

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4204471号  
(P4204471)

(45) 発行日 平成21年1月7日(2009.1.7)

(24) 登録日 平成20年10月24日(2008.10.24)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G O 1 N	33/15 (2006.01)	G O 1 N	33/15 Z
G O 1 N	33/50 (2006.01)	G O 1 N	33/50 Z
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 6 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-538398 (P2003-538398)	(73) 特許権者	307010166 第一三共株式会社 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成14年10月22日(2002.10.22)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/010932	(72) 発明者	北村 昭浩 日本国東京都江戸川区北葛西1丁目16番 13号 第一製薬株式会社 東京研究開発 センター内
(87) 国際公開番号	W02003/035898	(72) 発明者	中島 良平 日本国東京都江戸川区北葛西1丁目16番 13号 第一製薬株式会社 東京研究開発 センター内
(87) 国際公開日	平成15年5月1日(2003.5.1)	審査官	高堀 栄二
審査請求日	平成17年9月16日(2005.9.16)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2001-323293 (P2001-323293)		
(32) 優先日	平成13年10月22日(2001.10.22)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 細胞壁作用性薬剤のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞壁作用性薬剤の 中から特定の作用点を有する薬剤をスクリーニング方法 であって、下記の工程：

(1) レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物を細胞壁作用性の被検薬剤の存在下で培養する工程；

(2) 上記微生物 の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物の糖鎖を分析する工程；及び

(3) 工程(2)で得られたレポータータンパク質由来物の糖鎖の情報に基づいて該被検薬剤の細胞壁に対する作用点を推定する工程

を含む方法。

【請求項 2】

レポータータンパク質由来物の糖鎖の分析がレポーター蛋白質由来物の分子量測定により行われる 請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

レポーター蛋白質がグリーン・フルオロセセント・プロテインである 請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞壁作用性薬剤が抗真菌剤である 請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

上記工程(1)に先立って、細胞壁作用性薬剤のスクリーニングを下記の工程：

- (A1) レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物、及びレポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞膜に固定した微生物のそれぞれを被検薬剤の存在下で培養する工程；
- (A2) 上記各微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物を測定する工程；及び
- (A3) レポーター蛋白質を細胞壁に固定した微生物から培養液中にレポーター蛋白質由来物が流出し、かつレポーター蛋白質を細胞膜に固定した微生物からは培養液中にレポーター蛋白質由来物が実質的に流出しない場合に、該被検薬剤が細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤であると判定する工程；
- により行ない、上記工程(A3)により細胞壁に対して選択的な阻害作用を有すると判定された薬剤について上記(1)～(3)の工程を行なう請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項6】

細胞壁作用性薬剤の作用点の推定方法であって、下記の工程：

- (1) レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物を細胞壁作用性の被検薬剤の存在下で培養する工程；
- (2) 上記微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物の糖鎖を分析する工程；及び
- (3) 工程(2)で得られたレポータータンパク質由来物の糖鎖の情報に基づいて該被検薬剤の細胞壁に対する作用点を推定する工程；
- を含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光蛋白質などのレポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物を利用した細胞壁作用性薬剤のスクリーニング方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

深在性真菌症の発生頻度は易感染患者の増加とともに、ますます増加する傾向にあり、有効な治療薬が望まれている。現在、国内で上市されている深在性真菌症治療薬はわずか5剤のみであり、このうち3剤はアゾール系薬剤(ミコナゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール)である。その代表であるフルコナゾールは作用が静菌的であることに加え、使用量の増加とともに耐性菌の出現も懸念されている。一方、殺菌効果の高いポリエン系抗生物質であるアムホテリシンBは毒性も強く、必ずしも安全に使用できる薬剤ではない。これらの理由から、深在性真菌感染症での医療満足度は総じて低く、殺菌的かつ真菌選択的な新規薬剤への需要は依然として大きい。

30

【0003】

真菌細胞に特徴的に存在する細胞壁は選択性の観点から魅力的な標的である。パン酵母を例にとると細胞壁を構成する主要な糖ポリマーは、(1,3)- $\beta$ -グルカン、(1,6)- $\beta$ -グルカン、キチン、マンナンである。これらの糖ポリマーの合成経路のうち、マンナン合成経路は動物および真菌細胞間での存在自体や生合成経路についての共通性が高いため、真菌に特異的な標的を見出すことは不可能ではないものの、一般的に困難であると考えられる。(1,3)- $\beta$ -グルカン合成経路およびキチン合成経路には、FKS遺伝子群およびCHS遺伝子群などのように、真菌に特異的かつ生育に必須な酵素の存在が明らかになっており、これらを標的とした抗真菌剤の探索や開発が進められている。そして、(1,3)- $\beta$ -グルカン阻害作用を有するカンジン系抗真菌薬が実際に開発されている。これに対して、(1,6)- $\beta$ -グルカン合成経路も真菌に特異的な経路であると考えられ、遺伝学的解析の結果から真菌の生育に必須であると考えられる酵素の存在が明らかとなっているが、酵素レベルでのアッセイ系が確立されていないため阻害物質の報告もなく、この合成経路を阻害する抗真菌剤は未だ知られていない。

40

50

## 【 0 0 0 4 】

一般に、真核細胞には広くGPIアンカー蛋白質と総称される蛋白質が存在し、これらはGPIアンカーにより細胞膜に固定化される (Ferguson, M.A., et al., Ann. Rev. Biochem., 57, pp.285-320, 1988)。GPIアンカー蛋白質はN末端及びC末端に疎水性の高いシグナルペプチド領域を持ち、翻訳後の修飾によりこれらのシグナルは切断されるとともにC末端にGPIアンカーの付加を受け、ER(粗面小胞体)膜に固定される。その後、ER膜に固定化されたGPIアンカー蛋白質は膜上を輸送され、細胞膜に固定化される (Ferguson, M.A., et al., Ann. Rev. Biochem., 57, pp.285-320, 1988; Lu, C.F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pp.4825-4833, 1994)。

## 【 0 0 0 5 】

パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、細胞膜に固定化されたGPIアンカー蛋白質の一部はさらにGPIアンカーの一部が切断されて、新たに(1,6)- $\beta$ -グルカンをアンカーとして細胞壁に固定化される (Lu, C.F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pp.4825-4833, 1994; Kollar, R., et al., J. Biol. Chem., 272, pp.17762-17775, 1997)。

## 【 0 0 0 6 】

すなわち、パン酵母では細胞膜あるいは細胞壁に固定化された2種類のGPIアンカー蛋白質が存在し、この局在性の違いはC末端のシグナルペプチドの違いにより制御されることが予想されている (Hamada, K., et al., Mol. Gen. Genet., 258, pp.53-59, 1998; Caro, L., Yeast, 13, pp.1477-1489, 1997)。最近、このような蛋白質の細胞壁への局在化機構を利用して、外来の任意の蛋白質を細胞壁に固定化した酵母(アーミングイースト)の作出が報告された (Varrt, J.M.V.D., et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, pp.615-620, 1997; Murai, T., et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, pp.1362-1366, 1997)。

上述したように、(1,6)- $\beta$ -グルカンはGPIアンカー蛋白質を細胞壁に固定化するためのアンカーとしての機能を有しており、これまでの解析結果では、遺伝子破壊によって(1,6)- $\beta$ -グルカンの生合成を阻害すると、これらの蛋白質は細胞外へ流出する (Lu, C.F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pp.4825-4833, 1994; Lu, C.F., et al., J. Cell. Biol., 128, pp.333-340, 1995)。

## 【 0 0 0 7 】

最近、土屋らによりブドウ球菌細胞壁ペプチドグリカン結合型レポーター蛋白質の発現系の構築が報告されている (日本薬学会第120年会、要旨集2、第153頁、演題番号30[P B]15-71)。この系は、グラム陽性菌の細胞壁にレポーター蛋白質としてセファロsporinaゼをアンカリングさせたものである。しかしながら、この系の用途については明らかにされておらず、細胞壁作用性薬剤のスクリーニングに使用できることを示唆しないし教示していない。

## 【 0 0 0 8 】

また、従来、細胞壁作用性の薬剤の作用点を簡便かつ的確に推定する方法は(1,3)- $\beta$ -グルカンやキチンなどの細胞壁関連薬剤のスクリーニング方法以外に知られておらず、特定の作用点に作用する薬剤をスクリーニングする方法もその作用点以外のスクリーニングには利用できなかった。

## 【 発明の開示 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の課題は、細胞壁作用性薬剤のスクリーニング方法を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、細胞壁作用性薬剤のスクリーニング方法であって、細胞壁に対して阻害作用を有する薬剤の作用点を簡便かつ適切に判定することにより、特定の作用点に作用する薬剤を効率的にスクリーニングする方法を提供することにある。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

本発明者らは、先に、検出の容易な蛋白質(レポーター蛋白質)を細胞膜又は細胞壁に固

10

20

30

40

50

定した2種類の酵母(各々、膜型アーミングイースト又は壁型アーミングイーストと称する。)を作出し、実質的に壁型アーミングイーストでのみレポーター蛋白質が流出することを指標とすることで、細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤、例えば細胞壁を構成する(1,6)- $\beta$ -グルカン生合成酵素に対して選択的な阻害作用を有する薬剤をスクリーニングし得ることを見出した(PCT/JP01/3630)。

【0011】

本発明者らは上記の課題を解決すべくさらに研究を続けた結果、細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤の作用点に応じて、遊離するレポータータンパク質に付加している細胞壁を構成する上記糖鎖の分子量がそれぞれ異なり、遊離したレポータータンパク質の分子量を測定することによって薬剤の作用点を推定できることを見出した。すなわち、細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤の作用点に応じて遊離するレポーター蛋白質の糖鎖が異なるとの現象を発見したのである。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

10

【0012】

すなわち、本発明は、細胞壁作用性薬剤のスクリーニング方法であって、下記の工程：  
(1)レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物を細胞壁作用性の被検薬剤の存在下で培養する工程；

(2) 上記微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物の糖鎖を分析する工程；及び

(3)工程(2)で得られたレポータータンパク質由来物の糖鎖の情報に基づいて該被検薬剤の細胞壁に対する作用点を推定する工程

20

を含む方法を提供するものである。この方法は、好ましくは、細胞壁作用性薬剤の中から、所望の作用点を有する薬剤をスクリーニングするために用いられる。

【0013】

上記の発明の好ましい態様によれば、レポータータンパク質由来物の糖鎖の分析が、レポーター蛋白質由来物の分子量測定により行われる上記方法；レポーター蛋白質を細胞壁の(1,6)- $\beta$ -グルカンに固定した微生物を用いる上記の方法；微生物が酵母である上記の方法；レポーター蛋白質が蛍光蛋白質である上記の方法；蛍光蛋白質がグリーン・フルオレッセント・プロテインである上記の方法；並びに細胞壁に対する阻害作用が細胞壁の構築過程および/または糖鎖の生合成酵素(糖鎖の伸長に関する酵素)に対する阻害作用である上記の方法が提供される。細胞壁作用性薬剤は好ましくは抗真菌剤である。

30

【0014】

本発明のさらに好ましい態様では、上記方法の前に、細胞壁作用性薬剤をスクリーニングする工程を含む。この態様では、まず細胞壁作用性薬剤のスクリーニングを下記の工程：

(A1)レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物、及びレポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞膜に固定した微生物のそれぞれを被検薬剤の存在下で培養する工程；

