

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15151

研究課題名（和文）エンドグルカナーゼの機能改変による真菌感染症迅速診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel rapid diagnosis system of fungal infections using functionally-modified recombinant endoglucanase

研究代表者

山中 大輔 (Yamanaka, Daisuke)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70734599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本申請課題ではエンド型  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼの糖質加水分解活性を制御するアミノ酸を置換し、機能改変した変異型エンドグルカナーゼを作成した。これを用いて病原性真菌が放出する可溶性  $\alpha$ -1,6-グルカンの特異的に検出するELISA様試験を構築した。このELISA様試験を用いることで、様々な種類のCandida菌が産生する微量な  $\alpha$ -1,6-グルカンを高感度に測定することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真菌に特徴的な多糖構造である  $\alpha$ -1,6-グルカンを高感度に検出する方法を新たに開発したことで、 $\alpha$ -1,3-グルカンを指標とする従来法で問題視されていた偽陽性反応を抑えた新しい真菌感染症診断法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：A functionally modified mutant-endoglucanase was generated in *Escherichia coli* by substituting amino acids that regulate the glycolytic hydrolytic activity of  $\alpha$ -1,6-glucanase. Using this, an ELISA-like assay specific for soluble  $\alpha$ -1,6-glucans was constructed. The development of this ELISA-like assay has enabled the sensitive determination of trace amounts of  $\alpha$ -1,6-glucans produced by various types of *Candida* species.

研究分野：薬学

キーワード： $\alpha$ -1,6-グルカナーゼ  $\alpha$ -1,6-グルカン  $\alpha$ -D-グルカン 深在性真菌症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 深在性真菌感染症は衛生水準が向上した現代においても一定数の発症が認められる。その背景には高齢者増加による基礎疾患保有率の上昇があり、さらに移植医療の進展に伴う免疫抑制剤の長期使用、がん治療によっても免疫力は低下するため、重篤感染症の発症リスクは高まっている。細菌感染症と比べると治療薬の選択肢は十分とは言えず、耐性菌の出現は大きな問題となっている。

(2) 深在性真菌感染症の診断補助法として、病原性真菌が広く産生する  $\alpha$ -1,3-D-グルカンの高感度測定法が臨床現場で利用されている。我が国で  $\alpha$ -グルカン特異的検出法として開発されたリムルス G 試験 (LAL 法) は、カプトガニの生体防御システムである血液凝固反応を応用した体外診断試験である (文献)。リムルス G 因子は深在性真菌症患者血中に存在する微量  $\alpha$ -1,3-D-グルカンと反応し、試薬をゲル化または発色させる。多くの診断試薬で共通する問題点として、偽陰性・偽陽性反応があるが、リムルス試験でも同様に偽陽性反応の問題が知られている。様々な要因によって生じる反応だが、原因の一として真菌以外の生物種 (植物・細菌など) が  $\alpha$ -1,3-D-グルカンを有していることが挙げられる。

(3) カンジダなどの病原性真菌が放出する可溶性多糖は、 $\alpha$ -1,3-D-グルカンと  $\alpha$ -1,6-グルカン、マンナンなどによって構成されている (文献)。 $\alpha$ -1,3-D-グルカン及びマンナンを指標とする検査法が提案され、現在実用化されているが、これまでに  $\alpha$ -1,6-グルカンを指標とする試みはなかった。病原性真菌細胞壁を構成する主要な糖鎖構造の一つであったにも関わらず、 $\alpha$ -1,6-グルカンを対象とした研究例は  $\alpha$ -1,3-D-グルカンに関する研究例と比べて圧倒的に少なく、これまで微量の  $\alpha$ -1,6-グルカン構造のみを特異的かつ高感度に検出する方法は開発されてこなかった。

