

平成18年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 政策創薬総合研究

### 課題番号

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 …… 1
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 …… 12
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 …… 26
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 …… 37
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 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須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 …… 60
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 …… 66
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 …… 79
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 …… 92
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ィーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
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 …… 105
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 …… 116
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 …… 126
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 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

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 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

## 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、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

#### 【網羅的遺伝子破壊】

*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（図 1A）。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（図 1B）。1 年目までに、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。

2 年目においては、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 1C)。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。この方法で構築できたのは53種類のプロテインキナーゼ遺伝子破壊株であり、これら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。

今年度は、2年目に用いた遺伝子破壊方法では取得できなかったプロテインキナーゼ遺伝子21種類について解析を行った。必須遺伝子である可能性が考えられたので、遺伝子のプロモーターを抑制可能なプロモーターである *MET3* プロモーターと置換した株を作製した (図 1D)。

具体的には、まず、1つ目の相同染色体部位を *ARG4* マーカーと置換する。2つ目の相同染色体部位のプロモーター領域には、*URA3-MET3* プロモーターカセットを挿入する。結果として、遺伝子の発現は自身のプロモーターによって制御されず、*MET3* プロモーターによって制御されるようになる。*MET3* プロモーターは SH を含むアミノ酸の添加により厳しく抑制される。つまり、作製したプロモーター置換株をメチオニンとシステインを含む培地で培養すると発現が抑制され、遺伝子破壊と同等の表現型を示すと考えられる。

*MET3* プロモーター置換株の解析の結果、必須である可能性が低い遺伝子があったので、1年目で用いた方法 (図 1B) で遺伝子破壊を再度試みた。染色体の不安定性により3本の染色体が存在する遺伝子部位については、*SATI* マーカーを3つ目の相同染色体部位と置換した (図 1E)。

#### 【その他の遺伝子の解析】

サイクリン依存性プロテインキナーゼ *CDC28* の *MET3* プロモーター置換株を作製し、形態形成への影響を観察した。

蛋白質リン酸化関連遺伝子以外の遺伝子として、細胞壁成分  $\beta$  1, 6-グルカン生合成に関与する *CaBIG1* および脂肪酸の不飽和化に関与する *FAD2*

および *FAD3* の遺伝子を破壊し、解析を行った。

さらに、転写抑制因子 *Tup1p* と蛋白-蛋白相互作用する結合パートナーとして *Tcc1p* を同定し、遺伝子破壊株の観察や生化学的解析を行った。

#### (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の網羅的遺伝子破壊】

前年度までに、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。取得できなかった21遺伝子について、*MET3* プロモーター置換株を作製した。そのうち1遺伝子については株の構築ができなかった。作製した置換株をメチオニンとシステインを含んだ寒天培地上で培養すると、顕著に生育速度が落ちた株は2種類であった。

残りの19種類の遺伝子について、2つの相同染色体部位を *ARG4* と *hph200-URA3-hph200* マーカーでそれぞれ置換し、再度、遺伝子破壊を試みた。その結果、3種類の遺伝子について、遺伝子破壊に成功した。残りの16種類は、2種類のカセットの挿入は確認できたが、元の遺伝子(染色体)が残っており、破壊がうまくいっていない。これは、本来の遺伝子部位が3本存在していたか、もしくは、遺伝子破壊の過程で染色体の異数化が起り、新たに野生型の遺伝子座位が出現した可能性がある。3つ目の相同染色体部位の遺伝子を破壊するために、*SATI* マーカーを用いた。*SATI* マーカーは *Nouseothricin* 耐性遺伝子をコードしている。3つ目のアレルを破壊することによって完全に遺伝子を破壊することができた遺伝子は7種類であった。最終的に、破壊するこ

