

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22773

研究課題名(和文)アスペルギルス菌系凝集塊の分散化を可能にする細胞表面接着分子の制御法の開発

研究課題名(英文)Development of the methods for hyphal dispersion of *Aspergillus* hyphae by controlling the surface adhesive molecules

研究代表者

宮澤 拳 (Miyazawa, Ken)

国立感染症研究所・真菌部・研究員

研究者番号：30880231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：*Aspergillus fumigatus*の-1,3-グルカンとGAGの共欠損株(菌系分散株)の菌系生長を、濁度により少なくとも培養18時間まで定量的に測定することに成功した。リアルタイム濁度測定装置を用いることにより、濁度により連続的に菌系の増殖が計測された。増殖開始と倍加時間の計測に成功した。濁度の連続的測定により、濃度依存的な生育抑制が投与する抗真菌薬の種類によって異なる挙動を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌は菌系が塊を形成しながら生育するため、細菌や酵母で用いられる比濁法を適用することができなかった。本研究では、糸状菌の細胞表面を改変して菌系分散株を作製し、その菌系生育が濁度により測定可能であることを示した。リアルタイムに菌系の増殖を捉える方法を確立することに成功した。本手法は糸状菌の増殖の予測や抗真菌薬投与時の挙動の理解に有用であり、臨床に有用な情報を与えることができると確信している。

研究成果の概要(英文)：Mycelial growth of the -1,3-glucan and GAG co-deficient strain of *Aspergillus fumigatus* (hyphal dispersion strain) was quantitatively measured by optical density for at least 18 hours of cultivation. Using a real-time plate reader, mycelial growth of the hyphal dispersion strain cultured with a 24-well plate was continuously measured by optical density. The start of growth and doubling time were successfully measured. Continuous measurement of optical density revealed that concentration-dependent growth inhibition behaved differently depending on the type of antifungal drug added.

研究分野：医真菌学

キーワード：アスペルギルス 細胞壁 多糖 濁度 増殖曲線 糸状菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は液体振盪培養において、一般的に細胞が連なり糸状に生育した菌糸が塊を形成しながら生育する。単細胞生物である細菌や酵母は濁度法でその生育をリアルタイムに追跡できる。一方、糸状菌が塊を形成しながら生育すると、培養液内において細胞の分布が著しく不均一になり、観察される菌塊と生菌数との間に線形性が証明できない。そのため、糸状菌の生育量の定量法は、乾燥菌体重量の測定[引用 1]や、生細胞を色素プローブにより検出する間接的な計測[引用 2]にとどまっており、糸状菌に単細胞の細菌や酵母で用いる種々の解析手法を適用できない主因である。病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主要原因菌であり、適切な初期治療導入がアスペルギルス症患者の予後改善には必須である[引用 3]。しかし、現在でも信頼性の高い薬剤感受性試験法が確立されていないため、抗真菌薬の選択に際し科学的基準が曖昧である。したがって、科学的な薬剤感受性試験を確立し適切な薬剤選択を可能とするためには、糸状菌の生育を正確に定量モニターする新技術が必要である。我々は研究開始までに、*Aspergillus* 属糸状菌の液体振盪培養における菌糸塊形成機構について研究を進め、細胞壁多糖 -1,3-グルカンと細胞外分泌多糖ガラクトサミノガラクトン (GAG) が菌糸塊形成に寄与することを発見し、両多糖の共欠損株は菌糸が均一分散する形質を見出した[引用 4]。

2. 研究の目的

本研究における第一の目的として、*A. fumigatus* において -1,3-グルカンと GAG の共欠損株を作製し、その菌糸生長が濁度によって計測可能か否かを検証する。また、第二の目的として、糸状菌の細胞表面構造と各々の多糖・タンパク質分子を介した凝集機構を理解し、遺伝子破壊に依らない臨床分離株にそのまま適用可能な菌糸凝集回避法を開発する。

3. 研究の方法

(1) *A. fumigatus* における菌糸分散株の作製

濁度による菌糸生長の測定が可能か否かを検証するため、まず *A. fumigatus* の主要な -1,3-グルカン合成酵素をコードする *ags1* および推定 GAG 合成酵素遺伝子 *gtb3* の二重遺伝子破壊株を作製した。

(2) 比濁法の検討

菌糸生長の濁度測定に向けて、*A. fumigatus* の分生子を 50 mL の最少培地(AMM)に接種し、37°C、160 rpm でフラスコ振盪培養した。培養 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 時間目に培養液をサンプリングし、96 穴プレートに分注した。96 穴プレート中の培養液の濁度(OD₆₀₀)をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。濁度の直線性と菌体重量との相関性を検定するため、菌糸の希釈系列を調製し、各希釈倍率の濁度と菌体重量をそれぞれ測定した。抗真菌薬感受性の評価のためには、48 穴プレートに抗真菌薬を含む細胞培養用(RPMI)培地を加え、分生子を接種して 35°C、300 rpm、15 h 培養した。培養後の菌糸生育を OD₆₀₀ 測定により定量化した。

(3) リアルタイム濁度測定装置の適用

24 穴プレートに AMM、RPMI、富栄養(Yeast extract-glucose; YG)培地を分注し、菌糸分散株の分生子を接種して 37°C、250 rpm で 24 時間振盪培養した。濁度はリアルタイム濁度測定装置(Stratus, 600 nm; Cerillo)を用いて 3 分毎に測定した。増殖曲線は、各培地について 3 連で培養し、その平均値と標準偏差を各測定点についてプロットして作成した。抗真菌薬感受性は、各濃度の抗真菌薬を含んだ RPMI 培地に分生子を接種し、上記と同様に濁度を測定し増殖曲線を作成して評価した。菌糸の抗真菌薬を与えた場合の増殖の挙動は、RPMI 培地に分生子を接種して振盪培養し、培養 8 時間目(RPMI, YG 培地)または 15 時間目(AMM)に抗真菌薬を添加し、24 時間目まで培養を継続した。

