its application to design novel antifungal defense (<i>Candida albicans</i> の病原性因子の解析と新規抗菌戦略へ向けた応用)		
(論文内容の要旨)			
<i>Candida albicans</i> はヒトに常在する真菌であるが、免疫不全を契機としてカンジダ症を引き起こす。既存の薬には副作用があるため効果的な治療は難しく、特に全身性カンジダ症の致死率は50%を超える。高齢化社会を迎えるにあたり、患者数は上昇すると予想されるため、病原性の理解と新規治療法の確立が求められている。 <i>C. albicans</i> の病原性因子として、分泌型のアスパラギン酸プロテアーゼ（secreted aspartic protease、以下、Sap と略す）や血液適応などが有名であるが、病原性メカニズムはよくわかっていない。そこで、Sap の生化学的解析およびプロテオーム解析による新規病原性因子の同定を通して、<i>C. albicans</i> の病原性を理解しようと試みた。 1. 分泌型アスパラギン酸プロテアーゼファミリー（Saps1-10）の生化学的解析 <i>C. albicans</i> の病原性因子の一つとして、Sap ファミリーが存在する。Sap ファミリーには10種類ものアイソザイム（Saps1-10）が存在するが、生化学的性質の違いや多種のアイソザイムが存在する理由はよくわかっていない。そこで、全ての Sap アイソザイムを精製・解析することで、病原性の一端を明らかにしようと試みた。 本研究において、メタノール資化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> の発現系を用いることで、全アイソザイムの発現および精製に初めて成功した。Saps1-10 の最適pHは、2.5から6.5の範囲に幅広く分布していた。中性域でも活性を持つ Sap アイソザイムが存在することで、幅広い環境において病原性を発揮できる可能性が示唆された。 次に、ペプチド（FRETS-25Xaa）ライブラリーを用いて、切断部位 P1 の基質特異性を決定したところ、Sap アイソザイムの基質特異性は非常に広く、疎水性と塩基性のアミノ酸を好むことがわかった。更に、詳細な解析の結果、Sap1 は GVIKAFPK、Saps2-3 は GFIKAFPK 配列を最も好み、リシン（K）とアラニン（A）の間で切断することから、P2およびP3部位では疎水性アミノ酸を好むことが推察された。これらの結果から、Sap ファミリーは幅広い最適pHと基質特異性を保持し、これが多様な基質の分解に繋がると示唆された。 2. ペプスタチンA非感受性 Sap アイソザイムの発見 Sap の解析を進める過程で、Sap7 がペプスタチンA に非感受性であることを発見した。ペプスタチンA はアスパラギン酸プロテアーゼを強力に阻害できるため、カンジダ症に対する治療効果が検討されてきたが、<i>C. albicans</i> の病原性を必ずしも減少させなかった。Sap7 がペプスタチンA非感受性である理由を解明することで、阻害剤によるカンジダ症の治療が失敗した原因を明らかにできる可能性があった。 活性中心付近の構造がペプスタチンA の接近を阻害している可能性を考え、活性中心付近のアミノ酸をアラニンに置換した結果、M242AおよびT467A変異体がペプスタ			

チンAによって阻害されることがわかった。構造予測から、M242とT467の側鎖が活性部位への入り口を塞ぎ、ペプスタチンAの接近を阻害している可能性が示唆された。

3. 病原性プロテアーゼによって活性化される新規抗菌物質の設計

病原性真菌は真核生物であるため、抗真菌薬はヒト細胞に対しても重篤な副作用を持つものが多い。*C. albicans* の存在を認識し、真菌細胞だけを特異的に攻撃できる手法を開発できれば、副作用を抑えることが可能となると考えられた。

そこで、Sap ファミリーに着目し、プロテアーゼに依存して活性が制御される抗菌物質のデザインを試みた。この物質（デザインペプチド）は、抗菌を担う活性中心、活性を抑制する保護基、その2つを共役させる特異的リンカーから構成される。特異的リンカーがプロテアーゼによって切断されると活性化されるため、*C. albicans*が病原性を発揮する時・場所を認識できると考えられた。活性中心としては、抗菌ペプチドの一種であるラクトフェリシンに着目し、保護ペプチドとしては、負電荷に富むマギニン抑制配列を用いた。リンカーとしては、上記の GFIKAFPK 配列を用いた。

