

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590520

研究課題名(和文) 白癬の病態形成に対する起因菌分泌型セリンプロテアーゼ多重遺伝子族の機能解析

研究課題名(英文) A functional analysis of a secreted serine protease family for dermatophyte host invading mechanisms.

研究代表者

山田 剛 (YAMADA, Tsuyoshi)

帝京大学・医真菌研究センター・准教授

研究者番号：80424331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、白癬菌が産生する分泌型エンドプロテアーゼの中心分子と考えられているズブチリシン型セリンプロテアーゼファミリー(Subs)について、本菌の表皮角層侵入過程におけるその役割の解明を目指した。本研究を通じて、部位特異的組換え酵素を介した選択マーカーリサイクルシステムを構築し、ケラチンによって顕著に発現が活性化することが報告されているSub遺伝子群の多重破壊株を複数種作成した。これらの破壊株について、分泌型エンドプロテアーゼ活性等の表現型解析を進め、Subファミリーよりもむしろ分泌型メタロプロテアーゼ(MEP)ファミリーが角層ケラチンの分解に貢献していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Dermatophytes are the major causative agents of superficial mycoses. They likely have unique compensatory protease secretion machinery that collectively produces synergistic effects, causing infection. However, because of the limitation in dominant selectable markers for their molecular genetic studies, functions and roles of each protease in their infection processes are still elusive. The final goal of this study was to elucidate functions and roles of large protease gene families, such as subtilisins (SUBs) in host invasion by dermatophytes. To attain this, we examined applicability of the yeast FLP recombinase-recombination target (FRT) site-specific recombination system in *Arthroderma vanbreuseghemii*. Successful development of the codon-optimized flp/FRT-mediated one-step selectable marker recycling system allowed the sequential multiple disruptions of SUB genes, advancing our understanding of functions and networks of individual genes in these fungi.

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：皮膚糸状菌 感染症 セリンプロテアーゼ 多重遺伝子族 病原因子 マーカーリサイクリング 部位特異的組換え酵素

1. 研究開始当初の背景

白癬(いわゆる水虫)は国民病と言われるほど罹患率の高い真菌感染症である。我が国における白癬の推定患者数は2000万人以上と考えられ、生活習慣の変化と相まって高齢者から低年齢層へと拡大し続けている。本疾患に対する有効な手立てを講じる上で、起因菌(白癬菌)の感染メカニズムを解明することは不可欠である。

白癬菌は表皮角層(皮膚、毛髪、爪など)に感染することから、ケラチン分解能を有する分泌型プロテアーゼ(いわゆるケラチナーゼ)が長らく本菌の最も重要な病原因子と考えられてきた。本酵素にはアミノ酸配列などの特徴に基づく幾つかのグループが存在し、各グループには多数のアイソザイムが存在する。これらアイソザイムをコードする遺伝子群は多重遺伝子族(ファミリー)を形成していることから、各々の酵素の役割および酵素間の相互作用を解析する場合、遺伝子工学は重要な役割を果たす。しかしながら、本菌の研究領域に遺伝子工学が積極的に取り入れられることはなく、病原因子としての分泌型プロテアーゼの重要性は未だ不透明な状態である。

2. 研究の目的

我が国では国民病と言われるほど罹患率の高い白癬に対し、有効かつ持続的な制御を講じる上で、未だ不明な点の多い起因菌(白癬菌)感染メカニズムに対する理解は必要不可欠である。

ケラチンでできた硬いバリアによって覆われている皮膚、毛髪、爪等へ独占的に侵入し感染をおこす白癬菌にとって、分泌型プロテアーゼ(いわゆるケラチナーゼ)は古くから感染メカニズムの中心分子と考えられてきた。21世紀に入ると、*Trichophyton* 属等、臨床上問題となっている白癬菌種のゲノム解析が実施され、作用様式の異なる多様な分泌型プロテアーゼがゲノム上に多重遺伝子族(遺伝子ファミリー)を形成していることが明らかになってきた。これらのプロテアーゼファミリーが白癬菌を特徴付けている高度なケラチン分解能力に寄与しているものと考えられる。

本研究の目的は、申請者が確立してきた遺伝子工学の知識・技術を基に、“分泌タンパク質のかなりの割合を占めるとされるズブチリシン(subtilisin)型セリンプロテアーゼファミリーの本菌表皮侵入過程における役割、病原因子としての意義”を明らかにし、本菌病原因子に関する長年の疑問に対する答えを得ることである。

3. 研究の方法

申請者らは、主要な白癬菌の1つである *T. mentagrophytes*(teleomorph: *Arthroderma vanbreuseghemii*)を材料に、白癬菌の遺伝子操作技術(遺伝子導入、遺伝子破壊等)をすでに確立してきた。その過程において、親株(宿主株)として最適な相同組換えを高頻度で起こす

変異株($\Delta Ku80$ ならびに $\Delta Lig4$ 変異株)を作出することができた。これらの株を宿主に使用し、以下の流れにしたがって研究を進めていった。

