

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08472

研究課題名(和文) 白癬において起因菌酵素による膜受容体の活性化を起点に生じる痒みのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of serine protease involved in proteinase-activated receptor 2-mediated itch in dermatophytosis.

研究代表者

山田 剛 (Yamada, Tsuyoshi)

帝京大学・医真菌研究センター・准教授

研究者番号：80424331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：白癬で生じる痒みのメカニズムへの関与の可能性が指摘されている表皮ケラチノサイトの膜受容体Protease-activated receptor 2 (PAR-2)を特異的部位で切断し活性化させる白癬菌由来のトリプシン様セリンプロテアーゼの同定を試みた。

白癬菌*A. vanbreuseghemii*のゲノムシーケンスデータを利用して選抜した候補遺伝子を酵母で発現させた組換えタンパク質に基づくアプローチに加え、カラムクロマトグラフィーによる本菌細胞抽出液からのタンパク質精製に基づくアプローチにしたがってトリプシン様セリンプロテアーゼの同定を目指したが、目的とする分子の同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The detailed mechanisms of pruritus in dermatophyte infections remain poorly understood. Previously, among the endopeptidases, trypsin-type serine proteases secreted from the dermatophyte *A. vanbreuseghemii* were suggested to cause itching through activation of the proteinase-activated receptor-2, a member of the G-protein-coupled receptors, which may be one of the causal mechanisms of the pruritus associated with dermatophytosis. The aim of this study was to identify trypsin-type serine proteases from this fungus.

Based on the whole genome sequence data, several candidate genes were selected and expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Two recombinant proteins were successfully obtained, both of which showed no trypsin-like substrate specificity. We simultaneously challenged purification of trypsin-type serine proteases from a mycelial extract of the fungus by column chromatography. However, the isolation of desired proteases with trypsin-like substrate specificity was not achieved.

研究分野：医真菌学

キーワード：痒み 白癬 白癬菌 プロテアーゼ トリプシン

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では“国民病”と言われるほど罹患率が高い皮膚糸状菌症(白癬)において、“痒み”は極めて身近で不快な症状である。しかしながら、起因菌である白癬菌が組織への侵入を進める過程で痒みが発生するそのメカニズムは未だ不明な点が多い。今から5年ほど前、“マウスの掻き動作の回数”を指標に確立された“痒みの動物評価モデル”を利用して、白癬における痒みの発生メカニズムの解析が行われ、「皮膚表層の大部分を占めるケラチノサイトの膜に局在する受容体(Protease-activated receptor 2, PAR-2)の活性化を起点とする経路が関与していること」、そして「パラサイトである白癬菌が産生するプロテアーゼの中に、PAR-2分子をその細胞外アミノ(N-)末端側ペプチド鎖内の特定の部位で切断し、PAR-2分子の活性化に寄与するものがあること」など、新たな知見が報告された(Andoh T *et al*, J Pharmacol Exp Ther, 2012)。

## 2. 研究の目的

PAR-2は三量体Gタンパク質共役型膜受容体で、ポリペプチド鎖のN-端側にある細胞外露出領域にトリプシンの認識部位(アルギニン)がある。PAR-2は、トリプシン様の基質特異性を有する特定のエンドセリンプロテアーゼによって上記アルギニンのカルボキシル(C-)末端側で特異的に切断され、受容体活性化配列が露出することにより活性化される。

これまで、トリプシン様の基質特異性を有するプロテアーゼが白癬菌から単離された例は見られない。しかしながら、上記論文において実施された実験を通じて、白癬菌において産生されたトリプシン様の基質特異性を示すセリンプロテアーゼがPAR-2ポリペプチド鎖の特異的部位での切断および分子の活性化に関与していることが示唆されている。

そこで、表皮ケラチノサイトの膜に存在するPAR-2ポリペプチド鎖の特異的部位での切断および分子の活性化に関与する白癬菌由来トリプシン様セリンプロテアーゼの同定と単離を試み、白癬菌の感染によって生じる痒みのメカニズムの解明につなげていくことが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

今から5年ほど前に、主要な白癬菌群のゲノムシーケンスデータが公開され、多種多様なプロテアーゼ遺伝子がゲノム上に存在することが明らかになると共に、白癬菌の遺伝子情報の蓄積が進んでいる。しかしながら、白癬菌のゲノム中には、トリプシンのホモログ(オーソロ

