

接合菌の診断系構築に関する研究

研究分担者 掛屋 弘 長崎大学医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座

研究協力者 山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究要旨 主に血液疾患などの免疫抑制患者に発症する深在性真菌症である接合菌症の早期診断に有用と考えられる血清診断法の開発研究を試みた。我々は、前年度に真菌研究における新しいアプローチであるシグナルシークエンストラップ法を利用し、接合菌 (*Rhizopus oryzae*) の膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定して、二つの抗原蛋白質を候補に選出し、本年度はその蛋白精製を行った。

A. 研究目的

接合菌症は白血病などの高度の免疫抑制患者に発症する深在性真菌症である。その頻度は稀であるが、剖検症例の報告では深在性真菌症の原因としてアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスに次ぐ原因真菌であり、特に、白血病（MDSを含む）の剖検例では、接合菌症はアスペルギルス症、カンジダ症に次ぐ、第3位にあたり、血液疾患の主要な死因である。さらにその頻度は近年増加傾向にある。（深在性真菌症の診断・治療ガイドライン2007、協和企画）その治療薬は、わが国では未発売のボサコナゾールとアムホテリシン B 製剤のみが有効であるが、その予後は極めて不良で初期の抗真菌薬選択が重要となる。一方、その診断は、専ら培養による真菌学的検査と病理組織学的検査に限られ、補助診断としての血清学的検査は実用化していない。

我々は真菌研究における、新しいアプローチであるシグナルシークエンストラップ法を利用し、真菌の診断ツールならびに治療薬候補を応用することが期待される膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した後に、モノ

クローナル抗体開発して、接合菌症の早期診断法を確立することを計画した。

前年度は、シグナルシークエンストラップを用いて膜蛋白および分泌蛋白遺伝子の検出を試み、302 の候補蛋白のシークエンスおよび *R. oryzae* のデータベース (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) より遺伝子の同定を行った。その中から、最も多い163のクローンを占めた蛋白（候補A：hypothetical protein、226アミノ酸から構成される約23kDaの蛋白）および2番目に多い45のクローンが得られた蛋白（候補B：predicted protein、486アミノ酸から構成される約46kDaの蛋白）を蛋白抗原の候補として選出した。二つの候補蛋白はシグナルシークエンスを有し、後者はそのシークエンスの特徴から細胞壁のβグルカン合成酵素に関連するタンパク質である可能性が示唆された。

本年度は、二つの蛋白のクローニングから発現ベクターへの遺伝子挿入、タンパク精製～抗体作成を試みた。

（個々のクローンの遺伝子名等は、今後の特

許申請等にも関係があるため本稿には未記載。))

B. 研究方法

1. GST 融合型候補 A-遺伝子発現系構築

5' 側、3' 側の各プライマーを設計した (プライマーは未公表)。5' 側は EcoRI、3' 側は NotI の制限酵素サイトを付加した。

テンプレートを用いて上記プライマーで増幅した PCR 産物と pGEX-4T-1 を EcoRI、NotI で消化しクローニングした。その後、クローニングにてコロニーを複数得て、それらについて配列の確認を行った。そしてクローニングされた遺伝子配列と完全一致した 4 クローン (#1-4) を選抜し、BL21、T7 express の各大腸菌株へ導入し、タンパク質の発現をチェックした。

2. 大腸菌による候補 A-遺伝子発現系構築、pGEX-4T-1 ベクターを用いた発現検討

候補 A 遺伝子 (gene17118) を pGEX-4T-1 ベクターに挿入し、BL21 あるいは T7 express 株に導入した。得られた大腸菌株を 37°C で培養し、OD600nm=0.5 の時点でタンパク質発現誘導した。誘導条件は、15°C 培養、0.5 mM IPTG 添加で行なった。

3. 大腸菌培養による候補 A-遺伝子由来蛋白質の精製

発現を確認したクローン #1 菌株を 3L 培養した。菌増殖後に菌体を回収し、PBS で懸濁した。その後、超音波破碎装置で菌体を破碎し、遠心 (10000xg 1 時間) で上清を回収した。あらかじめ PBS で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア #17-0756-01) に上清を添加し、カラムを PBS で十分に洗浄し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 20 mM グルタチオンを用いて溶出した。

