

平成29年度 共同利用・共同研究報告

2017 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '17-1

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

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

亀井克彦・川本 進

(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)

Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto

(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、健康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* (CG) と *C. neoformans* (CN) 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。

これまでに我々は、*Cryptococcus* spp. が有する主要なT細胞抗原である98kDa manno protein (MP98) を認識する抗原受容体遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (CnT-II) の作成に成功している。本研究では、このマウスを用いることで以下のことが明らかとなっ

た。1) CnT-IIマウスの肺内に本真菌を感染させたところ、CGではCNに比べ肉芽腫反応に乏しく、菌体が肺腔内を充満していた。2) CGでは感染後のTh1免疫応答が低下した。3) CGの菌体成分が本真菌特異的なTh1細胞の分化誘導を抑制した。

一方で、本真菌の病原性に重要な莢膜多糖からCTAB非結合分画を採取し、さらにConA-sepharose 4Bカラムに結合する成分を精製しDectin-2との応答性を解析したところ、以下のことが明らかになった。1) CN由来ではDectin-2への結合性、Dectin-2レポーター細胞の活性化、骨髄由来樹状細胞の活性化を示したのに対して、CG由来ではいずれの活性も低下していた。2) ConAに結合する莢膜多糖成分としてgalactoxylomannan (GalXM), mannoprotein (MP) が知られているが、抗GalXM抗血清、精製GalXMを用いた解析から目的の活性はGalXMとは異なる可能性が示唆された。3) 本真菌の主要なMPである chitin deacetylase によってDectin-2レポーター細胞の活性化が観察された。

以上の結果から、*C. gattii* と *C. neoformans* はDectin-2への異なる刺激活性を示すことで、その後のTh1免疫応答が異なり、このことが両真菌の病原性の違いに関与する可能性が示唆された。両真菌種で異なるDectin-2のリガンド候補としてMPの可能性が考えられ、今後はその構造の違いとの関連性についてさらに解析を進める予定である。これらの成果は、第46回日本免疫学会学術集會にて報告した。

研究課題 '17-2

真菌病原性発現機構と宿主自然免疫応答の解析

倉田祥一郎

(東北大学大学院薬学研究科)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Study of fungal pathogenicity and host innate immune responses

Shoichiro Kurata

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(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、5150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。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て、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と、新たな抗真菌薬の標的の同定を目指した。

そのために、平成26年度に確立したショウジョウバエ網羅的感染実験系を用いて（採択番号14-11）、平成27年度に通常の培養条件では生育に必須ではない遺伝子を欠損した変異体2026系統を解析し、ショウジョウバエに対する病原性が低下した系統を57系統同定した（採択番号15-13）。平成28年度は、これらの内、宿主体内での増殖能が低下していた11系統を解析し、宿主体内での増殖に必要な遺伝子を同定した（採択番号16-6）。そこで、本年度は、ショウジョウバエを用いて同定したこれらの遺伝子が、マウスを宿主とした際にも、体内での増殖に関わるのかどうか検討すると共に、ショウジョウバエを用いた宿主の自然免疫応答を解析した。ショウジョウバエでは、真菌に対する免疫応答は、NF- κ B経路であるToll経路が制御している。当研究室では、このToll経路を制御する新規受容体を同定しているが、今回、この新規受容体は真菌に対する抵抗性の発現には関わらない事が明らかとなった。

研究課題 '17-3

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

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

加藤博己

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Hiroki Kato

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究では、高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において重要な役割を担うウイルス感染センサーであるRIG-I-like受容体(RLR)に着目し、それらによるウイルスRNA検知の分子機構と生理機能について継続して解析を行っている。特に近年は、細胞内ストレス顆粒(SG)の形成を介したRLR活性化の分子機構について解析しており、これまでにPumilioの機能解析など複数の報告を行ってきた(*PLoS Pathogens*, 2016, 2014; *Curr Opin Immunol*, 2015)。本年度は、昨年度に同定したSGに局在する新規RNA結合タンパク質(RBP)についての機能解析を実施した。これまでの解析から、このRBPの遺伝子破壊細胞においてRNAウイルス感染に応答したI型インターフェロン(IFN)遺伝子誘導すなわち抗ウイルス自然免疫応答が顕著に減弱していたことから、この分子が抗ウイルス応答を正に制御する因子であることが強く示唆されていた。さらにこの分子は、ウイ

ルス非感染細胞でRLRの一つであるLGP2と構成的に会合しており、ウイルス感染刺激に応答して両者の会合が減弱する結果が得られている。これまでにLGP2がウイルス非感染細胞で複数のRBPと会合していることを報告しており、ウイルス感染に応答したこの複合体の変化が、抗ウイルス応答に関与することが予想された。現在、これに注目した生化学的な解析および会合しているRNAの同定を含めた解析を実施している。一方で、CRISPR/Cas9系を用いたこの分子のノックアウトマウスを作出し、in vivoにおける抗ウイルス応答への関与について検討が進行中である。

研究課題 '17-4

Aspergillus fumigatus リボソーム標的薬剤耐性株における二次代謝活性化機構の解明

浅井禎吾

(東京大学大学院総合文化研究科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Activation of secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus* strains with resistance to ribosome-targeting chemicals

Teigo Asai

(Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Tetsu Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

昨年度、化学変異源を用いて *Aspergillus fumigatus* のハイグロマイシンB耐性株を作製し、二次代謝が活性化した変異株を見出した。今年度は、化学変異源の濃度、処理時間、選抜時のハイグロマイシンBの濃度を変化させ、ハイグロマイシンB耐性株を20株程度取得した。それぞれ培養すると、二次代謝の活性化の様式がいくつかのパターンに分類された。それぞれ、数株ずつピックアップして、次世代シーケンサーを用いて網羅的な変異解析を行った。どの株でも数十の変異が導入されていたため、容易にどの変異が二次代謝活性化に寄与しているかは特定することが難しかったものの、耐性株間に共通する変異もいくつか見出しており、現在それらについて詳細な解析を行っている。また、他の *Aspergillus* 属菌についてもハイグロマイシンB耐性株の中に二次代謝活性化株を見出している。今後これらの株の変異解析を行い、種を越えて共通の変異を見出すことで、ハイグロマイシンB耐性化と二次代謝活性化に寄与する変異を特定して行く予定である。

研究課題 '17-5

Antifungal drug resistance in *Candida glabrata* from transcriptional control to drug extrusion: aiming improved diagnosis and therapeutics

Miguel C Teixeira

(Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico/Bioengineering Department)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Candida glabrata はアゾール低感受性であるために近年患者数が増加しているが、耐性機序において、未解明な点が多い。そこで当研究課題では、トランスクリプトーム解析によって *C. glabrata* におけるアゾール耐性新規メカニズムの探索を目的にしている。*C. glabrata* 臨床分離株を用いて、ポサコナゾール、クロトリマゾール、フルコナゾール、ボリコナゾールに20-45日間暴露すること