グ)をコードすることが強く示唆される遺伝子は認められない。また上記の通り、過去にトリプシン様の基質特異性を有するプロテアーゼが白癬菌から精製された例も見られない。

そこで白癬菌のゲノムシーケンスデータを利用して、翻訳産物中にトリプシン様のモチーフ(ドメイン)を含むことが予想され、さらに他の糸状菌のプロテアーゼ遺伝子の情報との比較を通じてセリンプロテアーゼをコードすることが予想される遺伝子の検索を行い、解析の候補となる遺伝子(TSLP)の選抜を進めていった。

遺伝子操作の系が確立されている白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* を材料に用い、上記 TSLP の候補として選んだ3個の遺伝子(AvTSLP1-3)の各々について、相同組換えによる遺伝子破壊株の作出を試みた。また、RT-PCR法を用いてAvTSLP1-3のcDNAを単離した。単離したcDNAは各々発現ベクターに組み込んで酵母 *Pichia pastoris* に導入し、組換えタンパク質(rAvTSLPs)の発現を試みた。そして、組換えタンパク質の発現が確認されたものについては、その基質特異性を解析し、目的とするトリプシン様の基質特異性を有するセリンプロテアーゼの同定を進めた。

一方、組換えタンパク質を利用したトリプシン様セリンプロテアーゼの同定と並行して、サブローデキストロースブロスを用いた液体培養によって得られた *A. vanbreuseghemii* の発育菌糸の凍結粉砕物から細胞粗抽出液を調製し、硫安分画法および(アフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過を組み合わせた)カラムクロマトグラフィーによるトリプシン様セリンプロテアーゼの精製を試みた。

## 4. 研究成果

上記の通り、トリプシン様のモチーフ(ドメイン)、そして他の糸状菌のプロテアーゼ遺伝子情報を利用したホモロジー検索を通じて、最終的に3個の遺伝子(TSLP1-3)を選抜した。そして、液体培養で得られた *A. vanbreuseghemii* の発育菌糸から total-RNA を調製し、RT-PCR法を用いて、各遺伝子の cDNA(AvTSLP1-3)を単離した。さらに、組換えタンパク質を用いた解析や、カラムクロマトグラフィーによるタンパク質精製の後、目的とするプロテアーゼに対して遺伝学的視点からの解析を加えるために、*A. vanbreuseghemii* のゲノム上にある AvTSLP1~3 の各々について相同組換えによる遺伝子破壊用コンストラクトを構築し、遺伝子破壊株の作出を試みた。アグロバクテリウム法を用いた遺伝子破壊実験の結果、各遺伝子の破壊株を作出することができた。得られた遺伝子破壊株の発育速度を解析したところ、

*AvTLSP2* のみ、親株や他の破壊株に比べて菌糸の発育速度の低下が認められた(データ割愛)。

RT-PCR 法を用いて単離した3個の *AvTSLP* cDNA の各々について発現ベクターを構築し、酵母 *P. pastoris* に導入して組換えタンパク質 (rAvTLSPs) の発現を試みた。その結果、*AvTSLP1* (AvARB\_01633)、そして *2* (AvARB\_00131) を導入した *P. pastoris* において、組換えタンパク質 (rAvTLSP1、rAvTLSP2) の発現が確認された。そこで、質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用いたインスリンβ鎖消化産物の分子量測定に基づく rAvTLSP1 および rAvTLSP2 の基質特異性解析を試みた。その結果、何れの組換えタンパク質もプロテアーゼ活性は認められたものの、アルギニンの C-末端側を切断する活性は示さず、rAvTLSP1 は主に疎水性アミノ酸残基の C-末端側を、rAvTLSP2 はロイシンとチロシンの間を優先的に切断することが示唆され、トリプシン様の基質特異性を有するセリンプロテアーゼの同定には至らなかった。

