

誌)

2. 学会発表

国際会議

1. Kazuo Suzuki, Eri Muso, Shigeto Kobayashi, Toshiko Ito-Ihara, David Scott, Richard Watts, Oliver Flossmann, Suzanne Lane, and David Jayne. Japan-UK Vasculitis Epidemiology Study - First meeting, Emmanuel College, Cambridge, UK
 2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M., Maeda, N., and Koyama, H: In vivo role of myeloperoxidase for the host defense. The 4th international Peroxidase Meeting, October, 2004 (Japan).
 3. Suzuki K, Muso E, Nauseef WM: Contribution of peroxidases in host-defense, diseases and cellular functions. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30 (Kyoto)
 4. Muso E, Ito-Ihara T, Ono T, Imai E, Yamagata K, Akamatsu A, Suzuki K: Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy in MPO-ANCA related polyangiitis with rapidly progressive glomerulonephritis in Japan 2004. The 4th International Peroxidase Meeting, Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004.10.27-30, Kyoto
 5. Akiyoshi Hoshino, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Masato Yasuhara, Taeko Dohi, Kenji Yamamoto, and Kazuo SUZUKI Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots - MPO expressed on surface of activated neutrophils with Quantum dot-conjugated antibody. 4th International Peroxidase Meeting. Oct 27-30, 2004, Kyoto
- ### 国内会議
1. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 血管炎における活性化好中球の CD69 分子 第 34 回京都腎臓免疫研究会、京都、5月22日
 2. 宇野賀津子、猪原登志子、田原佐知子、田中麻理、米本智美、塚本達雄、深津敦司、鈴木和男、岸田綱太郎、武曾恵理 腎炎患者における末梢血リンパ球分画の IL12/IL18 への反応性の検討 第 34 回京都腎臓免疫研究会、京都、5月22日
 3. 猪原登志子、小野孝彦、深津敦司、北徹、鈴木和男、武曾恵理. ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療 15 例における治療効果と 6 ヶ月予後の検討。第 47 回日本腎臓病学会学術総会。平成 16 年 5 月 27 日。栃木
 4. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、村田久雄、高橋 啓 カンジダ誘導マウス動脈炎モデルにおける動脈炎成立過程の組織学的検討 第 93 回日本病理学会総会、2004/6/9-11、札幌
 5. 鈴木和男 活性化好中球による血管炎発症への関与 MPO-ANCA による糸球体内皮細胞傷害 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17-18 日 (沖縄)
 6. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 MPO-ANCA の糸球体内皮細胞への作用 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17-18 日 (沖縄)
 7. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼと真菌感染 生体防御機能異常ワークショップ 2004、2004 年 6 月 17-18 日、(沖縄)
 8. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、高野幸枝、鈴木和男、小山秀機 ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能 第 26 回日本フリーラジカル学会学術集会、2004 年 6 月 24-25 日 (山形)
 9. 大原関利章、高橋 啓、三浦典子、大川原明子、村山 研、土田和徳、金城義明、金子健二、大野尚仁、鈴木和男 川崎病類似マウス系統的動脈炎モデルにおけるヒト免疫グロブリンの治療効果の検討 第 40 回日本小児循環器学会総会、抄録、2004/6/30~7/2、東京
 10. 村山研、長尾朋和、鞍馬秀輝、長谷川明洋、船津高志、南谷晴之、新井孝夫、中山俊憲、鈴木和男 第 15 回日本生体防御学会 (長崎)「血管炎における活性化好中球の CD69 分子」
 11. 長尾朋和、松村実美子、馬淵綾子、越尾修、南谷晴之、鈴木和男 「MPO-ANCA による糸球体内皮細胞の粘着分子 Up-regulation」 第 15 回日本生体防御学会 (長崎) 鈴木和男 第 11 回代替血液学会 (札幌)「免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化」

12. 大川原明子、三浦典子、大原関利章、高橋啓、岡村春樹、大野尚仁、鈴木和男「血管炎を誘導する CAWS 投与初期のマウス好中球活性化とサイトカインの変動」第69回日本インターフェロン・サイトカイン学会(三沢)
13. 小野孝彦、猪原登志子、劉寧、北徹、雑賀寛、根本久一、武曾恵理、大川原明子、鈴木和男 第16回腎とフリーラジカル研究会(京都)「好中球活性化、活性酸素産生とフィブリン沈着を介した SCG/Kj マウスにおける半月体形成機序」
14. Youhei Koshimizu, Satoshi Yamagoe, Kazuo Suzuki, and Michiko Ohtomi. "Expression and localization of LECT2 in mouse brain 第27回日本神経科学会・第47回日本神経化学会合同大会(大阪)
15. Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki. MPO Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 第13回バイオイメージング学会学術集会 11/4-6、京都)
16. H. Sankawa, Y. Kameoka, N. Miura, N. Ohno, and K. Suzuki. Gene Expression in Splenocyte Response to CAWS Injection of Two Murine Strains. The 4th International Peroxidase Meeting Joint with the 10th Myeloperoxidase Meeting 2004. 11. 15 京都
17. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイによる血管炎惹起物質 *C. albicans* 由来菌体外多糖 第34回日本免疫学会総会・学術集会 2004. 12. 01 札幌
18. 三川 浩輝, 亀岡 洋祐, 三浦 典子, 大野 尚仁, 鈴木 和男 cDNA マイクロアレイ解析による血管炎に關与する炎症性分子の遺伝子発現 第27回日本分子生物学会年会 2004. 12. 08 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担報告書

