

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS研究

第1分野

課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏	……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏	……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二	……	10

第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先	……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生	……	22
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦	……	27
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇	……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子	……	39

第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太	……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル	……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一	……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタデューの基礎的および応用的研究	川上浩司	……	65

第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳	……	69
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴	……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介	……	84

KH53315	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	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

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 臨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臨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

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。前年度までは、全てのフォスファ

ターゼ遺伝子および一部のプロテインキナーゼ遺伝子について本方法を用いて遺伝子破壊株の作製を試みた。

今年度においては、この方法を応用し、1回の形質転換だけで二つの相同染色体を破壊する方法を確立した(図1)。詳細には、まず、ARG4Δ3'-URA3-ARG4Δ5'遺伝子破壊用カセットをPCRにより増幅する。カセット内に2ヶ所同一方向の同一配列が存在するため、カセット全長を一度に増幅することは困難である。そのため、左腕と右腕に分けてPCRを行った(図1A)。遺伝子破壊のための相同領域はそれぞれ300 bpになるように設定した。次に、片方の相同染色体部位にARG4Δ3'-URA3-ARG4Δ5'のカセットを形質転換によって挿入する。その後、植え継ぎを繰り返すだけで、もう一つの相同染色体間の相同組換えおよび同一染色体のARG4共通配列間の相同組換えが起こる(図1B)。最終的に、もう一つの相同染色体部位がARG4と置き換わることによって、ARG4,URA3の栄養要求性を相補することが出来る株を選択する。その結果、二つの相同染色体部位はそれぞれARG4Δ3'-URA3-ARG4Δ5'カセットおよびARG4と置き換わり、ターゲットにした遺伝子が破壊された株ができて上がる。この方法であれば、遺伝子破壊を計画してから遺伝子破壊株の作製まで約2週間で終了する。

以上の方法で構築した全てのプロテインキナーゼ遺伝子破壊株について、遺伝子破壊による形態分化への影響を調べた。*C. albicans*は通常の培地では酵母の形態で生育するが、人の体内に近い条件、即ち血清の添加や温度・pHの上昇等の環境下に晒すと、菌糸状に生育するようになる。この形態変換は病原性と密接に関係しており、形態変換能を調べることによって病原の有無をある程度予測可能である。具体的には4種類の寒天培地上における菌糸生育能を

観察した。2つは酵母形を誘導する培地、もう2つは菌糸形を誘導する培地である。

(倫理面への配慮)

本研究は、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

プロテインキナーゼ93種類のうち既に報告されていた19遺伝子を除いた全ての遺伝子について遺伝子破壊株の作製を試みた。そのうち53種類について破壊株の作製に成功した。取得できた全てのプロテインキナーゼ破壊株について寒天培地上での形態を観察した。その結果をもとに、表現型について、酵母形を誘導する培地において菌糸生育をする、菌糸形を誘導するはずの培地において菌糸生育を行わない、などのカテゴリーへの分類を行った(図2)。39種類の遺伝子破壊株が酵母形を誘導するはずのYPD培地上で何らかの表現型を示した。また、菌糸形を誘導する培地において菌糸生育が弱くなる遺伝子破壊株は25種類あった。

また、これまで遺伝子破壊を行ってきた遺伝子の中で、プロテインフォスファターゼの一つ、*YVHI*について遺伝子破壊を行い、詳細に解析を行った結果を論文発表した。*YVHI*遺伝子破壊株は、酵母形・菌糸形の両方の生育条件において生育が遅く、マウスの全身性感染モデルの系においても顕著な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。

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。実際、*C. albicans* において遺伝子破壊を予定したプロテインキナーゼ・プロテインフォスファターゼについては全遺伝子の破壊を試み、実際に 70 種類以上の遺伝子破壊株の作製に成功した。

今年度はプロテインキナーゼをコードする遺伝子に焦点を当て、全ての遺伝子について遺伝子破壊を行った。遺伝子破壊を行った 74 種類の遺伝子のうち 53 種類について遺伝子破壊株の構築が可能であった。つまり、これらの遺伝子は生育には必須でないことが示唆される。強力な抗真菌剤の標的分子になるとは考えられないが、病原性と密接に関連する形態変換機構を解明するために重要なキナーゼを含んでいると予想される。構築できた全てのプロテインキナーゼ遺伝子破壊株について、寒天培地上における形態形成への影響を調べた。その結果、酵母形の維持に必要なキナーゼや菌糸形への変換に重要な役割を果たしているキナーゼの同定に到ることが出来た。形態変換を制御するシグナル伝達機構については世界中の *C. albicans* の研究者達の注目的となっており、本研究の成果による重要な知見を提供できることが期待される。