### 2. 研究の目的

エンド  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼの糖質分解活性を消失させ、糖鎖結合活性のみを残した機能改変酵素を作製した。これを  $\alpha$ -1,6-グルカン特異的タンパク質プローブとして応用し、病原性真菌から放出される  $\alpha$ -1,6-グルカンを検出する新しい方法として実用化可能か否か評価することを目的とした。具体的には、より強力に  $\alpha$ -1,6-グルカンと結合出来るようプローブを改良し、各種条件下における反応性評価を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) アカパンカビに由来する  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼ (Neg1) をコードする遺伝子に変異を加え、プラスミドに挿入して大腸菌に導入した。酵素活性を支配するグルタミン酸を種々のアミノ酸に置換し、 $\alpha$ -1,6-グルカンに対する結合活性を ELISA およびバイオレイヤー干渉法で評価した。

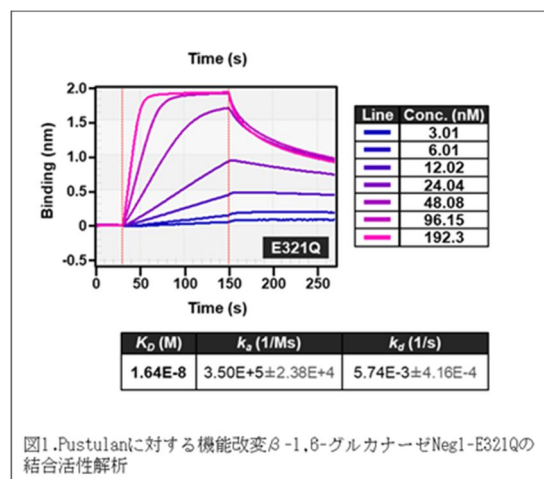
(2) 機能改変した  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼの N 及び C 末端から短縮し、糖鎖結合活性を有する最小分子の作成を試みた。

(3)  $\alpha$ -1,6-グルカン検出までに必要とする時間を短縮するため、機能改変  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼにルシフェラーゼを融合したプローブをデザインし、大腸菌での発現効率を検証した。

(4) 代表的な病原性真菌であるカンジダ及びアスペルギルス血清含有培地で培養し、機能改変  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼを用いたサンドイッチ様 ELISA によって培養上清中の  $\alpha$ -1,6-グルカンを検出可能か否か検証した。さらに、同一の検体を用いて従来の  $\alpha$ -1,3-D-グルカン検出法である LAL 法との反応性を比較した。

### 4. 研究成果

(1) アカパンカビ  $\alpha$ -1,6-グルカナーゼ (Neg1) の求核触媒及び酸・塩基触媒に位置するグルタミン酸を各種アミノ酸に置換したところ、全ての改変体 (約 40 種) で  $\alpha$ -1,6-グルカンに対する分解活性が消失した。この改変体を可溶性  $\alpha$ -1,6-グルカン (Pustulan) をコートした ELISA プレートに添加したところ、改変前の Neg1 及び多くの改変型 Neg1 は Pustulan との結合活性を示さなかった。また、結合活性が認められた改変体については、改変するアミノ酸種によって結合能に大きな差が認められた。このうち、比較的強い結合活性を示した改変体について、Biotin 化 Pustulan を固定したセンサーチップを用いてバイオレイヤー干渉法により結合・解離反応をリアルタイムで観察した。その結果、Neg1 の求核



触媒領域にあるグルタミン酸をグルタミン、グリシン、アラニンに変換したもので、酸・塩基触媒領域にあるグルタミン酸をグルタミン、アスパラギンに変換したものは  $\beta$ -1,6-グルカンに対して強い結合性を示すことが明らかとなった。特に、求核触媒領域をグルタミンに改変したグルカナーゼ (Neg1-E321Q) は培養液 1L あたり 2.5 mg 程度のタンパク質が回収可能であり、センサーチップに固定した Pustulan に対する KD 値は 16.4nM と強い結合性を示した (図 1)。また、機能改変  $\beta$ -1,6-グルカナーゼは精製から数か月～数年間冷蔵保管していても糖鎖結合活性を保持しており、再度本来の糖質分解活性が戻ることは無かった。これらの結果から、機能改変  $\beta$ -1,6-グルカナーゼは  $\beta$ -1,6-グルカンの検出用ツールとして広範囲に利用可能であると考えられる。

