

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590119
 研究課題名（和文）真菌の消毒薬耐性機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of antiseptic resistance in yeast.

研究代表者

大橋 一晶 (OHASHI KAZUAKI)
 岩手医科大学・薬学部・准教授
 研究者番号：70344679

研究成果の概要（和文）：

出芽酵母の消毒薬（塩化ベンザルコニウム・グルコン酸クロルヘキシジン）耐性に関する因子の検索を行った。これまでに本研究代表者は、トランスポーターのひとつ Sge1 を過剰発現させた場合に、酵母が塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンに対し、ともに耐性を示すことを明らかにしている。そこで Sge1 に構造上近い Azr1, Vba3, Vba5 の過剰発現が、これら消毒薬の耐性に関与するかどうかを調べたところ、いずれも野生株と同程度であった。また、Sge1, Azr1, Vba3, Vba5 の遺伝子欠損酵母もこれら消毒薬に耐性を示さなかった。一方、出芽酵母株の遺伝子欠損酵母株ライブラリーを用いて塩化ベンザルコニウム感受性に関与する因子のスクリーニングを行い、候補となる遺伝子欠損株を、耐性株に、感受性株ともに多数得た。

研究成果の概要（英文）：

So far I clarified overexpression of *SGEI* in yeast confers resistance to benzalkonium chloride and chlorhexidine. Effect of overexpression or deletion of *AZRI*, *VBA3* and *VBA5* to antiseptic sensitivity in yeast was examined. Overexpression of these genes did not confer resistance to benzalkonium chloride nor chlorhexidine in yeast. Deletion of *SGEI*, *AZRI*, *VBA3* and *VBA5* did not affect sensitivity to benzalkonium chloride nor chlorhexidine. Yeast deletion mutants showing resistance or sensitive to benzalkkonium chloride were screened to obtain numerous candidates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬学，酵母

1. 研究開始当初の背景

真菌症は、人の病気としては、水虫や口内炎としてなじみが深い。一方、真菌症には、内臓に感染する深在性真菌症（内臓真

菌症）が存在し、その感染者数は困ったことに近年増大しつつある。深在性真菌症は診断が困難であることが多く、患者の予後

を左右するほど、非常に重篤な症状を示す。

深在性真菌症の原因となる真菌の多くは、日和見感染を行い、通常は健常者にはあまり害を及ぼさない。しかしながら、近年の医療の高度化に伴い、高齢者や末期がん患者など免疫機能が衰えた状態の患者でも生存・治療が可能となったこと、エイズの出現に伴い、特に海外では免疫機能の低下した患者が増加したことなどから、深在性真菌症の問題が顕在化した。

真菌症の治療にはもっぱら抗真菌剤が用いられる。しかし、真菌は真核生物であるため、細菌と比べ、細胞の構造が人を含む動物と類似している。そのため細菌用抗生物質とは異なり、用いることのできる抗真菌薬が非常に限られている。さらに、近年では、最も頻繁に使われるアゾール系の薬剤に対して耐性を示す真菌も感染者から散見されつつあり、用いることのできる抗真菌薬が少ないことを考えると大きな問題である。

一方、いままでにあまり着目されていない問題として、院内で汎用される消毒剤に対して、病原微生物が耐性を獲得しつつあることが挙げられる。たとえば、消毒剤の一つであるクロルヘキシジンは、各医療施設で幅広く用いられているが、多用に伴い、強い抵抗性を持つ細菌が増加していることも知られている。クロルヘキシジンの有効濃度は一般に細菌よりも真菌の方が高く、真菌にとっては比較的毒性の低い濃度の消毒剤に常に暴露されるために、真菌についても同様に耐性を獲得したものが生じている可能性は非常に高い。また、最近では歯磨き粉にも、逆性石けん等の消毒剤が添加されている例も多々見受けられ、口内に存在する真菌にも耐性を与えやすい状況となっていると考えられる。

細菌では消毒剤に対する耐性機構の解析は、以前には比較的よく解析が行われていた。しかしながら、意外なことに、真菌に関してはこれら消毒剤に対する耐性に関与する遺伝子の解析は、調べた限りでは全くといってよいほど行われていない。