とができなかった遺伝子は9種類であった。

#### 【CDC28 発現抑制による細胞伸長】

上記の方法を利用して、サイクリン依存性プロテインキナーゼ CDC28 の MET3 置換株を作製した。メチオニンとシステインの添加により、検出限界以下まで抑制されることを Cdc28p を認識する抗体を用いたウェスタン解析によって確認した (図 2A)。CDC28 の発現抑制によって、細胞の肥大および極端な伸長を観察でき (図 2B)、CDC28 が細胞の形態維持に必要であることが示唆された。そこで、形態維持に関与する様々な転写因子の発現やリン酸化を調べるために、MET3 置換株において各転写因子の C 末端に HA タグを付加した株を作製した。その結果、CDC28 の発現を抑制すると、Efg1p, Nrg1p, Rbf1p, Rim101p, Fkh2p および Tec1p の発現が顕著に低下することが明らかとなり、これらの転写因子が細胞の肥大や極端な伸長にかかわること示唆された。

#### 【細胞壁構生合成に関わる CaBIG1 の機能解析】

細胞壁は、ヒトと真菌の大きな相違点であるため、かつてより抗真菌剤スクリーニングのいいターゲットとして研究されてきている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の BIG1 は、細胞壁の構成成分  $\beta$  1,6 グルカンの生合成に関与していると予想される遺伝子である。本研究では、*C. albicans* に存在している BIG1 の相同遺伝子 CaBIG1 を、上記の方法で遺伝子破壊することにより、病原性との関連性を調べた。CaBIG1、そして、細胞壁合成経路の抗真菌剤の標的分子としての可能性の有無を探った。結果として、遺伝子破壊により菌糸生育の遅れが観察でき (図 3A)、マウスへの病原性も顕著に低下した (図 3B)。病原性の低下の原因として、臓器への定着率の低下および、臓器内の菌糸への形態変換効率の低下が挙げられる。本研究のような動物実験により、 $\beta$  1,6 グルカン生合成経路は、真菌の生育および病原性発揮に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

#### 【脂肪酸不飽和化酵素 FAD2, FAD3 の解析】

脂肪酸は細胞膜の主たる構成要素で、微生物は脂肪酸不飽和化酵素 (FAD) を有し、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3) といった多価不飽和脂肪酸を産生する。真菌のほとんどは FAD を有するが *S. cerevisiae* 等一部例外もあり、ヒトも FAD を持たないことから、抗真菌剤スクリーニングの標的分子として有効である可能性が示唆されている。深在性真菌症の起因菌である *C. albicans* においては、酵母形から菌糸形への形態変化に伴い、不飽和脂肪酸が増加することが知られている。本研究では、これらの合成に関わる *C. albicans* の FAD 遺伝子 CaFAD2、CaFAD3 の同定、破壊を行った。表現型としては具体的に変化を見つけれられていないが、遺伝子破壊株の脂肪酸組成解析により、予想通り、特定の不飽和脂肪酸の合成が検出できなかった (図 4)。全身性カンジダ症マウスモデルを用いて病原性の検討を行ったが、親株との顕著な差は確認できなかった。

#### 【転写抑制因子 Tcc1p の解析】

*C. albicans* の Tup1p は酵母形から菌糸形への形態変換を抑制している転写因子であると考えられている。Tup1p と相互作用するタンパク質を新たに同定するために、タンデムアフィニティー精製を行った。具体的には Tup1p の C 末端に FLAG および 6xHis タグを付加した株を作製し、二段階のアフィニティーカラムによって精製を行った。相互作用するタンパク質を2種類同定し、1つは予想されていた Ssn6p であり、もう1つは機能未知のタンパクであった (図 5A)。この機能未知のタンパクを Tup1p-complex component=Tcc1p と命名した。TCCI 遺伝子を破壊すると、TUPI 遺伝子破壊株と同様、細胞の伸長が観察された (図 5B)。また、マウスへの病原性の低下が確認できた。

