

なっている。そこでエキス単品には抗真菌活性はないが、アゾール薬と相乗作用を有するエキスも見出した。相乗効果の機序は不明であるが、これもシードの一つとして次年度以降に耕造決定を行う。

本年度は *Histoplasma* につづき *Penicillium marneffeii* の非培養定量系を構築した。臨床検体を用いての検討は行っていないが、検出感度が  $10^1$  copy であることからその有用性が期待できる。種内多様性の解析には rRNA 遺伝子中の IGS 領域が有用であることは、*Histoplasma* をはじめとして多くの病原真菌で証明されてきた。今回得られたデータを元に解析を進めていく予定である。

#### E. 結論

子囊菌および担子菌の両方に抗真菌活性を有するエキスを見出した。また、臨床応用可能なマルネツフィー型ペニシリウム症起因菌の非培養系定量検出法開発した。今後多くの菌株を用いて検討することにより、本法の有用性を明らかにする必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表 (原著)

1. Golubev W, **Sugita T**, Golubev N: Ustilaginomycetous yeast, *Pseudozyma graminicola* sp. nov., isolated from the leaves of pasture plants. *Mycoscience*, **48**, 29-33, 2007

2. Mekha N, **Sugita T**, Ikeda R, Nishikawa A, Poonwan N.: Real-time PCR assay to detect DNA in sera for the diagnosis of deep-seated trichosporonosis. *Microbiol. Immunol.* **51**:633-5, 2007

3. Takahata Y, **Sugita T**, Hiruma M, Muto K.: Quantitative analysis of *Malassezia* in the scale of patients with psoriasis using a real-time PCR assay. *Br. J. Dermatol.* **157**: 670-3, 2007.

4. Amaya M, Tajima M, Okubo Y, **Sugita T**, Nishikawa A, Tsuboi R: Molecular analysis of *Malassezia* microflora in the lesional skin of psoriasis patients. *J. Dermatol. Sci.* **34**:619-24, 2007

5. Kato H, **Sugita T**, Ishibashi Y, Nishikawa A.: Evaluation of the levels of specific IgE against *Cryptococcus diffluens* and *Cryptococcus liquefaciens* in patients with atopic dermatitis *Microbiol Immunol.* **51**:945-50, 2007

6. Nakajima M, **Sugita T**, Mikami Y. Granuloma associated with *Trichosporon asahii* infection in the lung: Unusual pathological findings and PCR detection of Trichosporon DNA. *Med Mycol.* 2007 Sep 18;:1-4 [Epub ahead of print]

7. Takahata Y, **Sugita T**, Kato H, Nishikawa A, Hiruma M, Muto M.: Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br. J. Dermatol.* **157**: 1178-1182, 2007.

8. Prillinger H, Lopandic K, Sugita T, Wuczkowski M: *Asterotremella* gen.nov., an anamorphic tremelloid yeast isolated from the agarics *Asterophora lycoperdoides* and *Asterophora parasitica* J.Gen.Appl.Microbiol.,53, 167-175, 2007
9. Kajikazawa T, **Sugita T**, Nishikawa A: Comprehensive Identification of Bacteria in Processed Fresh Edible Sea Urchin Using 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis: The Products Contain Various Food Poisoning-related Bacteria and Opportunistic Bacterial Pathogens J. Health Sci. 56: 756-759, 2007
10. Kajikazawa T, **Sugita T**, Nishikawa A, Nakajima F, Ohyama M, Shoji N, Kosaka M, Wada Y.: Microbiological investigation of fresh edible raw sea urchin and its expiration J. Health Sci. 56: 397-400, 2007
11. Ağırbaşı H, Bilgen H, Özcan K, Otlu B, Sinik G, Çerikçioğlu N, Durmaz R, Can E, Yalman N, Gedikoğlu G, **Sugita T**: Two Possible Cases of Trichosporon Infections in Bone Marrow Transplanted Children: The First Case of *T. japonicum* Isolated From Clinical Specimens Jpn. J. Infect. Dis. In press