C. 研究結果

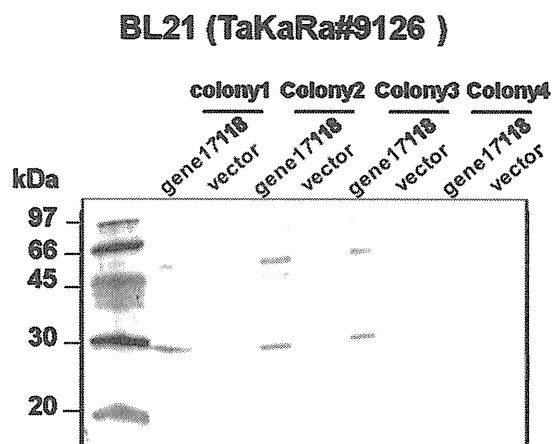
1. GST 融合型候補 A-遺伝子発現系構築

当科の *Rhizopus oryzae* 保存株 (#1327) より得られた遺伝子をテンプレートとしてえられた候補 A のクローニングを行った。その結果、報告されている当該遺伝子の配列と比較してアミノ酸レベルで 3 つの変異が認められたが、他の異なる保存株でも同様にその 3 つのアミノ酸変異が認められた。

2. 大腸菌による候補 A-遺伝子発現系構築、pGEX-4T-1 ベクターを用いた発現検討

両株で目的タンパク質を検出し、候補 A 遺伝子 (gene17118) 由来のタンパク質が発現することを確認した (図 1 には BL21 細胞での発現確認を示す)。

(図 1)



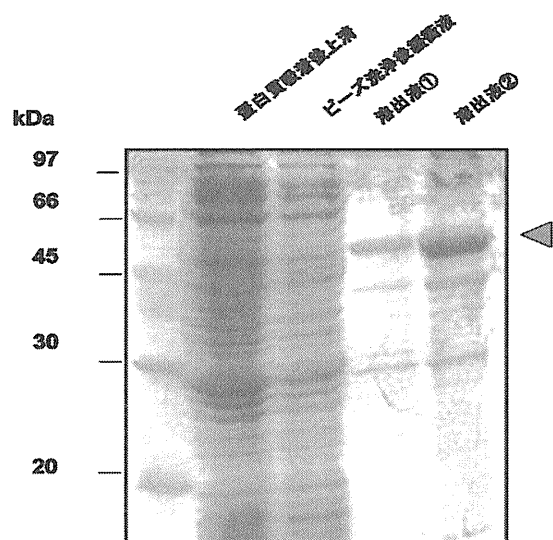
3. 大腸菌培養による候補 A-遺伝子由来蛋白質の精製

発現を確認したクローン #1 菌株を培養後に超音波破碎装置で破碎し、遠心後に上清を Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア #17-0756-01) に添加して、3mg の精製タンパク質を溶出した。

得られたタンパク質の電気泳動を示す (図

2)。目的の 23 kDa に約 30 kDa のマーカーが添付された目的の蛋白が認められた。

(図 2)



D. 考察

初年度に行ったシグナルシーケンストラップ法により比較的多くのクローンが得られた 2 種類の蛋白抗原を候補とし、大腸菌による遺伝子発現系の構築および蛋白精製を試み、候補 A の蛋白の精製に成功した。現在、ポリクローナル抗体の作成を目的として免疫中である。ポリクローナル抗体が得られた後には、ELISA プレートの作成およびその抗体の評価を行う予定である。

また、現在候補 B に関しても、大腸菌によ

る遺伝子発現を試みている。

E. 結論

接合菌の代表菌種である *R. oryzae* よりシグナルシーケンストラップ法を用いてえられた二つの蛋白抗原を候補として、大腸菌を用いて発現を試みた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. なし

学会発表

1. なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

1. なし

実用新案登録

1. なし

その他

1. なし

アスペルギルス症の診断系構築

研究分担者 山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究協力者 大西和夫 国立感染症研究所 免疫部

