

平成 27 年度 共同利用・共同研究報告

2015 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '15-1

糸状菌の感染免疫応答と形態形成を支配する細胞表層 α -1, 3-グルカンの生合成制御

阿部敬悦

(東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻)

吉見 啓

(東北大学未来科学技術共同研究センター)

川本 進・清水公徳・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Biogenesis of cell wall α -1, 3-glucan controlling fungi-host immune-responses and fungal morphogenesis

Keietsu Abe

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Akira Yoshimi

(New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

(1) 「*A. nidulans* の CWI 経路, フェロモン経路, AG 生合成酵素遺伝子の各欠損株の有性生殖能の解析」および「AG 合成酵素遺伝子の転写制御の CWI 経路とフェロモン経路への依存度の評価」

糸状菌の細胞壁 α -1, 3-グルカン (AG) は, 細胞壁の最外層に位置し, 内層の β -1, 3-グルカン (BG) やキチンを被覆することで感染宿主の免疫認識を回避するステルス因子として機能することが知られている。しかし, 麹菌などの非感染性の糸状菌にも AG が存在することから, 宿主に対するステルス性以外にも AG には未知

の生物学的機能があると思われる。我々は *A. nidulans* の AG 欠損株を用いて, AG が菌糸同士の接着因子であることを明らかにしたが, その他の生物学的機能はいまだ不明である。*A. nidulans* には無性世代と有性世代の生活環が存在することが知られている。有性生殖器官 (クラリストセシア) の形成には, 菌糸先端にある細胞の菌糸融合が必要である。そこで, 2 種ある AG 合成酵素遺伝子 *agsA* および *agsB* の遺伝子破壊株を用いて, 有性生殖能を検討した結果, *agsA* Δ 株および *agsB* Δ 株は有性世代不全であることを見出した。有性世代不全は *agsA* Δ 株でより顕著であった。以上より, AG の接着因子としての機能が有性生殖にも寄与することが予想された。*A. nidulans* の栄養生長時には, *agsB* が主として機能しており, CWI 経路による制御を受ける (総説 1, 関連原著論文 1, 関連総説 1)。以上の知見を総合すると, *A. nidulans* に存在する 2 種の α -1,3-グルカン合成酵素は, 栄養生長時と有性生殖器官形成時に AG 合成の役割分担をしており, *agsA* がフェロモン経路の制御により有性生殖へ寄与するという全く新しい知見を与える可能性が考えられた。現在, フェロモン経路の人為的活性化株を作出中であり, 引き続き, フェロモン経路の人為的活性化時の *agsA* および *agsB* 遺伝子の転写レベルを確認する予定である。

(2) 「*Aspergillus* 属糸状菌における α -1,3-グルカンの細胞接着性への寄与の検証」

糸状菌は液体培養において菌糸が絡まり菌糸塊となってしまうことが多いことから, AG が *Aspergillus* 属糸状菌一般の菌糸接着因子であることが予想された。モデル糸状菌 *A. nidulans* においても, 産業糸状菌 *Aspergillus oryzae* でも液体培養時に菌糸塊が形成される。麹菌 *Aspergillus oryzae* は *agsA*, *agsB*, *agsC* の 3 種の AG 合成酵素遺伝子を有していることから, これら 3 種の遺伝子を破壊した *agsA* Δ *agsB* Δ *agsC* Δ 株 (AG 欠損株) を作成した。その結果, 液体培養において, 麹菌の AG 欠損株の菌糸は, *A. nidulans* のような菌糸の完全分散性状にはならなかったが, 野生株に比べて小さな菌糸塊を形成し (野生株比直径が約 60% に減少), 培養総菌体量は増加した。

さらに、組換えタンパク質の生産量も野生株比1.7倍に増加した。これらの結果は、麴菌においてもAGは菌糸接着因子であるが、AGの他にも菌糸接着因子が存在することを示唆している。AG欠損株における酵素生産性の向上は、AG欠損株を物質生産用の宿主株として用いることにより、従来よりも一培養当たりの生産性の大幅な改善が可能であることを示唆した（論文投稿中）。

発表論文

- 1) Yoshimi A, Fujioka T, Mizutani O, Marui J, Hagiwara D, Abe K: Mitogen-activated protein kinases MpkA and MpkB independently affect micafungin sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotech Biochem*, 79: 836-844, 2015

研究課題 '15-2

Aspergillus fumigatus の転写因子 AtrR によるアゾール系薬剤耐性関連遺伝子の発現制御の分子メカニズム

五味勝也

(東北大学大学院農学研究科)

川本 進・清水公徳・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Molecular mechanisms for the regulation of genes involved in azole drug resistance by the transcription factor, AtrR, in *Aspergillus fumigatus*

Katsuya Gomi

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

麴菌 *Aspergillus oryzae* において見出されたアゾール系薬剤耐性に関する新規 Zn₂Cys₆ 型転写因子 AtrR は、モデル糸状菌の *Aspergillus nidulans* やアスペルギルス症起因

菌である *Aspergillus fumigatus* にも共通のオーソログとして見出され、それぞれの *atrR* 遺伝子の破壊株では、野生株より100倍も低い薬剤濃度でも感受性を示すことが見出された。*A. fumigatus* において AtrR の機能解析を行った結果、AtrR がアゾール耐性に関わる ABC トランスポーター Cdr1B の発現を制御していることを世界で初めて明らかにするとともに、アゾール薬標的分子である Cyp51A をはじめとしてエルゴステロール生合成に関与する酵素遺伝子の発現にも関わっていることを見出した。AtrR が本菌のアゾール薬耐性メカニズムにおいて中心的な役割を果たしており、AtrR の機能阻害剤の開発はアゾール薬の治療効果を格段に高め、耐性株に対しても卓効を示すことが期待される。本研究では AtrR による *cdr1B* および *cyp51A* 遺伝子の発現調節機構の解明を目指すとともに、Cyp51A に耐性変異を有するアゾール耐性 *A. fumigatus* 株における AtrR の機能阻害の重要性を検証することを目的とした。

Cyp51A を含むエルゴステロール生合成酵素遺伝子の発現制御を担う転写因子としてすでに bHLH 型転写因子 SrbA が報告されていたことから、*A. fumigatus* の *atrR* 破壊株に加えて *srbA* 破壊株も作製して、アゾール耐性や低酸素条件下における生育、マウスに対する病原性などの違いを比較した。*atrR* 破壊株と *srbA* 破壊株ともにアゾール薬剤に感受性が高くなっていったが、*atrR* 破壊株の方が感受性が高くなっていった。一方、低酸素条件下における生育はともに悪くなったが、株間での差異はほとんど認められず、マウスに対する病原性も同等に低下していた。両破壊株ともに *cyp51A*, *erg3B*, *erg24A*, *erg25A* のエルゴステロール生合成遺伝子の顕著な発現量低下を示したが、ABC トランスポーター遺伝子 (*cdr1B*) の発現は *atrR* 破壊株のみで著しく低下していた。また、マウスを用いた感染性試験により、いずれの破壊株も病原性の著しい低下が認められた。さらに、HA タグを付加した AtrR を用いたクロマチン免疫沈降 (ChiP) 解析を行ったところ、コントロールのアクチン遺伝子 (*act1*) プロモーターは濃縮されなかったのに対して、*cyp51A* および *cdr1B* のプロモーターはそれぞれ20倍、33倍に濃縮されたことから、AtrR がこれらのプロモーター領域に結合することが示された。また、AtrR は *cyp51A* の上流 -69~-415 の領域に、*cdr1B* の上流 -675~-982 の領域に強く結合することが示唆された。Cyp51A の G54E 置換変異による *A. fumigatus* のアゾール耐性株 (IFM 61567) につ