まず、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いてデザインペプチドの性質を解析したところ、pH 5-7 では不活性であるが、pH 4 以下では強い抗菌活性を示した。次に、*C. albicans* と *S. cerevisiae* を用いて、*C. albicans* を特異的に殺菌可能かどうかを調べた。Sap を強く誘導するYNB-BSA培地で *C. albicans* と *S. cerevisiae* を培養し、その後デザインペプチドを加えたところ、*C. albicans* ではほとんどの細胞が殺菌されたが、*S. cerevisiae* には効果がないことがわかった。この殺菌活性はペプスタチンAによって阻害されたことから、Sap のプロテアーゼ活性に依存していることが示唆された。

4. 時間分解プロテオミクスによる新規病原性因子のスクリーニング

C. albicans の血液適応過程は、全身性カンジダ症を引き起こすにあたり必須の過程である。しかし、Sap を代表とする既知の病原性因子だけではこの過程を説明できず、未発見の病原性因子が存在すると考えられる。そこで、血液適応過程におけるプロテオームの変動を捉えることで、新規病原性因子の探索を試みた。

血液適応過程を調べるために、fetal bovine serum (FBS) を用いて*C. albicans* を時系列に従って培養し菌体を回収した。各時間の菌体に存在するタンパク質をLC-MS/MSで網羅的に同定したところ、血液適応の初期においては、鉄や糖に対する高アフィニティトランスポーターが同定された。また、適応後期にシフトするに従って、細胞接着に働くアドヘシンや組織破壊に重要なプロテアーゼなどの既知の病原性因子が同定された。これらの結果から、特に適応初期において、血液から必須栄養素を取り込む過程が重要であり、これに関わる因子が新規病原性因子候補であると示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

C. albicans は常在性の真菌であるが、免疫不全を契機として致死的なカンジダ症を引き起こす。本研究は、病原性因子である分泌型アスパラギン酸プロテアーゼ群 (Sap) の性質を解析するとともに、その情報をもとに新発想のデザインペプチド医薬の創製を試み、さらに、プロテオミクスにより新規病原性因子候補を探索したものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 十種類存在する Sap ファミリーアイソザイム全てを精製し、生化学的性質を解析した。その結果、最適pHは2.5から6.5に幅広く分布すること、および、基質特異性として疎水性と塩基性のアミノ酸を好み、多様なペプチドを分解可能であることを示した。
2. Sap7 がアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤であるペプスタチンAに非感受性であることを発見し、活性中心付近に位置するM242とT467がペプスタチンAの接近を阻んでいる可能性を示唆した。これまでのこのプロテアーゼ阻害剤がカンジダ症の治療に効果的ではなかった原因のひとつと考えられた。
3. *C. albicans* のみを特異的に攻撃する副作用の少ないペプチドを設計し、デザインペプチド医薬の可能性を提唱した。このペプチドは、抗菌ペプチド、保護ペプチド、この2つを接続するリンカーペプチドから成る。このペプチドは、通常は抗菌活性を示さないが、Sap によってリンカーが切断されることで、*C. albicans* を攻撃できるようにデザインされている。このペプチドを、*C. albicans* および *S. cerevisiae* に作用させたところ、*C. albicans* の生存率のみが減少した。また、ペプスタチンAが抗菌活性を抑制したことから、常在病原菌が病原性を表した時に分泌する Sap 依存的に抗菌ペプチドが活性化されたことが示唆された。
4. *C. albicans* の血液環境への適応は、重要な病原性発現プロセスである。さらなる新規病原性因子を探索するため、プロテオミクスにより、血液特異的に誘導されるグルコースや鉄に対する高アフィニティトランスポーターなどが同定された。血液適応には、必須栄養素を確保することが重要であり、このプロセスに関わるタンパク質が新規病原性因子の候補であることを明らかにした。

以上のように本論文は、*C. albicans* の病原性因子の性質を解明するとともに、その情報をもとに医薬候補となるデザインペプチドを創製した。また、プロテオミクスにより、新規病原性因子候補タンパク質を同定した。これらの結果は、生体高分子化学、応用微生物学、創薬ペプチド化学分野の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成25年2月7日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。
要旨公開可能日： 年 月 日以降