

エンスプロジェクトも進行中であり、*Candida albicans* についてはほとんどのゲノム情報がインターネット上で公開されている。一方、真菌症の診断と治療はともにきわめて困難であるが、迅速な遺伝子診断の開発と新規抗真菌薬の探索も続けられている。深在性真菌症は多くの場合、感染防御能の低下した患者に発症する日和見感染である。従ってその治療には静菌的な薬剤では抗菌効果が十分ではなく、殺菌的に作用する抗真菌剤が望ましい。しかし抗細菌剤に比べて抗真菌治療薬の種類は少なく、また殺菌性の抗真菌剤で副作用のないものは全くないのが現状である。そのなかで静菌的作用を有するアゾール系抗真菌剤、特にフルコナゾールは、殺菌性抗真菌剤のアンホテリシン B に比べて副作用が少ないために、深在性真菌症の治療および予防に広く使用されてきた。これが昨今のアゾール剤耐性菌の出現を促し、臨床的使用に注意が喚起されるようになると、耐性機構の解明に多大の関心が注がれ、耐性にかかわる多くの現象が明らかにされてきた。

1989年に登場したフルコナゾールが、欧米を中心にカンジダ感染のハイリスク患者に長期的に投与されるようになると、間もなくアゾール剤耐性のカンジダが頻繁に分離されはじめるようになった。それと共に真菌のアゾール耐性機構に関する研究が、*C. albicans* を中心に活発になされ、耐性に関する真菌の細胞生物学的な興味深い知見が飛躍的に蓄積されてきた。アゾール剤耐性機構には、アゾール剤の標的分子 (P450<sub>14DM</sub>) の量的ならびに質的变化、薬剤の細胞内濃度の低下などが知られている。高度耐性臨床分離株の中には、それら複数の機構を獲得しているものも少なくないが、主要な機構は真菌細胞膜に存在する複数の輸送体タンパクが薬剤を細胞外へ排出するというものである。薬剤排出という現象は、抗癌剤耐性にかかわる

ヒト癌細胞の P-糖タンパク質や、細菌にテトラサイクリン耐性を付与する排出ポンプに見られるように、多種多様の生物に見い出される。真菌も例外ではなく、*C. albicans* をはじめとして他の *Candida* 属菌や *Aspergillus* 属菌、*Cryptococcus neoformans* から排出ポンプ遺伝子がクローン化されている (表 1)。これには ATP のエネルギーを必要とする薬剤排出系 (ABC 輸送体) とプロトンの駆動力に依存する系 (MFS 輸送体) とがあり、ことに前者の輸送体の発現が亢進するとアゾール剤のみならず構造的に関連のない種々の薬剤に対しても耐性となる。またフルコナゾールが登場して以来、臨床材料から分離されるカンジダ菌種が少しずつ変化し、最近では *C. albicans* に代わってともともフルコナゾールに低感受性の *C. glabrata* などによる感染が増加している。フルコナゾールは *C. glabrata* の排出ポンプ (*CgCDR1*) の発現を誘導することも確かめられたので、アゾール剤の使用に伴いこれら自然耐性の菌による感染が増え、臨床から分離される頻度が増してきたのであろう。

## B. 研究方法

真菌のアゾール系抗真菌剤に対する耐性が、主として真菌細胞膜に局在する薬剤排出ポンプ (輸送体) の過剰発現に起因することは既に述べたが、これらの輸送体についての詳しいことは殆ど調べられていなかった。我々はパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた遺伝子発現系を開発し、個々の輸送体を高発現させて、その機能をよりよく理解することを試みた。親株として用いた *S. cerevisiae* AD1-8U 株は共同研究者の Dr. Andre Goffeau (ベルギー、ルヴァンカトリック大学) のグループによって作製されたものであり、Pdr5p, Pdr10p, Pdr11p, Pdr15p,

