

1 特許取得

該当なし

2 実用新案登録

該当なし

微生物変換によるリファンピシン類の新規リード化合物の創出と創薬への応用

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 星野 泰隆

研究要旨

rifampicin は、ヒトの薬物代謝関連酵素である P450 を誘導するため、HIV/AIDS と結核の複合感染症において抗 HIV 薬の作用を低下させてしまう。この問題を解決することを目的とし、rifampicin 類を微生物変換させ抗 HIV 薬と併用可能な新規化合物の創出を目指し、検討を行った。

A. 研究目的

今日においても結核は全世界で非常に患者数の多い疾病であり、年間で約 200 万人もの人々の命が失われている。また、現在では既存の抗結核薬が効かなくなった多剤耐性結核菌や HIV/TB の複合感染が非常に大きな問題となっており、WHO を中心として数多くの政策が取られている。このような状況の中で、日本における結核に対する治療薬は、isoniazid や rifampicin (RFP) などの 5 種類しか存在しない。また 1965 年の RFP の開発以降、新薬の投入はなされていなかったが、rifabutin (ファイザー社) が 2008 年の 7 月に本邦において結核および非結核性抗酸菌症の治療薬として承認された。このような現状から、結核に対する新薬の期待は全世界で高まっている状況である。

その上近年問題が激化した HIV/TB に関しては、新規結核患者 920 万人中 70 万人が HIV に感染しており、170 万人の結核死亡者のうち 20 万人は HIV に感染していたという結果 (Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008) が出ている。日本でも、結核患者数は 10 万人当たり 9.8 人 (2007 年) であり、1999 年当時 (34.6 人) と比較すると若干改善方向にあるといえる。しかし、これとは反対に、HIV/AIDS の新規患者数は、2004 年に年間 1000 人以上となり、今後も増加傾向にあるといえる。したがって、HIV/AIDS と結核の複合感染症が今後増加することは必至である。この HIV/TB の複合感染症の問題点としては、唯一殺菌的に作用する RFP が抗 HIV 薬と相互作用することにより併用しにくい薬剤であることである。原因

として RFP がヒトの薬物代謝関連酵素 P450 (CYP3A4 等) を強力に誘導し、抗 HIV 薬であるプロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬の血中濃度を著しく低下させ効果を減弱させてしまう点である。したがって、我々は、多剤耐性結核菌に有効あるいは、薬物代謝に係わる P450 (CYP3A4) の強い誘導を引き起こさない化合物の取得を目的として、新規抗結核薬の研究を目指す。

このような現状から、我々の行った *Nocardia farcinica* のゲノム解析において、*Rhodococcus equi* の RFP 耐性に関与していると報告されている monooxygenase と相同性のある遺伝子を見出した。本遺伝子は、FAD-binding のモチーフ有しており、補酵素として、フラビンを必要とすると推測される。今までに報告のない RFP の修飾酵素を見出し、新規な部位への酸素の付加が行われていることが判明している。本酵素によって変換された化合物に関しては、抗微生物活性を修飾後であっても活性を有しているため、本酵素を利用して rifamycin 系新規リード物質の探索研究を行い、新規化合物の創出を目指す。

このように HIV/TB の複合感染症に対して使用できるということに着目し、この状況に使用可能な化合物の候補を創出することによって、現段階では治療に困難が付きまとう HIV/TB 感染症に対して、貢献することができる。また、日本においても HIV 感染者は近年増加傾向にあり、今後問題がより明確化するであろう HIV/AIDS 感染者における感染症 (結核などを中心とした) に対して、予防および治療の分野において還元できる可能性を有している。

B. 研究方法

(1) rifampicin (RFP) の monooxygenase による RFP 変換物の薬物代謝酵素 P450 の誘導能の測定

RFP は、ヒト薬物代謝酵素である P450 を強力に誘導することが知られている。通常、酵素誘導試験には初代肝細胞を用いるが、ロット間によるばらつき等が懸念されるため、安定な形質を保ったヒト肝癌由来の細胞株 FLCs (Functional Liver Cells) の培養細胞系を用いた。培養した FLC-5 及び FLC-7 細胞に、RFP 変換物を任意の濃度で添加し、48 時間後に Total RNA を抽出した。陽性コントロールとして RFP、RFP と比較して P450 の誘導能の低い rifabutin を比較用化合物として、RFP 変換物と同様に試験を行った。得られた Total RNA を用いて、RT-PCR 法によってヒトの薬物代謝酵素である P450 種の誘導能を測定した。測定した P450 種としては、RFP により主に誘導される CYP3A4 の測定を行った。また、文献上 RFP 添加により誘導することが判明している CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 および CYP2C19 についても RNA の発現を測定した。コントロールとしては、GAPDH を利用した。

(2) Rifamycin SV 変換物に関して

RFP 変換反応と同様に、*Nocardia* の monooxygenase 遺伝子をクローニングした大腸菌の resting cell を用いた微生物変換反応を行った。Resting cell 変換反応後の変換反応液を各種クロマトグラフィーにて精製した。

(3) Rifabutin および rifapentine の monooxygenase による変換

1) 変換物の作成

昨年度の研究により構築された rifampicin monooxygenase 発現ベクターを用いて、微生物変換の手法である resting cell reaction を利用した。まず、大腸菌にて monooxygenase タンパク質を発現させ、次にリン酸緩衝液中にて monooxygenase を発現した大腸菌の resting cells を用いて、rifamycin SV, Rifabutin および rifapentine の変換反応を行った。

2) resting cell 変換物の解析

Resting cell 変換反応後の反応液を HPLC にて分析した。変換反応に供した化合物と反応後の化合物に関して、本酵素の RMY 系化合物の変換能を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、RFP の変換物を取得するために *N.*

farcinica 由来の monooxygenase を大腸菌に導入し、変換反応を行っている。この実験は“遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律”に該当するため、“国立感染症研究所 組換え DNA 実験実施規則”に従い、遺伝子組換え実験申請を行い、然るべき拡散防止措置を行使し研究を行った。

また、研究を進める上で各実験施設の責任者の管理、監督の下に実験を行った。必要に応じて安全主任者の助言や指導を受けた。

また、ヒト P450 誘導活性の測定に関しては、通常新鮮ヒト肝細胞を用いて試験を行うが、本研究ではヒト肝癌由来の細胞株 FLCs (Functional Liver Cells) を用いることにより、倫理面に関しては問題ない。

C. 研究結果

(1) RFP 変換物の薬物代謝酵素 P450 の誘導能に関して

FCL 細胞 (FCL-5 および FCL-7) を用いた P450 の誘導活性の試験において、FCL 細胞への被験物質 (RFP 変換物および rifabutin) の添加により、細胞形態の変化が引き起こされ、特に FCL-5 細胞への細胞毒性がかんさつされた。その結果、細胞から回収した Total RNA 量にも影響が出た。

CYP mRNA の発現を RT-PCR で検討した結果、

FCL-5、FCL-7 細胞共に無添加と 1%エタノールのブランクでの P450 mRNA の発現量は低く、FCL-7 の陰性コントロールでは、CYP2C9 と CYP2C19 の発現は認められなかった。RFP では、FCL-5 及び FCL-7 細胞共に濃度と CYP3A4 の mRNA の転写量とに相関が見られ、CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 の誘導が認められた。RFP 変換物では、CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 の誘導活性が認められた。しかし、CYP2B6 および CYP2C8 に関しては誘導が認められなかった。比較対照用として使用した RFP よりも P450 の誘導活性が弱いとされている rifabutin に関しては、RFP 変換物と同様の結果となった。

FCL-5 及び FCL-7 細胞共に今回の誘導条件では CYP1A2 の発現は確認出来なかった。

(2) Rifamycin SV の変換物に関して

昨年度の研究により、monooxygenase により rifamycinSV が、変換されることが判明している。

本年度は、数 10mg 程度精製することを目的に検討を行った。RFP の変換方法と同様に *N. farcinica* 由来の monooxygenase を導入した大腸菌を用いた resting cell 反応により rifamycinSV を変換させた。次に変換反応液を、

