

# 平成 26 年度 共同利用・共同研究報告

## 2014 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '14-1

### *Aspergillus fumigatus* のアゾール系薬剤耐性 に 関与する転写因子 AtrR と SrbA の協調的発 現制御機構の解明

五味勝也

(東北大学大学院農学研究科)

川本 進・清水公徳・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Concerted regulatory mechanism for gene expression involved in azole drug resistance by transcription factors, AtrR and SrbA, in *Aspergillus fumigatus*

Katsuya Gomi

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku  
University)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Daisuke  
Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

麹菌 *Aspergillus oryzae* において見出されたアゾール系薬剤耐性に関する新規 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型転写因子 AtrR は、*Aspergillus nidulans* や *Aspergillus fumigatus* にも共通のオーソログとして見出され、それぞれの *atrR* 遺伝子の破壊株では、野生株より 100 倍も低い薬剤濃度でも感受性を示すことを見出した。興味深いことに、*A. fumigatus* の RNA-seq 解析により、AtrR は Cdr1B/AbcC トランスポーターだけでなく、Cyp51A を含むエルゴステロール生合成酵素遺伝子の発現にも関わっていることが示され、エルゴステロール生合成酵素の発現は、すでに報告のある bHLH 型転写因子 SrbA と協調的に制御されている可能性が示唆された。そこで、本研究ではエルゴステロール合成経路ならびに薬剤排出トランスポーターの遺伝子の

発現に AtrR と SrbA がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

*A. oryzae* において AtrR-GFP 融合タンパクの観察から、AtrR は薬剤の有無や低酸素などの条件にかかわらず常に核内に局在することが示された。一方、GFP-SrbA 融合タンパク質を用いた解析により、SrbA は薬剤添加や低酸素条件下で核膜または小胞体から核内へ移行することが認められ、2 種類の転写因子の活性化機構は異なることが示唆された。*atrR* 破壊株と *srbA* 破壊株を用いて互いの転写因子の細胞内局在を調べたが、いずれの破壊株も野生株と細胞内局在に違いは認められなかった。同様に、転写因子の発現も一方の遺伝子破壊によって影響は受けなかった。エルゴステロール生合成に関わる遺伝子はどちらか一方の遺伝子破壊によって著しい発現低下が認められたものの、*srbA* 破壊では ABC トランスポーター遺伝子の発現に影響は見られなかった。

一方、*A. fumigatus* でも同様に作製した *atrR* 破壊株と *srbA* 破壊株は低酸素条件下では生育が著しく悪くなり、ともにエルゴステロール生合成経路の遺伝子の発現量が低下したが、ABC トランスポーター遺伝子 (*cdr1B*) の発現は *atrR* 破壊株のみで顕著な低下が観察された。また、マウスを用いた感染性試験により、いずれの破壊株も病原性の著しい低下が認められた。さらに、千葉大学病院から単離された *A. fumigatus* のアゾール耐性株 (IFM 61567) において *atrR* 破壊を行ったところ、イトラコナゾールなどのアゾール薬だけでなくもともと効果が認められないフルコナゾールに対しても高い感受性を示すことが明らかになった。異なるタイプの耐性変異を有する耐性株における *atrR* 破壊株の取得を目指すとともに、AtrR と SrbA のシスエレメントの同定ならびに共免疫沈降試験による両転写因子の相互作用の有無を解析している。

## 研究課題 '14-2

### 新興強毒性真菌 *Cryptococcus gattii* の高病原性機序の免疫学的解析

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

川本 進・清水公徳

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Immunological analysis of a mechanism for high pathogenicity of *Cryptococcus gattii*

Kazuyoshi Kawakami, Keiko Ishii

(Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai)

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

1999年にカナダのバンクーバー島で *Cryptococcus gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生し、その後アメリカ合衆国の北西沿岸地域を中心に拡大しつつある (CDC-Morbidity and Mortality Weekly Report Vol.59, No.28, 2010). 2007年には、わが国でも国内感染と考えられる *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告されている (Emerg. Infect. Dis. 16: 1155-1157, 2010). 通常の *C. neoformans* によるクリプトコックス症と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、その高い致死率から高病原性クリプトコックス症とも呼ばれており、今後新興感染症として大きな問題に発展することが懸念される。本研究では、*C. gattii* と *C. neoformans* に対する免疫応答性を比較することで、本感染症の病態解明の手掛かりを探ることを目的とする。

*C. neoformans*, *C. gattii* に遺伝子銃を用いて OVA 発現ベクターを導入し、それぞれ 9 株、8 株を得た。C57BL/6 マウスの気管内に OVA 遺伝子導入菌株を感染させ、2 週後の所属リンパ節細胞を同抗原で再刺激し IFN- $\gamma$  産生を検出することで菌体内における OVA の発現を確認した。MHC クラス II 拘束性に OVA を認識する T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス (OT-II) の気管内に OVA 発現 *C. neoformans* を感染させたところ、

2 週後の肺内での IFN- $\gamma$  産生が非トランスジェニックマウスに比べ有意な増強を示した。これらの結果から、*C. neoformans* と *C. gattii* に共通な OVA 抗原に対するヘルパー T 細胞応答と、それぞれの真菌感染下での影響について詳細に解析することが可能となった。今後は、本実験系を用いることで、*C. neoformans*, *C. gattii* 感染下における免疫応答の相違点について解析を進め、*C. gattii* 感染症の高病原性機序の解明を目指したい。

## 研究課題 '14-3

### *Cryptococcus neoformans* の特異なゲノム安定化機構の分子基盤

—それを標的とした新規治療戦略を目指して—  
その 2

松浦 彰・今成百利子

(千葉大学大学院融合科学研究科)

川本 進・東江昭夫・高橋弘喜

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Molecular basis for specific regulation of genome integrity in *Cryptococcus neoformans* and its application to the development of novel therapeutic strategies

Akira Matsuura, Yuriko Imanari

(Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba University)

Susumu Kawamoto, Akio Toh-e, Hiroki Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

*Cryptococcus neoformans* は環境に常在する担子菌酵母であり、主に免疫機能の低下した人に感染し重篤なクリプトコックス症を引き起こす日和見感染真菌として知られている。本菌は、環状プラスミドが維持できない、遺伝子ターゲティングの効率が悪く、導入された直鎖状 DNA 断片の末端に高頻度でテロメア反復配列が付加される、など DNA 修復に関連するユニークな性質をもつことが明らかにされている (Edman, 1992)。本研究では、染色体末端の維持機構という観点から *C. neoformans* 特有

のゲノム維持機構を明らかにし、さらにこのような特有のゲノム維持機構が *C. neoformans* の生活環とどのように関連し、あるいはどのように制御されているかを明らかにすることを目的とした。