いて *atrR* の破壊を行ったところ、イトラコナゾールやボサコナゾールに対して高い感受性を示しただけでなく、野生株でも耐性を示すフルコナゾールに対しても感受性を示すことが分かった。これはアゾール耐性株の *atrR* 破壊によって *cyp51A* および *cdr1B* のいずれも発現量が著しく低下したことによるものと考えられた。

なお、以上の得られた成果を取りまとめた論文を5月中旬に *PLoS Pathogen* 誌に投稿した。

研究課題 '15-3

新興強毒性真菌 *Cryptococcus gattii* の高病原性機序の免疫学的解析 — その2

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

川本 進・清水公徳

(千葉大学真菌医学研究センター)

Immunological analysis of a mechanism for high pathogenicity of *Cryptococcus gattii*

Kazuyoshi Kawakami, Keiko Ishii

(Tohoku University Graduate School of Medicine)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

1999年にカナダのバンクーバー島で *Cryptococcus gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生し、その後アメリカ合衆国の北西沿岸地域を中心に拡大しつつある。2007年には、わが国でも国内感染と考えられる *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告され、その後も症例が増加している。通常の *C. neoformans* によるクリプトコックス症と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、その高い致死率から高病原性クリプトコックス症とも呼ばれており、今後新興感染症として重要な問題に発展することが懸念される。本研究では、*C. gattii* と *C. neoformans* に対する免疫応答性を比較することで、本感染症の病態解明の手掛かりを探ることを目的とした。

異なるクリプトコックス菌種での解析では抗原性の違

いにより正確な解析が妨げられる可能性が懸念されるため、卵白アルブミン (OVA) 遺伝子を導入することで両真菌種における共通抗原として発現させた *C. neoformans* 株 (YC-13, YC-11, H99) と *C. gattii* 株 (R265) を作製した。その中で、YC-13とH99にOVA遺伝子を導入した各1株 (YC-13-OVA6, H99-OVA4) においてOVA mRNAの発現が検出され、YC-13-OVA6では感染マウスの所属リンパ節細胞がOVAの刺激によりIFN- γ 産生を示した。また、OVA特異的なTCRを高発現したトランスジェニックマウス (OT-II) の脾細胞はYC-13-OVA6に反応してIFN- γ を産生した。さらに、OT-IIマウスにYC-13またはYC-13-OVA6を感染させると、YC-13-OVA6感染マウスにおいて肺内のIFN- γ 産生及び菌の排除が有意に亢進していた。一方、OT-IIマウス由来の脾細胞を抗原エピトープであるOVA₃₂₃₋₃₃₉で刺激する際に、H99またはR265の破砕物を添加したところ、H99の破砕物でのみ有意なIFN- γ 産生の増加が認められた。この違いは各菌種のDNAに起因しており、TLR9を介することが明らかとなった。さらに、H99由来のDNAはR265と比較して、骨髄由来樹状細胞からのIL-12産生をより強く誘導する結果が得られた。現在、両菌種でTLR9を刺激するCpG DNAのメチル化に相違がないか検討しているところである。

本研究を通して *C. gattii* 感染症の高病原性における免疫機序が明らかになることにより、新たな治療・予防法の開発に繋がることが期待される。これらの成果は、第26回日本生体防御学会学術総会及び第44回日本免疫学会学術集會にて報告した。

Cryptococcus neoformans の特異な染色体末端維持機構を標的とした新規治療戦略の開発に向けて

松浦 彰・久保田俊介

(千葉大学大学院融合科学研究科)

川本 進・高橋弘喜・清水公德・東江昭夫

(千葉大学真菌医学研究センター)

Towards development of novel therapeutic strategies targeting the specific regulation of telomere maintenance in *Cryptococcus neoformans*

Akira Matsuura, Shunsuke Kubota

(Graduate School of Advanced Integration Science,
Chiba University)

Susumu Kawamoto, Hiroki Takahashi, Kiminori Shimizu, Akio Toh-e

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Cryptococcus neoformans は環境に常在する担子菌酵母であり、主に免疫機能の低下した人に感染し重篤なクリプトコックス症を引き起こす日和見感染真菌として知られている。本菌は、環状プラスミドが維持できない、遺伝子ターゲティングの効率が悪く、導入された直鎖状DNA断片の末端に高頻度でテロメア反復配列が付加される、などDNA修復に関連するユニークな性質をもつことが明らかにされている (Edman, 1992)。本研究では、染色体末端の維持機構という観点から *C. neoformans* 特有のゲノム維持機構を明らかにし、さらにこの特有なゲノム維持機構と *C. neoformans* の生活環との関連を明らかにすることを目的としている。

これまでに、*C. neoformans* よりテロメアDNA伸長酵素テロメラーゼ触媒サブユニットの相同遺伝子 *CnEST2* を単離している。*C. neoformans* 一倍体細胞で *CnEST2* の遺伝子破壊を行い、*CnEST2* 遺伝子の細胞増殖における機能を解析した結果、本菌においても他生物種と同様、染色体末端の維持にはテロメラーゼの活性が必須であることが明らかになった。しかし、一倍体細胞で

の *CnEST2* 破壊株の取得率は極めて低く、*CnEST2* 遺伝子が増殖に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。*S. cerevisiae* など他の生物種ではテロメラーゼ遺伝子を欠損した後、数十回は正常に分裂を続けることが可能であることが知られている。我々の発見は、*C. neoformans* 特有のゲノム維持機能にテロメラーゼが深く関与し、テロメラーゼの欠損が早期に増殖阻害をもたらす可能性を示唆している。

そこで本年度は、二倍体 *C. neoformans* において *CnEST2* 欠損のヘテロ接合体を取得した。胞子形成により一倍体を取得し、テロメラーゼ欠損後どのタイミングで増殖が低下するかを確認したところ、テロメラーゼと相同組換え遺伝子との二重欠損株が取得できなかったのみならず、テロメラーゼ単独変異株の出現率も極めて低いことが示された。この結果により、テロメラーゼを抑制した条件で *C. neoformans* の増殖率が大幅に低下することが確認され、テロメラーゼを標的として *C. neoformans* 特異的な治療が可能であることが示された。

今後は、テロメラーゼ活性の制御に必要な分子の探索をさらに進めつつ、テロメラーゼ、組換え関連因子を含めたDNA末端修復機構の選択制の違いが生じる機構を分子の側から解析することで、この生物種の特異なDNA損傷修復のメカニズムと生理的意義を明らかにし、本菌に対する新規治療戦略の開発につなげたいと考えている。

研究課題 '15-5

病原真菌における一酸化窒素の合成機構と生理的役割の解析

高木博史

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

川本 進・知花博治・東江昭夫・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of synthetic mechanism and physiological role of nitric oxide in pathogenic fungus

Hiroshi Takagi

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Susumu Kawamoto, Hiroji Chibana, Akio Toh-e, Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

