

平成21年4月28日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790324

研究課題名（和文） カンジダにおけるアポトーシス機序の解明と新規治療戦略の開発

研究課題名（英文） Clarification of apoptosis mechanisms in *Candida* species to develop a novel antifungal strategy.

研究代表者

宮崎 泰可 (MIYAZAKI TAIGA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60448496

研究成果の概要：

病原真菌 *Candida glabrata* において、酸化ストレス応答に重要な転写因子 Skn7 の機能解析を行った。Skn7 欠損株は H2O2 などのストレス応答に必要な標的遺伝子の発現が誘導されず、酸化ストレスに感受性となった。Skn7 は、別の転写因子 CgAP1 とは独立した機能を持っており、その欠落は病原性の低下にもつながることがマウスモデルで確認された。アポトーシスにおける酸化ストレス応答能の役割について現在研究を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

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：病原性

1. 研究開始当初の背景

カンジダ症は日和見感染症として高頻度に見られる真菌症であり、難治性で重篤な場合も少なくない。その中でも近年分離頻度が増加している *Candida glabrata* はアゾール系抗真菌薬に低感受性のため、有効な抗真菌薬が非常に限られている。生体側の要因も考慮

した新しい抗真菌治療戦略の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究の最大の目的は、カンジダにおけるアポトーシスの機序を解明し、将来的に治療応用できるかを検討することである。

酸化ストレスとアポトーシスの関連性が古くから示唆されているが、病原真菌においてはほとんど解明されていない。好中球減少はカンジダ症のリスクファクターであり、好中球による酸化ストレスは病原真菌に対して有効な抗真菌活性の一つである。しかし、病原真菌の酸化ストレス応答メカニズムも未だ不明な点が多い。まずは、*C. glabrata* における酸化ストレス応答メカニズムを解明することを本研究の第一の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス応答において中心的な役割を担っている転写因子 *CgAPI* と *CgSKN7* の遺伝子欠損株を *C. glabrata* で作製する。相同組換えを利用して、標的遺伝子をマーカー遺伝子に置き換える手法を用いる。

(2) 表現型の解析として、薬剤感受性試験を行う。

(3) 定量リアルタイム PCR 法を用いて、各種ストレス応答に必要な遺伝子の発現制御を検討する。

(4) 播種性カンジダ症のマウスモデルを用いて、病原性への影響について検討する。

4. 研究成果

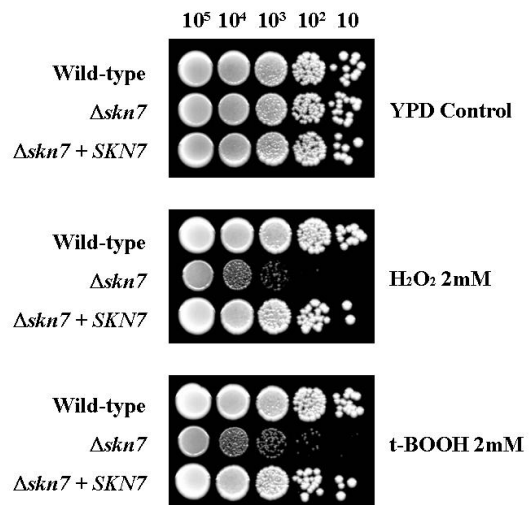
(1) *Candida glabrata* *SKN7* 遺伝子欠損株の作製：

URA3 マーカーを用いた deletion construct を作製し、*C. glabrata* の *URA3* 欠損株 (Uracil 栄養要求株) から *SKN7* 欠損株を作製することに成功した。