昨年度の共同利用・共同研究において、*C. neoformans* 一倍体細胞でテロメアDNA伸長酵素テロメラゼの相同遺伝子 *CnEST2* の遺伝子破壊を行い、*CnEST2* 遺伝子の細胞増殖における機能を解析した結果、本菌においても他生物種と同様、染色体末端の維持にはテロメラゼの活性が必須であることが明らかにしている。本年度はさらに、*S. cerevisiae* においてテロメラゼ欠損時に染色体末端維持に関与することが明らかになっている相同組換え、非相同末端結合に関する遺伝子に注目し、それらが *C. neoformans* における特異なDNA修復経路選択にどのように関わっているかに焦点を当て解析を進めた。まず、ゲノム中に *RAD52*, *RAD51*, *MRE11*, *DMC1* の相同遺伝子を見だし、それらの遺伝子破壊株を作製してその表現型を解析した結果、本菌では *RAD52* のDNA修復における重要性は低く、一方で *RAD51* 欠損はより severe な表現型となることが明らかになった。この傾向は、相同組換えが優先的におきる *S. cerevisiae* とは異なり、むしろ高等動物における相同遺伝子破壊の表現型と類似しており、興味深い。今後は、テロメラゼ活性の制御に必要な分子の探索をさらに進めつつ、テロメラゼ、組換え関連因子を含めたDNA末端修復機構の選択制の違いが生じる機構を分子の側から解析することで、この生物種の特異なDNA損傷修復のメカニズムと生理的意義を明らかにしたいと考えている。

## 研究課題 '14-4

### 病原真菌における一酸化窒素の合成機構と生理機能の解析

高木博史

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

川本 進・知花博治・東江昭夫・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Analysis of synthetic mechanism and physiological role of nitric oxide in pathogenic fungus

Hiroshi Takagi

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Susumu Kawamoto, Hiroji Chibana, Akio Toh-e, Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

一酸化窒素 (NO) はシグナル分子として、哺乳類の幅広い生命現象に関与している。最近、高木らは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NOがアセチルトランスフェラーゼ Mpr1 およびフラボタンパク質 Tah18 依存的にアルギニンから合成され、酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。一方、病原真菌はヒトに感染する際、自然環境と生体内の劇的な環境変化 (温度、酸素濃度、栄養など) によるストレスに曝される。真菌はこれらのストレスに応答し、耐性を獲得することで、増殖や病原性を示すことから、NOが真菌のストレス耐性や病原性の発揮に関与する可能性が考えられる。本研究では、*S. cerevisiae* と同様のNO合成経路の存在が示唆される病原真菌 (*Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) について、NO合成と増殖、ストレス耐性などとの関連性を解析する。平成26年度には、以下の研究成果が得られた。

- 1) *C. glabrata*: Tah18のオルソログ遺伝子 (*CgTAH18*) の発現抑制株をマウスのマクロファージに貪食させたところ、野生型株に比べてマクロファージ内での増殖率が高かったことから、*CgTAH18*が病原性に関与している可能性が示唆された。
- 2) *C. neoformans*: Tah18のオルソログ遺伝子 (*CnTAH18*) が生育に必須であることが判明したため、銅イオンで発現を誘導する系を構築し、銅キレーター添加によって生育が悪化することを確認した。また、NO特異的蛍光プローブを用いて、アルギニンの添加により細胞内にNOが生成していることが観察できた。
- 3) *A. fumigatus*: Mpr1のオルソログ遺伝子 (*AfMPR1*) の破壊株と高発現株を作製し、表現型を解析したところ、Mpr1と同様に *AfMPR1* がアセチルトランス

フェラーゼをコードしていることが示唆された。しかしながら、これらの株は高温ストレスや酸化ストレスに対して、野生型株と変わらない表現型を示した。また、NO特異的蛍光プローブを用いて、過酸化水素の添加により細胞内にNOが生成していることが観察できた。

今後、Mpr1, Tah18のオルソログ遺伝子の破壊株、発現抑制株、高発現株を用いて、細胞内NOレベルを定量するとともに、ストレス耐性などの表現型を観察することで、病原真菌においてMpr1やTah18がNOの合成と生理機能に関与するかどうか検討する。

## 研究課題 14-5

### 病原性真菌を弱毒化するマイコウイルスの探索と抗菌性素材開発に向けた検討

森山裕充

(東京農工大学大学院農学研究院)

川本 進・五ノ井透・東江昭夫

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Development of antifungal proteins derived from mycoviruses which attenuate host fungus

Hiromitsu Moriyama

(Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Susumu Kawamoto, Tohru Gono, Akio Toh-e

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

これまでの研究において、我々はイネいもち病菌に感染して生育阻害をもたらすマイコウイルス *Magnaporthe oryzae* chrysovirus, MoCV1-A由来のタンパク質のうち、ORF4が抗菌活性を有することをパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子発現系の利用により明らかにしてきた。また、MoCV1-A ORF4完全長(820残基)が、ヒト病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* に対しても、異常な液胞化や生育速度の減少、そして莢膜多糖形成の抑制が生育阻害効果を有することが確認されてきた(原著論文1)。

そこで本研究においては、*C. neoformans*に導入する

タンパク質サイズを短縮化することを目的として、まず、パン酵母遺伝子発現系を利用することにより、MoCV1-A ORF4の抗菌活性領域を短縮化する研究を行った。その結果、ORF4中心領域の250アミノ酸が、完全長ORFと同等の抗菌をパン酵母に対して示すことが明らかにされた。次に同定された短縮化されたタンパク質に相当する遺伝子配列を、川本進教授の研究室で開発された *C. neoformans* 発現ベクターに連結させる作業を行い、ベクターを完成させることが出来た。今後は、*C. neoformans*にこれらベクターを導入して、完全長ORF4と同等な抗菌活性を有することを検討していく。

アスペルギルス症の原因となり、重篤化をもたらす病原真菌 *Aspergillus fumigatus* に対する新たな薬剤開発を目的として、五ノ井教授の研究グループは、*A. fumigatus* を弱毒化する新規なマイコウイルスの探索とその応用研究を、高橋梓博士を中心として行っているが、本研究課題においては、マイコウイルス探索や同定に関して共同研究を行っている。これまでの探索研究の結果、4種のマイコウイルス由来の2本鎖RNAゲノムが同定されており、このうち、2種に関しては、宿主菌に生育阻害をもたらすことなどが確認できており、マイコウイルスである *Partitiviridae* 属と *Chrysoviridae* 属に分類されるが、既報のウイルスとは類似性は示すが同一ではなく、新種であることが確認されている。今後、宿主菌に対する作用機作などについての検討や、短縮化したMoCV1-A ORF4の効能などについても、共同研究を継続させることで実施していくことが望まれる。

### 発表論文

- 1) Urayama S, Fukuhara T, Moriyama H, Toh-E A, Kawamoto S. Heterologous expression of a gene of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A disrupts growth of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Immunol.* 58(5): 294-302 (2014)

