

図2 *Trichosporon asahii*のrRNA遺伝子構造

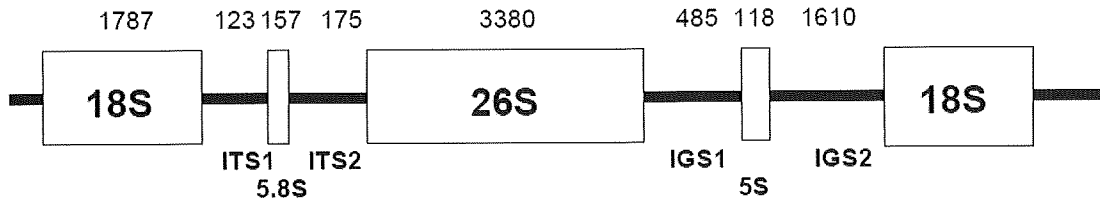


図3. トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の遺伝子型の系統関係

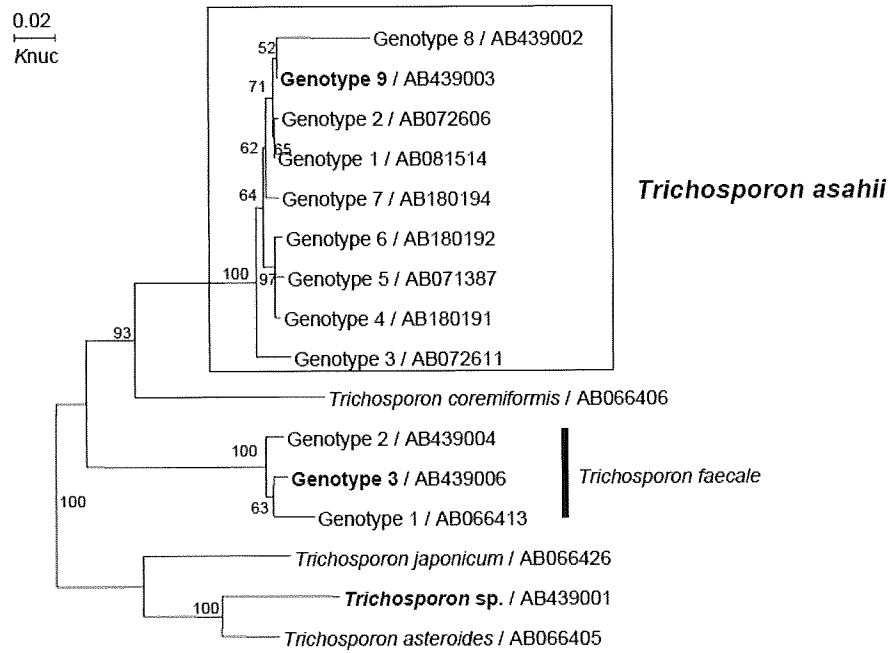
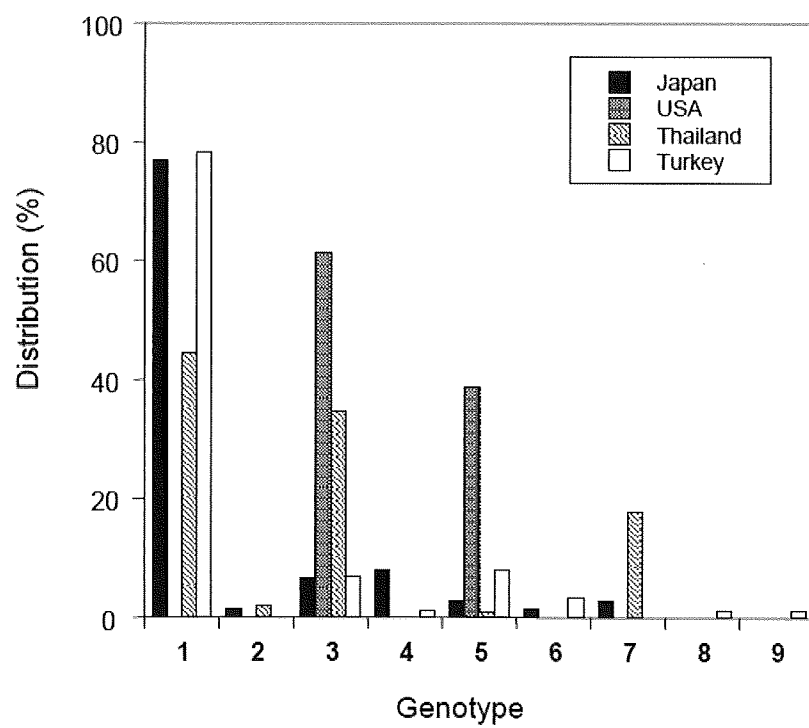


図4. トリコスポロン症起因菌 *T. asahii* の遺伝子型分布



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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 *Candida albicans* 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明を目標とした研究

分担研究者：大野秀明、国立感染症研究所 生物活性物質部、室長
研究協力者：田辺公一、宮崎義継（国立感染症研究所 生物活性物質部）

研究要旨

高度先進医療の発達に伴い、それに合併する日和見感染症としての深在性真菌症対策は医療現場において重要な位置を占めるものと考えられる。薬剤耐性真菌の耐性機構解明ならびに制御もその対策の一環であり、今回われわれは *Candida albicans* 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明として、ABC タンパク質とその阻害剤である FK506 の相互作用に特異的なアミノ酸残基の同定を行った。Fluconazole と阻害剤である FK506 を含む寒天培地上で *C. albicans* を培養し、発育を示した株の ABC タンパク質をコードする *CaCDR1* 遺伝子を解析した結果、ORF 上には少なくとも 1 箇所以上の 1 アミノ酸置換を引き起こすような変異が認められ、さらに同定された遺伝子変異の多くは、細胞外領域に存在する、あるいは一部の膜貫通領域に集中しており、これまでに報告のあった FK506 非感受性化変異とは全く異なるものであった。また、これらの変異は FK506 による阻害効果に対してのみ特異性を示すことが示唆された。今後これらの結果を応用した耐性菌制御法などが期待される。

