

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 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591110
 研究課題名（和文） 新規蛋白抗原検出による接合菌症の早期診断法の開発
 研究課題名（英文） Development of Early Detection kit for diagnosis mucormycosis
 研究代表者
 掛屋 弘（KAKEYA HIROSI）
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：40398152

研究成果の概要（和文）：

接合菌症は主に血液疾患などの免疫抑制患者に発症する深在性真菌症であるが、現在その診断は培養と病理学的診断のみに頼らざるをえず、その予後も大変不良なため血清診断などの補助診断法の開発が期待されている。我々は接合菌症の早期診断に有用と考えられる血清診断法の開発研究を試みた。真菌研究における新しいアプローチであるシグナルシーケンストラップ法を利用し、接合菌（*Rhizopus oryzae*）の膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定して、抗原蛋白の候補を選出した。最も多いクローンが検出された候補 A 抗原（26kDa 蛋白）および 2 番目に多いクローンであった候補 B 抗原（46kDa 蛋白）は、それぞれシグナルシーケンスを有し、候補 B はベータグルカン合成酵素に関連する遺伝子を有していた。本研究期間では候補 A 抗原を検出する ELISA キットを作成し、その評価を行った。その結果、候補 A 抗原は *R. oryzae*、*R. microspores*、*R. microspores var. rhizopodiformis* 培養上清中およびそれらの感染マウス血清中からも検出され、新たな抗原検出法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The diagnosis of mucormycosis relies upon the identification of organisms in tissue by histopathology with culture confirmation. However, culture often yields no growth, and histopathologic identification of an organism with a structure typical of Mucorales may provide the only evidence of infection. A clinician must think of this entity in the appropriate clinical setting and pursue invasive testing in order to establish a diagnosis as early as possible. Therefore, new early detection methods are required. We used a novel signal sequence trap methods to select protein antigen from *Rhizopus oryzae*. Two unknown proteins with signal sequences, antigen A (26kDa, hypothetical protein) and B (46kDa, hypothetical protein) were selected as candidates. We made ELISA kit to detect antigen A. The antigen A was detected in the culture supernatant of *R. oryzae*, *R. microspores*, *R. microspores var. rhizopodiformis*. The antigen was also detected in the serum form *Rhizopus* infected mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：接着菌、シグナルシーケンシ、診断キット

1. 研究開始当初の背景

接合菌症は白血病などの高度の免疫抑制患者に発症する深在性真菌症である。その頻度は稀であるが、剖検症例の報告では深在性真菌症の原因としてアスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスに次ぐ原因真菌であり、特に、白血病 (MDS を含む) の剖検例では、接合菌症はアスペルギルス症、カンジダ症に次ぐ、第 3 位にあたり、血液疾患の主要な死因である。さらにその頻度は近年増加傾向にある。(深在性真菌症の診断・治療ガイドライン 2007、協和企画) その治療薬は、わが国では未発売のポサコナゾールとアムホテリシン B 製剤のみが有効であるが、その予後は極めて不良で初期の抗真菌薬選択が重要となる。一方、その診断は、専ら培養による真菌学的検査と病理組織学的検査に限られ、補助診断としての血清学的検査は実用化していない。

2. 研究の目的

我々は真菌研究における、新しいアプローチであるシグナルシーケンストラップ法を利用し、真菌の診断ツールならびに治療薬候補を応用することが期待される膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した後に、モノクローナル抗体開発して、接合菌症の早期診断法を確立することを計画した。

3. 研究の方法

1. シグナルシーケンストラップ法による候補遺伝子の検索

「シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法)」(Kojima T, Kitamura T. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. *Nat Biotechnol*, 17:487-490, 1999) とよばれる細胞からの分泌蛋白質および膜蛋白質を選択的に同定するシステムが開発され、様々な蛋白質をコードする遺伝子群(cDNA ライブラ

リー)から、シグナルシーケンス (分泌蛋白質および膜蛋白質に共通して存在する疎水性のアミノ酸配列) を有する分泌蛋白質および膜蛋白質を選択的に同定する方法である。我々は、接合菌の代表菌種である *Rhizopus oryzae* より RNA を抽出して cDNA を作成。その後、シグナルシーケンストラップ法によって膜蛋白および分泌蛋白遺伝子を網羅的に同定した。

