

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Fc γ 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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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、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. 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。

【平成16年度】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遺伝子破壊株の作製を試みた。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。

【平成17年度】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。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、形態分化への影響を調べた。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。

【平成18年度】17年度に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。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。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、平成16年度で用いた方法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、*SAT1* マーカーを3つ目の相同染色体部位と置換した。

2. その他の遺伝子の解析

以下の抗真菌スクリーニング標的分子候補について、遺伝子破壊株もしくは *MET3* プロモーター置換株を作製し、遺伝子の機能解析を行った。

- 形態形成制御の関与する *HSL1* キナーゼ
- プロテインフォスファターゼ *YVH1*
- サイクリン依存性プロテインキナーゼ *CDC28*
- 細胞壁合成に関与する *CaBIG1*
- 脂肪酸の不飽和化に関与する *FAD2* および *FAD3*
- 転写抑制因子 *Tup1p* の結合パートナー *Tcc1p*

3. 蛋白質複合体精製のための分子生物学ツールの開発

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。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。構築した株の細胞抽出液より、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。得られた画分の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。

(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

1. 網羅的遺伝子破壊

【平成16年度】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。

【平成17年度】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。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。

【平成18年度】プロテインキナーゼ93種類のうち、平成17年度までに取得できなかった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、*ARG4*、*hph200-URA3-hph200*、*SAT1* 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、10種類の遺伝子について、遺伝子破壊に成功した。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。

2. その他の遺伝子の遺伝子破壊による解析

【プロテインキナーゼ *HSL1* の遺伝子破壊株の解析】

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。*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。

【プロテインフォスファターゼ *YVH1* の解析】

プロテインフォスファターゼの一つ、*YVH1* について遺伝子破壊を行い、詳細に解析を行った。*YVH1* 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。

【*CDC28* 発現抑制による細胞伸長】

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。*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、*CDC28* が細胞の形態維持に必要であることが示唆された。

【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 β 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。*C. albicans* の相同遺伝子 *CaBIG1*

を、遺伝子破壊することにより、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。遺伝子破壊により菌糸生育の遅れが観察でき、マウスへの病原性も顕著に低下した。つまり、 β 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。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。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。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。この機能未知のタンパクを *Tup1p-complex component=Tcc1p* と命名した。*TCC1* 遺伝子を破壊すると、*TUP1* 遺伝子破壊株と同様、細胞の伸長が観察された。また、マウスへの病原性の低下が確認できた。

3. 蛋白質複合体精製のための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。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。

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。平成16,17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。平成18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。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。

網羅的遺伝破壊で行った以外の遺伝子について遺伝子破壊等の解析を行った。以下に、各遺伝子について、抗真菌剤スクリーニングの標的分子としての適性について論ずる。

サイクリン依存性プロテインキナーゼ*CDC28*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。*HSL1*キナーゼや*YVH1*フォスファターゼは、必須遺伝子ではないため、スクリーニングの標的分子としては適当でない。

*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、その機能が未だに解明されていない。そのため、スクリーニング系を立ち上げるのが困難である。

不飽和脂肪酸の生合成遺伝子*FAD2*および*FAD3*は、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低い。

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。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や分子生物学的手法を開発し、様々な遺伝子の同定や遺伝子破壊株の作製を行った。*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

T. Umeyama, A. Kaneko, Y. Nagai, N. Hanaoka, K. Tanabe, Y. Takano, M. Niimi, Y. Uehara. *Candida albicans* protein kinase CaHsl1p regulates cell elongation and virulence. *Mol Microbiol.* 2005, 55(2):381-95.

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

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 *YVH1* controls growth, filamentation and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* 151: 2223-2232.

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

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 *CaYVH1* 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、実用新案登録、その他
なし

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