Snq2p, Yor1p, Ycf1p の 7 種の主要な ABC 輸送体が破壊されたアゾール剤高度感受性株である。またこの株は ABC 輸送体の転写因子 *PDR1-3* 変異を有し、転写活性が常時亢進した状態になっている (The gain-of-function *PDR1-3* mutation)。一方、耐性遺伝子を宿主菌体に導入するためのプラスミドベクター-pABC3 は、ニュージーランド、オタゴ大学との共同研究によって作製したもので、*PDR5* promoter、*PacI*-*NotI* multiple cloning site、*PGK* terminator を備えている。また *URA3* マーカーおよび *PDR5* の C-末端配列を残しているため、*PDR5* promoter の下流に調べたい耐性遺伝子を挿入後、プラスミドを *AscI* で切断して線状の形質転換カセットを取り出し、これを相同組み換えによって AD1-8U<sup>-</sup>株の染色体中 (*PDR5* 残存部分) に容易に導入することができる (図 1)。我々はこれまでに *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* の ABC および MFS 輸送体や、抗癌剤耐性に寄与するヒトの P-glycoprotein をこの発現系を用いて高発現させることに成功した。図 2 に、*C. albicans* の *CDR1* および *CDR2*、*C. glabrata* の *CDR1* および *PDHI* をそれぞれ組込んだ *S. cerevisiae* AD1-8U<sup>-</sup>株から細胞膜画分を分離し、SDS-PAGE で泳動後、クマシーブルー染色した膜タンパクプロファイルを示した。いずれのポンプ発現株も親株には存在しない新たなタンパクを 170 kDa 付近に発現している。この図からも明らかのように、容易にクマシーブルー染色で検出できるほど過剰な異種タンパクを発現できる酵母細胞の系はこれまでに例がない。発現したタンパクは特異抗体または MALDI-TOF 質量分析により同定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、健常者や患者を直接対象とする診断・治療の研究は行わないため、倫理面における問題が生じることはない。また研究の過程で必要な動物実験は国立感染症研究所における動物実験倫理委員会の規定に従って実施した。

## C. 研究結果

### 1. 薬剤排出ポンプの機能解析

これらのポンプ発現株を用いると、最小発育阻止濃度 (MIC 値)、基質特異性、ローダミン 6G の排出活性、ポンプ NTPase 活性などが容易に測定出来る。*C. albicans* の耐性遺伝子 *CDR1*、*CDR2* (いずれも ABC 輸送体)、*BEN<sup>R</sup>* (MFS 輸送体)、*ERG11* (アゾール剤の標的酵素) を AD1-8U<sup>-</sup>株に発現させ、それぞれの遺伝子発現株のフルコナゾールに対する MIC 値を比較すると、表 2 に示すように *CDR1*、*CDR2*、*BEN<sup>R</sup>*、*ERG11* 発現株の順に高いフルコナゾール耐性を示した。この結果は臨床分離耐性株の耐性の度合いと、各々が過剰に発現している遺伝子との関係に極めてよく一致する。また *CDR1* および *CDR2* 発現株は、フルコナゾールのみならずケトコナゾールやイトラコナゾールなど他のアゾール剤に対して交差耐性を示すとともに、構造的に関連のないシクロヘキシミド、ローダミン、セルレニンなどに対しても耐性を示すことが一目瞭然であった。一方、*BEN<sup>R</sup>* 発現株はアゾール剤ではフルコナゾールのみ耐性を示し、*BEN<sup>R</sup>* のアゾール剤に対する基質特異性が狭いという、これまでの知見を裏付ける結果が得られた。ABC 輸送体が ATP の加水分解によるエネルギーによって駆動するという事実は、ローダミン 6G の排出活性を測定することによって確認できた。即ち、グルコースの存在下では *C. albicans* の *CDR1*

あるいは *C. glabrata* の *CDR1* 発現株は細胞内に取り込んだローダミン 6G を活発に排出するが、エネルギー源のない状態では親株と同様に排出活性がまったく認められなかった。最近、我々は *C. neoformans* の ABC 輸送体 *CneMDR1* を高発現する株を作製したが、この株も *C. albicans* や *C. glabrata* の ABC 輸送体と同様に高いローダミン 6G 排出活性を示した。各ポンプ発現株の細胞膜画分を分離、精製しポンプの NTP の活性をしらべると、ATP のみならず CTP、GTP、UTP のいずれも基質として加水分解することが分かり、ABC 輸送体は NTPase 活性を有するという特徴が改めて確認できた。