一酸化窒素 (NO) はシグナル分子として、哺乳類の幅広い生命現象に関与している。高木らは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NOがアセチルトランスフェラーゼ Mpr 1 およびフラボタンパク質 Tah18 依存的にアルギニンから合成され、酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。また、Tah18と複合体を形成する Dre2 タンパク質が酸化ストレスセンサーとして働き、Tah18 依存的な NO 合成を制御する機構を提唱した。一方、病原真菌はヒトに感染する際、温度・低酸素などのストレスに応答して耐性を獲得し、病原性を示すことから、NOがストレス耐性や病原性に関与する可能性がある。

本研究では、*S. cerevisiae* と同様の NO 合成経路の存在が示唆される病原真菌 (*Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) について、NO と増殖・感染・病原性との関連性を解析する。平成27年度には、以下の研究成果が得られた。

1) *C. glabrata*: カイコ幼虫のテトラサイクリン転写抑制系を用いた *in vivo* 必須遺伝子の判定法を開発し、

Tah18のオルソログ遺伝子 (*CgTAH18*) が *C. glabrata* の生育および病原性の発現に必須であることを示す結果を得た (知花, 高木ら: 論文投稿中)。

2) *C. neoformans*: プロモーター部位を改変して Tah18 のオルソログ遺伝子 (*CnTAH18*) の発現抑制株を構築したところ、生育が抑制されたことから、*CnTAH18* は必須遺伝子であることが示唆された。

3) *A. fumigatus*: 培養時に、過酸化水素添加や高温ストレス処理すると、NO特異的蛍光プローブによる染色が菌糸内に確認できたことから、これらのストレスに応答したNOの生成が示唆された。

今後、Mpr1, Tah18, Dre2のオルソログ遺伝子の破壊株、発現抑制株、高発現株を用いて、細胞内NOレベルを定量するとともに、カイコやマウスの感染実験によってNOがストレス耐性や病原性に及ぼす影響を多面的に評価する。

研究課題 '15-6

マイコウイルス由来タンパク質の異種発現システムを利用した病原性真菌の生育制御系の開発

森山裕充

(東京農工大学大学院農学府研究院)

五ノ井透・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of novel regulation system for the human pathogenic fungi utilizing mycoviral proteins.

Hiromitsu Moriyama

(Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Susumu Kawamoto, Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々はイネいもち病菌に感染するマイコウイルス *Magnaporthe oryzae* chrysovirus, MoCV1-Aが宿主菌に対して、菌糸生育抑制、異常な色素沈着や分生子形成抑

制などの生育阻害現象をもたらすことを見出しており、MoCV1-Aウイルスの遺伝子がコードするタンパク質のうち、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子発現系の利用により ORF4 が抗菌性タンパク質をコードすることを明らかにしてきた。また、メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) で産生させた ORF4 タンパク質をイネいもち病菌の分生子に添加すると菌糸の伸長抑制が見られることも示してきた。

本研究成果として ORF4 タンパク質の部分領域をパン酵母に発現させることで、抗菌活性領域を調査したところ、MoCV1-A の近縁ウイルス間で保存性の高い、中央部の領域 (SU_a 領域) に活性があることが確認された。そこで、ピキア酵母の高密度培養による SU_a タンパク質の産生を試みている。さらに、パン酵母細胞内での ORF4 タンパク質の C 末端側領域 (24 領域) 発現時に出現した、生育促進を示す変異株を利用した抗菌活性タンパク質産生法の検討中である。

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主な原因菌である。五ノ井教授の研究グループにより、マウスに対する *A. fumigatus* の病原性を抑制する 2 種のマイコウイルスが見出されており、新規抗真菌薬としての応用を目指している。本共同研究プロジェクトにおいては、マイコウイルスの各ゲノムがコードする ORF タンパク質 (以下 ORF) のうち、宿主菌の病原性抑制に関与する ORF を特定するため、ウイルス未保有株 *A. fumigatus* (KU 株) にウイルス由来の各 ORF をそれぞれ個別に強制発現させ、宿主の形態・生育速度・ストレス耐性などの表現型を比較した結果、生育不良が生じる ORF が存在することが確認され、病原性の抑制に、マイコウイルス由来のタンパク質が関与する事が示唆された。

今後、*C. neoformans* に短縮など加工された ORF4 タンパク質を発現させたり、異種発現させた ORF4 タンパク質を外部から作用させた時の生育抑制効果などを検討していきたい。また *A. fumigatus* に関しても、MoCV1-A 由来の ORF4 タンパク質や、短縮配列である SU_a 配列を発現させて、その生育阻害効果を評価する。

研究課題 '15-7

抗真菌薬標的タンパクのインシリコ予測と実験的検証

中井謙太

(東京大学医科学研究所)

知花博治・宇野 潤

(千葉大学真菌医学研究センター)

An *in silico* prediction and experimental evaluation of antifungal drug targets

Kenta Nakai

(The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

Hiroji Chibana, Uno Jun

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々の研究分野は、ゲノム情報 (*in silico*) の解析に焦点を絞り、実験研究者と連携することで生物学的な発見や医療などへの貢献を目的としている。近年、深在性真菌感染症は増加傾向にあるが、既存の抗真菌薬は 4 系統しか存在せず、副作用や耐性菌の問題が生じている。そこで、本研究課題では、新しい抗真菌薬の開発に貢献することを目的に、副作用が少なく、広域性の高い抗真菌薬の開発が期待できる分子標的の同定を目的としている。まず、パン酵母、分裂酵母を中心とする真菌の培地上での (*in vitro*) 生育必須遺伝子情報を収集し、カンジダグラブラータのゲノムに含まれる相同遺伝子、1,160 個を抽出した。それら 1,160 遺伝子について知花准教授が作製した遺伝子改変株を用いてカンジダグラブラータにおいて生育上必須か否かの評価を行ったところ、約 900 についての生育上必須であるとの判定が出された。これら 900 遺伝子についてヒト遺伝子との相同性解析を行った結果、192 遺伝子が極めて低い相同性しか示さなかった。現在、これらの 192 遺伝子の改変株を用いてカイコあるいはマウスを用いた感染時 (*in vivo*) 必須遺伝子の評価実験を進めている。

Candida glabrata 細胞壁構築関連遺伝子欠損が菌体の性質に及ぼす影響

柴田信之・佐々木雅人・伊藤文恵・田中 大
(東北医科薬科大学感染生体防御学教室)
知花博治・山口正視
(千葉大学真菌医学研究センター)

Deletion effect of genes involved in cell wall integrity of *Candida glabrata*

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Itoh,
Yutaka Tanaka
(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)
Hiroji Chibana, Masashi Yamagushi
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

真菌の細胞壁は環境に対する適応に必要なだけでなく病原性にも関与していることが指摘されている。そこで *C. glabrata* の細胞壁糖鎖生合成に関与する各種の遺伝子欠損株について細胞壁の構築，化学構造さらに病原性を含む性質を調べることにより，*ALG6*，*MNN2*，*MNN10*，*HOC1* の細胞壁構築への関与について解析した。マンナンの構造解析はアセトリシス，¹H NMR 分析，メチル化分析により行った。細胞壁成分はアルカリ可溶性画分，酸可溶性画分，アルカリ・酸不溶性画分に画分し，キチンの定量はエルソン・モルガン法により行った。細胞壁グルカン層およびマンナン層の形態変化は透過型電子顕微鏡により解析した。また，病原性の変化はカイコへの感染実験により解析した。 $\Delta alg6$ 株は細胞壁成分に親和性を示す Calcofluor White, Congo Red, SDS などの薬剤に対する感受性， β -1,3-グルカナーゼ感受性が上昇していた。一方，micafungin に対する感受性は逆に低下し，キチン含量は野生株の 2 倍以上に増加していた。電子顕微鏡による細胞壁の解析でもマンナン層が薄く不鮮明になっていた。野生株と比較してマンナンの主鎖と側鎖から成るくし型構造に変化は見られなかったが，その分子量はかなり低下していた。一方， $\Delta mnn2$ 株では薬剤感受性に著しい変化は見られなかったが，マンナンの側鎖