遠心にて菌体を取り除き、反応液を COSMOSIL 75C₁₈-OPEN のカラムクロマトグラフィー（溶媒、H₂O：メタノール=1:0, 9:1, 7:3, 1:1, 2:3, 3:7, 0:1）に供した。変換物は、3:7 画分に溶出した。次に、溶出画分を Sephadex LH-20 のカラムクロマトグラフィー（溶媒：メタノール）に供し精製を行った。最終的に約 50mg の rifamycinSV 変換物を得た。

得られた rifamycinSV 変換物は、rifamycinSV よりも極性が増大し、クロロホルムに可溶であったものが難溶解性に変化していた。また、rifamycinSV は水に難溶解性であるが、rifamycinSV 変換物では可溶化した。色に関しては、オレンジ色から赤紫色に変化している。UV スペクトルに関しては、特徴的なものとして、UV440nm の吸収が UV400nm 付近にシフトしていることが判明した。さらに、質料分析の結果から、rifamycinSV と比較して分子量が 16 増加していることが確認された。これは、RFP 変換物の結果と同様の結果となった。したがって、本化合物は酸素原子が導入された化合物であると推測された。

また、rifamycinSV 変換物の抗微生物活性は、RifamycinSV よりも低下していることが、判明した。

(3) Rifabutin および rifapentine の monooxygenase による変換

RFP および rifamycinSV と同様の方法を用いて、変換反応を試みた。試料としては、本邦で結核症および抗酸菌症治療薬として平成 20 年 7 月に承認された rifabutin と rifapentine の二種類の rifamycin 系抗生物質を用いた。大腸菌を用いた変換反応後の反応液を、HPLC を用いて分析した。結果、rifabutin および rifapentine に関して、各々いくつかの変換物に変換されていることが判明した。また、この二種類の化合物の変換試料の抗微生物活性を調べたところ、大腸菌に対して活性が低下していることが判明した。

D. 考察

抗結核薬 RFP の問題点としては、現在 HIV/TB 複合感染症において使用しにくいという点である。唯一結核菌に対して殺菌的に作用する RFP がヒトの薬剤代謝酵素 (P450) を強力に誘導し、抗 HIV であるプロテアーゼ阻害薬や非核酸系逆転写酵素阻害薬の血中濃度を著しく低下させ、効果を失わせてしまう。したがって、本研究では、rifamycin 系抗生物質の monooxygenase による変換を利用して、P450 (CYP3A4 等) の強い誘導を引き起こさない化合物の取得を目的としている。

昨年度の研究結果より、単利精製した RFP 変換物は新規化合物であることが判明しているものであるが、この RFP 変換物のヒト薬物代謝酵素 P450 の誘導能の確認を行った。

結果、CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 の誘導活性が認められた。RFP および RFP より P450 の誘導能の弱い rifabutin と同様の誘導パターンを示し、RFP より誘導能は低いと推測された。この結果に関しては、定量リアルタイム PCR 等を用いて確認する必要がある。本化合物は、P450 の誘導能を有しているため、その点を改善しうる化合物の取得が今後の課題であろう。また、ナフタレン骨格の 4 位のカルボニルや 2' N-OH に対しての修飾等も有効な手立てではないだろうか。

rifamycinSV 変換物は、分子量が rifamycinSV と比較して分子量が 16 増加しており、RFP 変換物と同様に酸素原子が導入された化合物であると推測された。UV スペクトルにおいて、Rifamycin の S-form と SV-form を比較した場合 UV440nm から UV390nm にシフトすることが判明している。rifamycinSV 変換物では、UV440nm の吸収が UV400nm 付近にシフトしており、ナフタレン骨格の 1 位もしくは 4 位の水酸基がキノンになっている可能性が推測された。化合物の色の変化に関しても、これを支持する結果となっている。

また本酵素は、rifamycinSV (ピペラジン骨格を有していない) でも変換反応が起こることから、本酵素の直接的な反応部位ではない可能性が否定できない。同様に、rifabutin や rifapentine も同様である。したがって、アミドの窒素原子もしくは、ナフタレン骨格に作用する可能性もある。以上のことから、種々の rifamycin 系化合物の変換が可能であり新規薬剤候補が見つかる可能性を秘めている。また、本酵素の作用機序に関しては興味を持たれる。

E. 結論

N. farcinica の monooxygenase を用いた RFP 変換物におけるヒト薬剤代謝酵素である P450 の誘導活性の測定を行った。結果、CYP3A4, CYP2C9 および CYP2C19 の誘導活性が認められた。これらに関しては、RFP の誘導活性より弱く、rifabutin と同等であると推測された。また、RFP 変換化合物および rifabutin 添加系列に置いて、細胞毒性が確認されてことから、検討が必要である。

また、rifamycin 系抗生物質を用いた変換反応を行った結果、rifamycinSV において変換物を取得することができた。rifabutin および rifapentine では、変換反応が進むことが確認された。

以上のことから、RFP 変換物は rifabutin と同程度の P450 の誘導能を有しており、リード化合物候補としての可能性を有している。しかし 1/1000 になった抗菌活性の増強が今後の課題である。また、いくつかの rifamycin 系抗生物質の変換物も見いだしたことから、更なる研究により、本研究の目的である抗 HIV 薬と併用可能な薬剤の新規リード化合物を見いだすことにより、予防および治療の分野に対して還元できるものである。

F. 研究発表

1 論文発表

無し

2 学会発表

(1) 藤井匠子, 千葉和宏, 石野敬子, 星野泰隆, 佐藤浩之, 石川 淳

病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミノ配糖体リン酸化酵素遺伝子の同定

第 23 回日本放線菌学会大会 (山梨) 2007 年 7 月

(2) Hoshino, Y., Chiba, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Ishino, K. and Ishikawa, J.

Identification of two gene clusters for nocobactin biosynthesis in *Nocardia farcinica*.

UK-Japan Workshop on Genomics of Antibiotic-producing Actinomycetes: Implications and Applications, Tokyo

10 月 30 日-11 月 1 日

(3) 石川 淳, 黒田誠, 関塚剛史, 星野泰隆, 三上 襄

次世代シーケンサーによる *Nocardia terpenica* のゲノム解析の試み

第 3 回日本ゲノム微生物学会

(4) 石野敬子, 千葉和宏, 星野泰隆, 石川 淳
病原性放線菌ノカルジアのシデロフォア合成遺伝子の細胞障害性への関与

第 82 回日本細菌学会総会 (京都) 2009 年 3 月

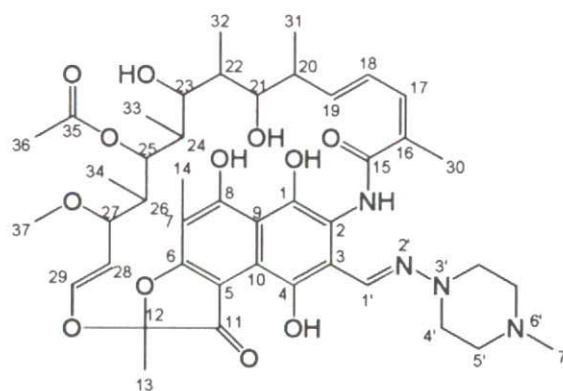
G. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