## 2. ポンプ蛋白質のリン酸化

排出ポンプの機能がどのように制御されているかを知るの是非常に興味深い、この分野への取り組みはまだ端緒についたばかりである。その中で我々は、ポンプのリン酸化に関する新しい知見を得た。*C. glabrata* の *Cdr1p* および *Pdh1p* 高発現株を用いて各々のポンプのリン酸化をしらべたところ、ポンプによってその様式が異なることが明らかになった。いずれの発現株においてもポンプは菌体内でリン酸化されるが、*Pdh1p* については、リン酸化の一部がプロテインキナーゼ A のリン酸化基質モチーフを認識する抗体で検出でき、*Pdh1p* のリン酸化はグルコースに依存して起きることが示された。また、プロテインキナーゼ A の阻害剤で処理するとリン酸化も減少した。一方、*Cdr1p* については、この抗体によるリン酸化の検出はできなかった。また *Pdh1p* のポンプ NTPase 活性はリン酸化による影響を受けなかったが、*Cdr1p* ではグルコース添加によって NTPase 活性が上昇した。現時点では *Pdh1p* の薬剤排出活性に

はプロテインキナーゼ A によるリン酸化が必要であると考えられる。これに対して *Cdr1p* では担当するキナーゼは明らかではないが、グルコース依存的にリン酸化が起き、そのリン酸化が NTPase 活性を制御しているものと考えられる。このようにポンプのリン酸化と薬剤排出活性との関連については未解明の部分が多く、現在当研究室でさらに解析を進めている。

## 3. 真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

真菌はヒト細胞と同じ真核細胞であるために両者の区別が少なく、真菌のみを選択的に阻害する薬剤をみいだすのは本質的に難しい。細胞壁合成を標的としたキャンディン系薬剤は、その意味で希少なクラスの抗真菌剤である。しかし新しい抗真菌剤の開発は常に必要であり、また耐性を克服することによって安全性に優れているアゾール剤の臨床的な有効寿命を延ばすことにもなる。そして次世代のより有効で安全な抗真菌剤が登場するまで臨床の場における有力な治療剤として選択することもできる。耐性克服の一つの手段として薬剤排出ポンプ阻害物質をさがし、アゾール剤と併用する可能性がある。ポンプ阻害剤との併用により、アゾール剤はポンプに汲みだされることなく真菌細胞内で有効濃度が保たれ、耐性菌の増殖をも阻止することが期待される。我々はこのような阻害剤のスクリーニングを目的として、この遺伝子発現系を用いて真菌の薬剤排出ポンプを標的分子とする阻害剤の探索を試みた。フルコナゾールとの併用によってアゾール剤耐性 *C. albicans* の感受性を低下させる例として、これまでに免疫抑制剤の FK506 が知られている。我々も図 3 に示したように *in vitro* で FK506 がフルコナゾールとの併用効果をもたらすことを確認するとともに、ローダミン 6G の菌体外排出および

ポンプ NTPase 活性を阻害することを認めた。全身性カンジダ感染症は本来感染防御免疫の低下した宿主に発症するいわゆる日和見感染症であるため、免疫抑制作用を有する薬剤は不向きである。従って免疫抑制作用を示さない誘導体の探索も必要である。さらに16員環マクロライド構造を有するミルベマイシンは駆虫薬として用いられている他に、薬剤排出ポンプ阻害剤としての可能性を持つことが示唆されている。ミルベマイシンが免疫抑制作用を有するという報告は今までにないので、我々は数種のミルベマイシンをフルコナゾールと組み合わせ、それらの併用効果をしらべた。その結果ミルベマイシン単独では菌の増殖を阻止しなかったが、フルコナゾールとミルベマイシンを同時に使用することによって CDR1 および CDR2 発現株は感受性化し、低濃度のフルコナゾールによって耐性株の発育が強く阻止された。しかし、BEN<sup>R</sup> 発現株には無効であった。さらにミルベマイシンは、薬剤排出ポンプ Cdr1p および Cdr2p の ATPase 活性を阻害したが、細胞膜 [H<sup>+</sup>]ATPase (Pma1p) の活性は阻害しなかった。以上の結果から、ある種のミルベマイシンは特異的に ABC 輸送体を阻害してアゾール剤の効果を高める物質として有望であることが明らかになった。このようなポンプ ATPase 活性の阻害効果を直接に観察した例は他に見当たらない。以上述べたように、我々の開発した *S. cerevisiae* の発現系 (7 種の内在性ポンプを破壊し、アゾール剤に高度感受性の AD1-8U<sup>-</sup>株) は、個々の外来性排出ポンプ遺伝子を導入・発現させたアゾール剤耐性株を作製し、それらを用いて排出ポンプ阻害剤スクリーニングの評価およびポンプ機能の解析を行うために、非常に優れているということがここでも証明された。