一方、組換えタンパク質を介したトリプシン様セリンプロテアーゼの同定と並行して、サブローデキストロースブロスを用いた液体培養によって得られた *A. vanbreuseghemii* の培養菌糸の凍結粉砕物から細胞粗抽出液を調製し、トリプシン様セリンプロテアーゼの精製を試みた。菌糸の凍結粉砕物を 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM CaCl<sub>2</sub> に懸濁したのち、2度の遠心によって細胞残渣を除去し、得られた上清について硫酸分画を行った。トリプシンの人工基質である N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg p-nitroanilide を利用した (トリプシン様) プロテアーゼ活性の測定結果を指標に、硫酸 40-70% 飽和で得られた沈殿を遠心によって回収し、少量の 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM CaCl<sub>2</sub> に再懸濁した。脱塩、限外ろ過によるサンプルの濃縮を行った後、Benzamidine Sepharose 担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを実施し、プロテアーゼ活性の認められた画分を回収して Sephacryl S200 HR 担体を用いたゲルろ過による分画を行った。N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg p-nitroanilide に対するプロテアーゼ活性の認められた画分を回収し、再び Benzamidine Sepharose 担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーと Sephacryl 担体 (S200HR) を用いたゲルろ過を組み合わせてタンパク質精製を進めた。最終的に回収した画分について SDS-PAGE による解析を行ったところ、分子量約 57kDa、約 27kDa および約 20kDa 付近にメジャーバンドが認められた。

そこで、これらのメジャーバンドを切り出し、N-末端アミノ酸配列の解析を実施した。しかしながら、約 57kDa および約 27kDa 付近のポリペプチド鎖はプロテアーゼではないことが示唆された (約 57kDa: グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、約 27kDa: 無機ジホスファターゼ)。また分子量約 20kDa 付近のポリペプチド鎖は純度が低く、同定には至らなかった。

上述の通り、今回の解析を通じて、目的とするトリプシン様の基質特異性 (アルギニンの C-末端側を認識) を有するセリンプロテアーゼの同定には至らなかった。しかしながら、白癬菌から単離したプロテアーゼ遺伝子を *P. pastoris* に導入し、酵素活性を有するプロテアーゼ組換えタンパク質を発現させることができた。したがって、*P. pastoris* を用いた組換えタンパク質の発現系を活用し、解析を行うプロテアーゼ遺伝子の範囲を広げることで、トリプシン様セリンプロテアーゼに関する新たな知見が得られる可能性がある。また、その他の宿主を用いた組換えタンパク質の発現系も試みたが、基質特異性の解析が可能なレベルでの組換えタンパク質の発現は認められなかった。したがって、現時点では *P. pastoris* を宿主に用いた組換えタンパク質発現系が白癬菌のプロテアーゼ遺伝子の発現系としてより適していると考えられる。

一方、カラムクロマトグラフィーによるトリプシン様セリンプロテアーゼの精製においても、目的とするプロテアーゼの単離には至らなかった。最終的に回収した画分の SDS-PAGE による解析で認められた2本のメジャーバンドは、いずれもプロテアーゼではないことが示唆された。本実験で得られた結果は、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過のみによる目的タンパク質の精製が困難であることを示している。しかしながら、回収した画分には N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg p-nitroanilide に対するプロテアーゼ活性が認められたことから、量的には少ないもののトリプシン様の活性を有するプロテアーゼが回収した画分に含まれている可能性がある。したがって、実験方法の再検討を行い、上記分画法にイオン交換クロマトグラフィー等、原理の異なる別の分画法を適宜加えることで、タンパク質精製のレベルを上げ、目的とするトリプシン様の基質特異性を有するセリンプロテアーゼの単離に至る可能性があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M.: Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 61(7), 2017. DOI: 10.1128/AAC.00115-17, 査読有

[学会発表](計1件)

山田剛、Mohamed Mahdi Alshahni、田中玲子、矢口貴志.: スイス・ローザンヌで分離された複数のテルビナフィン低感受性白癬菌株と薬剤感受性低下要因の解析. 第61回日本医真菌学会学術集会, 2017年

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山田 剛(YAMADA, Tsuyoshi)

帝京大学・医真菌研究センター・准教授

研究者番号:80424331

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

安東 嗣修 (ANDOH, Tsugunobu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号:50333498

田中 玲子(TANAKA, Reiko)

千葉大学真菌医学研究センター・助教

研究者番号:60143319

### (4)研究協力者

古川 那由太(FURUKAWA, Nayuta)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教