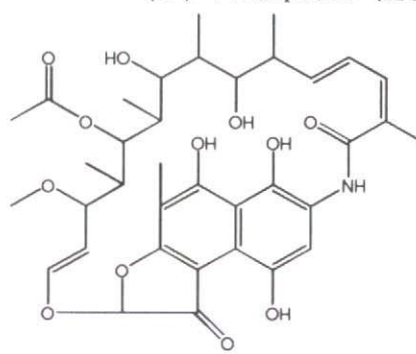
該当なし

2 実用新案登録

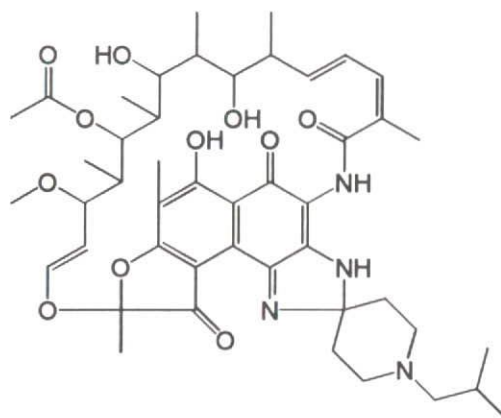
該当なし



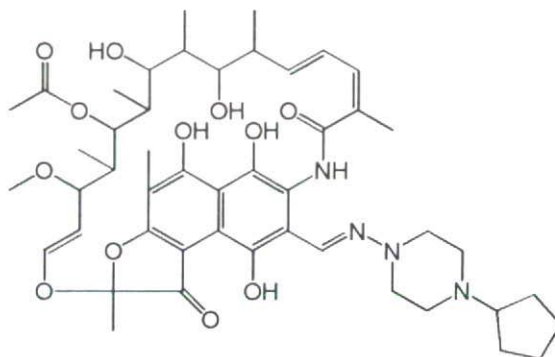
(1) rifampicin (RFP)



(2) rifamycinSV



(3) rifabutin



(4) rifapentine

図 1 rifamycin 系抗生物質の化学構造

CYP1A2: sense 5' -GGCAACCTCATCCCACAG- 3'
 antisense 5' -TCAGGCCGGAAGTCAGAG -3'
 CYP2B6: sense 5' - CTTTCTGAGTTCCGAGAGA- 3'
 antisense 5' - CAGATGATGTTGGCGTAAT- 3'
 CYP2C8: sense 5' - AGATCAGAATTTTCTACCC- 3'
 antisense 5' -AACTTCGTGTAAGAGCAACA - 3'
 CYP2C9: sense 5' -GCTCCCTGCAATGTGAT - 3'
 antisense 5' - CGTTTTCTGCTGAGAA- 3'
 CYP2C19: sense 5' -GCTTTTATACTATCAAAGCAGGTATAAGTCTAGGAAATG- 3'
 antisense 5' -AACTAGTCAATGAATCACAATACGCAAGCAGTCAC - 3'
 CYP3A4: sense 5' -GTGTGGGCTTTTATGAT- 3'
 antisense 5' - TGAGGAATGGAAAGACTG- 3'
 GAPDH: sense 5' -TTTGGTCGTATTGGGCGCTGGTCACCAGGG- 3'
 antisense 5' -ACCTGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTGGTGG- 3'

図2 RT-PCR に用いた primer

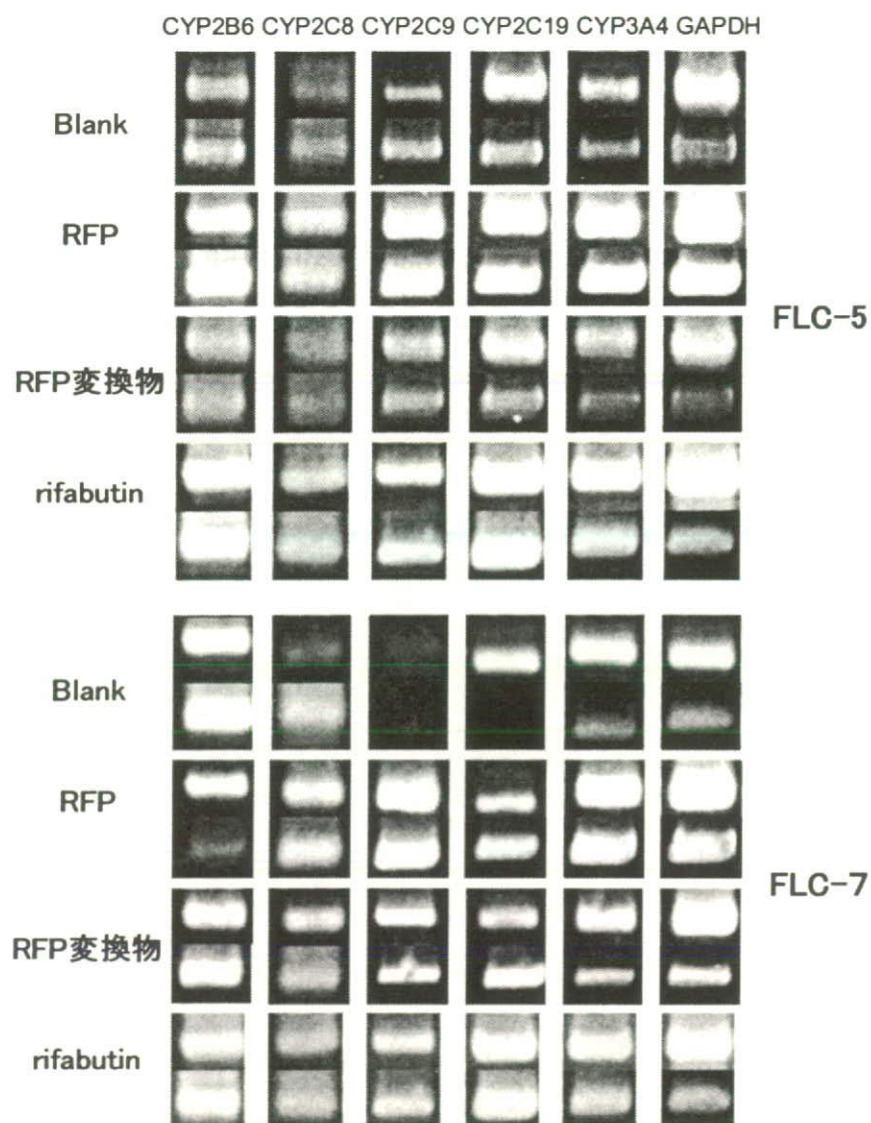


図3 RT-PCR による P450 の発現誘導の検出
 (各薬剤の濃度: 10 μ M)

病原真菌の薬剤排出ABCトランスポーターの基質特異性決定メカニズムの解明

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究者 田辺 公一

研究期間 平成19年4月～平成21年3月

研究要旨 病原真菌のABCタンパク質は、抗真菌薬に対する薬剤耐性化の主要な原因となっている。病原真菌ABCタンパク質とその変異タンパク質を出芽酵母で発現させて、生化学的解析を行うことで基質特異性決定の分子メカニズムを明らかにする。

A. 研究目的

本研究においては、病原真菌 (*Candida* を中心として) の多剤耐性に関わる ATP binding cassette (ABC) タンパク質の生化学的、酵素化学的性質を明らかにすることを目的とする。そのために、様々な病原真菌からABCタンパク質遺伝子を単離し、出芽酵母において大量発現させて機能解析を行う。

①多剤耐性化した *Candida albicans* においてはABCタンパク質である Cdr1p と Cdr2p の発現量が亢進していることが多い。Cdr1p と Cdr2p はアミノ酸配列において高い相同性を有するが、排出する薬剤や阻害剤に対する応答が異なる。これらの二つのタンパク質のドメインを交換したキメラタンパク質を作製し、機能解析を行うことで、基質認識に関わるドメインを同定し、薬剤結合部位を決定する。

②病原真菌 *C. albicans* のABCタンパク質CaCdr1pを大量発現している出芽酵母株において、阻害剤と基質の組み合わせによるストレスを与え、機能復帰変異株の単離を行う。この実験手法を用いて、CaCdr1pの基質輸送や阻害剤との相互作用に重要なアミノ酸を網羅的に同定し、基質または阻害剤となる薬剤の構造との相関を明らかにする。

B. 研究方法

① *Candida albicans* の Cdr1p と CaCdr2p は nucleotide binding domain (NBD) と

transmembrane domain (TMD) が2回繰り返される二次構造をとると考えられている。

推定される二次構造から、NBDとTMDの間でペプチド鎖を4分割し、Cdr1pとCdr2pでドメインを互いに交換する。具体的には、まず各ドメインをコードするcDNA領域をPCRによって増幅する。続いて互いにオーバーラップした部分を用いて最も外側に位置するプライマーによるPCRで、全ての断片を連結させる。

