

網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構 の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 梅山 隆

研究要旨 临床上問題となっている真菌症のうちカンジダ症の主要原因菌 *Candida albicans* の病原因子を同定することを目的として、新しい分子生物学ツールを開発し、様々な遺伝子について遺伝子破壊株の作製を行なった。

A. 研究目的

AIDS 患者における日和見感染症を初め、悪性腫瘍患者、臓器移植を受けた患者等の免疫不全による易感染症患者に認められる深在性真菌症は、患者の予後を大きく左右する深刻な感染症である。頻繁に使用されるアゾール系抗真菌剤に対する耐性菌の出現が临床上大きな問題になっているため、主要な医真菌であるカンジダやアスペルギルス等に対して、アゾール系薬剤とは異なる作用機作をもち、副作用の少ない新規抗真菌剤の開発が期待されている。そのために、これまでの抗真菌剤の主要な標的となってきた真菌細胞膜・細胞壁合成系以外の分子を創薬の標的分子として研究することが必要である。

高齢化社会において感染症の増加が見込まれる近年において、治療薬・治療方法の選択幅を広め、多剤耐性真菌の増加を抑制するとともに、高齢者の健康を維持していくことに貢献することが期待される。また、医療の高度化に伴って今後臓器移植が増加すると見込まれるが、移植後の感染症コントロールにも新規抗真菌剤の開発研究が必要不可欠であり、国民の医療と健康の向上に貢献できる。

最近の目覚ましい研究の発展によりカンジダ症の主要原因菌 *Candida albicans* に関する遺伝子工学・分子生物学的手法も徐々に確立され始め、“モデ

ル病原真菌”として扱うことも可能になってきている。本研究課題では、様々な分子生物学ツールを開発することによって病原真菌の基礎研究の進展を促進させる。それとともに、カンジダ及びアスペルギルスにおいて、ゲノム情報を基にした網羅的な遺伝子破壊を行い、医真菌の病原因子を同定するとともに、創薬のために、同定した分子に対する特異的阻害剤を探索することを目的としている。

B. 研究方法

1. 蛋白質複合体精製のための新しい分子生物学ツールの開発

目的遺伝子の C 末端に 6xHis タグおよび FLAG タグを付加できるようなプラスミドを構築した。2 つのタンデムに並んだタグ、mRNA の安定化に必要な *ACT1* ターミネーター、および選択マーカー *URA3* を含む断片を PCR によって増幅し、*C. albicans* のウリジン要求性株に形質転換し、栄養要求を相補する株を選択した。選択した株について、実際に目的とした遺伝子の C 末端に遺伝子カセット DNA が挿入されている株をコロニーダイレクト PCR および塩基配列解読によって確認した。

まず、セプチンと呼ばれる蛋白質複合体の精製について検討を行った。上記の方法を用いて、セプチンの構成因子の一つ、*CDC11* の C 末端に 6xHis タ

グおよび FLAG タグを付加した。構築した株を、酵母形を誘導するための YPD 培地、および菌糸形を誘導するための血清を含んだ YPD 培地の 2 種類の液体培地で培養し、細胞を得た。細胞抽出液より、FLAG M2 アガロースおよび NiNTA アガロースの二段階のアフィニティークロマトグラフィー精製を行った。得られた画分について SDS-PAGE 電気泳動を行い、CBB 染色後、複合体を形成している蛋白について MALDI-TOF MS を用いて、peptide finger printing によって同定した。

2. 網羅的な遺伝子破壊株の作製

C. albicans において病原性の発現機構を調べるために、既に公開されているゲノムデータベース情報を元に様々な遺伝子の遺伝子破壊株の作製を行った。目的遺伝子について遺伝子破壊用カセット DNA を PCR 法によって作製し、*C. albicans* の栄養要求株に形質転換することによって完全に遺伝子が欠失した株を取得した。

具体的には、*C. albicans* は通常二倍体であるため、異なる二種類の栄養要求マーカーを用いて、二回の形質転換を行う必要がある。最初の宿主として、ウリジンおよびアルギニン要求性の株を構築した。その株に対する 1 回目の形質転換には *URA3* マーカーを使用し、2 回目の形質転換に *ARG4* マーカーを使用することによって、目的の遺伝子を完全に欠失した株を構築した。遺伝子によってはマーカーの種類を変えたり、薬剤耐性マーカーを用いたり、様々な方法によって遺伝子破壊を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、輸入真菌症および日和見感染型深在性真菌症の対策を講ずるために企画した基礎的および応用的研究であり、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。

C. 研究結果

1. 蛋白質複合体精製のための新しい分子生物学ツールの開発

CDC11 に付加した 6xHis タグおよび FLAG タグを用いて、セプチン蛋白複合体を精製したところ、主要なバンドとして、*CDC11* 以外に 4 種類の蛋白が複合体を形成していることを示した。さらに、MALDI-TOF MS による peptide finger printing によってその 4 種類の蛋白を同定した (図 1)。その結果、予想通り *CDC3*, *CDC10*, *CDC12*, *SEP7* であり、開発した精製系が有効に使えることを証明した。酵母形、菌糸形の二つの形態について同様の実験を行うと、同じようなパターンが得られ、差は確認できなかった。さらに、*CDC3*, *CDC10*, *CDC12*, *SEP7* にもそれぞれ C 末端に 6xHis タグおよび FLAG タグを付加し、同様の精製を行ったところ、同じようなパターンが得られたことから、セプチン複合体は *C. albicans* においても 5 種類の蛋白から構成されていることが示唆された。

