

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15997

研究課題名（和文）「Wall-ome」の萌芽を目指した糸状菌細胞壁ダイナミクス測定系の開発と応用

研究課題名（英文）Development of an evaluation system to measure the dynamics of cell wall polysaccharides in filamentous fungi.

研究代表者

田中 大 (Tanaka, Yutaka)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00613449

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）：蛍光標識した細胞壁多糖結合タンパク質と、機械式蛍光顕微鏡、さらにソフトウェアを用いた画像解析を組み合わせることで、病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が菌糸を伸ばす過程や、抗真菌薬によって死んでいく最中における細胞壁多糖成分の量や局在の変化を、糸状菌の形態を破壊しないまま定量化することに成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Aspergillus fumigatus* が起こす真菌症の治療には、主にキャンディン系抗真菌薬が用いられます。しかし、本菌には時にこの薬が著効しないケースがあります。この原因は、細胞壁多糖構造を再構成する仕組みや、構造の不均質性にあるのではないかと考えられていましたが、詳細に調べることはこれまで困難でした。本研究成果によって、本菌の細胞壁多糖の量や局在の変化を、従来よりもより詳細に調べることが可能になりました。

研究成果の概要（英文）：By combining fluorescently labeled cell wall polysaccharide-binding proteins, mechanical fluorescence microscopy, and image analysis using software, the researchers were able to quantify changes in the amount and localization of cell wall polysaccharide components of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* during mycelial growth and during death by antifungal drugs, without destroying the fungus' morphology.

研究分野：医真菌学

キーワード：Cell wall Wallome *Aspergillus fumigatus* 細胞壁多糖 ガラクトフラノース

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト病原性糸状菌の多くにとって、細胞壁多糖は環境適応や抗真菌薬耐性を左右する重要な細胞構造である。申請者はこれまで、代表的なヒト病原性糸状菌である *Aspergillus fumigatus* の細胞壁多糖の構造と、それを決定する遺伝子群について解析を行ってきた。*A. fumigatus* の細胞壁は、分子構造の異なるいくつかの多糖から成る複合的な構造体である。結合グルコースのホモポリマーから成る グルカンと、N-アセチルグルコサミンのホモポリマーから成るキチンがファイバー状の内層構造を形成し、さらに 結合マンナンと 結合 5 員環型ガラクトースのヘテロポリマーから成るガラクトマンナン (GM)、結合グルコースポリマーである  $\beta$ -グルカン、このほかガラクトガラクトタンなどから成る非晶質の外層構造があり、休眠孢子や菌糸細胞の細胞構造を支持していると考えられている。

細胞壁多糖は、真菌の生育過程で盛んに分解・合成を繰り返しており、その動態は従来の予想を越えてダイナミックに変化していることがわかってきた。細胞壁を構成する多糖には真菌種ごとに量や構造の多様性があり、これらの変化量を定量的に、かつ連続的に捉えて一様に理解しようとするのは、細胞壁や細胞表面が主要な薬剤標的であることから鑑みても、真菌学的・医薬学的におおいに有益である。しかし、従来の細胞壁成分分析は、化学解析的な手法、すなわち「大量に培養して得られたバルク細胞へ企画分を初期試料とし、化学的・酵素的に分解して、単糖オリゴ糖単位レベルで定性定量解析する」というストラテジーが一般的であった。そのため、1) 形態・局在ごとの不均一性が無視される、2) 糖鎖の微細構造に由来する情報は一部、または全部が失われる、3) 孢子、出芽、菌糸と生活環の異なる状態の菌が混在する状態で解析することは難しい、といった問題点があった。したがって、細胞壁多糖の量や構造を、局在や不均一性の情報を保持したまま捉えることは、これまで困難であった。

## 2. 研究の目的

上述の背景から、本研究計画ではヒト病原性糸状菌 *A. fumigatus* をモデル生物とし、糸状菌の細胞壁多糖の質的・量的な動態の評価を客観的に、かつハイスループットに行うシステムの構築を目指した。また、本システムを利用して、*A. fumigatus* 病原性にかかわる様々な問題に対して細胞壁動態の観点からアプローチできるか否か検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究計画の遂行、すなわち糸状菌細胞壁多糖動態評価系の構築に向けて、まずは蛍光標識した細胞壁多糖結合性レクチン、あるいは糸状菌細胞染色蛍光色素を用いて、各種細胞壁構造の異なる *A. fumigatus* 遺伝子変異株など菌体を染色し、各種細胞壁成分の量や局在を観察できる顕微鏡画像の取得を目指した。その後、ハイコンテンツアナライザを用いて蛍光顕微鏡画像を取得しながら、各蛍光色素の蛍光強度を画像解析ソフトウェアで計測できる実験系の構築を目指し、菌体の自動認識条件の設計、各種蛍光色素の分染色条件検討、その他顕微鏡周辺の設定条件検討を行った。その後、最適化した実験系を用いて、*A. fumigatus* 菌体を様々な条件で培養し、細胞壁染色画像の一斉取得、一斉解析が可能かどうか検証した。

