

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590502

研究課題名(和文)カンジダ感染における留置カテーテルの影響に関する遺伝子機能解析

研究課題名(英文)Functional gene analysis for the influence of the indwelling catheter in the Candida infection

研究代表者

知花 博治 (Chibana, Hiroji)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：30333488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダグラブラータの病原性には複数の因子が関与すると考えられているが、未解明な点が多い。最近の研究において、危険因子の中で特に問題となっているが留置カテーテルである。そこで、本研究では留置カテーテルの付着に関与すると考えられるβ-グルカン、マンノプロテイン、レクチンなど細胞表層を構成する成分や加水分解酵素などの分泌酵素、さらにバイオフィルムの形成に関する成分などをコードする遺伝子などを中心に遺伝子欠損株を作成し研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：It is thought that multiple factors participate in pathogenicity of the *Candida glabrata*, but there are many unexplained points. In a recent study, it becomes the problem in particular as a risk factor is indwelling catheter. Therefore we made deletion mutants of the genes encoding beta-glucan, manno protein, the secretase such as an ingredient or the hydrolase which constituted the cell outer layer including the lectin. They were thought that participating in adhesion of the indwelling catheter by the formation of the biofilm.

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：病原真菌

1. 研究開始当初の背景

カンジダ属 (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* など) は、表皮、粘膜、口腔、食道、腸、肛門など人体の様々な部位に常在する真菌である。健常者にとってカンジダは重要な問題ではないが、抗生物質、ステロイド剤などを長期投与された患者には、しばしば膣カンジダ症や口腔カンジダ症を起こす。さらに重度の糖尿病、抗がん剤や免疫抑制剤の長期投与、臓器移植、エイズ、留置カテーテルなど危険因子を伴う患者に対しては、重篤な深在性(内臓)感染症を起こす。国内において全血流感染原因菌(細菌感染を含む)のうちカンジダは第4位(7-8%)であり、致死率20-50%に達する重篤な日和見感染症を起こし問題となっている(医真菌学会 2010)。

多様な感染症を起こすカンジダ症においては、複数の病原因子が関与すると考えられているが、未解明な点が多く残されている。カンジダ血症を発症した患者において、最近、特に問題になっている危険因子は留置カテーテルである。カンジダは留置カテーテルの表面にバイオフィルムを形成するだけでなく、抗真菌薬の感受性低下させることが知られている(Nett et al. 2007)。

2. 研究の目的

我々はカンジダ属の中で最も分子生物学的操作が簡便なカンジダグラブラータについて、ゲノム情報の高品質化を行うとともに、網羅的な遺伝子組換え株を作成し、本菌が宿主の危険因子である留置カテーテルをどのように利用し感染に至るのか、関与する遺伝子をスクリーニングする。

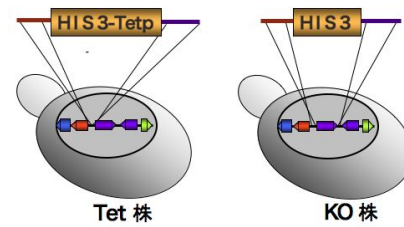
3. 研究の方法

(1) ゲノム情報の高品質化: カンジダグラブラータを温度、糖濃度、最少培地、富栄養培地等様々培養条件において培養を行い RNA を抽出する。IniTIA 法により 5' 端側を選択的に精製す

る。これを cDNA に逆転写し次世代シーケンサーを用いてシーケンスを決定する。得られたシーケンスを染色体にマッピングすることにより、各遺伝子の転写開始点を決定すると共に、未同定遺伝子を特定する。

(2) 分泌性タンパク質の予測: SignalP4.0 を用いて分泌性シグナルペプチドを予測する。

(3) 遺伝子組換え体の作成: 分泌性シグナルペプチドを予測された遺伝子について網羅的に遺伝子組換え体を作成する。



その際、生育必須等の理由により遺伝子欠損操作が施せない遺伝子については、テトラサイクリンを培地に添加することによって転写抑制される組換え体(Tet 株)を作成し、必須ではない遺伝子については遺伝子破壊株(KO 株)を作成する。