真菌の病原性および薬剤耐性機構の解明

分担研究者 新見昌一 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長
主任研究者 上原至雅 国立感染症研究所 生物活性物質部 部長

研究要旨 ATP binding cassette (ABC) タンパク質は様々な脂溶性の生体異物を細胞外に排出する。病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質はアゾール系抗真菌薬を排出し耐性化する。我々は *C. glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p と Pdh1p を出芽酵母に大量発現させて、タンパク質のリン酸化状態と薬剤排出能の相関を調べた。その結果、両者はそれぞれ異なる PKA の触媒サブユニットによってリン酸化され、リン酸化量がストレスや栄養条件によって変動することを明らかにした。Cdr1p の予測されるリン酸化部位を変異させたタンパク質を用いて解析を行い、307 番目のセリンと、484 番目のセリンをアラニンに置換させると、リン酸化量と ATP 加水分解活性が低下し、薬剤耐性能も低下した。これらのリン酸化部位は近傍にある NBD (nucleotide binding domain) の活性を調節し、タンパク質全体の薬剤輸送活性を調節するものと考えられる。

A. 研究目的

種々の ABC トランスポーター(ATP Binding Cassette transporter)は、細菌からヒトに至る生物に存在し、その多様な機能についての分子メカニズムが次第に明らかにされつつある。トランスポーターのあるものは薬剤を細胞外へ汲み出す排出ポンプの役割を果たし、それにより細胞は薬剤耐性を獲得する。このためトランスポーターの研究は細胞生物学的に興味深いだけでなく、医学的見地からもきわめて重要である。トランスポーターの働きが遺伝的にどのように制御されているのか、構造的に多様な化合物をどのように基質として認識するのか、ATP の結合と加水分解が薬剤の排出にどうかかわっているのか、さらにはこれらのポンプ蛋

白の本来の生理的機能は何かという諸点に関心が集まっている。細菌や動物細胞におけるトランスポーター解析の進展に伴って、病原真菌の ABC トランスポーターについても様々な解析がなされている。本研究においては、*C. glabrata* の ABC トランスポーターの Cdr1p と Pdh1p を出芽酵母において大量発現させて、タンパク質のリン酸化状態と薬剤排出機能の相関を調べた。

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、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、*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ので、*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。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。*C. albicans* の *CDR1* および *CDR2*、*C. glabrata* の *CDR1* および *PDH1* をそれぞれ組込んだ *S. cerevisiae* AD1-8U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。クマシーブルー染色で容易に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。今回は以上の方法を用いて、*C.*

glabrata の *Cdr1p* および *Pdh1p* に焦点を当ててポンプ機能の解析を行った。

(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. ABCタンパク質のリン酸化と機能の相関

ABCタンパク質のリン酸化に関しては、これまでいくつかのタンパク質において報告がなされている。コレステロールやリン脂質のトランスポーターであると考えられている ABCA1 は複数のキナーゼによってリン酸化を受けることで、リン脂質排出活性や ABCA1 自身の合成、分解速度が制御されている。また、嚢胞性繊維症の原因遺伝子タンパク質であり、Cl⁻チャンネルである CFTR (ABCC7) はプロテインキナーゼ A (PKA) およびプロテインキナーゼ C (PKC) によってリン酸化されることで、チャンネル活性が調節される。胆汁酸排出トランスポーターである MRP2 (ABCC2) は、C末端にある PDZ ドメインが PKC によってリン酸化を受けることで、PDZ 結合タンパク質との親和性が変化し細胞内局在が調節されるとの報告がある。一方、癌細胞において高発現し、抗癌剤を排出するトランスポーターである MDR1 (ABCB1) は PKA や PKC によってリン酸化を受けるが、これらのリン酸化は薬剤排出活性には影響を及ぼさないとされている。酵母においては薬剤排出トランスポーターである Pdr5p の420番目のセリンがカゼインキナーゼによってリン酸化され、自身の分解速度が調節されることが報告されている。このように、細胞内シグナ

ル伝達に関わる主要なプロテインキナーゼ群によって ABC タンパク質がリン酸化されることから、細胞の増殖や代謝状態、細胞外ストレスなどに応じて ABC タンパク質の機能や細胞内局在がコントロールされていると考えられる。

2. Cdr1p と Pdh1p のリン酸化

我々は、Cdr1p と Pdh1p のリン酸化と薬剤排出能、薬剤耐性度との相関を上述の出芽酵母を用いた実験系において調べた。まず、*in vivo* において [³²P] orthophosphate による標識実験を行い、Cdr1p と Pdh1p のどちらも、培地中のグルコース濃度に依存したリン酸化を受けていることを明らかにした。また、様々なリン酸化ペプチドを認識する抗体を用いたウエスタンブロットにおいて、抗リン酸化 Akt-substrate 抗体は Cdr1p と Pdh1p を、抗リン酸化 PKA-substrate 抗体は Pdh1p のみを認識した。しかし、抗 PKC-phosphoprotein 抗体や抗リン酸化チロシン抗体はいずれのタンパク質も認識しなかった。以上の結果より、Cdr1p と Pdh1p はともに PKA もしくは類似のキナーゼに依存したリン酸化を受けていることが推測された。