H. 知的財産権の出願特許状況  
なし

图1a

### 抗真菌效果 (289C)

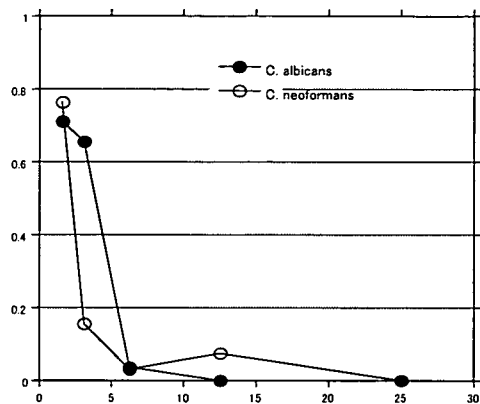


图1b

### 抗真菌效果 (169E, 169C)

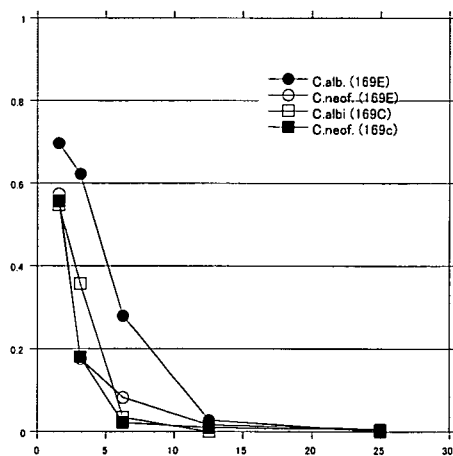


图1c

## 抗真菌效果 (171E, 171C)

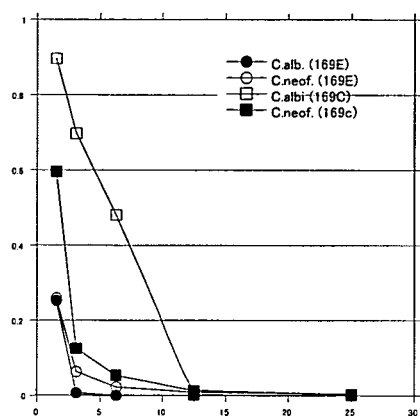


图1d

## 抗真菌效果 (201E, 201C)

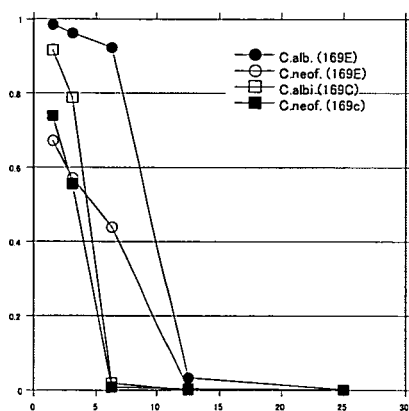


図2

## 抗真菌効果-相乗効果 (158C)

アゾール耐性 *C. albicans*

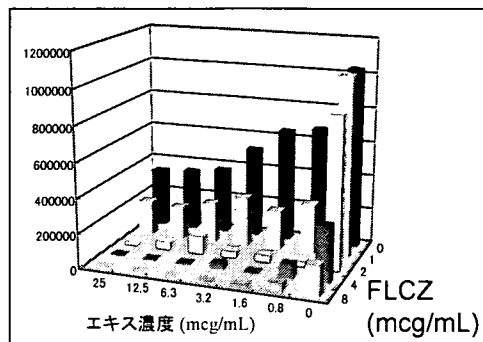
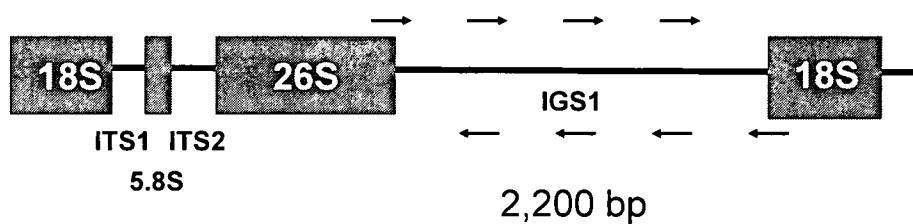


図3

## *Penicillium marneffeii*の定量化と多様性



CBS由来	20株
タイ患者由来	30株



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

分担研究報告書

病原真菌の細胞壁マンナンに対する宿主の認識・応答

分担研究者 大川原 明子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨：病原性真菌 *C. albicans* の最表層を構成する N 結合型糖鎖は、アスパラギン側鎖のアミド基の窒素原子に結合している。これらはすべて共通のコア構造を持っているが、コア構造から伸びた末端構造部分の糖鎖は、株によってさまざまな構造をしている。本研究は *C. albicans* マンノース転移酵素をコードしていると考えられる遺伝子を網羅的に破壊し、変異株の mannoprotein (MP) を解析することにより、炎症惹起に関与する MP の構造を明かにすることを目的とする。ゲノム情報から、46 種類のマンノース転移酵素が MP 分画に影響すると予想された。現在 9 種類のマンノース転移酵素を破壊した株を作製し、その菌糸形成など基本的な性格について検討を行った。一方、それらの株から MP を精製し、抗体を用いて表面の抗原性を解析すると共に炎症の指標として単球系培養細胞 (J774A.1 cell line) による IL-6 と TNF- $\alpha$  の産生誘導能について基礎検討を行った。

#### A. 研究目的

遺伝子破壊株の作製、発現解析によって、*C. albicans* のゲノム上にコードされている糖付加酵素と予想される遺伝子のうち、 $\beta$ -1,2-マンノースを付加する糖転移酵素を同定する。また、遺伝子破壊株の解析により、細胞表層における  $\beta$ -1,2-マンノース付加の生体防御反応における重要性を明確にする。遺伝子改変により樹立した *C. albicans* の遺伝子変異株の生菌、死菌あるいは培養液より調整した水溶性の mannoprotein (MP) を使い、マウスマクロファージ、マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) を活性化し、生体防御反応の違いについて比較、検討を行うことによって、細胞表層の構造変化と初期の免疫応答の因果関係を明らかにする。

## B. 研究方法

### 1. 遺伝子破壊株の作製

Uridine と Arginine 要求性の TUA4 (Ura3 $\Delta$ 、Arg4 $\Delta$ ) を用い遺伝子破壊を図1のように2段階で行った。破壊する遺伝子の翻訳領域の上流 200-300bp とハイグロマイシン遺伝子の一部 hph200 (約 200bp) と Ura3 遺伝子の一部を連結した DNA 断片 (合計約 2kbp) を PCR 法にて増幅した。同じように遺伝子翻訳領域の下流 200-300bp と hph200 と Ura3 の一部を連結した DNA 断片 (約 2kbp) を増幅し、両方の DNA 断片を混合後、TUA4 株に常法にて DNA 導入した。遺伝子破壊株は Uridine 要求性を相補すると考えられるので Uridine を除いた最小培地を用い候補の株を選択し、PCR 法にて一方のアリルの遺伝子コーディング領域を相同組み換えにより欠失した株を同定した。残りの一方のアリルも同様に遺伝子破壊を行った。破壊遺伝子の翻訳領域上流あるいは下流の 200-300bp と Arg4 遺伝子の一部を連結した DNA 断片を PCR 法にて増幅し、両 DNA 断片をすでに Ura3 遺伝子で一アリルを遺伝子破壊した株に導入した (図2)。Uridine と Arginine を除いた選択培地にて得られた遺伝子ホモ破壊株を PCR 法にて同定した。