4. 研究成果

(1) ゲノム情報の高品質化: 4,316 遺伝子の転写開始位置を決定し、新規に 59 遺伝子を見出した。その内 22 遺伝子については、他の生物の遺伝子にもアミノ酸配列の類似性が低く、本菌の特異的な遺伝子であることが示され、病原性の解明などに寄与することが期待できる。また転写開始点から開始コドンまでの距離を計測した結果、95%の遺伝子が 200bps 以内に転写開始点を持つことが示された(Figure 1)。さらにパン酵母の 5'-UTR の長さと比較も合わせて行ったところ、転移酵素の 5'-UTR が平均-805bps でパン酵母(73.4bps)の 11 倍にも達することが

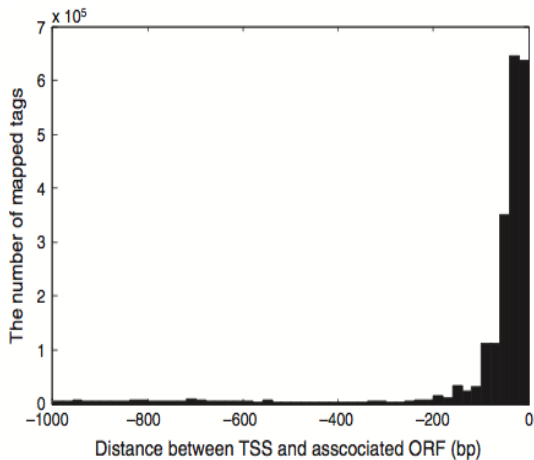


Figure 1 Distribution of mapped position of tags on the 5'-flanking region of each gene.

わかった。転移酵素の多くは細胞壁の構築に重要な機能を司っている。宿主との接点である細胞壁の構築に関する遺伝子群がパン酵母と比較し、その差が顕著であることはカンジダグラブラータの病原性を考える上に興味深い。さらに本解析結果は組換え体作成におけるテトラサイクリンプロモータの挿入位置の決定に有用である(Figure 3. Aoyama, Chibana et al., 2014).

(2) カテーテルへの付着やバイオフィーム形成には細胞外分泌タンパクが重要な役割を担うことが予想されるため、SignalP4.0 を用いてカンジダグラブラータの全ゲノムについて検索した。その結果 21.1% (1,000 遺伝子) において分泌性シグナルペプチドの存在が予測された。このうち約 90% (900 遺伝子) について遺伝子欠損あるいは転写抑制組換え体を作成した。今後これらの組換え体を用いて、バイオフィーム形成やカテーテルへの付着メカニズムについて研究を進めている。

Table 3 Average length of 5'-UTR of genes classified according to function and localization in *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*

