

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：平成 19 年 4 月-平成 21 年 3 月

課題番号：19590464

研究課題名（和文）病原真菌 ABC トランスポーターの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of ABC transporters in pathogenic fungi

研究代表者

新見昌一 (MASAKAZU NIIMI)

国立感染症研究所・生物活性物質部・室長

研究者番号：30118088

研究成果の概要：

アゾール剤耐性獲得に寄与する病原真菌 ABC トランスポーターの薬剤排出機構の解明と新規抗真菌薬の開発を視野に入れた基礎研究を行った。病原真菌の ABC トランスポーターを発現した出芽酵母を用い、ポンプ阻害剤とアゾール剤を組み合わせてポンプ阻害剤に非感受性の変異 ABC トランスポーターを多数分離した。変異部位の同定と変異トランスポーターの生化学的性状を解析し、ポンプの基質特異性、アゾール剤排出能、ポンプ阻害剤の結合部位などを明らかにした。

*C. albicans* の ABC トランスポーター遺伝子 *CaCDR1* に変異を誘導し、ポンプ阻害剤 FK506 に非感受性となる変異を 17 種類同定した。これらの変異 *CaCDR1* 遺伝子を出芽酵母にそれぞれ発現させた株を作製し、薬剤感受性試験および阻害剤感受性試験を行った。ほぼすべての変異株は、fluconazole、rhodamine 6G、cycloheximide に対する耐性を保持していた。しかし、8 番目の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスに N1240D 変異を有する株はローダミン 6G に対する耐性度が著しく低下し、1 番目の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスに N535I 変異をもつ株は fluconazole に対する耐性度が特異的に低下した。この結果は、CaCdr1p における FK506 による阻害効果と CaCdr1p の薬剤輸送との間に相関があることを示唆している。さらに、変異株は構造の異なる阻害剤、enniatin B と beauvericin に対しては野生型 CaCdr1p 発現株と同程度の感受性を示したことから、本研究で同定した遺伝子変異は FK506 に対する感受性を特異的に低下させるものであると考えられた。

変異部位の特徴から多種の基質輸送の仕組みを解析し、病原真菌の細胞外輸送の理解を深めることが可能となった。新しい作用部位を標的とする新規抗真菌薬の開発が困難な現状で、将来ポンプ阻害剤の併用により既存のアゾール剤の優れた特性を生かすことができれば、この研究の意義は大きい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,800,000	0	1,800,000
20 年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学（含 真菌学）

キーワード：病原真菌、カンジダ、薬剤耐性、ABC トランスポーター、機能解析、アゾール系抗真菌薬、ABC トランスポーター阻害剤、FK506、異種タンパク発現系出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

カンジダ症やアスペルギルス症などの深在性真菌症が確実に増加している。これらの真菌症は、エイズ、悪性腫瘍、血液疾患などの基礎疾患を持つ患者や臓器・骨髄移植を受けた患者に多発しており、医療の先進・高度化ならびに人口の高齢化に伴う日和見感染症として、今後もさらに増加することが危惧されている。真菌症を克服するための新薬の開発が待たれているが、病原真菌と宿主であるヒトの間には共通した遺伝子や生体分子が多いために、選択毒性の高い薬剤が得られ難い。既存の抗真菌薬の中では、アゾール系抗真菌薬が最も広く使われ、ヒトに対する副作用が少なく、良好な血中濃度が得られるため新薬開発の中心をなしてきた。特にフルコナゾールは、エイズ患者の口腔咽頭カンジダ症の予防・治療に用いられてきたが、本薬に対して耐性の *C. albicans* 臨床分離株が頻繁に分離されるようになった。これを契機に *C. albicans* のアゾール剤に対する耐性機構の解明が進み、真菌細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの過剰発現がアゾール耐性の主な原因であることが明らかになった。

そこで真菌の薬剤排出ポンプの働きを止めてアゾール剤の菌体内濃度を保つことにより、薬剤本来の抗菌力を発揮する方法を考えた。これは既存の抗真菌薬を生かすことにもなり、新規の抗真菌物質の探索と並行して、耐性菌問題を克服するための手段として欠かせないと考えられる。本研究においては病原真菌の薬剤排出ポンプを高発現した出芽酵母発現系を用いて真菌の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索を行った。

## 2. 研究の目的

ATP binding cassette (ABC) トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーによって立体構造を変化させて、様々な生体異物を細胞外に排出する。病原真菌において ABC トランスポーターは、アゾール系抗真菌薬を排出して真菌を薬剤耐性化するため、抗真菌薬による真菌症治療を困難にしている。本研究では、病原真菌 *C. albicans* の ABC タンパク質 Cdr1p (CaCdr1p) とその阻害剤として働く FK506 との相互作用メカニズムを明らかにす

ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

排出ポンプ阻害剤スクリーニングの評価系およびポンプ機能の解析としては、*C. albicans* の主要な排出ポンプ遺伝子 *CDR1*、*CDR2*、*MDR1*、*C. glabrata* の *CgCDR1* および *CgPDH 1*、*S. cerevisiae* の *ScPDR5* をそれぞれ *S. cerevisiae* AD 株に導入した排出ポンプ高発現株を用いた。*S. cerevisiae* AD 株はあらかじめ7種の内在性ポンプが破壊されているのでアゾール剤に高度感受性であり、この株に外来性の排出ポンプ遺伝子を導入・発現することによりポンプ固有の排出機能を反映したアゾール剤耐性株が得られている。さらにアゾール耐性 *C. albicans* 臨床分離株2株を用いた。

ポンプ阻害剤による菌の感受性化は *in vivo* および *in vitro* assay によってしらべた。*In vivo* assay においては、sub-MIC 濃度のフルコナゾールを含む寒天培地で菌を培養し、感受性ディスク法を用いて阻止円の大きさで判定し、またマイクロプレートを用いたマイクロ希釈チェッカーボード法でしらべた。さらにローダミン 6G の排出活性阻害効果を測定した。一方、*In vitro* assay はアゾール耐性菌から細胞膜を調整し、排出ポンプ (Cdr1p) の ATPase 活性に対する阻害効果を測定した。

## 4. 研究成果

*CaCDR1* 遺伝子上の FK506 非感受性化変異をこれまでに 17 種類同定した。FK506 非感受性化変異をもつ *CaCDR1* 遺伝子を出芽酵母に発現させた株を作製し、薬剤感受性試験および阻害剤感受性試験を行った。ほぼすべての変異株は、fluconazole、rhodamine 6G、cycloheximide に対する耐性を保持していた。しかし、8 番目の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスに N1240D 変異を有する株はローダミン 6G に対する耐性度が著しく低下し、1 番目の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスに N535I 変異をもつ株は fluconazole に対する耐性度が特異的に低下した。この結果は、CaCdr1p における FK506 による阻害効果と CaCdr1p の薬剤輸送との間に相関があることを示唆している。さらに、変

異株は構造の異なる阻害剤、enniatin B と beauvericin に対しては野生型 CaCdr1p 発現株と同程度の感受性を示したことから、本研究で同定した遺伝子変異は FK506 に対する感受性を特異的に低下させるものであると考えられた。

#### 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 13 件)

1. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated fungal drug resistance. *Clinical Reviews of Microbiology* (In press)
2. Erwin Lamping, Amrita Ranchod, Kenjiro Nakamura, Joel D A Tyndall, Kyoko Niimi, Ann R. Holmes, Masakazu Niimi and Richard D. Cannon. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 354-369, 2009.
3. Ann R Holmes, Ya-Hsun Lin, Kyoko Niimi, Erwin Lamping, Mikhail Keniya, Masakazu Niimi, Koichi Tanabe, Brian C Monk and Richard D Cannon. ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 3851-3862, 2008.
4. Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, Fugo H, Uehara Y and Niimi M. Identification of the putative protein phosphatase gene *PTC1* as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. *Eukaryotic Cell* 7, 1640-1648, 2008.
5. Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, Urata K, Someya T, Sasaki T, Kamei K, Niimi M, Hiramatsu K and Uehara Y. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiology and Immunology* 52, 455-459, 2008.
6. Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1264-1272, 2007.
7. Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M and Uehara Y. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 990-995, 2007.
8. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, and Monk BC. *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology*, 153, 3211-3217, 2007.
9. Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, and Cannon RD. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryotic Cell*, 6, 1150-1165, 2007.
10. 新見昌一 病原真菌カンジダの薬剤耐性に関わる分子機構 バムサ会誌 (印刷中)
11. 新見京子、新見昌一 環境要因によって変化する *Candida glabrata* のアゾール薬感受性について 深在性真菌症 SFI Forum (印刷中)
12. 新見京子、新見昌一 キャンディン系抗真菌薬と耐性機構 日本医真菌学雑誌 (印刷中)
13. 田辺公一、新見京子、新見昌一 病原真菌の薬剤耐性に関する新しい分子機構 日本臨床 66, 2008-2012, 2008.

[学会発表] (計 26 件)

国際学会 (6 件)

1. Niimi M, Tanabe K, Lamping E, Niimi K, Holmes AR, Monk BC and Cannon RD. Mechanisms of drug resistance in pathogenic fungi. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, 1-5 September, 2007, Hyogo, Japan.
2. Niimi M, Tanabe K, Niimi K, Lamping E, Takano Y, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, Uehara Y. Characterization of drug efflux pump inhibitors that chemosensitize fungal ABC transporters. 9th ASM conference on

*Candida* and Candidiasis 24-28 March, 2008, New York, USA

3. Niimi K, Monk BC, Maki K, Hatakenaka K, Ikeda F, Niimi M, Nakayama H, Cannon RD. Clinically significant micafungin resistance in *Candida glabrata* requires mutations in both *FKS1* and *FKS29*th ASM conference on *Candida* and Candidiasis. 24-28 March, 2008, New York, USA.
4. Keniya MV, Holmes AR, Niimi M, Cannon RD Monk BC. Heterologous expression of the *Candida albicans* plasma membrane proton pump in *Saccharomyces cerevisiae*. 9th ASM conference on *Candida* and Candidiasis. 24-28 March, 2008, New York, USA
5. Niimi M. Molecular basis of antifungal resistance in pathogenic fungi 15th Academic Congress of Korean Society for Medical Mycology 21 June, 2008 Seoul, Korea
6. E Lamping, K Nakamura, K Tanabe, K Niimi, AR. Holmes, Y Takano, Y Miyazaki, RD. Cannon and M Niimi *Cryptococcus neoformans* *AFR2* and *MDR1* are ABC-type multidrug efflux transporters able to pump azoles and many other xenobiotics 7th International Conference on cryptococcus and Cryptococcosis 11-14 September, 2008, Nagasaki, Japan

国内学会等 (20 件)

1. 田辺公一、新見昌一 病原真菌ABCタンパク質と基質の相互作用 第4回真菌分子細胞研究会 平成19年8月26, 27日 千葉
2. 新見昌一 医真菌学の現状と将来:私の専門分野から、抗真菌薬耐性機構 第15回医真菌学セミナー 平成19年10月6日 東京
3. 田辺公一、富山 進、上原至雅、新見昌一 出芽酵母ABCタンパク質Pdr5pの阻害剤FK506非感受性化変異 第51回日本医真菌学会総会 平成19年11月9-10日 高山
4. 中山浩伸、田辺公一、知花博治、青山俊弘、新見昌一 *Candida glabrata*のステロールトランスポートAUS1の機能発現 平成19年11月9-10日 第51回日本医真菌学会総会 (高山)
5. 新見京子、牧克之、畠中千明、石川嵩彦、高田徹、田村和夫、新見昌一、中山浩伸、BC Monk, RD Cannon. Clinical micafungin

resistance required functional homozygosity in *Candida glabrata* glucan synthase 第51回日本医真菌学会総会 平成19年11月9-10日 高山

6. 村山そう明、山口正視、川本 進、新見昌一、梶原 将 *Candida albicans*脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(CaFADs) 破壊株の表現型とトランスクリプトーム解析 第51回日本医真菌学会総会 平成19年11月9-10日 高山
7. 三好薫治、田辺公一、〇 由紀、高野幸枝、宮崎義継、新見昌一 病原真菌ABCタンパク質のFK506による阻害メカニズムの解明 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 平成19年12月11-15日 横浜
8. 名木 稔、田辺公一、〇 由紀、高野幸枝、宮崎義継、新見昌一 ドメイン置換解析による*Candida albicans* ABCタンパク質の基質認識メカニズムの解明 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 平成19年12月11-15日 横浜
9. 田辺公一、名木稔、新見昌一、宮崎義継: 病原真菌*Candida albicans* ABCタンパク質の基質認識メカニズムに関する研究 第6回 感染症沖縄フォーラム 平成20年2月14-16日 沖縄
10. 田辺公一、中山浩伸、知花博治、新見昌一、宮崎義継: 病原真菌ABCタンパク質の抗真菌薬耐性との関わり 第81回日本細菌学会総会 平成20年3月24-26日 京都
11. 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、知花博治、宮崎義継、新見昌一 病原真菌ステロールトランスporterの出芽酵母での発現解析 第5回真菌分子細胞研究会 平成20年8月21-22日 千葉
12. 名木 稔、田辺公一、〇由紀、高野幸枝、長沼芽衣、新見昌一、宮崎義継 血清添加による*Candida albicans*のアゾール剤非感受性化メカニズムの解明 第5回真菌分子細胞研究会 平成20年8月21-22日 千葉
13. 中山浩伸、田辺公一、新見昌一 *Candida glabrata*を用いた抗真菌薬の標的の選出 - 真菌のステロール恒常性のメカニズムの解明からのアプローチ 第2回真菌ワークショップ研究会 平成20年8月23日 千葉
14. 田辺公一、中山浩伸、山越 智、知花博治、新見昌一、宮崎義継 *Candida glabrata*ステ

ロールトランスポーターのアゾール剤耐性化における役割 第52回日本医真菌学会総会 平成20年9月10-11日

15. 新見昌一 病原真菌の生物学 衛生微生物技術協議会第29回研究会 平成20年6月24-25日 東京
16. 新見昌一、田辺公一、新見京子、Erwin Lamping, 高野幸枝, Ann R Holmes, Brian C Monk, Richard D Cannon 薬剤排出ポンプ阻害剤による真菌ABC輸送体の感受性化 第91回日本細菌学会関東支部総会 平成20年10月23-24日 千葉
17. 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、山越 智、臺 由紀、知花博治、新見昌一、宮崎義継 *Candida glabrata*ステロールトランスポーターによるアゾール剤耐性化 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 平成20年12月9-12日 神戸
18. 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、長沼芽衣、新見昌一、宮崎義継 *Candida glabrata*ステロールトランスポーターによるアゾール剤耐性化 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 平成20年12月9-12日 神戸
19. 田辺公一、中山浩伸、知花博治、宮崎義継、新見昌一 病原真菌ABCタンパク質の抗真菌薬耐性との関わり 第81回日本細菌学会総会 平成21年3月24-26日 名古屋
20. 新見昌一 キャンディン研究会 平成21年3月14日 東京

〔図書〕(計2件)

1. 新見昌一 クリプトコッカス症 ズーノースハンドブック (岸本寿男、山田章雄 監修) メディカルサイエンス (印刷中)
2. 新見昌一 真菌学総論 戸田新細菌学 改訂33版 南山堂 2007

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新見昌一

国立感染症研究所生物活性物質部

(2) 研究分担者

田辺公一

国立感染症研究所生物活性物質部

(3) 連携研究者