### 2. 遺伝子破壊株の解析

YPD 培地で  $1 \times 10^4$  cells/ml になるよう菌液を調整し、30 $^{\circ}$ C、70rpm で培養し倍化時間を算出した。また、菌糸形成能は 10 %血清入り寒天培地に植菌

して 37 $^{\circ}$ C で培養し、一週間後に形成された菌糸を観察した。

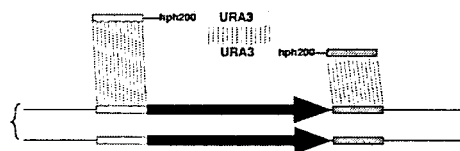


図1. Ura3 遺伝子による遺伝子破壊

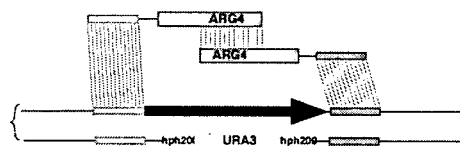


図2. Arg4 遺伝子による遺伝子破壊

### 3. MP 精製

YPD 培地で 30 $^{\circ}$ C、200 rpm で一晩前培養した菌を 48 時間本培養した。培養液を遠心して菌体を集めた、生理食塩水等で洗った後、20 mM の citrate buffer を加え、125 $^{\circ}$ C で 90 分オートクレーブし MP を抽出した。抽出液に 3 倍量のメタノールを加えて一晩攪拌して遠心し、その沈殿に水を加えて溶解した。水に対して透析を行い、遠心エバポレーターで乾燥した。

### 4. MP 表面構造の解析

血清因子 (ヤトロン製; 抗 $\beta$ -1,2マンナンラビットポリクローナル抗体) を用いてマンナン表面構造の解析を行った。精製した MP を ELISA プレートにコーティングし、翌日 ELISA アッセイを行った。



### 5. MP によるマウスマクロファージ活性化の検討

親株 (TUA-4) およびりん酸基を介したマンナンを欠失した MNN4 の 2 株を用いて基礎検討を行った。1x10<sup>6</sup> cells/ml の J774A.1 細胞 360  $\mu$ l を 48-well 組織培養用プレートにまき、18 時間後に培地交換し、10 ng/ml の GM-CSF 共存下、MP で刺激した。24 時間培養後に培養上清をとり IL-6, TNF- $\alpha$  両サイトカインを定量した。

### C. 研究結果

#### 1. 遺伝子破壊株の作製

現在までに 9 種類の遺伝子破壊株を作製した (表-1)。

#### 2. 遺伝子破壊株の解析

対数増殖期の倍加時間は親株の TUA-4 で 1.2 時間であり、各破壊株ともだいたい同じであった。一方、10% 血清固形培地中における菌糸形成能にも差を認めなかった (表-1)。

#### 3. MP 表面構造の解析

それぞれの破壊株から精製した MP は親株と同様にいずれも血清因子 5, 6 に反応したことから表面に  $\beta$ -1, 2 結合型のマンノースが存在すると考えられた (表-1)。

#### 4. MP によるマウスマクロファージ活性化の検討

親株 TUA-4、りん酸基を介したマンナンを欠失した MNN4 いずれも 10 ng/ml の GM-CSF 共存下、IL-6, TNF- $\alpha$  両サ

イトカインの産生能を認めた (図-3)。

表-1. 破壊株の性質

1) TUA4 由来		菌		MP
破壊遺伝子	クロールン	倍化時間 (hr)	菌糸形成	Factor5/6
3803	1	1.1	+	+/+
	2	1.2	+	+/+
6692	1	1.2	+	+/+
	2	1	+	+/+
4874	1	1	+	+/+
	2	1.1	+	+/+
1010	1	1.1	+	+/+
	2	1	+	+/+
6696	1	1.2	+	+/+
	2	1.1	+	+/+
1995	1	1.2	+	+/+
	2	1.1	+	+/+
TUA-4 (親株)		1.2	+	+/+

2) MNN4 由来		菌		MP
破壊遺伝子	クロールン	倍加時間 (hr)	菌糸形成	Factor5/6
6692	1	1.2	+	+/+
	2	1.1	+	+/+
	3	1.2	+	+/+
	4	1.2	+	+/+
3803	1	1.1	+	+/+
	2	1.2	+	+/+
	3	1.4	+	+/+
	4	1.1	+	+/+
	5	1.2	+	+/+
5572	1	1.1	+	+/+
	2	1.1	+	+/+
	3	1	+	+/+
MNN4 (元株)		1.1	+	+/+

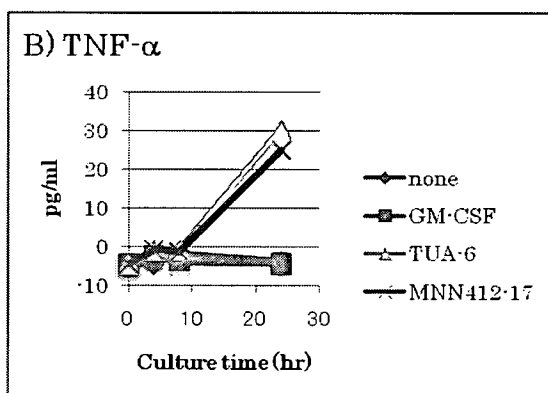
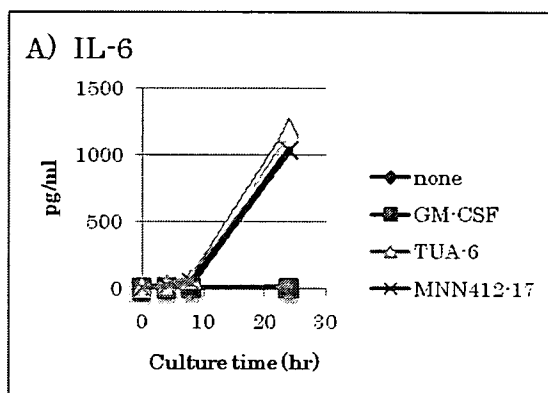


