

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15144

研究課題名（和文）病原性真菌の感染時に要求される真菌および宿主の銅ホメオスタシスの解析

研究課題名（英文）Investigation of copper homeostasis of pathogenic fungi and host cells required in infection

研究代表者

楠屋 陽子（Kusuya, Yoko）

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号：50711149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：高濃度の銅環境に対する病原性真菌の応答の解明は、宿主内に存在する高濃度の銅による殺菌システムに適応し、宿主内で感染拡大する機構を知る重要な手がかりとなる。本研究では、病原性真菌アスペルギルスフミガタスを高濃度の銅を添加した培地で継代培養し、銅耐性化させることで銅環境に適応する機構で起こる現象およびゲノムに生じる変化に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主には侵入してきた病原性真菌を高濃度の銅によって殺菌する免疫システムが備わっているが、その作用機序には未だ不明な点が存在する。更に近年、病原性真菌アスペルギルスフミガタスではアゾール系薬剤を使用した治療過程により患者から出現するアゾール系薬剤耐性菌だけでなく、農薬の分布等による環境中に広く分布するアスペルギルスフミガタスのアゾール系薬剤耐性化株が問題となっている。これらのことから、高濃度の銅環境で継代培養されたアスペルギルスフミガタスの解析により得られた知見は宿主の免疫システムの作用機序やアゾール系薬剤以外の新規の薬剤標的因子の発見と治療法の開発に役立つ可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Pathogens have need to overcome high concentrations of copper in the innate defense system of the host when they invade and spread the infection to host cells. Therefore, it is provided the critical clues to investigate the response of pathogenic fungi to the excess copper environment. In this study, I prepared copper-resistant strains in passage culture, including high concentration copper. Then I got new insights into the phenomenon and dynamic genome change concerning adaptation to the excess copper environment.

研究分野：分子生物学

キーワード：病原性真菌 銅 銅ホメオスタシス 環境応答 感染機構 アスペルギルスフミガタス

## 1. 研究開始当初の背景

銅は生命維持に欠かせない必須金属であるが、細胞内での濃度は高くても低くても生育・感染が阻害される。病原性真菌は口から吸引されて肺に到達するが、宿主内では付着部位(肺)において銅の濃度が上昇することで侵入してきた菌を殺菌する防御機構(自然免疫応答)が存在するため、高濃度の銅にさらされる。そのため、侵入した真菌は高濃度の銅環境下で自身の細胞内の銅濃度を至適濃度に維持することで宿主内での生存および病原性を保持し感染拡大する必要がある。

環境中に広く分布する病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* は、罹患率が年々増加傾向にある真菌症を引き起こす主要原因菌であり、他の病原性真菌同様に宿主への感染時に細胞内の銅ホメオスタシスを維持しなければならない。感染では、*A. fumigatus* の孢子が口から吸引されて肺に付着する事から生じ、孢子に存在するメラニン色素は孢子がマクロファージによる食事に抵抗する手段の一つであるため、メラニン色素が十分に蓄積されている成熟した孢子の形成が感染には重要である。*A. fumigatus* において孢子のメラニン色素の合成および成熟した孢子の形成には銅が必須であるため、細胞内の銅濃度は *A. fumigatus* の病原性を左右する病原性因子の一つである。しかしながら、*A. fumigatus* はマウスへの感染実験において、好中球減少および非好中球減少の両マウスモデルでアスペルギルス症を発症するが、*A. fumigatus* の二次代謝産物グリオトキシンは非好中球減少モデルでのみ、アスペルギルス症の発症に関与する病原性因子であることが同定されており、*A. fumigatus* の病原性因子と感染のメカニズムは非常に複雑で未知な部分が多い。近年、*A. fumigatus* の銅ホメオスタシスに関する研究が活発に行われ、多くの知見が発表され、*A. fumigatus* の感染時に生じる宿主の自然免疫応答には宿主の銅ホメオスタシスが、宿主側の防御機構に対する抵抗手段には *A. fumigatus* の銅ホメオスタシスが、それぞれ重要な役割を果たしていることが示唆されているが、*A. fumigatus* が自然免疫応答を乗り越えて感染に至るメカニズムは、未だ分かっておらず、*A. fumigatus* と宿主双方の銅ホメオスタシス機構のさらなる解析が求められる。