(A2)上記各微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物を測定する工程；及び

(A3)レポーター蛋白質を細胞壁に固定した微生物から培養液中にレポーター蛋白質由来物が流出し、かつレポーター蛋白質を細胞膜に固定した微生物からは培養液中にレポーター蛋白質由来物が実質的に流出しない場合に、該被検薬剤が細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤であると判定する工程；

40

に従って行ない、この工程(A3)により細胞壁に対して選択的な阻害作用を有すると判定された薬剤について、上記(1)~(3)の工程を行って、該薬剤の中から所望の作用点を有する薬剤をスクリーニングすることができる。

【0015】

別の観点からは、細胞壁作用性薬剤の作用点の推定方法であって、下記の工程：

(1)レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物を細胞壁作用性の被検薬剤の存在下で培養する工程；

50

(2) 上記微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物の糖鎖を分析する工程；及び

(3)工程(2)で得られたレポータータンパク質由来物の糖鎖の情報（特に、分子量あるいは分子量パターン等）に基づいて該被検薬剤の細胞壁に対する作用点を推定する工程を含む方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明のスクリーニング方法は、細胞壁作用性薬剤の中から特定の作用点を有する薬剤をスクリーニングするために好適に用いることができる。一般的には、細胞壁作用性薬剤、好ましくは細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤を多数の化合物を含むライブラリーなどから1次スクリーニングにより選抜した後、その薬剤の作用点を確認するため、あるいは特定の作用点を有する薬剤をさらにスクリーニングするなどの目的で用いることができる。もっとも、本発明の方法の使用態様は上記のものに限定されることはなく、薬剤が細胞壁作用性であることがすでに分かっている場合、あるいは予測可能な場合には、上記の1次スクリーニングを省略して、その薬剤の作用点を確認する目的で被験薬剤に本発明の方法を直接適用してもよい。本発明の範囲にこのような態様が包含されることは言うまでもない。

【0017】

本明細書において「細胞壁作用性」という用語は、例えば、以下の酵素の一種又は二種以上に作用して、その酵素の働きを干渉することを意味している。

- (a)微生物の細胞壁を構成する成分（糖ポリマー）の合成酵素；
- (b)微生物の細胞壁を構成する成分（糖ポリマー）の合成酵素の働きを補助する酵素；
- (c)微生物の細胞壁を構成する成分（糖ポリマー）の合成酵素の働きを抑制する酵素；
- (d)上記(b)と(c)に属する酵素が上記(a)の合成酵素の働きを補助又は抑制するために必要な過程やこれに関わる酵素；
- (e)異なる糖ポリマー同士の架橋に働く過程やこれに関わる酵素；
- (f)糖ポリマーに限らず、細胞壁を構成する成分（例えば、細胞壁に存在するGPI蛋白質）の細胞壁へのアンカリング過程や、この過程に関わる酵素；
- (g)糖ポリマーが細胞壁内で正常に構築される過程やこれに関わる酵素；
- (h)細胞壁の合成を調節する過程や経路、およびこれに関わる酵素；
- (i)微生物細胞の分裂過程に働く過程やこれに関わる酵素；
- (j)微生物細胞の形態を変化させる過程やこれに関わる酵素；
- (k)構築された微生物細胞の細胞壁を消化する過程やこれに関わる酵素；
- (l)微生物が外界の環境変化に対応して、その細胞壁組成を大きく変化させる過程やこれに関わる酵素；及び
- (m)その他、上記の例にのみ限定されることはなく、微生物細胞壁の構築や合成、細胞壁の構造を変化させる過程やこれに関わる酵素。

【0018】

また、本明細書において「細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する」とは、細胞壁の合成や分解などを含めて、上記の(a)から(m)に記載の事象に関して特異的な阻害作用を有することを意味している。本明細書において、「薬剤」とは、低分子化合物又は高分子化合物のほか、天然物、蛋白質又はその一部、あるいはポリペプチド、そしてオリゴヌクレオチドなどの核酸などを含めて、生物学的な作用を有する物質を全て包含する概念として用いる。いかなる意味においても「薬剤」の語を限定的に解釈してはならず、最も広義に解釈しなければならない。

【0019】

本発明の方法を行うに先立って、細胞壁作用性の薬剤を化合物ライブラリーからスクリーニングすることが好ましい（本明細書において上記目的で行われるスクリーニングを「1次スクリーニング」と呼ぶ場合がある）。この方法は、通常、PCT/JP01/3630号明細書に記載された方法に従って行うことができる。より具体的には、細胞壁作用性薬剤は、下

記の工程：

(A1)レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物、及びレポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞膜に固定した微生物のそれぞれを被検薬剤の存在下で培養する工程；

(A2)上記各微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物を測定する工程；及び

(A3)レポーター蛋白質を細胞壁に固定した微生物から培養液中にレポーター蛋白質由来物が流出し、かつレポーター蛋白質を細胞膜に固定した微生物からは培養液中にレポーター蛋白質由来物が実質的に流出しない場合に、該被検薬剤が細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤であると判定する工程；

を含むスクリーニング方法にて選抜可能である。

10

【0020】

上記の1次スクリーニングでは、レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物、及びレポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞膜に固定した微生物のそれぞれを被検薬剤の存在下で培養した後、培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物を測定する。培地や温度、培養時間などの条件は微生物の種類に応じて適宜選択すればよい。微生物として酵母を用いる場合の培養の具体的方法については、PCT/JP01/3630号明細書に具体的に説明されている。なお、本明細書において用いられる「GPIアンカー蛋白質」という用語は、特定の蛋白質を意味するものではなく、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

【0021】

20

レポーター蛋白質はその性質が明らかになっている蛋白質であれば限定されず、蛍光測定などの分光学的手段、高速液体クロマトグラフィー、マススペクトル、又は酵素反応などの生化学的手段などの通常的手段によって検出可能な蛋白質であればその種類は特に限定されないが、例えば、蛍光性蛋白質などを好適に用いることができる。例えば、グリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)又はその変異体(EGFP: Dormack, B.P., et al., Gene, 173, pp.33-38など)を用いることが好ましい。本明細書において「グリーン・フルオレッセント・プロテイン」という用語はGFP及びその変異体を含めた概念として用いる。微生物としてはGPIアンカー蛋白質を有する真核細胞微生物であればその種類は特に限定されないが、例えばパン酵母(*S. cerevisiae*)などの酵母を用いることが好ましい。

【0022】

30

酵母においては、細胞膜に固定化されたGPIアンカー蛋白質の一部が(1,6)- $\alpha$ -グルカンをアンカーとして細胞壁に固定化されることが知られている(Lu, C. F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pp.4825-4833, 1994; Kollar, R., et al., J. Biol. Chem., 272, pp.17762-17775, 1997)。また、融合蛋白質の製造によって酵素を微生物の細胞壁に固定化する方法が知られている(クリスら、特表平7-508652号公報)。こうした知見を利用して、外来の蛋白質を酵母の細胞壁に固定化する方法が開発されている(Varrt, J.M.V.D., et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, pp.615-620, 1997; Murai, T., et al., Appl. Environ. Microbiol., 63, pp.1362-1366, 1997)。GPIアンカー蛋白質はGPIアンカー型蛋白質ともよばれ、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型蛋白質、ホスファチジルイノシトールアンカー型蛋白質、PIアンカー型蛋白質などとも呼ばれる場合がある。

40

【0023】

従って、微生物として酵母を用いることが好ましいが、酵母を用いる場合には、上記の刊行物に記載された方法に従って、レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁又は細胞膜に固定した酵母を作出することができる。PCT/JP01/3630号明細書の実施例にはその具体的方法が示されており、当業者は上記刊行物に記載された方法に従って、所望の微生物を生産することが可能である。

【0024】

本明細書のスクリーニング法において、レポーター蛋白質由来物とは、薬剤の作用により細胞壁から遊離し、かつレポーター蛋白質の全部又はその主要な部分を含む単一の蛋白質又は複数の蛋白質の集合体である(本明細書において、レポーター蛋白質由来物の用語

50

は、特に言及しない場合には単一物質又は複数の物質の混合物のいずれの意味でも用いる)。後述するように、レポーター蛋白質が細胞壁に固定されている場合には、細胞壁作用性薬剤の作用点の違いに応じて、各々特有の糖鎖を有するレポーター蛋白質由来物が生成する。

【0025】

上記の1次スクリーニングの培養工程において(この1次スクリーニングの場合、レポーター蛋白質由来物には、細胞壁から遊離するものだけでなく、細胞膜から遊離するところの、細胞壁のレポーター蛋白質由来物に対応した蛋白(類)も含まれる)、培養液中にレポーター蛋白質由来物の流出が認められる場合には、その微生物の細胞壁又は細胞膜が被検薬剤の作用により損傷を受けたと解釈でき、レポーター蛋白質由来物が流出するものと考えられる(Lu, C.F., et al., Mol. Cell Biol., 14, pp.4825-4833, 1994; Lu, C.F., et al., J. Cell. Biol., 128, pp.333-340, 1995)。例えば、真菌に対して選択毒性を有する薬剤として細胞壁を選択的に損傷させる薬剤をスクリーニングする場合には、レポーター蛋白質を細胞壁に固定した微生物から培養液中にレポーター蛋白質由来物が流出し、かつレポーター蛋白質を細胞膜に固定した微生物からは培養液中にレポーター蛋白質由来物が実質的に流出しないことを判定基準として、その条件を満足する薬剤を選択すればよい。この判定基準により陽性と判断される薬剤は、細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤であると推定できる。

10

【0026】

1次スクリーニングにおいて、レポーター蛋白質由来物の測定は、レポーター蛋白質の種類や性質に応じて適宜の方法を選択すればよい。例えば、レポーター蛋白質としてグリーン・フルオレッセント・プロテインを用いる場合には、培養液の蛍光スペクトルを測定することによりレポーター蛋白質由来物の流出を検出することが可能である。

20

【0027】

本発明の方法は、好ましくは上記の1次スクリーニングにより選抜された細胞壁作用性薬剤から特定の作用点を有する薬剤をスクリーニングするために用いられ、下記の工程：  
(1)レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定した微生物を細胞壁作用性の被検薬剤の存在下で培養する工程；  
(2)上記微生物の培養液中に流出したレポーター蛋白質由来物の糖鎖を分析する工程；及び  
(3)工程(2)で得られたレポータータンパク質由来物の糖鎖の情報に基づいて該被検薬剤の細胞壁に対する作用点を推定する工程；  
を含むことを特徴としている。

30

【0028】

本発明の方法において用いられる微生物は、上記の1次スクリーニングについての説明で言及した微生物のうち、GPIアンカー蛋白質としてレポーター蛋白質が細胞壁に固定した微生物であり、好ましい態様では、レポーター蛋白質を細胞壁の(1,6)- $\alpha$ -グルカンに固定した微生物などを用いることができる。また、1次スクリーニングの説明で言及したとおり、微生物としては酵母を用いることが好ましい。本発明の方法において用いられる微生物において、レポーター蛋白質としては蛍光蛋白質を用いることが好ましく、グリーン・フルオレッセント・プロテインを用いることが特に好ましい。