によって、各アゾールに対してそれぞれ感受性が低下した株（進化株）を取得することができた。生化学的解析の結果、いずれ株もエルゴステロール合成量には変化がなく、アゾールの細胞内蓄積量に減少が確認された。ゲノム解析並びにトランスクリプトーム解析の結果、4つアゾールに対して耐性を示した株では、多剤耐性排出ポンプを制御因子である *RDR1* に突然変異が確認された。ポサコナゾール／クロトリマゾール耐性株では *Epa3* 付着因子の高発現が確認された。*Epa3* はバイオフィルム形成に必要な遺伝子であり、アゾール耐性に関する報告はこれまでになく、新しい知見となった。以上の結果をまとめ、Antimicrobial Agents and Chemotherapyへ投稿した。現在、revise version を作成中である。

発表論文

- 1) Mafalda Cavalheiro, Catarina Costa, Ana Silva-Dias, Isabel M. Miranda, Can Wang, Pedro Pais, Sandra N. Pinto, Dalila Mil-Homens, Sato-Okamoto Michiyo, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Raquel M. Silva, Nuno P. Mira, Arsénio Fialhol, Hiroji Chibana, Acácio R. Gonçalves, Geraldine Butler, Miguel C. Teixeira: Unveiling the mechanisms of in vitro evolution towards fluconazole resistance of a *Candida glabrata* clinical isolate: a transcriptomics approach. Submitted to Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- 2) Romão D, Cavalheiro M, Mil-Homens D, Santos R, Pais P, Costa C, Takahashi-Nakaguchi A, Fialho AM, Chibana H, Teixeira MC. A New Determinant of *Candida glabrata* Virulence: The Acetate Exporter *CgDtr1*. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Nov 14; 7: 473. doi:10.3389/fcimb.2017.00473. eCollection 2017.

研究課題 '17-6

真菌細胞壁成分に対する自然免疫応答機構の解析

河合太郎

(奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

Search for innate immune receptors for the fungal cell wall component

Taro Kawai

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

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アレルギーや炎症を引き起こす真菌成分の一つであるキチンに対する自然免疫応答について解析を行った。植物のキチン受容体の一つとして知られる CERK1 受容体のキチン認識モチーフ Lysine motif (LysM) と相同性を示すヒト及びマウスの蛋白質をデータベース検索から 6 種類 (LysM1-6 とする) 見つけ出した。うち 4 種類 (LysM1-4 とする) は、互いに高い相同性を示すことから、まずこの 4 つに着目して解析を行った。本年度 CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、これら 4 種類をそれぞれ欠損するマウス樹立に成功した。キチン投与後の自然免疫応答について、肺胞洗浄液中の免疫細胞 (好中球, 好酸球, マクロファージ等) の集積や炎症関連遺伝子 (IL-6 等) の発現を中心に解析を行っている段階である。予備的ではあるが、これら遺伝子欠損マウスと野生型に大きな差は認められなかった。そこで、これら 4 種類すべてを欠損する四重欠損マウスの樹立を現在行なっている。2 種類 (LysM2, 4) を欠損する二重欠損マウスの樹立に成功したが、このマウスにおいても免疫細胞の集積に差は認められなかった。また、残りの 2 種類 (LysM5, 6) についても遺伝子欠損マウスの樹立を行なっているところである。

研究課題 '17-7

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)

知花博治・山口正規

(千葉大学真菌医学研究センター)

Deletion effect of genes related to the cell wall architecture of *Candida glabrata*

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Ito,
Yutaka Tanaka

(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana, Masaki Yamaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年、病原性酵母 *Candida glabrata* の細胞壁は、環境ストレス応答をきっかけにダイナミックにヘテロ再構築されること、またこの現象が既存の抗真菌薬への耐性や致死的な環境ストレスからの防御などの面で有利に働くことが相次いで報告された。このことは、細胞壁構造最適化 (Cell Wall Integrity: CWI) の仕組みと *C. glabrata* の病原性、および抗真菌薬耐性とのあいだに密接な関わりがあることを示唆している。我々は、*C. glabrata* CBS138 株の全遺伝子について作製した変異株ライブラリの中から、特に i) 小胞体-ゴルジ体-分泌経路をコードする遺伝子、および ii) 糖タンパク質の品質管理に関わるシャペロン遺伝子群の欠損株を中心に、細胞壁糖鎖構造構築と環境ストレス応答能、および CWI に及ぼす影響について解析している。

我々は昨年度までに、小胞体局在型分子シャペロンタンパク質 Kre5p をコードする *KRE5* 遺伝子の発現抑制により、①細胞壁βグルカン構造の異常・含量低下、②細胞壁キチン含量の代償的な増加、③MAPキナーゼタンパク質 Slt2p のリン酸化亢進、④小胞体 (ER) ストレス応答活性化、⑤免疫抑制剤 FK-506 に対する超高感受性がそれぞれ観察されることを明らかにしていた。しかし、これらの現象にそれぞれ相関があるかどうかはよくわかっていなかった。従って今年度は、細胞壁βグルカンへのダメージが ER ストレス応答を誘導し、Slt2p MAPキナーゼの活性化を経てキチン生合成を活性化するという仮説モデルを立て、様々な遺伝子欠損株ライブラリを用いて仮説モデルを検証した。

CNE1 は糖タンパク質品質管理を担うカルネキシン型分子シャペロン Cne1p をコードしている。*Cne1* 遺伝子欠損株の細胞壁を解析した結果、*KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様に、β1-6グルカン含量の減少と、細胞壁キチン含量の増加が認められた。加えて、Slt2 MAPキナーゼのリン酸化亢進、小胞体ストレスマーカー遺伝子 *KAR2* や *BAG7* の mRNA 転写活性化も同時に認められた。興味深いことに、カルシニューリン阻害剤 FK-506 を処理したところ、これら変異株における細胞壁キチン含量はさらに増大し、かつ CWI を司る MAPキナーゼである Slt2p のリン酸化が極端に亢進することがわかった。加えて、*cne1* 遺伝子欠損株に FK-506 を処理したところ、細胞周期の停止および細胞死と異形細胞凝集像が観察された。以上のことから、*cne1* 遺伝子欠損株も *KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様の表現型を示し仮説モデルに沿った細胞応答を示すことがわかった。次に、小胞体-ゴルジ体-分泌経路が細胞壁生合成に重要な働きをしていることに着目し、各オルガネラに局在して細胞壁生合成に関与する遺伝子を選抜して解析した。小胞体に局在してカルネキシンシャペロンを補助する *ROT2*、ゴルジ体に局在して細胞壁マンナン生合成を担う *MNN2*、*MNN11*、*HOC1*、細胞膜上~ペリプラスム間隙に局在してβグルカン合成を担う *KRE1*、*KRE11* のそれぞれ遺伝子欠損株を解析したところ、*mnn2*、*mnn1*、*hoc1* 遺伝子欠損株は上記①~⑤のいずれの表現型も示さなかった一方で、*rot2*、*kre1*、*kre11* 遺伝子欠損株では、*KRE5* 遺伝子発現抑制株や *cne1* 遺伝子欠損株と同様に、細胞壁構造の異常や FK-506 高感受性が観察された。これらのことは、*C. glabrata* の CWI は MAPキナーゼシグナル伝達を中心として、小胞体ストレス応答やカルシニューリン経路がこれを制御している、という仮説モデルを支持するものと考えられる。