2. 候補抗原の選択

その中から接合菌に特異的な蛋白の候補の選出を行った。

3. GST 融合型候補 A-遺伝子発現系構築

5'側、3'側の各プライマーを設計した (プライマーは未公表)。5'側は EcoRI、3'側は NotI の制限酵素サイトを付加した。

テンプレートを用いて上記プライマーで増幅した PCR 産物と pGEX-4T-1 を EcoRI、NotI で消化しクローニングした。その後、クローニングにてコロニーを複数得て、それらについて配列の確認を行った。そしてクローニングされた遺伝子配列と完全一致した 4 クローン(#1-4) を選抜し、BL21、T7 express の各大腸菌株へ導入し、タンパク質の発現をチェックした。

4. 大腸菌による候補 A-遺伝子発現系構築、pGEX-4T-1 ベクターを用いた発現検討

候補 A 遺伝子 (gene17118) を pGE4T-1 ベクターに挿入し、BL21 あるいは T7 express 株に導入した。得られた大腸菌株を 37°C で培養し、OD600nm=0.5 の時点でタンパク質発現誘導した。誘導条件は、15°C 培養、0.5 mM IPTG 添加で行なった。

5. 大腸菌培養による候補 A-遺伝子由来蛋白質の精製

発現を確認したクローン#1 菌株を 3L 培養した。菌増殖後に菌体を回収し、PBS で懸濁

した。その後、超音波破碎装置で菌体を破碎し、遠心(10000xg1 時間)で上清を回収した。あらかじめ PBS で平衡化した Glutathione Sepharose 4B (GE ヘル ス ケ ア #17-0756-01) に上清を添加し、カラムを PBS で十分に洗浄し、50 mM Tris-HCl(pH8.0)/20 mM グルタチオンを用いて溶出した。

6. ELISA キットの評価

ELISA の感度を測定した。

7. 真菌培養上清中の候補 A 抗原の検出

液体培地 (sabouraud dextrose broth) にて各真菌を振とう培養 (200rpm)。培養 6 時間、24 時間、48 時間後に培養上清を回収。遠心 (3000rpm, 20min) 後に、0.2 μ m のフィルターにて濾過後、濃度を ELISA キットで測定した。

8. 感染マウス血清中の抗原検出

感染 2 日前および感染日に Cortisone acetate 250mg/kg と Cyclophosphamide 200mg/kg を投与して免疫を抑制したマウスに接合菌 (*R. oryzae*, *R. microspores*, *R. microspores var. rhizopodiformis*) を経気道感染。感染 4 日目に採血を行い、遠心後血清を保存。後日、ELISA キットにて候補 A 抗原の検出を試みた。

4. 研究成果

1. シグナルシーケンストラップ法による膜蛋白および分泌蛋白遺伝子の検出

接合菌の代表菌種である *Rhizopus oryzae* (臨床分離株) を使用し、37°C 48時間培養後にRNAを抽出し、cDNAを作成した。その後シグナルシーケンストラップを行い、膜蛋白および分泌蛋白の候補として計302のクローンを得た (国立感染症研究所との共同研究)。

2. 候補抗原の選択

302の候補蛋白のシーケンスおよび *R. oryzae* のデータベース (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryza

[e/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryza/e/MultiHome.html)) より遺伝子の同定を行った。その結果、得られたクローンの中には、Lipase (クローン4つ) やphosphoglycerate kinase (クローン2つ)、heat shock protein 70(クローン1つ)などの既知の蛋白も含まれていたが、多くはその機能が未知なhypothetical proteinやpredicted proteinであった(表)。

211クローンが得られたhypothetical proteinの中でも最も多い163のクローンを占めた蛋白 (候補A) は、226アミノ酸から構成される約23 k Daの蛋白で、アミノ酸配列解析の結果、シグナルシーケンスを有することが確認された。また2番目に多い45のクローンが得られた蛋白 (候補B) は、predicted proteinに分類され、486アミノ酸から構成される約46 k Daの蛋白で、同様にシグナルシーケンスを有し、一部は細胞壁の β グルカン合成酵素に関連するタンパク質である可能性が示唆された。

(個々のクローンの遺伝子名は、今後の特許申請等にも関係があるため本稿には未記載。)

表. シグナルシーケンストラップ法により得られたクローンの内訳

	クローン数
hypothetical protein	211
predicted protein	72
既知の蛋白	19
計	302

3. GST 融合型候補 A-遺伝子発現系構築

当科の *Rhizopus oryzae* 保存株 (#1327) より得られた遺伝子をテンプレートとしてえられた候補 A のクローニングを行った。その結果、報告されている当該遺伝子の配列と比較してアミノ酸レベルで3つの変異が認められたが、他の異なる保存株でも同様にその3つのアミノ酸変異が認められた。