A. 研究目的

近年、臓器移植患者やエイズ患者を含む免疫不全患者において、難治性の深在性真菌症が多発するようになり、先進国では高齢化に伴う日和見真菌感染も増加傾向にある。臨床において一般的に用いられる深在性真菌症の治療薬はアゾール系抗真菌薬であるが、長期投与による病原真菌の薬剤耐性化がしばしば報告されている。とくに日本国内では認可されている抗真菌薬に限られており、薬剤耐性化は真菌症治療における大きな問題となっている。

薬剤耐性化の主たる原因は薬剤排出ポンプ、ATP binding cassette

(ABC) タンパク質の機能亢進である。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* の薬剤耐性に関わる 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る。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、阻害剤と基質の共存下で *CaCDR1* 遺伝子への変異を誘発し、導入された遺伝子変異の

解析を行う。この実験手法を用いて、ABCタンパク質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

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 によって CaCdr1p のポンプ機能が阻害されない変異株が出現する。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* 遺伝子上に FK506 非感受性変異が存在することが予想されるので、タンパク質をコードする領域の塩基配列を確認する。このようにして得られた変異タンパク質発現株の薬剤感受性および他の阻害剤に対する応答性を調べる。

(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、現段階で動物実験へ研究を発展させる予定はない。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

D/CaCDR1 を 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。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、ORF 上には少なくとも 1 箇所以上の 1 アミノ酸置換を引き起こすような変異が認められた (図 3)。

同定された遺伝子変異の多くは、細胞外領域に存在する、あるいは一部の膜貫通領域に集中しており、これまでに報告のあった FK506 非感受性化変異とは全く異なるものであった。さらに、作製した遺伝子変異株について薬剤感受性試験を行い、fluconazole、itraconazole、nystatin、rhodamine 6G に対する感受性は野生型株とほぼ同じであることを明らかにした。

一番目の細胞外領域に遺伝子変異をもつ変異タンパク質発現株の中に、イオノフォアである nigericin に対する感受性が特異的に低下するものがあった。それらの遺伝子変異は 4 アミノ酸以内の領域に集中しており、nigericin との相互作用部位である可能性も考えられた。

また、本研究で作製した変異株の fluconazole 排出活性は構造の異なる CaCdr1p の阻害剤 enniatin B、および beauvericin によっては阻害されなかった (図 4)。野生株 (最上段) と比較して FK506 による阻害は変異株 (二段目以降) において完全に消失しているのに対して、enniatin B や beauvericin による阻害は野生型と同等あるいは阻害を受けやすくなっている変異株も認められた。

以上の、薬剤感受性試験、阻害剤の相互作用実験から、本実験で変異が認められたアミノ酸残基は FK506 による阻害効果の特異的に無効にす

る部位、すなわち FK506 との相互作用部位を示していると考えられた。

D. 考察

本研究において単離され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、他の基質に対する応答性にはほとんど影響を及ぼさなかった。これまでに報告のある FK506 非感受性遺伝子変異は他の薬剤排出活性を大幅に低下させるような変異であったことと比較すると、今回のスクリーニング系は FK506 との特異的相互作用のみを変化させる遺伝子変異を検出できたといえる。

本研究で作製した変異株は試験した抗真菌薬や薬剤に対する感受性が野生株と同等のものであったことから、本研究で同定した変異は CaCdr1p の基本的な薬剤排出機能自体には影響を及ぼさずに FK506 による阻害効果のみを失わせたと考えられる。また、構造の異なる阻害剤は変異株の薬剤排出活性を野生型同様に阻害できたことから、本研究で同定した変異は複数の阻害剤に対して非感受性化させるのではなく FK506 による阻害効果のみを特異的に失わせたと推測された。以上の考察より、本研究で変異が認められた CaCdr1p の細胞外ループ領域あるいは 8 番目、10 番目の膜貫通 α ヘリックスが FK506 との特異的な相互作用に重要な部位であることが強く示唆された。さらに変異の位置関係より、FK506 は他の基質と同様に ABC タンパク質によって細胞内から細胞外へと輸送され、その過程においてタンパク質のいずれかの領域（おそらくは、細胞外領域）でトラップされることで他の基質の輸送を阻害しているものと推測された。

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。

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。同定した遺伝子変異は、阻害剤の特異的相互作用部位の探索に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Internal Medicine (in press).

2) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effect of an Hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. Jpn. J. Infect. Dis., 62: 392-393, 2009.

3) 大野秀明、宮崎義継. 微生物の種類別にみた施設内感染制御. 真菌アスペルギルス. 医療福祉施設における感染制御と臨床検査. 臨床検査 53: 1381-1386, 2009.

4) 大野秀明、宮崎義継. ヒストプラズマ症. 呼吸器科 15: 57-63, 2009.

2. 学会発表

1) 田辺公一、山越 智、大野秀明、宮崎義継：血清による *Candida albicans* のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討. 第56回日本化学療法学会東日本支部総会、東京、2009.

2) 大野秀明：真菌性髄膜炎に対する抗真菌薬療法：第14回日本神経感染症学会総会、宇都宮、2009.

3) 大川原明子、山越 智、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継：*C. albicans*細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析. 第83回日本感染症学会総会、東京、2009.

4) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of mycological character and early immune response against different structures of cell surface mannan of *Candida albicans*. 109th General Meeting, American Society for Microbiology, Philadelphia, 2009.

5) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M,

Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative α -type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*.

The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo, 2009.

6) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of antifungal combinations against *Candida* biofilms and stress response. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

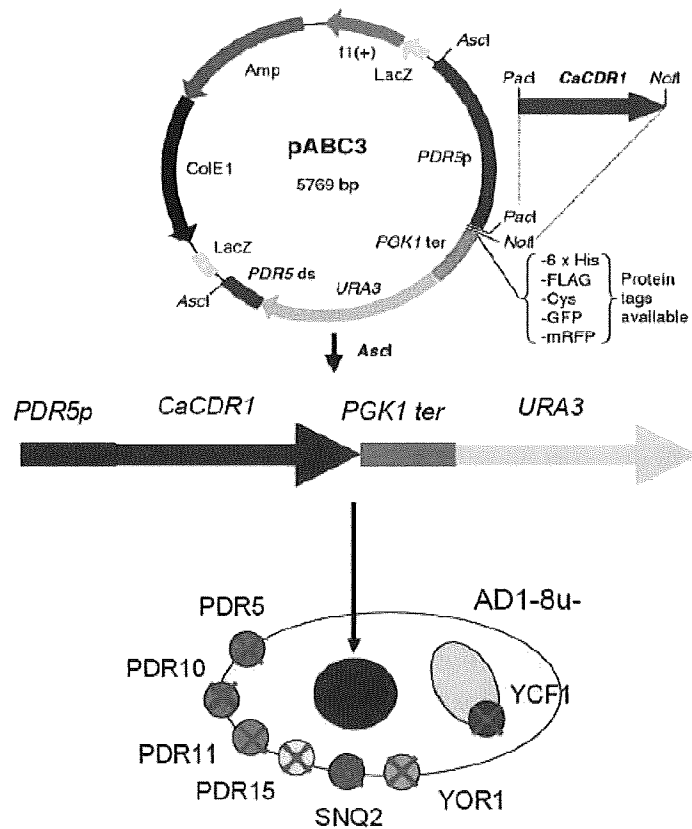


図1 本研究で用いるタンパク質発現系
 主要なABCタンパク質遺伝子を破壊した出芽酵母株 (AD1-8u-) に目的のABCタンパク質遺伝子を導入し、大量発現させる

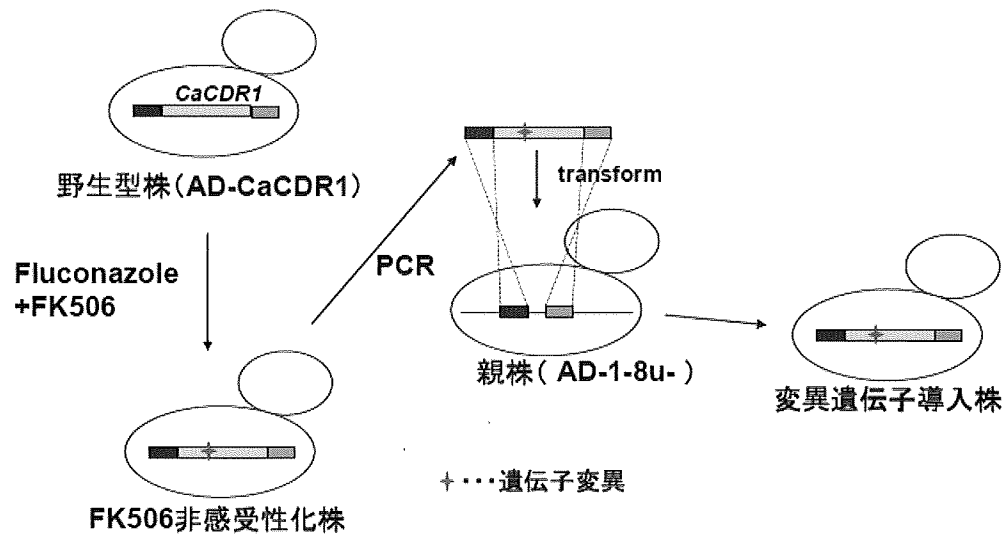


図2 CaCDR1遺伝子への変異導入実験の流れ

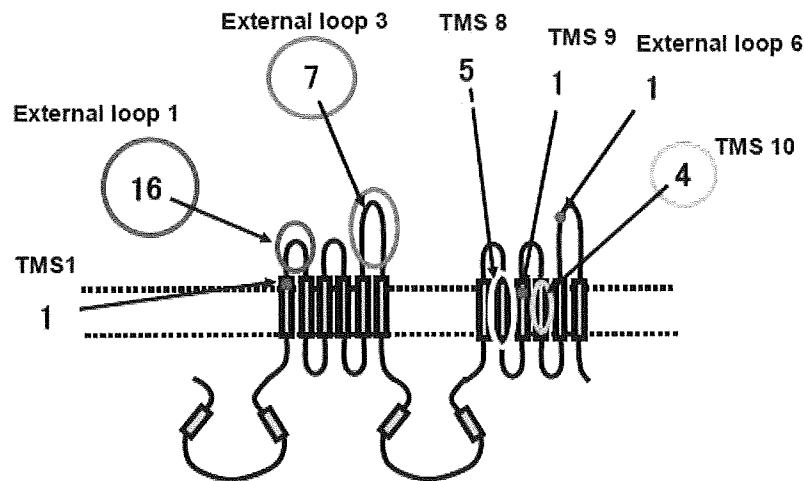
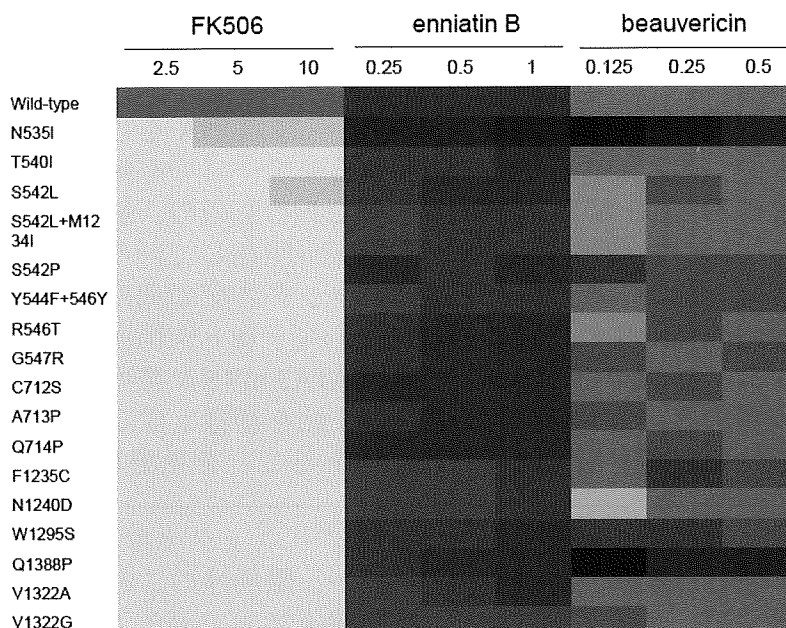