#### D. 考察

フルコナゾールの登場以来、カンジダのアゾール剤に対する耐性化が临床上問題になってきたが、主に ABC または MFS 輸送体による薬剤排出が耐性化の重要な機構であることが明らかにされてきた。我々は種々の耐性遺伝子を、内在する主要なポンプを除いたパン酵母に発現させ、それぞれが有する薬剤耐性の特性を付与することができた。この発現系は病原真菌の各ポンプの排出機構の比較研究や、ポンプ阻害剤の探索に有用であり、病原真菌の種々の排出システムの機能を広範囲に研究でき、ひいては耐性菌の克服のみならず新規化学療法剤の開発が期待される。さらにこの発現系は大量の膜タンパクの発現が可能のため、真菌のみならず抗癌剤排出ポンプを始めとする様々な膜トランスポーターや膜レセプターの研究、さらには膜タンパクの結晶構造解析など多方面に応用するための扉が開かれたといえよう。

#### E. 結論

アゾール系抗真菌剤に対する耐性獲得には真菌細胞膜に局在する二種の排出ポンプ、ABC (ATP binding cassette) または MFS (Major facilitator superfamily) 輸送体の寄与が大きい。これらの輸送体の機能をよりよく理解し、ポンプ阻害剤の探索を行うためにパン酵母を用いた発現系を開発した。7 種の主要な ABC 輸送体が破壊されアゾール剤高度感受性の親株 *S. cerevisiae* AD1-8U<sup>-</sup>株に調べたい耐性遺伝子を導入した。この発現系を用いることにより *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* の ABC 輸送体のみならず、抗癌剤耐性に寄与するヒトの P-glycoprotein の発現も可能であった。膜画分に発現する排出ポンプは特異抗体または MALDI-TOF 質量分析により同定した。これらのポンプ発現株を用いることによって MIC

値、基質特異性、ローダミン 6G の排出、ポンプ NTPase 活性などの比較が容易となり、*C. albicans* においては Cdr1p (ABC 輸送体)、Ben<sup>R</sup>p (MFS 輸送体)、Erg11p の順に強い耐性を示した。さらに *C. glabrata* の Cdr1p, Pdh1p がグルコース依存的にリン酸化することを認めた。以上のことからパン酵母発現系は耐性遺伝子の性状比較、ポンプ阻害剤の探索、さらには膜蛋白質の解析等に寄与することが大であることが明かとなった。

この研究は国立感染症研究所・生物活性物質部の和田俊一、梅山 隆、田邊公一、金子亜希、高野幸枝、永井有紀の各氏、ニュージーランド・オタゴ大学の Erwin Lamping, Kyoko Niimi, Ann R. Holmes, Brian C. Monk および Richard D. Cannon の各博士、ベルギー・ルヴァンカトリック大学の Dr. Andre Goffeau、日本歯科大学・新潟歯学部の仲村健二郎、青木茂治両先生との共同研究によって行われた。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表  
論文発表

1. Niimi K, Harding DRK, Parshot R, Decottignies A, Niimi M, Lin S, Cannon RD, Goffeau A, Monk BC: Chemosensitization of Fluconazole Resistance in *S. cerevisiae* and Pathogenic Fungi by a D-Octapeptide Derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1256-1271, 2004.
2. 新見昌一 クリプトコックス症 動物由来感染症—その診断と対策 真興交易 pp233-236, 2003.

3. 新見昌一、新見京子 抗真菌薬耐性の問題 臨床医、中外医学社 29, 214-218, 2003.
4. 新見昌一 薬剤耐性遺伝子のパン酵母における発現と機能解析 日本医真菌学会雑誌 45, 63-69, 2004.