4. 大腸菌による候補 A-遺伝子発現系構築、

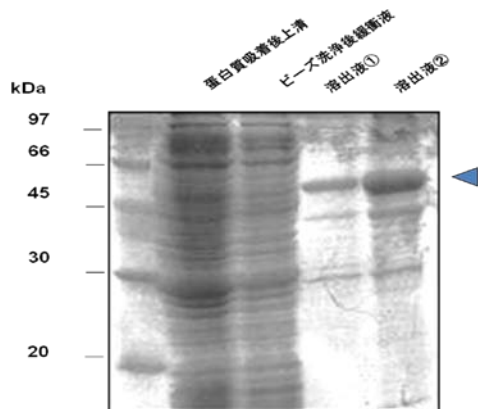
pGEX-4T-1 ベクターを用いた発現検討

両株で目的タンパク質を検出し、候補 A 遺伝子由来のタンパク質が発現することを確認した。

5. 大腸菌培養による候補 A-遺伝子由来蛋白質の精製

発現を確認したクローン#1 菌株を培養後に超音波破碎装置で破碎し、遠心後に上清を Glutathione Sepharose 4B (GE ヘルスケア #17-0756-01) に添加して、3mg の精製たんぱく質を溶出した。

得られたタンパク質の電気泳動を示す (図 1)。目的の 23 kDa に約 30 kDa のマーカーが添付された目的の蛋白が認められた。

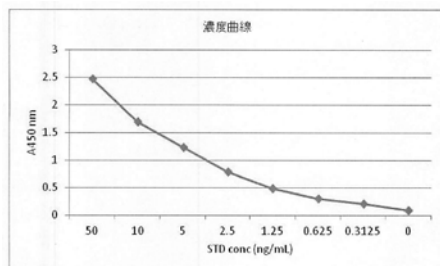


(図 1)

6. ELISA キットの評価

R. oryzae の候補 A 抗原 (23kDa 蛋白) を検出する ELISA キットの検量線を示す (図 2)。

図 2



7. 真菌培養上清中の候補 A 抗原の検出

R. oryzae, *R. microspores*, *R. microspores*

var. rhizopodiformis の培養上清中に候補 A 抗原が検出されたが、*Aspergillus fumigatus* や *Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans*、他の接合菌種の培養上清中には検出されなかった (図 3)。また、候補 A 抗原は、*R. oryzae*、*R. microspores*、*R. microspores var. rhizopodiformis* の培養上清中に経時的に増加していた (図 4)。

図 3

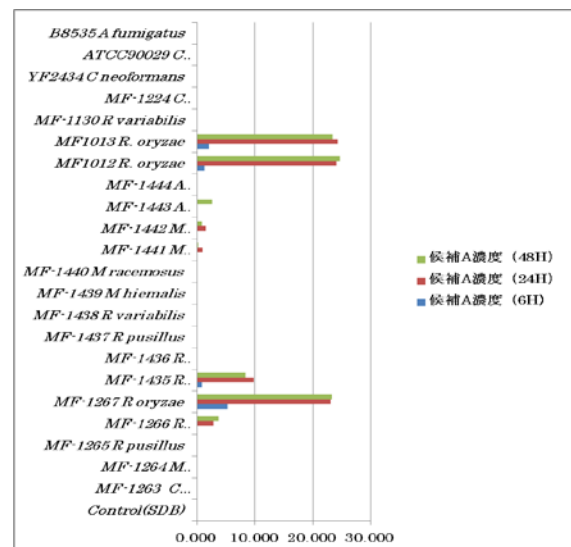
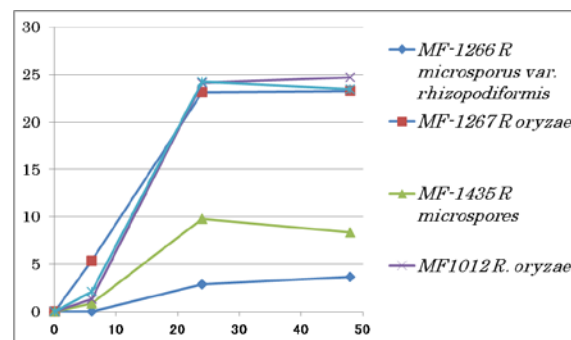


