

氏 名 根路銘 伸介

学位の種類 博士(工学)

学位授与年月日 2023年9月23日

学位論文名 Analysis of emulsification phenomenon caused by yeast cells with altered cell wall structure and development of novel antifungal drug screening method using the phenomenon

(細胞壁構造が変化した酵母細胞によって生じる乳化現象の解析とその現象を利用した新規抗真菌薬スクリーニング法の開発)

論文審査委員 主査 工学研究科 教授・東 雅之

副査 工学研究科 教授・北村 昌也

副査 工学研究科 教授・立花 亮

論文内容の要旨

乳化とは本来混ざり合わない2種類の液体が均一に混ざり合う現象で、例えば水が油を取り込んだO/W乳化や油が水を取り込んだW/O乳化などがある。食品や化粧品などの製造で乳化現象は広く利用されている。安定な乳化には両親媒性の乳化物質が必要であり、現在は化学合成された低分子乳化剤の使用が多いが、カゼインのような天然高分子も利用されている。本研究では、細胞自身に強い乳化活性を持つ酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞壁変異株を見出し、それを契機に細胞壁変異と乳化現象の関係を詳細に解析した。さらに、乳化を指標とした抗真菌薬のスクリーニング系の構築を目的とし、病原性真菌 *Candida albicans* の細胞壁成分で抗真菌薬の標的でもある β -1,3-グルカンやGPI アンカーの合成阻害と培養液の乳化の関係について詳細に解析した。

第1章では序論として本研究の背景と目的を述べた。

第2章では酵母 *S. cerevisiae* の遺伝子ノックアウトコレクションを用いて様々な遺伝子破壊株の乳化活性を評価し、細胞壁成分である GPI アンカーや *N*-結合型糖鎖の合成に関与する遺伝子の破壊株が強い乳化活性を有することを明らかにした。このような結果は酵母細胞壁由来の乳化剤の開発に役立つことが期待される。

第3章では病原性酵母 *C. albicans* の抗真菌薬の標的となる細胞壁形成を薬剤により阻害することで乳化が検出されるかを評価した。結果として、細胞壁 β -1,3-グルカンの合成を浸透圧保護下で阻害することにより、細胞壁タンパク質が遊離し、その培養上清に強い乳化作用が生じることを明らかにした。また、細胞壁以外に作用する既存の抗真菌化合物では乳化現象が見られないことを確認した。

第4章では酵母の細胞壁タンパク質の多くがGPIアンカーを介して β -グルカンに結合していることを考慮し、GPI アンカーの合成阻害により乳化が検出されるかを評価した。その結果、阻害により乳化が生じることを明らかにした。さらに、 β -1,3-グルカンと GPI アンカーの合成阻害により細胞から細胞壁タンパク質である Phr2、

Tkl1、Eno1、Fba1 が遊離していることを明らかにし、さらにそれらに His-tag をつけたタンパク質を精製し乳化活性を有することを確認した。これらの結果から、細胞壁形成阻害により生じる乳化現象にこれらタンパク質が大きく寄与していることが推察された。上記の結果と培養液の乳化活性の測定は極めて容易であることから、乳化の評価が細胞壁を標的とする抗真菌薬のスクリーニングに適用できると考えられた。

第5章では本研究の今後の展開も含めて総括した。

論文審査結果の要旨

乳化とは本来混ざり合わない2種類の液体が均一に混ざり合う現象で、食品や化粧品などの製造において幅広く利用されている。安定な乳化には、両親媒性の乳化物質が必要であり、化学合成された低分子乳化剤の他に、カゼインのような天然高分子も一部食品の乳化に利用されている。著者は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の各種細胞壁変異株の細胞に強い乳化活性があることを見出し、それら変異と乳化現象の関係を解析している。さらに、酵母を含む真菌の細胞壁は抗真菌薬の標的となることから、乳化を指標とした抗真菌薬のスクリーニング系が構築できるのではないかと考え、病原性酵母 *Candida albicans* の細胞壁形成阻害とその培養液の乳化の関係について詳細に解析している。

論文では、序論として本研究の背景と目的を述べている。次に、*S. cerevisiae* の様々な遺伝子破壊株の乳化活性を評価している。細胞壁成分である GPI アンカーや N-結合型糖鎖の合成に関与する遺伝子の破壊株では、細胞懸濁液と油を混合すると、強い乳化が生じることを明らかにしている。さらに、細胞懸濁液の上清を用いた解析から、乳化が生じる要因は細胞壁から遊離する高分子化合物であることを示している。*C. albicans* を用いた解析では、抗真菌薬の標的となる細胞壁の主成分である β -1,3-グルカンに注目し、 β -1,3-グルカンの分解により細胞壁から遊離したタンパク質の溶液には、高い乳化活性があることを明らかにしている。さらに、浸透圧保護剤と β -1,3-グルカン合成阻害剤を含む培地を用いて得られた培養液には、多くの細胞壁タンパク質が細胞から遊離していることや、高い乳化活性があることを明らかにしている。次に、乳化が生じる機構について理解を深めるために、 β -1,3-グルカンの合成阻害により *C. albicans* の細胞壁から遊離するタンパク質を4種類同定している。これらの組換えタンパク質は、いずれも強い乳化活性を有することから、同定した4種類のタンパク質の遊離が、 β -1,3-グルカン合成阻害によって生じる乳化の主要因であるとまとめている。細胞壁タンパク質の多くが、GPI アンカーを介して細胞壁に固定されていることから、GPI アンカーの合成阻害による乳化についても検討し、 β -1,3-グルカン合成阻害に比べると弱いだが、乳化が生じることを明らかにしている。また、細胞壁以外に作用する5種類の抗真菌化合物では、乳化現象が見られないことや、乳化評価は非常に簡便であることから、この方法が細胞壁を標的とする抗真菌薬の簡易的なスクリーニングに有用であると結論づけている。最後に、本研究の今後の展開も含めて総括している。

以上のように、本論文の著者は、酵母の細胞壁変化により生じる乳化現象やその要因を明らかにし、乳化を指標とした新規な抗真菌薬のスクリーニング系を確立している。これらの研究成果は、生物工学の分野の発展に寄与するところが大きい。よって本論文の著者は、博士(工学)の学位を受ける資格を有するものと認める。