

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791976

研究課題名(和文)病原真菌カンジダのHsp70タンパク質Sse1pによる抗真菌薬耐性の制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of antifungal tolerance by *Candida albicans* Sse1p belonging to heat shock protein 70

研究代表者

永尾 潤一 (Nagao, Jun-ichi)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30509047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：*Candida albicans*はヒト口腔に常在する病原真菌であり、高齢者などの易感染宿主において日和見感染を起こす。近年、既存の抗真菌薬であるフルコナゾールに対し耐性を獲得した耐性菌が報告され問題となっている。我々はheat shock protein70に属するタンパク質Sse1pがフルコナゾール抵抗性に関与することを見出し、Sse1pは、フルコナゾール抵抗性を制御するシグナル伝達系であるカルシニューリン経路を正に制御することで抵抗性に関与することが明らかとなった。また見出したSse1pの機能は*C. glabrata*においても確認され、新規抗真菌薬の標的となる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：*Candida albicans* is the most important fungal pathogen of humans. Azoles are the most developed and widely used antifungal drugs in clinical treatments. The emergence of azole resistant strains in clinical isolates from individuals remains a serious problem in clinic. We investigated the cellular function of Sse1p, belonging to the heat shock protein 70 family, in *Candida albicans*. Drug susceptibility tests indicated that repression of Sse1p expression resulted in hypersensitivity to fluconazole and conferred fungicidal activity to fluconazole. We further found that Sse1p conferred fluconazole tolerance by partially influencing the calcineurin signaling pathway. Involvement of Sse1p in fluconazole tolerance was also observed in an azole insensitive pathogenic fungus *C. glabrata*. Our results indicate that compromising Sse1p functions offers an alternative strategy for increasing the effectiveness of fluconazole in the treatment of *C. albicans* and *C. glabrata* infections.

研究分野：微生物学

キーワード：病原真菌 薬剤耐性 感染 分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

Candida albicans は、口腔、皮膚、腸管、膣に常在する病原真菌で、宿主が健常な場合は問題ないが、高齢者や免疫不全患者などの易感染宿主では重篤な日和見感染を起こす。本菌は臨床で最も発症頻度が高い病原真菌であるが、ヒトへの副作用が少ない安全で有効な抗真菌薬は非常に少ない。

臨床で高頻度で使用される *C. albicans* に対する抗真菌薬として、アゾール系抗真菌薬であるフルコナゾールが挙げられる。フルコナゾールは細胞膜成分エルゴステロールの合成阻害剤であり、エルゴステロールの欠如、毒性合成中間体の蓄積、それに伴う細胞膜ストレスにより静菌的作用を示す。近年、臨床においてフルコナゾール耐性菌の出現が深刻な問題となっている。国内外の研究者によりフルコナゾール耐性化の分子機構が少しずつ解明されてきており、その機構は、薬剤排出ポンプの発現誘導、カルシニューリン経路などのストレス応答経路の活性化、標的分子の過剰発現など多岐に渡ることが明らかとなっている。

我々のグループは、*C. albicans* の菌糸形への形態変換時に発現する遺伝子として新規 heat shock protein 70 (Hsp70) タンパク質をコードする *SSE1* 遺伝子 (別名 *MSI3*) を単離している (Cho *et al.*, *Yeast*, 2003)。申請者は、*C. albicans* において発現調節が可能な *SSE1* 発現制御株を構築し (図 1 a)、*SSE1* 発現抑制によりフルコナゾール超感受性になるという予備実験データを得ている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、新規 Hsp70 タンパク質 Sse1p が *C. albicans* のフルコナゾール抵抗性を制御することを見出している。本研究では以下の項目について解析することを目的とする。

- (1) Sse1p がどのようにフルコナゾール抵抗性を制御するのか分子レベルで解明する。
- (2) Sse1p のフルコナゾール抵抗性を *in vivo* で評価するための感染モデルを構築する。
- (3) 他の病原性 *Candida* 属における *SSE1* ホモログ遺伝子の機能を解析する。

3. 研究の方法

SSE1 遺伝子は生育に必須である可能性が考えられたため、解析には *SSE1* 遺伝子をテトラサイクリン応答型プロモーター下で制御した発現制御株 (tetSSE1 株) を構築した。対照として、野生型のプロモーター下で *SSE1* が制御されている株 (contSSE1 株) も構築した。tetSSE1 株はドキシサイクリン (DOX: テトラサイクリンアナログ) の添加により *SSE1* の発現量を抑制することができる (図 1 b)。構築した tetSSE1 株を用いて、以下の実験を行った。