図-3. MPによるサイトカイン産生

#### D. 考察

現在までに9種類の遺伝子破壊株を調整した。因子血清のアッセイから、得られた株はいずれも表層を構成するMPはβ-1,2型でマンノースがつながっていると考えられた。また、MP刺激によって炎症性サイトカイン産生が誘導される可能性が示されたことから、得られた破壊株について検討を行う予定である。

#### E. 結論

現在までに9種類の遺伝子破壊株を作製した。遺伝子破壊株の基本的な性質

について詳細の検討を行う。また、炎症性サイトカイン産生の誘導能について順次検討を行う。並行して残りの破壊株の作製を行っていく。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Akiko Ishida-Okawara, Noriko Nagi-Miura, Toshiaki Oharaseki, Kei Takahashi, Akinori Okumura, Hitoshi Tachikawa, Shin-ichiro Kashiwamura, Haruki Okamura, Naohito Ohno, Hidechika Okada, Peter. A. Ward, Kazuo Suzuki Neutrophil Activation and Arteritis Induced by *C. albicans* Water-soluble Mannoprotein-β-glucan Complex (CAWS) Experimental Molecular Pathology, 82, 220-6, 2007

##### 2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

分担研究報告書

抗真菌剤耐性機構の解明と排出ポンプ阻害剤の探索

分担研究者・上原至雅 岩手医科大学 教授

主任研究者・新見昌一 国立感染症研究所 室長

研究要旨：病原真菌の多剤耐性に関わる排出ポンプを高発現した出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて海洋微生物由来の化合物および培養ろ液をスクリーニングし、真菌の ABC トランスポーターを阻害する新規物質を見出した。Cyclodepsipeptide の unnarmicin A および unnarmicin C が sub-MIC 濃度のフルコナゾール存在下で ScPdr5p, CaCdr1p, CgCdr1p および CgPdh1p 過剰発現耐性株の発育を強く阻止した。しかし Cdr2p または CaMdr1p 高発現株の発育は阻止しなかった。Unnarmicin A および unnarmicin C は CaCdr1p 過剰発現株のローダミン排出に対する阻害活性を有し、IC50 はそれぞれ 3.61  $\mu\text{M}$  および 5.65  $\mu\text{M}$  であった。また CaCdr1p の ATPase 活性も阻害し、IC50 はそれぞれ 0.495  $\mu\text{M}$  および 0.688  $\mu\text{M}$  であった。さらに重要な点として両阻害剤はフルコナゾール耐性 *Candida albicans* 臨床分離株に対しても感受性化効果を示した。以上のことから unnarmicin A および unnarmicin C は抗真菌薬療法の併用剤としての可能性を有した排出ポンプ阻害剤であることが分かった。

#### A. 研究目的

カンジダ症やアスペルギルス症などの深在性真菌症が確実に増加している。これらの真菌症は、エイズ、悪性腫瘍、血液疾患などの基礎疾患を持つ患者や臓器・骨髄移植を受けた患者に多発しており、医療の先進・高度化ならびに人口の高齢化に伴う日和見感染症として、今後もさらに増加するこ

とが危惧されている。真菌症を克服するための新薬の開発が待たれているが、病原真菌と宿主であるヒトの間には共通した遺伝子や生体分子が多いため、選択毒性の高い薬剤が得られ難い。既存の抗真菌薬の中では、アゾール系抗真菌剤が最も広く使われ、ヒトに対する副作用が少なく、良好な血中濃度が得られるため新薬開発の中

心をなしてきた。特にフルコナゾールは、エイズ患者の口腔咽頭カンジダ症の予防・治療に用いられてきたが、本薬に対して耐性の *Candida albicans* 臨床分離株が頻繁に分離されるようになった。これを契機に *C. albicans* のアゾール剤に対する耐性機構の解明が進み、真菌細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの過剰発現がアゾール耐性の主な原因であることが明らかになった。

そこで真菌の薬剤排出ポンプの働きを止めてアゾール剤の菌体内濃度を保つことにより、薬剤本来の抗菌力を発揮する方法を考えた。これは既存の抗真菌剤を生かすことにもなり、新規の抗真菌物質の探索と並行して、耐性菌問題を克服するための手段として欠かせないと考えられる。本研究においては病原真菌の薬剤排出ポンプを高発現した出芽酵母発現系を用いて真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索を行った。

## B. 研究方法

海洋バイオテクノロジー研究所より分与された海洋微生物由来の 80 化合物および 8640 培養ろ液を実験に供した。排出ポンプ阻害剤スクリーニングの評価系およびポンプ機能の解析としては、*C. albicans* の主要な排出ポンプ遺伝子 *CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*C.*

*glabrata* の *CgCDR1* および *CgPDH 1*、*S. cerevisiae* の *ScPDR5* をそれぞれ *S. cerevisiae* AD 株に導入した排出ポンプ高発現株を用いた。*S. cerevisiae* AD 株はあらかじめ7種の内在性ポンプが破壊されているのでアゾール剤に高度感受性であり、この株に外来性の排出ポンプ遺伝子を導入・発現することによりポンプ固有の排出機能を反映したアゾール剤耐性株が得られている。さらにアゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株 2 株を用いた。