## 研究課題 '14-6

### *Cryptococcus neoformans* の低酸素応答転写因子 Crz1/Sp1 のシグナリング解析

川本 進・清水公德・大楠美佐子・萩原大祐  
(千葉大学真菌医学研究センター)

Raclavsky, Vladislav  
(チェコ・パラツキー大学)

Sipiczki, Matthias  
(ハンガリー・デブレツェン大学)

関水 和久・松本 靖彦  
(東京大学大学院薬学系研究科)

田村 裕  
(千葉大学大学院医学研究院)

三浦 恵  
(横浜市立大学大学院医学研究科)

### Signaling analysis of transcription factor Crz1/Sp1 for hypoxia adaptation in *Cryptococcus neoformans*

Susumu Kawamoto, Kiminori Shimizu, Misako Ohkusu, Daisuke Hagiwara  
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Vladislav Raclavsky  
(Palacky University, Czech)

Matthias Sipiczki  
(University of Debrecen, Hungary)

Kazuhiisa Sekimizu, Yasuhiko Matsumoto  
(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)

Yutaka Tamura  
(Graduate School of Medicine, Chiba University)

Satoshi Miura  
(Graduate School of Medicine, Yokohama City University)

### 研究成果

病原酵母 *Cryptococcus neoformans* は、我が国に常在する真菌のうちで最も病原性が強く、易感染患者、特に、エイズ患者の直接死因としても臨床的に極めて重要な真菌である。本菌は生育に酸素が必須な偏性好気性酵母であるが、自然環境からヒトに感染時、肺に感染して血流に

乗り血液脳関門を通過後、脳内に至って髄膜炎等を起こすと考えられており、高酸素環境（自然環境、肺）から低酸素環境（血流、脳内）への劇的な酸素濃度変化などに打ち勝って初めて増殖し病原性を示す。本菌の「低酸素状態に対する環境応答」は本菌の病原性発揮にも深く関連する病原因子のひとつと考えられ、我々は本菌の低酸素応答遺伝子として「転写因子 Crz-1/Sp-1」を得て低酸素応答機構の分子解析を進めているが、更に、本菌の新たな別の低酸素応答遺伝子を以下のようにして得た。まず、*Agrobacterium* 法による形質転換を用いて、ゲノムランダム挿入ミュータントライブラリーを作製し、その中から低酸素環境非適応株を選抜した。次に、選抜された菌株の T-DNA 挿入部位をシーケンス解析によって特定することができ、相同組換えによりその遺伝子破壊株を作製した。そして、その遺伝子破壊株の低酸素条件下における性質を解析するために、生存率測定や RT-PCR や薬剤感受性試験を行った。生存率測定から、遺伝子破壊株が野生株よりも低酸素条件下の生存率が低いことが確認できた。また、RT-PCR によって、野生株は低酸素条件下で真菌細胞膜合成に関わる遺伝子の発現量の増加が認められたが、遺伝子破壊株においてはその遺伝子発現の増加はあまり認められなかった。新たに得た低酸素応答遺伝子と、すでに本菌の低酸素応答遺伝子として解析を進めている「転写因子 Crz-1/Sp-1」との関連を更に調べつつあり、*C. neoformans* の低酸素ストレスに対する環境応答シグナリング機構の解明を目指している。

上記のように、我々は *C. neoformans* の細胞周期制御機構の研究の中で、特異な低酸素応答現象を見出し、解析を進めて来たが、従来すでに詳細な研究が進められ、多くの知見が蓄積されて来ているモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞周期制御機構についても、バイオインフォマテクス解析などを用いて更なる解析、考察を行ったところ、*S. cerevisiae* の細胞周期制御において、最も重要な役割を果たしていると言われる制御因子「サイクリン-1 分子 (Cln1)」と「サイクリン-2 分子 (Cln2)」の分子構造機能的な差異が、ユビキチン-プロテアソーム経路によるという、新たな重要な知見を得て、その分子機構のモデルも提出して、論文として発表した。

### 発表論文

- 1) Suganami A, Takase N, Sugiyama H, Virtudazo EV, Kawamoto S, Tamura Y: Structure based functional

distinction between Cln1 and Cln2 depends on the ubiquitin-proteasome pathway.

*J. Proteomics Bioinformatics* 7: 102-107 (2014)

## 研究課題 '14-7

### 病原真菌の mild heat stress 応答分子の機能評価と診断・治療への分子基盤

長 環・永尾潤一・田中芳彦

(福岡歯科大学)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Functional evaluation and application of mild heat stress responded molecules in pathogenic fungi.

Tamaki Cho, Junichi Nagao, Yoshihiko Tanaka

(Fukuoka Dental College)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## 研究成果

ヒトの発熱や外部加温による mild heat stress (39°C ~ 41°C) は、ヒト常在病原性真菌 *Candida albicans* のバイオフィルムに対する薬剤感受性を亢進した (Cho T et al: BPB, 2012). 平成25年度センター共同利用研究にて、37°C および 39°C における *C. albicans* のバイオフィルム形成時の遺伝子発現を網羅的に探索した。平成26年度はさらに解析を進め、37°C と比較して 39°C で発現が増加する遺伝子として *HYR* (菌糸形細胞壁タンパク質をコードする)、逆に 39°C で発現が減少する遺伝子として *YWP* (酵母形細胞壁タンパク質をコードする) や *TEP1* (酵母形細胞壁関連タンパク質をコードする) など細胞壁に関連する遺伝子群に変化が見られることを明らかにした。

以上の結果は温度による菌体の表層構造の変化を示唆するものであり、抗原性に変化が見られる可能性も考えられる。そこで各温度で増殖した *C. albicans* のバイオフィルムを抗原として、マウス骨髄細胞由来樹状細胞とナイーブ T 細胞の培養系で抗原応答を検討した。IL-17 を産生するヘルパー T 細胞の誘導能を細胞内サイトカイ

ン染色後にフローサイトメトリーにより評価した。解析の結果 (n = 3), 平均値が 37°C の抗原に対して 39°C の抗原で 1.6 倍の IL-17 産生能を示した ( $p < 0.1$ )。2°C の温度変化による T 細胞の分化誘導は弱いながら認められたので、39°C で何らかの抗原変化があると考えられる。

温和な加温に対する菌体の薬剤感受性の変化および宿主細胞の応答の変化は、薬剤投与方法などへの応用も考えられる。

## 研究課題 '14-8

### *Candida glabrata* の糖鎖合成に關与する遺伝子欠損株の性質の解析

柴田信之・工藤 敦・伊藤文恵・田中 大

(東北薬科大学薬学部)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Analysis of the cell wall integrity of *Candida glabrata* glycosyltransferase deletion mutants