Cdr1p と Pdh1p のリン酸化シグナルは培地中のグルコースの欠乏によって消失し、グルコース刺激によって再び回復することが分かった。このとき Pdh1p は 1 mM でリン酸化が回復するが、Cdr1p は 100mM までリン酸化が回復しなかったことから、両者は異なるキナーゼによってリン酸化されていると考えられた。また、Cdr1p のリン酸化は高濃度の NaCl、熱ショック、H2O2 添加などの細胞外ストレスによっても亢進した。出芽酵母におけるグルコースによる栄養増殖やストレス応答反応には PKA が関与することから、これらの結果は Cdr1p や Pdh1p が PKA

によってリン酸化される可能性をさらに支持するものであった。

3. リン酸化による ATP 加水分解活性と薬剤排出活性の調節

Cdr1p、Pdh1p が PKA によってリン酸化されるかどうかをさらに検討するために、PKA の触媒サブユニット遺伝子 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3* をそれぞれもしくは二重に(全部破壊すると致死である)破壊した酵母株を作成し、その株で発現させた Cdr1p、Pdh1p のリン酸化状態を調べた。その結果、Tpk2p と Tpk3p が主に Pdh1p のリン酸化を担っており、Cdr1p は Tpk 以外にもリン酸化に関わるキナーゼが存在すると考えられた。さらに、Cdr1p のリン酸化部位を同定するために、推測される Akt によるリン酸化部位をひとつずつアラニンに置換した変異タンパク質を発現させて、リン酸化状態と薬剤排出能、薬剤耐性度を比較した。8 つある候補のうち nucleotide binding domain (NBD) 1 の付近にある 307 番目 (M1) と 484 番目 (M2) のセリンのアミノ酸置換変異は抗リン酸化 Akt-substrate 抗体によるウエスタンブロットにおいてシグナルが大幅に減少し、二つ同時にアラニンに置換した変異タンパク質 (M1, 2) ではシグナルを全く検出できなかった。また、これらの変異タンパク質は基質輸送に必須とされている ATP 加水分解活性が有意に低下しており、変異タンパク質発現株は野生型 Cdr1p 発現株と比較してローダミン排出活性(薬剤排出活性)が低下していた。さらに、変異タンパク質を発現している酵母株の薬剤耐性度も野生型と比較して有意に低下していた。

以上の結果より、PKA または類似のリン酸化活性をもつキナーゼが、グルコースや細胞外ストレスに応じて Cdr1p や Pdh1p をリン酸化することを明らかにできた。また Cdr1p においては、

このような培養条件において M1、M2 のセリンがリン酸化されていると考えられた。M1 や M2 のアラニン変異は薬剤排出活性を大きく低下させたことから、この部位のリン酸化状態が薬剤排出活性を調節するというモデルが考えられる。M1 や M2 の近傍にある NBD は ATP の加水分解を行って、薬剤輸送活性エネルギーを作り出すと考えられていることから、この位置のリン酸基のもつ負の電荷が NBD の活性、ドメインの動きを調節しているのかもしれない。

D. 考察

病原真菌 *C. glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p と Pdh1p はアゾール系抗真菌薬を排出し、真菌に薬剤耐性能を付与する。我々は Cdr1p と Pdh1p を出芽酵母において大量発現させて、タンパク質のリン酸化状態と薬剤排出機能の相関を、抗リン酸化セリン・スレオニン抗体を用いたウエスタンブロット解析により調べた。その結果両者はそれぞれ異なる PKA の触媒サブユニットによってリン酸化されること、またそのリン酸化量がストレスや栄養条件によって変動することが明らかとなった。さらに、Cdr1p の予測されるリン酸化部位を変異させたタンパク質を用いて解析を行ったところ、307 番目のセリンと、484 番目のセリンをアラニンに置換させると、リン酸化量と ATP 加水分解活性が低下し、薬剤耐性能も低下することが分った。これらのリン酸化部位は近傍にある NBD (nucleotide binding domain) の活性を調節し、タンパク質全体の薬剤輸送活性を調節するものと考えられる。

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 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^Rp (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らかとなった。

この研究は国立感染症研究所・生物活性物質部の田邊公一、和田俊一、梅山 隆、金子亜希、高野幸枝の各氏、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 M, Wada S, Tanabe K, Kaneko A, Takano