海洋微生物由来の化合物および培養ろ液による菌の感受性化は *in vivo* および *in vitro* assay によってしらべた。*In vivo* assay においては、sub-MIC 濃度のフルコナゾールを含む寒天培地で菌を培養し、感受性ディスク法を用いて阻止円の大きさを判定し、またマイクロプレートを用いたマイクロ希釈チェッカーボード法でしらべた。さらにローダミン 6G の排出活性阻害効果を測定した。一方、*In vitro* assay はアゾール耐性菌から細胞膜を調整し、排出ポンプ (*Cdr1p*、*Cdr2p*) の ATPase 活性に対する阻害効果を測定した。

## C. 研究結果

### 1) 海菌 ABC トランスポーターの特異的阻害剤のスクリーニング

unnarmicin A および unnarmicin C は元々抗細菌活性を示す化合物として

分離されたもので、4個のアミノ酸と異なる長さの3-hydroxy fatty acidからなる cyclodepsipeptides である(Fig. 1)。Sub-MIC 濃度のフルコナゾール存在下で感受生ディスク試験を行うと、両化合物はいずれもアゾール剤耐性 *S. cerevisiae* AD/CaCDR1 株の発育を阻害し、ディスク周辺に大きな阻止円を生じた。この阻害活性は AD/CaCDR1 に特異的であり、AD/CaCDR2 および AD/CaMDR1 に対して感受性化は認められなかった (Fig. 2)。unnarmicin A および unnarmicin C の AD/CaCDR1 に対する効果は既知の排出ポンプ阻害剤 FK506 の阻害効果に匹敵するものであった。unnarmicin A および unnarmicin C はそれぞれ単独ではいずれのポンプ発現株に対しても増殖阻止効果はなかった。unnarmicin A および unnarmicin C の広範囲の真菌排出ポンプ阻害活性の有無をしらべるために、*C. glabrata* の CgCdr1p および CgPdh1p、*S. cerevisiae* の ScPdr5p 過剰発現耐性株、さらにフルコナゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株に対する阻害効果を検討した。その結果、*C. glabrata* の ABC トランスポーターである CgCdr1p、CgPdh1p 発現株は発育が強く阻害された。その阻害効果は FK506 のそれに相当した。同様に ScPdr5p 発現株もフルコナゾール共存下で増殖が阻害された。臨床から分離された *C. albicans*

2株は *CDR1* および *CDR2* を過剰発現しているフルコナゾールおよびケトコナゾールに耐性の株であるが、unnarmicin A および unnarmicin C はこれらの臨床分離株に対しても同様に感受性化し、特に CaAD 株に対して顕著であった (Fig. 2)。

## 2) *C. albicans* 排出ポンプ発現株の感受性化

次に unnarmicin A および unnarmicin C の相乗効果を評価するためにアゾール剤耐性 *S. cerevisiae* CDR1 発現株の感受性化をマイクロプレート上でマイクロ希釈チェッカーボード法によってしらべた。プレートの縦横にそれぞれフルコナゾールと unnarmicin A (または C) の希釈系列をつくり、各濃度の組み合わせにおける AD/CaCDR1 発現株の増殖の程度を測定した。AD/CaCDR1 発現株に対するフルコナゾール単独の MIC は 320  $\mu\text{g/ml}$  であったが、10  $\mu\text{M}$  unnarmicin A または 1.25  $\mu\text{M}$  unnarmicin C が共存するとフルコナゾールの MIC は 5  $\mu\text{g/ml}$  に低下した。しかし、AD/CaCDR2 および AD/CaMDR1 に対しては unnarmicin A および unnarmicin C はフルコナゾールの MIC は低下しなかった。AD/CaCDR1 発現株の発育阻止に対するフルコナゾールと FK506, unnarmicin A および unnarmicin C のそれぞれの FIC Index は 0.266、0.141、0.031 であり、unnarmicin A および unnarmicin C 両剤の強い相乗効果が示

された。またフルコナゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株の発育阻止に対するフルコナゾールと FK506, unnarmicin A および unnarmicin C のそれぞれの FIC Index も相乗効果を示した。

### 3) CaCdr1p 発現株のローダミン 6G 排出および ATPase 活性に対する阻害効果

ABC タンパク質の薬剤排出活性は、蛍光基質であるローダミン 6G によって定量的に測定できる。CaCdr1p のローダミン 6G 排出活性に及ぼす両剤の影響について検討した。AD/CaCDR1 株および AD/CaCDR2 株を 2-deoxy glucose 存在下で培養し、細胞内の ATP を枯渇させて ABC タンパク質が機能しない状態にして、ローダミン 6G を細胞内にとりこませた。その後、グルコース添加によって ATP 合成を回復させてローダミン 6G を排出させ、その排出量を測定した。その結果、CaCdr1p のローダミン排出活性は unnarmicin A および unnarmicin C のいずれによっても濃度依存的に阻害されたが (IC<sub>50</sub> はそれぞれ 3.61  $\mu$ M と 5.65  $\mu$ M)、CaCdr2p のローダミン 6G 排出活性は阻害されなかった (Fig. 3)。