が失われ α -1,6-結合マンノースからなる主鎖のみに変化していた。*Alg6p* は小胞体での糖タンパク質合成に関与しているが， $\Delta alg6$ 株は細胞壁へのストレスをシグナル伝達する MAPK (*Slk2p*) の活性化が起きていた。これは *Alg6p* の欠損で生じる小胞体ストレスが細胞壁の構築不全が起きており，その結果が *Slk2* の活性化に表れているものと考えられる。カイコを用いた感染実験でも野生型と比較して $\Delta alg6$ 株では病原性が低下していたが，復帰株では野生株と同等の病原性を示したことから，細胞壁の強度の維持は病原性に関与すると考えられる。この細胞壁構築不全に関連する遺伝子は，抗真菌薬の新たなターゲットとなる可能性を示唆している。

研究課題 '15-9

ゲノム情報を利用した *Aspergillus niger* 及び醸造黒麹菌のアレルゲン遺伝子の同定

鎌田洋一

(岩手大学農学部)

山田 修

(酒類総合研究所)

高橋治男

(山形大学農学部)

橋本ルイコ

(千葉県衛生研究所)

渡辺麻衣子

(国立医薬品食品衛生研究所)

川上裕司・橋本一浩

(エフシージー総合研究所)

知花博治・清水公徳

(千葉大学真菌医学研究センター)

Identification of allergen genes of *Aspergillus niger* and its related koji molds by using of their genomic information

Yoichi Kamata

(Department of Agriculture, Iwate University)

Osamu Yamada

(National Research Institute of Brewing)

Haruo Takahashi, Ruiko Hashimoto

(Chiba Prefecture Institute of Public Health)

Maiko Watanabe

(National Institute of Health Sciences)

Yuji Kawakami, Kazuhiro Hashimoto

(FCG Research Institute)

Hiroji Chibana, Kiminori Shimizu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

これまでの千葉大学真菌医学研究所共同研究の成果として、カビアレルゲンに特化したデータベースを作製していた。麹菌、白麹菌、*A. niger*のゲノム情報を入手し、作製したカビアレルゲンデータベースとの相同性検索

を行い、同データベースに追加した。相同性検索の結果、10種の既知カビアレルゲン遺伝子と類似のアレルゲン候補遺伝子が、上記麹菌等にあることを明らかにした。複数種の *Aspergillus* 属菌からゲノムDNAおよびRNAを抽出した。RNAはcDNA化し、DNAと共に次世代シーケンサーによるゲノムおよび発現遺伝子解析を行った。その成績をカビアレルゲンデータベースと照合することによって、実験を行わずに、アレルゲン遺伝子を選抜できるか検討した。*Aspergillus*属中に、未同定であるが、現在までに報告されているアレルゲン遺伝子と高度に相同性のある遺伝子が10種以上検出された。cDNAの次世代シーケンシングでは、その塩基配列の解析結果が直ちに遺伝子のクローニングに有効だった。合計6種のアレルゲン候補遺伝子の全長のクローニングと、発現ベクターへの導入、大腸菌における組換えアレルゲンタンパク質の発現が確認された。6種の内、可溶性タンパク質としてペルオキシゾーム局在性のタンパク質が精製された。同組換えアレルゲンタンパク質は、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症患者血清中のIgE抗体と結合した。同組換えアレルゲンの接種は、マウスにIgE抗体産生を誘導した。以上の成績は、カビアレルゲンの同定に、従来の粗アレルゲンと患者血清との反応、粗アレルゲンの精製・アミノ酸配列解析・遺伝子クローニング、さらに組換えタンパク質の調製という過程を経ずにカビアレルゲンが同定できることを示し、カビアレルゲンの同定にゲノム情報を利用する有効性が確認された。

研究課題 '15-10

千葉大学が保有する化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬シーズ開発

荒井孝義

(千葉大学大学院理学研究科)

知花博治・佐藤(岡本)美智代

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of antifungal seeds from chemical compound library owned by Chiba University

Takayoshi Ari

(Graduate School of Science and Technology, Chiba University)

Hiroji Chibana, Michiyo Okamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

千葉大学が保有する1,000種類のオリジナル合成化合物のうち450種類の化合物について、一次スクリーニングを終了した。その結果、6種類の化合物について *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* 等の主要な病原真菌に対して生育阻害活性が確認された。次にこれらの化合物について、マウスの培養細胞を用いて呼吸阻害活性を指標とした細胞毒性を測定したところ、1種類の化合物に細胞毒性が確認されず、抗真菌薬「シーズ候補」とし、特許出願を行った。また、日本化学療法学会のこれを元に製薬企業に対して抗真菌薬の共同研究を提案し、平成28年度に共同研究契約を締結することになった。平成28年度は550種類の化合物について、これまでと同様に、シーズ候補のスクリーニングを進めると共に、化合物の作用機序の解明に取り組んで行くことにした。

研究課題 '15-11

新規ユビキチンリガーゼ SCFUcc1 によるカンジダ・グラブラータの感染制御機構の解明

中務邦雄

(名古屋大学大学院理学研究科)

知花博治・佐藤(岡本)美智代

(千葉大学真菌医学研究センター)

Functional analysis of a novel ubiquitin ligase complex, SCFUcc1, in the virulence of *Candida glabrata*

Kunio Nakatsukasa

(Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University)

Hiroji Chibana, Michiyo Okamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

微生物や植物に特有の代謝経路であるグリオキシル酸回路は、病原性酵母の感染や植物の種子の発芽において必須の役割を果たすことが知られている。これらの生物はグルコースが不足すると酢酸や脂肪酸を材料にグリオキシル酸回路→クエン酸回路→糖新生という一連の代謝反応によりグルコースを合成する。これまで、代謝酵素の転写を介したグリオキシル酸回路の活性化、不活性化の機構は報告されていた。我々は本研究において、ユビキチン・プロテアソーム系を介した代謝酵素の分解によるグリオキシル酸回路の制御機構を見出した。グリオキシル酸回路において最初の反応を触媒するクエン酸合成酵素 Cit2 は、グルコースが豊富にあるとユビキチンリガーゼ複合体 SCF^{Ucc1} によるユビキチン修飾を受け、プロテアソームによって分解された。また、グルコースが不足して酢酸や脂肪酸からグルコースを合成する必要が生じると、SCF^{Ucc1} は Cit2 をユビキチン化できなくなり安定化した Cit2 がグリオキシル酸回路を活性化した。この研究は、代謝経路の活性が代謝酵素の分解により制御されるというユニークなスイッチング機構を明らかにしたものである。現在、*Candida glabrata* の感染における SCF^{Ucc1} ホモログの役割について、in vivo 解析を進めた。

まず、カイコ幼虫の体液中に菌体を感染させ生存率を比較した結果、Cit2の欠損株は野生株と比較して有意差が得られなかった。次にマウスのマクロファージを用いた貪食実験系を確立させ、現在本実験を用いたCit2の機能解析を進めている。