- (1) 薬剤感受性における *C. albicans SSE1* の役割

SSE1 の発現量抑制条件において、抗真菌薬に対する薬剤感受性試験を行った。細胞膜合成阻害を示すフルコナゾールとイトラコナゾールを含むアゾール系の他に、細胞膜傷害を示すポリエン系であるアムホテリシン B、細胞壁合成阻害を示すキャンディン系であるミカファンギンを使用した。遺伝子発現変化はリアルタイム PCR により解析した。

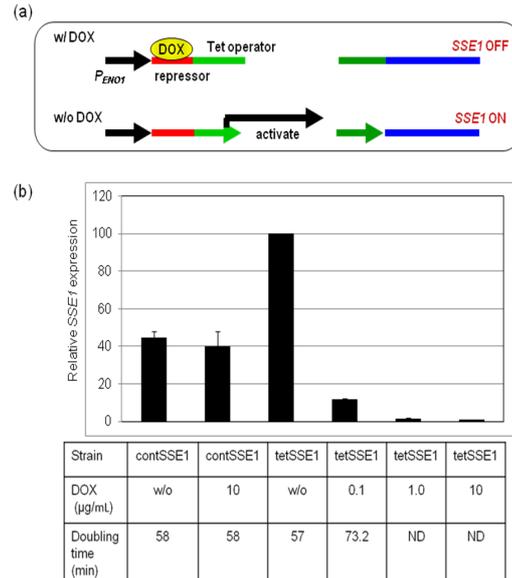


図 1. (a) *SSE1* 発現制御株の構築, (b) DOX による *SSE1* 発現制御

(2) カイコ幼虫を用いた感染実験モデルの構築

菌糸形誘導培地 (N-アセチルグルコサミン培地) に酵母形細胞を接種し、培養時間により、0 分 (酵母形: Y0 cells)、60 分 (酵母形: Y60 cells)、90 分 (菌糸形: H120 cells) の各細胞を調製した。5 齢のカイコ幼虫に上記の調製した各種細胞を 10^5 細胞になるようにカイコ血液中に注射した。注射後、カイコの死亡率を経時的に観察した。また、注射後 24 時間のカイコ内の菌数をコロニー形成単位により測定した。また、*In vitro* において採取した 10% カイコ体液を含む水溶液に各細胞を接種し、形態変換能を評価した。

(3) *C. glabrata SSE1* の機能解析

C. glabrata ゲノムデータベース情報により *SSE1* ホモログ遺伝子を単離し、図 1 と同様に *C. glabrata* における *SSE1* 発現制御株を構築した。方法 (1) と同様に *SSE1* 発現抑制時における各種抗真菌薬に対する感受性を評価した。

4. 研究成果

(1) 薬剤感受性における *C. albicans SSE1* の役割

構築した tetSSE1 株を用いて薬剤感受性試験を行った結果、*SSE1* 遺伝子発現を抑制した条件下において、フルコナゾールと同様にイトラコナゾールに対して超感受性を示した。

一方、ミカファンギンやアムホテリシン B に対する抵抗性には影響は見られなかった (図 2)

