

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20790329

研究課題名（和文） *Aspergillus fumigatus* 各形態を認識する宿主因子の探索研究課題名（英文） Identification of a host factor recognizing *Aspergillus fumigatus*

研究代表者

豊留 孝仁 (TOYOTOME TAKAHITO)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任講師

研究者番号：90422245

研究成果の概要（和文）：アスペルギルス症は最も重要な真菌症の一つである。本研究課題ではアスペルギルス症の主な原因菌である *Aspergillus fumigatus* の各形態を認識する宿主因子の探索を行った。この結果、血清糖タンパク質の一つ、fetuin A が休止期分生子ではなく、菌糸に強く結合することが明らかとなった。我々の検討ではこの fetuin A が *A. fumigatus* のバイオフィーム形成を促進することが分かっており、本タンパク質が菌糸と相互作用することによりバイオフィーム形成が促進されていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Aspergillosis is one of the most important mycoses in the world. In this study, we explored host factors recognizing conidia and/or hyphae of *Aspergillus fumigatus*. We identified a host factor, fetuin A, as a binding protein to *A. fumigatus* hyphae. Additionally, our data indicated that fetuin A induced the formation of biofilm of *A. fumigatus*. Therefore, we suggest that binding of fetuin A to *A. fumigatus* hyphae induces the formation of biofilm playing a pivotal role in the pathogenesis of the infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：真菌感染症

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）・6911

キーワード：真菌・感染症・アスペルギルス・バイオフィーム・血清タンパク質・フェツイン

1. 研究開始当初の背景

我が国において、*Aspergillus* 属菌（主に *A. fumigatus*）が起因菌であるアスペルギルス症は増大の一途をたどっている。*A. fumigatus* を含めて *Aspergillus* 属菌はその生育過程において分生子から膨化分生子、そして菌糸へと形態を変え、さらに分枝を繰り返すといった点で出芽もしくは分裂を繰り返す酵母とは大きく異なる。また、その形態

と共に表面構造も変化することが知られている。このことから宿主との相互作用を考える上で、これら形態変化を考慮に入れる必要があるが、いまだこのような研究は少ない。さらに我々はこれまでの研究において *A. fumigatus* が血清存在下でバイオフィームを形成することを明らかとし、宿主内での持続感染に関与していることを示唆してきた。このように宿主因子との相互作用は感染防御

だけではなく、真菌が宿主から身を守り、自らの感染を進展させるという点で非常に複雑である。これらの相互作用を分子レベルで解明することにより、いまだ不明な部分が多いアスペルギルス症成立や多様な病態形成機序の解明が期待される。

2. 研究の目的

本研究では *A. fumigatus* と相互作用する宿主因子を探索することを目的とした。この目的を達成するために具体的には次の2つの目的を設定した。

- (1) これまでに血清中のバイオフィーム形成を促進する宿主因子として fetuin A という血清糖タンパク質を同定している。しかし、fetuin A と *A. fumigatus* との相互作用については不明である。そこで *A. fumigatus* と fetuin A の相互作用について明らかとする。
- (2) 主に細胞表面のタンパク質との相互作用解明を標的として、細胞抽出物を用いて *A. fumigatus* と相互作用する宿主因子を同定する。

これらを目的として設定し、*A. fumigatus* と相互作用する宿主因子を探索した。

3. 研究の方法

以下の2つの方法を用いて相互作用する宿主因子の探索を行った。

- (1) 血清成分 fetuin A との相互作用の検討：我々のこれまでの研究から血清中の糖タンパク質 fetuin A が *A. fumigatus* のバイオフィーム形成に重要であることが分かっていた。しかし、その分子機構は未だ不明であり、相互作用についても明らかではない。そこで fetuin A が *A. fumigatus* と直接相互作用するかどうかについて fetuin A を含むヒト成人血清を用いてプルダウンアッセイにより検討を行った。さらに fetuin A と菌糸との相互作用を評価するために fetuin A をラベルし、菌糸との相互作用を検討した。
- (2) 細胞表面タンパク質との相互作用の検討：樹状細胞株 DC2.4 細胞を用いて、細胞表面タンパク質の抽出を行い、*A. fumigatus* 菌体と結合するタンパク質についてプルダウンアッセイにより検討をした。得られたタンパク質は質量分析法により同定を行った。