発表論文

- 1) Nakatsukasa K, Nishimura T, Byrne SD, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H., Okumura F, Kamura T: The Ubiquitin Ligase SCF^{Ucc1} Acts as a Metabolic Switch for the Glyoxylate Cycle. *Molecular Cell*, 59: 2-34, 015

研究課題 '15-12

真菌感染におけるペア型受容体を介した生体防御機構の解明

荒瀬 尚

(大阪大学微生物病研究所)

平安恒幸

(大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

知花博治・佐藤 (岡本) 美智代

(千葉大学真菌医学研究センター)

Host defense mechanism by paired immune receptors in fungal infection

Hisashi Arase

(Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

Kouyuki Hirayasu

(WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

Hiroji Chibana, Michiyo Okamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ペア型受容体は、細胞外ドメインが非常に相同性の高い活性化型と抑制化型のペアからなる受容体であり、主に自然免疫系の細胞に発現している。代表者は、ペア型レセプターの一つである活性化レセプター-LILRA2が細

菌によって壊された免疫グロブリンをリガンドとして認識することを発見した。しかしながら、真菌感染におけるLILRA2の役割は明らかではなかった。本研究課題において、病原真菌カンジダアルビカンスから分泌されたプロテアーゼによって分解された免疫グロブリンもLILRA2を介した生体防御機構を活性化することを明らかにし、これまでの成果と合わせて論文発表を行った。

研究課題 '15-13

ショウジョウバエ感染系を用いた真菌病原性発現機構のゲノムワイド解析

倉田祥一郎・倉石貴透

(東北大学大学院薬学研究科)

知花博治・佐藤 (岡本) 美智代

(千葉大学真菌医学研究センター)

Genome-wide analysis of fungal virulence mechanism using *Drosophila* infection system

Shoichiro Kurata, Takayuki Kuraishi

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

Hiroji Chibana, Michiyo Okamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

日和見感染症に代表される感染症を引き起こす病原真菌の病原性発現機構は、依然として不明であり、大きな脅威となっている。真菌医学研究センター知花准教授は、*Candida glabrata*を用いて、5249遺伝子を組換えた変異体ライブラリーを作成している。このリソースを用いると、病原性の発現に関わる遺伝子をゲノムワイドに探索できる。しかしながら、マウスなどの哺乳動物を宿主として用いて網羅的に解析することは、現実的に不可能である。一方、自然免疫研究によく利用されているショウジョウバエは、生活環が短く網羅的解析に優れている。また、すでに確立されている自然免疫変異体を用いることができる。そこで、本研究では、センターの有する真菌のリソースを利用した、ショウジョウバエでの解析から病原真菌の病原性発現機構の解明に迫ることとした。

そのために、昨年度の本共同利用・共同研究（採択番号14-11）で確立した易感染ショウジョウバエ系統を用いた網羅的感染実験系を用いて、倍地上での生育が正常な2,026の遺伝子欠損株を解析した。合計7万匹以上のショウジョウバエを用いた四次スクリーニングまで行い、病原性が低下した57株同定した。さらに、このうち14株において、ショウジョウバエ体内での菌の増殖を調べ、宿主体内での菌の増殖と、病原性の低下との関係を調べた。その結果、14株中11株では、宿主体内での増殖能が低下していたが、3株では野生型と同等の増殖能を示した。本菌において、このような病原因子を示唆する報告は未だない。今後、これら3株において、宿主体内で増殖しているにもかかわらず、病原性が低下する理由を明らかにすることで、病原真菌の病原性発現機構の本質を明らかにすることが期待できる。

研究課題 '15-14

感染に応答した自然免疫誘導の分子機構の解析

藤田尚志・加藤博己
（京都大学ウイルス研究所）
米山光俊・尾野本浩司
（千葉大学真菌医学研究センター）

Innate immune responses against pathogen infection

Takashi Fujita, Hiroki Kato
（Institute for Virus Research, Kyoto University）
Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto
（Medical Mycology Research Center, Chiba University）

研究成果

高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において、RIG-I-like受容体（RLR）は細胞内に侵入した非自己RNAを検知するセンサー分子として必須な役割を担っている。本研究は、最近明らかにした細胞内ストレス顆粒（SG）の形成を介したRLRシグナル誘導の分子機構について解析することを目的とした。本年度は、これまでのSGについての共同研究を進め、New castle disease

virus（NDV）感染に応答したRIG-Iの挙動とSG形成について詳細に解析した。その結果、NDV感染細胞内では、まずRIG-IはNDVウイルスの増殖複合体に集積することで少量のI型インターフェロン産生を誘導すること、またそのあと遅れて形成されてくるSGへ移動することによりSGを足場としてさらに強力なインターフェロン産生を誘導すること、さらに、この時NDV由来の5'末端にキャップ構造を持たないリードスルーRNAがSGに共局在しており、このRNAが非自己としてRIG-Iにより検知されていることを明らかにした。

発表論文

- 1) Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T: Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 32: 48-53, 2015.

研究課題 '15-15

真菌核酸に対する自然免疫応答の解析

河合太郎
（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）
米山光俊・高橋 梓
（千葉大学・真菌医学研究センター）

Recognition of fungal nucleic acids by pattern recognition receptors

Taro Kawai
（Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology）
Mitsutoshi Yoneyama, Azusa Takahashi
（Medical Mycology Research Center, Chiba University）

研究成果

本研究では、ウイルスや真菌由来のRNAに対する自然免疫応答惹起のメカニズムを明らかにすることを目指した。そこで、自然免疫によるRNA認識機構の詳細をさらに理解するため、I型インターフェロン遺伝子の発現誘導可能な分子の発現スクリーニングを行い、Hu Antigen R（HuR）を得た。HuRはRNA結合ドメインを

持つタンパク質であり、AUリッチ配列をもつmRNAの安定化に寄与することが知られている。そこで、ゲノム編集技術を用いてHuRを欠損するマウスマクロファージRAW264.7細胞を樹立した。合成二本鎖RNAアナログPoly (I:C) に対する応答を解析したところ、HuR欠損細胞ではインターフェロン β やケモカイン遺伝子の発現が野生型細胞と比べ顕著に限弱していた。また、HuRは未刺激状態では核に局在しており、Poly (I:C) 刺激により細胞質内に移行し顆粒状の局在を示した。このドットはストレス顆粒であることが示されている。ストレス顆粒は、ストレス刺激やウイルス感染によって形成される細胞質内顆粒であり、mRNA, RNA結合蛋白質, リボゾーム等が含まれており、ストレス時における翻訳抑制に関与すると考えられている。ウイルスRNAもストレス顆粒に局在することが報告されており、病原体のRNAがここで認識されることが示唆される。今後、HuRの細胞内局在の詳細や結合するRNAの同定を通して、真菌やウイルスに対する防御機構におけるHuRの役割を明らかにしていく必要がある。

発表論文

- 1) Kumar S, Ingle H, Mishra S, Mahla RS, Kumar A, Kawai T, Akira S, Takaoka A, Raut AA, Kumar H: IPS-1 differentially induces TRAIL, BCL2, BIRC3 and PRKCE in type I interferons-dependent and -independent anticancer activity. *Cell Death Dis*, 6: e1758, 2015

研究課題 '15-16

遺伝子サイレンシングと自然免疫反応のスイッチング機構の解析

程久美子・高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Switching mechanism between gene silencing and innate immune response

