

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07501

研究課題名（和文）病原性酵母クリプトコックスの病原因子としてのタンパク質マンノシル化機構の解明

研究課題名（英文）Involvement of protein mannosylation in virulence in a pathogenic yeast
Cryptococcus neoformans

研究代表者

清水 公德 (Shimizu, Kiminori)

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・教授

研究者番号：40345004

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：病原性酵母クリプトコックス・ネオフォルマンズのタンパク質マンノシル化機構と病原性の関連の解明を目指して研究を行ったが、タンパク質の抽出やGFP融合タンパク質の観察などの技術的な面で遅滞が発生した。含硫アミノ酸合成系の解明に至る過程でMET5遺伝子を同定するとともに、その病原性への関与について明らかとした。並行して実施したアスペルギルス・ニドランスを用いたタンパク質マンノシル化酵素のかび毒産生への関与に関する研究では、論文として好評にいたる成果が上げられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性酵母クリプトコックス・ネオフォルマンズのタンパク質マンノシル化機構と病原性の関連の解明を目指して研究を行った。タンパク質の抽出やGFP融合タンパク質の観察などの技術的な面で遅滞が発生した。関連して実施した含硫アミノ酸合成系の解明に至る過程でMET5遺伝子を同定するとともに、その病原性への関与について明らかとした。その結果、MET5遺伝子欠損はマウスに対する病原性を失わせるのに対して、カイコに対する病原性については顕著な影響が見られないことを示した。このことは、病原微生物の病原性を評価する上で用いる実験動物の選択が重要であることを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the relationship between the protein mannosylation mechanism and pathogenicity of a human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*, but there were technical delays in the extraction of proteins and the observation of GFP-fused proteins. In a parallel study on the involvement of protein mannosylation enzymes in mycotoxin production using *Aspergillus nidulans*, the results were well received.

研究分野：微生物学、医真菌学

キーワード：病原性酵母 *Cryptococcus neoformans* 病原性実験 含硫アミノ酸 遺伝子機能解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の着想に至った源流は、病原酵母類の分類基準とされる形質 (DBB 染色応答) の分子メカニズムの解明を試みた研究である。すなわち、タンパク質マンノシル化酵素の一つ PMT2 機能が DBB 染色に関わることを見出した。さらに、PMT2 機能の欠損により、病原性をはじめ交配能、莢膜合成やストレス応答など多くの面で異常が認められることを解明した。このように、PMT2 の機能がクリプトコックスの性状に及ぼす影響は広汎におよぶものの、分子レベルでの生命現象の説明には至っていない。これまで DBB 染色メカニズムを解明する目的の研究を続ける中で PMT2 以外にも細胞壁合成酵素が DBB 染色に必須であることを突き止めた。

2. 研究の目的

本研究課題「病原性酵母クリプトコックスの病原因子としてのタンパク質マンノシル化機構の解明」では、病原性遺伝子としての性質をもつ PMT2 のターゲットタンパク質の同定を通して、タンパク質マンノシル化機構を解明することを目的とした。これまで病原真菌のタンパク質糖鎖化酵素が病原性に関与する研究は数多く報告されてきた。ところが、これらの酵素の基質がどのようなタンパク質で、そのタンパク質がどのような機構で病原性に関わるのかを関連付けて論じた研究報告例は皆無である。私たちのこれまでの研究では、病原性に直接関わる莢膜、莢膜合成への分泌タンパク質の関与、そして分泌タンパク質の修飾酵素を、それぞれ明らかにしてきた。その実績にもとづき、これまでの発見の隙間を埋める研究計画である。

3. 研究の方法

(1) プロテオミクス的アプローチによるマンノシル化タンパク質の同定

マンノシル化を含む糖鎖修飾を受けるタンパク質を特定するため、クリプトコックス野生型株 (以下、WT 株) および PMT2 遺伝子変異株 (以下、PMT2 株) からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動により全タンパク質を分画する。タンパク質スポットのうち、シフトしたタンパク質を切り出し、アミノ酸配列を解読する。

また、これとは別に、WT 株および PMT2 株からそれぞれ抽出したタンパク質から、マンノース結合型レクチンであるコンカナバリン A (ConA) によるマンノシル化タンパク質のみを抽出する。すなわち、ConA アガロースカラムを用いてそれぞれの株の全タンパク質からマンノースが付加したタンパク質を精製する。これらを SDS-PAGE あるいは二次元電気泳動により分画し、WT 株特異的なタンパク質スポットを切り出し、アミノ酸配列を解読する。

上記の方法により解読したアミノ酸配列をもとにクリプトコックスのゲノムデータベースのアンノテーションデータと比較し、同定したタンパク質をコードする遺伝子配列を特定する。

(2) マンノシル化タンパク質の病原性への関与

上記に従い特定したタンパク質コード遺伝子 ORF をそれぞれノックアウトする (以下、KO 株)。KO 株にノックアウトした遺伝子を再導入した株 (RC 株) を作製する。

WT 株、KO 株および RC 株をカイコに接種し、WT 株と KO 株の間で病原性が異なるかについて解析する。菌の分離試験および病理試験により、病原性に変化が生じた KO 株が宿主から影響される感染段階を突き止める。

(3) マンノシル化タンパク質の細胞内挙動解析

病原性への関与が認められた遺伝子 ORF を PCR により増幅する。すでに構築したクリプトコックス発現ベクター (Shimizu et al, 2014) にクローニングする。