### 4) ABC タンパク質は ATPase 加水分解エネルギーによって薬剤を排出する。unnarmicin A および unnarmicin C の CaCdr1p の ATPase

活性に及ぼす影響について検討した。AD/CaCDR1 株 および AD/CaCDR2 株より細胞膜画分を調製し、リン酸モリブデン法によって ATPase 活性を測定した。その結果、CaCdr1p の ATPase 活性は unnarmicin A および unnarmicin C のいずれによっても濃度依存的に阻害されたが (unnarmicin A および unnarmicin C による IC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.495  $\mu$ M と 0.688  $\mu$ M)、CaCdr2p の ATPase 活性はいずれによっても阻害されなかった (Fig. 4)。

## D. 考察

ABC トランスポーターが過剰に発現すると病原真菌は高度に多剤耐性を獲得する。臨床的に最も重要な多剤耐性を抑制する戦略の 1 つは真菌の ABC トランスポーターの特異的な阻害剤を探索することである。薬剤排出ポンプを阻害することにより、真菌細胞内の薬剤濃度が上昇し、菌の生育が抑制される。我々は一連の海洋微生物由来の化合物および培養ろ液をスクリーニングすることにより新しい阻害剤を見つけた。unnarmicin A および unnarmicin C は環状ペプチドで、臨床的に重要な真菌 ABC トランスポーター CaCdr1p および CgCdr1p を阻害することが明らかになった。

unnarmicin A および unnarmicin C は 4 個のアミノ酸と異なる長さの 3-hydroxy fatty acid からなる

cyclodepsipeptides である。チェッカーボードアッセイを行うと、unnarmicin A と比較して unnarmicin C の方が若干増殖阻害活性が強い。一方、寒天上の感受生ディスク試験では unnarmicin A の方がより菌を感受性化した。ローダミン 6G 排出阻害活性は両者でほぼ同じであった。これらの活性の微妙な相違はアルキル側鎖の違いによっていることが推測される。一方、薬剤輸送を駆動する CaCdr1p の ATPase 活性は unnarmicin A および unnarmicin C によって同程度に阻害された。このことは *in vitro* の ATPase アッセイでは阻害剤が標的タンパクに同程度の親和性を持つことを示している。しかし、IC50 値はローダミン 6G 排出阻害に必要な量の 1/10 量であった。これはローダミン 6G 排出阻害活性測定が *in vivo* 測定であるのに対して、*in vitro* の ATPase アッセイでは阻害剤が標的の細胞質側から直接阻害することが想像される。unnarmicin A および unnarmicin C 単独では真菌細胞に異害作用を示さないで、常在真菌には無害であると予想される。

CaCDR1 と CaCDR2 は非常に相同性の高いタンパク (84% identity, 92% similarity) であるにも関わらず、unnarmicin A および unnarmicin C はともに AD/CaCDR2 株に対してはフルコナゾール共存下で増殖阻害を示さなかった。CaCdr1p と CaCdr2p の間のアミノ酸配列の違いは分子全体に存在するが、主に膜貫通領域 (TMDs) に見られる。この違いが unnarmicin A お

よび unnarmicin C の阻害効果の違いを反映しているのかもしれない。また *in vitro* の ATPase アッセイは、全細胞を用いたローダミン 6G 排出阻害に必要な量の 1/10 量ですむこととも関連する。臨床分離株は CaCdr1p と CaCdr2p の両方を高発現しているにも関わらず、臨床分離株に対しても unnarmicin A および unnarmicin C の阻害効果を認めた。このことは実際のアゾール耐性臨床分離株では CaCdr2p よりも CaCdr1p の方が機能しているという我々の考えを指示するものである。この研究を通して、これらの阻害剤が真菌の ABC トランスポーターを特異的に阻害することにより、ABC トランスポーターの分子メカニズムの研究にも有用な新しいツールになるともいえる。

#### E. 結論

unnarmicin A および unnarmicin C は単独では菌の増殖を阻止しなかったが、フルコナゾールとの共存下で *CaCDR1*, *CgCDR1*, *CgCDR2*, *SCPDR5* 発現株に対して相乗効果を示し、低濃度のフルコナゾールでも耐性株の発育が強く阻止された。しかし *CaCDR2*, *CaMDR1* 発現株には無効であった。さらに両剤は排出ポンプの CaCdr 1p-ATPase およびローダミン 6G 排出を阻害した。以上の結果から、unnarmicin A および unnarmicin C は ABC 輸送体の阻害剤として極めて有望であることが明らかになった。

本研究は、田辺公一、高野幸枝（以上、国立感染症研究所）、Erwin Lamping (University of Otago, New Zealand)、足立恭子他 2 名（海洋バイオテクノロジー研究所）との共同研究として行われたものである。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 発表論文

Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1264-1272, 2007.

Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M and Uehara Y. Inhibition of fungal ABC

transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *BBRC*, 364, 990-995, 2007.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, and Monk BC. *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology*, 153, 3211-3217, 2007.

Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, and Cannon RD Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryotic Cell*, 6, 1150-1165, 2007.

新見昌一 真菌学総論 戸田細菌学  
改訂 33 版 南山堂 2007

H. 知的財産権の出願特許状況  
なし



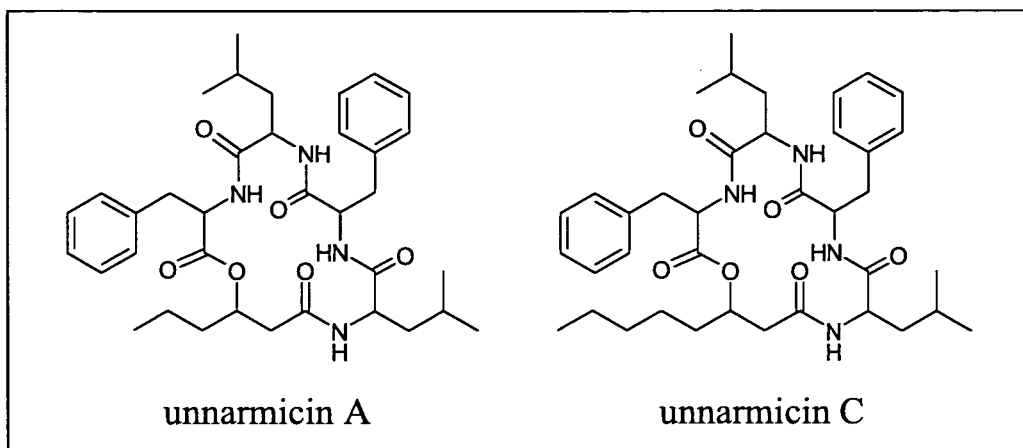


Fig. 1. Structures of unnarmicin A and unnarmicin C.

	FLC	FK506	unnarmicin A	unnarmicin C
AD/pABC3	0 (1)			
AD/CaCDR1	40 (320)			
AD/CaCDR2	20 (160)			
AD/CaMDR1	10 (40)			
<i>C. albicans</i> AD	20 (40)			
<i>C. albicans</i> B59630	40 (320)			
AD/CgCDR1	40 (320)			
AD/CgPDH1	5 (20)			
AD/ScPDR5	40 (320)			

Fig. 2. Chemosensitization of efflux pump expressing strains of *S. cerevisiae* and of fluconazole-resistant *C. albicans* clinical isolates to fluconazole with specific pump inhibitors.

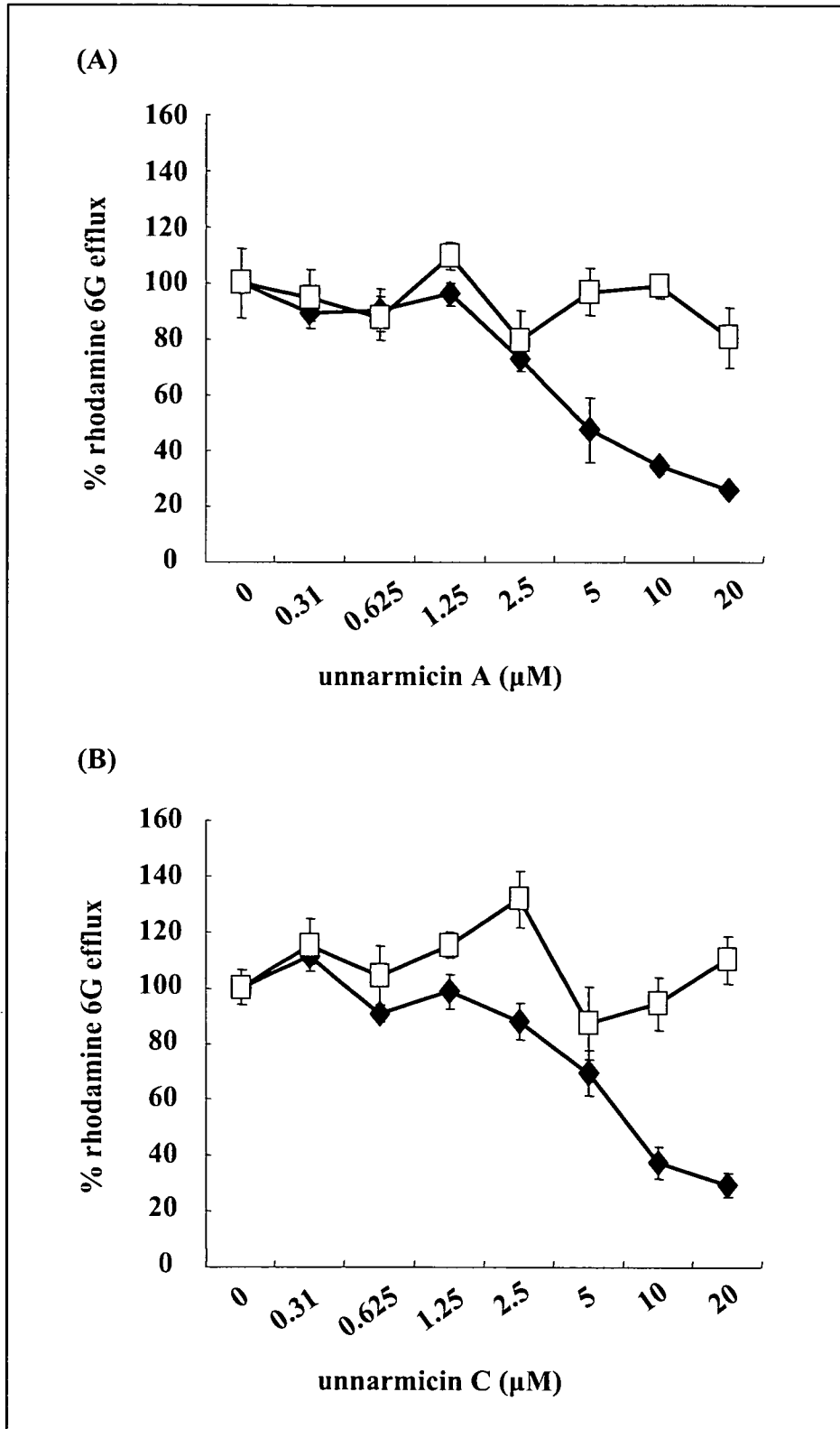


Fig. 3. Rhodamine 6G efflux assay of pump over-expressing strains.