Kumiko Ui-Tei, Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年、ゲノムからはタンパク質をコードしないノンコーディングRNAが多く転写されることが明らかになっている。ノンコーディングRNAの中でもsmall interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA), PIWI-interacting RNA (piRNA) といった内在性の小分子2本鎖RNAは、遺伝子サイレンシングという塩基配列特異的な遺伝子抑制機構によって、広く多様な生命現象を制御している。一方、ウイルスは、ほぼすべての生物に感染する病原体であり、生物はウイルス感染に対するさまざまな防御機構を発達させてきているが、哺乳類特異的な現象として、ウイルスなどの外来性2本鎖RNAにより惹起される抗ウイルス応答反応が存在する。これら2つの機構は、共通にRNAによって惹起される機構であるにも関わらず、相互の関連は不明である。申請者らは、両方の経路に共通に関わる因子としてTAR-RNA binding protein (TRBP) を同定している。本研究では、TRBPの機能を足がかりに、これら2つの経路のクロストークやスイッチングの分子機構を明らかにすることを目指している。

RNAサイレンシングでは、小分子RNAがArgonauteと呼ばれるタンパク質へ取り込まれて、初めてその遺伝子抑制機能を発揮する。TRBPは小分子RNAのArgonauteへの取り込みを促進してRNAサイレンシ

グ活性を促進する。米山らはウイルス感染を細胞質内で感知するウイルスセンサータンパク質としてRIG-I, MDA-5, LGP2を発見している。TRBPは、これらのうちLGP2と直接相互作用するが、RIG-IやMDA5とは相互作用しないことが明らかになった。そこで、これらのウイルスセンサータンパク質のRNAサイレンシング効果に対する影響を、それらのノックダウンによるレポーターアッセイや強制発現系をもちいて検討したところ、RIG-IとLGP2はRNAサイレンシング活性を抑制する作用があるが、MDA5には抑制作用はないことがわかった。さらに、小分子RNAとTRBPやウイルスセンサータンパク質との相互作用をゲルシフトアッセイで解析した結果、TRBPだけでなく、RIG-IとLGP2も小分子RNAと結合するが、MDA5はほとんど結合しないことが明らかになった。RNAサイレンシング活性とsiRNA結合活性の結果は、RIG-IとLGP2のsiRNAへの結合が遺伝子サイレンシング活性を何らかの形で制御している結果と推定された。今後は、このような遺伝子サイレンシング活性制御の機構とTRBPとの相互作用の関連を明らかにすることで、2つの経路のクロストークの機構を解明する予定である。

研究課題 '15-17

同種造血幹細胞移植後のCandida感染による移植免疫反応の修飾

豊嶋崇徳

(北海道大学大学院医学研究科)

橋本大吾

(北海道大学病院)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

α -Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice

Takanori Teshima, Daigo Hashimoto

(Department of Hematology, Hokkaido University
Graduate School of Medicine)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

同種造血幹細胞移植後の真菌感染症は、しばしば重症化し致命率も高い。また、移植患者で感染症とならんで危険な合併症である移植片対宿主病 (GVHD) は、ドナーの移植片に混入したTリンパ球がレシピエントの細胞を攻撃する難治性の疾患である。GVHDは細菌感染によって増悪をきたすことが知られているが、真菌感染症がGVHDに及ぼす影響は不明であった。そこで、本研究ではマウスモデルを利用して真菌感染症がGVHDに及ぼす影響を解明し、移植後の真菌感染症予防の意義について再検討することを目的とした。

まず、マウスGVHDモデルに*C. albicans*死菌、あるいはその細胞壁構成糖鎖である α -マンナンを投与したところ、病態は有意に悪化し、特に肺で顕著であった。そのメカニズムを解析するため、肺に浸潤している炎症性細胞を調べたところ、 α -マンナンを投与したレシピエントマウスで、ドナー由来T細胞が顕著にTh17細胞への分化していることが明らかとなった。また、このTh17細胞分化の亢進は、レシピエントマウスのDectin-2を介したものであった。これらの結果から、同種造血幹細胞移植後の真菌感染症は、単に感染症として問題になるばかりではなく、肺におけるGVHDの悪化要因として重篤な病態を引き起こしている可能性が示唆された。

発表論文

- 1) Uryu H, Hashimoto D, Kato K, Hayase E, Matsuoka S, Ogasawara R, Takahashi S, Maeda Y, Iwasaki H, Miyamoto T, Saijo S, Iwakura Y, Hill GR, Akashi K, Teshima T: α -Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood*, 125: 3014-3023, 2015.

研究課題 '15-18

カンジダ感染に対する IL-17A/F を介した皮膚真菌症防御機構の解明

岩澤真理・松岡悠美・若林正一郎

(千葉大学医学部附属病院)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

IL-17 is pivotal for host defense against epidermal candidiasis

Mari Iwasawa, Yuumi Nakamura, Seiichiro Wakabayashi

(Chiba University Graduate School of Medicine)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Candida albicans (*C. albicans*) は、健常人においては皮膚や粘膜に常在真菌として定着し、通常は症状を起こすことはない。一方、多湿や不衛生、抗生剤投与による菌交代現象などにより、主に間擦部に紅斑、鱗屑、小膿疱、びらんなどを生じる。ヒトの慢性皮膚粘膜カンジダ症においては Dectin-1, CARD9, STAT3, IL-17レセプター遺伝子など複数の遺伝子異常が報告され、これらの分子を介した生体防御機構が *C. albicans* 排除に重要であることが示唆される。しかしながらマウスの経皮感染モデルは確立されておらず、その詳細な分子機構は不明である。そこで本研究では、1) 経皮感染マウスモデルの作成、2) 各種ノックアウトマウスを用いた感染防御機構の解明、を目的とし研究を開始した。まず、マウスの背部を剃毛し、一定量の *C. albicans* 懸濁液に浸したガーゼを貼付・密封したところ、Day2をピークに感染局所で好中球の浸潤を伴う炎症が認められ、Day7で *C. albicans* の排除と炎症の収束が認められ、*C. albicans* 経皮感染モデルの確立に成功した。そこで、IL-17のノックアウト (KO) マウスを用いて同様の実験を行ったところ、Day7でも *C. albicans* が排除できず、皮膚における感染防御に IL-17 が必須であることが示された。さらに、IL-17の産生細胞を探索したところ、これまで考えられてきた Group3

innate lymphoid cells (ILC3) と $\gamma\delta$ T 細胞であることが明らかとなった。これらの結果から、皮膚では Th17細胞ではなく、ILC3と $\gamma\delta$ T 細胞から分泌される IL-17が感染防御に必須であることが示された。

研究課題 '15-19

肺炎球菌認識と感染防御における Dectin-2 の役割に関する研究

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

Role of Dectin-2 in the host defense to pneumococcal infection

Kazuyoshi Kawakami, Keiko Ishii

(Tohoku University Graduate School of Medicine)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

肺炎球菌は市中肺炎の原因細菌として最も頻度が高い。特に、高齢者や慢性心肺疾患、糖尿病などの基礎疾患を有する患者では重症化することが多く、高齢化社会のわが国では重要な問題となっている。これらのハイリスク患者には莢膜多糖ワクチンが用いられ一定の予防効果を上げてきたが、胸腺非異存性抗原であるため臨床効果に十分でない点も存在し、より有効なワクチンの開発が望まれている。肺炎球菌は、真菌と同様に多糖に富む莢膜を有しており、免疫細胞による認識に何らかの C タイプレクチン受容体が関与している可能性が予想される。