4. 研究成果

- (1) Fetuin A との直接の相互作用：休止期分生子、膨化分生子、菌糸を調製し、それぞれとヒト成人血清を混合し、菌体と結合した fetuin A の検出を行った。その結果、図1に示すとおり、菌糸と fetuin A が結合することが明らかとなった。一方で休止期分生子と fetuin A との結合は検出できなかった。このことから fetuin A は菌糸と相互作用することが強く示唆された。さらに、図2に示すとおり、菌糸表面にパッチ状に結合する fetuin A が確認された。我々のこれまでの検討から、Fetuin A 添加によって *A. fumigatus* バイオマスの増大 (図3)、血清添加時と類似の厚いバイオフィーム形成 (図4)、そして菌糸の分枝促進 (図5) が誘導されることが明らかとなっており、fetuin A が *A. fumigatus* のバイオフィーム形成に強く関与していると考えられる。本研究で明らかとなった直接の fetuin A との相互作用がバイオフィーム形成の引き金となっている可能性も考えられる。今後、菌側の結合パートナーの同定や fetuin A 添加後の *A. fumigatus* 遺伝子発現プロファイルの解析により、バイオフィーム形成の詳細な機構が明らかになると期待している。

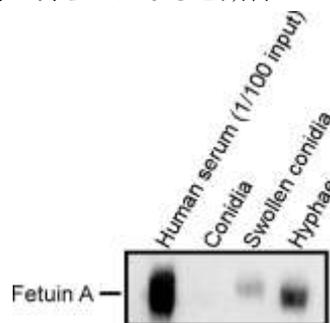


図1: *A. fumigatus* 菌体を用いた fetuin A のプルダウンアッセイ

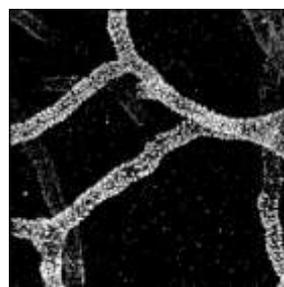


図2: *A. fumigatus* 菌糸への蛍光ラベル fetuin A の結合

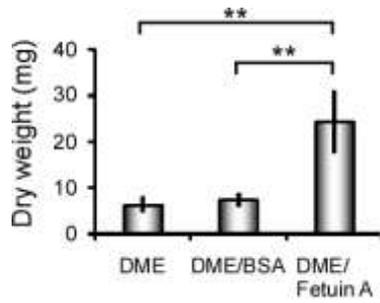


図 3: fetuin A 添加によりバイオマスが著しく増大する

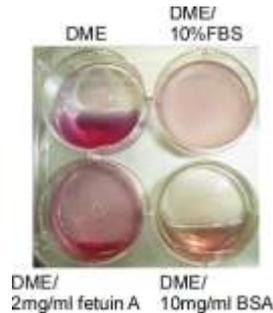


図 4: Fetuin A 添加によっても血清添加時と類似の厚いバイオフィルムを形成する

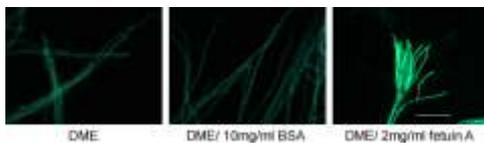


図 5: Fetuin A 添加時に菌糸の分枝が誘導されている

- (2) 細胞抽出物中の *A. fumigatus* 相互作用タンパク質: DC2.4 細胞より調製した細胞抽出物を用いてプルダウンアッセイを行った。複数の *A. fumigatus* 菌体と結合するタンパク質を見だし、これらを質量分析により同定を行った。その結果、これらのタンパク質の多くが細胞核に局在するタンパク質であった。細胞表面のタンパク質を標的としたがそのようなタンパク質を見出すことはできなかった。この理由として、真菌細胞壁の主成分である糖鎖を認識するレクチンは一般的に結合力がそれほど強くないために十分に回収ができなかった可能性が考えられる。一方で、宿主細胞の核タンパク質と *A. fumigatus* 菌体は非常に強く結合することが明らかとなった。感染の過程においても宿主細胞の破