#### D. 考察

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。昨年度はプロテインキナーゼをコードする遺伝子について網羅的に破壊を試み、遺伝子破壊が出来なかったキナーゼ遺伝子は74種類のうち21種類であった。この21種類の遺伝子は生育に必須である可能性が高く、抗真菌剤の探索のための効果的な標的分子となり得る。今年度は、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 *MET3* 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した。*MET3* プロモーター置換株の解析の結果、21種類のうちの2種類の遺伝子が必須であると予想されたが、いずれも細胞周期に関与していることが推測されており、予想可能な結果であった。

21種類のうちの19種類について再度方法を変えて遺伝子破壊を行ったが、最終的に、9種類について破壊することができなかった。必須である可能性が高いが、なぜ、*MET3* プロモーター置換株では生育に影響を及ぼさなかったのだろうか？この理由として、*MET3* プロモーターは完全には抑制できない、という可能性がある。このプロモーターはこれまでの経験から、十分抑制は可能であるが、抑制してもわずかに発現が検出されることもある。このわずかな発現量だけでも機能することが可能であれば、*MET3* プロモーター置換株で発現を抑制しても、生育できることになる。したがって、この9種類のキナーゼ遺伝子については、必須である可能性は否定できない。

サイクリン依存性プロテインキナーゼ *CDC28* は、他の生物の解析から必須であると予想されていたので、本研究計画当初から *MET3* プロモーター置換株を作製し、解析を続けてきた。予想通り、*C. albicans* においても必須であり、しかも、本菌の特

徴である形態変換にも関与していることが明らかとなった。しかしながら、サイクリン依存性プロテインキナーゼはヒトの細胞においても必須なキナーゼであり、抗真菌剤の標的分子候補としては適切でないと考えられる。

今後の展開として、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。

また、今年度は、プロテインキナーゼ以外の遺伝子についても、抗真菌剤の標的分子としての可能性を探った。*CaBIG1* は *C. albicans* の形態維持および病原性に関与しているため、抗真菌剤の標的分子候補として十分可能性がある。しかしながら、*CaBig1p* 自体がどのような分子であるか、つまり、酵素なのか、アダプター蛋白なのか、その機能が未だに解明されていない。今後の詳細な解析に期待して、抗真菌剤のスクリーニング系を立ち上げることが必要である。

また、抗真菌剤の標的分子候補として、脂肪酸合成に焦点を当てた。不飽和脂肪酸の生合成遺伝子は、ヒトや病原性を持たない *S. cerevisiae* には存在していないので、格好の標的分子の候補である。しかしながら、遺伝子破壊による影響は、形態や病原性においてほとんどなく、抗真菌剤の標的分子としての可能性は断念した。

さらに、形態変換を抑制する転写因子 *Tup1p* と相互作用するタンパク質 *Tcc1p* を同定した。この遺伝子を破壊すると、細胞の伸長が促進され、マウスへの病原性が低下する。新規な転写因子であり、出芽 *S. cerevisiae* や他の生物には相同遺伝子が確認できないため、基礎生物学への貢献度は非常に高く、抗真菌剤の新しい標的分子として可能性を秘めている。しかしながら、転写因子自体をスクリーニングの標的分子にするのは困難であるため、周辺のシグ

ナル伝達経路を解析し、スクリーニング系を構築する必要があると考えられる。

#### 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。遺伝子破壊が成功しなかった、必須であると考えられる遺伝子についてプロモーター置換株を作製し、生育に必須であるかどうかを確認した。必須であると確認できた遺伝子について、今後、新しい抗真菌剤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

A. Kaneko, T. Umeyama, Y. Utena-Abe, S. Yamagoe, M. Niimi and Y. Uehara. Tcc1p, a novel protein containing the tetratricopeptide repeat motif, interacts with Tup1p to regulate morphological transition and virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 5, 1894-905, 2006

T. Umeyama, A. Kaneko, M. Niimi and Y. Uehara. Repression of *CDC28* reduces the expression of the morphology-related transcription factors, Efg1p, Nrg1p, Rbf1p, Rim101p, Fkh2p and Tec1p and induces cell

elongation in *Candida albicans*. *Yeast*, 23, 537-552, 2006

S. Y. Murayama, Y. Negishi, T. Umeyama, A. Kaneko, T. Oura, M. Niimi, K. Ubukata and S. Kajiwara. Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology*, 152, 1551-1558, 2006