40

【0029】

本発明の方法では、細胞壁作用性薬剤の作用点の違いによってレポーター蛋白質由来物に結合する糖鎖が変化することを利用し、その糖鎖を分析することにより、好ましくはレポーター蛋白質由来物の分子量(特に、分子量変化や分子量パターン)を測定することにより、被検薬剤の作用点を推定することを特徴としている。

【0030】

GPIアンカー蛋白質として細胞壁に固定されたレポーター蛋白質には、通常、アンカリングに關与する(1,6)- $\alpha$ -グルカン及び/又は(1,3)- $\alpha$ -グルカンのほか、N-グリコシル鎖及びO-グリコシル鎖などの複数の種類の糖鎖が結合している。細胞壁作用性薬剤、例えば

50

、(1,6)- $\beta$ -グルカンの合成阻害薬、(1,3)- $\beta$ -グルカンの合成阻害薬、マンナンの合成阻害薬(N型糖鎖またはO型糖鎖)、ヘテロ糖鎖のクロスリンクの阻害剤、糖鎖合成の調節を阻害する薬剤、及びGPIアンカーの合成阻害剤などは、上記微生物に作用してそれぞれレポーター蛋白質由来物を流出させる能力を有するが、これらの薬剤は上記の各糖鎖に対して異なる作用点で作用することから、レポーター蛋白質に結合した上記糖鎖はこれらの薬剤の作用点に応じて特徴的に変化する。この結果、薬剤の作用により遊離したレポーター蛋白質由来物は、これらの薬剤の作用点に応じた異なる糖鎖断片を有する(あるいは特定の糖鎖を欠落する)ことになる。

#### 【0031】

本発明の方法において、レポーター蛋白質由来物の糖鎖の分析方法は特に限定されない。本明細書において用いられる「糖鎖の分析」という用語は、糖鎖部分の分子量の測定や構造決定のほか、レポーター蛋白質由来物全体についての分子量測定などを含めて、最も広義に解釈する必要がある。糖鎖の違いを証明できる手段であればいかなる方法を採用してもよい。最も簡便には、ポリアクリルアミドゲルなどを用いた電気泳動によりレポーター蛋白質由来物全体の分子量を測定することによって糖鎖を分析することができ、ウエスタンブロッティングなど当業者に周知かつ汎用の手法により、糖鎖の違いを反映したレポーター蛋白質由来物の分子量分布を可視的に確認することが可能である。本明細書において用いられる「分子量の測定」という用語は、分子量の比較を行うのに十分な情報を与えるものであればよく、その用語をいかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

#### 【0032】

本発明の方法は、細胞壁作用性薬剤の中から、例えば、(1,6)- $\beta$ -グルカンの生合成阻害作用を有する薬剤、又は(1,6)- $\beta$ -グルカンの生合成に関与する1又は2以上の酵素に対して阻害作用を有する薬剤をスクリーニングするために特に好適に利用できる。さらに本発明の方法は(1,3)- $\beta$ -グルカン阻害薬やその他の作用によって細胞壁の合成や構築が阻害される薬剤(これは作用点が未知であってもよい)をスクリーニングすることも可能である。そして、細胞壁作用性薬剤の具体例としては、例えば、抗真菌剤などを挙げることができるが、本発明の方法によりスクリーニング可能な薬剤は抗真菌剤に限定されることはない。

#### 【実施例】

#### 【0033】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

#### 例1(参考例)

##### (1)材料および方法

##### (A)使用菌株および形質転換

*Escherichia coli* JM109, TOP10F'およびDH5 株, *S. cerevisiae* YPH500株(MAT ade2, his3, leu2, lys2, trp1, ura3), IFO 0565株, IFO 1226株およびKRE6破壊株を用いた。形質転換法は公知の方法またはyeast transformation kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて指示書にしたがって実施した。

##### (B)使用薬剤

下記に示す薬剤を使用した。

#### 【0034】

#### 【表1】

10

20

30

40

薬剤	略称	作用	
アクレアシンA	AC	細胞壁((1,3)- $\beta$ -glucan)合成阻害	
ツニカマイシン	TM	細胞壁(N型糖鎖)合成阻害	
ニッコーマイシンZ	NM	細胞壁(キチン)合成阻害	
カルコフルオールホワイト	CW	細胞壁への物理的吸着	
コンゴレッド	CR	細胞壁への物理的吸着	
アムホテリシンB	AMPH	細胞膜障害 (エルゴステロールとの結合)	10
フルコナゾール	FCZ	細胞膜(エルゴステロール)合成阻害	
オーレオバシディン	AB	細胞膜(スフィンゴリピド)合成阻害	
セルレニン	CE	細胞膜(脂肪酸)合成阻害	
サリノマイシン	SM	細胞膜障害(イオノフォア)	
フルシトシン	5-FC	核酸合成阻害	20
ゼオシン	ZE	核酸への結合	
ネトロプシン	NE	核酸合成阻害	
シクロヘキシミド	CH	蛋白質合成阻害	
アザセリン	AS	蛋白質合成阻害	
プロモコンドウリトール	BC	マンノシダーゼ阻害	
カフェイン	CA	細胞内情報伝達(c-AMP)阻害	

30

## 【 0 0 3 5 】

## (C) オリゴヌクレオチド

以下に示すオリゴヌクレオチドを実験に供試した。M13 universal primerおよびM13 reverse primerはファルマシア社より購入し、それ以外は合成したものをを用いた。これらは、レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として微生物の細胞壁又は細胞膜に固定するために用いる遺伝子として利用できる。

GFP-SM2(5'-GGCATGGATGAGATCTACAAATAATG-3')

GFP-SM3(5'-CATGATTACGCCGAGCTCGCATGCCTG-3')

GFP-SM4(5'-CAACACTTGTCACTACGTTAACTTATGGTGTTCATG-3')

YEX-SM2(5'-CCTGTGATTTCTCCAGCTCGAATTC-3')

YEX-SM3(5'-GATTCATTAATGCATGCTGGCAGCAGG-3')

YEX-SM4(5'-GATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAG-3')

YEX-SM5(5'-CTCACGGTATCGCCCTCGAGATCTCTGAATCC-3')

YEX-SM6(5'-GAGACCCTCTTCTGAGCTCTCTGAATCC-3')

YEX-SM7(5'-AAACCAAAAGATCGACTAGTATAAAATGAATATA-3')

YEX-SM8(5'-CATTAAATGCATGCTGGCAGCAG-3')

YEX-SM9(5'-CTTTAACGAGTCCGCGGATTTCTCCAGCTCG-3')

SUC2-sen1(5'-GCACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCTTTTC-3')

SUC2-anti2(5'-GCGAGCTCTTTGATGCAGATATTTGGCTGCAA-3')

GAS1-sen1(5'-GCAGATCTGTAGTGTGATTTGGGTTCCGG-3')

40

50

GAS1-anti3(5'-GCCCGCGCTTATCGAGTTATTATGTATGTGTCGAAGC-3')  
 CWP2-sen1(5'-GCAGATCTACTTTGTTGCCGCTGAATCCG-3')  
 CWP2-anti1(5'-GCGAATTCGAGAAATCACAGGACTCGTTAAAG-3')  
 MEL1-sen1(5'-GCGAATTCGAGAGCAACGGTAATAAAAGCAACGACG-3')  
 MEL1-sen3(5'-CGGAGCTCGGTGTCTCCGAGTTACAATGGC-3')  
 MEL1-anti1(5'-GCAGATCTAGAAGGCGATACCGTGAGCTGGAAC-3')  
 MEL1-anti2(5'-CGGAGCTCCATCAATACTTCTCGCCCTGCT-3')  
 MEL1-anti3(5'-GCAGATCTAAGAAGAGGGTCTCAACCTATAGAAG-3')  
 M13 universal primerおよびM13 reverse primer

【 0 0 3 6 】

10

(D) プラスミド

pUC19, YEp13, YEp24 (以上、Pouwels, P.H. et al., Cloning vectors, Elsevier science publishers B.V., 1985), pYPR2831 (Horiuchi, H. et al., Agric. Biol. Chem., 54, 1771-1779, 1990), pGFPuv (Clontech, Palo Alto, CA, USA)およびpYEX-S1 (Amrad, Victoria, Australia)を用いて、以下のプラスミドを作製して用いた。これらには、レポーター蛋白質をGPIアンカー蛋白質として微生物の細胞壁又は細胞膜に固定するために用いる遺伝子を含む組換えベクターが含まれる。PCR産物のサブクローニングにはpGEM-T vector system (Promega, Madison, WI, USA)を用い、変異の導入にはTransformer site-directed mutagenesis kit (Clontech)を用いた。アガロースからのDNA断片の回収、脱リン酸化、平滑化、ライゲーションおよび制限酵素消化は常法に従って行った。主なプラスミドの構造を第1図に示した。図中、oriB: 大腸菌の複製起点、ori Y: パン酵母の複製起点、Ampr: アンピシリン耐性遺伝子、dLEU2: LEU2の部分欠損マーカー、Pro: フォスフォグリセレートキナーゼ・プロモーター、SS: 分泌シグナル、Ter: フォスフォグリセレートキナーゼ・ターミネーターを示す。

20

【 0 0 3 7 】

pUXS1: YEp24のHindIII消化断片をpUC19のHindIII siteに挿入した。  
 pUXS2: YEp13のXhoI, Sall消化断片をpUC19のSall siteに挿入した。  
 pUAC1: CWP2 (Varrrt, J.M. et al., J. Bacteriol., 177, 3104-3110, 1995)の一部をPCRで増幅(鋳型; YPH500株染色体DNA, プライマー; CWP2-sen1およびCWP2-anti1)させ、pGEM-Tにサブクローニングした。  
 pUAC1a: pUAC1をEcoRI, PstI消化後、self-ligationさせた。  
 pUAC3: MEL1 (Liljestrom, P.L., Nucl. Acids Res., 13, pp.7257-7268, 1985)の一部をPCRで増幅(鋳型; IFO 0565株染色体DNA, プライマー; MEL1-sen1およびMEL1-anti1)させ、pGEM-Tにサブクローニングした。  
 pUAC5a: pUAC3のScaI, BglII消化断片をpUAC1aのScaI, BglII siteに挿入した。  
 pUAC8: MEL1の一部をPCRで増幅(鋳型; IFO 1226株染色体DNA, プライマー; MEL1-sen3およびMEL1-anti1)させ、pGEM-Tにサブクローニングした。  
 pUAC12: SUC2 (Taussig, R. et al., Nucl. Acids Res., 11, pp.1943-1954, 1983)の一部をPCRで増幅(鋳型; YHP500株染色体DNA, プライマー; SUC2-sen1およびSUC2-anti2)させ、pGEM-Tにサブクローニングした。  
 pUAC13: MEL1の一部をPCRで増幅(鋳型; IFO 0565株染色体DNA, プライマー; MEL1-sen3およびMEL1-anti3)させ、pGEM-Tにサブクローニングした。

30

40

【 0 0 3 8 】

pUAC14: pGFPuvに変異を導入した(プライマー; GFP-SM2, GFP-SM3)。  
 pUAC15: pEAC8aをStuI消化後、self-ligationさせた。  
 pUAC15a: pUAC15に変異を導入した(プライマー; YEX-SM4, YEX-SM7)。  
 pUAC16: pUAC12のNaeI, SpeI消化断片をpUAC15aのSpeI, StuI siteに挿入した。  
 pUAC19: pUXS1のEcoRV, PvuII消化断片をpEAC12のEcoRV siteに挿入した。  
 PUAC19a: pUAC19に変異を導入した(プライマー; GFP-SM4, YEX-SM8, YEX-SM9)。  
 pUAC20: pUXS2のEcoRV, PvuII消化断片をpEAC12のEcoRV siteに挿入した。