クローニングした ORF の上流または下流に GFP、RFP などの蛍光タンパク質コード遺伝子を組み込み、融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製する。これを WT 株および PMT2 株に導入し、目的タンパク質の細胞内における挙動を観察する。

4. 研究成果

病原性酵母クリプトコックス・ネオフォルマンスのタンパク質マンノシル化機構と病原性の関連の解明を目指して研究を行った。タンパク質の抽出や GFP 融合タンパク質の観察などの技術的な面で遅滞が発生した。関連して実施した含硫アミノ酸合成系の解明に至る過程で MET5 遺伝子を同定した (Fig. 1)。

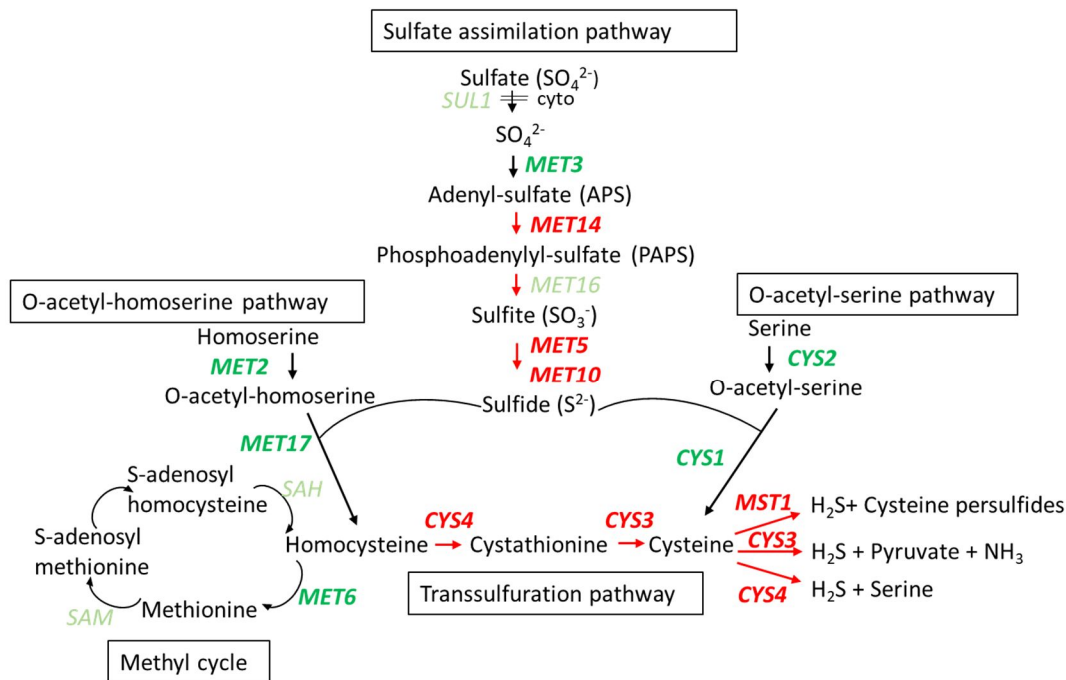


Fig. 1

また、MET5 遺伝子欠損はマウスに対する病原性を失わせるのに対して、カイコに対する病原性については顕著な影響が見られないことを示した (Fig. 2)。

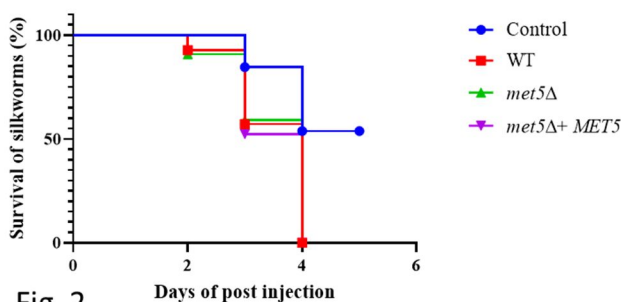


Fig. 2

このことは、病原微生物の病原性を評価する上で用いる実験動物の選択が重要であることを示唆するものである。また、並行して実施したアスペルギルス・ニドランスを用いたタンパク質マンノシル化酵素のかび毒産生への関与に関する研究では、論文として公表にいたる成果が上げられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nguyen Phuong-Thao, Nguyen Ngoc-Hung, Kang Ying-Qian, Shimizu Kiminori	4. 巻 63
2. 論文標題 <i>Cryptococcus neoformans MET5</i> Gene is not Essential for Virulence in the Silkworm Infection Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 77 ~ 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.21-00023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Le Thi Huynh Tram, Le Thy Nhan, Yoshimi Akira, Abe Keietsu, Imanishi-Shimizu Yumi, Shimizu Kiminori	4. 巻 368
2. 論文標題 Hyperosmotic medium partially restores the growth defect and the impaired production of sterigmatocystin of an <i>Aspergillus nidulans</i> pmtC mutant in a HogA-independent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnab127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nguyen Phuong Thao, 清水由巳, 清水公德
2. 発表標題 Sulfur amino acid metabolism in a basidiomycetous yeast <i>Cryptococcus neoformans</i>
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	清水 由巳 (Shimizu Yumi) (50725124)	関東学院大学・理工学部・教授 (32704)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	Guizhou Medical University			
ベトナム	Nong Lam University of Ho Chi Minh City			