本研究では、マウス肺炎球菌肺炎モデルを用いることで、本細菌に対する感染防御への Dectin-2 の役割について、Dectin-2 遺伝子欠損 (KO) マウスと野生型コントロール (WT) マウスを比較検討することで解析した。WT マウス、Dectin-2KO マウスの肺内に血清型 3 型の肺炎球菌を感染させたところ、KO マウスでは WT マウスに比べて生存期間が短縮し、3 日後の肺内菌数が有意に増

加した。Dectin-2KOマウスでは、好中球の感染局所への集積の異常はみられなかったが、好中球による菌の貪食が有意に低下した。一方、肺炎球菌のオプソニン化に重要と考えられる血清や気管支肺胞洗浄液中の莢膜多糖特異的なIgG量がDectin-2KOマウスではWTマウスと比べて有意な低下、もしくは低下傾向を示した。また、肺炎球菌培養上清による骨髄由来樹状細胞 (BM-DCs) からのIL-12p40産生が、Dectin-2KOマウスではWTマウスに比べ有意に低下していた。肺炎球菌由来成分のうち、ConA-sepharose 結合性物質がBM-DCsのDectin-2によって認識され、IL-12p40産生を誘導した。以上の結果から、Dectin-2による肺炎球菌多糖の認識が、感染局所への好中球動員よりも好中球による貪食機能に関与することで、感染防御において重要な役割を担うことが明らかになった。

本研究を通して免疫系による肺炎球菌の認識機構が明らかになることで、より有効なワクチンの開発に繋がることが期待される。

研究課題 '15-20

肺炎球菌混合感染における *Aspergillus fumigatus* バイオフィーム産生についての研究

渡邊 浩・岩橋 潤

(久留米大学医学部感染制御学講座)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on biofilm formation by *Aspergillus fumigatus* co-cultured with *Streptococcus pneumoniae*

Hiroshi Watanabe, Jun Iwahashi

(Department of Infection Control and Prevention,
Kurume University School of Medicine)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ヒトの病原体となる細菌の多くが、ヒト体内において

定着しバイオフィームを形成すると、化学療法や宿主防御機構に対する抵抗性が增強することが知られている。近年、真菌においても *Aspergillus fumigatus* や *Candida albicans* がバイオフィームを形成することが報告された。感染症は、単独の病原体だけでなく、複数の病原体によるもの (混合感染、重複感染) もあり、複数の病原体による場合は、異なる病原体の間で相互作用が起き、重症化の可能性もある。臨床例として、*Streptococcus pneumoniae* と *A. fumigatus* の重複感染が報告されている。本研究では、未だ知見の乏しい *S. pneumoniae* と *A. fumigatus* の混合バイオフィームの構造・性状について解析した。

S. pneumoniae と *A. fumigatus* を24ウェルプレートにおいて同時にバイオフィーム形成開始させると、24時間後では既に *S. pneumoniae* のみからなるバイオフィームが観察された。予め24時間形成させた *A. fumigatus* バイオフィームに *S. pneumoniae* を加えると、バイオフィームの減少および菌糸の減少・切断が観察された。この現象は、*A. fumigatus* のバイオフィーム産生を増強させる血清糖タンパク質 fetuin を添加しても観察された。*S. pneumoniae* 培養上清を *A. fumigatus* バイオフィームに加えると、バイオフィームの減少および菌糸の減少・切断が見られたが、培養上清を熱処理すると影響は見られず、*S. pneumoniae* 培養上清中の熱感受性因子が *A. fumigatus* バイオフィーム破壊に関与することが示唆された。

今後は、*S. pneumoniae* 培養上清中の *A. fumigatus* バイオフィーム破壊因子の同定を行う予定である。

研究課題 '15-21

アスペルギルスのバイオフィーム形成および抗真菌薬耐性に関連する新規遺伝子群の探索

梅山 隆・宮崎義継

(国立感染症研究所)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Screening of novel genes involved in biofilm formation and antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*

Takashi Umeyama, Yoshitsugu Miyazaki

(National Institute of Infectious Diseases)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

深在性真菌症の中でも *Aspergillus fumigatus* を主要病原菌とするアスペルギルス症は増加傾向にあり、予後が非常に悪い。近年、アスペルギルスのバイオフィーム形成がアスペルギルス感染に関与することが示唆されている。特にアスペルギローマ（菌球）の菌糸塊に見られる菌糸周囲には厚い細胞外マトリクスが観察されている。このようなバイオフィームを形成する状態では、いくつかの抗真菌薬に対する感受性が低下する現象が示され、難治性の原因の1つになっていると考えられる。しかしながら、バイオフィーム形成、および、それによる抗真菌薬耐性の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、バイオフィーム形成に関わる新規遺伝子を同定し、抗真菌薬耐性との関連性を明らかにすることを目的とする。平成27年度では、分泌蛋白質と予測される *A. fumigatus* の5遺伝子について血清刺激によるバイオフィーム形成に及ぼす影響を検討した。また、Cas9/CRISPRゲノム編集技術を *A. fumigatus* に導入した。

ハイグロマイシン耐性マーカーを含むカセットDNAを *A. fumigatus* AfS35株に形質転換し、5つの分泌蛋白質をコードする遺伝子の破壊株をそれぞれ作製した。親株では血清添加によってバイオフィーム形成量が増加するが、遺伝子破壊株ではその増加は観察できなかったこ

とから、5つの分泌蛋白質が血清刺激に応答したバイオフィーム形成に関与することが示唆された。今後、血清刺激に応答したバイオフィーム形成におけるシグナル伝達機構の役割を解明していく。

今後の新規遺伝子探索に応用するために、幅広い生物種で用いられているCas9/CRISPRゲノム編集技術を *A. fumigatus* で利用可能にした。ゲノム上の標的部位の20塩基を含むsgRNAとCas9蛋白質を一度の形質転換で導入するためのプラスミドを構築した。このシステムを用いることにより、ゲノムの特定の部位を切断し、変異導入などの編集を行うことが可能になる。今後、この技術を用いて、血清刺激に応答する新しい遺伝子群の探索に応用したい。

研究課題 '15-22

動物感染モデルを用いたポリコナゾール局所投与による真菌症治療に向けた基礎研究

長内理大・山崎伸吾・石井伊都子

(千葉大学医学部附属病院薬剤部)

渡辺 哲・亀井克彦・五ノ井透・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Effects of local administration of voriconazole onto mycosis in animal infection model

Arihiro Osanai, Shingo Yamazaki, Itsuko Ishii

(Pharmacy, Chiba University Hospital)

Tetsu Watanabe, Katsuhiko Kamei, Toru Gono, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ポリコナゾール (VRCZ) はカンジダやアスペルギルス症などの真菌感染症に対して広く用いられる抗真菌薬である。有効性が高く、広く利用されることが期待される反面、治療域が狭く薬物動態の個体間あるいは個体内の変動が大きいため治療濃度を管理するのが難しい薬物である。本研究ではアスペルギルス膿胸に対し、VRCZを胸腔内投与することにより、胸腔内でのVRCZ濃度並びに全身での血中濃度がどのように変動するか、