50

pUAC20a: pUAC20に変異を導入した(プライマー; GFP-SM4, YEX-SM8, YEX-SM9)。  
 pUAC21: pYPR2831のPstI消化断片を平滑化し、pEAC12のEcoRV siteに挿入した。  
 pUAC21a: pUAC19aのSacI, BglIII消化断片をpUAC21のSacI, BglIII siteに挿入した。  
 pUAC28: GAS1 (Vai, M., et al., J. Biol. Chem., 266, 12242-12248, 1990)の一部をPCRで増幅(鋳型; YPH500株染色体DNA, プライマー; GAS1-sen1およびGAS1-anti3)させ、pGEM-Tにサブクローニングした。

## 【 0 0 3 9 】

pUAC29b: pUAC28のBglIII, SacII消化断片をpUAC20aのBglIII, SacII siteに挿入した。  
 pUAC30b: pUAC29bのBglIII, BamHI消化断片をpUAC19aのBglIII siteに挿入した。  
 pUAC31b: pUAC29bのBglIII, BamHI消化断片をpUAC21aのBglIII siteに挿入した。 10  
 pEAC3: pUAC5aのEcoRI, SalI消化断片をpYPR2831のEcoRI, SalI siteに挿入した。  
 pEAC6: pEAC3の一部をPCRで増幅(鋳型; pEAC3, プライマー; MEL1-sen3およびMEL1-anti2)させ、pGEM-TにサブクローニングしたプラスミドのSacI消化断片をpYEX-S1のSacI siteに挿入した。  
 pEAC6a: pEAC6に変異を導入した(プライマー; YEX-SM2, YEX-SM3)。  
 pEAC7: pUAC8のSacI, BglIII消化断片をpEAC6aのSacI, BglIII siteに挿入した。  
 pEAC7a: pEAC7に変異を導入した(プライマー; YEX-SM4, YEX-SM5)。  
 pEAC8: pUAC13のSacI, BglIII消化断片をpEAC6aのSacI, BglIII siteに挿入した。  
 pEAC8a: pEAC8に変異を導入した(プライマー; YEX-SM6)。  
 pEAC9: pUAC14のSacI, BglIII消化断片をpEAC6aのSacI, BglIII siteに挿入した。 20  
 pEAC11: pEAC7aのSacI, NdeI消化断片をpUAC16のSacI, NdeI siteに挿入した。  
 pEAC12: pEAC9のSacI, BglIII消化断片をpEAC11のSacI, BglIII siteに挿入した。

## 【 0 0 4 0 】

第1図において、pEAC6a: Reporter= -ガラクトシダーゼ、pEAC8a: Reporter=GFPuv、pUAC19: Reporter=EGFP, Marker=URA3, AS=CWP2アンカリングシグナル、pUAC19a: Reporter=EGFP, Marker=URA3, AS=CWP2アンカリングシグナル、pUAC20a: Reporter=EGFP, Marker=LEU2, AS=CWP2アンカリングシグナル、pUAC21a: Reporter=EGFP, Marker=TRP1, AS=CWP2アンカリングシグナル、pUAC29b: Reporter=EGFP, Marker=LEU2, AS=GAS1アンカリングシグナル、pUAC30b: Reporter=EGFP, Marker=URA3, AS=GAS1アンカリングシグナル、pUAC31b: Reporter=EGFPuv, Marker= TRP1, AS=GAS1アンカリングシグナルである。 30

## 【 0 0 4 1 】

## (E)アーミングイーストの作出

レポーター蛋白質として*S. cerevisiae*由来の -ガラクトシダーゼ (Turakainen, H., et al., Appl. Environ. Microbiol., 59, 2622-2630, 1993; MEL1)またはグリーン・フルオロセプト・プロテイン (green fluorescent protein: GFP)を選択した。GFPはGFPuvおよびEGFPuv (Cormack, B.P., et al., Gene, 173, 33-38, 1996; GFPuvにPhe64 LeuおよびSer65 Thrになるように変異を導入したもの)を用いた。次いで、これらの蛋白質のN末端側にSUC2の分泌シグナル、C末端側にCWP2のGPIアンカリングシグナルをそれぞれ付加した融合蛋白質をコードする遺伝子を設計してホスホグリセレートキナーゼのプロモーターとターミネターの間に挿入し、発現カセットとした。この発現カセットをYEp型ベクターに挿入したプラスミド(pEAC6a, pEAC8aおよびpEAC9)をそれぞれ形質転換(AYE1, AYE2およびAYE3株)、またはYIp型ベクターに挿入したプラスミド(pUAC19a, pUAC20aおよびpUAC21a)を線状化した後に、菌株の染色体DNAに組み込んで壁型アーミングイースト(AY-2, AY-5, AY-16, AY-14, AY-17株)を作出した。膜型アーミングイースト(AY-12, AY-15株)はGPIアンカリングシグナルをGAS1由来のものに置き換えて(pUAC29b, pUAC30bおよびpUAC31b)作出した。作出した菌株を表2に示した。 40

## 【 0 0 4 2 】

## 【表2】

菌株	遺伝子型 (genotype)	表現型 (phenotype)	遺伝子操作	
YPH500 (親株)	MAT $\alpha$ ade2,his3,leu2,lys2,trp1,ura3			
AYE-1	MAT $\alpha$ YPH500(pEAC6a)	Leu+,Ura+		
AYE-2	MAT $\alpha$ YPH500(pEAC8a)	Leu+,Ura+		
AYE-3	MAT $\alpha$ YPH500(pEAC9)	Leu+,Ura+		
AY-2	MAT $\alpha$ YPH500	Ura+	EGFPuv-CWP2(pUAC19a)	
AY-5	MAT $\alpha$ YPH500	Leu+,Ura+	EGFPuv-CWP2 $\times$ 2(pUAC19a,pUAC20a)	10
AY-10	MAT $\alpha$ YPH500	Leu+,Trp+	EGFPuv-CWP2(pUAC20a,pUAC21a)	
AY-12	MAT $\alpha$ YPH500	Leu+,Ura+	EGFPuv-GAS1 $\times$ 2(pUAC29b,pUAC31b)	
AY-14	MAT $\alpha$ YPH500	Leu+,Trp+,Ura+	EGFPuv-CWP2 $\times$ 3(pUAC19a,pUAC20a, pUAC21a)	
AY-15	MAT $\alpha$ YPH500	Leu+,Trp+,Ura+	EGFPuv-GAS1 $\times$ 3(pUAC29b,pUAC30b, pUAC31b)	
AY-16	MAT $\alpha$ YPH500 kre6 $\Delta$ ::URA3	Leu+,Trp+,Ura+	EGFPuv-CWP2 $\times$ 2(pUAC20a,pUAC21a)	
AY-17	MAT $\alpha$ YPH500	Leu+,Ura+	GFPuv-CWP2 $\times$ 2(pUAC19,pUAC20)	

## 【 0 0 4 3 】

## (F) 培地

YPAUD (1% イーストエクストラクト, 2% ペプトン, 2% グルコース, 40  $\mu$ g/ml アデニン, 20  $\mu$ g/ml ウラシル), RPMIB [RPMI1640 (Sigma), 1 Mソルビトール, 100 mMリン酸カリウムバッファー (pH 4.0~7.0), 2% グルコース, 40  $\mu$ g/ml アデニン, 20  $\mu$ g/ml ウラシル], YNB [0.67% yeast nitrogen base without amino acid, (Difco), 2% グルコース, 添加栄養素 (40  $\mu$ g/ml アデニン, 20  $\mu$ g/ml ヒスチジン, 60  $\mu$ g/ml ロイシン, 30  $\mu$ g/ml リジン, 40  $\mu$ g/ml トリプトファン, 20  $\mu$ g/ml ウラシル)]を適宜用いた。また、寒天培地は上記の液体培地に1.5~2% アガロースを添加した。

## 【 0 0 4 4 】

## (G) -ガラクトシダーゼ活性の測定

Schreuderら (Schreuder, M.P., et al., Yeast, 9, 399-409, 1993)の方法を用いた。すなわち、YNBで培養した対数増殖後期の培養液160  $\mu$ lに1 M酢酸バッファー (pH 4.5)および0.1 M p-ニトロフェニル- -ガラクトピラノシド (Boehringer manheim)を各20  $\mu$ l加え、37  $^{\circ}$ Cで5分間反応させた。反応液に1 mlの2% 炭酸ナトリウムを加えた後に、吸光度(OD<sub>410</sub>)を測定した。

## 【 0 0 4 5 】

## (H) GFP発現株の蛍光強度測定

RPMIB (pH 7.0)で培養した対数増殖期の菌を集め、水にOD<sub>595</sub>=1.0になるように浮遊させて測定した。蛍光強度および至適波長の測定は蛍光光度計 (F-2000, 日立工機)を用いて行った。また、個々の細胞の蛍光の検出には蛍光顕微鏡 (Axioplan, Zeiss)を用いた。

## 【 0 0 4 6 】

## (I) Zymolyase作用によるGFP流出効果の測定

液体培地で培養した対数増殖期の酵母を集め、適当なバッファーに浮遊させた。これにZymolyase 100T (生化学工業)を添加(400~6.25  $\mu$ g/ml)し、30  $^{\circ}$ Cで30分間振盪した。反応後、フィルターでろ過して酵母とバッファーを分離し、バッファー中の蛍光強度を蛍光光度計で測定した(excitation = 487 nm, emission = 513 nm)。

## 【 0 0 4 7 】

## (J) GFPの局在比較

液体培地で培養した対数増殖期の菌 (AY-2株)をガラスビーズを用いて物理的に粉碎したのち、細胞壁、細胞膜および可溶性蛋白質を分画し、適当なバッファーに懸濁した。それぞれの画分の蛍光強度を測定し(excitation = 487 nm, emission = 513 nm)、各画分の蛍光強度を菌全体の総蛍光強度に対する比率で表した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 8 】

## (K)KRE6破壊株のGFP流出効果の測定

KRE6破壊株 (AY-16株) を30 で振盪培養し、3および6時間後にフィルターで培養液をろ過して培地中の蛍光強度を測定した。

## 【 0 0 4 9 】

## (L)既存抗真菌試薬によるGFP流出効果の測定

培養した対数増殖期の菌 (AY-2株およびAY-12株) を集め、各種の薬剤を作用させた。培養上清の蛍光強度はCytofluor2300蛍光測定装置 (Millipore) を用いて測定した (excitation = 480 nm, emission = 530 nm)。各種薬剤作用時の蛍光強度は薬剤無添加対照の蛍光強度との差で示した。