Nobuyuki Shibata, Atsushi Kudoh, Fumie Itoh, Yutaka Tanaka

(Tohoku Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana,

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## 研究成果

*Candida glabrata* の細胞壁糖鎖生成に關与する各種の遺伝子欠損株について細胞壁の構造および性質の解析を行い、特に大きく変化の見られた *alg6* Δ 株と *mnn2* Δ 株について細胞壁に与える影響を詳細に解析した。細胞壁グルカンはアルカリ可溶性画分、酸可溶性画分、アルカリ・酸不溶性画分に分画し解析した。キチンの定量はエルソン・モルガン法により行った。グルカン結合性キレートキシンに対する感受性は増殖阻止円の測定により行った。マンナン構造解析はアセトリシス、<sup>1</sup>H NMR 分析、メチル化分析により行った。細胞壁グルカン層およびマンナン層の形態変化は透過型電子顕微鏡により解析した。

*alg6* Δ 株は SDS, Calcofluor white 等の薬剤感受性、β-1,3-

グルカナーゼ感受性が上昇し、TEMでもマンナン層が薄く不鮮明になっていた。しかし、micafunginおよびキラーチンに対する感受性は逆に低下し、キチン含量は野生株の2倍以上に増加していた。*alg6*Δ株はマンナンの構造に変化が見られなかったが分子サイズは低下していた。*mnn2*Δ株はマンナンの側鎖が失われα-1,6-結合の直鎖構造に変化していた。しかし、薬剤感受性等に著しい変化は見られなかった。カイコを用いた感染実験の結果、*alg6*Δ株は野生株と比較して大きく病原性の低下していることが明らかとなった。これらの結果は特に*alg6*Δ株では細胞壁合成系の酵素活性の低下が生じ、細胞壁 integrity の低下から病原性の低下につながっていることを示唆している。細胞壁構造の変化が免疫系細胞による認識に影響を与えている可能性も検討している。

#### 研究協力者

川上和義

(東北大学大学院医学系研究科)

高橋 梓, 山口正視

(千葉大学真菌医学研究センター)

#### 研究課題 '14-9

#### *Candida glabrata* バイオフィーム形成に関する遺伝子群の機能解析

梶原 将・Xinyue Chen

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

#### Function analysis of genes related with the biofilm formation in *Candida glabrata*

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Susumu Kajiwara, Xinyue Chen

(Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology)

#### 研究成果

病原真菌 *Candida glabrata* は種々のカンジダ症(真菌症)の主要起因菌の一種で、この真菌種が医療デバイス等の表面にバイオフィームを形成すると、高い抗真菌剤耐性を有することが知られている。そこで、我々は未だあまり研究が進んでいない *C. glabrata* のバイオフィーム形成機構に注目し、この真菌の細胞壁結合タンパク質を網羅的に解析することで、その分子機構を明らかにし、当該真菌症の治療や対策の礎となりうる情報を提供することとした。

*C. glabrata* のバイオフィーム形成に関係すると考えられる分泌シグナルペプチド領域と膜貫通領域を有すると考えられる102のタンパク質をコードする遺伝子を選定し、それら遺伝子の破壊株を用いてプラスチックプレート上でのバイオフィーム形成を観察し、それらを野生株のものと比較解析した。

その結果、102の遺伝子の中の5つの遺伝子の破壊株において、*C. glabrata* のバイオフィーム形成量が明らかに減少したことが分かった。それら遺伝子は、脂質トランスポーター *Arv1p*、MFS トランスポーター *Qdr2p*、2つのERからゴルジ体へのタンパク質輸送に関わるタンパク質 *Syc2p* と *Syn8p*、細胞ストレスに関係するタンパク質 *Frt2p* をコードしていると推測された。その中で、*SYC2* と *SYN8* 遺伝子についてさらに詳細に解析したところ、これらの遺伝子破壊株が医療デバイス材料として用いられているシリコン表層でもバイオフィーム形成が野生株よりも減少し、それらバイオフィームをSEMで観察したところ、バイオフィーム形成の初期過程での細胞接着性が特に減少していることが分かった。加えて、これらの株は、ハイグロマイシンB、コンゴレッド、SDSに対する感受性が増加することも分かった。一方、*QDR2* を破壊した株でも、シリコン表層上でのバイオフィーム形成では、野生株と比べ明確な差が認められた。

今後、さらに詳細な解析を進めることで、これらのタンパク質がどのようにしてバイオフィーム形成に関わっているのかのメカニズムを明らかにする予定である。

## 研究課題 '14-10

### 線虫を用いた *in vivo* 抗真菌活性物質スクリーニングと作用点の研究

水野貴之・文谷政憲

(徳島文理大学大学院工学研究科ナノ物質工学専攻)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Constriction of the drug screening system of *Candida glabrata* pathogenicity vsing *Caenorhabditis elegans* as a host

Takayuki Mizuno, Masanori Bun-ya

(Tokushima Bunri University)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

我々は、線虫とカンジダ・グラブラータを用いた新しいアッセイ系を確立させ、殺菌効果をもつ化合物のスクリーニングを目指している。

カンジダ・グラブラータを餌として一時間、線虫に摂取させ、その後大腸菌を餌とし、20℃で飼育するとカンジダ・グラブラータは腸内に定着し、25℃で培養すると腸内でのカンジダ・グラブラータが増加し致死率が上昇することを我々はこれまでに報告した。本研究において、抗真菌薬フルコナゾールを線虫に投与した場合、腸内のカンジダ・グラブラータは減少し致死率も未感染のレベルまで回復することが分かった。これに対して *sek-1* (自然免疫系の遺伝子) に欠損を持つ線虫と同様の実験を行ったところ、25℃の培養で致死率が著しく増加するが、フルコナゾールの投与した場合、*sek-1*欠損系統においても、生残率が改善した。野生型と *sek-1*欠損を持つ系統をすりつぶして生菌数を調べたところ、野生型では、フルコナゾールの添加によって腸内のカンジダ・グラブラータが死滅しており、*sek-1*欠損系統では、菌数は少ないものの生菌が一定レベルで存在していることが分かった。これらの結果から、線虫体内においてフルコナゾールがカンジダ・グラブラータに対して静菌的に作用し、自然免疫系によって殺菌されていることが示唆

された。また、限られた量の化合物を使用するにあたり、より高感度な実験系の開発を試みた。腸内に定着したカンジダ・グラブラータは、CTC染色によりライブイメージが観察可能であり、線虫内の生菌数を推定することができる。本実験系は96穴プレートでの解析が可能となった。現在、東大の創薬オープンイノベーションセンターより分与された化合物ライブラリーを用いて、スクリーニングを進めている。

## 研究課題 '14-11

### ショウジョウバエを使った真菌の感染実験系の開発

倉石貴透・倉田祥一朗

(東北大学大学院薬学研究科)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Development of a fugal infection system using *Drosophila*

Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

日和見感染症に代表される感染症を引き起こす病原真菌の病原性発現機構は、依然として不明であり、大きな脅威となっている。真菌医学研究センター知花准教授は、*Candida glabrata*を用いて、ゲノムワイドに5150遺伝子を組換えた変異体ライブラリーを作成している。このリソースを用いると、病原性の発現に関わる遺伝子を網羅的に探索できる。しかしながら、マウスなどの哺乳動物を宿主として用いて、網羅的に解析することは、現実的に不可能である。一方、自然免疫研究によく利用されているショウジョウバエは、遺伝子操作が容易であるばかりか、生活環が短く網羅的に解析に優れている。また、すでに確立されている自然免疫変異体を用いることで、病原性がどのように発現しているのかを分子レベルで解

析できる。

本研究では、まず *C. glabrata* をショウジョウバエに感染させる感染実験系を確立した。そのために、研究目的、すなわち、真菌リソースを利用した網羅的解析を達成させるために、通常の感染実験で用いるマイクロインジェクション法ではなく、タングステンニードルを用いた体表傷害法を検討し、数千レベルでの感染実験が可能となった。一方、真菌医学研究センターでは、体表傷害法に適した真菌の培養法と、東北大学に輸送可能な方法を確立した。次に、免疫系に関与することが知られている遺伝子の欠損ショウジョウバエに野生型の *C. glabrata* を感染させ、その後の生存率を測定することで、易感染宿主のモデルとしてスクリーニングに適したショウジョウバエシステムを探索した。その結果、真菌感染抵抗性を制御している Toll 受容体の上流の因子である *psb* と *modSP* を欠損させた変異体において、感染後の生存率が有意に低下しており、易感染宿主のモデルとしてスクリーニングに最適であることがわかった。そこで、真菌の生育には必須ではない約2,500遺伝子を欠損した系統について、感染実験を行い、病原性が低下した系統を58系統、病原性が高まった系統を30系統同定した（第37回日本分子生物学会年会で発表：カンジダ酵母の病原性を規定する遺伝子の網羅的同定：ショウジョウバエ成虫への殺傷能力を指標としたカンジダ非必須遺伝子欠損株のスクリーニング：渡辺亮，倉石貴透，青山俊弘，中山浩伸，知花博治，倉田祥一郎）。これらの変異体で病原性が変化した理由を明らかにすることで、病原真菌の病原性発現機構の一端が明らかに出来るものと期待している。

## 研究課題 '14-12

### 感染に応答した自然免疫誘導の分子機構の解析

藤田尚志・加藤博己

(京都大学ウイルス研究所)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Innate immune responses against pathogen infection

Takashi Fujita

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Hiroki Kato

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において、RIG-I-like 受容体 (RLR) は細胞内に侵入した非自己 RNA を検知するセンサー分子として必須な役割を担っている。本研究は、最近明らかにした細胞内ストレス顆粒 (SG) の形成を介した RLR シグナル誘導の分子機構について解析することを目的とした。

これまでの共同研究から、Pumilio と呼ばれる RNA 結合タンパク質が、RLR を介したシグナルに何らかの役割を担っていることを示唆する結果を得ていた。そこで本研究では、この Pumilio のウイルス感染応答および SG 形成への関与などについて詳細な解析を行った。その結果、1) Pumilio が三種の RLR のうち LGP2 と特異的に会合していること、2) ウイルス感染に反応して SG に共局在すること、3) Pumilio が LGP2 とウイルス由来二本鎖 RNA との会合の増強に補助的に働くことなどが明らかとなった。これらの結果は、RLR による非自己ウイルス RNA 認識における Pumilio タンパク質の新たな機能を明らかにしている。さらに、これらの成果を含め RLR の機能とウイルス RNA 検知の分子メカニズム、SG 形成とその重要性などについての総説を共同で 2 報執筆し報告した。

## 発表論文

- 1) Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T: Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 32: 48-53, 2015.
- 2) Narita R, Takahashi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T: A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection. *PLoS Pathog*, 10: e1004417, 2014.
- 3) Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T: Antiviral innate immunity and stress granule responses. *Trends Immunol*, 35: 420-428, 2014.

## 研究課題 '14-13

### 自然免疫受容体を介した真菌核酸認識機構の解析

河合太郎

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Recognition of fungal nucleic acids by pattern recognition receptors

Taro Kawai

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## 研究成果

自然免疫を介する核酸認識機構を理解する上で細胞内RNAヘリカーゼRIG-I-like receptors (RLRs)に着目し研究を行った。その結果、RLRsファミリーの一つであるMDA5の機能を負に制御する新たな制御因子Arl5Bを同定することができた。Arl5BはArf/Arlファミリーに属する低分子量G蛋白質であるが、その機能については

不明な点が多い。また、これまでの研究からArf/Arlファミリー分子はRIG-Iを始めとする自然免疫系を制御することも示唆されている。これらのことから我々はArlファミリー分子群に着目し、これらに対する発現ベクターを構築しMDA5とともに培養細胞へ発現させインターフェロンβ遺伝子プロモーター活性化を指標にスクリーニングを行ったところ、Arl5Bの過剰発現がMDA5によるインターフェロンβ遺伝子プロモーター活性化を有為に抑制した。更なる解析からMDA5とArl5Bが結合することを見いだした。また、MDA5に対する抑制効果はArl5BのGTP/GDP結合活性に依存しなかった。これらのことからArl5BはMDA5に直接結合することでその機能を抑制すると考えられた。そこでArl5B欠損マウスを作成し解析を行った。Arl5B欠損マウスは胎生致死であったため胎児繊維芽細胞を樹立し解析に用いた。その結果、Arl5B欠損細胞においてはMDA5アゴニストであるPoly I:Cや脳心筋炎ウイルスに対するインターフェロンβの発現や転写因子IRF3とNF-κBの活性化が野生型と比して上昇していた。以上の結果から、Arl5BはMDA5の抑制因子として機能していることが示された。今後、真菌核酸に対するArl5BならびにRLRsの役割を明らかにしていく予定である。

## 発表論文

- 1) Kitai Y, Takeuchi O, Kawasaki T, Ori D, Sueyoshi T, Murase M, Akira S, Kawai T: Negative regulation of Melanoma Differentiation-associated Gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like Protein 5B. *J Biol Chem*, 290: 1269-80, 2015.