T. Umeyama, A. Kaneko, H. Watanabe, A. Hirai, Y. Uehara, M. Niimi and M. Azuma. Deletion of the *CaBIG1* gene reduces beta-1,6-glucan synthesis, filamentation, adhesion, and virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun*, 74, 2373-2381, 2006

##### 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 遺伝子破壊株の構築

(A) 親株、(B) *hph200-URA3-hph200/ARG4* による破壊、(C) *AUA/ARG4* による破壊、(D) *MET3* プロモーター置換株、(E) 3つ目の相同染色体部位の *SAT1* マーカーによる破壊

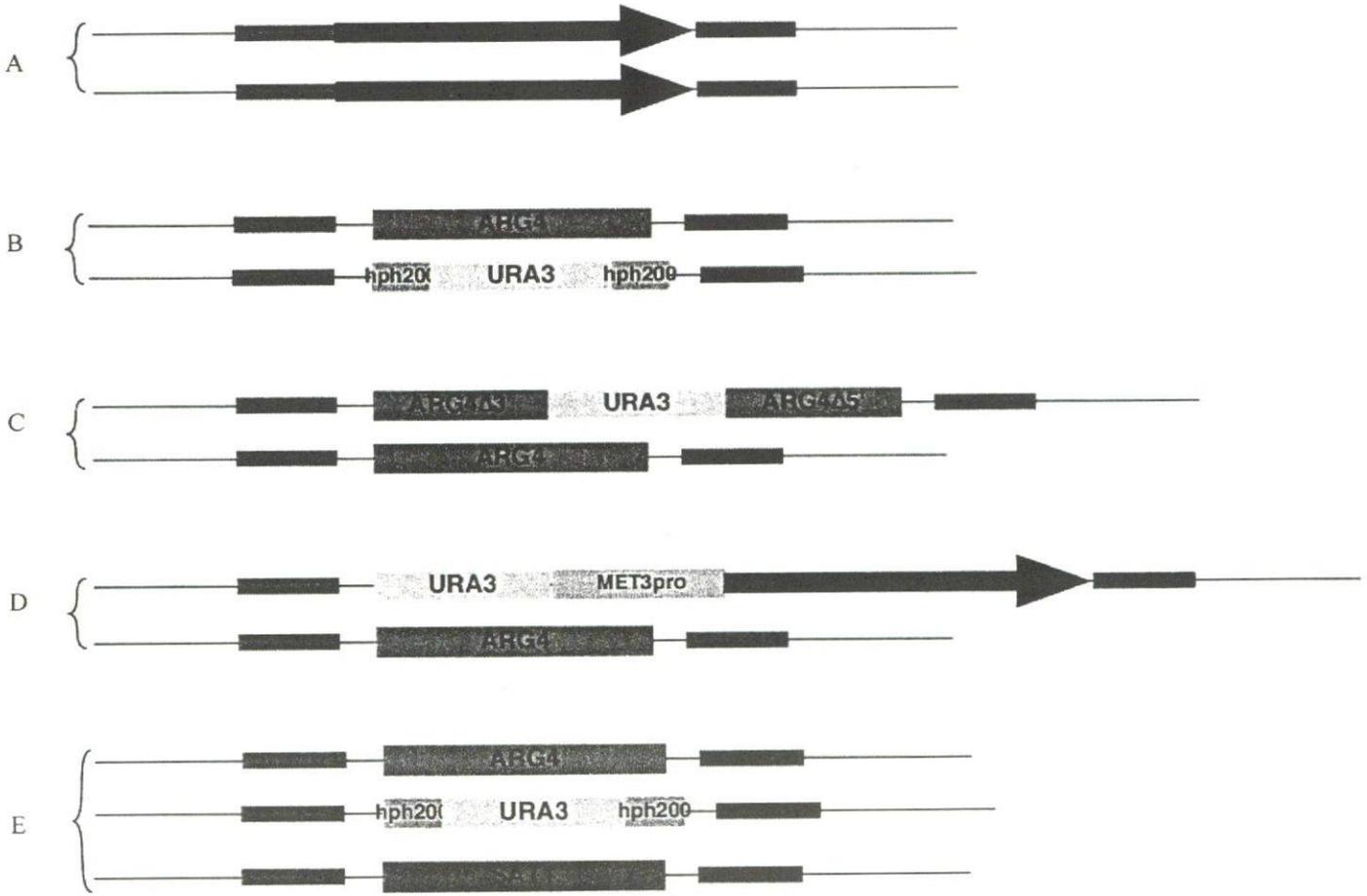


図2 *CDC28* の発現抑制の影響

(A) *MET3* プロモーター抑制による *CDC28* の発現抑制の確認 (レーン4および8)

(B) *CDC28* 発現抑制による細胞の伸長 (パネル4および8)