図3 FK506非感受性化遺伝子変異の検出頻度



FK506以外の阻害剤は変異株の薬剤排出を抑制できた
→FK506特異的相互作用部位における変異だった

図4 色々な阻害剤による野生型および変異株の fluconazole 排出阻害実験

上段に示した量の阻害剤を含ませたペーパーディスクの辺縁に形成された生育阻止円を測定し色の明暗で阻害活性を表示した。暗いほうが強く阻害を受けていることを示している。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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

真菌感染症における宿主免疫機構の解明とその臨床的評価法の開発

分担研究者 川上和義、東北大学大学院医学系研究科、教授

研究要旨

本研究では、クリプトコックス症における宿主免疫応答機序を解明するために、特に感染後の自然免疫活性化と菌体成分との関連性に焦点を当て、1) NKT 細胞による真菌認識抗原の探索、2) クリプトコックス DNA による樹状細胞の活性化機序について解析を実施した。今回、クリプトコックス菌体中に CD1d 拘束性に NKT 細胞によって認識される何らかの糖脂質抗原が存在する可能性を示唆する結果が得られ、さらに菌体から抽出した糖脂質を HPLC にて解析することで、monogalactoyl diacylglycerol 及び ceramide monohexoside が本真菌の主要な糖脂質であることが明らかになった。一方、クリプトコックスの *URA5* 遺伝子を増幅した 345 塩基対の PCR 産物でマウスの骨髄由来樹状細胞を刺激すると、TLR9 に依存した樹状細胞刺激活性が検出された。この DNA をさらに断片化することで、樹状細胞活性化に関与するモチーフの有無について解析したところ、CG 配列の存在が必要であるものの、従来から知られている CpG モチーフとは異なる機序が関与している可能性を示す結果が得られた。最後に、クリプトコックス症の免疫病態に深く関わる細胞性免疫能の定量的評価法として、ヒト末梢血リンパ球からリアルタイム PCR 法により T-bet、GATA3 mRNA 発現を解析することに成功するとともに、T-bet/GATA3 比を指標とすることで臨床的に細胞性免疫能評価できる可能性のあることを見出した。

A. 研究目的

Cryptococcus neoformans は、糖尿病、血液悪性疾患、膠原病、エイズなどの免疫低下宿主に合併する日和見病原真菌であり、このような症例では重篤な髄膜脳炎を引き起こし、临床上重要な問題になっている。本真菌は、ハトをはじめとする鳥類の堆積糞中で増殖し、乾燥によって空気中に飛散する。初感染は、空気中に飛散した真菌酵母を経気道的に吸入することによって起こる。免疫低下のない場合でも肺

クリプトコックス症を起こすことがあるが、限局性のことが多く、通常は髄膜脳炎にまで至ることは少ない。一方、エイズや白血病などのように細胞性免疫能が低下した場合には、感染を局所に封じ込めることができずに中枢神経系に播種性感染を惹起する。このような違いは感染宿主の免疫状態によって大きく左右されるため、その対策を講じるためには本真菌に対する感染防御免疫機構の理解が重要である。

近年、*C. neoformans*は、マクロファージによる貪食・殺菌からのエスケープ機構を備えており、細胞内で増殖可能な病原微生物として認識されており、そのため感染防御には細胞性免疫の成立が必須であり、CD4⁺ ヘルパーT細胞が重要な役割を果たすことが知られている。感染後の病態には、Th1/Th2 サイトカインのバランスが大きく関係しており、宿主の免疫反応がTh1側に傾くと生体では感染防御に働き、逆にTh2側に傾くと感染は憎悪に向かう。このTh1/Th2 バランスは自然免疫機構によって制御されており、マクロファージや樹状細胞による病原微生物の認識や、natural killer (NK) 細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などの自然免疫リンパ球が重要な役割を担っていることが報告されている。

免疫低下宿主における日和見感染症では、治療に抵抗性を示し、重症化する症例が少なくないことから、いち早くその存在を検出し早期に治療を開始することが重要である。そのために、微生物感染の迅速診断法の開発が進歩してきた。しかしながら、宿主側の免疫能を正確に評価する方法に関しては、未だ十分とは言えず、その早期の開発が待ち望まれている。感染防御機構は、主に好中球に依存するものと、細胞性免疫が中心的な役割を演ずるものに大別することができる。その中で細胞性免疫については、リンパ球数やそのサブセット解析、末梢血リンパ球の幼弱化試験、ツベルクリン反応などが知られているが、必ずしも正確な評価が得られるわけではなく、細胞性免疫低下に起因する日和見感染症の発症を予測するためには十分とは言いがたい。

このような背景から、本研究では、*C. neoformans* の肺内感染後における自然免疫の活性化機序を解明することを目的として、特に樹状細胞によるTLR9を介した本真菌の認識機構とと

もに、NKT細胞の活性化機序について、マウス感染モデルを用いて解析を行った。併せて、宿主の細胞性免疫能をよりの確に評価するための検査法を開発する目的で、Th1/Th2 バランスの規定要因と考えられる T-bet、GATA3 に焦点を当て、リアルタイム PCR 法を用いて、末梢血リンパ球からこれら master transcriptional regulators の発現検出を試みた。