(2) 機能改変  $\beta$ -1,6-グルカナーゼ (約 52kDa) を低分子化する目的で、N 及び C 末端から 30 から 150 アミノ酸程度を短縮し、それぞれ大腸菌で発現させた。C 末端を 30 アミノ酸程度短縮したものの  $\beta$ -1,6-グルカンに対する僅かな結合活性が確認されたが、結合活性は完全長の機能改変  $\beta$ -1,6-グルカナーゼと比べて大幅に減少した。従って、十分な糖鎖結合活性を保持したまま  $\beta$ -1,6-グルカナーゼを低分子量化することは現段階では困難であることが確認された。

(3) 完全長の改変グルカナーゼにホタルルシフェラーゼ (約 61kDa) を融合したところ、精製の過程で 2 つの分子が分離していることが確認された。そこで、より低分子量のルシフェラーゼ (約 19kDa) を融合し大腸菌を用いて発現させたところ、安定した状態のルシフェラーゼ融合グルカナーゼを得ることができた (図 2)。これを用いて ELISA 様試験を構築したところ、最短 30 分程度で  $\beta$ -1,6-グルカンを検出することが可能となった。従来の ELISA 法に比べ測定時間は大幅に短縮されたが、感度の点では従来法 (化学発光基質) の方が優れていたため、今後さらなる検討が必要であると考えている。また、ルシフェラーゼ融合グルカナーゼを用いることで、機能改変  $\beta$ -1,6-グルカナーゼが重合度 (DP) 11 から 15 程度のゲンチオオリゴ糖を認識していることが明らかとなり、一方で植物配糖体や食品添加物などに含まれる低分子量のゲンチオオリゴ糖とは反応しないことが証明された。

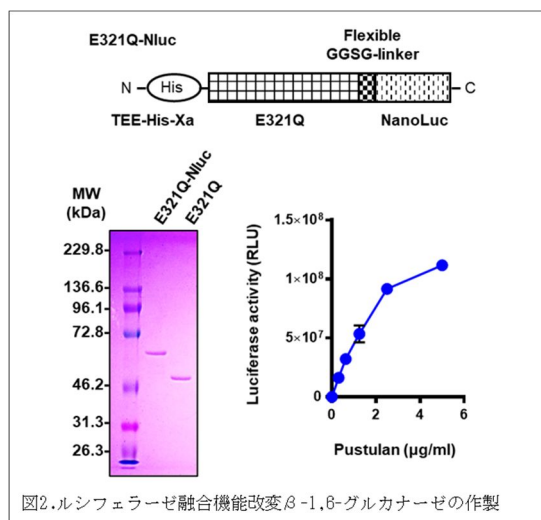


図2.ルシフェラーゼ融合機能改変 $\beta$ -1,6-グルカナーゼの作製

(4) カンジダ及びアスペルギルスを血清添加培地で培養し、その上清を機能改変  $\beta$ -1,6-グルカナーゼを用いたサンドイッチ ELISA 法 (化学発光基質) によって測定したところ、培養したカンジダ菌種の上清中に  $\beta$ -1,6-グルカンが放出されていることが明らかとなった。同一の検体を  $\beta$ -1,3-D-グルカンを指標とする LAL 法で測定したところ、それぞれの測定値に正の相関性があることが確認された (図 3)。また、検体によっては LAL 法に比べて  $\beta$ -1,6-グルカンを指標とする本法 (サンドイッチ ELISA) の方がより高感度な検出が可能であった。一方、培養した全てのアスペルギルス種 (7 種, 20 株) において、LAL 法による  $\beta$ -1,3-D-グルカンの存在を確認することが出来たが、 $\beta$ -1,6-グルカンを指標とする本法との反応性は認められなかった。従って、本測定法は全ての病原性真菌の検出に利用できるわけではないが、従来法と組み合わせることによって、これまでよりも容易に原因菌種を特定することが可能になると考えられる。