近年における細菌の多剤耐性機構の中には、消毒剤をも含め耐性となっている例もあり（例えば、MRSA の60%が消毒薬耐性遺伝子を持つ）、消毒剤が真菌においても抗真菌薬耐性をも含めた多剤耐性と深い関わりを持つ可能性も否定できない。

したがって、本研究では、消毒剤耐性という観点から真菌の薬剤耐性機構に関与する因子（遺伝子産物）を、出芽酵母を用いて検索する。

（ここで述べる消毒剤とは、病院内や日常生活で汎用される消毒剤、すなわち塩化ベンザルコニウムやクロルヘキシジンなどを指す。）

2. 研究の目的

本研究では、消毒剤耐性を付与するトランスポーターSge1 のホモログについて過剰発現および遺伝子欠損の効果を調べるとともに、出芽酵母の消毒剤耐性機構に関与する因子（遺伝子産物）を、出芽酵母の遺伝子欠損株を用いてスクリーニングする。

3. 研究の方法

出芽酵母の培養は、YPAD 培地（YPD 培地 + Adenine 0.08 mg/ml）または合成培地である SD 培地を用い、30℃で行った。酵母へのプラスミドの導入は酢酸リチウム法により行った。出芽酵母は BY4742 株（MAT α ; his3 Δ leu2 Δ lys2 Δ ura3 Δ ）を用いた。出芽酵母では、ゲノム上の全遺伝子約 5000 個について、それぞれの遺伝子をノックアウトした遺伝子欠損酵母株ライブラリーが利用可能である（ただし致死となる遺伝子は除く）。遺伝子欠損株ライブラリーは BY4742 株を元に遺伝子欠損されたものを用い、EUROSCARF から有償で分与されたものを用いた。

また、各因子の過剰発現株については、酵母のマルチコピープラスミド pRS425 を用いて行った。PCR 法により各遺伝子のゲノム断片を増幅した後、pRS425 に組み込み、BY4742 株に導入した。コントロールとして用いた株は、pRS425 のみを導入し

たものであり、培養はロイシンをふくまないSD培地を用い30°Cで行った。薬剤の感受性については、寒天培地中に薬剤（塩化ベンザルコニウムまたはグルコン酸クロルヘキシジン）を加え、コロニーの出現の有無により耐性を調べた。

遺伝子欠損酵母株ライブラリーを用いた、塩化ベンザルコニウムに対する感受性に関与する遺伝子のスクリーニングでは、YPAD培地を用いた。酵母株は、いったん96穴プレートで各遺伝子の欠損株ごとにfull growthとなるまで培養した後に、400倍に希釈し用いた。この希釈培養液に塩化ベンザルコニウムを添加して30°Cで培養し、24時間後と48時間後に観察を行った。培地に加えた塩化ベンザルコニウムの濃度は 3×10^{-4} %および 4×10^{-4} %の2通りでそれぞれの遺伝子欠損株について行った。このときコントロールである酵母野生株よりも増殖を示すものを消毒剤耐性株、野生株よりも増殖が遅いものを消毒剤感受性株の候補とした。

4. 研究成果

真菌のモデル生物である出芽酵母を用いて、汎用消毒剤である逆性石けん（塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジン）に対する耐性機構を解析した。これまでに本研究代表者は、トランスポーターのひとつSge1を過剰発現させた場合に、酵母が塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンに対し、ともに耐性を示すことを明らかにしている。Sge1は、トランスポーターの中でもmajor facilitator superfamilyに属し、crystal violet等の色素の排出を行うと推測されている（Ehrenhofer-Murray AE, *et al.* (1998) *Yeast* 14(1):49-65）。しかしながら、Sge1の生理的機能や、抗真菌剤、消毒剤への耐性に関しては明らかになっていない。そこで、まずSge1に構造上近い3個のタンパク質Azr1, Vba3, Vba5が、Sge1同様に酵母の逆性石けん耐性に関与しているかどうかを調べた。