学会発表

1. Umeyama T, Kaneko A, Nagai Y, Niimi M, Uehara Y: CaHsl1p protein kinase regulates cell elongation and virulence in *Candida albicans*. *ASM Conferences, 7th Candida and Candidiasis*, March 18-22, 2004, Austin, Texas.
2. Kaneko A, Umeyama T, Uehara Y, Niimi M: A tandem affinity purification of the septin protein complex in *Candida albicans*. *ASM Conferences, 7th Candida and Candidiasis*, March 18-22, 2004, Austin, Texas.
3. Cannon RD, Tsao S, Ong S, Niimi K, Lamping E, Niimi M, Monk BC, Holmes A: Allelic variation affecting drug pump function in *Candida albicans*. *ASM Conferences, 7th Candida and Candidiasis*, March 18-22, 2004, Austin, Texas.
4. Niimi M, Wada S, Kaneko A, Tanabe K, Takano Y, Umeyama T, Uehara Y, Lamping E, Niimi K, Holmes A, Monk BC, Cannon RD: An efficient system for functional hyper-expression of multidrug efflux pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontier studies and International Networking of Genetic Resources in Pathogenic Microorganisms*. November 21-22, 2003, Tokyo.

5. Niimi M, Wada S, Niimi K, Lamping E, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, Uehara Y: Functional hyper-expression of drug efflux pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 平成15年8月25—28日 淡路島
6. Niimi M, Wada S, Niimi K, Shimokawa O, Takano Y, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, Uehara Y: Molecular features of the innate fluconazole resistance of *Candida glabrata*. 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 25-29 May, 2003, San Antonio, Texas.
7. Cannon RD, Lamping E, Wada S, Holmes AR, Niimi K, Niimi M, Monk BC, Uehara Y: Functional analysis of fungal drug efflux pumps. 15th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 25-29 May, 2003, San Antonio, Texas.
8. 金子亜希、梅山隆、新見昌一、上原至雅 *Candida albicans* におけるダブルタグ法を用いた蛋白質複合体精製法の確立 第26回日本分子生物学会 平成15年12月10—13日 神戸
9. 梅山 隆、鳥海佳美、杉田 隆、西川朱實、新見昌一、上原至雅 病原性真菌 *Candida albicans* における CDC28 の発現抑制による形態変化への影響 第26回日本分子生物学会 平成15年12月10—13日 神戸
10. 新見昌一 薬剤耐性遺伝子のパン酵母における発現と機能解析 第47回日本医真菌学会総会シンポジウム 平成15年10月16~17日 東京
11. 梅山 隆、新見昌一、上原至雅 プロテインキナーゼによる *Candida albicans* の形態制御および病原性への関与 第47回日本医真菌学会総会 平成15年10月16~17日 東京
12. 仲村健二郎, Erwin Lamping, 金子亜希, 久和彰江, 新見昌一, 青木茂治 *Cryptococcus neoformans* ABC 輸送体 CneMdr1p の *Saccharomyces cerevisiae* での発現と薬剤耐性 第47回日本医真菌学会総会 平成15年10月16~17日 東京
13. 下川 修、新見昌一 *Candida albicans* ステロール14位脱メチル化欠損株に見られる酢酸塩による増殖停止現象の機序：活性酸素の関与の検討 第47回日本医真菌学会総会 平成15年10月16~17日 東京
14. 梅山 隆、金子亜希、永井有紀、新見昌一、上原至雅 病原性酵母 *Candida albicans* における形態形成に関与するプロテインキナーゼの解 第36回酵母遺伝学フォーラム 平成15年7月24~26日 かずさ
15. 新見昌一、和田俊一、高野幸枝、上原至雅 *Candida glabrata* のアゾール系抗真菌薬耐性機構 第36回酵母遺伝学フォーラム 平成15年7月24~26日 かずさ
16. 梅山 隆、新見昌一 *Candida albicans* における形態形成に関与するプロテインキナーゼの解析 第76回日本細菌学会総会 平成15年4月1~3日 熊本
17. 花岡 希、梅山 隆、新見昌一 *Candida albicans* における蛋白質脱リン酸化酵素の機能解析 第76回日本細菌学会総会 平成15年4月1~3日 熊本
18. 鳥海佳美、梅山 隆、杉田 隆、西川朱實、新見昌一 *Candida albicans* におけるサイクリン依存性プロテインキナーゼ