研究要旨 アスペルギルス症の診断はアスペルギルスガラクトマンナン抗原検出法が比較的信頼性の高い検査として使用されているが、未だに感度、特異度など課題の多い検査である。これまでに、哺乳類の細胞表面および分泌蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ(SST-REX)法を用い、*Aspergillus fumigatus* の膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行い113種類の遺伝子を得ることができた。今年度は、その中から B11a 遺伝子とそのホモログ B11b 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系構築を試みた。

A. 研究目的

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全者の増加などに伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。その中でもアスペルギルス症はもっとも頻度が高いと考えられている。現在、アスペルギルス感染症の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検出系は、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、より感染実態を反映するアスペルギルス感染症の早期診断系の確立が求められている。

このような背景のもと、アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象に、早期診断系の作製を念頭に新たな標的抗原の検索を行い、その検出系の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

SST-REX 法で得られた分泌蛋白質、膜蛋白質をコードすると考えられる遺伝子の中で、B11a 遺伝子とそのホモログ B11b 遺伝子の cDNA を pGEX-6P-His6-FLAG、pMAL-c4X-Strep-tagII に入れ、大腸菌を使い大量産生を行った。GST あるいは MBP との融合蛋白質を、Glutathione Sepharose カラムあるいはアミロース resine カラムにより精製し、抗体の産生、ウエスタンブロット、サンドイッチ ELISA のコントロールに使用した。

2. 抗 B11a, B11b ウサギポリクローナル抗体の作製

Maltose binding protein-B11a-Srep-tag II (MBP-B11a-S)、Maltose binding protein-B11a-Srep-tagII (MBP-B11a-S) それぞれ 2.1 mg をウサギ（日本白色種）に免疫し ELISA 法にて抗体価を調べた。全血を回収後、血清を調整した（イワキ株式会社）。

3. 抗 B11a, B11b モノクローナル抗体産生

ハイブリドーマの作製

GST-B11a-His6-FLAG、GST-B11a-His6-FLAG それぞれ 50 ug を BALB/c マウスに免疫した。抗体価の上昇したマウスに関して、ブーストをかけ脾臓細胞を調整後、ポリエチレングリコールによるミエローマ細胞との細胞融合を行った。HAT 培地によりハイブリドーマのセレクションを行った。その後、増殖してきたハイブリドーマの培養上清を用い、MBP-B11a-S あるいは MBP-B11b-S を吸着させた 96 穴プレートで ELISA 法により抗 B11a あるいは抗 B11b 抗体産生細胞を選んだ。マウスの使用にあたっては、「国立感染症研究所・動物実験計画指針」等の規則に基づいて、動物愛護に細心の注意を払って実験を行なった。

4. 抗体の精製

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体は、いずれも protein G セファロースカラムにより精製した。

5. サンドイッチ ELISA 系の構築

モノクローナル抗体は、NHS-LC-biotin (PIEACE 社) を用いビオチン化した。大腸菌で作製した蛋白質を 5 mg/ml 50 μ l/well で 96 穴マイクロプレートに吸着させ、抗原プレートを作製し、これを用いてビオチン化した抗体の力価を確認しサンドイッチ ELISA の二次抗体として濃度を検討した。

サンドイッチ ELISA の条件検討のため、修飾していない各濃度のモノクローナル抗体を用いた抗体感作プレートを作製し、1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0 μ g/ml の各濃度の組換え体蛋白質を反応させ、さらに二次反応としてあらかじめ濃度を決めたビオチン化抗体を反応させた。その後 Neutravidin-POD を反応させた、酵素発色基質を加え発色させ、450nm で吸光度を測定した。

