

平成 24 年度 共同利用・共同研究報告

2012 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '12-1

クリプトコックスの低酸素ストレス応答機構解析～低酸素応答遺伝子として見出した「転写因子 A」の分子機能解析を中心として～

川本 進・清水公德・大楠美佐子・萩原大祐
(千葉大学真菌医学研究センター)

Raclavsky, Vladislav (チェコ・パラツキー大学)
Sipiczki, Matthias (ハンガリー・デブレツェン大学)
関水 和久・松本 靖彦

(東京大学大学院薬学系研究科)

田村 裕 (千葉大学大学院医学研究院)

三浦 恵・園田 智子

(横浜市立大学大学院医学研究科)

畑 邦彦 (鹿児島大学大学院農学研究科)

Hypoxia signaling analysis of *Cryptococcus neoformans*

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Misako Ohkusu, Daisuke Hagiwara

(Chiba University, Medical Mycology Research Center)

Vladislav Raclavsky (Palacky University, Czech)

Matthias Sipiczki (University of Debrecen, Hungary)

Kazuhisa Sekimizu, Yasuhiko Matsumoto

(University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Yutaka Tamura

(Chiba University, Graduate School of Medicine)

Satoshi Miura, Tomoko Sonoda

(Yokohama City University, Graduate School of Medicine)

Kunihiko Hata

(Kagoshima University, Graduate School of Agriculture)

研究成果

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* は、生存に酸素が必須

な偏性好気性真菌であり、本菌は、肺で感染後、脳血液関門を越え脳髄膜へ移行して病原性を発揮して行く際、高酸素環境から低酸素環境への酸素欠乏ストレス条件に打ち勝ってはじめて増殖し、病原性を発揮して行く。すなわち、本菌の低酸素環境ストレス応答は、本菌感染の病原因子の一つと言える。我々は、本菌の細胞周期制御機構を研究中、低酸素環境条件下では細胞周期制御が flexible になるという、本菌のユニークな低酸素ストレス応答現象を見出した。そして、我々は、*Agrobacterium* を用いた、ゲノムランダム挿入遺伝子変異体ライブラリーを構築してスクリーニングし、低酸素応答遺伝子として、これまでに「転写因子 A」を見出して来たが、平成 24 年度には、「転写因子 A」の分子機能解析を更に詳細に進めた。

C. neoformans の低酸素応答遺伝子「転写因子 A」は、カルシニューリン応答 (Crz1) 転写因子、及び、PKC1-依存性 (Sp1) 転写因子とに homologous な分子であり、C 末端近くに、いわゆる、Zinc-finger を 3 つ持つ転写因子の一つ「Crz1/Sp1」であった。また、低酸素環境下、本菌が G2 arrest 状態に入るために必須な遺伝子として同定した本分子は、低酸素環境下での増殖の slowdown の他、本菌の細胞壁の integrity の維持、莢膜合成の抑制的な制御、バイオイテム生成の促進、フルコナゾール感受性、カルシウム感受性など、本菌の感染にも関連した種々の細胞生理機能に重要な役割を持つ分子であることを明らかにした。真菌の低酸素応答シグナリングに転写因子「Crz1/Sp1」が重要な役割を担っていることは、我々が *C. neoformans* で初めて見出し報告したが、更に、本菌における低酸素応答転写因子「Crz1/Sp1」のシグナル伝達下流分子の探索などを行って、*C. neoformans* の低酸素ストレスに対する環境応答シグナリング機構全体の解明を目指すとともに、本菌病原性への本分子の寄与を検討、考察しつつある。

発表論文

- 1) Moráňová Z, Virtudazo EV, Pospíšilová K, Ohkusu M, Kawamoto S, Husičková V, Raclavský V: The CRZ1/

SPI-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Biomedical Papers*, Published online 22 April 2013 (DOI: 10.5507/bp.2013.024).

研究課題 '12-2

新規抗真菌薬開発を目指したアスペルギルス属糸状菌の薬剤耐性機構とシグナル伝達機構の解析

五味勝也・阿部敬悦 (東北大学大学院農学研究科)
川本 進・清水公德・萩原大祐
(千葉大学真菌医学研究センター)
小山泰二 (野田産業科学研究所 (現キッコーマン))

Molecular analyses of mechanisms of drug resistance and signal transduction leading to novel antifungal drug discovery in *Aspergillus* fungi

Katsuya Gomi, Keietsu Abe
(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)
Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Daisuke Hagiwara
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)
Yasuji Koyama (Noda Institute for Scientific Research)

研究成果

A. fumigatus の薬剤耐性化機構については、薬剤の標的分子や排出系の変異によることが示唆されているものの、遺伝子レベルでの詳細な解析がほとんどなされていない。一方、*A. fumigatus* はヒト粘膜上での感染と生育を示すことから、このような固相表面における生育に関わる環境応答系が重要な機能を持っていると考えられる。そこで、本研究では *A. fumigatus* に対する効果的な新規創薬開発に資するため、薬剤耐性化の分子機構の解明ならびに浸透圧シグナル伝達系の機構解明を目指した。

我々は麹菌においてアゾール系薬剤の排出に関与する ABC トランスポーターの発現を制御する新規 Zn₂Cys₆

型転写因子 AtrR を世界で初めて見出し、*A. fumigatus* においてもこのオーソログが同様にアゾール耐性に関与していることを明らかにした。*A. fumigatus* の *atrR* 破壊株の RNA-seq 解析を行ったところ、AtrR はトランスポーター遺伝子だけでなく、エルゴステロール生合成酵素遺伝子の発現にも関わっていることが示された。非常に興味深いことに、AtrR 制御下のエルゴステロール生合成酵素遺伝子は、すでに報告のある bHLH 型転写因子 SrbA 制御下のものと一致していたことから、エルゴステロール生合成酵素の発現は AtrR と SrbA の 2 種類の転写因子によって協調的に制御されている可能性が強く示唆された。また、アゾール系薬剤耐性に関与していると考えられる ABC トランスポーター (AbcC/Cdr1B) の遺伝子は SrbA 制御下になく、AtrR 単独による制御を受けていると考えられた。

一方、*A. nidulans* の二成分性情報伝達系の生育必須因子であるリン酸基中間因子遺伝子 *ypdA* の発現制御株 (*CypdA*) と、下流 response regulator 遺伝子 *sskA* および *srrA* の欠損を加えた *CypdAsskAΔ*, *CypdAsrrAΔ*, *CypdAsskAΔ srrAΔ* 株を育種した。*ypdA* の発現抑制により、*ypdA* の転写量と蛋白質発現量が野生株比 5% 以下となった。*ypdA* の発現抑制は、フルジオキシニル処理と類似する致死をもたらしたが、*sskAΔ*, *srrAΔ* の導入は生育を部分的に回復させ、*sskAΔ srrAΔ* の導入は生育を完全に回復させた。*CypdAsskAΔ srrAΔ* の生育は回復したが、隔壁間長が長くなる *sskAΔ* 変異の形質を残していた。

研究課題 '12-3

新規性の高い抗真菌薬標的の探索と阻害剤のアッセイ系の開発

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター)
吉田 稔・松山晃久 (理化学研究所)
青山俊弘 (鈴鹿工業高等専門学校)

Searching for anti-fungal drug targets having high novelty and developing of an assay system for screening the repressors

Hiroji Chibana
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)
Minoru Yoshida, Akihisa Matsuyama
(Chemical Genomics Research Group, RIKEN)
Toshihiro Aoyama
(Suzuka National College of Technology)

研究成果

Saccharomyces cerevisiae, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* の真菌類およびヒトゲノムのデータベースを用いて、最適な標的の条件として1) ヒトに相同性がないか、あるいは極めて低いこと、2) ゲノム配列が公開されている病原真菌に高く保存されていること、3) *in vivo* で必須であること、以上の3点に条件として薬剤標的に探索を進めている。まず、条件1) と2) を満たす遺伝子を *Candida glabrata* のゲノムから抽出した。*C. glabrata* は、病原真菌の中で遺伝子操作が最も容易であるため、我々は本菌を病原真菌の実験モデル生物と位置づけ、ゲノムワイドな遺伝子機能解析を進めている。*C. glabrata* のゲノムから抽出した遺伝子のうち100 遺伝子について Tet 株を構築することができた。Tet 株は、テトラサイクリンを添加した培地において、Tet promoter が挿入された遺伝子の転写が抑制される。したがって、Tet 株が、テトラサイクリンに対して高い感受性を示すことを基準にすることにより各遺伝子が生育に必須か否かを判定することができる。さらに標的分子あるいはその遺伝子が感染時に *C. glabrata* にとって必須であることを検証することは標的分子を絞り込む上で極めて重要である。Tet 株を感染させた場合には、蚕幼虫

の餌にテトラサイクリンを添加することによって Tet 株中の当該遺伝子の発現を抑制することができた。最終的に抗真菌薬の標的として5つに絞ることができた。今後これらの株を用いてマウスを用いた感染実験検証、組換えタンパク等を用いて阻害剤のアッセイ系を開発して行きたい。

発表論文

- 1) Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y: The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation, *Mol Microbiol.* 88: 371-81, 2013.