ン酸化亢進、小胞体ストレスマーカー遺伝子 *KAR2* や *BAG7* の mRNA 転写活性化も同時に認められた。興味深いことに、カルシニューリン阻害剤 FK-506 を処理したところ、これら変異株における細胞壁キチン含量はさらに増大し、かつ CWI を司る MAPキナーゼである Slt2p のリン酸化が極端に亢進することがわかった。加えて、*cne1* 遺伝子欠損株に FK-506 を処理したところ、細胞周期の停止および細胞死と異形細胞凝集像が観察された。以上のことから、*cne1* 遺伝子欠損株も *KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様の表現型を示し仮説モデルに沿った細胞応答を示すことがわかった。次に、小胞体-ゴルジ体-分泌経路が細胞壁生合成に重要な働きをしていることに着目し、各オルガネラに局在して細胞壁生合成に関与する遺伝子を選抜して解析した。小胞体に局在してカルネキシンシャペロンを補助する *ROT2*、ゴルジ体に局在して細胞壁マンナン生合成を担う *MNN2*、*MNN11*、*HOC1*、細胞膜上~ペリプラスム間隙に局在してβグルカン合成を担う *KRE1*、*KRE11* のそれぞれ遺伝子欠損株を解析したところ、*mnn2*、*mnn1*、*hoc1* 遺伝子欠損株は上記①~⑤のいずれの表現型も示さなかった一方で、*rot2*、*kre1*、*kre11* 遺伝子欠損株では、*KRE5* 遺伝子発現抑制株や *cne1* 遺伝子欠損株と同様に、細胞壁構造の異常や FK-506 高感受性が観察された。これらのことは、*C. glabrata* の CWI は MAPキナーゼシグナル伝達を中心として、小胞体ストレス応答やカルシニューリン経路がこれを制御している、という仮説モデルを支持するものと考えられる。

発表論文

- 1) Yutaka Tanaka, Masato Sasaki, Fumie Ito, Toshio Aoyama, Michiyo Sato-Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Nobuyuki Shibata: Cooperation between ER stress and calcineurin signaling requires maintaining the cell wall integrity in *Candida glabrata*, *Fungal Biology*, 122(1): 19-33
- 2) Fumie Itoh, Shizuka Takahashi, Yutaka Tanaka, Atsushi Kudoh, Masato Sasaki, Michiyo Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Masashi Yamaguchi, Kazuyoshi Kawakami, Hiroji Chibana and Nobuyuki Shibata: Glycosyltransferase Alg6 is required for cell wall integrity and virulence of *Candida glabrata*, *FEBS Journal* (Under revision)

研究課題 '17-8

薬剤耐性および感受性 *Aspergillus fumigatus* 株の代謝産物のメタボローム解析

細江智夫

(星薬科大学薬化学教室)

武田 尚

(星薬科大学薬化学教室)

若菜大悟

(星薬科大学薬化学教室)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Metabolome analysis based on fungal metabolites of drug-resistant mutant *Aspergillus fumigatus*

Tomoo Hosoe

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Hisashi Takeda

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Daigo Wakana

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々は、近年発生し問題となっている *Aspergillus fumigatus* の薬剤耐性株を、化学成分の観点から感受性株と判別することが可能ではないかと考え、その検討を試みている。昨年度は、AMPH 耐性及び感受性 *A. fumigatus* を PDB 培地を用い、25℃ もしくは 5% CO₂ 条件下 37℃ の 2 種の条件での培養を行い、その代謝産物の ¹H-NMR スペクトルを用いメタボローム解析を行ったところ、感受性株が特徴的に産生する芳香族化合物由来ピークから感受性株と耐性株の分類が可能と判断した。本年度は、上記検討を拡大し、当センターが保有するアゾール系薬物耐性菌 *A. fumigatus* 類縁菌、*A. lentulus*、*A. udagawae* 及び *A. viridinutans* を対象に、その培養及び HPLC プロファイル解析を実施し、耐性株の相似性に関与する化学成分の探索を行った。

A. lentulus、*A. udagawae* 及び *A. viridinutans* 各 8 菌株を

PDB 培地及び米固体培地、25℃ でそれぞれ 1 週間もしくは 2 週間培養を行い、得られた培養エキスを HPLC 分析した。培養の結果、両培地とも菌の発育は観測されたものの、PDB 培地培養では特徴的な代謝産物は観測されなかった。米固体培地培養では保持時間 25.7 分のピークがほぼすべての菌株で共通して観測された。また、*A. viridinutans* と *A. lentulus* は共通性の高い HPLC プロファイルを示したが、*A. udagawae* は上記 2 菌種とは異なり、高極性化合物を多数産生することが明らかとなった。

今後、更に培地種、培養温度等の検討を行い最適な培養条件を設定した後、各菌株の培養エキスについて ¹H-NMR スペクトルを用いたメタボローム解析を行う予定である。

研究課題 '17-9

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)

高橋弘喜・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)

Hiroki Takahashi, 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29年度では、前年度までにCas9/CRISPRゲノム編集技術を用いたスクリーニングで得られた、血清存在下での生育に必須と予想される遺伝子の検討を行った。

Cas9/CRISPRゲノム編集技術を*A. fumigatus*で応用し、次世代シーケンサーと組み合わせたCRISPRスクリーニングを行うことによって、血清存在下の生育に必須と予想される26種類の候補遺伝子を前年度までに取得していた。得られた遺伝子が予想通りに血清存在下で必須かどうかを確認するために、26種類全ての遺伝子について、*A. fumigatus* Afs35株を宿主として、ハイグロマイシン耐性遺伝子の挿入による遺伝子破壊を行った。それぞれの遺伝子破壊株を血清存在下で培養し生育を比較したが、いずれの破壊株も生育の低下を示すものは確認できなかった。この結果を踏まえて、今後、Cas9/CRISPRによる変異導入の効率を上げるためのプラスミドベクターを開発し、新しく遺伝子ライブラリを作製し、CRISPRスクリーニング法を確立することにより、血清刺激に応答するシグナル伝達機構の解明を目指す。

発表論文

- 1) Takashi Umeyama, Yuta Hayashi, Hisaki Shimosaka, Tatsuya Inukai, Satoshi Yamagoe, Shogo Takatsuka, Yasutaka Hoshino, Minoru Nagi, Shigeki Nakamura, Katsuhiko Kamei, Kenji Ogawa, Yoshitsugu Miyazaki: Cas9/CRISPR genome editing to demonstrate the contribution of Cyp51A Gly138Ser to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. bioRxiv. May 1, 2018. (DOI: 10.1101/311712).

研究課題 '17-10

新規抗真菌剤の合成および活性評価研究

椎名 勇

(東京理科大学理学部第一部応用化学科)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Enantioselective synthesis of new antibacterial and antifungal agents and evaluation of its activity

Isamu Shiina

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science)

Minehiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

東京理科大学理学部第一部応用化学科 椎名研究室では2016年に*Eupenicillium shearii*より単離・構造決定されたユーシェアリライド天然物(24員環マクロライド)の全合成方法を確立した。また、独自の不斉合成技術によりユーシェアリライド類縁体(光学異性体およびジアステレオマー)のライブラリーを構築している。さらに、2017年には置換基を天然のものから違えた構造に変換した非天然型のユーシェアリライド類縁体の合成を実施し、数種類の人工化合物の製造を行なった。平成29年度の共同研究では、カンジダやクリプトコッカスなどの真菌とMRSAなどの多剤耐性グラム陽性菌に対するユーシェアリライド立体異性体(8種類)の発育阻止効果試験に加え、上記非天然型ユーシェアリライドを用いた真菌とバクテリアに対する発育阻止効果試験を実施した。その結果、天然物よりも抗真菌活性と抗細菌活性ともに高い人工型のユーシェアリライド類縁体があることを確認した。平成30年度の共同研究においても、これら新規化合物を用いた真菌とバクテリアに対する活性調査試験を継続する予定である。

発表論文

- 1) Takayuki Tono, Inohana, Takehiko Inohana, Teruyuki Sato, Tomoki Yoshida, Isamu Shiina: Total Synthesis and Antimicrobial Activities of All Stereoisomers of (16Z, 20E)-Eushearilide and (16E, 20E)-Eushearilide: The Journal of Organic Chemistry 83, 印刷中(doi: 10.