B. 研究方法

マウス C57BL/6 マウスとともに、同じ遺伝的背景を有する CD1d 遺伝子欠損 (knockout : KO) マウス (順天堂大学竹田和由先生より供与)、Ja18KO マウス (千葉大学中山俊憲教授より供与)、TLR9KO マウス (大阪大学微生物病研究所審良静男教授より供与) を用いた。一部の C57BL/6 マウスは日本チャールス・リバーより購入した。なお、すべての動物実験は、東北大学の倫理委員会の承認を得た上で実施した。

C. neoformans 莢膜欠損株である Cap67 (Stuart M. Levitz 教授, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA より供与) を potato dextrose agar (PDA) 培地 (栄研化学、東京) にて 30°C で培養した。

骨髄由来樹状細胞 マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を 10 ng/ml GM-CSF (和光純薬、大阪) とともに 8 日間培養することで骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cells: BM-DC) を作製した。

C. neoformans 抗原でパルスした BM-DC による NKT 細胞の活性化 BM-DC に Cap67 または α -GalCer (フナコシ、東京) を加え 24 時間培養し、MACS 細胞分離装置 (ミルテニーバイオテク、東京) を用いて CD11c 陽性細胞を分離した。一方、マウスから肝臓を摘出し、比重遠心法によりリンパ球分画 (liver mononuclear lymphocytes:

LMNC) を分離した。Cap67 または α -GalCer でパルスした BM-DC を LMNC とともに 48 時間培養し、培養上清中の IFN- γ 濃度を ELISA にて測定した。実験によっては、NKT 細胞として、NK1.2 細胞 (Mitchell Kronenberg 教授, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA, USA より 供与) も使用した。

C. neoformans からの脂質抽出 Cap67 を multibeads shocker (安井機械、大阪) で破碎し、Folch 法にて脂質 (総脂質) を抽出した。得られた総脂質から Sep-Pak plus silica cartridge (日本ウォーターズ、東京) を用いて中性脂質、糖脂質、リン脂質を分離し、さらに糖脂質を HPLC にて分析した。糖脂質のスタンダード標品として、アシルステリルグルコシド (ASG、大豆由来)、ステリルグルコシド (SG、大豆由来)、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG、小麦由来)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG、小麦由来)、セラミドモノヘキソシド (CMH、海綿由来) を使用した。

C. neoformans からの DNA 抽出 Cap67 を、1% SDS, 0.3M EDTA 添加 1M Tris-HCl (pH 7.5) に溶かし、定法に従って DNA を抽出した。DNA は使用するまで -20°C に保存し、OD260/OD280 比が 1.5 から 2.0 の間に収まるものを使用した。

PCR 産物の調整と配列決定 サーマルサイクラー (PC320, ASTEC, 福岡) により、クリプトコッカスに特異的なプライマーを用い、クリプトコッカス由来の DNA の一部を増幅した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

ACG GTG AGG GCG GTA CTA TG (forward)、AAG ACC TCT GAA CAC CGT AC (reverse)。PCR mixture (TaKaRa Ex Taq, TaKaRa, 滋賀) に上記のプライマーと DNA 溶液を加え、(94°C 1分、63°C 1分 30秒、72°C 1

分) \times 36 サイクルの条件で反応を行った。得られた DNA 断片の塩基配列は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies) にて塩基配列を決定した。

サイトカイン測定 培養上清中の IL-12p40、IFN- γ 、IL-2 濃度はそれぞれの ELISA キットを用いて測定した。

DNA と TLR9 の共局在の観察 Rhodamine 標識 DNA を BM-DC と培養した後、細胞内の TLR9 を FITC 標識抗 TLR9 抗体 (IMGENEX, San Diego, CA, USA) にて染色した。スライドガラスに細胞を塗布し、ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) で封入後、LSM 510 (Zeiss, Oberkochen, Germany) により解析を行った。

ヒト末梢血リンパ球 (PBMC) からの T-bet、GATA3 発現の解析 各年齢 (22~53 歳) の健常人ボランティア 5 名の末梢静脈血から PBMC を採取した。PBMC は Th1 刺激活性の強い *Mycobacterium bovis* BCG (日本 BCG、東京) や ConA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の存在あるいは非存在下で 24 時間刺激培養し、一部にはタクロリムス (FK506)、シクロホスファミド (CPX)、デキサメサゾン (Dex) のような免疫抑制剤を添加した。培養後の PBMC から RNA を抽出し、得られた RNA は PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) により DNA に変換後、T-bet、GATA3、及び house-keeping gene として β -actin (ACTB) に特異的な TaqMan probe を用いてリアルタイム PCR を行った。

統計学的解析 実験結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で表している。各群間の統計学的解析は Student's t-test を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

C. 研究結果

C. *neoformans* による CD1d に依存した NKT 細胞の活性化

C. *neoformans* に NKT 細胞を活性化する何らかの菌体成分が存在しないか検討するために、先ず BM-DC を Cap67 と 24 時間共培養した後、MACS カラムにて精製した BM-DC を LMNC に加えさらに 24 時間培養後上清中に産生された IFN- γ の測定を行ったところ、Cap67 をパルスした BM-DC との共培養にて LMNC から明らかな IFN- γ 産生が検出された。この反応は、抗 CD1d 抗体を添加することで完全に抑制された。さらに、CD1dKO マウスに由来する BM-DC を用いて同様な実験を行ったところ、LMNC からの IFN- γ 産生が完全に消失した。一方、LMNC を J α 18KO マウスから作製し、Cap67 パルス BM-DC と培養したところ、WT マウス由来 LMNC と比較して IFN- γ 産生が有意に減少した。これらの結果から、C. *neoformans* に NKT 細胞によって認識される何らかの抗原が存在する可能性が示唆された。