研究課題 '12-4

真菌感染防御における IL-17 産生機構に関する研究

岩倉洋一郎
(東京大学医科学研究所・システム疾患モデル研究センター・細胞機能研究分野)
西城 忍 (千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on the production of IL-17 in immune responses against fungal infection

Yoichiro Iwakura
(The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)
Shinobu Saijo
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

IL-17A は主に活性化 CD4⁺T 細胞から産生され、細胞外寄生菌に対する感染防御や自己免疫疾患の発症において中心的な役割を担っている。申請者らは、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を *Candida albicans* (*C. albicans*) で刺激し、その培養上清が naïve T 細胞を Th17 細胞に分化させることを見出した。一方、IL-17A ノック

クアウトマウスに *C. albicans* を感染させると野生型 (WT) マウスと比較し生存率が有意に低下することを明らかにした。しかし最近, CD4⁺細胞以外にも IL-17A を産生する細胞が見出され, Th17 と他の IL-17 産生細胞との機能の違いが注目されている。

そこで, まずマウスに *C. albicans* を感染させ in vivo でも IL-17A が産生されるかどうかを検討したところ, 感染後比較的早期に IL-17A が産生されることが明らかとなった。今後は, ノックアウトマウスやノックインマウスと細胞移植の系などを組み合わせ, どの細胞から分泌される IL-17A が感染防御に重要な役割を担っているのかを明らかにする予定である。

発表論文

- 1) Ikeda S., Saijo, S., Murayama MA, Shimizu K., Akitsu A., and Iwakura, Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *J. Immunol.*, in press.

研究課題 '12-5

真菌性肺炎の発症機序の解明

中江 進

(東京大学医科学研究所・システム疾患モデル研究センター・システムズバイオロジー研究分野)

新江 賢 (杏林大学保健学部・免疫学教室)

西城 忍 (千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on the pathogenesis of fungal pneumonia

Susumu Nakae

(Laboratory of Systems Biology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

Ken Arae

(Department of Immunology, Faculty of Health Sciences, Kyorin University)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

気道や腸管上皮, また, 皮膚表皮では, 細胞と細胞の間が様々な接着分子を介して連結され (tight junction), 外来抗原の侵入を防いでいる。その tight junction の破壊に, 外来および内在性の protease が関与していることが示されつつある。真菌 *Aspergillus* による肺炎は, *Aspergillus* 自体の感染による免疫応答だけでなく, *Aspergillus* が産生する protease による宿主の気道上皮の破壊が発症及び症状の重症化に関わっている可能性が強く示唆されている。実際に, マウスに *Aspergillus* 由来の protease を吸入させると, 組織破壊と好中球の浸潤を伴う強い気道炎症が認められた。さらに, 各種欠損マウスを用いた結果, *Aspergillus* protease による好中球性気道炎症は, T 細胞, B 細胞, NKT 細胞, マスト細胞非依存的であることが明らかになった。*Aspergillus* protease による好中球性気道炎症局所では, IL-17, IL-17F, IL-21, IL-23, IL-6, TNF といった Th17 型サイトカインおよび誘導因子の発現の亢進が認められ, これらサイトカインが好中球性気道炎症の誘導に関与することが期待された。しかしながら, これらのサイトカイン欠損マウスでも *Aspergillus* protease による好中球性気道炎症は正常マウスと同程度に誘導されることが明らかになった。現在, これらサイトカイン以外に, 好中球性気道炎症の誘導に関わる因子の同定を進めている。

研究課題 '12-6

真菌による重症喘息発症機構の解明: *Schizophyllum commune* 応答を中心として

廣瀬晃一 (千葉大学大学院医学研究院)

渡邊 哲 (千葉大学医学部附属病院)

中島裕史 (千葉大学大学院医学研究院)

亀井克彦・豊留孝仁

(千葉大学真菌医学研究センター)