標的遺伝子 (*SKN7*) の欠損は PCR とサザンブ

ロット法で確認した。

(2) *C. glabrata* において *SKN7* 遺伝子の欠損は酸化ストレス感受性を誘導することを明らかにした。



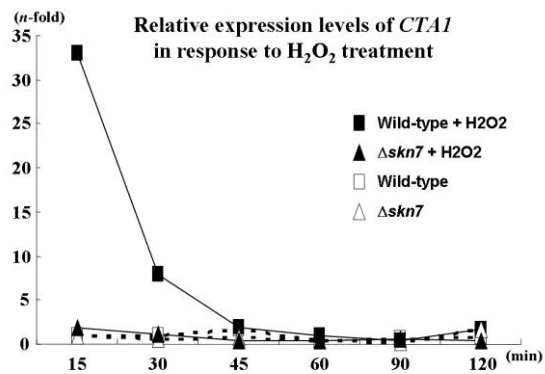
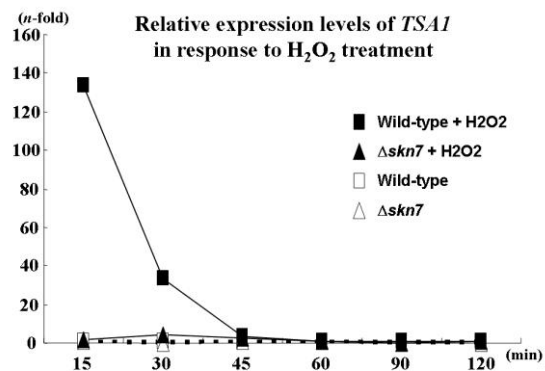
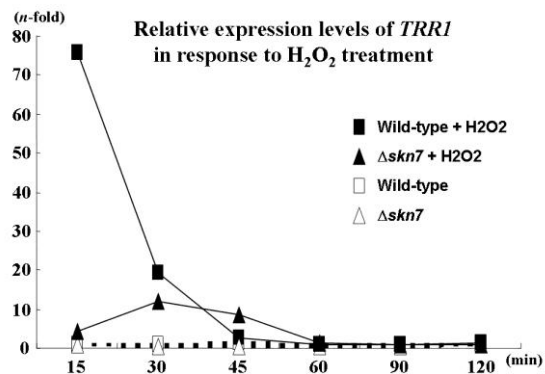
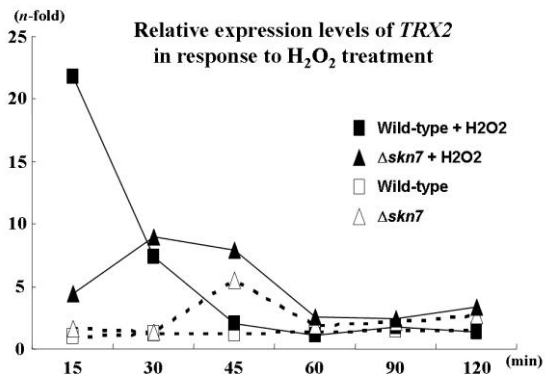
(Wild-type: コントロール、 $\Delta skn7$: *SKN7* 欠損株、 $\Delta skn7 + SKN7$: *SKN7* 欠損株に正常の *SKN7* 遺伝子を戻した株)

SKN7 欠損株に正常な *SKN7* を戻すことによって酸化ストレスへの応答能は回復した。

また、*CgAPI* と *SKN7* の二重欠損は H2O2 感受性に相加効果をもたらした。

(3) 酵母細胞で報告されている酸化ストレス応答に関連した遺伝子の発現量を測定し、*Skn7* の標的分子を同定した。

一例として、*TRX2*, *TRR1*, *TSA1*, *CTA1* などは H2O2 によるストレスに対して発現量が増加するが、これらは *Skn7* により制御されていることが明らかになった。



(4) Skn7 の欠損が *C. glabrata* の病原性に与える影響について、播種性カンジダ症のマウスモデルを用いて検討した。

SKN7 欠損株は親株と比較して有意に病原性が低下していることが確認された。

これらのデータは病原真菌における酸化ストレス応答能と病原性、細胞死メカニズム解析の第一歩として有用なものであると考えられ、現在英文専門誌 *Mycopathologia* に投稿中である。

また、*C. glabrata* において、種々のアポトーシス関連遺伝子欠損株の作製にも成功しており、現在、酸化ストレス応答能とアポトーシスの関連性について研究を進めている。

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)

[学会発表] (計4件)

① 発表者(代表者)名: 西條 知見, 発表課題: Characterization of the *SKN7* homologue in *Candida glabrata*, 学会等名: The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology 2009 (ISHAM 2009), 発表年月日: 2009年6月25日-29日, 発表場所: 東京

② 発表者(代表者)名: 西條 知見, 発表課題: *Candida glabrata* の *SKN7* に関する検討, 学会等名: 第83回日本感染症学会総会・学術講演会, 発表年月日: 2009年4月24日, 発表場所: 東京

③ 発表者(代表者)名: 西條 知見, 発表

課題： *Candida glabrata* SKN7 欠失株における表現型および病原性の変化，学会等名：真菌症フォーラム第 10 回学術集会，発表年月日：2009 年 2 月 21 日，発表場所：名古屋

- ④ 発表者（代表者）名：宮崎泰可，発表課題：病原性真菌における calcineurin の役割 ～新規抗真菌戦略の標的分子としての可能性，学会等名：第 32 回長崎感染症研究会，発表年月日：2008 年 3 月 29 日，発表場所：長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 泰可 (MIYAZAKI TAIGA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員
研究員
研究者番号：60448496

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者