1021/acs.joc.8b00774).

研究課題 '17-11

アゾール系農薬テブコナゾールによる選択で得られた耐性 *Aspergillus fumigatus* 株の解析

豊留孝仁

(帯広畜産大学獣医学研究部門)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of azole-resistant *A. fumigatus* clones selected with a fungicide, tebuconazole

Takahito Toyotome

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年、*Aspergillus fumigatus* のアゾール薬耐性化が問題となってきている。農地等外部環境中で用いられているアゾール系抗カビ剤が耐性化要因の一つとして挙げられている。農薬での選択で生じる耐性化は十分に明らかとなっておらず、今後も新たな耐性菌の出現が懸念される。我々はこれまでに日本で使用量が最も多いアゾール系抗カビ剤テブコナゾールを用いて *A. fumigatus* の選択を行い、テブコナゾールに対する感受性の低下した4クローンを取得してきた。本研究ではこれらクローンの耐性化要因の解明を行った。

まず、これまでに得られているクローンの医療用アゾール薬に対する感受性を評価した。その結果、テブコナゾール耐性株はいずれもボリコナゾールに耐性を示すことが明らかになった。また、株によってはイトラコナゾールに対しても耐性を示すことが明らかとなった。標的酵素である Cyp51A のプロモーター領域およびコード領域を解析したが、いずれも変異は認められなかった。これらの結果から、Cyp51A に依らない未知の機構によりアゾール系抗真菌薬への耐性を獲得していることが推測された。

現在、他競争的資金にて引き続き解析を進めており、耐性クローンにおいてゲノムワイドでの解析を行い、複数の変異箇所を同定済みである。4株共通して major facilitator superfamily (MFS) タンパク質に点変異を生じていることが明らかになっている。今後このタンパク質の薬剤耐性への寄与について解析を進める予定である。

研究課題 '17-12

千葉大学が保有するオリジナル化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬シーズの開発

荒井孝義

(千葉大学大学院理学研究科)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(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 Arai

(Graduate School of Science, Chiba University)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(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は、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特許出願中である(特願2016-058951)。平成28年度は残る550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、現在作用点の解析を進めている。

研究課題 '17-13

Aging associated tissues dysfunction through regulation of microbiota and metabolites

早野元詞

(Genetics Department, Harvard Medical School)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

Motoshi Hayano

(Genetics Department, Harvard Medical School)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

腸内細菌叢と肥満、がん、炎症などについてはさまざまな報告があがってきているが、一方で老化と腸内細菌叢の関係は不明である。本研究は腸内細菌による記憶や筋肉など多臓器への影響を含む「老化」制御の可能性を探り、腸内細菌やメタボライトの制御を介した臓器機能の回復を検討することを目標とした。

I-PpoIと呼ばれるエンドヌクレースを用いたDNA損傷誘導型のエピゲノム変化による早老症モデル、ICE (Inducible changed in Epigenome) マウスはHarvard Medical SchoolのDavid A. Sinclair研究室において構築されている (unpublished data)。ICEマウスでは野生型の老化マウス同様に記憶や筋肉における機能低下が観察され、FOXOやCTCF結合領域特異的なH3K27ac, H3K56acそしてDNA methylationの変化が観察される。今回、千葉大学真菌医学研究センターにおいて、ICEマウスや野生型の老化マウスの脳において、炎症マーカーであるマイクログリアやアストロサイトの上昇、そしてFluoro Jade C stainingによるNeuronal Degenerationが確認された。これらの結果からICEマウスにおいて記憶障害は異常な炎症応答を介していることが明らかになった。今後、この炎症惹起の要因について、腸内細菌叢と代謝産物について検討するとともに、腸管の感染制御に関わる $\alpha 1, 2$ -フコース発現とそれに対する*S. Typhimurium*や*Citrobacter rodentium*感染がどのように老化を制御するかを引き続き検討する。特に老化において腸内細菌叢による代謝産物が体全体のDNAやヒストン修飾をどのように制御し、疾患を誘導するかに焦点をあてて、共同研

究を進展させる。

研究課題 '17-14

ITAM共役受容体Trem2のカンジダ感染防御における役割の解明

原 博満・豊永憲司

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on the role of the ITAM-coupled receptor Trem2 in anti-fungal defense

Hiromitsu Hara, Kenji Toyonaga

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

DAPI2会合型ITAM共役受容体であるTrem2を欠損する(Trem2^{-/-})マクロファージは、真菌受容体であるC型レクチンを介したサイトカイン/ケモカイン応答が増強することを見出した。そこで、カンジダ感染防御におけるTrem2の生理的役割を明らかにするため、Trem2^{-/-}マウスを用いた*Candida albicans*感染試験を貴センター実験施設にて実施した。初回の感染実験において、Trem2^{-/-}マウスは野生型コントロールマウスに比べて有意に死亡率の減少が観察された。感染臓器内(感染後4日目)でTNFの上昇とIL-10産生の減少の傾向が見られた。2回目の感染試験においても、有意差は無いものの、やはりTrem2欠損マウスで死亡率の改善が観察されたが、感染臓器内(感染後7日目)でのサイトカイン産生に有意な差は認められなかった。従って次年度は、この実験結果の追試を実施し、さらに詳細に経時的にカンジダ感染後のマウスを解析し、カンジダ感染防御におけるTrem2シグナルの役割をより明確にするるとともに、Trem2によるCLRシグナル抑制の分子メカニズムの解明を目指す。

研究課題 '17-15

哺乳類特異的な自然免疫応答機構とRNAサイレンシング機構における相互作用の解明

程久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Molecular interaction between gene silencing and innate immune responses in mammalian cells

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々は、RNAによって惹起されるという点で共通の分子機構であるRNAサイレンシングと抗ウイルス応答の両方の経路に関わる初めての分子としてTAR-RNA binding protein (TRBP)を同定した。TRBPはRNAサイレンシングに関わるDicerタンパク質と相互作用する二本鎖RNA結合タンパク質であるが、抗ウイルス応答においては細胞内ウイルスセンサーであるRIG-I-like receptors (RLRs)の1つであるLGP2とも相互作用する。抗ウイルス応答によりRLRsの発現量が上昇すると、LGP2とTRBPは相互作用し、TRBPのRNAサイレンシング促進機能を抑制すると考えられる結果を得ていたが、その作用機序は不明であった。しかし、我々はTRBPが二本鎖RNAと結合する部位と同じ部位を介してLGP2と相互作用することを明らかにした。すなわ

ち、LGP2がTRBPと相互作用することで、それまでTRBPが結合していたRNAサイレンシングに関わるmicroRNAを遊離することが明らかになった。そこで、TRBPが結合するmicroRNA (miRNA)を同定するためにRNA免疫沈降シークエンスをおこない、TRBPと共免疫沈降するmiRNAを網羅的に同定した。これらのmiRNAはTRBPから遊離放出されることで、前駆体miRNAから成熟型miRNAへの生合成過程が阻害されているがノーザンブロットによって明らかになった。さらに、それらの標的遺伝子群を情報科学的に推定し、実際にそれらの遺伝子の発現が上昇することもRT-PCR法によって証明した。

今後は抗ウイルス応答によりRNAサイレンシングが抑制される生物学的意義について、ゲノムワイドな遺伝子発現変動の解析により明らかにする。

なお、本研究成果の一部は、現在論文投稿中である。

研究課題 '17-16

臨床検体から分離されたテルビナフィン低感受性(耐性)白癬菌株における耐性化メカニズムの解明

山田 剛

(帝京大学医真菌研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene.