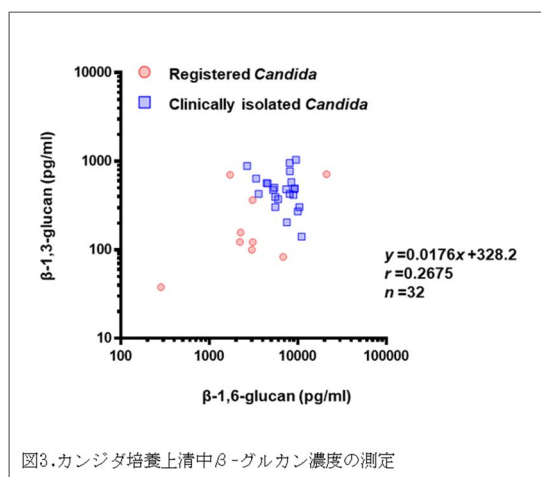


図3.カンジダ培養上清中 $\beta$ -グルカン濃度の測定

#### < 引用文献 >

Obayashi, T., Kawai, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H., Yasuoka, A., Shimada, K., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horiuchi, A., Ito, A., and Yamaguchi, H. (1995) Plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *The Lancet* **345**, 17-20

Uchiyama, M., Ohno, N., Miura, N. N., Adachi, Y., Aizawa, M. W., Tamura, H., Tanaka, S., and Yadomae, T. (1999) Chemical and immunochemical characterization of limulus factor G-activating substance of *Candida* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**, 411-420

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamanaka Daisuke, Takatsu Kazushiro, Kimura Masahiro, Swamydas Muthulekha, Ohnishi Hiroaki, Umeyama Takashi, Oyama Fumitaka, Lionakis Michail S., Ohno Naohito	4. 巻 295
2. 論文標題 Development of a novel -1,6-glucan-specific detection system using functionally modified recombinant endo- -1,6-glucanase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5362-5376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁
2. 発表標題 機能改変型エンド -1,6-グルカナーゼを用いた真菌感染症新規診断法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 高浜 亜季子, 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁
2. 発表標題 血中 -1,6-glucan測定におけるヒト検体前処理法の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 後藤 佳世, 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁
2. 発表標題 新規 -1,6-グルカン特異的検出法におけるアスペルギルス菌体外多糖の反応性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中島 大智, 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁
2. 発表標題 -1,6-glucon特異的検出に用いる機能改変 -1,6-gluconaseの作製と評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁
2. 発表標題 機能改変 -グルカナーゼを用いたカンジダ菌 -1,6-グルカン高感度検出法の開発
3. 学会等名 真菌症フォーラム 第24回学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 高津 和城, 山中 大輔, 田中 宏明, 大西 宏明, 安達 禎之, 石橋 健一, 大野 尚仁
2. 発表標題 Candida菌体外可溶性多糖の検出 - -1,6-glucon構造に着目して -
3. 学会等名 第62回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 太田 隼人, 山中 大輔, 石橋 健一, 安達 禎之, 大野 尚仁
2. 発表標題 -1,6-glucon特異的protein probeを用いた新規深在性真菌症高感度迅速診断法の開発
3. 学会等名 第62回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 - 1, 3 - 1, 6 - グルカンの測定方法	発明者 中田秀孝、安達禎之、石橋健一、山中大輔、大野尚仁	権利者 オリンパス株式会社、学校法人東京薬科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-209679	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 - 1, 6 - グルカナーゼ変異体と - 1, 6 - グルカンの測定方法	発明者 山中大輔、大野尚仁、元井益郎、元井章智	権利者 東栄新薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/018346	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----