## 研究課題 '14-14

### 宿主免疫応答とRNAサイレンシングのクロストークの分子機構

程久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Crosstalk between RNA silencing and host immune responses

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

高等真核生物では、ウイルス感染に対する生体防御機構としてインターフェロンの誘導を伴う自然免疫応答機構が発達している。自然免疫応答では、米山らが見出したRIG-I, MDA-5, LGP2などのウイルスセンサータンパク質が重要な役割を果たす。一方で、小分子非コードRNAによるRNAサイレンシングも、2本鎖RNAの侵入やウイルス感染に対する生体防御機構の1つであり、これら2つの機構は、共通にRNAによって惹起されるため、相互に調節し合うクロストークの機構が存在することが想定される。平成26年度には、両経路に共通に関わる因子であることを独自に見出したTrans-activating response (TAR) RNA-binding protein (TRBP) と、ウイルスセンサータンパク質のRNAサイレンシング機構における機能を解析した。

RNAサイレンシングでは、小分子RNAがArgonauteと呼ばれるタンパク質へ取り込まれて、初めてその遺伝子抑制機能を発揮する。TRBPは小分子RNAのArgonauteへの取り込みを促進することで、RNAサイレンシング活性を促進する。そこで、ウイルスセンサータンパク質のRNAサイレンシング効果に対する影響を、それらのノックダウンによるレポーターアッセイ

や強制発現によって検討したところ、RIG-IはRNAサイレンシング活性を抑制する作用があることがわかり、TRBPと何らかの機構で拮抗することが想定された。さらに、小分子RNAとTRBPやウイルスセンサータンパク質との相互作用をゲルシフトアッセイで解析した結果、TRBPのみでなく、RIG-IとLGP2も小分子RNAと相互作用することが明らかになった。これらの機能的意味を明らかにし、より詳細な解析を行うため、現在、CRISPRゲノム編集システムを用いたこれらの因子のヒトノックアウト細胞株の作製を進めている。

さらに、我々は、アポトーシスで活性化されるカスペアーゼによって、TRBPがプロセシングを受けて構造変換することも明らかにしている。そこで、免疫応答反応とRNAサイレンシング機構において、プロセシングによる構造変換によって、TRBPが異なる機能を示す可能性についても検討した。その結果、プロセシングされた後のTRBPはRNAサイレンシング活性を促進する効果が消失していることが明らかになった。さらに、プロセシング前後のTRBPと相互作用する二本鎖RNAをRNA免疫沈降シークエンスによって解析した結果、相互作用している二本鎖RNAの種類が大きく異なることがわかってきた。今後は、プロセシング前後のTRBPと相互作用する二本鎖RNAの特徴を明らかにし、TRBPの免疫応答機構における機能の解明を目指す。

## 研究課題 '14-15

### 真菌認識機構 Dectin を標的とした新規難治性喘息の治療機軸の確立

廣瀬晃一・中島裕史

(千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター 感染免疫分野)

### Roles of Dectin-1 and Dectin-2 in the development of allergic airway inflammation.

Koichi Hirose, Hiroshi Nakajima

(Allergy and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

真菌への暴露，感作は喘息の重症化に関与することが知られているが，そのメカニズムに関しては不明な点が多い．本研究では真菌認識機構である Dectin-1, Dectin-2 のアレルギー性気道炎症発症における働きを解析した．野生型マウス，Dectin-1欠損マウス，Dectin-2欠損マウスを用いてチリダニ（HDM）誘発性アレルギー性気道炎症を惹起し，気管支肺洗浄液（BALF）中の炎症細胞浸潤，気道過敏性，縦隔リンパ節T細胞分化，およびサイトカイン産生能を比較検討した．その結果，Dectin-2欠損マウスでは，野生型マウスに比べてHDM投与後のBALF中への好酸球浸潤，肺組織における気道周囲への好酸球，リンパ球浸潤が減少しており，気道過敏性も低下していた．また，Dectin-2欠損マウスでは縦隔リンパ節T細胞からのIL-5, IL-13, IL-17産生が低下していることが明らかとなった．さらにそのメカニズムを解明した結果，Dectin-2は肺に局在するCD11b陽性樹状細胞からのサイトカイン産生を制御することによりHDM特異的Th2細胞分化，Th17細胞分化を促進していることが明らかとなった．

既に我々はDectin-1もアレルギー性気道炎症に関与することを示唆するデータを得ており，現在そのメカニズ

ムを解析中である．

### 発表論文

Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 ;51:201-9. doi: 10.1165/rmb.2013-0522OC.

## 研究課題 '14-16

### 結核菌細胞壁成分を認識する新規受容体の探索と免疫賦活への応用

米川晶子・三宅靖延・石川絵里・

大洞将嗣・山崎 晶

(九州大学生体防御医学研究所)

西城 忍・米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria.

Akiko Yonekawa, Yasunobu Miyake, Eri Ishikawa, Oh-hora, Sho Yamasaki

(Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Shinobu Saijo, Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

結核菌などの抗酸菌に特有の細胞壁の成分のうち，マンノース付加リポアラビノマンナンは宿主の免疫応答に対し抑制性と刺激性の両方の活性を示すことが知られている．しかし，その多面的な作用を説明しうるような受容体は，はっきりとは同定されていない．本研究では，C型レクチン受容体であるDectin-2がマンノース付加リポアラビノマンナンの受容体であることを見出した．マンノース付加リポアラビノマンナンはDectin-2に依存して樹状細胞を活性化し，炎症性サイトカインおよび抑制性サイトカインの産生を誘導した．また，Dectin-2を介して樹状細胞において抗原に特異的なT細胞の応答を増強することもわかった．さらに，マウス自己免疫疾患モデルにおいてマンノース付加リポアラビノマンナンのもつアジュバント活性が明らかにされた．実際の感染において，Dectin-2ノックアウトマウスは肺における病態の悪化を示した．以上より，病原真菌に対する感染防御

に必須の役割を示すDectin-2が、真菌だけではなく、マンノース付加リポアラビノマンナンを認識することにより抗酸菌に対する宿主の免疫応答にも寄与することが明らかになった。

尚、本研究はNature Review Immunology誌のHighlightで紹介された (Nat. Rev. Immunol., 14, 648-649, 2014).

### 発表論文

Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria.

Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S.

Immunity. 41 (3):402-13. 2014.

### 研究課題 '14-17

#### 真菌感染に対する免疫応答におけるカルシウムシグナル役割の解明

大洞将嗣

(九州大学生体防御医学研究所)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究所)

#### Elucidation of the role of calcium signaling in immune response to fungal infection

Masatsugu Oh-hora

(Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いて、真菌感染防御に重要なC型レクチン受容体Dectinファミリーにおけるカルシウム流入-カルシウムシグナルの制御機構と機能を解析した。PLC- $\gamma$ の下流で活性化される“ストア作動性カルシウム (SOC) 流入”を欠損するBMDCを用いた解析の結果、Dectinファミリーはリガンド刺激によってSOC流入を活性化することが明らかとなった。またSOC流入欠損BMDCでは、リガンド刺激による

IL-2, GM-CSFの産生が有意に低下していた。さらに、SOC流入欠損BMDCによるT細胞のプライミングも部分的に低下していた。

次に、真菌感染防御における樹状細胞のカルシウムシグナルの役割を個体レベルで解析するために、樹状細胞特異的にSOC流入を欠損するマウスにカンジダ菌のSC5314株を投与した。その結果、コントロールとノックアウトマウスの生存率に変化はなかった。そこで、別株のATCC18804株を投与した場合、ノックアウトマウスでは生存率が低下していたが、統計的有意差は出なかった。以上から、カンジダ菌に対する感染防御において、樹状細胞のSOC流入の関与はそれほど大きくない可能性が示唆された。しかし、他の免疫応答に参与している可能性を排除することはできず、さらなる解析が必要である。