Roles of Fungi in the Development of Severe Asthma: Possible roles of the immune responses against *Schizophyllum commune*

Koich Hirose

(Department of Allergy and Clinical Immunology,
Graduate School of Medicine, Chiba University)

Akira Watanabe

(Department of Control and Treatment of Infectious
Diseases, Chiba University Hospital)

Hiroshi Nakajima

(Department of Allergy and Clinical Immunology,
Graduate School of Medicine, Chiba University)

Katsuhiko Kamei, Takahito Toyotome

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

真菌への暴露, 感作は喘息の重症化に関与することが知られている. スエヒロタケ (SC) は喘息, アレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) の発症に関与することが報告されている真菌だが, これまでに SC 特異的抗体の効率的なスクリーニング方法の報告は無く, 喘息患者における SC 感作率は不明である. 本研究では ELISA 法による SC 特異的抗体のスクリーニング方法を確立し, 喘息患者における SC 感作率を検討するとともに, 喘息重症度との相関を明らかにすることを目的とした.

まず SC による ABPM 患者血清を用いて主要抗原を探索・同定した. この主要抗原を用いて SC 特異的抗体測定 ELISA 法を確立し, 喘息患者における感作率を検討した. 47 名の喘息患者 (Step2 6 名, Step3 29 名, Step4 12 名) 中, 4 名が SC 特異的 IgG 陽性, 6 名が SC

特異的 IgE 陽性であることが明らかとなった. SC 特異的抗体陽性喘息患者はアスペルギルスにも感作されている傾向が見出されたが, SC 特異的抗体価はアスペルギルス特異的抗体価との相関性は認められなかった. これらの結果から喘息患者の一部は SC に感作が成立していることが明らかとなった.

研究課題 '12-7

病原性担子菌酵母糖タンパク質糖鎖の構造解析

大橋貴生・藤山和仁

(大阪大学生物工学国際交流センター)

五ノ井 透 (千葉大学真菌医学研究センター)

Structural analysis of glycoprotein sugar chains in pathogenic Basidiomycete yeast.

Takao Ohashi, Kazuhito Fujiyama

(International Center for Biotechnology, Osaka University)

Gonoi Toru

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原性担子菌酵母を含む真核生物において多くの糖タンパク質には糖鎖が付加しており, その糖鎖構造は多様である. 非病原性モデル子囊菌酵母である出芽酵母や分裂酵母では糖鎖構造および糖鎖生合成関連遺伝子が報告されている. また, 病原性子囊菌酵母である *Candida albicans* および *Aspergillus fumigatus* では糖鎖生合成関連遺伝子の機能不全変異により病原性の低下が報告されている. 一方, 病原性担子菌酵母においては *Cryptococcus neoformans* を除いて, 糖鎖生合成関連遺伝子の解析どころか, 糖鎖構造情報はほとんど蓄積されていない. 前年度までに代表的な病原性担子菌酵母である *C. neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa* および *Malassezia furfur* の糖鎖構造解析に着手し, 特に O-結合型糖鎖について構造情報を得ていた. 本年度はさらに上述の 3 種の病原性担子菌酵母の N-結合型糖鎖の構造解析を行った.

各病原性担子菌酵母を培養後, ヒドラジン分解-ピリジルアミノ化法を用いて, ピリジルアミノ化糖鎖を調

製後、サイズ分画 HPLC、逆相 HPLC および MALDI-TOF-MS による解析を行った。その結果、*C. neoformans* においては Hex₇₋₉PentGlcNAc₂ の糖鎖が主要な糖鎖として検出された。*R. mucilaginosa* については、サイズ分画 HPLC による分析が終了し、Hex₅₋₇GlcNAc₂ の糖鎖が主要な糖鎖として検出された。*M. furfur* についても同様にサイズ分画 HPLC、逆相 HPLC によるピリジルアミノ化糖鎖の分画を行い精製糖鎖を得た後、LC-ESI-MS/MS による解析を行った。主要な糖鎖について、標準糖鎖と両 HPLC にて溶出位置が一致する糖鎖が検出され、LC-ESI-MS/MS の結果を考慮し以下の様に構造決定することができた；Man α 1,2Man α 1,6 (Man α 1,3) Man α 1,6 (Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,3) Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc (M8A), Man α 1,2Man α 1,6 (Man α 1,3) Man α 1,6 (Man α 1,2Man α 1,3) Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc (M7A), Man α 1,2Man α 1,6 (Man α 1,2Man α 1,3) Man α 1,6 (Man α 1,2Man α 1,3) Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc (M8B), Man α 1,2Man α 1,6 (Man α 1,2Man α 1,3) Man α 1,6 (Man α 1,2Man α 1,2Man α 1,3) Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc (M9A)。本研究の結果により、本 3 種病原性担子菌酵母糖鎖の基礎情報が取得できた。これらの情報を元に将来的には糖鎖生合成関連酵素遺伝子の同定、本酵素の阻害剤の探索の効率化が達成され、効果的な抗真菌剤の開発へと発展することが期待される。