また胸腔内投与による治療効果を検討することを目的とした。

まず、千葉大学医学部附属病院における患者症例を検討した。71歳、アスペルギルス膿胸の患者に対し、VRCZ200mg/回、1日2回を静脈内で投与したが、血中濃度は1.45mgと目標濃度に到達しなかった。そこで、胸腔内にVRCZ200mgを投与し、血中濃度の推移を検討したところ、12時間後濃度は一過性に1.69mgまで上昇したが、24時間後では再び1.53mgと低下した。そこで、肺ドレーンを留置し、週2～3回繰り返し投与することとし投与量も300mg/回、400mg/回と増量したところ、血中濃度は5.63mgまで上昇した。血中濃度が中毒域となったため、300mg/回に戻して治療した。B-D-グルカン値は開窓術を行ったDay51には陰性化し、その後患者は回復し退院することができた。以上のことから、アスペルギルス膿胸に対するVRCZの胸腔内局所投与は臨床上有効な治療法であることが示唆された。

なお、マウスでのアスペルギルス膿胸のモデル作成を試みたが、安定した胸腔内注入モデルの作製に手間取り、データを得るに至らなかったため報告書には記載しなかった。今後、動物実験感染モデルを確立し、投与量や投与スケジュールについて詳細な検討がなされることが期待される。

研究課題 '15-23

侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の病原因子に関する研究

西順一郎

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with invasive disease

Junichiro Nishi

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

インフルエンザ菌b型ワクチン導入後に分離された小児侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株を収集しPCR法で血清型解析を実施した。血清型解析で無莢膜株と判定した28株について、臨床背景、薬剤感受性、生物型、MLST解析、バイオフィーム産生能、付着因子について検討を行った。臨床背景として発症年齢が新生児から学童まで幅広い年齢層に認められた。基礎疾患を有する症例からの分離例が多く、全体の42.9%を占めた。3例が死亡しており、予後不良例も認めた。薬剤感受性は良好な株が多かったが、2株がβラクタマーゼ産生クラブラン酸アモキシシリン耐性株であり、今後臨床的に問題となる可能性が示唆された。ST型は28株中26株が異なっており多様であった。生物型はⅡ型が最も多くついでⅢ型であり、インフルエンザ菌b型株とは異なっていた。バイオフィーム産生能、付着因子保有状況は多様であり、呼吸器から分離される無莢膜株との大きな違いは認めなかった。

研究課題 '15-24

天然物を素材とした新規抗感染症薬リード化合物の獲得

久保田高明

(昭和薬科大学)

五ノ井透

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of lead compound for new anti-infective agent from natural resources

Takaaki Kubota

(Showa Pharmaceutical University)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

沖縄で採取したVerongida目の海綿から、単離した新規プロモチロシンアルカロイドTyrokeradine GおよびHを単離、構造決定した。Tyrokeradine GおよびHは*Aspergillus niger*に対して穏やかな抗真菌活性を示した。

Tyrokeradine Gは *Cryptococcus neoformans* に対しても穏やかな抗細菌活性を示した。

また、沖縄で採取した *Hyrtios* 属の海綿から、単離したアゼピノインドール骨格を持つ新規ビスインドールアルカロイド Hyrtinadine B および C を単離、構造決定した。Hyrtinadine B は、*Aspergillus niger* に対して穏やかな抗真菌活性を示した。Hyrtinadine C は *Escherichia coli* および *Bacillus subtilis* に対して穏やかな抗細菌活性を示した。

今後も、顕著な抗菌活性を示す新たな天然物の探索を継続して行う予定である。

発表論文

- 1) Kubota T, Watase S, Sakai K, Fromont J, Gonoï T, Kobayashi J: Tyrokeradines G and H, new bromotyrosine alkaloids from an Okinawan Verongid sponge. *Bioorg Med Chem Lett*, 25: 5221-5223, 2015.

研究課題 '15-25

Aspergillus fumigatus 関連種における臨床株と環境株の比較

広瀬 大

(日本大学薬学部)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on comparison between clinical and environmental isolates on relatives of *Aspergillus fumigatus*

Dai Hirose

(School of Pharmacy, Nihon University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アスペルギルス症主要原因菌である *Aspergillus fumigatus* のアゾール薬に対する耐性株の増加は世界的に問題視されているが、日本国内においてはこれまでの所、耐性株は殆ど発見されていないのが現状である。一方、*A. fumigatus* の関連種は国内の多くの臨床分離株に

おいて、アゾール薬に対して耐性があることが知られている。しかし、国内の環境中から関連種の正式な分離報告はこれまでになく、その分布の実態は解明されていない。そこで、国内各地の土壌から関連種の分離を試み、その遺伝子型および薬剤感受性を解析し、耐性株の分布の実態把握を行った。この結果、*A. fumigatus* に比べ低頻度ではあるが南北問わず幅広い地域の土壌から *A. fumigatus* 関連種である *A. lentulus*, *A. udagarwae*, *A. viridinutans* を分離することができ、国内の自然環境中にこれら関連種が生息していることが確認された。また、薬剤感受性は、*A. lentulus*, *A. udagarwae* においては臨床および環境分離株の多くにおいて ITCZ に耐性があるのに対して、*A. viridinutans* は臨床株、環境株とも多くの株において ITCZ, VRCZ に耐性みられた。これらの耐性は環境株、臨床株とも同程度であることから、自然耐性と推定される。

研究課題 '15-26

白癬菌が産生・分泌するプロテアーゼによる表皮角層ケラチン分解様式に関する形態学的解析

山田 剛

(帝京大学医真菌研究センター)

矢口貴志・田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Morphological analyses of keratin degradation mechanisms by dermatophytes

Tsuyoshi Yamada

(Teikyo University Institute of Medical Mycology)

Takashi Yaguchi, Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

白癬の原因菌である白癬菌による表皮角化組織への侵入様式は今なお不明な点が多いが、タイプの異なるプロテアーゼ群を段階的に利用した酵素的分解が組織への菌の侵入初期の重要なプロセスであると長年考えられてきた。申請者らは、角化組織の酵素的分解への関

与が指摘されているメタロプロテアーゼ4 (MEP 4), ロイシンアミノペプチダーゼ2 (Lap 2) およびジペプチジルペプチダーゼ4 (DPPIV) について, 角化組織への菌の侵入様式との関連性を解析した. 白癬菌 *A. vanbreuseghemii* を宿主に用いて, 上記プロテアーゼ遺伝子の一重および多重破壊株を作出し, (ヒト由来の) 爪を唯一のタンパク質源とする最小寒天培地 (簡易的 *in vitro* 爪白癬モデル) を用いて感染実験を行った. しかし, すべての一重破壊株と宿主株との間で爪への感染 (増殖) 速度の差が認められなかった他, 光学顕微鏡観察においても形態学的差異は認められなかった. また, ホスト株およびMEP4一重破壊株の菌糸で覆われた爪の走査型電子顕微鏡観察を行ったところ, 爪表面に見られる隙

間を利用して菌糸が組織内部に伸長していることが判明した. さらに, 作出に成功したMEP 4/DPPIV二重破壊株, そして別途作出したゲノム上に5個あるMEP遺伝子を全て破壊した五重破壊株においても同様の解析結果が得られた.

以上のことから, 酵素的分解に基づく表皮角化組織への白癬菌の侵入様式に対し, MEPファミリー, Lap2およびDPPIVの関与の可能性は低いと考えられる. また, ホスト株およびMEP4一重破壊株感染爪の走査型電子顕微鏡観察結果から, 酵素的分解よりもむしろ組織表面の物理的なスペース (細胞間の隙間, 傷など) が角化組織内への菌の侵入を促す重要な要素になっているのではないかと考えられる.