このようにして作製した遺伝子カセットをAD-1-8u株に導入し発現させて、薬剤感受性試験および酵素化学的解析を行う。

②病原性真菌 *C. albicans* のABCタンパク質であるCaCdr1pを大量発現する出芽酵母 (AD/CaCDR1) を、基質である fluconazole と阻害剤である FK506 を含む寒天培地上で培養すると、FK506非感受性化株が出現する。非感受性化株の *CaCDR1* 遺伝子をPCRによって増幅し、親株 (AD1-8u株; 以後AD株) に導入し、遺伝子導入株がFK506に対して非感受性になるかどうかを調べる。遺伝子導入株が再びFK506非感受性であれば、*CaCDR1* のORFのシーケンスを確認する。このようにして得られた変異タンパク質発現株の他の阻害剤に対する応答を調べる。また、変異タンパク質の輸送基質特異性がどのように変化するのかを明らかにする。

(倫理面への配慮)

当研究においては、病原真菌と薬剤との相互作用

に焦点をあてて研究を行っているために、現段階で動物実験を行う予定はない。また、病原真菌の薬剤排出ポンプ遺伝子を出芽酵母において発現させて機能解析を行っているために、実験材料を P1 レベルで取り扱うことができる。環境への拡散も遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律にのっとり、十分に配慮して研究を行っている。

C. 研究結果

① *Candida albicans* の Cdr1p と Cdr2p の各ドメインを交換したキメラタンパク質を AD1-8u 株において大量発現させて機能解析を行った。まず、TMD を互いに置き換えたコンストラクトについて調べた。以後、キメラコンストラクトについては N 末端から C 末端に向かって並ぶドメインの順番にしたがって 1212 (それぞれ NBD1 が Cdr1、TMD1 が Cdr2、NBD2 が Cdr1、TMD2 が Cdr2) のように記述する。抗真菌薬や抗癌剤を含む 27 種類の化合物に対する薬剤感受性試験の結果、それぞれ 2121 は Cdr1p と、1212 は Cdr2p と同様の薬剤耐性を示したことから、TMD によって基質特異性は決定されている、言い換えれば NBD は Cdr1p または Cdr2p であってもタンパク質は機能すると考えられた。さらに、一方の TMD のみを置き換えたコンストラクト 1211、1112、2122、2221 についても薬剤感受性試験を行った結果、特に TMD1 の置換が薬剤耐性度により強く影響しており、したがって基質特異性の決定に大きく貢献しているものと考えられた。

② AD/CaCDR1 を基質である fluconazole と阻害剤である FK506 を含む寒天培地上で培養し、FK506 非感受性化株を 50 株以上単離した。そのうち 44 株の *CaCDR1* 遺伝子を PCR によって増幅し、AD 株に導入したところ、ほぼ全ての遺伝子導入株は FK506 に対して非感受性であった。したがって、最初のスクリーニングで単離された変異株は *CaCDR1* 遺伝子上の変異が原因で FK506 非感受性化していたと考えられた。また、非感受性化株の *CaCDR1* 遺伝子の ORF の塩基配列を決

定したところ、大半の変異株の ORF 上には 1 箇所で 1 アミノ酸置換を引き起こすような変異が認められた。

同定された遺伝子変異は、細胞外に露出すると推測されるループ部分に集中しており、これまでに報告のあった FK506 非感受性化変異と一致するものはなかった。

さらに、単離した遺伝子変異株についてペーパークロマトによる薬剤感受性試験を行い、fluconazole を含む主要な抗真菌薬に対する耐性には、大きな変化がないことを明らかにした。また、FK506 とは構造の異なる阻害剤 beauvericin、enniatin を用いた感受性化試験を行った結果、本研究で同定した変異 CaCdr1p 発現株は FK506 に対する感受性が低下していたが、他の阻害剤に対する感受性は保持していた。

D. 考察

① *C. albicans* の Cdr1p と Cdr2p は多剤耐性化の主要な原因となる薬剤排出ポンプとして精力的に研究が進められてきた。近年プロモーター領域の同定、転写調節因子の解析が進み、様々な環境ストレスに応答して CDR1 と CDR2 の発現が亢進することが明らかになってきた。したがって、病原真菌の薬剤耐性化はさけることのできない事象であり、耐性化した菌の効果的な駆逐法が必要となっている。Cdr1p や Cdr2p の基質認識機構を明らかにすることは効果的な薬剤の探索やポンプ機能を抑制する特異的阻害剤の開発にも大きく役立つものと期待される。本研究では、Cdr1p および Cdr2p の N 末端側の TMD の配列が基質特異性の決定に大きく貢献していることと、阻害剤 FK506 の応答に N 末端側と C 末端側の双方の TMD が必要であることを明らかにした。このような結果は、二つの TMD が協調的に機能して基質および阻害剤特異性を決定することを示唆している。

② 本研究において単離したほぼ全ての FK506 非感受性変異株の *CaCDR1* 遺伝子上に、遺伝子変異が認められた。おそらく、fluconazole の標的分

子である Erg11p の過剰発現株や ERG11 遺伝子に変異を持ったものも同時に発生していた可能性は高いが、それらの株は本実験で用いた高濃度の fluconazole 存在下では生育できなかったと推測される。また、本研究で同定した全ての遺伝子変異は FK506 に対する応答性のみを変化させて、他の基質の輸送、あるいは構造の異なる阻害剤に対する感受性にはほとんど影響を及ぼさなかった。この結果は、本実験で遺伝子変異が認められたアミノ酸残基は CaCdr1p の FK506 との特異的相互作用に関わるアミノ酸であることを示唆している。CaCdr1p において FK506 非感受性化する遺伝子変異はこれまでも報告はあるが (11 番目の膜貫通 α ヘリックス : TMS11)、それらは基質認識にかかわるとされている薬剤排出活性を大幅に低下させたり、あるいは今回の研究で構造の異なる阻害剤に対する感受性も大幅に変化していた。したがって、TMS11 のアミノ酸残基は基質と阻害剤の双方の相互作用にかかわると推測される。

これまでの報告のある変異導入実験は、ヒト ABC タンパク質の情報をもとに、ある特定の部位特異的変異を導入し解析したものであり、客観的な実験結果に基づいた変異の箇所ではなかった。本研究における遺伝子変異のスクリーニング法は客観的なものであり、阻害剤や基質の相互作用部位を網羅的に解析するきわめて有効な手法であるといえる。

また、本研究で行った遺伝子変異解析実験では、既報の研究手法とは異なり、変異箇所がきわめて少ない変異株を大量に取得できた。通常、ランダム遺伝子変異導入において変異導入効率を調節することは難しく、遺伝子中に複数個所の遺伝子変異が導入されてしまい、その後の解析が困難になるケースが多い。こういった観点からも、本研究の実験手法は他の遺伝子の変異導入実験にも応用も可能であると期待される。

E. 結論

病原真菌の薬剤排出ポンプを高発現している出芽酵母株を用いて、排出ポンプが阻害剤に対して非感受性化するような遺伝子変異を網羅的に同定する手法を確立した。その結果、これまで報告のなかった遺伝子変異を数多く同定し、阻害剤および基質と *Candida albicans* 薬剤排出ポンプタンパク質の相互作用について考察を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, Cannon RD. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 1150-65 2007
- 2) Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk BC. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology*. 2007 Oct;153(Pt 10):3211-7.
- 3) Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami NS, 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. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Dec;60(6):1264-72.
- 4) Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M, Uehara Y. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Dec 28;364(4):990-5.
- 5) Holmes AR, Lin YH, Niimi K, Lamping E, Keniya M, Niimi M, Tanabe K, Monk BC, Cannon RD. ABC transporter Cdr1p contributes more than

Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):3851-62.