研究課題 '12-8

リボソームタンパク質をバイオマーカーとした質量分析法による真菌類の同定・分類法の開発

矢口貴志 (千葉大学真菌医学研究センター)

佐藤浩昭・鳥村政基

((独) 産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門)

Development of method for classification and identification of fungi based on the profiling of ribosomal proteins as observed by mass spectrometry

Takashi Yaguchi, Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Hiroaki Sato, Masaki Torimura

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

研究成果

生物種の同定・分類は基準株との比較で行われるため、*A. fumigatus* 基準株 (IFM 47795 = Af293) の精製リボソームタンパク質の質量分析を行い、基準株のリボソームタンパク質の正確な分子量リストを作成することを目的とした。試料菌株をビーズ破砕し、超遠心分離機 (真菌医学研究センター所有) を用いてリボソームを抽出し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計 (MALDI-TOFMS, 産総研所有) を用いて各リボソームタンパク質のマスマスペクトルを観測した。各リボソームタンパク質の正確な分子量を解析し、翻訳アミノ酸配列から計算される分子量との差異を比較して翻訳後修飾の有無を明らかにした。その結果、全ゲノム解読された *A. fumigatus* および類縁の *Neosartorya fischeri* の計 3 株について、分類の基準となるリボソームタンパク質の正しい分子量リストを作成した。さらに、ゲノム解読株間で、一部のリボソームタンパク質に変異が生じていることを実証し、*A. fumigatus* 類縁菌の同定及び株レベルでの識別が、本法によって可能であることを見出した。

今後、DNA 解析法で得られた分類結果や形態および薬剤耐性などの特徴と比較することによって、本法の妥当性を実証するとともに、得られたマスマスペクトルをデータベース化し、真菌の新しい分類指標を提示することが期待できる。

平成 24 年度 共同利用・共同研究研究会報告

2012 Fiscal Year Cooperative Research Meetings Report

研究会－1

千葉大学感染症研究ネットワーク 第 1 回研究会

山本友子・高屋明子・佐藤慶治
(千葉大学大学院薬学研究院)
米山光俊・川本 進・亀井克彦
(千葉大学真菌医学研究センター)
北 潔 (東京大学大学院医学研究科)

Chiba University Research Network on Infectious Diseases

Tomoko Yamamoto, Akiko Takaya, Yoshiharu Sato
(Department of Microbiology and Molecular Genetics,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba
University)
Mitsutoshi Yoneyama, Susumu Kawamoto, Katsuhiko
Kamei
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)
Kiyoshi Kita
(Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine,
The University of Tokyo)

研究成果

千葉大学の学内には、感染症研究にかかわる医学部、

薬学部、附属病院、融合科学研究科などに数多くの研究者がおり、それぞれが活発に研究を進めている。しかしそれらの連携は意外なほど少なく、ネットワーク化が期待されていた。そこで、これら千葉大学の学内各部局における感染症研究の統合、さらには活性化を進めることを目的として今年度から本センターの共同利用・共同研究会として「千葉大学感染症研究ネットワーク」を企画した。第 1 回目となる今回は平成 24 年 6 月 23 日（土）に千葉大学薬学部大会議室（医薬系総合研究棟Ⅱ地下 1 階）にて開催した。学内の感染症研究グループから計 8 題の一般演題が発表され、これに引き続き、北 潔教授（東大医学研究科）から「感染症研究が結ぶ世界の絆」と題した特別講演をいただいた。この種の学内ネットワークを目指した会合は今回が初めての試みであったが、参加者は 63 名に達した。

全体を通じて非常に活発な議論が行われ、学内各部局における感染症研究の統合、活性化という目的は十分に達成されたものと考えられた。今後更に発展させるべく計画を進めている。