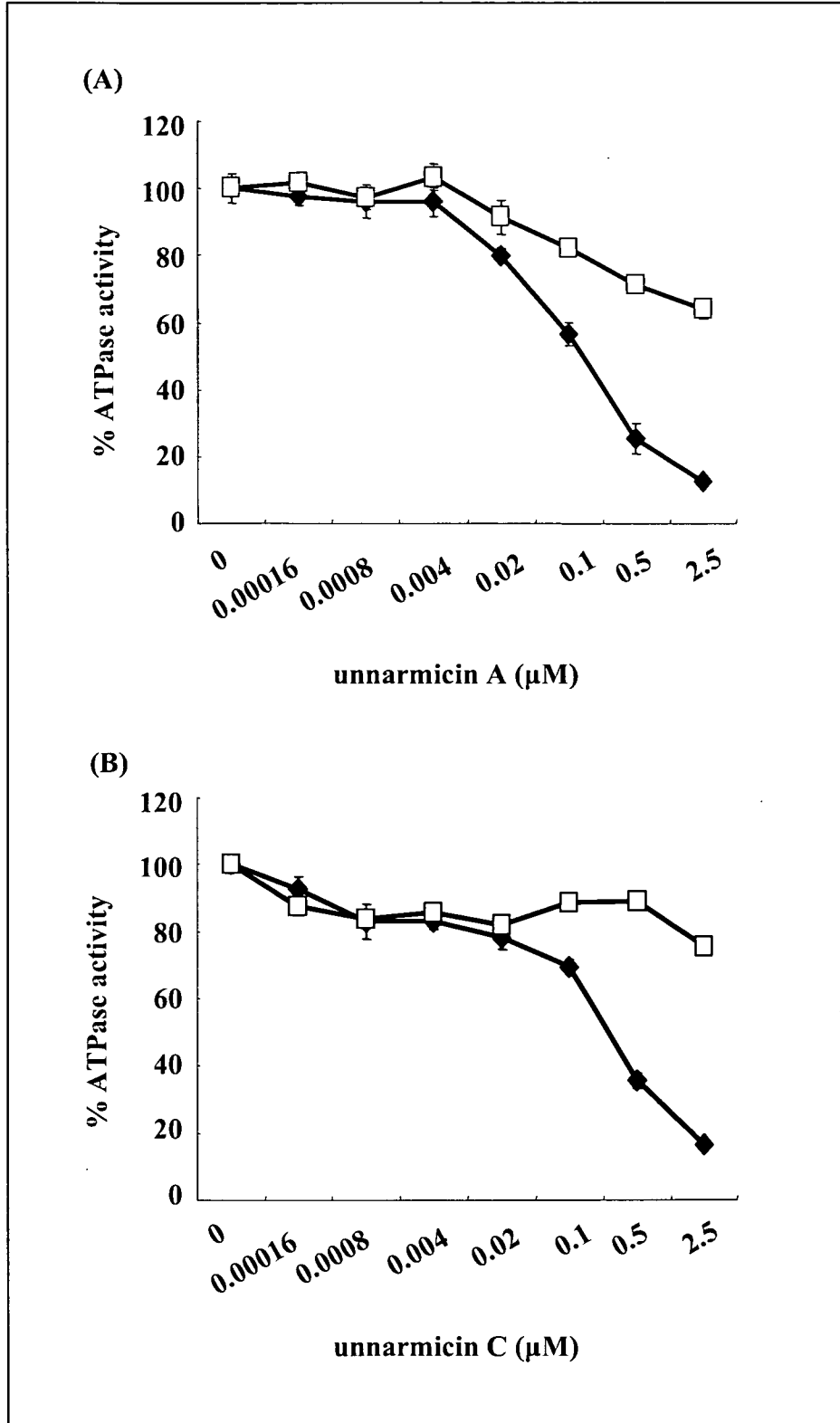


Fig. 4. ATPase assay of plasma membrane fractions isolated from pump expressing strains.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

分担研究報告書

輸入真菌症および日和見真菌症の迅速診断法の開発

分担研究者 宮崎義継

研究協力者 山越 智、岡部智也、大川原明子、新見昌一

わが国の深在性真菌症では、アスペルギルス症が頻度と重篤度において最重要の疾患である。ガラクトマンナン抗原が、比較的信頼性の高い検査として使用されているが、未だに課題の多い検査である。早期に強力な治療を可能にする、診断法の開発は急務であるため、アスペルギルス症の早期診断方法に関する研究を開始した。今年度は、*Aspergillus fumigatus* の細胞表面あるいは細胞外に存在する、診断標的となる可能性が高い分子の検索を行った。

#### A. 研究目的

侵襲性アスペルギルス症は、標準的な抗真菌化学療法による治療でも致死率が30%以上の極めて重篤な疾患である。現在、早期診断を目的として使用されているガラクトマンナン抗原は血液悪性疾患の患者では約80%の感度を有しているが、他の基礎疾患では特異度が低く非実用的である。また、予後を改善するために先制攻撃的治療が提案されているが、真菌の肺などへの定着をスクリーニングする指標は現在まで開発されていない。

今年度は、*Aspergillus fumigatus* による真菌症の診断標的として、使用可能な抗

原の検索を行った。診断標的として使用する場合、真菌細胞の細胞質外に局在することが検出に有利であると考え、細胞膜あるいは細胞外に分泌されるタンパク質を検索する方針とした。

シグナルシーケンストラップ（SST）法は、細胞膜あるいは細胞外へ分泌されるタンパク質を同定する手法として Tashiro らにより報告された (Tashiro et al. *Science*. 1993)。細胞内輸送に必用なシグナルペプチドを有するタンパク質を網羅的に検出することで、様々な状態にある真菌を検出可能と推察できる。酵母細胞などでも SST 法の応用可能性は示