Tsuyoshi Yamada

(Teikyo University Institute of Medical Mycology)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

申請者らとスイス・ローザンヌにある Centre Hospitalier Universitaire vaudois (CHUV) の共同研究グループは、2013年～2016年にかけてCHUVを拠点に収集した臨床分離白癬菌2,056株を対象に、白癬の治療に広く使用されているテルビナフィン (TBF) を含むサブローデキストロース寒天培地を用いた簡易培養試験を行い、17株の培養陽性株を見出した。これらのTBF低感受性株では、TBFの作用標的であるスクワレンエポキシダーゼをコードする *SQLE* 遺伝子のORF内にアミノ酸置換を生じる幾つかの点変異 (SNP) が認められた。そこで、TBFに感受性を示す白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* に遺伝子操作を行い、内在性の *SQLE* 遺伝子に同様のSNPを導入した複数の変異株を作出した。これらの *SQLE* 変異株の幾つかについて、CLSI法によるTBF感受性評価を行ったところ、全ての変異株で明確な感受性低下が認められた。これより、本研究で見出された臨床分離白癬菌株における薬剤耐性化の主要原因は、*SQLE* 遺伝子に生じた点変異によるタンパク質のアミノ酸変異に伴う立体構造の変化であることが示唆された。

一方、今回見出された臨床分離TBF低感受性白癬菌株の中には、*SQLE* タンパク質内に Phe³⁹⁷ → Leu 変異を有する複数の株が含まれていた。これらの株について、CLSI法によるTBF感受性評価を行ったところ、TIMM20,092株のみ、その他の株に比べ、より一層の感受性低下が認められた。これより、TIMM20,092株のTBF低感受性化には、*SQLE* 遺伝子に生じた点変異に加え、別の要因が関与している可能性が示唆された。現在、薬剤の排出に関わるトランスポーター遺伝子の発現レベルの解析を行っているところである。

発表論文

- 1) Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(7): e00115-17, 2017.

研究課題 '17-17

アスペルギルス症原因菌が産生する環状ペプチドの宿主免疫応答反応への影響

梅村舞子

(産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

豊留孝仁

(帯広畜産大学動物・食品検査診断センター)

亀井克彦・渡辺 哲・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Effect of cyclic peptides produced by pathogenic *Aspergillus* species on host immune response

Maiko Umemura

(Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Takahito Toyotome

(Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Daisuke

Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アスペルギルス症の原因菌である糸状菌 *Aspergillus flavus* において、近年、カビで初めてのリボソームペプチド生合成経路が研究代表者によって見出された。本経路では環状ペプチド化合物の骨格構造が前駆体遺伝子に直接書き込まれており、ほぼすべてのカビ・キノコに保存されている。また生合成される環状ペプチドの一つである ustiloxin は強い微小管重合形成阻害活性を有することから、宿主の正常な免疫反応を抑制する可能性が高い。そこで本研究では、本リボソームペプチド生合成経路で生合成される環状ペプチドが新規病原因子として機能するかを、当該経路遺伝子破壊株を用いた動物細胞感染実験等から検証する。

Aspergillus fumigatus Af293株は、ust-RiPS経路における前駆体ペプチド様遺伝子を2つ保有する (*rps1a* および *rps2a* と呼称)。これまでの Transwell システムを用いたヒ

ト肺上皮細胞 (Calu-3) への侵入試験および免疫抑制マウスへの感染実験から, *rps2a*破壊株において細胞侵入活性が優位に低く, またマウス肺増殖率が低い傾向が見られた. そこで本年, マクロファージ食作用に対する本経路の影響を観察するため, マウスのマクロファージ RAW264.7細胞に *A. fumigatus rps1a* および *rps2a*破壊株を作用させて, 食作用アッセイを行った. FITCで染色した胞子をガラスボトムプレート上で培養した RAW264.7細胞に添加して, 37度で1時間5% CO₂培養器にて培養した. 細胞を固定化した後, マクロファージ細胞を CellMaskにて染色し, 共焦点顕微鏡にて細胞内に取り込まれた胞子の数をカウントした. 結果, *rps1a*破壊株, *rps2a*破壊株ともに, 捕食された胞子の割合は親株と有意な差を示さなかったことから, 本経路はマクロファージによる食作用に影響を及ぼさないと結論付けた. しかし本経路による細胞傷害性とマウス肺内における増殖性への影響が見られていることから, 引き続き他の真菌に数多く存在する同経路を分類した上で, 宿主への作用を調べる予定である.

発表論文

- 1) Hagiwara, D., Sakai, K., Umemura, M., Nogawa, T., Kato, N., Osada, H., Watanabe, A., Kawamoto, S., Gono, T., Kamei, K., Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*, PLoS One, 12, e0177050, 2017 (doi: 10.1371/journal.pone.0177050).

研究課題 '17-18

*Aspergillus fumigatus*の病原性におけるガラクトフラノース含有糖鎖の機能解析

岡 拓二

(崇城大学・応用微生物工学科)

亀井克彦・渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

萩原大祐

(筑波大学・生命環境系・糸状菌相互応答講座)

田中 大・柴田信之

(東北薬科大学・感染生体防御学研究室)

Functional analysis of galactofuranose-containing oligosaccharides in the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*

Takuji Oka

(Department of Applied Microbial Technology, Sojo University)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Daisuke Hagiwara

(Laboratory of Fungal Interaction and Molecular Biology, Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

Yutaka Tanaka, Nobuyuki Shibata

(Department of Infection and Host Defense, Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

研究成果

今年度の特筆すべき成果として Gal₇転移酵素活性測定系を改良したことが挙げられる. Gal₇転移酵素活性の検出に用いる UDP-Gal₇は不安定な稀少物質であり, 且つ, 試薬として販売されていない. そこで, これまでは UDP-Gal₆から UDP-Gal₇を合成する酵素である Gif の組換え体を作製し, UDP-Gal₆から生合成したものを HPLC によって精製して使用していた. そのため, UDP-Gal₇を準備することが研究推進における律速因子となっていた. この状況を打破するために, 反応系に UDP-Gal₇を入れる代わりに UDP-Gal₆と Gif を添加する方法を考案した. 反応条件を最適化したところ, この連続反応系を用いることで UDP-Gal₇を準備することなく Gal₇転移酵素活性の検出が可能となった. この連続反応系を用いて, GfsA および GfsC の Gal₇転移酵素活性を検出したところ, 両酵素共に単独の酵素で Gal₇を最大で5個まで転移する活性を有することが明らかになった. また, $\Delta gfsC$, $\Delta gfsAC$ およびそれらの相補株に焦点を当てて FTGM の解析を ¹H-NMR 解析およびメチル化分析によって実施した. その結果, $\Delta gfsC$ 株では β 1, 5-Gal₇残基が著しく減少し, $\Delta gfsAC$ 株では, β 1, 5-Gal₇残基が全く検出されなくなることが明らかになった. 以上の結果から, *Aspergillus fumigatus* の全ての β 1, 5-Gal₇糖鎖は GfsA と GfsC が協調的に働くことで生合成されることを明らかにすることができた. また, ガラクトマンナン中のコア

マンナン鎖合成を担う α 1, 2-マンノース転移酵素が CmsAであることを明らかにし, Δ cmsA株では各種の抗真菌薬に対する感受性が増加していることを共同研究によって明らかにすることができた. この成果は現在 *Scientific Reports* 誌に投稿中であり, 査読を受けるところである.

発表論文

- 1) Oka T. Biosynthesis of galactomannans found in filamentous fungi belonging to Pezizomycotina. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2018)82, 183-191.
- 2) Katafuchi Y, Li Q, Tanaka Y, Shinozuka S, Kawamitsu Y, Izumi M, Ekino K, Mizuki K, Takegawa K, Shibata N, Goto M, Nomura Y, Ohta K, Oka T. GfsA is a β 1, 5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology.* (2017)27, 568-581.
- 3) Matsunaga E, Higuchi Y, Mori K, Yairo N, Toyota S, Oka T, Tashiro K, Takegawa K. Characterization of a PA14 domain-containing galactofuranose-specific β -D-galactofuranosidase from *Streptomyces* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2017)81, 1314-1319.

研究課題 '17-19

天然化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬の開発研究

五十嵐雅之

(微生物化学研究所第2生物活性研究部)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of antifungal drugs from natural chemical compound library

Masayuki Igarashi

(IMC, Lab. Head, Microbial Chemistry)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

平成29年度より千葉大学真菌研究センターとの共同研究を開始し, 初年度分を報告する. 深在性真菌症の適応薬は, 核酸合成を阻害するピミジン系, エルゴステロールと結合するポリエン系, エルゴステロール合成酵素の阻害剤であるアゾール系, 細胞壁合成阻害剤であるエキノキャンディン系の4系統しかなく, いずれも副作用や耐性菌の出現が問題になっており, 新規の作用機序をもつ抗真菌薬の開発が必要である. そこで, 本研究計画では, 微生物化学研究所が保有する化合物ライブラリーを用いたスクリーニングによって得られた候補化合物の薬剤標的分子を同定し, 新規抗真菌薬の創出をめざしている. 平成29年度は, 本研究で使用する化合物について, 提供機関との打合せメールなどでの打合せを進め, MTAの締結に至った. 解析予定の1,000種類の化合物のうち今年度は644種類について一次スクリーニングならびに二次スクリーニング終了した. 一次スクリーニングでは, カンジダ・グラブラータを用いて生育阻害活性を指標にした. その結果, 140サンプルに生育阻害活性が確認され, 二次スクリーニングへと移行した. 二次スクリーニングでは, 8種類の病原性真菌について, 生育阻害活性を測定し, それぞれの菌種についてMICを決定した. さらに, 培養細胞を用いた呼吸阻害活性を測定した. これらの結果より, 6サンプルが抗真菌薬シーズ候補として選抜することができ, 今年度の研究計画を順調に進めることができた. 次年度は, 得られた抗真菌活性物質の作用分子の同定と未解析化合物からの抗真菌活性物質のスクリーニングを継続する.

研究課題 '17-20

未利用微生物を素材とした新しい抗真菌薬シーズの探索

久保田高明

(昭和薬科大学)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Search for new antifungal drug seeds from unutilized microorganism.

Takaaki Kubota

(Showa Pharmaceutical University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

海綿動物からは多くの生物活性天然物が単離、構造決定されており、それらをもとに新たな医薬品が開発されている。近年、メタゲノム解析により、これら生物活性天然物の真の生産者は海綿動物に共生する難培養性微生物であることが明らかになってきている。一方、微細藻類の一群である渦鞭毛藻は、他の生物種からは得られない特異な化学構造のマクロリドを生産するにも関わらず、医薬品リード化合物探索の素材としてあまり注目されていない。今回、沖縄で採取した数種の実験動物および渦鞭毛藻を対象に、深在性真菌症の原因真菌に対して抗真菌活性を示す新たな生物活性天然物の探索を行った。

その結果、*Amphimedon* 属海綿から2個の新規マンザミン関連アルカロイドを、*Hippospongia* 属海綿から2個の新規メロテルペノイド関連化合物を、*Pseudoceratina* 属海綿から2個の新規プロモチロシナルカロイドを、*Hyrtilis* 属海綿から2個の新規インドールアルカロイドを、*Dysidea* 属海綿から2個の新規ポリヒドロキシルロールを、*Symbiodinium* 属渦鞭毛藻から2個の新規マクロリドを、*Amphidinium* 属渦鞭毛藻から2個の新規マクロリドを、それぞれ単離、構造決定した。

現在、これらの新規化合物および同時に得られた既知化合物の、深在性真菌症原因真菌に対する抗真菌活性の評価に向けて準備を進めている。

研究課題 '17-21

BCG 東京株による感染症の迅速診断と病原性に関する研究

大楠清文

(東京医科大学 微生物学)

石和田稔彦・大楠美佐子・竹内典子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Rapid diagnosis and pathogenicity of the infection caused by BCG Tokyo strain.

Kiyofumi Ohkusu

(Department of microbiology, Tokyo Medical University)

Naruhiko Ishiwada, Misako Ohkusu, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

結核の中蔓延国である日本ではBCG (ワクチン) 接種率が高く、小児の重症結核予防効果は高いが、接種後の副反応としてリンパ節腫脹や皮膚疾患、稀に骨炎や全身感染症が問題となる。症状が重篤な場合には、ヒト型結核菌との鑑別を行った上で、抗結核薬による治療が考慮されるが、現在、検査室で通常実施しているPCR法ではヒト型結核菌とBCGの鑑別は出来ない。私たちは、BCG特異プライマーによるPCRおよび日本で使用されているBCG東京株特有の塩基配列欠損があることが知られているRD16領域のシーケンス解析を行うことで、BCGとヒト型結核菌を迅速に鑑別出来る方法を確立した。実際に、リンパ節炎の生検組織、膿汁、骨髄炎の骨髄などの検体から直接BCG東京株を検出することが可能であった。検査結果は、臨床経過や病理組織像、培養検査結果と一致していた。本解析方法は検体から直接解析することにより、検体採取から数日以内に結果が判明するために、臨床的にも大変有用な検査法と考えられた。

発表論文

- 1) Otsuka T, Hosokai R, Watanabe T, Ishiwada N, Saitoh A. Subcutaneous chest wall abscess as a complication of BCG vaccination. *Pediatr Int.* 2017 Oct 3. doi: 10.1111/ped.13382.