- (1) 白癬菌 *T. mentagrophytes* において機能するコンディショナルプロモーターの探索ならびに本プロモーターを用いた遺伝子発現の制御システムの構築を行う。具体的には、これまで予備試験的に検討を重ねてきた銅イオン(Cu^{2+})抑制型コンディショナルプロモーターである Copper transporter 4 プロモーター(*P_{CTR4}*)について、レポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイを基に、コンディショナルプロモーターとしての有用性を確認する。
- (2) *Saccharomyces cerevisiae* の部位特異的組換え酵素(FLP)を利用して、多重遺伝子族の機能解析の場で活躍する遺伝子多重破壊システム(形質転換用選択マーカーのリサイクルシステム)の構築を行う。
- (3) 構築したマーカーリサイクルシステムを基に、ケラチンによって発現が顕著に活性化されるズブチリシン(*SUB*)遺伝子(*SUB3*, *SUB4*, *SUB6* など)を中心に、*SUB* 遺伝子を多重に破壊した株で構成されるライブラリーを構築する。
- (4) 構築した種々の *SUB* 遺伝子多重破壊株ライブラリーについて、*in vitro* ならびに *in vivo* の表現型解析を行い、白癬病態形成過程における *SUB* 遺伝子ファミリーの役割を明らかにしていく。

4. 研究成果

- (1) 白癬菌で機能するコンディショナルプロモーターの検討

SUB 遺伝子のような多重遺伝子族の場合、グループ内の遺伝子(産物)が協調的に相互作用しながら全体として幾つかの機能を果たしていることが多い。したがって、多重遺伝子族全体または個々の遺伝子(産物)の機能を解析する場合、複数の遺伝子に変異を有する変異株(多重破壊株)が必要となる。このような株は相同組換えを介した遺伝子破壊(targeted-gene disruption)を繰り返すことによって作り出すことができるが、その場合、形質転換体のスクリーニングに使用する選択マーカー(白癬菌の場合は薬剤耐性遺伝子)のリサイクルが必須となる。選択マーカーのリサイクルに部位特異的組換え酵素(site-specific recombinase)がしばしば利用されるが、その場合、リコンビナーゼの発現を厳密に制御することができるコンディショナルプロモーターが必要となる。

そこで申請者らは、パン酵母由来の部位特異的組換え酵素(FLP)を利用して選択マーカーのリサイクルを行うことに決め、*flp* 遺伝子の発現を制御するためのコンディショナルプロモーターの検討を行った。研究開始当初、人工的に構築し

たステロイドホルモン(デキサメタゾン)応答性プロモーター(GVG)の他、銅イオンによって発現が活性化または抑制される2種類の銅イオン応答性遺伝子、*CRP1* および *CTR4* のプロモーターについて検討を進めた。GVG ならびに *T. rubrum* から単離した *CRP1* および *CTR4* 遺伝子のプロモーター(コーディング領域の上流1.0kb程度)を *eGFP* および β -ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)の上流に接続したレポーターカセットを構築して *T. mentagrophytes* に導入し、本菌におけるステロイドホルモンまたは銅イオン応答性を解析した。その結果、*CTR4* 遺伝子(銅イオントランスポーター遺伝子)のプロモーター(*P_{CTR4}*)のみ高い応答性を示し、レポーター遺伝子の転写活性が顕著に抑制された。そこで、*T. mentagrophytes* の内在性トリプトファン合成酵素遺伝子(*TRP5*)をターゲットに *P_{CTR4}* の活性を解析した。相同組換えを利用して、本菌の染色体上にある *TRP5* 遺伝子の上流に *P_{CTR4}* を挿入したクローンを作成し、銅イオン存在下(遺伝子発現抑制状態)に置いたところ、本クローンがトリプトファン要求性を示したことから、*P_{CTR4}* が銅イオン応答性(抑制型)コンディショナルプロモーターとして *T. mentagrophytes* における遺伝子発現の厳密な制御を可能にすることが判明した。