## 2. 研究の目的

*A. fumigatus* は宿主内に存在する高濃度の銅に晒されるストレスに高度に適応し、優位に増殖して病原性を発現している。高濃度の銅環境に対する応答を解明することは、宿主内で感染拡大する機構を知る重要な手がかりとなる。本研究では、*A. fumigatus* を高濃度の銅を添加した培地で継代培養し、銅耐性化させることで銅環境に適応する機構で生じる様々な変化から有用な知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### i) *A. fumigatus* 臨床分離株の銅感受性試験と感受性株の選出

真菌医学研究センター バイオリソース管理室が保有する *A. fumigatus* 臨床分離株、約 100 株を最小培地と最小培地に高濃度の銅を添加した培地にそれぞれ植菌し、生育を測定する銅感受性試験を行い、臨床分離株の銅に対する感受性の傾向を観察する。銅感受性試験の結果から、銅に対する感受性の高い株を選出する。

### ii) 銅感受性株→銅耐性化株の作成

銅感受性試験の結果から選出した銅感受性の高い株を最小培地に硫酸銅を 100  $\mu\text{M}$  添加した高濃度の銅添加培地で継代培養を実行する。高濃度の銅を添加した培地を用いた継代培養は 10 世代まで行い、銅耐性を示す銅耐性化株となっているかを確認する。

### iii) 銅耐性化株の解析

1. 銅耐性化株をいくつかの種類培地に植菌し、生育状況を観察する。

2. 銅耐性化株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサー (Illumina) でシーケンスを行い、ゲノム上の変化を調べる。

3. 蚕への感染実験を行い、その病原性の変化を調べる。

## 4. 研究成果

i) 約 100 株の臨床分離株の銅感受性を確認すると、銅に対する感受性も低い株から高い株まで様々に存在した。そこで、銅に対する感受性試験の結果から、最小培地 (MM) と MM に硫酸銅を 100  $\mu\text{M}$  添加した培地 (MM+100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ) 上のコロニーの直径 (cm) から算出された比 (ratio) が小さく、MM 培地で 3 cm 以上の生育がある感受性の高い 9 株を選択した (表 1: 白字)。

IFM	MM (cm)	MM + 100 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub> (cm)	ratio
59361-1	2.1	0.00	0.00
60237	1.8	0.00	0.00
64794	2.9	0.63	0.22
61407-1	3.5	0.93	0.27
59984-1	1.9	0.53	0.28
64259-1	5.5	2.03	0.37
59357-2	6.6	2.67	0.40
63501	3.9	1.60	0.41
63648	5.9	2.50	0.42
61578-1	4.0	1.70	0.43
59363-1	4.9	2.17	0.44
64258	5.4	2.67	0.49
63352	6.1	3.00	0.49

表1. 銅感受性試験

ii) 選出した9株をそれぞれ高濃度の銅環境下で、10世代、継代培養を実行することで、世代を重ねる毎に、100  $\mu$ M の CuSO<sub>4</sub> 添加培地において生育が増加する株を確認した。

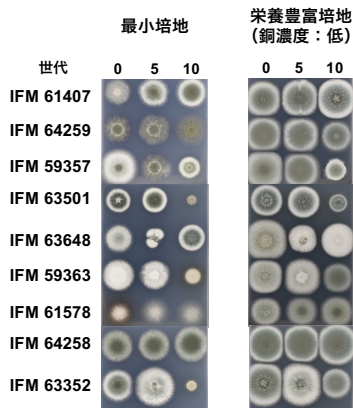


図2. 高濃度の銅添加培地での生育

IFM 61407, 63648, 59363, 64258 の4株において0世代から5または10世代で著しい生育の増加が観察された(図1)。また、わずかではあるが、IFM 63501 と 61578 においても高濃度の銅の添加培地において5または10世代の株で生育の増加が観察され(図1)、これらの株を含めた6株は銅耐性化した株と考えられる。

iii) 1. 最小培地と栄養豊富培地(銅濃度：低)での生育を観察したところ、IFM 61407 と 64258 以外の株では、最小培地および栄養豊富な培地では生育が減少傾向になることが観察された(図2)。また、メラニン色素の合成や孢子形成に大きな変化が生じた(図2)。



図1. 高濃度の銅添加培地での生育

2. 銅耐性化株の作成を試みた9株の0と10世代目、それぞれの株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサー HiSeq X Ten (Illumina) で全ゲノムシーケンスを行い、0世代から10世代においてゲノム上に生じた変化を解析した。

IFM	SNP	InDel
61407	9 (2)	112 (8)
64259	8 (1)	107 (23)
59357	2	120 (16)
63501	20 (3)	137 (21)
63648	2	112 (12)
61578	24 (2)	103 (12)
59363	9 (1)	148 (28)
64258	11	205 (30)

表2. 10世代目の銅耐性株のSNP, InDel

()内の数字は遺伝子のアミノ酸置換 (SNP)、または挿入・欠失 (InDel) により機能が変化した遺伝子の数

アミノ酸置換が生じる SNP の数は少ないが、InDel によって機能が変化している遺伝子は多く存在する (表2)。

3. 病原性を確認するために0世代 (0g) と10世代 (10g) の株の胞子懸濁液をそれぞれ蚕に感染させ、経過時間での死亡数を観察した。

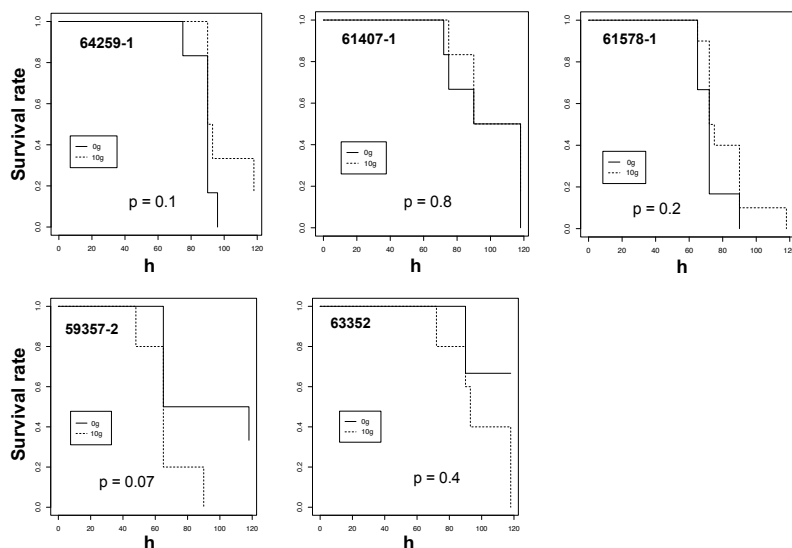


図3. 蚕への感染実験

蚕の引数が少なかったことも影響し、有意差のあるデータは得られなかったが、IFM 64259-1 と 61578-1 は10世代目の銅耐性株の病原性は弱い傾向にある。一方、IFM 59357-2 と 63352 に関しては10世代目の株の病原性が強い傾向にある。しかしながら、この2株は継代培養によって高濃度の銅添加培地での生育の増加が観察されなかった株であるため、銅耐性化と病原性の関係は反比例する可能性が考えられる。

今後、ゲノム上に生じた変化と得られた表現型と病原性の違いを詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 楠屋陽子, 辺彩, 萩原大祐, 矢口貴志, 高橋弘喜
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus銅耐性株の取得とその特性解析
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Kusuya, Cai Bian, Daisuke Hagiwara, Takashi Yaguchi, Hiroki Takahashi
2. 発表標題 Investigation of the molecular mechanisms of copper homeostasis in Aspergillus fumigatus
3. 学会等名 9th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楠屋陽子, 辺彩, 萩原大祐, 矢口貴志, 高橋弘喜
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusの銅代謝転写因子Afmac1及びaceAの機能解析
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------