研究課題 '17-22

小児無脾症患者における肺炎球菌血清型特異IgG抗体・オプソニン活性、インフルエンザ菌b型特異抗体価保有状況に関する検討

星野 直・竹下健一

(千葉県こども病院 感染症科)

石和田稔彦・竹内典子

(千葉大学真菌医学研究センター)

The analysis of serotype specific IgG antibody, opsonophagocytic activity of *Streptococcus pneumoniae* and anti polyribosyl ribitol phosphate antibody of *Haemophilus influenzae* among children with asplenia

Tadashi Hoshino, Kenichi Takeshita

(Chiba Children's Hospital)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

無脾症は、肺炎球菌・インフルエンザ菌莢膜株に感染すると重症化しやすいため、海外ではHibワクチン、肺炎球菌ワクチンの接種による予防が推奨されている。国内における無脾症患者のリスクとワクチン接種推奨に関する評価をする目的で小児無脾症患者23名の肺炎球菌血清型特異IgG抗体（血清型1・3・5・6A・7F・19A）と抗PRP抗体（Hib）の測定を行った。その結果、いずれかの血清型に対する肺炎球菌特異抗体価が陽性基準値（0.35 μ g/ml）以下であった症例が10例認められた。また、抗PRP抗体が陽性基準（1 μ g/ml）以下であった症例が13例認められた。この中には、定期接種対象外の年齢層の症例も含まれていた。日本小児感染症学会会員を対象とした免疫不全状態の小児（無脾症含む）に対するHibワクチン、肺炎球菌ワクチン接種の実態調査を行ったところ、施設間に差が認められたことから、これらの基礎疾患を有する小児に対する接種勧奨と具体的な接種スケジュールの提示が必要と考えられた。

発表論文

- 1) Takeshita K, Ishiwada N, Takeuchi N, Takahashi Y, Naito S, Nagasawa K, Hishiki H, Hoshino T, Shimojo N. Pneumococcal IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in Japanese children with a medical history of hematopoietic neoplasms and solid tumors. 71: 13-21, 2018

研究課題 17-23

Cryptococcus neoformans のユニークなゲノム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

(千葉大学大学院理学研究院/大学院融合科学研究科)

久保田俊介

(千葉大学大学院融合科学研究科)

高橋弘喜・亀井克彦・川本 進・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 unique mechanism of genome maintenance in *Cryptococcus neoformans*

Akira Matsuura

(Graduate School of Science, Chiba University)

Shunsuke Kubota

(Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba University)

Hiroki Takahashi, Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto,

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、*C. neoformans* 染色体末端近傍でのゲノム変化に注目し、テロメア末端およびDNA損傷末端で作用する分子の機能とゲノム変化、感染サイクルとの関連を明らかにするとともに、それを標的とした新規治療戦略の開発を目指している。

これまでに、DNA末端を維持・修復する過程に関する *C. neoformans* 特有の現象を主として遺伝学的、分子生物学的手法を用いて解析をしている。前年度までに、我々が同定した染色体末端を伸長する酵素であるテロメラーゼの触媒サブユニット *CnEST2* の欠損細胞が、一倍体で致死性を示すことを見出した。他の多くの生物種で

は、テロメラーゼの欠損は直ちには致死とはならないことから、この違いが*C. neoformans*特異的な治療戦略として利用できる可能性が考えられた。

そこで、既知のヒトテロメラーゼ阻害剤を増殖中の*C. neoformans*に投与したところ、*CnEST2*遺伝子のコピー数と相関して増殖の低下がみられることが明らかになった。さらに、薬剤添加時の遺伝子発現変化をRNA-Seqにより調べたところ、テロメラーゼ阻害剤の添加に対する特異的な遺伝子発現変化が見出され、テロメラーゼを標的とする*C. neoformans*特異的な治療戦略の有効性が確認された(論文準備中)。

現在入手可能なテロメラーゼ阻害剤は、*C. neoformans*のテロメラーゼ活性を阻害する活性が低いことが示唆されている。千葉大学分子キラリティー研究センターの化合物ライブラリーを用いて、より特異的に*C. neoformans*のテロメラーゼを阻害する化合物の候補を探索したところ、類似構造をもついくつかの候補化合物が単離された。今後は、この化合物による阻害機序の解明、およびより活性の高い阻害剤の探索を行う予定である。

研究課題 '17-24

マウス感染時に起こる病原細菌遺伝子発現の網羅的解析

高屋明子

(千葉大学・大学院薬学研究院)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

山本友子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Transcriptome analysis of *Salmonella* Typhimurium during infection of mouse

Akiko Takaya

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Tomoko Yamamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

感染症の理解には、病原微生物と宿主細胞との相互作用により引き起こされる相互の遺伝子発現やタンパク質産生の変化を解明することが重要である。サルモネラのマウス感染時に起こる病原細菌遺伝子発現の網羅的解析を行うため、蛍光タンパク質を恒常的に発現するサルモネラ(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)を用いて宿主内感染細胞での動態を検討し、分取することを試みた。サルモネラを腹腔内に投与し、経時的に腹腔内の免疫担当細胞を解析したところ、感染初期にはLarge Peritoneal Macrophage (LPM)に特異的に感染するものの、感染24時間後にLPMが完全に消失した。腹腔内マクロファージとしてLPMと共に骨髄由来のSmall Peritoneal Macrophage (SPM)が検出されるが、SPMも感染3日後には消失していた。一方、単球の数は増加しており、感染3日後には単球内にサルモネラが局在していた。又、脾臓内のサルモネラも単球に局在していた。SPMは炎症性マクロファージであり、細菌感染においては単球から分化する。これまでサルモネラの感染では、マクロファージ内で増加するといわれてきたが、本研究から、単球内で増加することで炎症性マクロファージへの分化抑制に寄与する可能性が示唆された。

感染早期に誘導されるLPMの消失が、サルモネラ感染による細胞死によるものが検討したが、特異的な細胞死の誘導はみられなかった。LPMはLPS等の刺激を受けるとリンパ節の一つとして考えられるOmentumに移動する。そこで、標識したLPMを含む細胞とサルモネラを同時に投与したところ、投与24時間後に標識したLPMがOmentumで検出された。このことから、腹腔内に投与されたサルモネラはLPMに特異的に貪食された後、LPMの移動に伴ってOmentum内に移行することができると考えられる。

研究課題 '17-25

腸内細菌叢と腸内真菌の相互作用により構築される粘膜免疫システムの解明

佐野晃之

(ニューヨーク大学医学部スカボール研究所)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

Understanding the intestinal immune responses orchestrating by gut microbiota and mycobacteria

Teruyuki Sano

(New York University, School of Medicine Skirball
Institute of Biomolecular Medicine)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本研究では、抗生物質で腸内細菌叢を攪乱したマウスの腸管における真菌の増殖および宿主免疫細胞に対する影響について解析を試みた。野生型マウスに代表的な病原性真菌の一つである *Candida albicans* を経口投与したところ、約1ヵ月後に腸管から完全に排除された。一方、事前にβ-ラクタム系抗生物質の一つであるアンピシリンを処理したマウスに *C. albicans* を経口投与したところ、消化管である胃、小腸、盲腸、大腸のいずれの部位においても多数の *C. albicans* が検出されたことにくわえ、3か月以上経過しても腸管における *C. albicans* の数量は維持されていた。一方、メトロニダゾールやストレプトマイシン処理したマウスでは、野生型マウスと同様に *C. albicans* は腸管から排除された。以上の結果から、特定の抗生物質で腸内細菌叢が攪乱されると *C. albicans* が腸管に定着することが示され、特定の腸内細菌が *C. albicans* の消化管における定着を制御していることが示唆される。