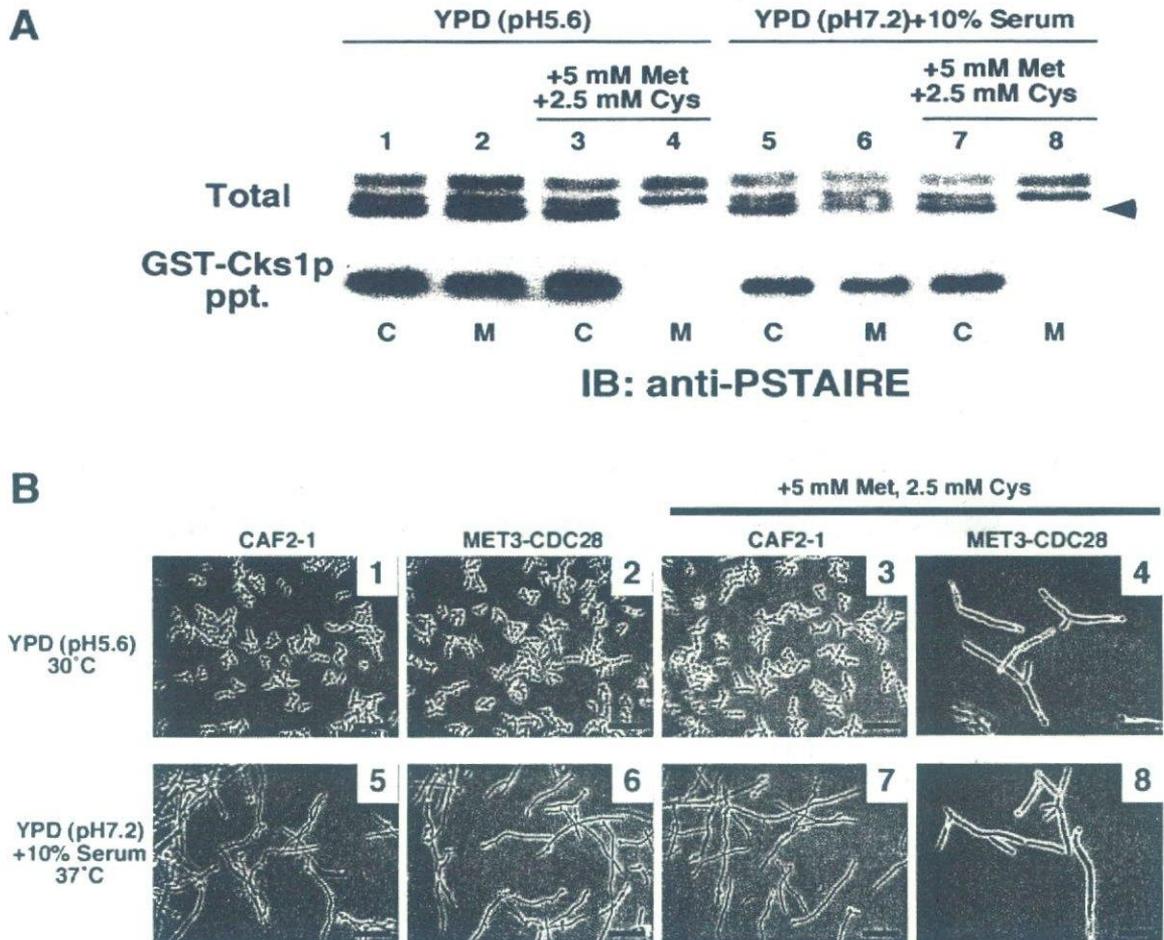


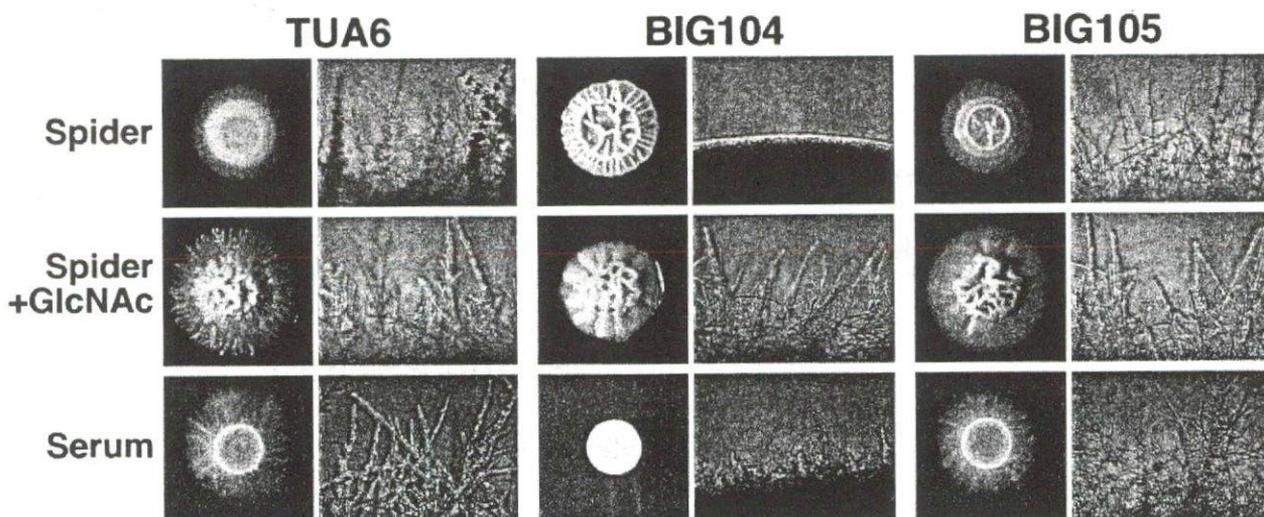
図3 *CaBIG1* の遺伝子破壊株の表現型

(A) 寒天培地上の形態

(B) マウスの病原性への影響

TUA6 は親株、BIG104 が遺伝子破壊株、BIG105 が相補株を示す。