C. *neoformans* からの脂質抽出

これまでの報告から、微生物に由来する NKT 細胞抗原の多くが糖脂質であることから、C. *neoformans* でも糖脂質抗原が NKT 細胞を活性化している可能性を調べるために、Folch 法を用いて Cap67 から脂質を抽出した。Cap67 に含まれる脂質の大部分は中性脂質であり、他にも微量ではあるがリン脂質、糖脂質も含まれていた。得られた糖脂質に NKT 細胞刺激活性が存在するか調べるために、Cap67 由来糖脂質でパルスした BM-DC と NK1.2 細胞と共培養し上清中に産生される IL-2 を測定したところ、明らかな活性は検出されなかった。しかし、強力な NKT 細胞抗原である α -GalCer でパルスした BM-DC を用いた場合には NK1.2 細胞から大量の IL-2 産生がみられた。興味深いことに、 α -GalCer で BM-DC をパ

ルスする際に糖脂質を添加すると、これらの反応が濃度依存的に抑制されたのに対して、中性脂質やリン脂質ではそのような抑制は認められなかった。このことから、糖脂質画分には何らかの抑制物質が存在するために目的の活性が検出できなかった可能性が考えられることから、Cap67 由来の糖脂質から HPLC を用いてさらに精製を行ったところ、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) とセラミドモノヘキソシド (CMH) の 2 つのピークが検出された。

C. *neoformans* 由来 URA 5 遺伝子による TLR9 を介した BM-DC の活性化 C. *neoformans* DNA による BM-DC の活性化機序を解明するために、Cap67 DNA からクリプトコックス特異的なプライマーを用いて 345 塩基対の DNA 断片を増幅した。得られた DNA 断片は、BM-DC からの IL-12 産生を誘導し、この反応は TLR9 遺伝子欠損によって完全に消失した。この DNA 断片の塩基配列を調べたところ、URA 5 遺伝子であることが明らかになったが、その中には TLR9 認識モチーフとして知られている gacgtt 及び gtcgtt のいずれも存在しなかった。

C. *neoformans* URA 5 遺伝子による BM-DC 活性化機序を明らかにするために、345 塩基対からさらに分割し、20 塩基前後の DNA 断片を合成し、それぞれの BM-DC 刺激活性を調べたところ、活性の強い断片 (例えば #112) から活性のない断片 (例えば #123) まで様々であった。これらの活性は、TLR9KO マウス由来の BM-DC では完全に消失し、TLR9 遺伝子を導入した HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼ・リポーターアッセイにおいて 119 塩基対の DNA 断片で刺激活性が検出されたことなどから、TLR9 に依存したものであることが明らかになった。24 塩基の #112 では CG 配列を有しており、この配列を欠失させたり、GC

に置換することで活性が消失したことから、従来からの CpG モチーフが関与している可能性が考えられた。しかしながら、いわゆる CpG モチーフが存在しないこと、主鎖のリン酸基部分の酸素原子を硫黄原子に置き換えた場合に従来の CpG-ODN と異なり活性が消失したことから、これまでの CpG モチーフとは異なる機序で TLR9 と相互作用している可能性が考えられた。

URA5 遺伝子由来 DNA 断片と TLR9 の共局在 次に、#112 と #123 で BM-DC に対する刺激活性が異なる機序について調べるために、Rhodamin 標識された各種 DNA 断片を、BM-DC と培養した後に、FITC 標識抗 TLR9 抗体で染色したものを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、#112 はわずかながらではあるが TLR9 との共局在が認められたのに対して、#123 に関しては共局在が検出されなかった。

PBMC からの T-bet、GATA3 mRNA 発現の解析 リアルタイム PCR による T-bet、GATA-3 の発現を調べたところ、T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 は無刺激の時に比べて、BCG 刺激、ConA 刺激で増加しており、特に T-bet/GATA-3 は年齢との間に有意な負の相関が認められた。また、免疫抑制剤として用いた FK506、Dex は、抗原によって刺激された PBMC の T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 を低下させることが判明した。一方、CPX は抗原によって刺激された PBMC の T-bet/ACTB、T-bet/GATA-3 を低下させる作用は認められなかった。この結果は、ELISA による IFN- γ の濃度測定の結果とも基本的によく一致しており、特に T-bet/GATA-3 との間には強い正の相関が観察された。

D. 考察

C.neoformans をマウスの肺に感染さ

せると、肺内で経時的な NKT 細胞の集積が観察されることや、Ja18KO マウスでは感染が増悪することなどから、NKT 細胞が *C.neoformans* 感染防御に深く関係することが予想されていた。本研究では、*C.neoformans* の菌体内に NKT 細胞の認識抗原が存在するか否かについて検討した。そのために、本真菌をパルスした BM-DC で NKT 細胞を刺激したところ、CD1d に依存して IFN- γ や IL-2 の産生が誘導された。これらの結果から、*C.neoformans* には CD1d に結合して NKT 細胞によって認識される何らかの抗原が存在する可能性が予想された。

これまでの報告から、CD1d に拘束された形で NKT 細胞を活性化する抗原のほとんどが糖脂質であることから、今回は脂質に焦点を絞って解析を行った。粗糖脂質画分には NKT 細胞の刺激活性を検出できなかったばかりでなく、 α -GalCer パルス BM-DC による NKT 細胞の活性化までも抑制したことから、この画分には何らかの阻害物質が混入している可能性を考え、さらに HPLC による精製を試みた。その結果、*C.neoformans* 由来の主要な糖脂質として MGDG と CMH の 2 つが検出された。これまでの報告では、細菌から得られた両方のタイプの糖脂質に NKT 細胞刺激活性が検出されたことから、本真菌の糖脂質にもこのような活性が存在する可能性が考えられ、今後のさらなる解析が必要である。