- Y, Umeyama T, Hanaoka N, Uehara Y, Lamping E, Niimi K, Tsao S, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD. Functional analysis of fungal drug efflux transporters by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 58, 1-7, 2005.
2. Umeyama T, Kaneko A, Nagai Y, Hanaoka N, Tanabe K, Takano Y, Niimi M, Uehara Y. *Candida albicans* protein kinase CaHsl1p regulates cell elongation and virulence. *Molecular Microbiology* 55, 381-395, 2005.
 3. Wada S, Tanabe K, Yamazaki A, Niimi M, Uehara Y, Niimi K, Lamping E, Cannon RD, Monk BC. Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability. *Journal of Biological Chemistry* 280, 94-103, 2005.
 4. Niimi M, Niimi K, Takano Y, Fischer FJ, Uehara Y, Holmes AR, Cannon RD. Regulated over-expression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 999-1006, 2004.
 5. Kaneko A, Umeyama T, Monk BC, Hanaoka N, Uehara Y, Niimi M. Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast* 21, 1025-1033, 2004.
 6. Niimi, K., Harding, D.R.K., Parshot R., King A., Lun D. J., Decottignies A., Niimi, M., Lin S., Cannon R. D., Goffeau, A. and Monk, B.C. Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 1256-1271, 2004.
 7. 新見昌一 その他の真菌感染症 ネオエスカ感染症・アレルギーと生体防御 倉田 毅・編 同文書院 2005
 8. 新見昌一 深在性真菌症 感染症の事典 国立感染症研究所学友会編 朝倉書店 2004
 9. 新見昌一 真菌性髄膜炎 最新版家庭医学大全科 法研 2004
 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 日本医真菌学雑誌 45, 63-69, 2004
- 学会発表
1. 花岡希、梅山 隆、上野圭吾、上原至雅、新見昌一 二形性真菌 *Candida albicans* におけるプロテインフォスファターゼの網羅的遺伝子破壊 第 77 回日本細菌学会総会、平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪
 2. 上野圭吾、花岡希、梅山 隆、上原至雅、新見昌一 病原性真菌 *Candida albicans* における蛋白質リン酸化酵素をコードする CaYVH1 の機能解析 第 77 回日本細菌学会総会、平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪
 3. 新見昌一、金子亜希、梅山 隆、上原至雅 出芽酵母系を用いた *Cryptococcus neoformans* ABC 輸送体 CneMdr1p の機能発現とアゾール剤耐性 第 77 回日本細菌学会総会、平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪
 4. 下川修、根津尚史、新見昌一 *Candida albicans* ステロール 14 位脱メチル化欠損株における酢酸塩による細胞死の機序 第 77 回日本細菌学会総会、平成 16 年 4 月 1-3 日、大阪
 5. 新見昌一 真菌の薬剤耐性機構 第 57 回日本細菌学会九州支部総会特別講演 平成 16 年 9 月 3-4 日、福岡

6. 花岡希、梅山 隆、上野圭吾、上原至雅、新見昌一 二形性真菌 *Candida albicans* における CaYVH1 プロテインフォスファターゼの解析 第 37 回酵母遺伝学フォーラム 平成 16 年 9 月 9-11 日、島根
 7. 梅山 隆、新見昌一、上原至雅 病原性真菌 *Candida albicans* における CDC28 発現抑制による形態変換への影響 第 37 回酵母遺伝学フォーラム 平成 16 年 9 月 9-11 日、島根
 8. 金子亜希、梅山 隆、上原至雅、新見昌一 *Candida albicans* における TAP 法を用いたタンパク質複合体精製法の確立 第 37 回酵母遺伝学フォーラム 平成 16 年 9 月 9-11 日、島根
 9. 田辺公一、和田俊一、山崎亜希子、新見昌一、上原至雅、K Niimi*、E Lamping*、RD Cannon*、BC Monk* (*University of Otago, New Zealand) *Candida glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p のリン酸化は薬剤排出活性と ATP 加水分解活性を調節する 第 37 回酵母遺伝学フォーラム 平成 16 年 9 月 9-11 日、島根
 10. E Lamping*、BC Monk*、M Niimi*、RD Cannon* (*University of Otago, New Zealand) Genetic tools for functional hyper-expression of membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae* 第 37 回酵母遺伝学フォーラム 平成 16 年 9 月 9-11 日、島根
 11. 根岸由美子、梅山 隆、新見昌一、梶原 将、村山そう明 *Candida albicans* の脂肪酸不飽和化酵素の解析 第 48 回日本医真菌学会総会、平成 16 年 9 月 25-26 日、横浜
 12. E. Lamping, BC Monk, AR Holmes, K Niimi, S Tsao, K Nakamura, M Niimi, RD Cannon. A membrane protein hyper-expression system and its application in the search for new antifungal drugs 第 48 回日本医真菌学会総会、平成 16 年 9 月 25-26 日、横浜
 13. 新見昌一 酵母を利用した病原真菌遺伝子の機能解析と創薬へのアプローチ 第 48 回日本医真菌学会総会シンポジウム 平成 16 年 9 月 25-26 日、横浜
 14. 田辺公一、和田俊一、山崎亜希子、K Niimi、E Lamping、RD Cannon、BC Monk、上原至雅、新見昌一 病原真菌 *Candida glabrata* の ABC タンパク質 Cdr1p のリン酸化は薬剤排出活性と ATP 加水分解活性を調節する 第 27 回日本分子生物学会年会、平成 16 年 12 月 8-11 日、神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

平成16年度厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

研究協力者報告書

Coccidioides immitis 遺伝子同定法

佐野文子（千葉大学真菌医学研究センター） - - - - - 105

協力研究報告書

Coccidioides immitis 遺伝子同定法

研究協力者 佐野文子 千葉大学真菌医学研究センター 助教授

研究要旨 コクシジオデス症の原因菌 *Coccidioides immitis* の分離・同定による確定診断は実験室内感染の危険が高い。今回 polymerase chain reaction (PCR) を用いた非培養系による分離菌の同定法ならびに臨床検体からの遺伝子検出を既報と比較したところ、臨床検体に応用できる方法としてはいずれも不十分なものであった。そこで、生菌および臨床検体にも応用できる迅速遺伝子診断法として loop mediated isothermal amplification method (LAMP) を応用し、本菌種に特異的に反応するプライマーセットの開発に着手した。

I. 臨床検体からの LSUrRNA 遺伝子検出の試み

A. 研究目的

コクシジオイデス症の診断は、菌分離・同定による培養検査が最も有効な方法ではあるが、危険を伴う。本菌種は危険度レベル3で、我が国では発生していないものの、米国では実験室感染事故も多く、検査関係者の死亡事故も少なくない。そこで非培養系による診断法を開発すべく、今回、渡航歴、臨床症状、抗体測定、胸部画像所見から本症と診断された患者から気管支鏡下に気道内分泌物を採取し、これを用いて培養検査と共に遺伝子診断を試みた。