| | <i>C. glabrata</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Significant difference† |
|-------------------------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Transferase activity | -805.0 | -73.4 | * |
| Actin binding | -23.8 | -29.2 | |
| Lipid metabolic process | -29.2 | -73.5 | |
| Phosphoprotein phosphatase activity | -51.2 | -136.9 | * |
| Nuclear envelope | -48.0 | -80.2 | |
| Chromosome | 0.0 | -50.7 | |
| Golgi apparatus | -31.2 | -103.0 | * |
| Mitochondrion organization | -99.5 | -205.5 | * |
| Nuclease activity | -46.1 | -42.4 | |
| Translation | -258.4 | -62.7 | * |
| Cell communication | -700.1 | -46.0 | * |
| Signal transduction | -24.3 | -97.7 | |
| Electron carrier activity | -120.2 | -56.3 | |
| RNA binding | -8.3 | -64.5 | * |
| Structural molecule activity | -31.2 | -81.9 | * |
| Nucleotide binding | -29.2 | -89.5 | * |
| Peptidase activity | -46.8 | -45.8 | |
| Nucleoplasm | 0.0 | -62.2 | |
| Ribosome | -42.2 | -65.3 | |
| Cytoskeletal protein binding | -40.0 | -54.0 | |
| Biological process | -4.0 | -88.2 | * |
| Carbohydrate metabolic process | -805.0 | -83.6 | * |
| Transcription factor activity | -154.7 | -105.4 | |
| Protein binding | -48.0 | -51.2 | |
| DNA binding | -9.6 | -80.1 | * |
| Hydrolase activity | -134.6 | -79.5 | * |
| Lipid binding | -29.1 | -97.6 | * |
| Metabolic process | -12.5 | -100.6 | * |
| Intracellular | -46.8 | -83.4 | |
| Receptor activity | -4.0 | -115.4 | |
| Endoplasmic reticulum | -628.2 | -61.8 | * |
| Cytosol | -126.2 | -123.0 | * |
| Endosome | -49.7 | -139.0 | * |
| Nucleus | -154.7 | -70.1 | * |
| Vacuole | -664.0 | -75.6 | * |
| Protein metabolic process | -126.9 | -52.0 | |
| Response to stress | -37.3 | -64.8 | * |
| Cytoplasm | -258.4 | -70.5 | * |

Table 3 (Continued)

| | <i>C. glabrata</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Significant difference† |
|---|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Calcium ion binding | -404.3 | -45.3 | * |
| Peroxisome | -28.6 | -132.4 | * |
| Mitochondrion | -670.8 | -73.8 | * |
| Biosynthetic process | -47.6 | -98.4 | * |
| Cytoskeleton | -93.0 | -40.2 | |
| Cytoskeleton organization | -93.0 | -74.0 | * |
| Protein modification process | -161.8 | -50.0 | |
| Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process | -135.0 | -83.2 | * |
| Enzyme regulator activity | -700.1 | -30.5 | * |
| Nucleolus | -31.0 | -55.6 | |
| Cellular component | -150.0 | -106.3 | |
| DNA metabolic process | -59.0 | -108.0 | |
| Kinase activity | -47.6 | -69.3 | |
| Catalytic activity | -556.9 | -100.6 | * |
| Plasma membrane | -805.0 | -118.8 | * |
| Protein transport | -157.6 | -88.0 | |
| Signal transducer activity | -201.6 | -177.7 | |

*Probability of significant difference of $P < 0.05$.

Predicted *C. glabrata* genes were categorized by CGD (<http://www.candidagenome.org/download/go/>). The information for TSSs of *S. cerevisiae* was also obtained from the web site (http://downloads.yeastgenome.org/published_datasets).

†The average distance between TSS and the first ATG of each gene ontology (GO) was calculated and statistical analysis (Wilcoxon test) was performed to confirm whether there were significant differences between *C. glabrata* and *S. cerevisiae*.

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 1 件)

Toshihiro Aoyama, Hironobu Nakayama, Keigo Ueno K, Tatsuya Inukai T, Koichi Tanabe, Minoru Nagi, Martin M. Bard Hiroji Chibana: Genome-wide survey of transcriptional initiation in the pathogenic fungus, *Candida glabrata*. Genes Cells. 2014 Apr 14. doi: 10.1111/gtc.12147 in press. 査読あり

学会発表] (計 2 件)

知花博治 : *Candida glabrata* 遺伝子改変株コレクションを用いた病原性の理解と抗真菌薬の

標的探索. 第 57 回医真菌学会総会シンポジウム. 東京. 2013 年 9 月 27 日. 招待講演

Chibana H: Research project for understanding pathogenicity and parasitism of *Candida glabrata*. The 20 th anniversary symposium. The Korean Society for Medical Mycology. Seoul (Korea). 2013. 6. 1. 招待講演

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

知花 博治 (Chibana, Hiroji)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号 : 30333488

(2) 研究分担者

宇野 潤 (Uno, Jun)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任研究員

研究者番号 : 40114243