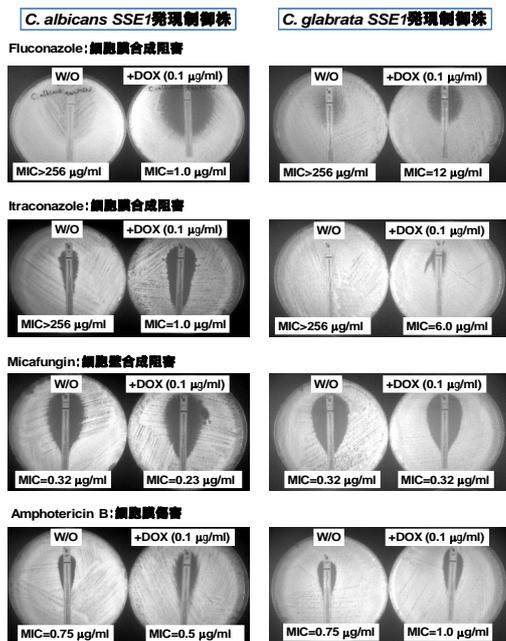


図 2 . *SSE1* 発現制御株を用いた抗真菌薬感受性試験

つまり、*SSE1* はアゾール系抗真菌薬特異的に抵抗性に関与することが示された。また、*SSE1* 発現抑制条件下でフルコナゾールを作用させると、静菌的作用のフルコナゾールの作用が殺菌的になることが明らかになった。フルコナゾールは *C. albicans* のエルゴステロール合成系をターゲットとするが、菌体内では同時にフルコナゾールによるストレスに対してカルシニューリン経路を活性化し抵抗すると考えられている。カルシニューリン経路と *SSE1* との関係を、カルシニューリン下流遺伝子 (*UTR2*, *PLC3*) の発現量を指標に解析した。野生株ではフルコナゾールにより *SSE1* および *UTR2*, *PLC3* の発現量は増加した。一方 *SSE1* の発現を抑制された tet*SSE1* 株では *UTR2*, *PLC3* の発現も抑制された。この現象は *SSE1* 発現抑制条件下におけるフルコナゾール超感受性の一因と考えられ、*SSE1* はフルコナゾールによるカルシニューリン経路の活性化に関与することが示唆された (図 3)。 *Saccharomyces cerevisiae* のホモログタンパク質 Sse1p は Hsp90 のコシャペロンとして機能するという報告がある。この知見から、*C. albicans* において Sse1p は Hsp90 と協調してカルシニューリン経路を活性化する可能性が考えられる。今後、Hsp90 との関連を含めて詳細な解析が必要となる。

(2) カイコ幼虫を用いた感染実験モデルの構築

C. albicans は口腔カンジダ症の原因菌である。これまでに見出した Sse1p の薬剤抵抗性における機能を *in vivo* でも評価することを目的

とし、*C. albicans* 感染モデルの構築を試みた。これまでに *C. albicans* の粘膜感染モデルの簡便かつ迅速な評価系として、カイコ幼虫を用いた感染モデルが既に報告されている。我々は、カイコ感染モデルを申請研究に適用することにした。第 1 段階として、カイコ感染モデルを構築し、モデルの妥当性を評価することにした。*C. albicans* は環境因子により酵母形から菌糸形へ形態変換する二形成病原真菌である。この二形成は病原性に関与すると考えられているが、明確な答えはない。そこで、カイコ感染モデルを用いて *C. albicans* の二形態および形態変換能が病原性に及ぼす影響を評価した。

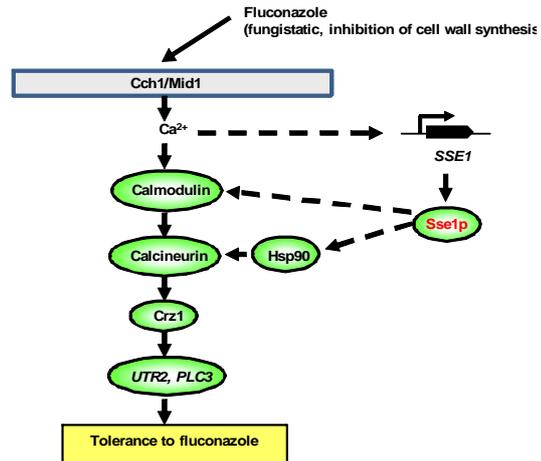


図 3 . Sse1p によるカルシニューリン経路の制御機構の推定モデル

菌糸形誘導培地に酵母形細胞を接種し、培養時間により、0 分 (酵母形 : Y0 cells)、60 分 (酵母形 : Y60 cells)、90 分 (菌糸形 : H120 cells) を調製した。各細胞をカイコに感染させた結果、Y0 cells と H120 cells で致死率に大きな違いはなかったが、形態変換の準備が出来た Y60 cells は致死時間を顕著に早めた (図 4 a)。また Y60 cells は他の細胞と比べ、感染 24h 後においてカイコ内で増殖していた (図 4 b)。 *In vitro* カイコ体液中での形態は、0 分細胞は酵母形のままだが、60 分細胞は 2h 後に菌糸形に変化した。以上から、*C. albicans* の形態変換能がカイコ感染において病原性に関与することが示唆された。