10

## 【 0 0 5 0 】

## (2)結果

## (A)各種壁型アーミングイーストの性状解析

レポーター蛋白質として  $\beta$ -galactocidase、GFPuv、及びEGFPuvの3種類を、発現方法として高コピーベクターを用いる方法と染色体へ挿入する方法を用いて種々の壁型アーミングイーストを作出し、これらの菌株の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性および蛍光強度を比較した。その結果、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現株 (AYE-1株およびAYE-2株) には、いずれも微弱な活性が認められるのみであった。また、GFPuvを高コピーベクターを用いて発現させた菌株 (AYE-3株) を蛍光顕微鏡で観察した結果、個々の細胞間での蛍光強度に大きなバラツキが認められたことから、プラスミドの安定性に問題があると考えられた。一方、EGFPuv およびGFPuv発現カセットを染色体へ挿入した菌株 (AY-5株およびAY-17株) の蛍光強度を比較した結果 (表 3)、EGFPuvの蛍光強度はGFPuvのそれより3倍以上強かった。以上の結果から、レポーター蛋白質として蛍光蛋白質を用いることが適当であり、EGFPuvをレポーター蛋白質として染色体に組込んだ株が特に好適であると結論できた。本菌株の至適波長を測定した結果、excitation max = 487 nm, emission max = 513 nmであった。

20

## 【 0 0 5 1 】

## 【表 3】

	excitation(nm)	emission(nm)	fluorescence
YPH500	487	513	260
AY-5	487	513	1260
YPH500	395	509	50
AY-17	395	509	350

30

対数増殖期の菌株を水に懸濁し、蛍光強度を測定した。

## 【 0 0 5 2 】

## (B)Zymolyase作用によるGFP流出効果の測定

AY-2株を試験管内で増殖させ、菌体を集めてZymolyaseを作用させた。作用後の培養上清中の蛍光強度を測定した。浸透圧保護下でAY-2株にZymolyaseを作用させた結果、添加したZymolyaseの濃度に依存してバッファー中の蛍光強度が上昇した (表 4)。この結果から、大量のGFPが細胞壁に固定化されていることが示唆された。

40

## 【 0 0 5 3 】

## 【表 4】

zymolyase( $\mu\text{g/ml}$ )	蛍光強度
400	2160
200	1240
100	1170
50	786
25	410
12.5	215
6.25	126
0	107

10

## 【0054】

## (C)KRE6破壊株のGFP流出効果の測定

Saccharomyces cerevisiae(パン酵母)における(1,6)- $\beta$ -グルカンの生合成には少なくとも6種類の酵素が関与していることが推定されている。これらの酵素のうち、ゴルジ体に存在するKRE6<sup>-</sup>遺伝子がコードする産物(蛋白質)およびそのホモログであるSKN1遺伝子がコードする産物(蛋白質)の少なくとも1つは生育に必須であることが明らかとなっている(Gaughran, J.P. et al., J. Bacteriol., 176, pp.5857-5860, 1994)。また、KRE6ホモログはCandida albicans(代表的な病原性真菌)などの真菌にも広く存在すると推定されている。以上の知見から、Kre6p(KRE6遺伝子の産物)は新規な抗真菌剤を開発するために好ましい標的であると推測される。

20

## 【0055】

KRE6の破壊によるGFP流出効果を確認する目的で、AY-5株およびAY-16(KRE6破壊)株を試験管内で培養し、経時的にGFPの流出を測定した(第2図)。その結果、両株の培養液(菌+培地)にはいずれの培養時間においても同等の蛍光強度が検出されたのに対し、培養上清の比較では、AY-16株の方がAY-5株よりも明らかに高かった。さらに、これら2株の酵母を試験管内で培養し、対数増殖期にある菌を蛍光顕微鏡下( $\times 400$ )で観察したところ、AY-16株では蛍光強度が減弱していた。これらの結果は、KRE6の破壊がGFPの流出を促進することを示しており、作出した微生物(アーミングイースト)を用いてKRE6<sup>-</sup>遺伝子の産物を阻害する薬剤をスクリーニングし得る実験成績であった。

30

## 【0056】

## (D)GFPの局在性の比較

AY-2株(壁型アーミングイースト)およびAY-12株(膜型アーミングイースト)におけるGFPの局在性を比較した。各々の菌を試験管内で増殖させ、菌体を集めて細胞壁、細胞膜および可溶性蛋白質に分画した。得られた画分の蛍光強度を測定し、総蛍光強度に対する比率を算出した(単位:%)。結果を表5に示す。壁型アーミングイーストでは細胞壁に、膜型アーミングイーストでは細胞膜にそれぞれ大量のGFPが固定化されていることが明らかとなった。

40

## 【0057】

## 【表5】

	AY-2	AY-12
細胞壁画分	40	11
細胞膜画分	15	48
可溶性蛋白質画分	45	41

## 【 0 0 5 8 】

## (E) 既存抗真菌試薬によるGFP流出効果の測定

10

上記方法がKre6p以外の作用点を有する薬剤のスクリーニングに利用できるか否かを確認する目的で、既存抗真菌試薬作用時のAY-2株(壁型アーミングイースト)およびAY-12株(膜型アーミングイースト)におけるGFP流出効果を比較した。まず、試験管内で培養したAY-2株およびAY-12株を浸透圧を保護した培地(RPM1B)に浮遊させ、薬剤を作用させた。培養後、上清の蛍光強度を測定し、薬剤無添加対照との差を算出した。その結果を第3図に示す。

## 【 0 0 5 9 】

細胞壁を作用点とするアクレアシンA (Aculeacin A: (1,3)- $\beta$ -グルカン合成阻害剤)、ツニカマイシン (Tunicamycin: マンナン合成阻害剤) ではAY-2株において顕著なGFP流出効果が認められたが、AY-12株においては流出効果はほとんど認められなかった。細胞膜を作用点とするアムホテリシンB (Amphotericin B)、フルコナゾール (Fluconazole)、およびサリノマイシン (Salinomycin) はどちらの菌株においても若干の流出効果が認められた。上記以外の試薬では、壁型アーミングイースト (AY-2株) に対してのみ明瞭なGFP流出効果を示すものは認められなかった。以上の結果から、上記スクリーニング方法によって、種々の種類の細胞壁作用性薬剤をスクリーニングできることが明らかとなった。

20

## 【 0 0 6 0 】

以下の配列表に微生物AY-15株及びAY-14株に保持させた遺伝子を示す。

配列番号1は膜型アーミングイーストであるAY-15株がゲノム組み込み型として保持する遺伝子であり、SS(分泌シグナル)-EGFPuv-膜アンカリングシグナル(AS)の塩基配列に相当しており、市販のGFPuvに変異を加えてある(312番目をgに、315番目をa、316番目をaに置換した。オリジナルのGFPuvではそれぞれt、c、tである。)

30

## 【 0 0 6 1 】

配列番号2は壁型アーミングイーストであるAY-14株がゲノム組み込み型として保持する遺伝子であり、SS(分泌シグナル)-EGFPuv-壁アンカリングシグナル(AS)の塩基配列に相当しており、市販のGFPuvに変異を加えてある(312番目をgに、315番目をa、316番目をaに置換した。オリジナルのGFPuvではそれぞれt、c、tである。)

## 【 0 0 6 2 】

## 例2(本発明)

## (1) 試験材料および方法

## (A) 菌株、細胞、形質転換法、及び培地

40

*Escherichia coli* JM109およびDH5(株)、*Saccharomyces cerevisiae* YPH499株およびYPH500株を用いた。形質転換法としては上記例1に記載された方法、またはyeast transformation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて指示書に従って実施した。今回用いた菌株を表6に示す。培地は例1に記載した培地を適宜使用した。

## 【 0 0 6 3 】

## 【表6】

菌株	遺伝子型 (genotype)	表現型 (phenotype)	遺伝子操作
YPH499	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2, his3, leu2, lys2, trp1, ura3</i>		
YPH500	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2, his3, leu2, lys2, trp1, ura3</i>		
AY-10	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500</i>	Leu+, Trp+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a)
AY-10u	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUXS1
AY-10a	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 gas1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB6
AY-10b	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 kex2::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB8
AY-10c	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 skn1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB10
AY-10d	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 bck1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB18
AY-10e	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 pmt1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB19
AY-10f	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 pmt2::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB20
AY-10g	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 pmt4::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB21
AY-10h	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 fks1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB23
AY-10i	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 kre2::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB22
AY-10j	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 mnn9::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB24
AY-10k	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 kre6::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB9
AY-10l	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 gpi::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x2(pUAC20a,pUAC21a),pUAB7
AY-12	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500</i>	Leu+, Trp+	
AY-12u	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUXS1
AY-12a	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 gas1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB6
AY-12b	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 kex2::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB 8
AY-12c	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 skn1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB10
AY-12d	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 bck1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB18
AY-12e	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 pmt1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB19
AY-12f	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 pmt2::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB20
AY-12g	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 pmt4::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB21
AY-12h	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 fks1::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB23
AY-12i	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 kre2::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB22
AY-12j	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 mnn9::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB24
AY-12k	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 kre6::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB9
AY-12l	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500 gpi::URA3</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x2(pUAC20b,pUAC21b),pUAB7
AY-14	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-CWP2x3(pUAC19a,pUAC20a,pUAC21a)
AY-15	<i>MAT<math>\alpha</math> YPH500</i>	Leu+, Trp+, Ura+	EGFP-GAS1x3(pUAC19b,pUAC20b,pUAC21b)

10

20

## 【 0 0 6 4 】

## (B) オリゴヌクレオチド

以下に示す24個のオリゴヌクレオチドを合成し、適宜実験に供試した。

KRE6-Sen3 (5' -CGCGGCCGTAACAAAACGAACAACATGAGACAAAACCCG -3')

KRE6-Ant3 (5' -CGAGGCCTTTAGTTCCCTTTATGACCCGATTTGAAC -3')

SKN1-Sen1 (5' -CGAAGCTTCTTCGTATTTTTAGTCGCTC -3')

SKN1-Ant1 (5' -CGATGGCTGCTTCCGTACCCAAATCT -3')

GAS1-Sen1 (5' -GCGCATGCCGCAAACGTGGAGATGGAA -3')

GAS1-Ant1 (5' -GCCC GCGGCTTATCGAGTTATTATGTATGTGTGCGAAGC -3')

GPI1-Sen1 (5' -GCGCATGCTTCCTTATGTTAGCTTGTCC -3')

GPI1-Ant1 (5' -GCGCATGCCTTTACTCAATGGCTTACATGGCA -3')

KEX2-Sen1 (5' -GCGCATGCGACGTGTTCTTTCTCTCGTTTC -3')

KEX2-Ant1 (5' -GCGCATGCATTTTATTCGCGGGTGCAAACAAT -3')

BCK1-Sen1 (5' -GCGCATGCAGCACATACACATTCTAGGTCTGATTCG -3')

BCK1-Ant1 (5' -GCGCATGCGGAATTGGTGGTGCCGATTTTGACTTTCC -3')

PMT1-Sen1 (5' -GCGCATGCTCATTCTACGCTTGTCCATCCAC -3')

PMT1-Ant1 (5' -GCGCATGCGCGAAATGATAATACCACTGAAACTACTTG -3')

PMT2-Sen1 (5' -GCCAGCTGGTCTTTCCATATTCACCAGTTTGTCCG -3')

PMT2-Ant1 (5' -GCCAGCTGAGTACCAGAAGCAACCAATTACAAGTGCCA -3')

PMT4-Sen1 (5' -GCGCATGCGTTGAAGTACACGAAGGCCGCGC -3')

PMT4-Ant1 (5' -GCGCATGCAAGCGTTCAGTTCGTTTGTGGTTAGTG -3')