今回解析した *URA5* 遺伝子は、クリプトコックスなどが持つ orotidine mono phosphate pyrophosphorylase をコードし、ウラシルの生合成に関与していることが知られている。そして、この *URA5* 遺伝子に変異を有するクリプトコックス株は、野生株と比較して、マウスへの経静脈感染において病原性が弱まることが報告されている。したがって、*URA5* 遺伝子は、何らかの形で病原性を決定する鍵となる遺伝

子であることが推察される。本研究から、この *URA5* 遺伝子の一部が、いわゆる「CpG モチーフ」を持たないにも関わらず、TLR9、MyD88 および NF- κ B を介し、CpG-ODN と同様の経路により、BM-DC を活性化することが明らかになった。これらの研究成果は、真菌感染の免疫病態を理解する上で新たな視点を提起するものであり、重要な知見であると考えられる。

最後に、リアルタイム PCR 解析の結果より、末梢血リンパ球から Th1/Th2 細胞分化の決定に重要な転写制御因子 T-bet 及び GATA3 mRNA の発現を定量的に解析できることが分かり、さらに T-bet/GATA3 は Th1 サイトカインである IFN- γ 産生と強い正の相関を示すことも明らかとなった。興味深いことに、T-bet/GATA3 が年齢と負の相関を示しており、加齢による細胞性免疫能への影響と何らかの関係がある可能性が考えられた。今後は、T-bet/GATA3 比を指標とすることで、真菌感染症と宿主免疫能との関連について臨床的な解析を行ってきたい。

E. 結論

本研究により以下の点が明らかになった。

1) *C.neoformans* の菌体中に NKT 細胞によって認識される何らかの糖脂質抗原が存在する可能性が示唆され、MGDG、CMH がその候補になるものと考えられた。

2) *C.neoformans* 由来の DNA は CpG モチーフとは異なる機序で TLR9 に認識され樹状細胞を活性化することが明らかになった。

3) 細胞性免疫能の定量的評価法として、ヒト末梢血リンパ球からリアルタイム PCR 法により T-bet、GATA3 mRNA 発現を解析することに成功するとともに、T-bet/GATA3 比を指標とすることで臨床的に細胞性免疫能評

価できる可能性のあることを見出した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) A.Miyazato, K.Nakamura, N.Yamamoto, H.M.Mora-Montes, M.Tanaka, Y.Abe, D.Tanno, K.Inden, X.Gang, K.Ishii, K.Takeda, S.Akira, S.Saijo, Y.Iwakura, Y.Adachi, N.Ohno, K.Mitsutake, N.A.Gow, M.Kaku, K.Kawakami: Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. Infect Immun. 77: 3056-3064, 2009.

2. 学会発表

1) K.Kawakami: Mechanism of IL-12 synthesis by dendritic cells during cryptococcal infection, Symposium, International Society of Human and Animal Mycology, Tokyo, May 2009.

2) 川上和義: 真菌感染と宿主免疫機構, 教育講演, 第 83 回日本感染症学会総会学術講演会, 東京, 2009 年 4 月.

3) Y.Abe, K.Nakamura, A.Miyazato, M.Tanaka, D.Tanno, K.Ishii, Y.Kinjo, M.Kaku, K. Kawakami: CD1d-dependent activation of natural killer T-cells by *Cryptococcus neoformans* and analysis of its glycolipids, ワークショップ, 第 39 回日本免疫学会総会学術集会, 大阪, 2009 年 12 月.

4) M.Tanaka, Y.Abe, D.Tanno, K.Ishii, K. Kawakami: TLR9-dependent activation of bone marrow-derived dendritic cells by *URA5* DNA from *Cryptococcus neoformans*, 第 39 回日本免疫学会総会学術集会, 大阪, 2009 年 12 月.

5) H.Yamamoto, N.Yamamoto, M.Tanaka, Y. Abe, D. Tanno, T. Aoyagi, K. Ishii, S. Saijo, Y. Iwakura, M. Kaku, K. Kawakami: Dectin-2- dependent activation of myeloid dendritic cells stimulated with *Cryptococcus neoformans* and its role in the host

defense, 第 39 回日本免疫学会総会学
術集会, 大阪, 2009 年 12 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予
定を含む)

4. 特許取得
特になし

5. 実用新案登録
特になし

6. その他
特になし

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

Candida albicans のプロテインキナーゼを標的とする
抗真菌物質の探索および基礎的解析

研究分担者・上原至雅	岩手医科大学 教授
研究協力者・梅山隆	国立感染症研究所 主任研究官
大野秀明	国立感染症研究所 室長
津田香代子	岩手医科大学 助教
西谷直之	岩手医科大学 講師

研究要旨

深在性真菌症の原因菌として知られる *Candida albicans* の生存に必須なプロテインキナーゼ CaMPS1(mono-polar spindle-1)を新規抗真菌剤の標的候補分子とし、そのキナーゼ活性阻害物質の探索を行った。*in vitro* キナーゼ活性評価法を構築し、化合物ライブラリを利用したスクリーニングから CaMPS1 のキナーゼ活性を阻害する物質として化合物 X (分子量 ; 250.2) を得た。更に、化合物 X による *C. albicans* の増殖抑制効果も認められた。他のチロシンキナーゼ (ヒト由来の EGFR, VEGFR) の活性は阻害しないことから、化合物 X は CaMPS1 選択的に活性抑制作用を発揮し、*C. albicans* の増殖に影響を与えている可能性が高い。また、ヒトホモログである hMPS1 のキナーゼ活性を阻害することが報告されている staurosporine と SP600125 は CaMPS1 に対して阻害効果を示さなかった。薬剤感受性に違いがあることから、MPS1 の構造は種間で異なることが予想され、選択性の高い抗真菌薬開発の可能性が示された。

【研究目的】

カビによる全身性の感染症である深在性真菌症は増加の一途を辿っており、年々問題が深刻になってきている。しかし、真菌はヒトと同じ真核生物であることが選択毒性を有する新薬の開発を困難にしているのが現状である。本研究では、「新しい作用機序を持ち」「副作用がなく」「広い抗菌スペクトラムを有する」という性質を兼ね備えた新しい治療薬の開発を目的として標的候補因子としてプロテインキナーゼに着目した。

C. albicans にコードされている 93 種類のプロテインキナーゼのうち既

に論文等で報告されていた 19 種類を除いて、74 種類のプロテインキナーゼについて遺伝子破壊を試み、遺伝子破壊株が取得できなかったもののうち、*C. albicans* の生育に必須なキナーゼであることが確認されたのが MPS1 である。

MPS1 は元々、酵母の細胞分裂において紡錘体極複製に必須な因子として見出された (EMBO J., 14, 1655-1663, 1995) が、最近では細胞分裂におけるチェックポイントキナーゼとしての機能が明らかになってきており、癌化との関連も示唆され、抗癌剤の標的候

補としても有望視されている。

ヒトホモログとの相同性も比較的低い(36% identity)ことから、CaMPS1を抗真菌剤の新たな標的候補分子とし、機能阻害物質の探索、及び解析を行った。

【研究方法】

1. リコンビナントキナーゼタンパク質の作製

C. albicans の生存必須キナーゼである MPS1 のキナーゼドメイン (CaMPS1-KD) 配列をコードするプラスミドを作製し、大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、His-tag 融合タンパク質として発現させた (図 1)。不溶性タンパク質として発現した MPS1-KD を 8M 尿素で可溶化し、Ni Sepharose (GE Healthcare)にて精製後、希釈透析法によるリフォールディング処理を行った。

2. *in vitro* キナーゼ活性測定

MBP (ミエリン塩基性タンパク質) を基質としたリン酸化反応系を構築し、リコンビナントキナーゼタンパク質 CaMPS1-KD の活性を確認した。検出は反応後タンパク質を SDS-PAGE にて展開し、ゲル中のリン酸化タンパク質を Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (invitrogen)で蛍光染色することにより行った。

3. キナーゼ活性阻害物質の探索

化合物ライブラリのサンプルを反応系に混ぜ、CaMPS1-KD のキナーゼ活性を阻害する物質の探索を行った。一次スクリーニングでは一度に 40 サンプルの阻害効果を確認できるドットプロット法を採用した。反応後のサンプル溶液を PVDF メンブレンに吸着させ、メンブレンを Pro-Q Diamond Blot Stain (invitrogen)で染色し、リン酸化タンパク質を検出した。ここで陽性と判

断したものについて SDS-PAGE→ゲル染色による二次スクリーニングを行い CaMPS1-KD のキナーゼ活性への阻害効果を再確認した。

4. キナーゼ活性阻害物質の *C. albicans* 増殖に与える影響の検証

①増殖阻害効果の経時的測定

一晚培養した菌液を候補物質を含む YPD 培地にて 200 倍希釈し、30°C で培養を行い、660nm における吸光度 (OD660)を経時的に測定し、化合物未処理のコントロールの増殖度と比較した。

②増殖阻害効果の濃度依存性の検証

一晚培養した菌液を候補物質を含む YPD 培地にて 200 倍希釈し、30°C で 8 時間培養後、一定量の菌液を YPD プレート培地にスポットし一晚培養後、増殖コロニーをコントロールと比較観察した。

【実験結果】

1. CaMPS1-KD の活性測定

MBP へのリン酸化を指標にしたキナーゼアッセイ系において、リン酸化 MBP は ATP、MBP、CaMPS1-KD 全てが揃った時にのみ検出されたことから、MBP は ATP 依存に CaMPS1-KD によりリン酸化されることが確認された。

2. CaMPS1-KD 活性阻害物質の同定

CaMPS1-KD のキナーゼ活性阻害物質の探索には微生物、及び植物由来の化合物ライブラリを利用した。純粋化合物が 2442 種、菌培養上清が 800 種、計 3242 サンプルのスクリーニングを行った。その結果、陽性化合物が 4 種 (有効濃度; >1 μ M) 得られた。そのうちの 하나가化合物 X (分子量 ; 250.2) である (図 2)。

3. 化合物 X の *C. albicans* 増殖能への

影響

CaMPS1-KD の活性阻害効果を持つ化合物 X の *C. albicans* 増殖能への影響について検証した。その結果、50 μ M 以上の濃度で強い増殖抑制効果が認められた (図 2)。

4. 化合物 X の他のキナーゼ活性への影響

化合物 X のキナーゼ活性阻害効果が CaMPS1 特異的か否かを検証するために他のキナーゼ (ヒト由来の EGFR, VEGFR) の活性に対する影響を解析した。その結果、いずれのキナーゼに対しても阻害効果は認められなかった (図 3)。

5. staurosporine 、 SP600125 の CaMPS1-KD への阻害効果の検証

非選択的なキナーゼ阻害剤である staurosporine、JNK 阻害剤として知られる SP600125 は human MPS1 (hMPS1/TTK) の活性を阻害することが報告されている (Nature Biotech. 3, 329-336, 2005/ EMBO Rep. 6, 866-872,

2005)。しかし、これら阻害剤は CaMPS1 に対して活性阻害作用は示さないことが分かった (図 4)。また、菌増殖への影響を検討した結果、staurosporine には化合物 X と同程度の増殖抑制効果があることが分かった。つまり、staurosporine は MPS1 非依存の機構で細胞増殖を抑制していると考えられる。

【考察】

C. albicans の生存必須のプロテインキナーゼ CaMPS1 の活性阻害作用を持つ化合物 X は、*C. albicans* の増殖抑制効果も示すことを見出した。即ち、化合物 X による選択的な CaMPS1 キナーゼ活性阻害が細胞増

殖に影響を及ぼしている可能性が高い。また、hMPS1 のキナーゼ阻害剤は CaMPS1 活性を阻害しないことから、MPS1 の構造は種間で異なることが予想され、選択性の高い抗真菌薬開発の可能性が示された。

図 1

