

機関番号：82603

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20591212

研究課題名（和文） アスペルギルス症の感染制御と診断に臨床応用可能な細胞外分子の検出に関する研究

研究課題名（英文） Screening of excreted proteins of *Aspergillus fumigatus* for clinical application.

研究代表者

宮崎 義継 (MIYAZAKI YOSHITSUGU)

国立感染症研究所・生物活性物質部・部長

研究者番号：00311861

研究成果の概要（和文）：アスペルギルス症の診断と治療に使用する目的で、アスペルギルス症の原因となる真菌から分泌される、あるいは、菌表面に分布する蛋白質を検出した。検出した蛋白質のうち量が多いものを選択して当該遺伝子をクローニングし、蛋白質を検出する抗体を作成した試験管内で菌を培養したときに当該の蛋白質が培養液中で検出可能であることを確認した。さらに、診断に応用するために調べた抗体を用いた検査キットの試作品を作成した。

研究成果の概要（英文）：We found some novel fungal proteins which natively exist on cell surface or are excreted out through cell membrane. Candidate proteins were chosen depending on levels of transcription for further experiments of gene cloning and of producing antibody, then confirmed that some proteins could be detected in culture medium. That showed those candidate, or at least a part of those, are excreted out to medium from fungal cell. We developed a preliminary diagnostic kit as an application of the study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	0	1,900,000
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,600,000		3,600,000

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：Aspergillus 属 診断

1. 研究開始当初の背景.

(1) アスペルギルス症は、高度先進医療における最も頻度の高い致死的真菌感染症

であるが、最も効果が高い抗真菌薬療法でも3カ月後の死亡率は30%以上であり、アスペルギルス症の新しい診断ならびに治療法の創生がもとめられている。

(2) 現在、診断に応用されている標的分子は β -D-グルカンとアスペルギルス・ガラクトマンナン抗原であるが、前者は、非特異的な検査であることが問題で、後者は感度と特異度に問題を有し2007年にカットオフ値が変更されるなどの混乱を生じており、特に慢性呼吸器疾患では有効性が低い。そのため特異的かつ感度の高いアスペルギルス属の検出系が求められている。

2. 研究の目的

Aspergillus 属による感染症の診断標的ならびに治療標的とするために、アスペルギルス属の菌体外へ分泌される分子及び細胞膜に存在する蛋白分子を網羅的に検索する。最終目標は、同定した蛋白の検出系を作成し診断応用を検討することと、遺伝子破壊による病原性の喪失を確認して治療標的となる可能性を示すことである。

3. 研究の方法 (本研究課題の研究方法について、その具体的内容を簡潔に記述すること。)

Aspergillus fumigatus の cDNA ライブラリーを作成し、シグナルシーケンストラップを応用して、酵母及びヒト細胞において蛋白を発現させ、細胞膜あるいは細胞外に分泌される *A. fumigatus* 由来蛋白を同定する。

3. 研究成果

診断や治療の標的として、真菌細胞から分泌される、あるいは、真菌細胞表面に局在す

る真菌蛋白質をシグナルシーケンストラップ法により検索し、同定した *Aspergillus fumigatus* 蛋白質 YeMY1 を選択して解析を行った。YeMY1 はデータベースからは機能が推定できなかったが、検討した蛋白では発現量が多く、今年度の結果から病原性に関与することが示された。

H20

1. *Aspergillus fumigatus* cDNA ライブラリー作成. 充分栄養成分を含む YEPD 培地、並びに、低炭素源の培地において、*A. fumigatus* MF-13 株を培養し RNA を抽出し、*A. fumigatus* cDNA ライブラリーを作成した。

2. 培養細胞に作成した cDNA を transfection し、自律増殖可能な細胞が選択された。その中に含まれるアスペルギルス cDNA 由来遺伝子のシーケンスをえた。

3. えられた候補遺伝子のうち機能が不明であったもの一つを選択し、A1 とした。A1 を再度 PCR クローニングし、を *Saccharomyces cerevisiae* の発現系に組み込み、酵母細胞で発現することを確認した。

4. A1 のマウスモノクローナル抗体を作成し、*A. fumigatus* の培養上清に A1 が含有されていることをウエスタンブロットにて確認した。さらに、標識した抗体を *A. fumigatus* 菌糸と反応させた結果、位相差顕微鏡による検討では、菌糸の先端部に発現が確認された。

H21

1. 細胞から分泌される蛋白質抗原の検索. シグナルシーケンストラップ法により同定した蛋白質である YeMY1 に関して、YeMY1 を発現する細胞を用いてマウスモノクローナル抗体を作成した。