KRE2-Sen1 (5' -GCGGATCCACCAGCAACAAACCAATACAGACCA -3')

KRE2-Ant1 (5' -GCGGATCCGTTTCATTTGTTTTATCTCGGCTCG -3')

MNN9-Sen1 (5' -GCGGATCCAAAAATCATCATCACATCAGAACCG -3')

MNN9-Ant1 (5' -GCGGATCCAAAGCGCATTGACTGGAGAAGGT -3')

30

40

50

FKS1-Sen1 (5' -GCGGATCCATGAAACTCTAATCCTACTATCGGCG-3')

FKS1-Ant1 (5' -GCGGATCCTGCTCCTCATACCTTAAACCGG-3')

【 0 0 6 5 】

(C) プラスミド

上記例 1 に記載した pAUC19a, pUAC29b, pUAC20a, pUAC30b, pUAC21a, pUAC31b (以上、第 8 図), pUC19 および YEp24 を用いて以下のプラスミドを作成した。PCR 産物のサブクローニングには pGEM-T vector system (Promega, Madison, WI, USA) を用い、アガロースからの DNA 断片の回収、ligation および制限酵素消化は例 1 の方法により行った。

【 0 0 6 6 】

pUXS1: YEp24 の HindIII 消化断片 (Ura3) を pUC19 の HindIII site に挿入した。 10

pUAO1: KRE6 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; KRE6-sen3 および KRE6-ant3) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB1: SKN1 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; SKN1-sen1 および SKN1-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB3: GAS1 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; GAS1-sen1 および GAS1-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB4: GPI1 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; GPI1-sen1 および GPI1-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB5: KEX2 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; KEX2-sen1 および KEX2-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。 20

pUAB6: YEp24 の ClaI, SmaI 消化断片を pUAB3 の ClaI, MscI site に挿入した。

pUAB7: YEp24 の ClaI, SmaI 消化断片を pUAB4 の ClaI, HpaI site に挿入した。

pUAB8: YEp24 の ClaI, NheI 消化断片を pUAB5 の ClaI, XbaI site に挿入した。

pUAB9: YEp24 の BamHI, EcoRI 消化断片を pUAO1 の BglII, EcoRI site に挿入した。

pUAB10: pUXS1 の KpnI, PvuII 消化断片を pUAB1 の ClaI, XbaI site に挿入した。

pUAB11: BCK1 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; BCK1-sen1 および BCK1-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

【 0 0 6 7 】

pUAB12: PMT1 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; PMT1-sen1 および PMT1-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。 30

pUAB13: PMT2 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; PMT2-sen1 および PMT2-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB14: PMT4 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; PMT4-sen1 および PMT4-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB15: KRE2 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; KRE2-sen1 および KRE2-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB16: FKS1 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; FKS1-sen1 および FKS1-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。

pUAB17: MNN9 を PCR で増幅 (鋳型; YPH500 株染色体 DNA, プライマー; MNN9-sen1 および MNN9-ant1) させ、pGEM-T にサブクローニングした。 40

pUAB18: YEp24 の EcoRI, NheI 消化断片を pUAB11 の EcoRI, NheI site に挿入した。

pUAB19: YEp24 の EcoRI, SmaI 消化断片を pUAB12 の EcoRI, EcoRV site に挿入した。

pUAB20: YEp24 の EcoRI, SalI 消化断片を pUAB13 の XhoI, MunI site に挿入した。

pUAB21: YEp24 の ClaI, SmaI 消化断片を pUAB14 の ClaI, HpaI site に挿入した。

pUAB22: YEp24 の EcoRI, SmaI 消化断片を pUAB15 の EcoRI, EcoRV site に挿入した。

pUAB23: YEp24 の EcoRI, SmaI 消化断片を pUAB16 の EcoRI, EcoRV site に挿入した。

pUAB24: YEp24 の EcoRI, SmaI 消化断片を pUAB17 の EcoRI, HpaI site に挿入した。

【 0 0 6 8 】

(D) アーミングイーストおよび遺伝子破壊株の作出

遺伝子破壊操作は常法に従った。作出した遺伝子操作株を使用したプラスミドとともに 50

上記表 6 に示した。AY-10k株, AY-10l株, AY-12k株およびAY-12l株は以下の方法で作出した。YPH499株にYEp24を形質転換し、生じた形質転換体をAY-10株またはAY-12株と接合させた。生じた二倍体からプラスミドを除き、それぞれAY-17株およびAY-18株とした。AY-17株およびAY-18株にpUAB7のSphI消化物またはpUAB9のEco52I消化物を形質転換し、得られた形質転換体から半数体を分離した。得られた半数体およびAY-10u株をRPMIB培地にそれぞれ接種し、30(Cで振盪培養した。得られた培養液の蛍光強度を比較し、AY-10u株と同程度の蛍光強度を有するコロニーを選択して、AY-10k株, AY-10l株, AY-12k株およびAY-12l株とした。

【 0 0 6 9 】

(E) 遺伝子破壊株のGFP流出と流出GFP分子量の比較

10

液体培地に接種後、30 で培養した対数増殖期の菌を集め、同じ新鮮培地に浮遊させて接種菌液を作製した。これを30(Cで培養した。培養上清の蛍光強度をARVO sx (Wallac, 東京)を用いて測定した(excitation=480nm, emission=530nm)。遺伝子破壊株のGFP流出効果は、非遺伝子破壊株 (AY-10u株またはAY-12u株) のそれとの差で表した。蛍光測定後、培養上清は限外濾過して濃縮した。これを常法に従ってSDS-PAGEで分離したのちにPVDF膜にブロッティングし、市販の抗GFP抗体 (ウサギIgG, Santa Cruz Biotechnology) を用いてGFPを検出し、分子量を比較した (ウエスタンブロッティング)。

【 0 0 7 0 】

(F) 薬剤によるGFP分子量の変化

酵母の細胞壁合成に対して阻害作用の確認されている薬剤として、ツニカマイシン tunicamycin (TM; フナコシ, 東京), アクレアシン A aculeacin A (AC; 和光純薬, 大阪) およびスタウロsporin staurosporine (SP; ベーリンガーマンハイム, 東京) を使用した。菌株はAY-14株を用いた。

20

【 0 0 7 1 】

(2) 結果

(A) 遺伝子破壊によるGFPの流出促進

細胞壁糖鎖の合成や正常な細胞壁構築に阻害が見られた際にGFPが細胞壁から培地中に流出する (例 1)。第 9 図に示したように、細胞壁合成に関わる遺伝子 (表 7 参照) を破壊した場合、AY-12株 (膜型アーミングイースト) を親株とした遺伝子破壊株では、いずれの株においても有意な流出は観察されなかったが、AY-10株 (壁型アーミングイースト) を親株とした遺伝子破壊株では、特に GAS1株 ( はGAS1遺伝子を破壊したことを示す。以下同様である。)、 GPI1株, KRE6株, および PMT2株から明らかなGFP流出が観察された。これらの結果は、この方法により(1,6)- $\beta$ -グルカンの生合成経路(KRE6), GPI-アンカーの生合成(GPI1), O型糖鎖の合成経路 (PMT2) およびヘテロ糖鎖の架橋反応 (GAS1) を阻害する薬剤をスクリーニングできることを示唆している。

30

【 0 0 7 2 】

【 表 7 】

遺伝子	推定あるいは確定された機能	推定される細胞内での局在	真菌に特異的な酵素	文献
<i>PMT1</i>	O型糖鎖の合成	粗面小胞体	肯	16
<i>PMT2</i>				
<i>PMT4</i>				
<i>KRE2</i>				
<i>MNN9</i>	N型糖鎖の合成	ゴルジ体	否	18
<i>FKS1</i>	(1,3)- $\beta$ -グルカンの生合成	形質膜	肯	19
<i>KRE6</i>	(1,6)- $\beta$ -グルカンの生合成	ゴルジ体	肯	6
<i>SKN1</i>				
<i>GPI1</i>	GPIアンカーの合成	粗面小胞体	否	20
<i>GAS1</i>	グルカン糖鎖同士の架橋?	形質膜	肯	21
<i>BCK1</i>	糖鎖合成・細胞壁の構築	細胞内	否	3
<i>KEX2</i>	蛋白質のプロセッシング	ゴルジ体	否	22

16 Gentsch, M. et al., EMBO J., 15, pp. 5752 -5759, 1966

17 Hausler, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, pp. 6846 -6850, 1992

18 Dean, N., Biochim. Biophys. Acta., 1426, pp. 309 -322, 1999

19 Mazur, P. et al., Mol. Cell. Biol., 15, pp. 5671 -5681, 1995

6 Romer, T. et al., Mol. Cell. Biol., 13, pp. 4039 -4048, 1993

20 Leidich, S. D. et al., J. Biol. Chem., 269, pp. 10193 -10196, 1994

21 Popolo, L., M. et al., 1993 J. Bacteriol., 175, pp. 1879 -1885, 1993

3 Cid, V. J. et al. *Microbiol. Rev.*, 59, pp. 345-386, 1995

22 Redding, K. et al., J. Cell. Biol., 113, pp. 527 -538, 1991

#### 【 0 0 7 3 】

細胞壁ポリマーの合成を阻害する薬剤を用いた実験において、SP(PKC1プロテインカイネーゼCの阻害薬)、AC((1,3)- $\beta$ -グルカン合成阻害薬)およびTM(N型糖鎖合成阻害薬)をそれぞれ単独でAY-14株に作用させたところ、GFPの流出が認められた(AC及びTMによる流出効果は例1に示したとおりである)。(1,3)- $\beta$ -グルカンの合成経路、N型糖鎖の合成経路、糖鎖(グルカン)合成の調節経路などに対する阻害薬などもスクリーニングできることが明らかである。

#### 【 0 0 7 4 】

この方法により選択される薬剤の阻害経路(作用点)のうち、真菌に特異的な酵素が存在し、かつ真菌にのみ存在する経路として示唆されているのは、(1,3)- $\beta$ -グルカンの合成経路、(1,6)- $\beta$ -グルカンの合成経路、O型糖鎖の合成経路、およびヘテロ糖鎖同士の重合(または架橋)反応である(表7)。従って、上記のスクリーニングにより選抜される薬剤から、さらに真菌に特異的な経路または生化学反応を阻害する薬剤をその作用点ごとに選別する作業が必要である。

#### 【 0 0 7 5 】

(B) 遺伝子破壊株から流出するGFPの分子量の観察

第10図には、遺伝子破壊株から流出したGFPの分子量をウエスタンブロッティングで解析した結果を示した。この結果から分かるように、遺伝子破壊株から流出したGFPの分子量は様々に変化していた。

#### 【 0 0 7 6 】

(C) 細胞壁合成を阻害する薬剤による流出GFP分子量の観察

第11図には、SP(PKC1プロテインカイネーゼCの阻害薬)、AC((1,3)- $\beta$ -グルカン合成阻害薬)およびTM(N型糖鎖合成阻害薬)をそれぞれ単独でAY-14株に作用させ、流出したGFPの分子量を比較した結果を示した。薬剤無作用時に比べ、TMの作用によってGFPは大幅に低分子化した。また、流出GFPの分子量には、ACの作用によって約10kDa以内の高分子化が

10

20

30

40

50

認められ、SPの作用による場合には約10kDa以内の低分子化が認められた。

【 0 0 7 7 】

すでに述べたように、真菌に特異的な酵素の存在が示唆されているのは、(1,3)- $\beta$ -グルカン合成経路、(1,6)- $\beta$ -グルカン合成経路、O型糖鎖合成経路、およびヘテロ糖鎖同士の重合（または架橋）反応である。これらの合成経路または生化学反応を阻害する薬剤を作用させた場合のGFPの分子量変化は、いずれも10kDa以内の小さな変化であった。このような分子量変化を与える薬剤をスクリーニングすることにより、真菌に選択的な、とりわけ真菌細胞壁に選択的な活性を示す薬剤を選択できる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 7 8 】

本発明の方法によれば、細胞壁に対して選択的な阻害作用を有する薬剤の作用点を簡便かつ適確に判定することができ、細胞壁作用性薬剤の中から所望の作用点を有する薬剤を効率的にスクリーニングすることが可能である。

【 配列表 】

【 0 0 7 9 】

Sequence Listing

<110> Daiichi Sankyo Co., Ltd.

<120> Method for screening an agent acting on cell wall

<130> A41102M

<160> 2

<210> 1

<211> 1116

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

```

actagtatgc ttttgaagc tttccttttc cttttggctg gttttgcagc caaaatatct 60
gcatcaaaga gctcgcagc ctgcaggtcg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
aaaatgagta aaggagaaga acttttact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 180
ggtagatgta atgggcacaa attttctgtc agtggagagg gtgaaggatga tgcaacatac 240
ggaaaactta cccttaaat tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
ctgtcacta cgtaactta tgggtttcaa tgcttttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
ttcaaatgag acgggaacta caagacgcgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 480
gttaatcgta tgcagttaaa aggtattgat tftaaagaag atggaaacat tctcggacac 540
aaactcgagt acaactataa ctcacacaat gtatacatca cggcagacaa acaaagaat 600
ggaatcaaag ctaacttcaa aatcgcacc aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
gaccattatc acaaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 720
tacctgtcga cacaatctgc ctttgcgaa gatccaacg aaaagcgtga ccacatggtc 780
cttcttgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctgtagtgtt 840
gatttgggtt ccggaactga atccagtact gcctcttcta acgcttcggg gtcttcttcc 900
aagtctaact ccggctcttc tggttcttcc agttcttctt ctcttcttcc agcttcatct 960
tcatcttcta gcaagaagaa tgctgccacc aacgttaaag ctaacttagc acaagtggtc 1020
tttacctcca tcatttctt atccattgcc gctgggtgctg gttttgcttt ggtttaaaaa 1080
gcttcgacac atacataata actcgataag ccgcgg 1116

```

<210> 2

<211> 1236

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 2

```

actagtatgc ttttgaagc tttccttttc cttttggctg gttttgcagc caaaatatct 60

```

10

20

30

40

50

```

gcatcaaaga gctcgcatgc ctgcaggctg actctagagg atccccgggt accggtagaa 120
aaaatgagta aaggagaaga acttttctact ggagtgtgcc caattcttgt tgaattagat 180
ggatgatgta atgggcacaa attttctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 240
ggaaaactta cccttaaat tatttgcact actggaaaac tacctgttcc atggccaaca 300
cttgtcacta cgftaactta tgggtttcaa tgcttttccc gttatccgga tcatatgaaa 360
cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaacg cactatatct 420
ttcaagatg acgggaacta caagacgcgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 480
gttaatcgta tcgagttaaa aggtattgat tttaaagaag atggaaacat tctcggacac 540
aaactcgagt acaactataa ctacacaaat gtatacatca cggcagacaa acaaaagaat 600
ggaatcaaag ctaacttcaa aattcgccac aacattgaag atggatccgt tcaactagca 660
gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 720
tacctgtcga cacaatctgc ctttgcgaa gatcccaacg aaaagcgtga ccacatggtc 780
cttcttgagt ttgtaactgc tgctgggatt acacatggca tggatgagat ctctgaatcc 840
gctgccgcca tttctcaaat cactgacggt caaatccaag ctactaccac tgctaccacc 900
gaagctacca ccactgctgc cccatcttcc accgttgaag ctgtttctcc atccagcacc 960
gaaactatct ctcaacaac tgaaaatggt gctgctaagg ccgctgtcgg tatgggtgcc 1020
gggtgctctag ctgctgctgc tatgttgta taagaaatct ctgattttt ataatatcta 1080
tatggctttt ttcaaaattt tcggttttac taggtaagt tttgattctt ttcttttctg 1140
taatataatt ttacacataa ttttaataa tttttgttat ttggaatagg tagataccat 1200
aaaaataaaa cactttttac tttaacgagt ccgctg 1236

```

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 0 】

【図 1】 第 1 図は、実施例で用いた主なプラスミド（pEAC及びpUAC）の構造を示す。

【図 2】 第 2 図は、AY-5株およびAY-16株を試験管内で培養し、経時的に培養液および培養上清の蛍光強度によりGFP流出を測定した結果を示す。

【図 3】 第 3 図は、既存抗真菌試薬によるGFP流出効果を示す。カッコ内は主に障害される高分子を示し、上段の図はAY-2株の結果、下段の図はAY-12株の結果をそれぞれ示し、薬剤は左よりAC: Aculeacin A, TM: Tunicamycin, NM: Nikkomycin, CW: Calcofluor White, CR: Congo red, AMPH: Amphotericin B, SM: Salinomycin, FCZ: Fluconazole, AB: Aureobasidin, CE: Cerulenin, 5-FC: 5-Flucytocine, ZE: Zeocin, NE: Netropsin, CH: Cycloheximide, AS: Azaserine, BC: Bromoconduritol, CA: Caffeinを示す。

【図 4】 第 4 図は、AY-15株に導入した遺伝子の塩基配列（塩基数1116）、制限酵素認識サイト、及び該遺伝子がコードするアミノ酸配列（1文字表記）を示す。図中、核酸番号600番までを示す。

【図 5】 第 5 図は、AY-15株に導入した遺伝子の塩基配列（塩基数1116）、制限酵素認識サイト、及び該遺伝子がコードするアミノ酸配列（1文字表記）を示す。図中、核酸番号601番～1116番までを示す。

【図 6】 第 6 図は、AY-14株に導入した遺伝子の塩基配列（塩基数1236）、制限酵素認識サイト、及び該遺伝子がコードするアミノ酸配列（1文字表記）を示す。図中、核酸番号660番までを示す。

【図 7】 第 7 図は、AY-14株に導入した遺伝子の塩基配列（塩基数1236）、制限酵素認識サイト、及び該遺伝子がコードするアミノ酸配列（1文字表記）を示す。図中、核酸番号661番～1236番までを示す。

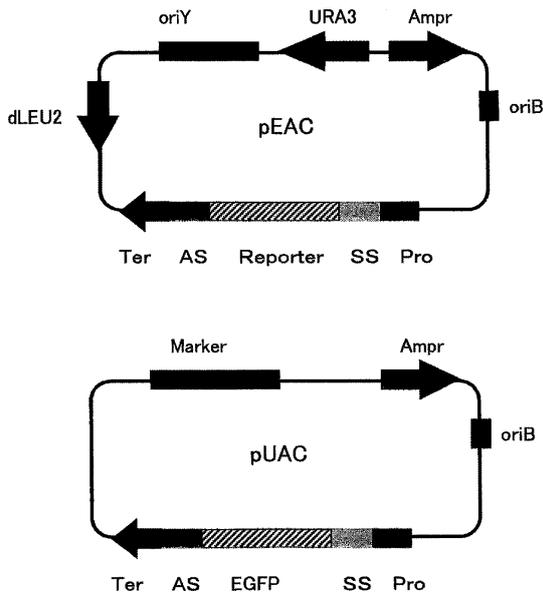
【図 8】 第 8 図は、実施例で用いたプラスミドpAUC19a, pUAC29b, pUAC20a, pUAC30b, pUAC21a, 及びpUAC31bの構造を示す。

【図 9】 第 9 図は、細胞壁合成に関わる遺伝子を破壊した場合にAY-12株（膜型アーミングイースト）を親株とした遺伝子破壊株又はAY-10株（壁型アーミングイースト）を親株とした遺伝子破壊株から流出するGFPの量を示す。

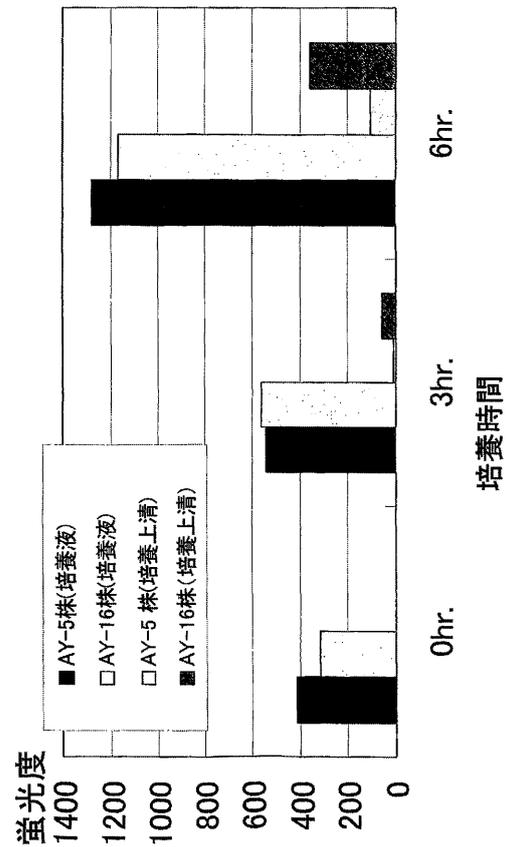
【図 10】 第 10 図は、遺伝子破壊株から流出したGFPの分子量をウエスタンブロッティングで解析した結果を示す。

【図1】 第1図は、SP(PKC1プロテインキナーゼCの阻害薬), AC((1,3)- -グルカン合成阻害薬)およびTM(N型糖鎖合成阻害薬)をそれぞれ単独でAY-14株に作用させ、流出したGFPの分子量を比較した結果を示す。