図 4



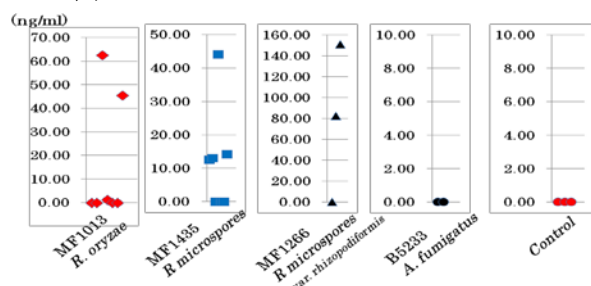
単位 ng/ml

感染マウス血清中の抗原検出

R. oryzae, *R. microspores*, *R. microspores var. rhizopodiformis* 感染マウス血清中に、候補 A 抗原が検出された (それぞれ 2/7 匹、

4/7 匹、2/3 匹陽性)。一方、候補 A 抗原は、*A. fumigatus* 感染マウスや非感染マウスの血清中には検出されなかった (図 5)。

図 5



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 13 件)

1. Saijo T, Miyazaki T, Izumikawa K, Mihara T, Takazono T, Kosai K, Imamura Y, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Skn7p is required for oxidative stress response and virulence in *Candida glabrata*. *Mycopathologia*. 169:81-90, 2010

2. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 1639-1643, 2010

3. Kohno S, Izumikawa K, Ogawa K, Kurashima A, Okimoto N, Amitani R, Takeya H, Niki Y, Miyazaki Y. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. *J Infect Dis*. 61: 410-418, 2010

4. Miyazaki T, Izumikawa K, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Yasuoka A, Kohno S. The glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease Yps1 is transcriptionally regulated by the calcineurin-Crz1 and Slt2 MAPK pathways in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 11: 449-456, 2011

5. Takazono T, Izumikawa K, Nagayoshi Y, Tanaka A, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kamihira S, Kohno S. Evaluation of the Cica Fungi Test Candida, a novel serum Candida mannan antigen kit, and its comparison with Cand-Tec in candidemia patients. *Jpn J Infect Dis*. 64: 116-120, 2011

6. Kobayashi T, Takeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. *Jpn J Infect Dis*. 64: 292-296, 2011

7. Miyazaki T, Izumikawa K, Nagayoshi Y, Saijo T, Yamauchi S, Morinaga Y, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Functional characterization of the regulators of calcineurin in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 11: 621-630, 2011

8. Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an

adult pneumology ward. Med Mycol.
49: 581-585, 2011

9. Kohno S, Izumikawa K, Takeya H,
Miyazaki Y, Ogawa K, Amitani R,
Niki Y, Kurashima A. Clinical efficacy
and safety micafungin in Japanese
patients with chronic pulmonary
aspergillosis: a prospective observational
study. Med Mycol. 49: 688-693, 2012

10. Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu
A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, Mihara T,
Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y,
Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y,
Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto
M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara
K, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S.
Antifungal susceptibilities of *Aspergillus*
fumigatus clinical isolates in Nagasaki,
Japan. Antimicrob Agents Chemother.
56: 584-587, 2012

11. Izumikawa K, Yamamoto Y, Mihara T,
Takazono T, Morinaga Y, Kurihara S,
Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T,
Nishino T, Tsukamoto M, Takeya H,
Yanagihara K, Mine M, Yasuoka A,
Tashiro T, Kohno S. Bronchoalveolar
lavage galactomannan for the diagnosis
of chronic pulmonary aspergillosis. Med
Mycol. 50:811-817, 2012

12. Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K,
Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono
T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S,
Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T,
Tsukamoto M, Takeya H, Yamamoto Y,
Yanagihara K, Yasuoka A, Tashiro T,
Kohno S. Correlation between triazole
treatment history and susceptibility in
clinically isolated *Aspergillus fumigatus*.
Antimicrob Agents Chemother. 56:
4870-4875, 2012

13. Mihara T, Izumikawa K, Takeya H,
Ngamskulrungron P, Umeyama T,
Takazono T, Tashiro M, Nakamura S,
Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H,
Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y,
Kohno S. Multilocus sequence typing of
Cryptococcus neoformans in non-HIV
associated cryptococcosis in Nagasaki,
Japan. Med Mycol. 51: 252-256, 2013

〔学会発表〕(計1件)
掛屋 弘、他. 新規蛋白抗原を使用した接合
菌症の早期診断法開発の試み. 第14回真菌
症フォーラム. 2013年2月16日, 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

掛屋 弘 (KAKEYA HIROSI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 40398152

(2)研究分担者

河野 茂(KOUNO SIGERU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80136647

(3)連携研究者

該当なし