B. 研究方法

1. 原因菌 *Coccidioides immitis* の分離・培養、DNA の抽出

気管支鏡下で採取された気道内分泌物を抗生物質添加サブロー培地 (BBL Mycosel 寒天培地) に接種し、37°C で 1 週間培養、この集落表面を静かに白金耳で釣菌し、新たな培養基 (ポテト・デキストロース寒天斜面培地) 数本に継代し 37°C で 4 日間培養した。

この時、1.5 ml サイズのエッペンチューブに 70% アルコール 1 ml 用意し、遺伝子解析用に少量の菌体を入れた。エッペンチューブ周囲に 70% アルコール を噴霧してから、手で攪拌し、48 時間室温にて放置した。この検体を 3 回滅菌蒸留水で洗い、市販キットを用いて DNA を抽出した (図 1)。

この培養物から同様にポテト・デキストロース平板培地とサブロー平板培地に接種し、シャーレ周囲をビニルテープで厳重に覆い、37°C で 1ヶ月培養し、巨大集落観察用とした。集落観察前に、ホルマリン原液 5 ml を針

付きシリンジに入れ、ビニルテープを突き刺して、シャーレ内側に静かに注入し、48 時間以上、放置した (図 2)。

シャーレより少量の菌体を取り出し、新たな培養基に接種し、37°C で 1 週間培養し、菌の発育が無いことを確認した後、シャーレからの菌体を掻き取り、顕微鏡観察した (図 3) 以上の操作はすべてレベル 3 実験室内で行った。

2. 患者気道内分泌物からの DNA の抽出、nested PCR および遺伝子配列決定

患者気道内分泌物 3 種 (浮遊液 1, 浮遊液 2 および喀痰) おおの約 0.5 ml を 20 倍量の 70% エタノールで 30 分固定後、市販キットにより DNA を抽出した。

NL-1, NL-4 で第一 PCR を行い、GenBank の *C. immitis* の LSUrRNA 遺伝子配列 AB040702 を基に作成したプライマー (CocciLSUF; 5' -CCA ACA GGG ATT GCC TCA GTA ACG G-3' , CocciLSUR; 5' -GAG GCC TTT AAC CAA CCG CCA GAA C-3') を用いて nested PCR を行い、D1/D2 領域の部分配列 413 塩基を決定した。

Proline rich antigen 遺伝子 (PRA) の検出、塩基配列の決定もあわせて行った。

C. 研究結果

LSUrRNA 遺伝子は喀痰から抽出された DNA のみ配列決定により確認された (図 4)。

また、PRA 遺伝子は気道内分泌物のうち浮遊液 1 から抽出された DNA および分離菌体から抽出された DNA のみ配列が一致し、他はヒト遺伝子の部分配列を増幅していた (図 5)。

D. 考察

今回用いた LSUrRNA 遺伝子の D1/D2 領域

の部分配列検出用プライマーは子囊菌全般を増幅するため、*C. immitis* に特異的ではないが、遺伝子配列まで決定すれば、非培養系診断として、一考の価値がある。

Proline rich antigen 遺伝子はヒト遺伝子を増幅することから、喀痰、感染組織など人体遺伝子を含む検体への応用が難しいが、分離菌体の同定には有用と考えられた。臨床検体でも遺伝子配列まで決定し、一致を確認すれば、非培養系診断法として、利用価値がある。

II. Loop mediated isothermal amplification method (LAMP 法) によるウレアーゼ遺伝子、rRNA ITS1-5.8S-ITS2 領域遺伝子の検出。

A. 研究目的

LAMP 法は感染症関連では SARS、レジオネラ、腸管出血性大腸菌、高病原性トリインフルエンザなどの検出用キットがすでに市販されているばかりではなく、病原真菌でもその応用が多種の菌種で試みられており、なかでもパラコクシジオイデス症原因菌および病理組織標本から遺伝子検出はすでに報告されている。そこで LAMP 法による遺伝子検出をコクシジオイデス症に応用することを試みた。

B. 研究方法

千葉大学真菌医学研究センターで保存されている *C. immitis* 17 株を用いてウレアーゼおよび rRNA ITS1-5.8S-ITS2 領域遺伝子の配列を決定し、これらと既報の遺伝子検出法ならびに GenBank での既知配列を参考に、*C. immitis* を特異的に検出する LAMP 法用のプライマーを設計した。

陰性コントロールとして類縁菌の *Blastomyces dermatitidis* , *Histoplasma*

capsulatum および *Paracoccidioides brasiliensis* の菌体抽出 DNA を用いた。

C. 研究結果

ウレアーゼ, rRNA ITS1-5.8S-ITS2 領域遺伝子とともに *C. immitis* のみに反応したが, ウレアーゼ遺伝子の場合, 検出バンドが不鮮明であった (図 6)。

D. 考察

コピー数も多く, 通常の PCR でも検出感度が良いとされている rRNA ITS1-5.8S-ITS2 領域遺伝子を用いた LAMP 法が現在のところでは有用性が高いと考えられる。

今後は *C. immitis* が属するオニゲナ目菌種およびその類縁目に属する菌種について本法を試すとともに, 気管内分泌物, 生検組織などの臨床材料への応用を考えている。

E. まとめ

コクシジオイデス症原因菌の迅速同定は既報に沿った方法で可能であるが, 臨床検体からの遺伝子検出による迅速診断法は改良の余地がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 原著論文

• Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Ohori A, Kamei K, Franco M, Miyaji M, Nishimura K: Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. FEMS Microbiol Lett. 2004

May 1;234(1):93-7.