現在、構築したカイコ感染モデルを用いて *SSE1* 発現制御株の病原性や抗真菌薬感受性の評価を進めている。

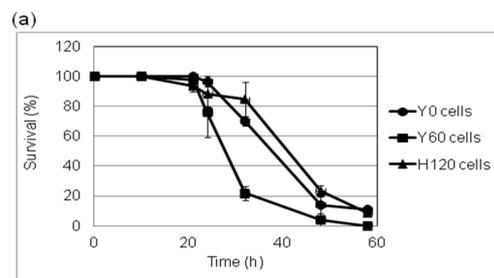


図 4 . (a) 各形態細胞の感染後のカイコの生存率

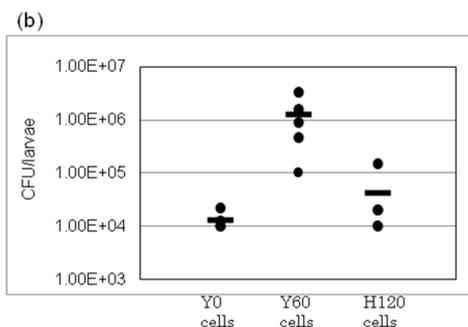


図4. (b) 感染24h後のカイコ体内における各形態細胞の菌数

(3) *C. glabrata* Sse1p の機能解析

近年、臨床において、*C. glabrata* による真菌症が増加傾向にある。*C. glabrata* の重要な特徴として、アゾール系抗真菌薬に対する感受性が低いことが挙げられる。今回、我々は *C. glabrata* Sse1p (*C. albicans* Sse1p との相同性 63%) に着目し、抗真菌薬抵抗性への関与を解析した。*C. glabrata* において Sse1p 発現を抑制すると、フルコナゾールやイトラコナゾールに対して高い感受性を示した。しかし、細胞膜傷害を示すアムホテリシンBや細胞壁合成阻害活性を示すミカファンギンに対する感受性には影響は見られなかった(図2)。Sse1p は *C. albicans* だけでなく、*C. glabrata* においてもアゾール系抗真菌薬に対する抵抗性を制御する新規な因子であることが明らかとなった。

以上のことから、Sse1p は新規抗真菌薬の標的となる可能性が期待される。Sse1p の機能を抑制する薬剤を開発することができれば、既存の抗真菌薬であるフルコナゾールの効果を増強することができ、カンジダ感染症に対する新しい治療法を提供すると期待される。

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 4件)(すべて査読有)

T. Cho, J. Nagao, R. Imayoshi, Y. Tanaka. Importance of Diversity in the Oral Microbiota including Candida Species Revealed by High-Throughput Technologies. Int. J. Dent. (2014), vol. 2014, Article ID 454391, 5 pages. DOI: 10.1155/2014/454391.

H. Matsumoto, J. Nagao, T. Cho, J. Kodama. Evaluation of pathogenicity of *C. albicans* in germinating ready states using a silkworm infection model. Med. Mycol. J. 54 (2013) 131-140. DOI:http://doi.org/10.3314/mmj.54.131.

T. Cho, J. Nagao, R. Imayoshi, J. Kodama, T. Morotomi, H. Kaminishi. In vitro

efficacy of continuous mild heat stress on the antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms. Biol. Pharm. Bull. 35 (2012) 1371-1373.

http://doi.org/10.1248/bpb.b12-00228.

J. Nagao, T. Cho, J. Uno, K. Ueno, R. Imayoshi, H. Nakayama, H. Chibana, H. Kaminishi. *Candida albicans* Msi3p, Sse1p of Hsp70 family, is involved in cell growth and fluconazole tolerance. FEMS Yeast Research. 12 (2012) 728-737. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00822.x.

[学会発表](計 5件)

永尾潤一, 長環, 今吉理恵子, 橋本麻利江, 田崎園子, 田中芳彦. 「病原真菌 *Candida glabrata* の Hsp70 タンパク質 Sse1 の機能解析」. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2014年9月25-27日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

永尾潤一, 長環, 今吉理恵子. 「*Candida albicans* Msi3p, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Sse1p of the Hsp70 family, is involved in cell growth and fluconazole tolerance」. 第55回歯科基礎医学会総会. 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市). 2013年9月20-22日.

松本晴仁, 永尾潤一, 今吉理恵子, 長環. 「カイコ感染モデルによる病原真菌 *Candida albicans* の形態と病原性の関連性の評価」. 第55回歯科基礎医学会総会. 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市). 2013年9月20-22日.

松本晴仁, 永尾潤一, 長環, 今吉理恵子, 児玉淳, 上西秀則. 「カイコ感染モデルによる病原真菌 *Candida albicans* の形態と病原性の評価」. 第39回福岡歯科大学学会総会. 福岡歯科大学(福岡県・福岡市). 2012年11月18日.

永尾潤一, 長環, 今吉理恵子, 上西秀則. 「*Candida albicans* の新規 HSP70 タンパク質 Msi3p はフルコナゾールによるカルシニューリン経路活性化に関わる」. 第56回日本医真菌学会総会, 京王プラザホテル多摩(東京都・多摩市). 2012年11月10-11日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

永尾 潤一 (NAGAO JUN-ICHI)

研究者番号: 30509047