C. 研究結果

1. モノクローナル抗体の作製

B11a, B11b 遺伝子産物についてモノクローナル抗体の作製を行った。この蛋白質は、約 20 kDa の分子量を有し、他のアスペルギルス属にもホモロジー持つ蛋白質である。大腸菌により大量産生した、GST-B11a-His6-FLAG、GST-B11b-His6-FLAG をマウスに免疫し、MBP-B11a-S あるいは MBP-B11b-S を用いた ELISA 系にて抗体価の上昇を確認後、ブーストをかけたのち、脾臓細胞を調整した。ミエローマとの細胞融合を行い、得られたハイブリドーマそれぞれ約 1000 クローンを ELISA にてスクリーニングし、最終的に B11a に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 6 種類、B11b に対するハイブリドーマ 9 種類を得た。タイピングにより産生される抗体はすべて IgG クラスであることが分かった。それぞれのハイブリドーマから産生抗体を精製し、大腸菌で作製した融合蛋白質を用い、ウェスタンブロット法および ELISA 法を行い力価、特異性の検討をした。

2. B11a, B11b 蛋白質検出のためのサンドイッチ ELISA 系の構築

B11a, B11b 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系としてポリクローナル抗体とモノクローナル抗体で挟む系を構築することを試みた。一次抗体をモノクローナル抗体、二次抗体をビオチン化ポリクローナル抗体、発色には Neutravidin-POD を 2 次抗体に吸着させ、TMB で発色させる系を考え条件検討した。一次抗体は、得られたモノクローナル抗体のうち抗体価の比較的高いものを一種類選び、条件検討の後、最終的に一次抗体 10 μ g/ml、二次抗体 1 μ g/ml の濃度に決めた。ブロッキング剤は 5% BSA を

用いた。標準蛋白質として大腸菌で作製した MBP との融合蛋白質を用い、300 pg/ml

までの検出感度を得ることが出来た (図 1)。

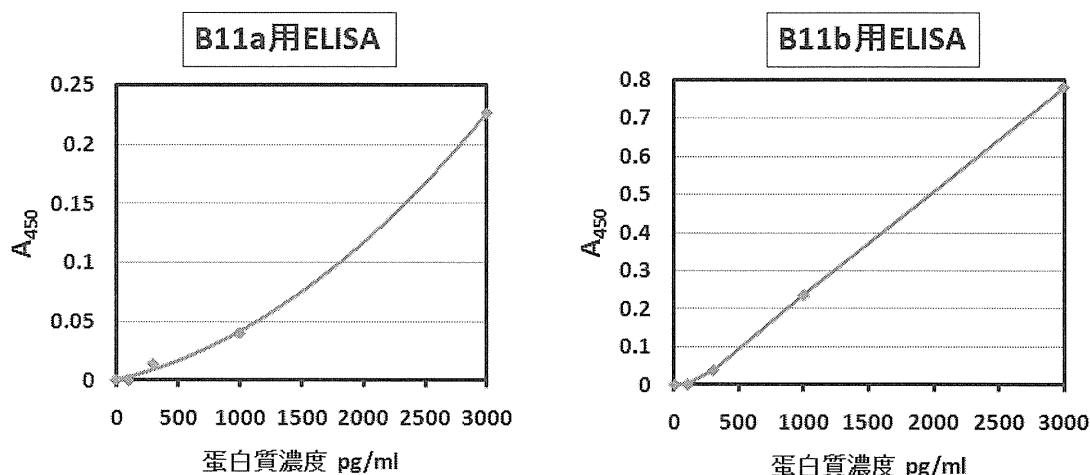


図 1. B11a, B11b 蛋白質のサンドイッチ ELISA の標準曲線

D. 考察

B11a, B11b とも分泌蛋白質であり *A. fumigatus* の培養上清の生化学的解析で B11a 蛋白質に糖鎖修飾がされている結果が得られている。対して B11b での糖鎖修飾の可能性が低い結果を得ている。今回構築した ELISA 系は、大腸菌の蛋白質を用いて構築したため、糖鎖修飾の影響を受ける可能性があり、今後細胞上清等を用いた検証が必要と考えられる。

E. 結論

SST-REX 法を用いて得られた *A. fumigatus* の細胞外蛋白質のなかで 2 つの蛋白質 B11a, B11b についてプロトタイプ のサンドイッチ ELISA 系の構築を行った。大腸菌で合成した標準蛋白質を用いて 300 pg/ml の感度を得た。