**A**



**B**

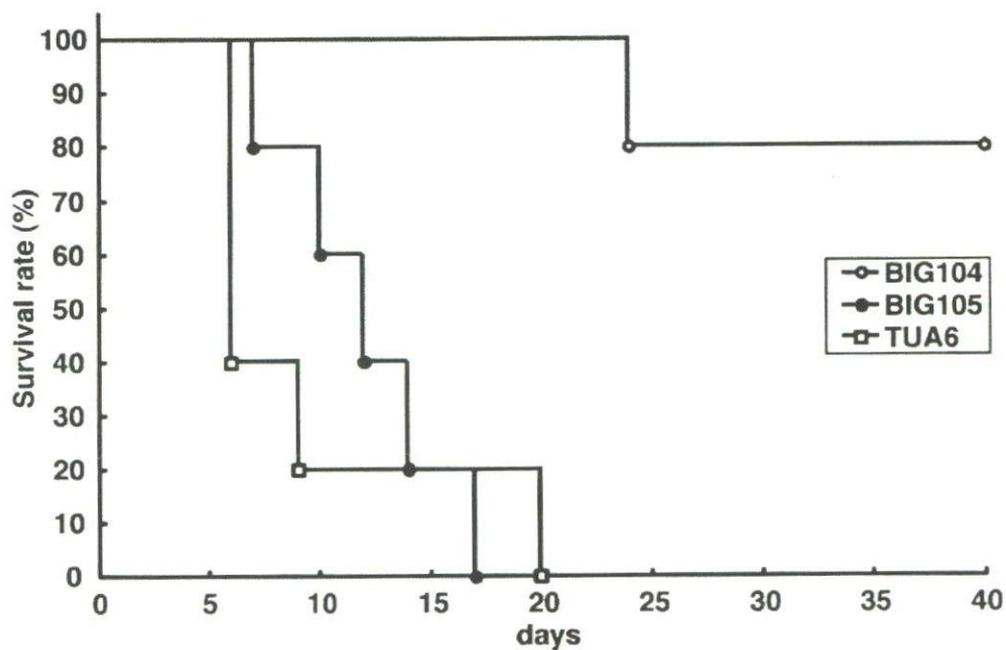


図4 *FAD2*, *FAD3* 遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化。遺伝子破壊により不飽和脂肪酸のピークが消失する。