2. 網羅的な遺伝子破壊株の作製

プロテインキナーゼ、プロテインフォスファターゼ、転写因子を含む約 50 種類の遺伝子について遺伝子破壊を行い、株の取得に成功した。現在も、着々と遺伝子破壊を行っている最中である。

その中で、プロテインキナーゼの一つ *HSL1* キナーゼについて遺伝子破壊を行った結果を論文発表した。*HSL1* 遺伝子破壊株の表現型は、酵母形・菌糸形の両方の形態において細胞の伸長が促進されることであった (図 2)。*C. albicans* における主要な病原性の一つ、二形性との関連が密接であり、マウスの全身性感染モデルの系においても病原性の低下が確認できた。

D. 考察

C. albicans はその通常二倍体、という性質から、遺伝学的・分子生物学的研究が他の微生物よりも立ち遅れていた。本研究のような様々な解析ツールの開発、遺伝子破壊法の確立によって、本菌の基礎研究の推進に貢献できた。

今年度開発した蛋白質複合体精製法について、タンデムアフィニティークロマトグラフィーという二回精製を行うことによって、非常に純粋な複合体を精製することに成功した。特に、*C. albicans* においてセプチン複合体の構成因子を生化学的に同定できたのは世界初である。現在、菌糸形成に関与する転写因子について、この蛋白質複合体精製法を用いて解析を行っている最中であり、遺伝子の性状を解明するのに優れたツールと成り得るだろう。

網羅的な遺伝子破壊株の作製については、*C. albicans* が二倍体であるゆえ、株の構築が困難であり、さらに染色体が不安定なため、完全に欠失した株を得る確率が低い傾向にある。しかし、形質転換効率やカセット挿入効率を高める試行錯誤を行ったことで、極めて効率的に遺伝子破壊を行うことが出来るようになった。現在、目的の3割程しか完成していないが、効率を上げたことによって完成までの期間を短縮できると考えている。

E. 結論

蛋白質複合体を精製するための分子生物学的ツールを開発し、蛋白相互作用研究に役立つことを証明した。また、*C. albicans* では困難とされている遺伝子破壊法について簡便に行える系を開発し、様々な遺伝子の遺伝子破壊株を作製した。作製した遺伝子破壊株を今後詳細に解析することにより抗真菌剤標的分子の探索に貢献できると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. *Mol Microbiol.* 2005, 55(2):381-95.

Kaneko A, Umeyama T, Hanaoka N, Monk BC, Uehara Y, Niimi M. Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast.* 2004, 21(12):1025-33.

2. 学会発表

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、酵母遺伝学フォーラム、平成 16 年 9 月

梅山 隆、新見昌一、上原至雅、病原性真菌 *Candida albicans* の *CDC28* 発現抑制による形態変換への影響、酵母遺伝学フォーラム、平成 16 年 9 月

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 *CaYVHI* プロテインフォスファターゼの解析、酵母遺伝学フォーラム 平成 16 年 9 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 新しいツールを用いたセプチン複合体の精製

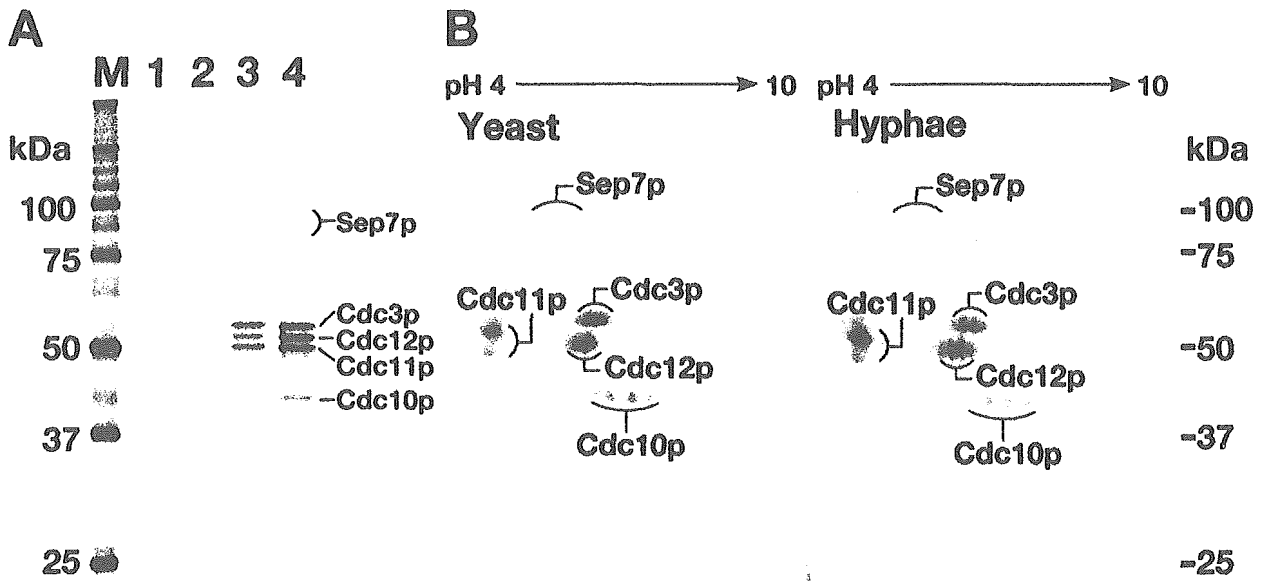


図2 HSL1 キナーゼ遺伝子破壊株の表現型