• 五十嵐 毅, 黒瀬龍彦, 板橋孝一, 中野郁夫, 岡本賢三, 佐野文子, 木村清延, 加地浩: 肺パラコクシジオイデス症の 1 例. 日本呼吸器学会雑誌 42 (7): 629-33, 2004.

2) 学会発表

• 佐野文子, Itano EN, Tatibana BT, 宇野 潤, 鎗田響子, 亀井克彦, 宮治 誠, 西村和子: LAMP 法による患者喀痰からの *Paracoccidioides brasiliensis* 特異的遺伝子の gp43 検出. 日本菌学会第 48 回大会, 講演要旨集 p90, 長崎, 2004. 5. 29-30.

• 佐野文子, 五十嵐 毅, 亀井克彦, 西村和子: LAMP 法 (loop-mediated isothermal amplification) による喀痰からの *Paracoccidioides brasiliensis* 糖蛋白抗原遺伝子の gp43 検出. 真菌症フォーラム 第 5 回学術集会, プログラム/抄録集 p57-58, 東京, 2004. 1. 31.

• 佐野文子, Itano EN, 宇野 潤, 鎗田響子, 亀井克彦, 宮治 誠, 西村和子: LAMP 法による患者喀痰からの *Paracoccidioides brasiliensis* 特異的遺伝子 gp43 の検出. 第 48 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (Supple 1): 100, 横浜, 2004. 9. 25-26.

• 村田佳輝, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子: イヌにおけるヒストプラズマ症 (Histoplasmosis) の一症例について. 第 28 回千葉県獣医学会, 講演抄録, p17, 2004. 3. 7

• 村田佳輝, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子, 斎藤陽彦: イヌにおけるヒストプラズマ症 (Histoplasmosis) の一症例について. 平成 16 年度関東地区獣医師大会 日本小動

- 物獣医師会（関東），抄録集，p58，甲府，2004. 9. 6.
- 村田佳輝，佐野文子：千葉県で発生したイヌのヒストプラズマ症（Histoplasmosis）の一症例について．平成 16 年度 学会年次大会（新潟）日本小動物獣医学会，抄録集，p284，新潟，2005. 2. 10-12.
 - 石川利雄，佐野文子，村田佳輝，石川雅子，亀井克彦，山本浩嗣：ヒストプラズマ症と鑑別を要した Large Granular Lymphoma の猫一例．平成 16 年度（第 29 回）千葉県獣医学会．抄録集 p9，はるるプラザ（千葉），2005. 3. 6.
 - Sano A, Tatibana BT, Itano EN, Igarashi T, Uno J, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 from sputa by Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP). Poster no. 2, Abstract pp., 60-61, 3rd Congress of Asia-Pacific Society for Medical Mycology, 4-6 March 2005, The Dusit Thani Hotel, Bangkok, Thailand.
 - Murata Y, Ueda Y, Sano A, Inomata T, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K: Canine histoplasmosis in Japan: an update. Poster no. 42, Abstract p., 104, 3rd Congress of Asia-Pacific Society for Medical Mycology, 4-6 March 2005, The Dusit Thani Hotel, Bangkok, Thailand.
- 3) 関連総説
- 佐野文子：カビ：よい子，悪い子，おっかない子！先端-News Letter（NPO 先端医療福祉開発研究会）12：6-7，2004.
 - 佐野文子，村田佳輝，上田八千代，猪股智夫，亀井克彦，西村和子：人と動物の共通感染症の最前線 Part 1. 本邦における犬のヒストプラズマ症の疫学．獣医畜産新報 57：669-670，2004.
 - 佐野文子：特集 皮膚糸状菌症 ハリネズミの皮膚糸状菌症．ViVeD 1（1）：33-40，2005.
 - 佐野文子：シリーズ/病原性真菌の今日的意味（21）-13. 人獣共通真菌症．化学療法領域 21（2）：153-7，2005.
- 4) 関連著書
- 分担執筆：国立感染症研究所 学友会編「感染症の事典」宮治 誠，佐野文子：ヒストプラズマ症. pp. 209-11，2004 年 10 月，朝倉書店，東京.
 - 分担執筆：山崎修道 編「感染症予防必携第 2 版」佐野文子：パラコキシジオイデス症，pp. 304-6，プラストミセス症，pp. 343-44，2005 年 1 月，財団法人 日本公衆衛生協会，東京.
- H. 知的財産権
なし