上記研究成果について、投稿論文ならびに学会発表で成果報告を行った。

(2) *P_{CTR4}/flp* カセットを利用した選択マーカーリサイクルシステムの構築

上述のように、*P_{CTR4}* が銅イオン存在下で遺伝子発現を顕著に抑制できることが判明した。そこで、*P_{CTR4}* を *flp* の発現を制御するプロモーターに利用して、*T. mentagrophytes* における選択マーカーリサイクルシステムの構築を進めた。研究開始当初、*Penicillium chrysogenum* において、コドン使用頻度(codon usage)が *flp* 遺伝子の発現レベルに大きな影響を与えることが報告された(Kopke et al., *Appl Environ Microbiol* 76, 4664-74, 2010)。本報告を踏まえ、モデル動物好性白癬菌である *Arthroderma benhamiae* におけるコドン使用頻度情報を基に最適化されたコドンを有する *flp* (*avflp*)を人工合成した。*avflp* と共に、ほぼネイティブな *flp* (*caflp*)を各々有するモジュール(*avFLP/FRT* および *caFLP/FRT* モジュール)[*FRT-nptII* cassette-*P_{CTR4}/avflp* (or *caflp*) cassette-*FRT*]を含むプラスミドベクター(pMRV)を構築した。プロトプラスト・ポリエチレングリコール法を用いて、これらのコンストラクトを各々 *T. mentagrophytes* に導入し、銅イオンを添加した選択培地でクローンのスクリーニングを行った。PCR法を用いて、得られたクローンの中から目的の遺伝子座(*Ku80* 遺伝子座)に *avFLP/FRT* または *caFLP/FRT* モジュールが挿入されたものを選び、銅イオンの特異的キレーターである BCS (bathocuproine

disulfonate)を添加した培地に移植して *P_{CTR4}* の活性化を介した *avFLP* または *caFLP* の発現を誘導した。その後、分子生物学的方法を用いてクローンを解析した結果、*avFLP/FRT* モジュールを導入したクローンにおいてのみ、リコンビナーゼ活性を介したモジュールの除去が確認され、*nptII* マーカーのリサイクルが可能であることが判明した。

(3) *avFLP/FRT* システムを利用したズブチリン(*SUB*)遺伝子多重破壊株の作出

上述の結果を踏まえ、銅イオン応答性(抑制型)コンディショナルプロモーター(*P_{CTR4}*)と最適化されたコドンをもつ部位特異的組換え酵素(*avflp*)を基に構築したマーカーリサイクル用プラスミドベクター(pMRV)を用いて *SUB* (*AvSUB*) 遺伝子の多重破壊株の作出を試みた。本研究に使用している *T. mentagrophytes* と近縁な *A. benhamiae* 等において、ケラチンによる顕著な発現の誘導が報告されている *SUB3*, *SUB4*, *SUB6*, *SUB7* 等のホモログを標的に、*avFLP/FRT* モジュールを含むコンストラクトを構築し、相同組換えを介した *avFLP/FRT* モジュールによる遺伝子破壊とモジュールの除去を繰り返し行った。その結果、*SUB3*, *SUB6*, *SUB7* や *SUB3*, *SUB4*, *SUB6* を欠損した *SUB* 三重破壊株の作出に成功した。これらのクローンに宿主に使用した親株(コントロール株)との間に明らかな形態学的相違は見られなかった。また、スキムミルクを唯一の栄養源(窒素源または炭素源)とする液体培地を用いてこれらのクローンを培養し、培養液中の総エンドプロテアーゼ活性を比較解析したところ、総エンドプロテアーゼ活性に関する明確な差は認められなかった。したがって、*A. benhamiae* 等において、ケラチンによる顕著な発現の誘導が報告されている *SUB3*, *SUB4*, *SUB6*, *SUB7* 等は、本研究に使用した *T. mentagrophytes* (*A. vanbreuseghemii*) におけるメジャーなエンドプロテアーゼではなく白癬の病態形成過程における重要な病原因子ではないことが示唆された。

上記研究成果について、投稿論文を作成し、"Microbiology"に投稿中である。

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2件)

Maria Grumbt, Michel Monod, 山田 剛, Christian Hertweck, Jiri Kunert, Peter Staib Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine

dioxygenase and a sulfite efflux pump.
Journal of Investigative Dermatology,
査読有、2013、133: 1550-1555.

DOI: 10.1038/jid.2013.41.

岩田 淳 Mahdi Mohamed Alshahni 西山 彌生 榎村 浩一 安部 茂 山田 剛

Development of a tightly regulatable
copper-mediated gene switch system in
dermatophytes. Applied and
Environmental Microbiology、査読有、
2012、78: 5204-5211.

DOI: 10.1128/AEM.00464-12.

[学会発表] (計2件)

岩田 淳 榎村 浩一 安部 茂 山田 剛

白癬菌における銅イオン応答性プロモーターを用いた遺伝子発現調節系の構築.

第55回日本医真菌学会学術集会、2012年
11月、東京

岩田 淳 Mahdi Mohamed Alshahni 西山 彌生 榎村 浩一 安部 茂 山田 剛

Development of a conditional gene
knockdown system based on
copper-responsive promoter P_{CTR4} .

The 18th Congress of the International
Society for Human and Animal
Mycology, 2012, June, Berlin.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 剛 (YAMADA, Tsuyoshi)

帝京大学・医真菌研究センター・准教授

研究者番号:80424331

(2)研究分担者

(3)連携研究者

安部 茂 (ABE, Shigeru)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号:10125974

榎村 浩一 (MAKIMURA, Koichi)

帝京大学・医療共通教育センター・教授

研究者番号:00266347

西山 彌生 (NISHIYAMA, Yayoi)

帝京大学・医真菌研究センター・客員教授

研究者番号: 10082231