### 研究課題 '14-18

#### スエヒロタケ感作による気管支喘息重症化メカニズムの解明

廣瀬晃一・中島裕史

(千葉大学大学院医学研究院 アレルギー・臨床免疫学)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター 臨床感染症分野)

渡邊 哲

(千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部)

#### Roles of sensitization to *Schizophyllum commune* in the development of severe asthma

Koichi Hirose, Hiroshi Nakajima

(Allergy and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Department of Control and Treatment of Infectious Diseases, Chiba University Hospital)

## 研究成果

真菌への暴露，感作は喘息の重症化に関与することが知られている．スエロタケ（SC）は喘息，アレルギー性気管支肺真菌症（ABPM）の発症に関与することが報告されている真菌だが，これまでにSC特異的抗体の効率的なスクリーニング方法の報告は無く，喘息患者におけるSC感作率は不明である．我々はこれまでの共同研究によりSCによるABPM患者血清を用いて主要抗原を探索・同定し，この主要抗原を用いてSC特異的抗体測定ELISA法を確立した．このELISA法を用いて喘息患者における感作率を検討した結果，47名の喘息患者（Step2 6名，Step3 29名，Step4 12名）中，4名がSC特異的IgG陽性，6名がSC特異的IgE陽性であることが明らかとなった．さらにSC特異的抗体陽性喘息患者と陰性喘息患者の呼吸機能を比較した結果，SC特異的IgE陽性喘息患者は陰性喘息患者に比較し1秒率（FEV1.0）が有意に低下していることが明らかとなった．SC特異的抗体陽性患者はアスペルギルスに対しても感作が成立している傾向がみられたが，SC特異的IgE抗体価とアスペルギルス特異的IgE抗体価は相関しなかった．今後はSC感作とアスペルギルス感作，それぞれの気管支喘息重症化における働きを解析するため予定である．

## 研究課題 '14-19

### アムホテリシンBによる *Aspergillus fumigatus* バイオフィーム産生の抑制効果についての研究

秦 亮・渡邊 浩

（久留米大学医学部感染制御学講座：2014年4月に久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門より教室名称変更）

亀井克彦

（千葉大学真菌医学研究センター臨床感染症分野）

### Basic research for anti-biofilm effect formed by *Aspergillus fumigatus* using amphotericin B

Liang Qin, Hiroshi Watanabe

（Department of Infection Control and Prevention, Kurume University School of Medicine）

Katsuhiko Kamei

（Division of Clinical Research, Medical Mycology Research Center, Chiba University）

## 研究成果

人に感染症を引き起こす病原体として *Aspergillus fumigatus* は非常に重要であり，近年，感染の増加傾向が報告されている．*A. fumigatus* は主に経気道感染し，侵襲性アスペルギルス症，アスペルギローマや慢性壊死性肺アスペルギルス症などを引き起こす．また，肺病変から全身性播種性病変をつくることもある．感染防御能の低下した患者において，アスペルギルス症などの深在性真菌症は，発症件数ならびに治療の困難さの面でも，臨床治療上重要な課題とされている．近年，亀井，渡邊らは *A. fumigatus* によるバイオフィームの産生を報告し，重要な生育因子としてFetuinとの濃度依存性的な関連を示唆した（Int J Med Microbiol., 2012）．アムホテリシンBはアスペルギルス感染症に対しての臨床効果は認められているが，同病原体が産生するバイオフィームに対する抑制効果については未だ明らかになってはいない．

我々は96穴マイクロプレートに *A. fumigatus* を接種し，バイオフィームの産生を確認後，0.1xMIC，1xMIC，10xMICのアムホテリシンBを添加し，バイオフィームの抑制効果についてMicrotiter biofilm assayで評価した．アムホテリシンBの0.1xMIC存在下ではOD595で2.69，1xMIC存在下で0.057，10xMIC存在下で0.056と濃度依存性のバイオフィームの抑制効果が確認された．今後は様々な状態においても同様な効果が得られるかどうかを確認し，臨床効果との相関についても検討していく予定である．

## 発表論文

- 1) Qin L, Kida Y, Ishiwada N, Ohkusu K, Kaji C, Sakai Y, Watanabe K, Furumoto A, Ichinose A, and Watanabe H. The relationship between biofilm formations and capsule in *Haemophilus influenzae*. J Infect Chemother, 20: 151-156, 2014.

## 研究課題 '14-20

### アスペルギルスのバイオフィーム形成および抗真菌薬耐性に関連する新規遺伝子群の探索

梅山 隆・宮崎義継

(国立感染症研究所)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Screening of novel genes involved in biofilm formation and antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*

Takashi Umeyama, Yoshitsugu Miyazaki

(National Institute of Infectious Diseases)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

深在性真菌症の中でも *Aspergillus fumigatus* を主要病原菌とするアスペルギルス症は増加傾向にあり、予後が非常に悪い。近年、アスペルギルスのバイオフィーム形成がアスペルギルス感染に関与することが示唆されている。特にアスペルギローマ（菌球）の菌糸塊に見られる菌糸周囲には厚い細胞外マトリクスが観察されている。このようなバイオフィームを形成する状態では、いくつかの抗真菌薬に対する感受性が低下する現象が示され、難治性の原因の1つになっていると考えられる。しかしながら、バイオフィーム形成、および、それによる抗真菌薬耐性の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、バイオフィーム形成に関わる新規遺伝子を同定し、抗真菌薬耐性との関連性を明らかにすることを目的とする。平成26年度では、一次配列からプロテインキナーゼと予測される *A. fumigatus* の *AUK4* が菌糸生育やバイオフィーム形成に及ぼす影響を検討した。

ハイグロマイシン耐性マーカーを含むカセットDNAを *A. fumigatus* AfS35株に形質転換し、*AUK4* 遺伝子破壊株を作製した。さらに、遺伝子を戻し、相補株を作製した。これらの株を用いて、生育および分生子形成の観察を行った。遺伝子破壊株の寒天培地上のコロニー生育速度は親株と比べて約75%に低下し、分生子形成効率は

大幅に低下した。親株では血清添加によってバイオフィーム形成量が増加するが、遺伝子破壊株ではその増加は観察できなかったことから、*AUK4* が血清刺激にตอบสนองしたバイオフィーム形成に関与することが示唆された。今後、*AUK4* を手がかりとして、血清刺激にตอบสนองしたバイオフィーム形成におけるシグナル伝達機構の役割を解明していく。

## 研究課題 '14-21

### Sialylglycopeptide が *Aspergillus fumigatus* 生育と biofilm 形成に及ぼす影響

豊留孝仁

(帯広畜産大学)

亀井克彦・高橋弘喜・八尋真希

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Effect of sialylglycopeptide on the growth and biofilm formation of *Aspergillus fumigatus*

Takahito Toyotome

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei, Hiroki Takahashi, Maki Yahiro