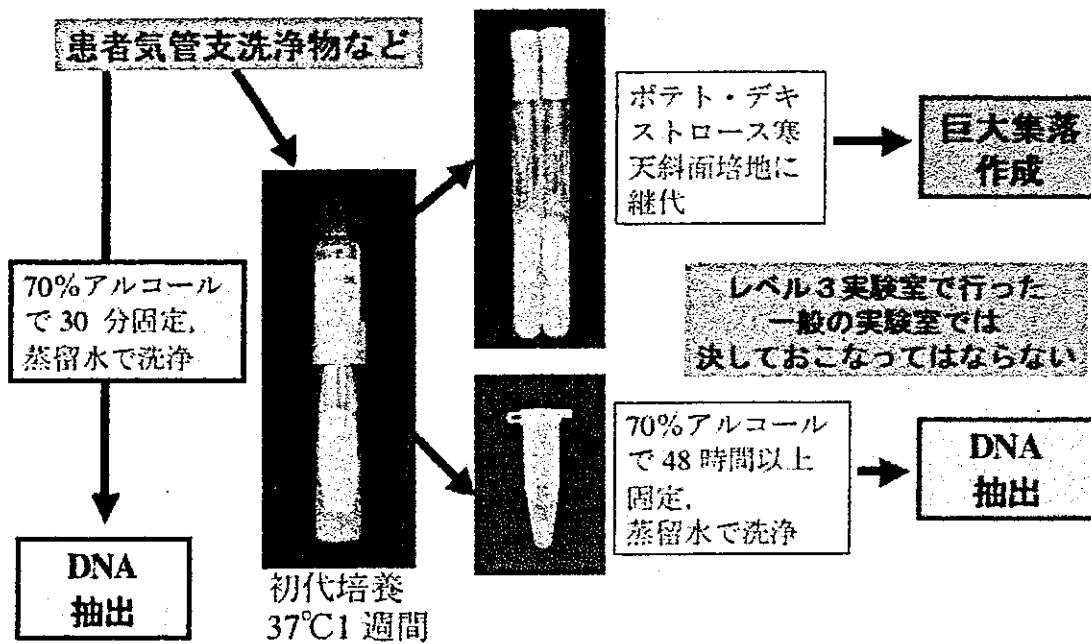


図1 原因菌：*Coccidioides immitis* の分離・培養，DNA の抽出

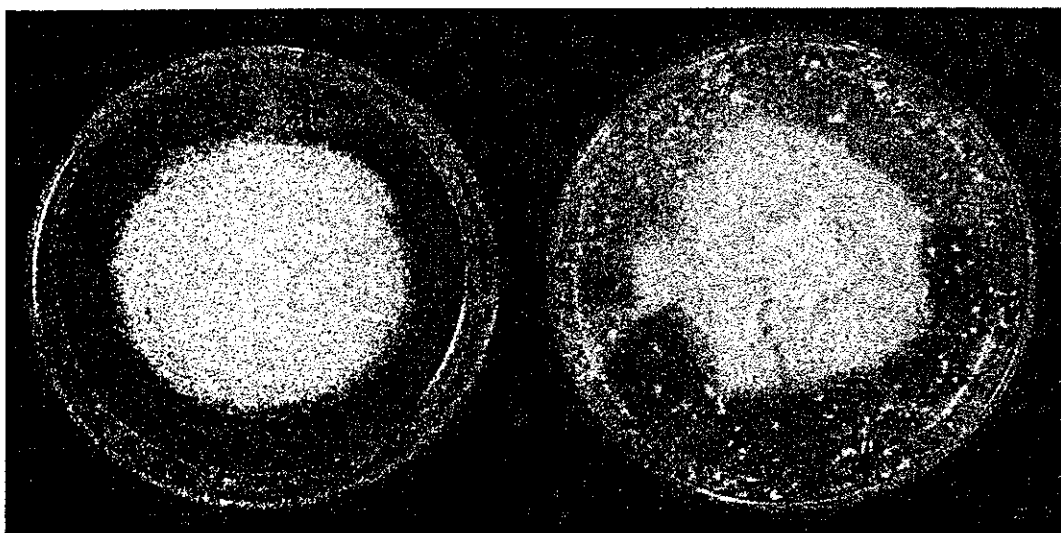


図2 原因菌：*Coccidioides immitis* の集落，37°C，1ヶ月培養後，ホルマリン固定。左：サブロー寒天平板，右：ポテト・デキストロース寒天平板（ホルマリン注入時に分節型分生子が蓋に飛び散っている）。

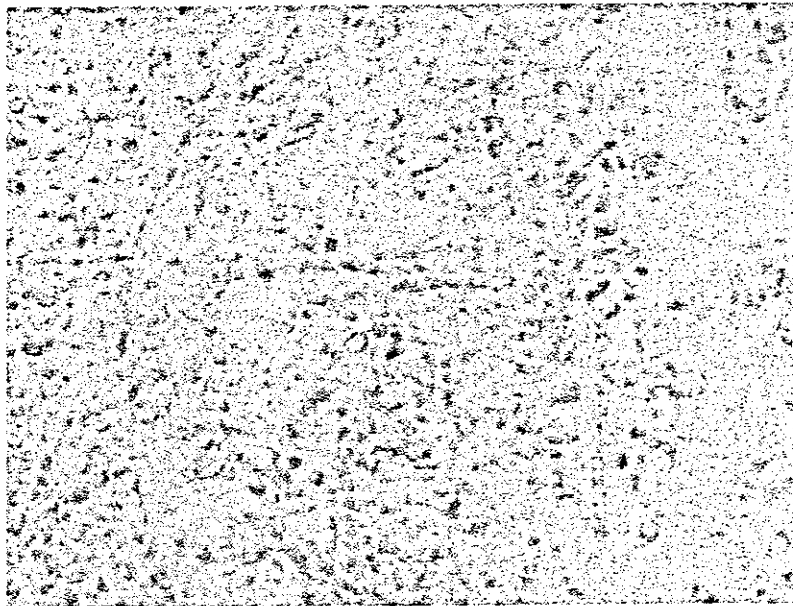


図3 今回分離された *Coccidioides immitis* の分節型分生子 (ラクトフェノール・コトンプルー染色, x200). 図2のシャーレ蓋に付着したものを観察した.