壊などにより、核タンパク質との接触があると推定される。また、微生物を捕捉する好中球からの NET にも核タンパク質が含まれており、感染の過程でこの相互作用は重要な意味を持っていると推測される。今後、これらの相互作用が感染成立において持つ意味を検討していきたい。

この検討の中で *A. fumigatus* と相互作用する血清中の新たな宿主因子として Apolipoprotein AI (ApoAI) を見出した。このタンパク質は血清中のタンパク質であるが細胞抽出物中ではなく、培養に用いたウシ胎児血清から由来していた。ApoAI を蛍光ラベルして菌体との結合を検討したところ、パッチ状に結合した fetuin A と異なり、菌糸表面に一樣に結合する様子が観察された。また、菌糸のみならず、休止期分生子および膨化分生子においても結合が見られたことも fetuin A とは異なる。現在、ApoAI が *A. fumigatus* に及ぼす影響等について検討を進めている。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Toyotome T, Yamaguchi M, Iwasaki A, Watanabe A, Taguchi H, Qin L, Watanabe H, Kamei K, Fetuin A, a serum component, promotes growth and biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*, Int. J. Med. Microbiol., 302, 108-116, 2012, 査読有
- ② 豊留孝仁、亀井克彦、病原真菌の病原機構と病原因子、化学療法の領域、28、201-207、査読無
- ③ Toyotome T, Watanabe A, Iwasaki A, Kamei K, Strategy of *Aspergillus fumigatus* to evade attacks from host-projectile weapons and armor, Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 50, 139-145, 2009, 査読無
- ④ 豊留孝仁、渡辺哲、亀井克彦、ゲノムプロテオーム解析による真菌病原因子の解明と抗真菌薬創薬への期待、日本臨牀、66、2255-2260、2008、査読無
- ⑤ Watanabe A, Hashimoto Y, Higurashi H, Ochai E, Toyotome T, Nagayoshi M, Kamei K, Candidates for virulence factors of *Aspergillus fumigatus*, Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 49, 263-267, 2008, 査読無

[学会発表] (計 14 件)

- ① 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* バイオフィルム形成に関与する宿主因子の検討、第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 4 月 27 日-29 日、長崎
- ② Takahito Toyotome, Fetuin A, a serum glycoprotein, promotes the growth and the biofilm formation of *Aspergillus fumigatus*, The 5th Advances Against Aspergillosis, 2012 年 1 月 26 日-28 日、トルコ・イスタンブール
- ③ 豊留孝仁、宿主血清タンパク質 fetuin A が *Aspergillus fumigatus* に及ぼす影響、2011 年インターラボセミナー、2011 年 12 月 10 日、東京
- ④ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* にとっての宿主因子との正の相互作用、負の相互作用、第 55 回日本医真菌学会総会、2011 年 10 月 21 日、東京
- ⑤ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* バイオフィルム形成を促進する血清中因子の同定、第 94 回日本細菌学会関東支部総会、2011 年 10 月 6 日-7 日、東京
- ⑥ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* のバイオフィルム構築を促進する血清糖タンパク質の同定、第 54 回日本医真菌学会総会、2010 年 10 月 16 日-17 日、東京
- ⑦ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* バイオフィルム構築を促進する血清成分の同定、第 24 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2010 年 7 月 9 日、東京
- ⑧ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* 膨化分生子処理により誘導される MEK/ERK 経路活性化と AP-1 活性化、第 84 回日本感染症学会総会、2010 年 4 月 6 日-7 日、京都
- ⑨ 豊留孝仁、ERK-1/2 and AP-1 activation upon treatment with swollen conidia of *Aspergillus fumigatus*、第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 28 日-29 日、横浜
- ⑩ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* 膨化分生子処理で誘導される TNF- α 産生は MEK/ERK 経路に依存している、第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2009 年 10 月 30 日、東京
- ⑪ 豊留孝仁、*Aspergillus fumigatus* 膨化分生子処理時の MAP キナーゼ ERK-1/2 活性化、第 30 回関東医真菌懇話会、2009 年 11 月 21 日、東京
- ⑫ Takahito Toyotome, The activation of host transcription factor, AP-1, triggered by *Aspergillus fumigatus*, The 17th Congress of the ISHAM (ISHAM2009), 2009 年 5 月 29 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊留 孝仁 (TOYOTOME TAKAHITO)
千葉大学・真菌医学研究センター・特任講師

研究者番号：90422245