これらの因子のうち、Azr1は、Sge1と最も相同性が高く（40%のアミノ酸相同性を示す）、抗真菌剤であるアゾール系の抗真菌薬に対して耐性を付与することが報告されており（Tenreiro S, *et al.* (2000) *Yeast* 16(16):1469-81）、逆性石けん耐性との関連が興味深い。一方、Vba3とVba5はともに酵母の液胞に塩基性アミノ酸を輸送するトランスポーターとして同定された因子である。

まずは、これら因子Azr1, Vba3, Vba5について、Sge1の場合と同様、酵母のマルチコピープラスミドにそれぞれの因子をコードする遺伝子断片を挿入し、酵母に導入することで、これら因子の過剰発現株を作製した。その結果、これらいずれのタンパク質を過剰発現させた場合にも、酵母の逆性石けん耐性度は、塩化ベンザルコニウム、グルコン酸クロルヘキシジンについて、ともに野生株と同程度であった。したがって、Sge1類似分子のうち逆性石けん耐性に関与し、おそらく逆性石けんの排出を行うのと考えられるは、Sge1のみであることが明らかとなった。

さらに、Sge1およびその類似分子であるAzr1, Vba3, Vba5について、酵母遺伝子欠損株ライブラリーを利用し遺伝子欠損株をそれぞれ単離し、遺伝子欠損が酵母の塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンに対する感受性に及ぼす影響を調べた。その結果、Sge1, Azr1, Vba3, Vba5について、いずれの遺伝子欠損株も塩化ベンザルコニウムおよびグルコン酸クロルヘキシジンに対する感受性が酵母野生株よりも高くなることは無かった。過剰発現では逆性石けん耐性を付与するSge1についても遺伝子欠損では逆性石けんに対し高感受性を示さなかったことから、逆性石けん排出に関与し機能的に重複する因子がSge1以外にも存在し、Sge1遺伝子欠損株では、その因子が

Sge1 の機能を補うため、逆性石けん耐性度が野生株と変わらないと推察される。

一方、遺伝子欠損により酵母の塩化ベンザルコニウム感受性が変化する遺伝子を検索する目的で、出芽酵母株の遺伝子欠損酵母株ライブラリーを用いて塩化ベンザルコニウム感受性スクリーニングを行った。方法は、培地に塩化ベンザルコニウムを添加した条件で、各遺伝子の欠損株ごとに培養を行い、コントロールである出芽酵母野生株よりも早い増殖を示すものを塩化ベンザルコニウム耐性株、野生株よりも増殖が遅いものを塩化ベンザルコニウム感受性株とした。現在までに、約 1500 株についてスクリーニングを終え、候補となる遺伝子欠損株を、耐性株については 46 株、感受性株については 227 株を得た。一方、今回のスクリーニングでは、操作ごとに菌量にぶれが出てしまっている可能性や、そもそも遺伝子欠損により細胞増殖が非常に遅くなっている欠損株も含まれていることが考えられるため、得られた薬剤感受性候補欠損株については再度、薬剤感受性を確認する必要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 20 件)

1. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2011) Proposal to conserve the name *Codariocalyx* (*Leguminosae/Fabaceae*) with that spelling. *Taxon* **60**, 239.
2. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2011) The Correct Scientific Name of “Shirobana-hagi”, the Oldest White-Flowered Race of *Lespedeza* (*Leguminosae*) in Japan). *J. Jpn. Bot.* **86**, 36-41.
3. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2010) Proposal to modify Article 37 Example 4. *Taxon* **59**, 1612.
4. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2010) Identity of *Lespedeza bicolor* Turcz. f. *albiflora* Matsum. (*Leguminosae*). *J. Jpn. Bot.* **85**, 322-330.
5. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2010) Amendments in *Codariocalyx* (*Leguminosae*). *J. Jpn. Bot.* **85**, 238-240.
6. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2010) Proposals to add two new recommendations in Recommendation 37A. *Taxon* **59**, 987.
7. Hiroyoshi Ohashi, Tseng-chieng Huang and Kazuaki Ohashi (2010) *Entada* (*Leguminosae* subfam. *Mimosoideae*) of Taiwan. *Taiwania* **55**, 43-53.
8. Kazuaki Ohashi and Hiroyoshi Ohashi (2010) New Combinations of *Melanthera* (*Asteraceae*) in Japan and Taiwan. *J. Jpn. Bot.* **85**, 59-63.
9. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2010) Correction of Author names in East Asian *Selliguea* (*Polypodiaceae*) in Japan. *J. Jpn. Bot.* **85**, 46.
10. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2009) Three white-flowered forms of *Lespedeza* (*Leguminosae*) in Japan. *J. Jpn. Bot.* **84**, 359-360.
11. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2009) New combinations of *Selliguea* (*Polypodiaceae*) in Japan, Korea and Taiwan. *J. Jpn. Bot.* **84**, 305-309.
12. Hiroyoshi Ohashi, Tomoyuki Nemoto, Kazuaki Ohashi (2009) A revision of *Lespedeza* subgenus *Macrolespedeza* (*Leguminosae*) in China. *J. Jpn. Bot.* **84**, 197-223.
13. Hiroyoshi Ohashi, Tomoyuki Nemoto, Kazuaki Ohashi (2009) A revision of *Lespedeza* subgenus *Lespedeza* (*Leguminosae*) of China. *J. Jpn. Bot.* **84**, 143-166.
14. Hiroyoshi Ohashi, Tomoyuki Nemoto, Kazuaki Ohashi (2009) Identity of *Lespedeza anthobotrya* Ricker and *L. bracteolata* Ricker (*Leguminosae*). *J. Jpn. Bot.* **84**, 185-188.

15. Hiromi Kawai, Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Mitsuo Yamada, Ryoko Iijima, Takao Inoue, Yasuko Kezuka, Kazuaki Ohashi, Yasuo Yoshida, Koujiro Tohyama, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Hiroyuki Arai, Ayako Ohashi-Kobayashi, and Masatomo Maeda (2009) Normal formation of a subset of intestinal granules in *Caenorhabditis elegans* requires ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9, which are highly homologous to human lysosomal peptide transporter TAP-like. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2979-2990.
16. Aya Kamakura, Yasuyuki Fujimoto, Yu Motohashi, Kazuaki Ohashi, Ayako Ohashi-Kobayashi, and Masatomo Maeda (2008) Functional dissection of transmembrane domains of human TAP-like (ABCB9) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**, 847-851.
17. Koji Yonekura, Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2008) *Potentilla hebiichigo* Yonek. & H. Ohashi (*Rosaceae*) and its distribution *J. Jpn. Bot.* **83**, 301-305
18. Koji Yonekura, Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2008) Identity of *Duchesnea indica* var. *arbitarpa* Y. N. Lee (*Rosaceae*) from Korea *J. Jpn. Bot.* **83**, 314
19. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2008) Typification of *Scutellaria guilielmii* A. Gray (*Lamiaceae*) *J. Jpn. Bot.* **83**, 253-255
20. Hiroyoshi Ohashi and Kazuaki Ohashi (2008) Lectotypification of *Taiwania cryptomerioides* Hayata (*Cupressaceae*) *J. Jpn. Bot.* **83**, 177-184.

[学会発表] (計 3 件)

1. (Regenerating gene) family proteins in type 1 and type 2 diabetes. (第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 岡山, 平成 22 年 5 月 29 日), ○Nausheen J. Shervani, Iwao Takahashi, Kazuaki Ohashi, Naoya Noguchi, Hiroshi Okamoto, Shin Takazawa, Akira Sugawara, Koji Nata

2. Contribution of heparan sulfate fine structure to insulin secretion. (第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会, 神戸, 平成 22 年 12 月 9 日), ○Iwao Takahashi, Kazuaki Ohashi, Nausheen J. Shervani, Koji Nata
3. Sera from Japanese diabetes patient show autoimmunity to REG family antigens. (第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 平成 21 年 10 月 23 日), ○Nausheen J. Shervani, Koji Nata, Naoya Noguchi, Iwao Takahashi, Takayuki Ikeda, Kazuaki Ohashi, Takeo Yoshikawa, Akira Uruno, Shin Takasawa, Hiroshi Okamoto, Akira Sugawara

[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

大橋 一晶 (OHASHI KAZUAKI)
 岩手医科大学・薬学部・准教授
 研究者番号 : 70344679

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし