

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890274  
 研究課題名（和文）カンジダの新規ストレス応答蛋白質によるクオラムセンシングを介した病原性発現制御  
 研究課題名（英文）Functional analysis of a novel member of heat shock 70 protein in quorum sensing system of pathogenic fungus *Candida albicans*  
 研究代表者  
 永尾 潤一（NAGAO JUN-ICHI）  
 福岡歯科大学・歯学部・助教  
 研究者番号：30509047

## 研究成果の概要（和文）：

病原真菌 *Candida albicans* は、様々な環境因子により酵母形から菌糸形へと形態変換を起こす。この形態変換は病原因子の一つと考えられている。本研究では新規ストレス応答タンパク質 Msi3p の恒常発現株を構築し、本菌の病原性発現性制御における機能を解析した。Msi3p の恒常発現により、その機能に関して以下のことが明らかになった。(1) 生育必須因子である (2) マウスへの病原性に関与する (3) 形態変換に関与する情報伝達経路を負に制御する (4) 細胞壁の統合性、酸化ストレス応答に関与する。本研究成果は新たな抗真菌薬開発につながるものと期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

*MSI3* (multicopy suppressor of *ira1* mutant, which causes hyperactivation of the Ras-cAMP-PKA pathway) was isolated as a gene involved in early yeast-hyphal transition of *Candida albicans* and is a novel member of the heat shock protein 70 family. Previously, we showed that *MSI3* expression is quickly and significantly downregulated in *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)-induced germination. We generated a mutant strain, tet*MSI3*, in which *MSI3* is controlled under the tetracycline-regulatable promoter and we compared various phenotypes with those of the parent strain CAF2. Negative regulation of *MSI3* expression with the tetracycline analog doxycycline resulted in a growth defect in tet*MSI3* cells. In the absence of doxycycline, *MSI3* expression was approximately 4-fold higher in tet*MSI3* cells than in CAF2 cells in a growth medium, which increased the susceptibility to cell wall inhibitors. *MSI3* expression was drastically reduced in response to GlcNAc in CAF2 cells. The results suggested that a drastic reduction in *MSI3* expression by GlcNAc activates the Ras1-cAMP-PKA pathway, thus stimulating germination and also inducing resistance to hydrogen peroxide. Reduced expression and overexpression of *MSI3* resulted in avirulence and attenuated virulence, respectively, in a murine model. Our findings suggest that *C. albicans* Msi3p has multiple functions in cell growth, cell wall integrity, negative regulation of hyphal morphogenesis via the Ras1-cAMP-PKA pathway, susceptibility to hydrogen peroxide, and virulence.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：細菌学，真菌学

科研費の分科・細目：菌学・形態系基礎菌科科学

キーワード：病原性真菌，形態変換，シグナル伝達，Heat shock protein

### 1. 研究開始当初の背景

病原真菌 *Candida albicans* は、通常酵母形で発育するが、血清、低濃度グルコース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) などの栄養成分に加え、温度、pH などの環境因子により菌糸形へと形態変換を起こす。この形態変換は、病原因子の一つと考えられており、Ras1 を介して、シグナル伝達経路である cAMP-PKA 経路により誘導される (図1)。近年、菌密度依存的に形態変換を制御するクオラムセンシング (QS) の作用分子 farnesol が単離された。Farnesol は、cAMP-PKA 経路の上流 Ras1-Cdc35 シグナル伝達を負に制御することで菌糸形成を抑制することが明らかになっている (図1)。

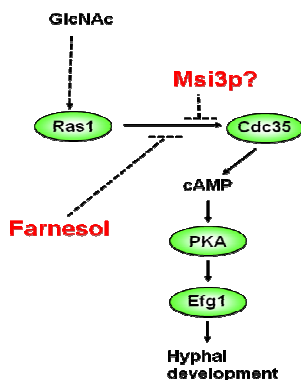


図 1. 菌糸形成シグナル伝達の推定モデル

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに形態変換初期に関与する遺伝子として heat shock protein (HSP)70 family に属する新規遺伝子 *MSI3* (multicopy suppressor of *iral* mutant 3) を見出している (Cho *et al.*, Yeast. 2003)。本研究では、*Candida albicans* の病原性発現制御における Msi3p の機能を解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

*MSI3* 遺伝子の上流にテトラサイクリン応答型プロモーターを挿入することで、*MSI3* 発現制御株 (tet*MSI3*) を構築した (図 2)。構築した tet*MSI3* 株とコントロールである標準株 CAF2 を用いて、細胞増殖、マウスへの病原性、菌糸形成能、およびストレス応答に関して解析を行った。

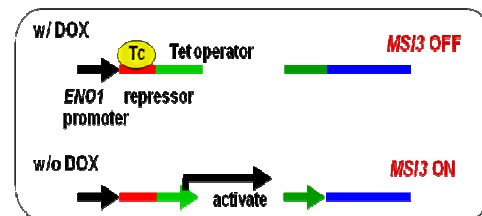


図 2. テトラサイクリン応答システム

### 4. 研究成果

(1)リアルタイム RT-PCR 解析により、標準株 CAF2 では菌糸形成を誘導する GlcNAc に応答し *MSI3* の発現が強く抑制されることが明らかになった。この結果から我々は、*MSI3* 発現量の減少が *C. albicans* の菌糸形への形態変換に重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てた。そこで、*MSI3* の恒常発現のためにテトラサイクリン応答型プロモーターを用いて *MSI3* 発現制御株 (tet*MSI3*) を構築した。リアルタイム PCR により増殖培地での *MSI3* 発現を確認した結果、*MSI3* の発現量は、DOX 添加により 1/90 に抑制され、DOX 非存在下では親株 CAF2 より約 4 倍大量発現していることが分かった (図 3)。

図 4 のように、tet*MSI3* は DOX 存在下で生育できなかったことから *MSI3* は生育必須遺伝子であることが明らかとなった。また、マウスへの感染実験において、tet*MSI3* は DOX 存在下ではコントロールと同様の生存率を示した (図 5)。このことは *in vitro* と同様に *in vivo* でも増殖しなかったためと考えられる。DOX 非存在下では、CAF2 と比べ致死にいたるまでの時間に遅延が見られた。*MSI3* の恒常発現により病原性になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。

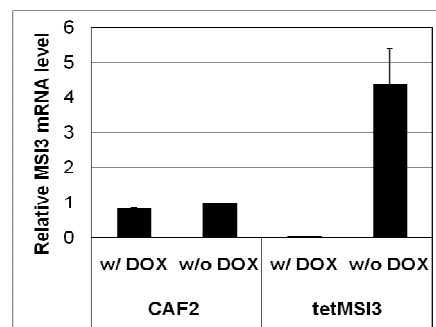


図 3. *MSI3* 発現解析

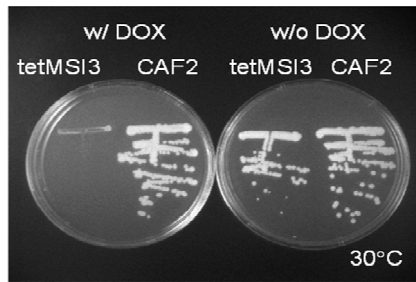


図 4. 細胞増殖への影響

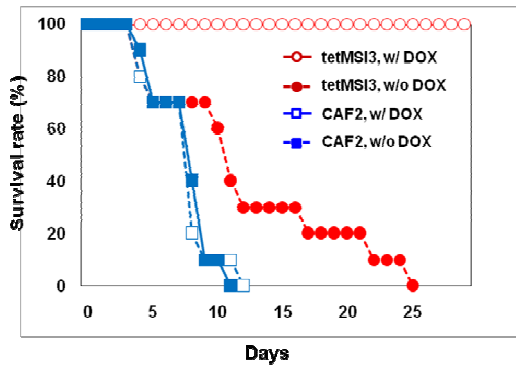


図 5. マウス感染実験

(2) DOX 非存在下 (*MSI3* 恒常発現) で、Ras1-cAMP-PKA 経路を活性化する GlcNAc 誘導による菌糸形成能を解析した。その結果、tetMSI3 は CAF2 と比べ菌糸形成開始に遅延がみられた。また、QS 分子 farnesol による菌糸形成抑制が顕著に促進された (図 6)。このことから、Msi3p は farnesol と同様に Ras1-cAMP-PKA 経路を負に制御することが示唆された。