【図1】  
第1図

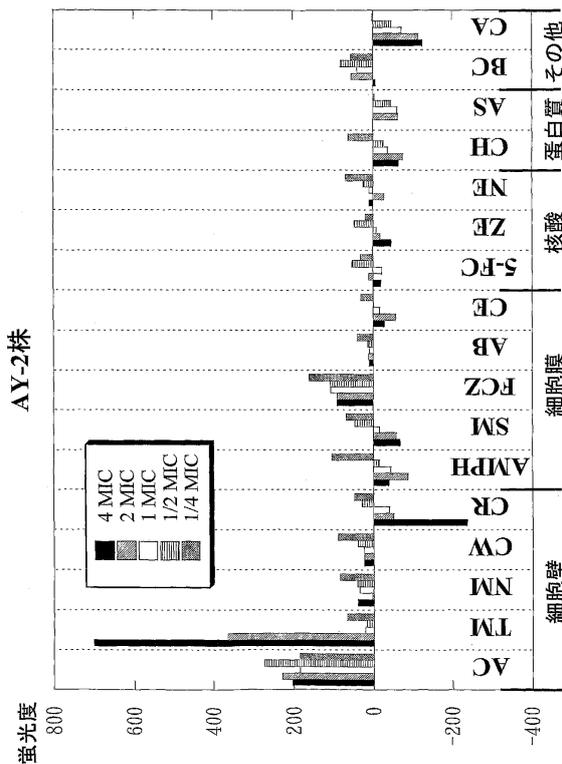


【図2】  
第2図



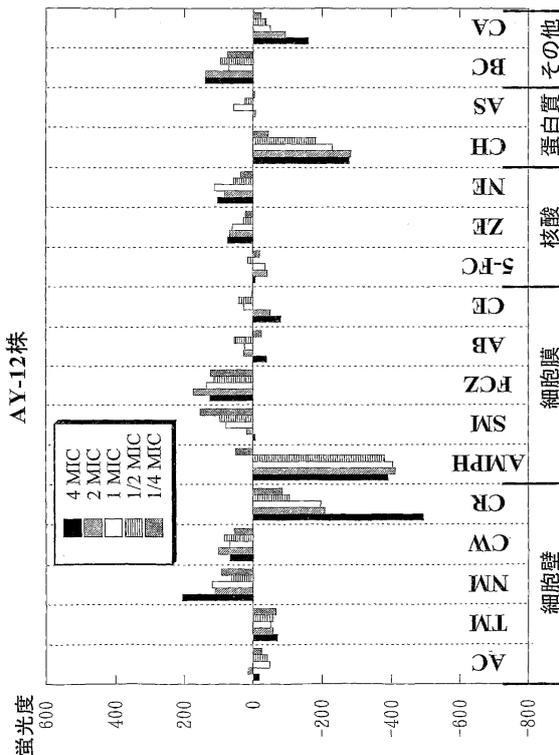
【 図 3 ( A ) 】

第3図 (A)



【 図 3 ( B ) 】

第3図 (B)



【 図 4 】

第4図

```

ACTAGTATGCTTTTGAAAGCTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGCAAGCAAAAATATCT
  M L L Q A F L F L L A G F A A K I S
/
SpeI

70 80 90 100 110 120
GCATCAAAAGAGCTCGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGGGTACCGGTAGAA
A S K S S H A C R S T L E D P R V P V E
/
SacI

130 140 150 160 170 180
AAAATGATTAAGAGGAGAAAGAACTTTCACTGGAGTTGCCAATTCITGTTGAATTAGAT
K M S K G E E L F T G V V P I L V E L D

190 200 210 220 230 240
GGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

250 260 270 280 290 300
GGAAACTTACCCTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACACTGCTGTCATGGCCAAACA
G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T

310 320 330 340 350 360
CTTGCACTACGTTAACTTATGGTGTCAATGCTTTTCGGTTATCCGATCATATGAAA
L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K

370 380 390 400 410 420
CGGCATGACTTTTCAAGAGTCCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCT
R H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I S

430 440 450 460 470 480
TTCAAAGATGACGGGAACACAAAGCGGCTGCTGAAGTCAAGTTGAAGGTGATACCCCTT
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

490 500 510 520 530 540
GTTAATCGTATCGAGTTAAAGGTATGATTTTAAAGAGATGAAACATTTCTCGGACAC
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

550 560 570 580 590 600
AAACTCGAGTACAACTATAACTCACAAATGTATACATCACGBCABACAACAAAAGAAAT
K L E Y N Y N S H N V Y I T A D K Q K N

```

【 図 5 】

第5図

```

610 620 630 640 650 660
GGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCACACAACATGAAGATGGATCCGTTCAACTAGCA
G I K A N F K I R H N I E D G S V Q L A

670 680 690 700 710 720
GACCATTAACAAGAACTCCAAATGGCCGATGGCCCTGCTTTTACCAGACAACCAT
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

730 740 750 760 770 780
TACCTGTCGACAAATCTGCCCTTTCGAAAAGTCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTC
Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V

790 800 810 820 830 840
CTTCTGAGTTTGTAACTGCTGCTGGATTACACATGGCATGGATGAGATCTGTAGTGT
L L E F V T A A G I T H G M D E I C S V
/
Bgl II

850 860 870 880 890 900
GATTTGGGTTCCGGAAGTGAATCCAGTACTGCCTCTTAAACGCTTCGGGGTCTTCTGCC
D L G S G T E S S T A S S N A S G S S S

910 920 930 940 950 960
AAGTCTAACTCCGCTCTTCTGGTCTTCCAGTCTTCTTCTTCTTCTGAGCTTCATCT
K S N S G S S G S S S S S S S S S S S

970 980 990 1000 1010 1020
TCATCTTCTAGCAAGAAGAATGCTGCCACCAACGTTAAAGTAACTTAGCACAAGTGGTC
S S S S K K N A A T N V K A N L A Q V V

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTTACCTCCATTTGCTTATCCATTGCCGCTGGTGCCTTTGCTTGGTTTAAAAA
F T S I I S L S I A A G V G F A L V *

1090 1100 1110 1120
GCTTCGACACATACATAATAACTCGATAAGCCGCGG
/
SacII

```

【図6】

第6図

```

10 20 30 40 50 60
ACTAGTATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTGCTTTGCTGCTTTTGCAGCCAAATATCT
/
M L L D A F L F L L A G F A A K I S
SpeI

70 80 90 100 110 120
GCATCAAAGAGCTCGCATGCCTGCAAGGTGCACTCTAGAGGATCCCGGGTACCGGTAGAA
/
A S K S S H A C R S T L E D P R V P V E
SacI

130 140 150 160 170 180
AAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTTGTTGAATTAGAT
/
K M S K G E E L F T G V V P I L V E L D

190 200 210 220 230 240
GGTGTGTTAATGGGCAAAATTTCTGTGTCAGTGGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
/
G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y

250 260 270 280 290 300
GSAAACTTACCCTAAATTTATTTGCACTGCAAACTACTGTTGCCATGCGCAACA
/
G K L T L K F I C T T T G K L P V P W P T

310 320 330 340 350 360
CTTGTCACTGTTAATGCTTATGGTGTCAATGCTTTTCCGTTATCGGATCATATGAAA
/
L V T T L T Y G V Q C F S R Y P D H M K

370 380 390 400 410 420
CGGCATGACTTTTCAAGAGTGCATGCCGAGGTTATSTACAGBAACGCACTATATCT
/
R H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I S

430 440 450 460 470 480
TTCAAAGATGACGGAACTACAAGAGCGTCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTT
/
F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L

490 500 510 520 530 540
GTTAATGATGAGTAAAAGGATTTGATTTTAAAGAAGTGAACATTTCTCGACAC
/
V N R I E L K G I D F K E D G N I L G H

550 560 570 580 590 600
AAACTCGAGTACAAGTATAACTCAGACATGTATACATCACGGCAGACAACAAGAAT
/
K L E Y N Y N S H N V Y I T A D K Q K N

610 620 630 640 650 660
GGAATCAAAGCTAAGTCAAATTCAGCACAAGATGAAGATGATCCGTTCAACTAGCA
/
G I K A N F K I R H N I E D G S V Q L A

```

【図7】

第7図

```

670 680 690 700 710 720
GACGATTATCAACAAAATCTCCATTGGCGATGCCCCCTGCTTTTACCAGACAACCAT
/
D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H

730 740 750 760 770 780
TACCTGTCAGACAACTCTCCCTTTGSAAGATGCCAACGAAAAGCGTACACAGATGTC
/
Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M V

790 800 810 820 830 840
CTTGTGAGTTTGTACTGCTGCTGGGATTACACATGGCATGATGATGCTCTGAATCC
/
L L E F V T A A G I T H G M D E I S E S
BglII

850 860 870 880 890 900
GCTGCGCCATTTCTCAATCACTGACCGTCAAATCCAACTACTACCCTGCTACCACC
/
A A A I S Q I T D G Q I Q A T T T A T T

910 920 930 940 950 960
GAACTACGACCACTGCTGCCCTCTCCACCGTTGAAACTGTTTCTCCATCGACACC
/
E A T T T A A P S S T V E T V S P S S T

970 980 990 1000 1010 1020
GAACTATCTGCAACAACGAAATGGTCTGCTAAGCCCGTGTGATGATGGGTGCC
/
E T I S Q Q T E N G A A K A A V G M G A

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GGTGTCTAGCTGCTGCTGCTATGTTGTTAAGAATCTCTGATTTTTTATAATATCTA
/
G A L A A A A M L L *

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TATGGCTTTTTTCAAATTTTCGGITTTACTAGGTAAGTGTGATTTCTTTCTTTTGGT

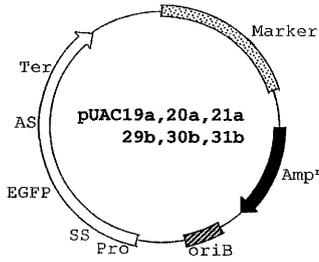
1150 1160 1170 1180 1190 1200
TAATATATTTTACACATAATTTAAATAATTTTGTATTTTGAATAGGTAGATACCAT

1210 1220 1230 1240
AAAAATAAACACTTTTACTTTAACGAGTCCGGGG
/
SacII

```

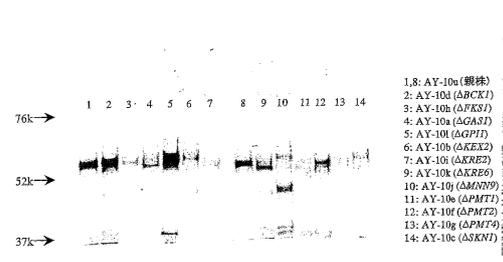
【図8】

第8図



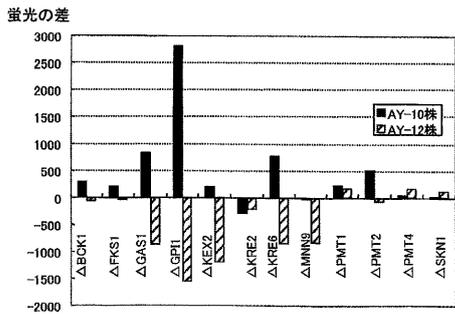
【図10】

第10図



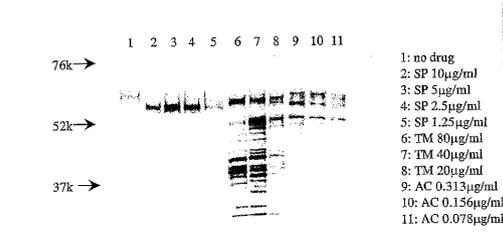
【図9】

第9図



【図11】

第11図



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I  
C 1 2 R 1/865 (2006.01) C 1 2 N 1/19  
C 1 2 R 1:865

(56) 参考文献 特開 2 0 0 0 - 1 0 2 3 8 7 ( J P , A )  
国際公開第 0 1 / 0 8 3 7 3 3 ( W O , A 1 )  
Antimicrob. Agents Chemother., Vol. 34, No. 4 (1990) p. 660-662  
Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 54, No. 1 (2000) p. 90-96  
Appl. Environ. Microbiol., Vol. 63, No. 4 (1997) p. 1362-1366  
J. Cell Biol., Vol. 128, No. 3 (1995) p. 333-340

(58) 調査した分野 (Int. Cl. , D B 名)  
BIOSIS/WPI (DIALOG)  
PubMed  
JSTPlus (JDreamII)