6) Tanabe K, Niimi K, Niimi M. What's new in the molecular basis of antifungal drug resistance in pathogenic yeasts. *Nippon Rinsho.* 2008 Dec;66(12):2273-8. Review. Japanese

2. 学会発表

- 1) Koichi Tanabe, Susumu Tomiyama, Erwin Lamping, Yukie Takano, Yoshimasa Uehara and Masakazu Niimi. Novel mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* ABC protein, Pdr5p, result in insensitivity to the efflux pump inhibitor FK506: 2nd FEBS Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens 2007年5月
- 2) 田辺公一、新見昌一：病原真菌 ABC タンパク質と基質の相互作用 第4回 真菌分子細胞研究会 2007年8月
- 3) 田辺公一、富山 進、上原至雅、新見昌一：出芽酵母ABCタンパク質Pdr5pの阻害剤FK506非感受性化変異 第51回 日本医真菌学会総会 2007年11月
- 4) 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、宮崎義継、新見昌一：ドメイン置換解析による *Candida albicans* ABC タンパク質の基質認識メカニズムの解明 第30回 日本分子生物学会大会・第80回 日本生化学会大会 合同大会
- 5) 三好勲治、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、宮崎義継、新見昌一：病原真菌 ABC タンパク質のFK506による阻害メカニズムの解明 第30回 日本分子生物学会大会・第80回 日本生化学会大会 合同大会
- 6) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、知花博治、宮崎義継、新見昌一：病原真菌ステロールトランスポーターの出芽酵母での発現解析 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 7) 中山浩伸、田辺公一、青山俊弘、岡野 誠、知花博治、新見昌一：病原真菌 *Candida glabrata* のステロール輸送機構の解明 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 8) 岡野 誠、田辺公一、青山俊弘、知花博治、新見昌一、中山浩伸：*Candida glabrata* のステロールトランスポータ *AUS1* を制御する転写因子の検索 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 9) 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、長沼芽衣、新見昌一、宮崎義継：血清添加による *Candida albicans* のアゾール剤非感受性化メカニズムの解明 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 10) 田辺公一、中山浩伸、山越 智、知花博治、新見昌一、宮崎義継：*Candida glabrata* ステロールトランスポーターのアゾール剤耐性化における役割 第52回 日本医真菌学会 2008年9月
- 11) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、山越 智、臺 由紀、知花博治、新見昌一、宮崎義継：*Candida glabrata* ステロールトランスポーターによるアゾール剤耐性化 第31回 分子生物学会大会 2008年12月
- 12) 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、長沼芽衣、新見昌一、宮崎義継：*Candida albicans* の血清添加によるアゾール剤非感受性化メカニズムの解明 第31回 分子生物学会大会 2008年12月
- 13) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、知花博治、新見昌一、宮崎義継：病原真菌 *Candida albicans* における血清によるアゾール系抗真菌薬耐性化 第7回 感染症沖縄フォーラム 2009年2月
- 14) 中山浩伸、田辺公一、名木 稔、知花博治、宮崎義継、新見昌一：病原真菌のステロールトランスポーターの発現機序 第82回 細菌学会総会 2009年3月
- 15) 名木 稔、田辺公一、宮崎義継、新見昌一：*Candida albicans* の血清添加によるアゾール

G. 知的財産権の出願登録状況

なし

病原真菌の薬剤排出ABCトランスポーターの基質特異性決定メカニズムの解明

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部
 研究者 田辺 公一

研究要旨 病原真菌の ABC タンパク質は、抗真菌薬に対する薬剤耐性化の主要な原因となっている。病原真菌 ABC タンパク質とその変異タンパク質を出芽酵母で発現させて、生化学的解析を行うことで基質特異性決定の分子メカニズムを明らかにする。

A. 研究目的

本研究においては、病原真菌 (*Candida* を中心として) の多剤耐性に関わる ATP binding cassette (ABC) タンパク質の生化学的、酵素化学的性質を明らかにすることを目的とする。そのために、様々な病原真菌から ABC タンパク質遺伝子を単離し、出芽酵母において大量発現させて機能解析を行う。

ABC タンパク質の基質特異性と排出メカニズムを詳細に明らかにすることは、病原真菌の薬剤耐性機構を理解し制御するために必要であり、新たな抗真菌薬の開発にも大きく貢献するものと考えられる。本研究では、病原真菌 *Candida albicans* の多剤耐性に関わる ABC タンパク質の基質特異性を決定するメカニズム、基質相互作用部位を明らかにすることを目的として研究を進めていく。病原真菌 *C. albicans* の ABC タンパク質 CaCdr1p を大量発現している出芽酵母株において、阻害剤と基質の組み合わせによるストレスを与え、機能復帰変異株の単離を行う。この実験手法を用いて、CaCdr1p の基質輸送や阻害剤との相互作用に重要なアミノ酸を網羅的に同定し、基質または阻害剤となる薬剤の構造との相関を明らかにする。

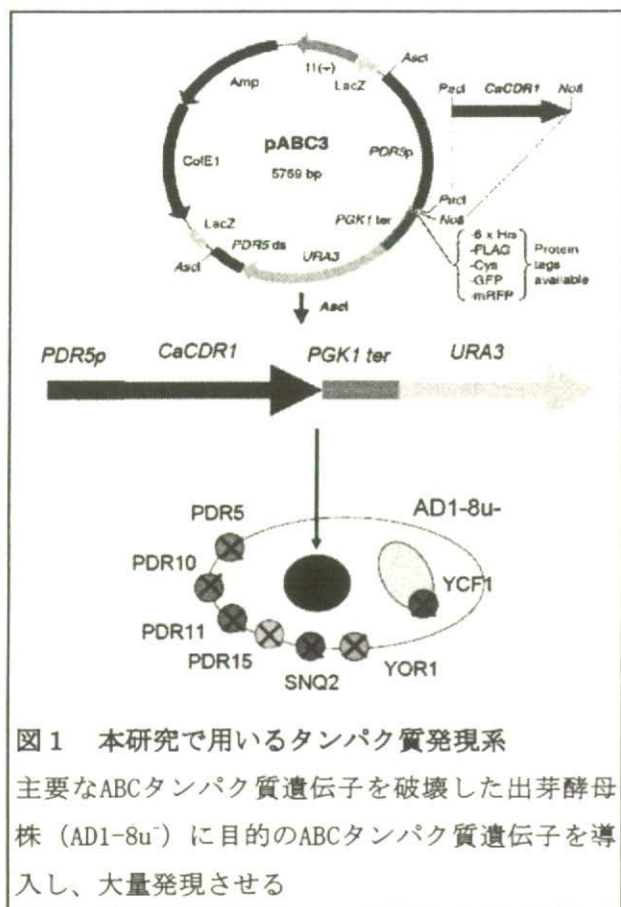


図1 本研究で用いるタンパク質発現系
 主要なABCタンパク質遺伝子を破壊した出芽酵母株 (AD1-8u⁻) に目的のABCタンパク質遺伝子を導入し、大量発現させる

B. 研究方法

Candida albicans の Cdr1p と CaCdr2p は nucleotide binding domain (NBD) と transmembrane domain (TMD) が2回繰り返される二次構造をとると考えられている (図2)。

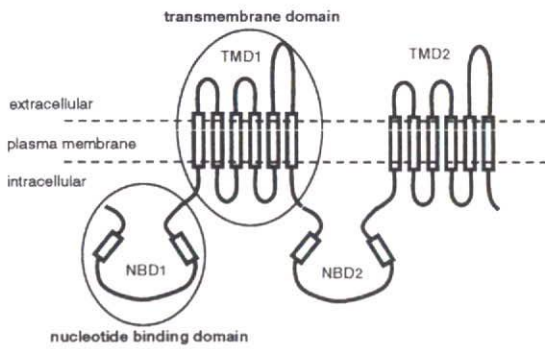


図2 *Candida albicans* ABCタンパク質の推定される二次構造

病原性真菌 *C. albicans* の ABC タンパク質である CaCdr1p を大量発現する出芽酵母 (AD/CaCDR1) を、基質である fluconazole と阻害剤である FK506 を含む寒天培地上で培養すると、FK506 非感受性化株が出現する。非感受性化株の *CaCDR1* 遺伝子を PCR によって増幅し、親株 (AD1-8u 株; 以後 AD 株) に導入し、遺伝子導入株が FK506 に対して非感受性になるかどうかを調べる。遺伝子導入株が再び FK506 非感受性であれば、*CaCDR1* の ORF のシーケンスを確認する。このようにして得られた変異タンパク質発現株の他の阻害剤に対する応答を調べる。また、変異タンパク質の輸送基質特異性がどのように変化するのかを明らかにする。