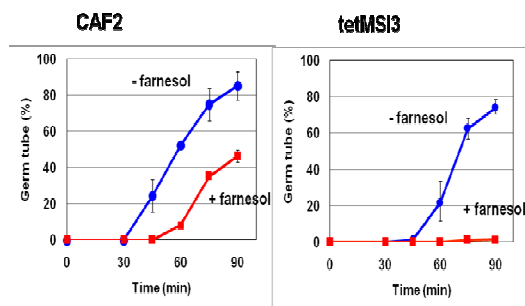


図 6. GlcNAc による菌糸形成誘導

(3) tetMSI3 は CAF2 と比べ細胞壁ストレス剤に感受性を示したことから、細胞壁の組成や構造の変化が示唆された (図 7)。また、酸化ストレスに対しても著しい感受性を示した。これらの感受性試験から Msi3p はストレス応答にも関与することが明らかになった。

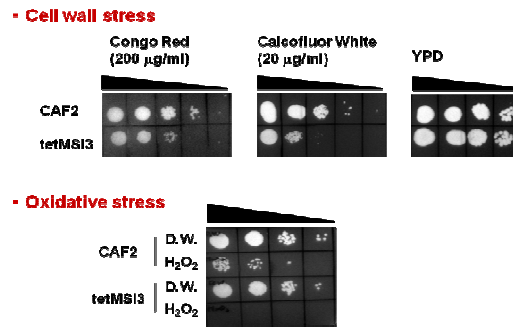


図 7. ストレス感受性試験

以上のことから、Msi3p は細胞増殖、細胞壁の統合性、酸化ストレスに関与することが明らかになった。また farnesol と共に cAMP-PKA 経路を負に制御することで形態変換を制御することが示唆された (図 1)。このような Msi3p の機能が、マウス感染実験による tetMSI3 株の病原性の低下を引き起こしたのではないかと考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 6 件)

① 永尾潤一, *Candida albicans* の新規 HSP70 family タンパク質 Msi3p による病原性発現制御機構, 第 6 回 真菌細胞研究会, 2010 年 3 月 19 日, 千葉 (千葉大学真菌医学研究センター) .

② 永尾潤一, *Candida albicans* の HSP70 family に属する新規タンパク質 Msi3 による病原性発現制御, 第 62 回 日本細菌学会九州支部総会, 2009 年 9 月 5 日, 佐賀 (佐賀大学医学部) .

③ 永尾潤一, Overexpression of the *Candida albicans MSI3* encoding a novel member of the HSP70 family effects on the germination regulated by farnesol, The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009 年 5 月 26 日, 東京 (京王プラザホテル) .

④ 長環, The target of regulation of morphogenesis in *Candida albicans* by farnesol. Symposium (Biofilm and quorum sensing). The 17<sup>th</sup> Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009 年 5 月 26 日, 東京 (京王プラザホテル) .

⑤ 長環, 病原性真菌におけるクオラムセンシ

ング機構センサーの探索, 第 2 回 真菌ワークショップ研究会, 千葉大学真菌医学研究センター, 2008 年 8 月 23 日, 千葉 (千葉大学真菌医学研究センター) .

⑥永尾潤一, *Candida albicans* のクオラムセンシングを介した病原性発現における新規ストレス応答遺伝子 *MSI3* の機能解析, 第 5 回真菌細胞研究会, 千葉大学真菌医学研究センター, 2008 年 8 月 21 日, 千葉 (千葉大学真菌医学研究センター) .

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

永尾 潤一 (NAGAO JUN-ICHI)

研究者番号 : 30509047

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

( )

研究者番号 :