## 4. 研究成果

### (1) ハイコンテンツアナライザを用いた糸状菌細胞壁多糖定量画像解析システムの構築

細胞壁結合性レクチン、糸状菌細胞染色性色素、ハイコンテンツアナライザを組み合わせることで、*A. fumigatus* の代表的な細胞壁多糖を相対定量可能なシステムを構築した。各生活環の形態を形成した *A. fumigatus* 菌体を試料とし、蛍光色素標識した細胞壁多糖結合性レクチン (Concanavalin A, SBL, WGA, Dectin-1 など) あるいは糸状菌細胞染色蛍光色素 (Calcofluor White, Propidium Iodide など) のカクテルを用いて蛍光染色を施した。蛍光染色した菌体を CellCarrier Ultra 96 Black Plate に播種し、PerkinElmer 社製ハイコンテンツアナライザ Operetta CLS® を用いて蛍光染色画像を一斉に取得した。得られた蛍光染色画像を Harmony® ソフトウェアを用いて画像解析を実施した。Operetta および Harmony による画像解析システムのプリセットには、糸状菌画像解析が可能な条件が設定されていなかったため、細胞核・細胞質染色像を標的として糸状菌形態を認識する条件を新たに設計した。これによって、糸状菌の核・細胞質構造から菌糸を認識し、各種蛍光色素の蛍光強度から細胞壁成分の量を半自動的に、ハイスループットに相対定量できる仕組みを作り上げた。

(2) A. fumigatus 菌糸生育過程における細胞壁キチン - グルカン - GM 動態の同時計測

設計したシステムを用いて、*A. fumigatus* の菌糸生育過程における細胞壁多糖の動態を同時測定できるかどうか検証した。ヒト病原性糸状菌 *A. fumigatus* は、休眠孢子から発生して出芽し糸状生育するが、この過程で細胞壁多糖成分がどのように変化するかは詳細に調べられていなかった。グルカンを ConA、Dectin-1 で、キチンを CFW、WGA で、GM の Galf 糖鎖を抗ガラクトマンナン抗体 EBA-2 でそれぞれ分染色し、Operetta CLS® ならびに Harmony® で解析したところ、休眠孢子、その膨潤、出芽、菌糸伸長の各生活環過程の形態を捉えながら、細胞壁結合レクチンに由来する蛍光量の変遷を、数値化して定量することに成功した。この実験の結果、*A. fumigatus* の細胞壁多糖は、予想されていた通り、休眠から出芽、菌糸伸長の過程で、細胞壁多糖成分の局所的な濃縮や分散が起こることがわかった。また、予想に反して、この細胞壁多糖局在の偏りは、すべての成分で菌糸の先端でのみ起こるのではないことがわかった。すなわち、細胞壁 グルカンと結合する ConA、Dectin-1 は、出芽直後から活動的糸状生育の過程にかけて菌糸先端に局在することが示されたが、細胞壁キチンと結合する CFW の染色は、孢子基幹側や菌糸の分節部、分岐部に高強度に認められた。また細胞壁 GM は孢子ではほとんど染色されず、常に菌糸先端が高強度であることがわかった。これらのことは、菌糸先端が細胞壁多糖合成および分解のもっとも盛んな場である、という考えと必ずしも一致しない。すなわち、細胞壁代謝の盛んな場は、細胞壁多糖成分の種類によって異なる可能性を示唆している。より興味深いことに、CFW と同じくキチン成分に結合すると思われた WGA レクチンは、CFW と異なる局在を示した。すなわち WGA による孢子基幹部への染色は限定的で、かつ菌糸の分節分岐部の染色像は斑点状で、一様でなかった。この原因は不明だが、CFW と WGA の結合特性がキチン、すなわち 1-4 結合 N-アセチルグルコサミンとの結合様式の違いに起因していると考えられる。細胞壁キチンの動態を捉えるのに CFW と WGA のどちらを用いるのがより良いのか、より詳細な検討が今後必要である。