G. 研究発表

学会発表

国内学会

1. 宮崎義継, 田辺公一, 梅山 隆, 山越 智, 渋谷和俊, 大野秀明. 診断ワークショップ5 深在性真菌症の病理 深在性真菌症における臨床的課題. 第100回日本病理学会総会. 4月28-30日, 2011年.
2. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越 智, 渡邊 浩, 宮崎義継. 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコッカス症多発発生例からの分離株のMLSTによる疫学的検討. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年, 東京.
3. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* の Mps1 キナーゼの新たな抗真菌薬ターゲットとしての可能性の検討. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日,

- 2011年, 札幌.
4. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 宮崎義継. 遺伝子診断法を用いた土壤中に生息するヒストプラスマ属検出の試み. 第85回日本感染症学会総会・学術講演会. 4月21-22日, 2011年.
 5. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus*属分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチELISA法によるアスペルギルス症診断系構築の試み. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
 6. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 宮崎義継. 国立感染症研究所における地域流行型真菌症への対応と現状. 第32回関東医真菌懇話会学術集会. 5月21日, 2011年, 東京.
 7. 大野秀明, 田辺公一, 杉田 隆, 畠山修司, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 亀井克彦, 宮崎義継. 国内で初めて分離されたVGIIa型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第59回日本化学療法学会総会. 6月23-25日, 2011年.
 8. 大野秀明, 田辺公一, 梅山 隆, 金子幸弘, 山越 智, 宮崎義継. クリプトコックス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*). 衛生微生物技術協議会第32回研究会. 6月29-30日, 2011年.
 9. 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. アスペルギルス属の病原性制御にむけたアプローチ. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 10. 梅山 隆, 大野秀明, 田辺公一, 山越 智, 宮崎義継. 標準化MLST解析法を用いたわが国のクリプトコックス属臨床分離株の分子疫学解析. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 11. 梅山 隆, 山越 智, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* MPS1キナーゼの化学的・遺伝学的アプローチによる解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 12. 大川原明子, 金城雄樹, 上野圭吾, 山越智, 梅山 隆, 樽本憲人, 大野秀明, 新見昌一, 宮崎義継. β 結合型マンノースを欠失したカンジダマンナンは樹状細胞の炎症性サイトカイン産生を増強する. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 13. 山越 智, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 橋本ゆき, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus*の分泌蛋白質B-11およびそのホモログの検出系と病原性について. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
 14. 大野秀明, 大川原明子, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山 隆, 山越 智, 泉川公一, 藤井 毅, 竹村 弘, 岸 一馬, 河野 茂, 宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus*属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. ワークショップ3 深在性真菌症の新たな展開—重症例、難治症例の病態と治療—. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.
 15. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継. 日本とタイにおける遺伝子

検出法を用いた環境生息ヒストプラスマ属の検出. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.

特記事項なし。

16. 大野秀明, 田辺公一, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. 本邦初の北米流行型*Cryptococcus gattii*臨床分離株の実験的病原性解析. 第55回日本医真菌学会学術集会. 10月21-22日, 2011年, 東京.
17. 田辺公一, 大野秀明, 梅山 隆, 山越 智, 知花博治, 宮崎義継. *Candida glabrata* 臨床分離株におけるキャンディン感受性とFKS遺伝子の解析. 真菌分子細胞研究会. 11月12-13日, 2011年, 香川.
18. 田辺公一, 大野秀明, 金子幸弘, 梅山隆, 山越 智, 金城雄樹, 杉田 隆, 畠山修司, 亀井克彦, 渋谷和俊, 宮崎義継. *Cryptococcus gattii*国内分離株の病原因子解析. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会. 10月26-28日, 2011年, 山形.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. アスペルギルス・フミガーツス感染症の検査、予防及び治療のための方法並びに組成物

PCT 国際出願 PCT/JP2011/068454

2011.8.12 出願

発明者:宮崎 義継、山越 智、梶川 益紀、杉浦 雅仁、伊藤 玲子

特許取得

特記事項なし。

実用新案登録

特記事項なし。

その他