網羅的な遺伝子破壊によって遺伝子破壊が出来なかった遺伝子は 74 種類のうち 21 種類であった。取得できない理由として 2 つ考えられる。1 つは、その遺伝子が位置するゲノム上の部位において、遺伝子組み換えの頻度が非常に低い可能性が挙げられ

る。もう 1 つの理由は、その遺伝子が生育に必須である可能性である。生育に必須な遺伝子は、抗真菌剤の探索のための効果的な標的分子となり得る。来年度は、これらの必須である可能性を有する遺伝子について、自身のプロモーターを発現誘導可能なプロモーターと置換した株を作製することにより、その遺伝子が必須であるかどうかを確認する予定である。さらに、必須であると判明した遺伝子については、阻害剤の探索のための系を構築することを目的として、*in vitro* のキナーゼアッセイ系を構築する。真菌特有のプロテインキナーゼを阻害する物質の探索によって新しいクラスの抗真菌剤の開発に貢献できると考えている。

E. 結論

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。*C. albicans* のゲノム上にコードされている全てのプロテインキナーゼ遺伝子について遺伝子破壊を行った。大まかな表現型の観察により、多くの遺伝子について遺伝子破壊による何らかの影響を検出できた。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

Hanaoka, N., T. Umeyama, K. Ueno, K. Ueda, T. Beppu, H. Fugo, Y. Uehara, and M. Niimi. 2005. A putative dual-specific protein phosphatase encoded by *YVHI* controls growth, filamentation and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* 151: 2223-2232.

2. 学会発表

なし

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 *C. albicans*のための簡便な遺伝子破壊法の概略図