1) 4種類作成したマウスモノクローナル抗体を、それぞれMbYeMY1-11、12、13、14として、培養液中で細胞外へ分泌されるか否かを、液体培地の培養上清を用いてwestern blotにて確認した。ビオチン不可による免疫染色では抗原の局在を検出できなかった。

2) MbYeMY1-11およびMbYeMY1-12は抗原に対する反応性を確認できた。

2. 遺伝子破壊による蛋白質機能の推定と病原性の変化. 遺伝子破壊のために *A. fumigatus* Ku-1株を使用して、YeMY1をコードする遺伝子の特異的な破壊を行いΔyemy1株を作成したところ、寒天培地上で形成される胞子の数はKu-1株と比較して減少したが、液体培地で菌糸として発育する場合には、Ku-1株と比較して差を認めなかった。

3. 診断と治療応用の検. 討YeMY1を検体を用いた抗原診断に使用する目的でELISA系を構築した。

1) 先の4種類の抗体に加えポリクローナル抗体PbMY1Aを作成し、これとMbYeMY1-11を用いてサンドイッチELISA系を作成し、検出感度はYeMY1 10pg/mlであった。

2) MbYeMY1-11とMbYeMY1-12を用いた系では抗原の検出は不可能であった。

H22

1. *Aspergillus fumigatus* からクローン化したタンパク質YeMY1のin vivo感染モデルにおける検出を行った. 実験的マウスアスペルギルス症を作成し、血清からのY1検出

を試みた。昨年度までに作成したY1検出ELISAプレートをを用い、非感染マウスと実験的マウスアスペルギルス症からえた血清を検体として、YeMY1の検出を試みたところ、実験的マウスアスペルギルス症の血清からはYeMY1が検出された。

2. *A. fumigatus* のYeMY1遺伝子破壊株を用いて、YeMY1遺伝子が菌の増殖と病原性に与える影響を検証した。当該遺伝子破壊株Δyemy1株を感染させたマウスは、親株を感染させたマウスと比較して生存期間が有意に長かった。この結果から、YeMY1がマウスアスペルギルス症で感染増悪に関与する病原因子の一つであることが示された。

3. マウス抗YeMY1を作成し、実験的マウスアスペルギルス症に対して抗体を使用し、抗体の治療に関する有用性を検討した。いくつかの抗体で、生存を延長させる傾向があったが有意な効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

1. Kohno S, Izumikawa K, Ogawa K, Kurashima A, Okimoto N, Amitani R, Kakeya H, Niki Y, Miyazaki Y. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. *J Infect* 査読有 61(5): 410-418, 2010.
2. Hoshino Y, Fujii S, Shinonaga H, Arai K, Saito F, Fukai T, Satoh H, Miyazaki Y, Ishikawa J. Monooxygenation of rifampicin catalyzed by the rox gene product of *Nocardia farcinica*: structure elucidation, gene identification and role in drug resistance. *J Antibiot*. 査読有 63(1): 23-28, 2010.
3. Kohno S, Izumikawa K. Posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis: The next strategy against the threat

- of azole-resistant *Aspergillus* infection. Clin Infect Dis. 査読有 51: 1392-1394, 2010.
4. Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwarara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. Genes Cells. 査読有 16:80-89, 2011.
 5. Nagi M, Tanabe K, Takano Y, Kikuchi K, Miyazaki Y, Niimi M. Serum or bile affects the in vitro azole susceptibilities of *Candida* spp. Jpn J Infect Dis. 査読有 62(4): 306-308, 2009.
 6. Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. Jpn J Infect Dis. 査読有 63(5): 355-357, 2010.
 7. Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90 related stress responses. Med Mycol. 査読有 48(4): 606-612, 2010.
 8. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Inter Med. 査読有 49: 491-495, 2010.
 9. Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. Jpn J Infect Dis. 査読有 62(5): 392-393, 2009.

10. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Pulmonary cryptococcosis in late pregnancy and review of published literature. Mycopathologia. 査読有 167(3): 125-131, 2009.

[学会発表] (計 1 1 件)

山越 智, 橋本ゆき, 梅山 隆, 田辺公一, 金子幸弘, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 Y-1 を標的とした ELISA 検出系の構築と病原性の検討. 第 54 回日本医真菌学会総会. 10 月 16-17 日, 2010 年, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 義継 (MIYAZAKI YOSHITSUGU)
国立感染症研究所・生物活性物質部・部長
研究者番号 : 00311861

(2) 研究分担者

泉川 公一 (IZUMIKAWA KOUICHI)
長崎大学・医菌薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 20404212

山越 智 (YAMAGOE SATOSHI)
国立感染症研究所・生物活性物質部・主任
研究官

研究者番号 : 00212283