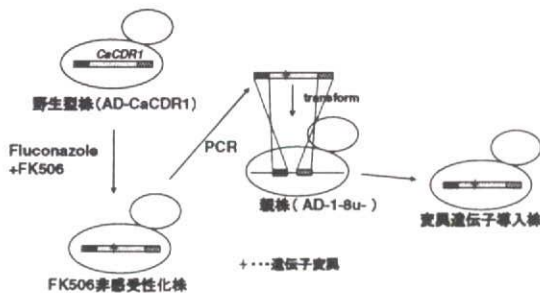


図3 *CaCDR1* 遺伝子への変異導入実験の流れ

(倫理面への配慮)

当研究においては、病原真菌と薬剤との相互作用に焦点をあてて研究を行っているために、現段階で動物実験を行う予定はない。また、病原真菌の薬剤排出ポンプ遺伝子を出芽酵母において発現させて機能解析を行っているために、実験材料を

P1 レベルで取り扱うことができる。環境への拡散も遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律にのっとり、十分に配慮して研究を行っている。

C. 研究結果

AD/*CaCDR1* を基質である fluconazole と阻害剤である FK506 を含む寒天培地上で培養し、FK506 非感受性化株を 50 株以上単離した。そのうち 44 株の *CaCDR1* 遺伝子を PCR によって増幅し、AD 株に導入したところ、ほぼ全ての遺伝子導入株は FK506 に対して非感受性であった。したがって、最初のスクリーニングで単離された変異株は *CaCDR1* 遺伝子上の変異が原因で FK506 非感受性化していたと考えられた。また、非感受性化株の *CaCDR1* 遺伝子の ORF の塩基配列を決定したところ、大半の変異株の ORF 上には 1 箇所でも 1 アミノ酸置換を引き起こすような変異が認められた。

同定された遺伝子変異は、細胞外に露出すると推測されるループ部分に集中しており、これまでに報告のあった FK506 非感受性化変異と一致するものはなかった (図 4)。

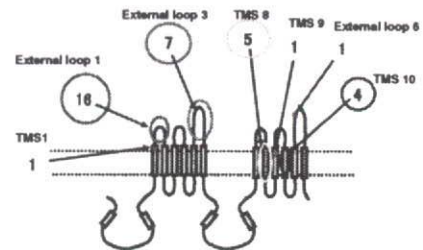


図4 FK506非感受性化遺伝子変異の検出頻度

さらに、単離した遺伝子変異株についてペーパークロマトによる薬剤感受性試験を行い、fluconazole を含む主要な抗真菌薬に対する耐性には、大きな変化がないことを明らかにした (図 5)。

Resistant variant	bc change	rd change	rd position	Predicted location	FLC	NRG	CYS	HTS
Wild type					512	64	4	8
FR1(RoFK506)	A713P	G→C	2137	External loop 3	512	64	2	16
FR3	S642P	T→G	1624	External loop 1	512	64	2	8
ER8	V1322G	C→T	3986	TMS10	512	64	2	16
FR8	S642L	G→C	1625	External loop 1	512	32	2	16
			3702	TMS8				
FR10	M1234E	G→C	1630	External loop 1	256	16	2	8
FR11	S652L	C→T	1625	External loop 1	1024	64	2	8
FR14	Q1348P	A→T	4163	External loop 6	256	64	1	8
FR15	Y646F	+TAT	1636	External loop 1	256	32	2	8
			1619	External loop 1	512	64	4	8
FR16	T640A	A→C	2141	External loop 3	512	32	1	16
FR18	Q714P	T→C	2141	External loop 3	512	64	2	8
FR22	V1322A	A→T	3986	TMS10	512	64	2	8
FR24	N630I	-A	1604	TMS1	128	32	1	8
			4496	C-terminus				
FR26	C712S	G→C	2136	External loop 3	512	64	2	8
FR31	F1236C	T→G	3704	TMS8	512	64	4	8
FR38	N646Y	G→C	1637	External loop 1	512	64	4	8
FR42	N1295S	A→G	3984	TMS9	512	64	2	8
FR43	N1290D	A→G	3718	TMS8	1024	4	2	8
			4061-4063	TMS11	32	8	0.25	8
T1351F	T1351F	A→G	4063	TMS11	128	64	0.5	8
T1356A	L1356A	TT→GC	4072-4073	TMS11	64	32	0.5	8
L1358A	L1358A	T→C	4086	TMS11	32	8	0.6	8
G1362A	G1362A							

図5 AD/CaCDR1変異株と主要な薬剤に対する感受性

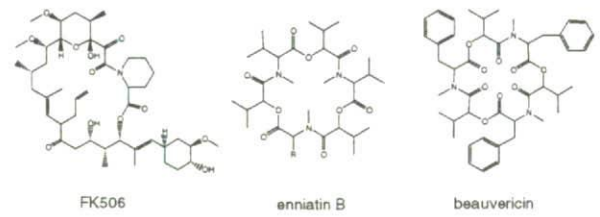


図8 実験に用いたCaCdr1p阻害剤

また、FK506とは構造の異なる阻害剤 beauvericin、enniatinを用いた感受性化試験を行った結果、本研究で同定した変異 CaCdr1p 発現株はFK506に対する感受性が低下していたが、他の阻害剤に対する感受性は保持していた(図6、7、8)。

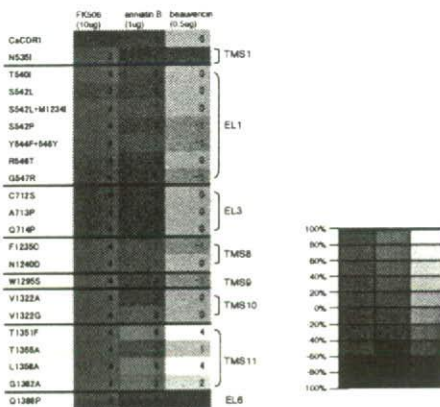


図6 AD/CaCDR1変異株の阻害剤感受性の比較

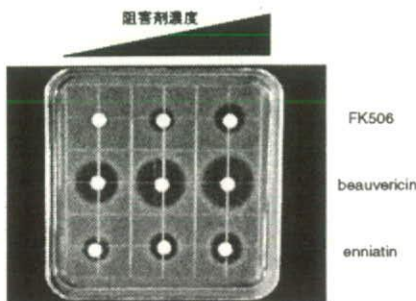


図7 図6の阻害剤感受性試験の方法
生育阻止濃度以下の濃度のフルコナゾールを含む寒天培地で阻害剤を含むディスクを載せる。阻害剤感受性だと排出ポンプが阻害されて生育阻止円が形成される。野生型(AD/CaCDR1、阻害剤感受性)において形成される阻止円と耐性変異株において形成される阻止円の直径を比率で表し色分けして表した。明るい色ほど耐性化していることを表している

D. 考察

本研究において単離したほぼ全ての FK506 非感受性変異株の *CaCDR1* 遺伝子上に、遺伝子変異が認められた。おそらく、fluconazole の標的分子である Erg11p の過剰発現株や *ERG11* 遺伝子に変異を持ったものも同時に発生していた可能性は高いが、それらの株は本実験で用いた高濃度の fluconazole 存在下では生育できなかったと推測される。また、本研究で同定した全ての遺伝子変異は FK506 に対する応答性のみを変化させて、他の基質の輸送、あるいは構造の異なる阻害剤に対する感受性にはほとんど影響を及ぼさなかった。この結果は、本実験で遺伝子変異が認められたアミノ酸残基は CaCdr1p の FK506 との特異的相互作用に関わるアミノ酸であることを示唆している。CaCdr1p において FK506 非感受性化する遺伝子変異はこれまでも報告はあるが(11番目の膜貫通 α -ヘリックス:TMS11)、それらは基質認識にかかわるとされている薬剤排出活性を大幅に低下させたり、あるいは今回の研究で構造の異なる阻害剤に対する感受性も大幅に変化していた。したがって、TMS11のアミノ酸残基は基質と阻害剤の双方の相互作用にかかわると推測される。

これまでの報告のある変異導入実験は、ヒト ABC タンパク質の情報をもとに、ある特定の部位特異的変異を導入し解析したものであり、客観的な実験結果に基づいた変異の箇所ではなかった。本研

究における遺伝子変異のスクリーニング法は客観的なものであり、阻害剤や基質の相互作用部位を網羅的に解析するきわめて有効な手法であるといえる。

また、本研究で行った遺伝子変異解析実験では、既報の研究手法とは異なり、変異箇所がきわめて少ない変異株を大量に取得できた。通常、ランダム遺伝子変異導入において変異導入効率を調節することは難しく、遺伝子中に複数個所の遺伝子変異が導入されてしまい、その後の解析が困難になるケースが多い。こういった観点からも、本研究の実験手法は他の遺伝子の変異導入実験にも応用も可能であると期待される。

E. 結論

病原真菌の薬剤排出ポンプを高発現している出芽酵母株を用いて、排出ポンプが阻害剤に対して非感受性化するような遺伝子変異を網羅的に同定する手法を確立した。その結果、これまで報告のなかった遺伝子変異を数多く同定し、阻害剤および基質と *Candida albicans* 薬剤排出ポンプタンパク質の相互作用について考察を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Holmes AR, Lin YH, Niimi K, Lamping E, Keniya M, Niimi M, Tanabe K, Monk BC, Cannon RD. ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p does to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Nov;52(11):3851-62.
- 2) Tanabe K, Niimi K, Niimi M. What's new in the molecular basis of antifungal drug resistance in pathogenic yeasts. *Nippon Rinsho.* 2008 Dec;66(12):2273-8. Review. Japanese

2. 学会発表

- 1) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、知花博治、宮崎義継、新見昌一：病原真菌ステロールトランスポーターの出芽酵母での発現解析 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 2) 中山浩伸、田辺公一、青山俊弘、岡野 誠、知花博治、新見昌一：病原真菌 *Candida glabrata* のステロール輸送機構の解明 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 3) 岡野 誠、田辺公一、青山俊弘、知花博治、新見昌一、中山浩伸：*Candida glabrata* のステロールトランスポータ *AUS1* を制御する転写因子の検索 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 4) 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、長沼芽衣、新見昌一、宮崎義継：血清添加による *Candida albicans* のアゾール剤非感受性化メカニズムの解明 第5回 真菌分子細胞研究会 2008年8月
- 5) 田辺公一、中山浩伸、山越 智、知花博治、新見昌一、宮崎義継：*Candida glabrata* ステロールトランスポーターのアゾール剤耐性化における役割 第52回 日本医真菌学会 2008年9月
- 6) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、山越 智、臺 由紀、知花博治、新見昌一、宮崎義継：*Candida glabrata* ステロールトランスポーターによるアゾール剤耐性化 第31回 分子生物学会大会 2008年12月
- 7) 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、長沼芽衣、新見昌一、宮崎義継：*Candida albicans* の血清添加によるアゾール剤非感受性化メカニズムの解明 第31回 分子生物学会大会 2008年12月
- 8) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、知花博治、新見昌一、宮崎義継：病原真菌 *Candida albicans* における血清によるアゾール系抗真菌薬耐性化 第7回 感染症沖縄フォーラム 2009年2月
- 9) 中山浩伸、田辺公一、名木 稔、知花博治、宮崎義継、新見昌一：病原真菌のステロールトランスポーターの発現機序 第82回 細菌学会総会 2009年3月

- 10) 名木 稔、田辺公一、宮崎義継、新見昌一：
*Candida albicans*の血清添加によるアゾール
系抗真菌薬耐性化メカニズムの解明 第 82
回 細菌学会総会 2009年3月

日和見感染症治療ならびに遺伝子治療用ベクターとしての特性解析を目指したB群アデノウイルスの感染機構の解明

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所
遺伝子導入制御プロジェクト
研究者 櫻井 文教

近年、免疫不全状態においてB群アデノウイルス (Ad) 感染症が問題となっている。一方、B群 Ad は遺伝子導入ベクターの基本骨格としても注目されている。B群 Ad の感染機構は未だ不明であることから、本研究ではB群 Ad の感染機構を検討した。

A. 研究目的

近年、骨髄移植や臓器移植の際の免疫抑制状態、および抗がん剤投与やヒト免疫不全ウイルス感染 (エイズ) により免疫力が減弱した状態において、B群に属するアデノウイルス (B群 Ad) (3、7、11、35型など) による重篤な感染症が問題となっている。しかしながら、現在、B群 Ad 感染症に対する有効な治療薬は少なく、その予防・治療法の確立は極めて重要な課題である。一方、B群 Ad は遺伝子導入用ベクターの基本骨格としても大きな注目を集めている。B群 Ad は他群に属する多くのヒト Ad が利用する Cocksakievirus-adenovirus receptor (CAR) 以外の分子を受容体として認識するため、遺伝子導入用ベクターとして汎用されているC群5型 Ad ベクターでは遺伝子導入不可能な細胞にも効率良く感染する。加えて、成人のB群 Ad に対する抗体の保持率が総じて低いことから、既存抗体による感染阻害も起こりにくい。しかしながら、B群 Ad の感染機構に関しては複数のB群 Ad 受容体が存在することが想定されているものの、その一つがCD46であることが報告された以外、ほとんど明らかになっていない。B群 Ad 感染症の予防・治療法の確立に向けて、またB群 Ad をベ-

スにした遺伝子治療用ベクターとしての特性解析に向けて、B群 Ad の感染機構の解明は極めて重要である。そこで本研究では、①35型 Ad のペントンベース RGD (Arg-Gly-Asp) 配列の感染への関与、②35型 Ad ベクターによる自然免疫活性化、③35型 Ad ベクター感染による受容体 CD46 発現量変化について検討した。

B. 研究方法

B-1. 35型 Ad のペントンベース RGD 配列の感染への関与

(1) ヒト白血病細胞株 K562 細胞の培養

ヒト白血病細胞株 K562 細胞は、10%ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地を用いて、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。

(2) ペントンベース RGD 配列改変 35型 Ad ベクタープラスミド (pAdMS19、-20) の作製

ペントンベース・RGD 配列を RGE に置換した 35型 Ad ベクタープラスミドである pAdMS19、および RGD 配列を欠損させた 35型 Ad ベクタープラスミド pAdMS20 は以下のように作製した。シヤトルプラスミド pHM5.4 を *AscI/EcoRI* で処理したフラグメントと、同じく *AscI/EcoRI* で処理

した 35 型 Ad ゲノム (bp7930-21944) のフラグメントをライゲーションすることにより pHM5.4-Ad35-2 を得た。次に、*PmeI/AscI/NheI/Bst1107I/Csp45I/PacI/NotI* のマルチクローニングサイトを有するシャトルプラスミド pFS4 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *SphI/Csp45I* で処理したフラグメントをライゲーションし、pFS4-Ad35-1 を得た。さらに、pFS4-Ad35-1 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメント (35 型 Ad ゲノムの 14409 bp -15544 bp を含む) と、pFS4 を *Bst1107I* と *Csp45I* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-2 を作製した。そして、pFS4-Ad35-2 を *PvuII/PstI* 処理したフラグメントと、ペントンベース・RGD 配列付近をコードした合成オリゴ DNA (5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAGAGGAGAGATTGCGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3' , 5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTCCTCTCTGACTCTCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCAACTATGTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'、アンダーラインは RGE 配列に変更した部分) をライゲーションすることにより pFS4-Ad35-5 を作製した。次に、pFS4-Ad35-5 と pFS4-Ad35-1 を *SphI* と *PvuII* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-6 を得た。pFS4-Ad35-7 は、pFS4-Ad35-6 と pHM5.4-Ad35-2 をそれぞれ *I-CeuI/BlpI* 処理した後ライゲーションすることによって作製した。さらに、pFS4-Ad35-7 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントと、pHM5.4-Ad35-2 を *SgrAI* と *PacI* で切断したフラグメントをライゲーションすることにより pFS4-Ad35-9 を得た。そして最後に、pFS4-Ad35-9 を *AscI/PacI* で切断したものと *Bst1107I* で消化