(3) A. fumigatus キャンディン系抗真菌薬暴露過程の細胞壁キチン-グルカン動態および菌糸先端破裂の同時計測

設計したシステムを用いて、キャンディン系抗真菌薬の暴露過程における細胞壁キチン、細胞壁 グルカンの動態を同時測定できるかどうか検証した。*A. fumigatus* は、キャンディン系抗真菌薬の暴露に应答して、一過性の薬剤抵抗性を示す性質のあることを知られている。特に、最小発育阻止濃度 MIC を大きく越える高濃度薬剤に暴露したときに抵抗性を発揮することから、この性質は Paradoxical Effect と呼ばれている。Paradoxical Effect の起こる原因として、細胞壁 グルカンの破壊に应答した代償的なキチン生合成活性化であることが指摘されていたが、これまでの研究では直接的な証拠に乏しかった。CellCarrier Ultra 96 Black Plate に播種した *A. fumigatus* 菌体各ウェルに低濃度から高濃度のカスポファンギン、ミカファンギンを処理し、顕微鏡観察して Paradoxical Effect を誘起できていることを確認したのち、細胞壁 グルカンを ConA で、細胞壁キチンを CFW で、さらに細胞質漏出を観察するために Propidium Iodide で染色して、Operetta CLS® ならびに Harmony® で解析した。その結果、Paradoxical Effect を起こしている菌糸は、短い菌糸が凝集した形態をとっており、その菌糸先端部分の多くに、高強度の CFW 染色像が観察された。この結果は、Paradoxical Effect を起こしている菌糸では、先端に細胞壁キチンが豊富に存在する可能性を示唆した。ところが、単位面積あたりの CFW 強度を、同様に単位面積あたりの糸状菌組織量で除すると、その数値には Paradoxical Effect 誘起群と非誘起群の間に有意な差はないことがわかった。すなわち、Paradoxical Effect を起こした菌体では、細胞壁キチンの含量が増えているのではなく、局在の偏りが分節部から菌糸先端部へシフトしているのではないかと、ということを示している。興味深いことに、CFW 染色の弱い一部の菌糸先端では、Propidium Iodide の高強度染色が観察された。このことは、Paradoxical Effect を起こしている菌体凝集塊の菌糸先端は 2 種類の状態が混在していることを示唆している。すなわち、キチンが集積して生存している菌糸先端と、キチンが集積しておらず死んだ菌糸先端である。これらの状態が、どのような因果で生じるのかはより詳細な検討の余地があるが、本研究成果は、キャンディン系薬に対する *A. fumigatus* の Paradoxical Effect の原因解明に向けた確かな一歩であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuya Ito, Taiga Miyazaki, Yutaka Tanaka, Takashi Suematsu, Hironobu Nakayama, Akihiro Morita, Tatsuro Hirayama, Masato Tashiro, Takahiro Takazono, Tomomi Saijo, Shintaro Shimamura, Kazuko Yamamoto, Yoshifumi Imamura, Koichi Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Shigeru Kohno & Hiroshi Mukae	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of Elm1 in antifungal susceptibility and virulence in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66620-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Emiko Matsunaga, Yutaka Tanaka, Saki Toyota, Hisae Yamada, Takuji Oka, Yujiro Higuchi, Kaoru Takegawa	4. 巻 131
2. 論文標題 Identification and characterization of $\alpha$ -D-galactofuranosidases from <i>Aspergillus nidulans</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 大、伊藤 文恵、佐々木 雅人、柴田 信之
2. 発表標題 環境ストレス応答性細胞壁再構成における糖転移酵素Gfsの細胞内動態解析
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤文恵、穴戸啓介、田中大、佐々木雅人、柴田信之
2. 発表標題 病原性黒色真菌 <i>Exophiala jeanselmei</i> 細胞壁多糖の抗原構造および $\alpha$ -1, 2 結合マンノースから成る長鎖オリゴ糖の抗原性の解析
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 大、岡拓二、伊藤文恵、佐々木雅人、柴田信之
2. 発表標題 酵母型マンナン構造の存在を示唆する新規糸状菌マンノース転移酵素群の解析
3. 学会等名 第4回東北医真菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 大、伊藤 文恵、佐々木 雅人、柴田 信之
2. 発表標題 タンパク質ノックダウンテクノロジーの病原性糸状菌への適用と細胞壁構造変化に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 大、伊藤 文恵、佐々木 雅人、柴田 信之
2. 発表標題 糸状菌タンパク質ノックダウンのためのイネオーキシシンドグロン異種発現株の構築
3. 学会等名 第5回東北医真菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小泉 舞華、Shen Jiangan、田中 大、松永 恵美子、伊藤 文恵、佐々木 雅人、竹川 薫、柴田 信之
2. 発表標題 GH159酵素のガラクトフラノシダーゼ活性の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021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
---------	---------