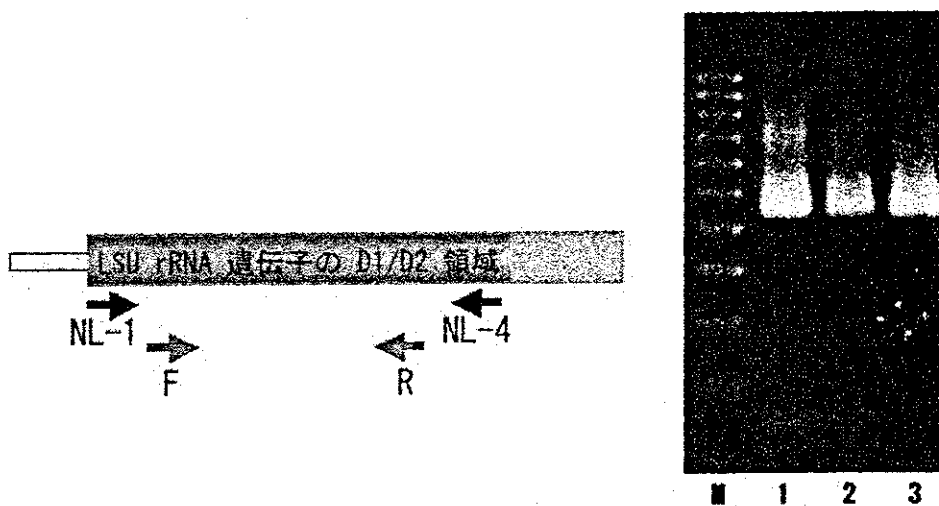


図4 Nested-PCR のプライマー位置 (左) と検出された LSU rRNA 遺伝子 (右). M: マーカー, 1: 浮遊液 1, 2: 浮遊液 2, 3: 喀痰. 3検体とも同一サイズのバンドが検出されたが, *C. immitis* の遺伝子として配列を決定できたのは喀痰のみであった. この配列は後に培養された *C. immitis* 遺伝子配列と一致していた.

Coccidioides immitis の protein rich antigen 遺伝子 (AF013256) より設計されたプライマーの配列と位置

プライマー	配列 (5'→3')	配列位置
Cocci I	GTA CTA TTA GGG AGG ATA ATC GTT	841-864
Cocci II	GGT GTC AAC TGG TGG GAT GTC AAT	1366-1343
Cocci III	ATC CCA CCT TGC OCT GTA TGT TCG A	962-986
Cocci IV	GGA GAC GGCTGG ATT TTT TAA CAT G	1303-1279

Bialek R, Kem J, Herrmann T, Tijerina R, Cecenas L, Reischl U, Gonzalez GM: PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. J Clin Microbiol 42: 778-83, 2004 より

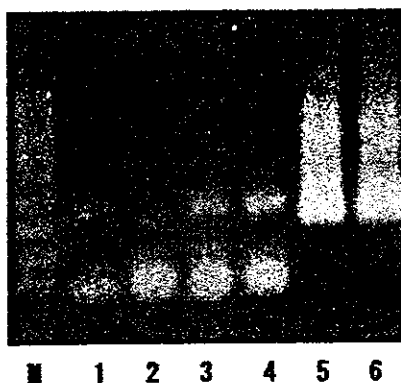


図5 Nested-PCR のプライマー位置 (左) と検出された PRA 遺伝子 (右)。M: マーカー, 1: 他のコクシジオイデス症患者喀痰, 2: 浮遊液 1, 3: 浮遊液 2, 4: 喀痰, 5: *C. immitis* 菌体 (本症例分離株), 6: *C. immitis* 菌体 (センター保存株)。*C. immitis* 遺伝子として配列を決定できたのは 浮遊液 1 と菌体のみで, 他はヒト遺伝子の部分配列を増幅していた。

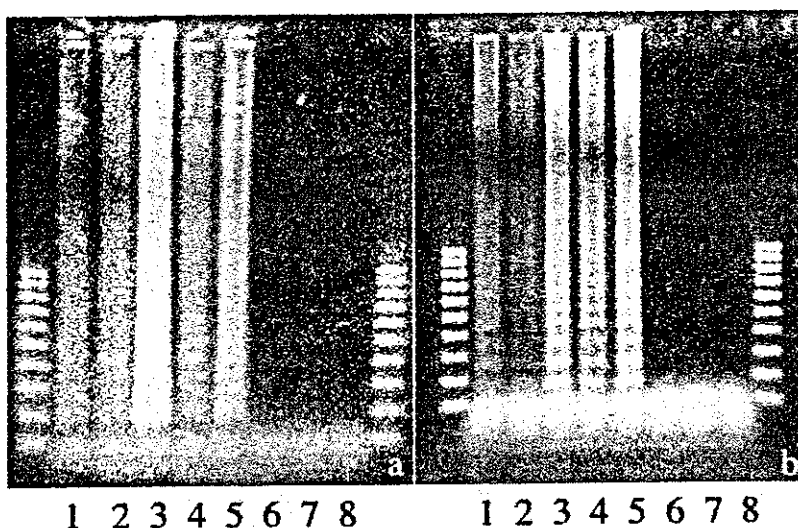


図6. LAMP 法による *C. immitis* の urease および rRNA ITS 領域遺伝子の検出

(a) urease, (b) rRNA ITS 領域,

1-5; *C. immitis*, 6; *Histoplasma capsulatum*,

7; *Blastomyces dermatitidis*, 8; *Paracoccidioides brasiliensis*.