次に *C. albicans* が腸管に定着したマウスにおいて宿主免疫細胞の動態を解析したとこと、腸管膜リンパ節中で観察されるCD4陽性T細胞数が非定着マウスと比較して増加していたことにくわえ、腸管粘膜固有層におけるIgA陽性細胞ならびにRoryt陽性のTh17細胞の割合が増加していることを見出した。一方、樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫系細胞の割合に変化は見られなかった。これまでに、Th17細胞は喘息をはじめとするアレルギー反応の誘導にも寄与していることが報告されており、真菌の定着によって誘導される腸管Th17細胞と宿主のアレルギー応答の関係性については大変興味深く、今後の検討課題と考えられる。

研究課題 '17-26

Candida glabrata におけるミトコンドリア選択的オートファジー活性検出系の開発

名木 稔

(国立感染症研究所)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

Measurement of mitophagic activity in *Candida glabrata*

Minoru Nagi

(National Institute of Infectious Diseases)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究の初年度における報告である。病原真菌 *Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジー(マイトファジー)は病原性と鉄欠乏環境における生存の維持に関与している事が明らかにされたが、病原性における詳細な役割はわかっていない。また、*C. glabrata* ではマイトファジー活性の検出系が未確立であり、その点がマイトファジーの役割を解明することの妨げとなっている。本研究では、マイトファジー活性を効率よく検出することを目的とし、出芽酵母の液胞内プロテアーゼをコードするPEP4の *C. glabrata* におけるホモログであるCAGL0M02211gの破壊株(真菌センター分与株)にミトコンドリア移行シグナルとGFPを付加したジヒドロ葉酸リダクターゼ(mtDHFR-GFP)を高発現させた菌株を作製した。マイトファジーが活性化した場合、ミトコンドリアに局在したmtDHFR-GFPはミトコンドリアと共に液胞へと運ばれて分解を受けるが、CAGL0M02211gの破壊株では液胞内へと運ばれた後分解を受けずに液胞内に蓄積したため、このタンパク質のGFPシグナルを観察することでマイトファジー活性化の有無を確認することができた。以上のように、蛍光顕微鏡観察によって効率よくマイトファジー活性を測定することができる実験系を確立した。今後これらの株を用いて、感染臓器内におけるマイトファジー活性の測定を進めていく。

研究課題 '17-27

マウス細菌性肺炎モデルにおけるシベレス タットとトロンボモジュリンによる炎症反応 制御

渡邊栄三・川口留以

(千葉大学大学院医学研究院・救急集中治療医学)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Regulation of inflammatory response with sivelestat and thrombomodulin in murine bacterial pneumonia model

Eizo Watanabe, Rui Kawaguchi

(Department of Emergency and Critical Care Medicine,
Chiba University)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

マウス肺炎球菌肺炎モデルにおけるリコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) の敗血症病態への効果を明らかにする目的で、マウスに肺炎球菌を気管内に注入し肺炎モデルを作成し検討を行った。肺炎モデルマウスに対し菌液投与3時間後にrTMを腹腔内投与し、菌液投与24時間後に犠牲させたマウスにおいて、rTM投与の有無につき、血清cytokine濃度、HMGB1, syndecan-1, 肺血管内皮, 上皮, 血球系細胞群におけるcytokine発現率を経時的に比較検討した。その結果、肺炎球菌注入群において、rTM投与によって血清TNF, IL-10濃度はいずれも低下傾向となった。HMGB1はrTM投与で有意に低下, syndecan-1もrTM投与で低下傾向を認めた。一方、肺血管内皮細胞において菌液注入後12時間でIL-10発現率は低下し、rTM投与によって上昇した ($p < 0.05$)。また菌液注入24時間後では、肺血管内皮および血球系細胞群両方で、rTM投与によってTNF発現率は低下, IL-10発現率は血管内皮細胞のみで上昇傾向を示した。以上のことからマウス肺炎球菌肺炎モデルに対するrTMの抗炎症作用が認められた。またrTM投与によって、glycocalyx layer障害が軽減される可能性も示唆された。

研究課題 '17-28

Aspergillus fumigatus 関連種の日本国内にお ける分布の実態解明

廣瀬 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)

Investigation of distribution on the related species of *Aspergillus fumigatus* in Japan

Dai Hirose

(School of Pharmacy, Nihon University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本年度は伊豆諸島神津島の自然環境中における*Aspergillus*属相を明らかにした。2017年10月に神津島の7地点において5-10 m間隔で12箇所、計84箇所において土壌試料を採取した。各土壌試料について滅菌したコロンを用いたベイト法により*Aspergillus*属の分離培養を行った。各分離菌株について形態観察およびカルモジュリン遺伝子の部分塩基配列に基づき種同定を行い、各地点における各菌種の出現頻度を算出した。それらの結果、3節9種 (sect. Fumigati: *A. fumigatus*, *A. felis*; sec. Flavi: *A. nomius*; sect. Nigri: *A. neoniger*, *A. brasiliensis*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. welwitschiae*, *A. brunneoviolaceus*) の分布が確認された。*Aspergillus fumigatus* 関連種の*A. felis*は、森林環境に比べ荒原環境における出現頻度が著しく高かった。本種11菌株について、イトラコナゾールに対する薬剤感受性をEtestにより評価した結果、36%にあたる4株でMICが12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示すことが明らかとなった。*Aspergillus felis*を除く8種に関しては森林環境における出現頻度が高く、sect. Nigriの種については加えて低標高の地域で出現頻度が高い傾向がみられた。sect. Nigriの各種に関してもイトラコナゾールに対する薬剤感受性を評価した結果、*A. neoniger*と*A. tubingensis*においてそれぞれ54%と53%の株でMICが4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示すことが明らかとなった。

研究課題 '17-29

保育園児から分離される肺炎球菌無莢膜株の病原性解析

和田紀之

(和田小児科医院)

黒澤サト子

(くろさわ子ども&内科クリニック)

石和田稔彦・竹内典子・大楠美佐子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Pathogenesis of non-encapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from nursery school

Noriyuki Wada

(Wada Pediatric Clinic)

Satoko Kurosawa

(Kurosawa Children's and Internal Medicine Clinic)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi, Misako Ohkusu
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

肺炎球菌結合型ワクチン導入後、東京都内の保育園5か所に通園している児から分離されるようになった肺炎球菌無莢膜株に関する検討を行った。保育園児からの肺炎球菌無莢膜株の分離率(保菌率)は12%であった。MLST解析を行ったところ複数のSequence typeに分類されたが、同じ保育園で同じ時期に分離されるST型は一致しており、無莢膜株の水平伝播が疑われた。無莢膜株は、 β -ラクタム系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬の耐性に関与する遺伝子を保有しており、莢膜株と比較しバイオフィーム産生能が高い株が有意に多かった。今回の検討から肺炎球菌無莢膜株は、今後呼吸器感染症の起炎菌になる可能性があり、また、難治化に関与する可能性が示唆された。継続して保育園児から分離される無莢膜株の病原性解析を進めると同時に、治療、予防対策に関しても検討していく必要があると思われた。