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

近年、*Aspergillus fumigatus* がその感染過程においてバイオフィームを形成することが明らかとなってきた。これまでの研究で血清糖タンパク質フェツインAがバイオフィーム形成を促進することが明らかとなってきた。さらなる検討から、フェツインAのN-結合型糖鎖が重要な役割を果たしていると推測された。また、新たな観点からの研究としてフェツインA添加が *A. fumigatus* の遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを検討してきた。そこで、本研究ではフェツインAのN-結合型糖鎖構造の *A. fumigatus* の遺伝子発現に及ぼす影響について、N-結合型糖鎖構造をもつシアリルグリコペプチド (SGP) を用いて検討を行った。

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、SGP添加時に *A. fumigatus* において発現が4倍以上上昇する遺伝子もしくは低下する遺伝子をそれぞれ

れ42遺伝子, 75遺伝子見いだした。これら遺伝子のうち, フェツインA添加時にも共通して4倍以上発現が上昇もしくは低下する遺伝子はそれぞれ1遺伝子, 6遺伝子が見いだされた。フェツインAおよびSGPのいずれを添加しても上昇する遺伝子はMajor facilitator superfamily (MFS) 型トランスポーターをコードしている。一方, 共通して低下する遺伝子のうち, 3つの遺伝子はゲノム上で近接していた。この3つの遺伝子を含むゲノム領域では9つの遺伝子がいずれもSGP添加により発現量が大きく低下しており, 共通して遺伝子発現制御を受けていることが示唆された。

これらの遺伝子について, これまでに詳細な解析はなされていない。今後, これら遺伝子の機能を解析することにより, *A. fumigatus* バイオフィルム形成に関する詳細な分子メカニズムが明らかになると期待される。

## 研究課題 '14-22

### 病原真菌・放線菌の休眠遺伝子を利用した新規抗感染症薬リード化合物の獲得

久保田高明

(北海道大学大学院薬学研究院)

五ノ井透

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Development of lead compound for new anti-infective agent using silent gene of pathogenic fungi and bacteria

Takaaki Kubota

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

### 研究成果

化合物生産性が明らかにされていない病原性放線菌のうち *Nocardia terpenica* IFM0555の生産する成分について精査した結果, *Nocardia terpenica* IFM0406の生産する brasilicardin A (アミノ酸トランスポーターSystem Lの強力な阻害により免疫抑制活性を示す) および関連化合物

を生産している事が明らかになったが, 新規化合物の単離には至らなかった。

また, 次世代シーケンサーによりゲノム解析が行われている数種の *Nocardia* 属放線菌に関して, 構造の新規性が高い化合物の生合成遺伝子である事が期待される trans-ATタイプのポリケチド合成酵素遺伝子の探索を行ったが, 存在を確認する事はできなかった。

一方, 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 2012-7-4A株の培養上清の成分を精査し, 新規鎖状ポリケチド amphidin C~Gを単離, 構造決定した。これら新規化合物および同時に得られた既知の鎖状ポリケチド amphidin Aおよびマクロリド amphidinolide Qの抗菌活性を評価した結果, amphidin C~Gおよび amphidinolide Q全てが *Trichophyton mentagrophytes* に抗菌活性を示す事が分かった。また, amphidin Aは *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* に, amphidin CおよびEは *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* に, amphidinolide Qは *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* に抗菌活性を示す事が分かった。

### 発表論文

- 1) Kubota, T.; Iwai, T.; Sakai, K.; Gono, T.; Kobayashi, J. "Amphidinins C-F, amphidinolide Q analogues from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp." *Org. Lett.* 2014, 16, 5624-5627.
- 2) Kubota, T.; Iwai, T.; Ishiyama, H.; Sakai, K.; Gono, T.; Kobayashi, J. "Amphidin G, a putative precursor of amphidin A from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp." *Tetrahedron Lett.* 2015, 56, 990-993.

## 研究課題 '14-23

### 膣カンジダ症発症とカンジダ・アルビカンスの遺伝子型に関する研究

神戸俊夫

(名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター)

矢口貴志・田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Study on *Candida albicans* genotypes relating with vaginal candidiasis

Toshio Kanbe

(Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University)

Takashi Yaguchi, Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

*Candida albicans*は口腔、皮膚、膣などの常在性真菌として知られ、カンジダ症のほとんどがこれら常在性カンジダ酵母による内因性感染である。これまでに、健常者口腔に由来する*C. albicans*のマイクロサテライト領域に基づいた遺伝子型解析で5つの主要遺伝子型 (genotype 1, 2, 3, 4, 5) の中で, genotype 5は健常者に由来する*C. albicans*のみにみられる型であり, genotype 2, 3はカンジダ症病巣部に由来する*C. albicans*の主要遺伝子型であることを示してきた。本研究では、膣カンジダ症患者病変部より分離した86株の*C. albicans*の遺伝子型を2種類のマーカー(CDC 3, CAI)により解析し、これまでの結果と比較した。結果、膣カンジダ症の場合も, genotype 5 (健常者由来*C. albicans*特異的) *C. albicans*は認められなかった。カンジダ症病巣部に由来する*C. albicans*でみられるgenotype 2および3については、ほとんどがgenotype 2 *C. albicans* (7%)で, genotype 3 *C. albicans*の分離率は1%であった。これらの結果はカンジダ血症患者に由来する*C. albicans*と同じであった。現在, genotype 2 *C. albicans*の健常者膣における分布に関する解析に加え, genotype 2および5 *C. albicans*の生物学性状についての比較を進めている。

## 研究課題 '14-24

### 真菌認識に重要な自然免疫受容体Dectin-1及びDectin-2の抗腫瘍応答における役割の解析

柳井秀元・谷口維紹

(東京大学生産技術研究所)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

### Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses

Hideyuki Yanai, Tadatsugu Taniguchi

(Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

#### 研究成果

がんに対する新たな治療法として、最近、免疫療法に大きな期待が寄せられている。古くから自身の免疫系ががん細胞を認識し、排除することがわかっていたが、その機構としては、獲得免疫系によるがん細胞の認識機構がよく知られており、免疫系のもう一つの軸である自然免疫系がどのようにしてがん細胞を認識し、その排除を促しているのか、という点については不明な点が多く残されていた。

本研究では、免疫細胞の一種であるマクロファージが樹状細胞に発現するC型レクチンファミリー分子のDectin-1が、がん細胞を直接認識することで、自然免疫系が活性化され、その結果がん細胞が体内から排除されることを明らかにした。

本研究は、病原真菌に対する感染防御に必須の役割を担っている自然免疫受容体がん細胞を認識し、その排除を促していることを世界に先駆けて明らかにしたもので、今後、新しいがんの治療法や予防法の開発へとつながることが期待される。

尚、本研究はeLife誌のInsightで紹介された。

## 発表論文

Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses.

Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai

S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y, Taniguchi T.

eLife. 3:e04177. 2014 (doi: 10.7554/eLife.04177.)