**Table 1. Drug efflux pumps in pathogenic fungi**

<b>Fungus</b>	<b>Efflux pump gene</b>	<b>Type of transporter</b>
<i>C. albicans</i>	<i>CDR1</i>	ABC
	<i>CDR2</i>	ABC
	<i>BEN<sup>R</sup></i>	MFS
	<i>FLU1</i>	MFS
<i>C. glabrata</i>	<i>CDR1</i>	ABC
	<i>PDH1</i>	ABC
<i>C. dubliniensis</i>	<i>CDR1</i>	ABC
	<i>CDR2</i>	ABC
	<i>MDR1</i>	MFS
<i>C. krusei</i>	<i>ABC1</i>	ABC
	<i>ABC2</i>	ABC
<i>C. neoformans</i>	<i>CneMDR1</i>	ABC
	<i>CnAFR1</i>	ABC
<i>A. fumigatus</i>	<i>AfuMDR1</i>	ABC
	<i>AfuMDR2</i>	ABC
	<i>AfuMDR3</i>	MFS
	<i>AfuMDR4</i>	ABC
<i>A. flavus</i>	<i>AflMDR1</i>	ABC
<i>A. nidulans</i>	<i>atrA</i>	ABC
	<i>atrB</i>	ABC
	<i>atrC</i>	ABC
	<i>atrD</i>	ABC

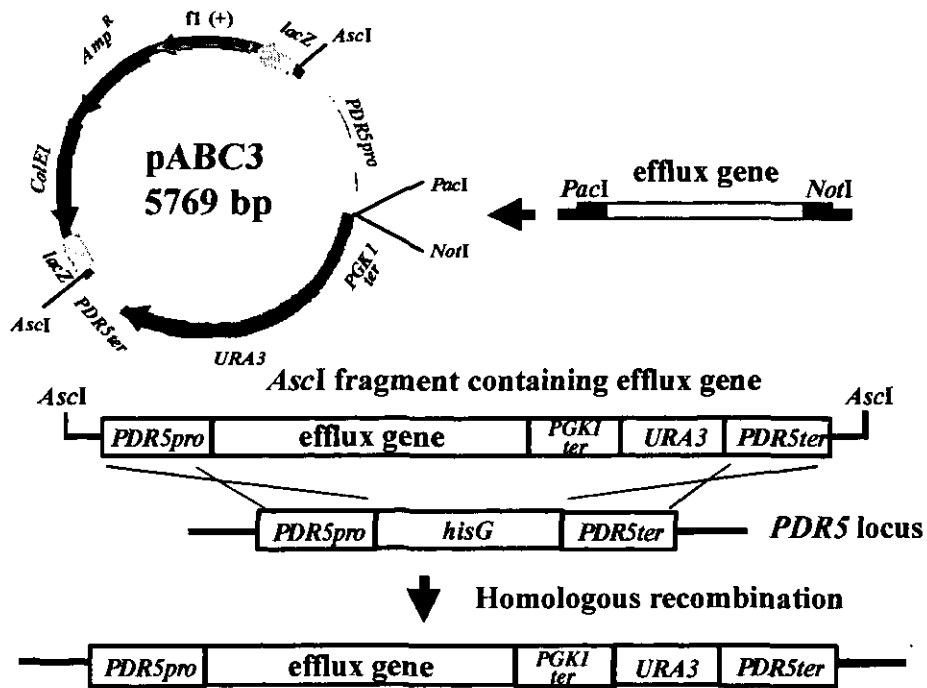


Fig.1. Plasmid construction and integration of a multidrug efflux gene at the PDR5 locus of *S. cerevisiae* AD1-8U<sup>-</sup>.