(a) 親株、(b) *FAD2* 遺伝子破壊株、(c) *FAD3* 遺伝子破壊株

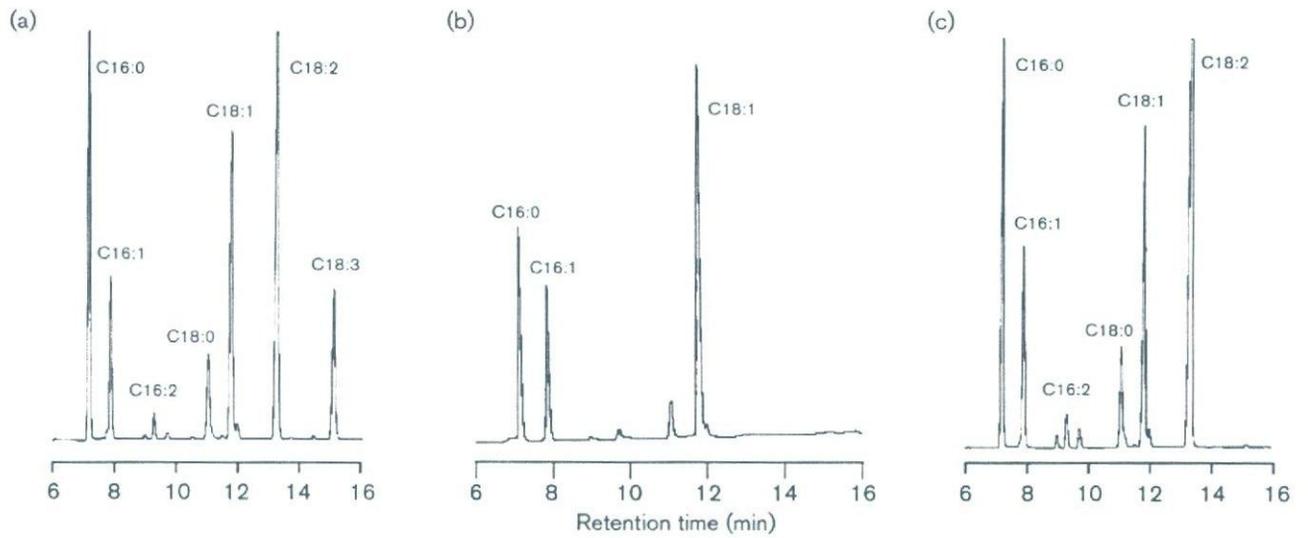
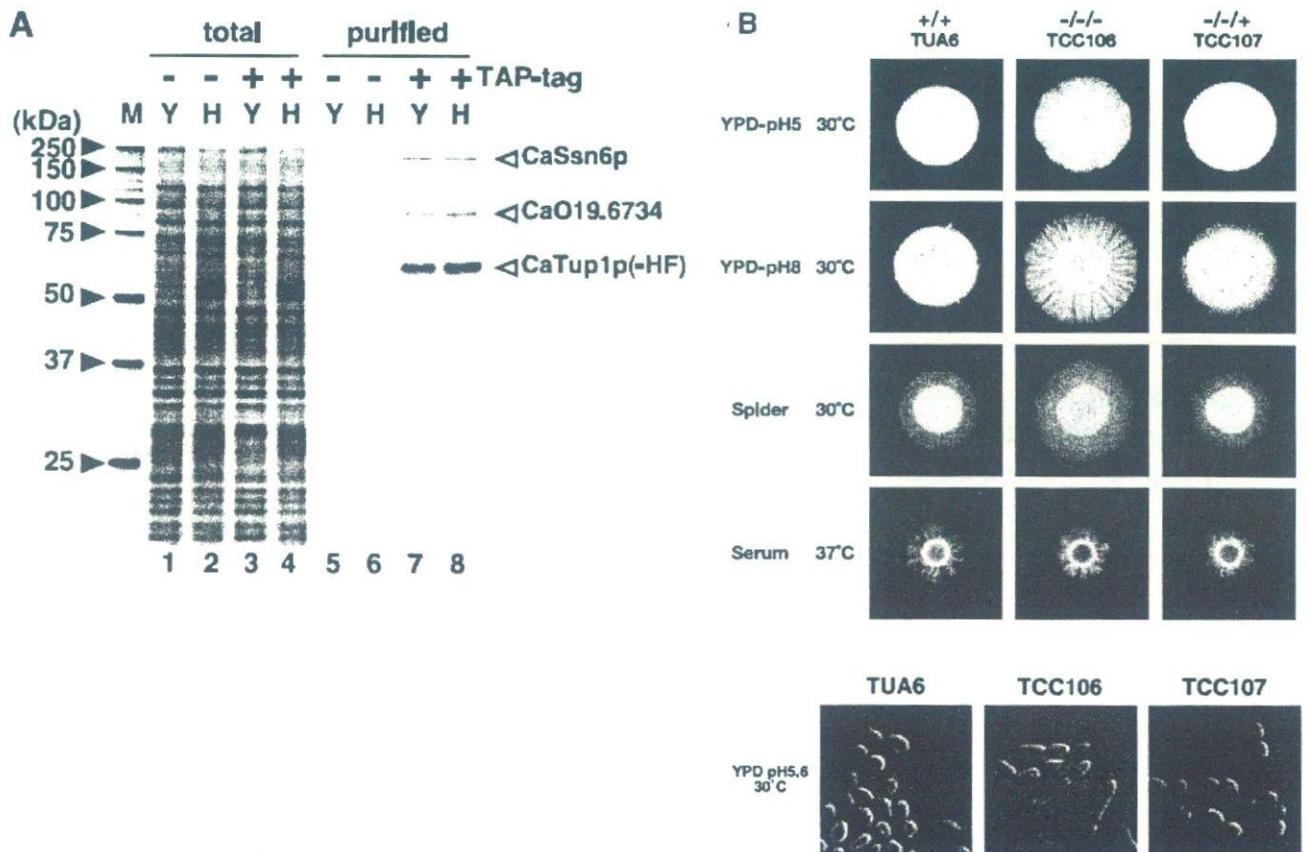


図5 *Tcc1p* の同定および遺伝子破壊

(A) *Tup1p* と結合する蛋白として *Tcc1p* (*CaO19.6734*) を同定

(B) *TCCI* 遺伝子破壊による寒天培地 (上) および液体培地 (下) の形態



---

平成18年度

政策創薬総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成19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