(A) 遺伝子組み換えようカセットの増幅及び形質転換後の相同組換え

(B) 形質転換体から遺伝子破壊株への相同組換えの流れ。

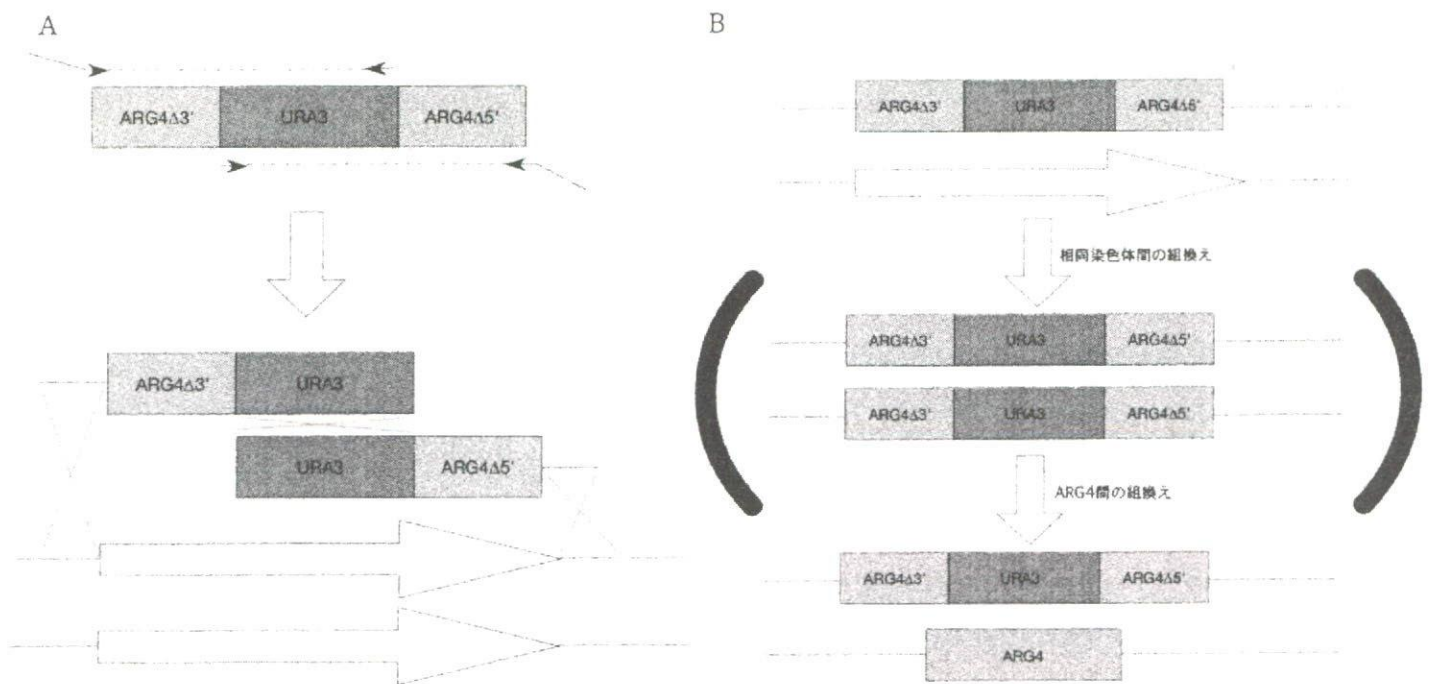
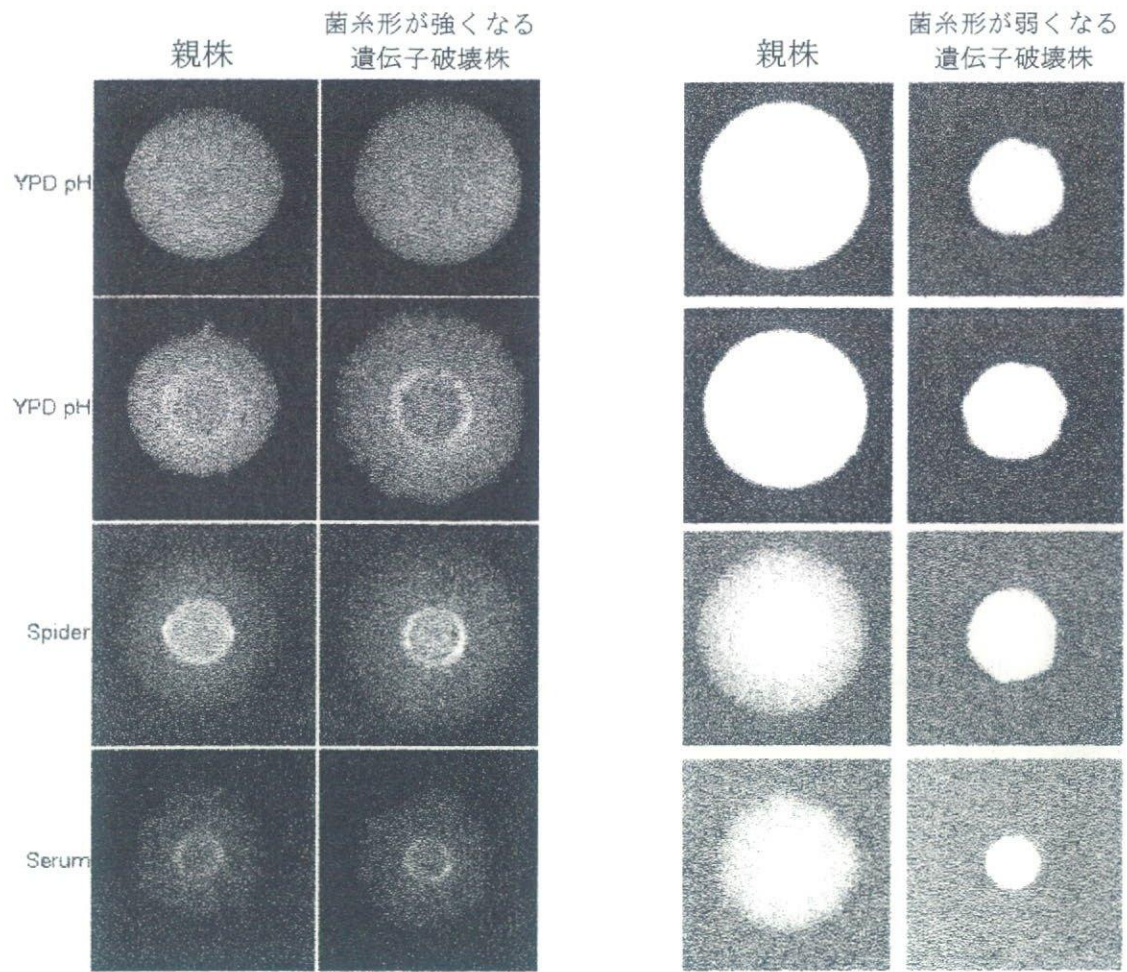


図2 作製した遺伝子破壊株が示す形態の表現型



平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社