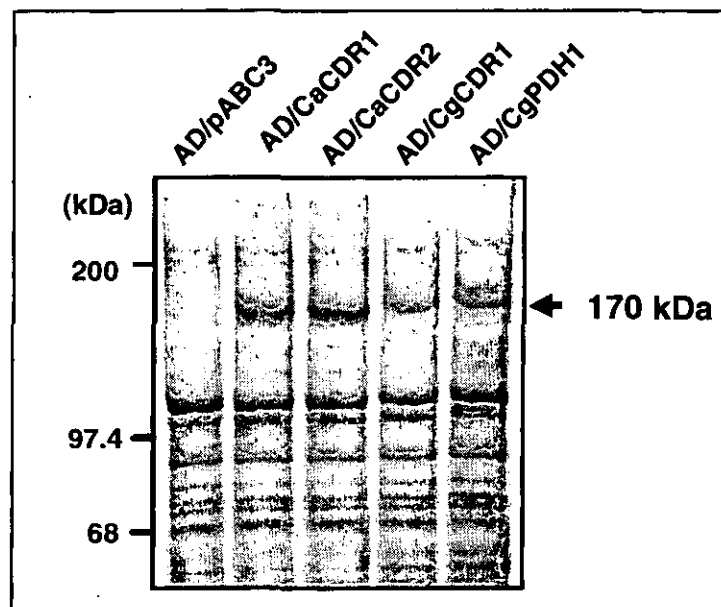
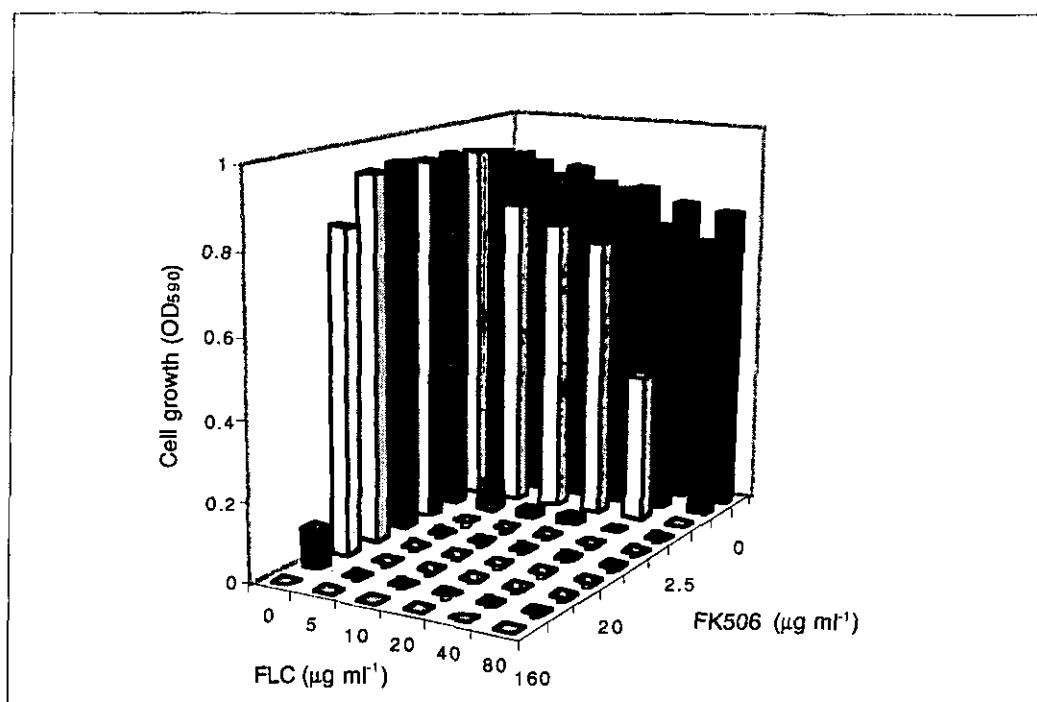


Fig. 2. Functional hyper-expression of efflux pumps in the host *S. cerevisiae* strain AD1-8U<sup>-</sup>. SDS-PAGE gel analysis showed that *C. albicans* Cdr1p and Cdr2p, and *C. glabrata* Cdr1p and Pdh1p were equally hyper-expressed at the size of 170 kDa in the plasma membrane of the host cells. Proteins were stained with Coomassie blue and identities confirmed with specific antibodies or by mass spectrometry. The gel also showed the plasma membrane preparation from a control strain transformed with an empty cassette from pABC3.



**Table 2. Antifungal susceptibilities of *S. cerevisiae* cells expressing *C. albicans* drug resistance genes**

Gene	Function	Fluconazole MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>CDR1</i>	ABC pump	400
<i>CDR2</i>	ABC pump	80
<i>BEN<sup>R</sup></i>	MFS pump	60
<i>ERG11</i>	Ergosterol synthesis	2
None (AD1-8u)	-	0.6



**Fig. 3. Chemosensitization of the *S. cerevisiae* Pdr5p over-expressing yeast strain to fluconazole by an Immunosuppressant FK506.**