した pAdMS18 を混和させ、大腸菌 BJ5183 株にエレクトロポレーションし、大腸菌中での相同組み換えによりプラスミド pAdMS19 を得た。pAdMS20 も pAdMS19 と同様の手順で作製した。尚、pAdMS20 作成の際に使用した合成オリゴ DNA の配列は以下の通りである。

5' -CTGCTGCAGAAGCTAAGGCAAACATAGTTGCCAGCGACTCTACAAGGGTTGCTAACGCTGGAGAGGTCAATTTGCGCCAACACCTGTTCCGACTGCA-3'

5' -GTCGGAACAGGTGTTGGCGCAAATTCCTCTCTGACTCTCCAGCGTTAGCAACCCTGTAGAGTCGCTGGCAACTATGTTGCCTTAGCTTCTGCAGCAG-3'

(3) 35 型アデノウイルスベクターの作製

Green fluorescence protein (GFP) 発現 35 型 Ad ベクターは以下のように作成した。pHMCAGFP を *I-CeuI* および *PI-SceI* 処理したフラグメントと、pAdMS18 を *I-CeuI* および *PI-SceI* 処理したフラグメントをライゲーションし、pAdMS18-GFP を得た。そして、pAdMS18-GFP を Ad ゲノムの両末端に存在する制限酵素 *SbfI* で消化することにより線状にし、SuperFect Transfection Reagent (キアゲン社より入手) を用いて 60 mm 培養ディッシュに播種した 293E1B 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後約 10 日間培養し、GFP 発現 35 型 Ad ベクター Ad35GFP を得た。ペントンベース・RGD 配列を RGE (Arg-Gly-Gln) に改変した 35 型 Ad ベクター Ad35RGE GFP および RGD 配列を欠損させた 35 型 Ad ベクター Ad35ΔRGD GFP は、ベクタープラスミド pAdMS19 および pAdMS20 を用いて Ad35GFP を同様に作製した。Fig. 1 に本研究で用いた 35 型 Ad ベクターを示す。これらの 35 型 Ad ベクターの増幅および精製は常法に従った。精製した Ad ベクターの物理化学的力価は Maizel ら

の方法に従い測定した。

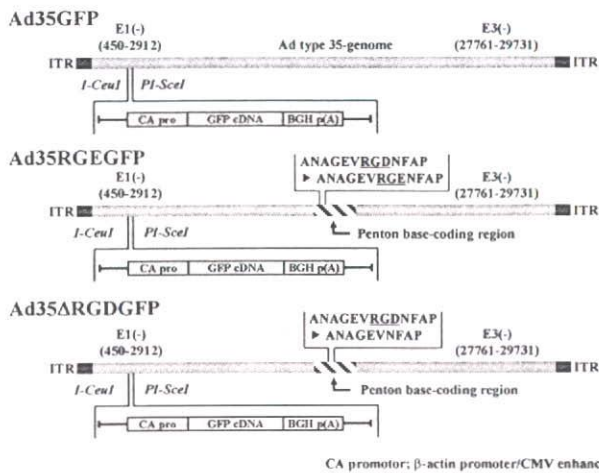


Fig. 1 Schematic diagram of adenovirus serotype 35 vectors used in this study.

(4) 各種インテグリンの発現解析

K562 細胞を 1% BSA-PBS (staining buffer) に懸濁し各種抗インテグリン抗体を添加後、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を staining buffer で 2 回洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識した 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin specific polyclonal antibody (Pharmingen 社より入手) および anti-rat IgG (H+L) antibody (Jackson ImmunoResearch 社より入手)) を添加し、氷上で 1 時間インキュベートした後、細胞を staining buffer で 2 回洗浄した。これらの細胞をフローサイトメーターを用いて解析した。抗 $\alpha_v\beta_3$ (LM609)、抗 $\alpha_v\beta_5$ (P1F6)、抗 α_5 (P1D6)、抗 β_1 (P4C10)、抗 β_2 インテグリン抗体 (P4H9-A11) は Chemicon International 社より、抗 α_4 インテグリン抗体 (HP2/1) は Immunotech 社、抗 α_6 インテグリン抗体 (GoH3) は R&D Systems 社より入手した。

(5) 35 型 Ad ベクター感染における 2 価カチオンの影響

EDTA、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ もしくは $CaCl_2$ を含む Tris buffer に懸濁した K562 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、4°C、30 分間インキュベートした。その後、35 型 Ad ベクターを 1000 VP (vector particle)/cell となるよう加え、37°C で 1.5 時間培養した。細胞を洗浄して 35 型ベクターを取り除いたのち、新鮮培地に懸濁し引き続き 48 時間培養し、GFP 発現量をフローサイトメーターにて測定した。

(6) RGD ペプチド存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

K562 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、4°C、30 分間インキュベートした。次に、RGD または RGE ペプチドを各濃度になるように添加し、4°C、1 時間インキュベートした。その後、Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37°C、3 時間培養後、新鮮培地に置換し 48 時間後の GFP 発現量をフローサイトメーターを用いて検討した。

(7) 抗インテグリン抗体存在下での 35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入

K562 細胞を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、4°C、30 分間インキュベートした。次に、抗インテグリン抗体を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加し、4°C、1 時間インキュベートした。その後 Ad35GFP を 3000 VP/cell で作用させ、37°C、3 時間培養した。新鮮培地に交換の後再度培養し、遺伝子導入 48 時間後にフローサイトメーターを用いて GFP 発現量を測定した。

B-2. 35 型 Ad ベクターによる自然免疫活性化

(1) 35 型 Ad ベクターの作製

B-1 (3) と同様に作製した。

(2) マウス骨髄由来樹状細胞への感染

野生型マウス (C57Bl6) およびヒト CD46 トランスジェニックマウス (CD46TG) (大阪大学岡部勝先生より供与、C57Bl6 background) の大腿骨より骨髄細胞を回収し、mouse GM-CSF 含有培地にて 8 日間培養し、樹状細胞を誘導した。このように誘導した樹状細胞に対し、5 型ならびに 35 型 Ad ベクターを 3000 vector particle (VP)/cell で 1.5 時間作用させた。計 24 時間培養後、細胞表面の樹状細胞成熟化マーカーの発現、遺伝子発現効率を Flow cytometry で測定するとともに、培地中の炎症性サイトカイン量を ELISA にて測定した。

(3) マウス全身投与後の炎症性サイトカイン産生

野生型マウスおよび CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを静脈内投与した。投与より 6 時間後、血清を回収し、血清中の炎症性サイトカイン量を ELISA にて測定した。

B-3. 35 型 Ad ベクター感染による受容体 CD46 発現量変化

(1) CD46 発現量の定量

B-2 (2) と同様に CD46TG マウスより調製した樹状細胞に対し、35 型 Ad ベクターを 3000 VP/cell で作用させた。感染 24 時間後、細胞表面の CD46 発現量を Flow cytometry で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物およびヒト由来の生体試料を用いた実験は行わなかった。

C. 研究結果

C-1. 35 型 Ad のペントンベース RGD 配列の感染への関与

まず初めに、K562 細胞におけるインテグリンの発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、 α_5 および β_2 インテグリンが 86 % 以上の細胞で発現していた (Fig. 2)。また、発現レベルはやや低いものの 20% の細胞で $\alpha_v\beta_3$ インテグリンが、17% の細胞で $\alpha_v\beta_5$ インテグリンが発現していた。



Fig. 2 Flow cytometric profiles of integrin expression on K562 cells. The cells were stained with anti-integrin antibodies, followed by a PE-labeled secondary antibody, and subsequently analyzed by a flow cytometer (thick line). As a negative control, the cells were incubated with isotype control antibody (shaded histogram). Percentage of positive cells is showed by number in upper right-hand corner of each profile.

次に、K562 細胞への 35 型 Ad ベクター感染におけるインテグリンの関与について検討するため、EDTA もしくは 2 価カチオン存在下における 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率について検討した。インテグリンと RGD 配列との結合には 2 価カチオンが必須であることが報告されてい