(4) 細胞壁成分の分画と生化学的解析

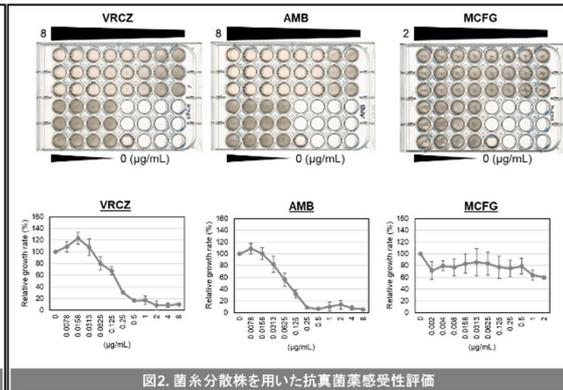
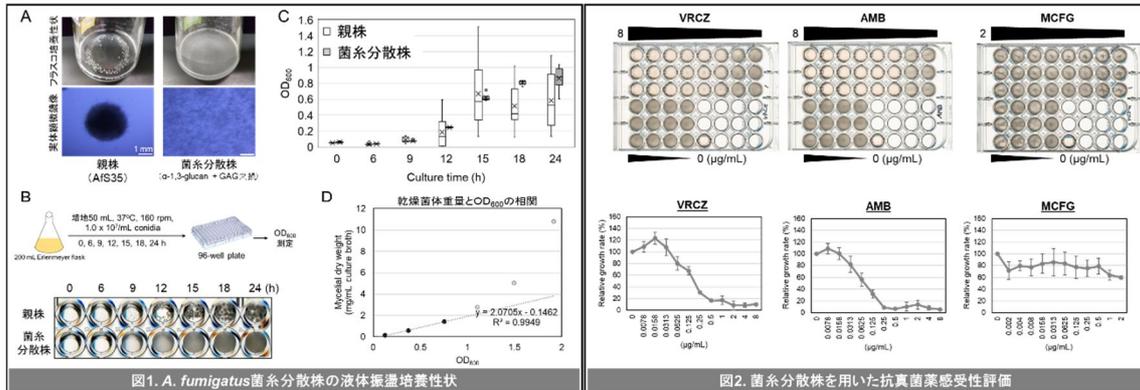
菌糸の細胞壁成分は熱水アルカリ抽出法[引用 5]により分画し、熱水可溶画分およびアルカリ可溶(-1,3-グルカンを主に含む)画分を取得した。両画分を加水分解して陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、単糖分析を行った。GAG の精製は、改変 Brian 培地[引用 6]を用いて *A. fumigatus* を培養し、上清を得てエタノール沈殿に供し、凍結乾燥することにより実施した。

4. 研究成果

(1) 菌糸生育測定への比濁法の導入

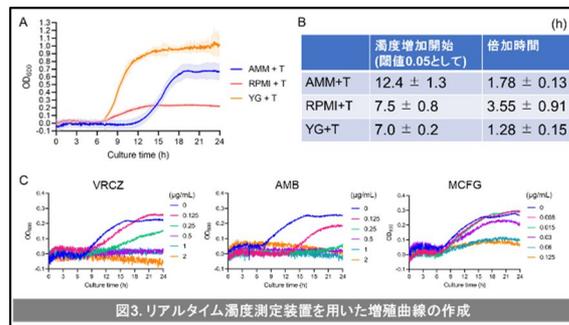
作製した *A. fumigatus* の *ags1*, *gtb3* 二重遺伝子破壊株は、細胞壁から -1,3-グルカンと GAG が共に欠損していた。*ags1*, *gtb3* 二重遺伝子破壊株はフラスコ液体振盪培養条件下で菌糸が均一分散した(菌糸分散株)(図 1A)。フラスコ培養で得た培養液を 96 穴プレートに分注し観察したところ、親株(AfS35)では液中の菌体の分布が不均一である一方、菌糸分散株ではウェル全体に均一に菌体が存在していることが分かった(図 1B)。濁度による菌糸生育の測定の結果、*A. fumigatus* の親株では濁度

と菌体生育量との相関がみられなかった一方、菌系分散株の生育は濁度法により少なくとも培養18時間まで精度よく定量的に計測された(図1C)。菌系分散株の場合、OD₆₀₀ = 0.8 まで菌体乾燥重量との直線関係を示した(図1D)。また、48 穴プレートにて抗真菌薬を含む培地に菌系分散株の分生子を接種して振盪培養したところ、濃度依存的な生育抑制が濁度により定量的に測定された(図2)。既存の抗真菌薬存在下の最少生育阻止濃度(MIC)は、現在標準的に用いられる薬剤感受性測定手法である CLSI M38-2 に準拠した微量液体希釈法で得られた MIC とよく一致した。[発表論文 1]



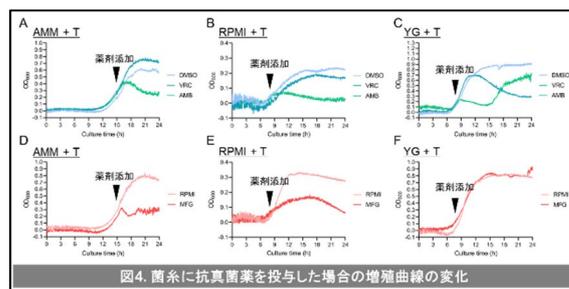
(2) リアルタイム濁度測定装置を用いた菌系生育の測定

24 穴プレートに AMM, RPMI, YG 培地を分注し、菌系分散株の分生子を接種して振盪培養した。リアルタイム濁度測定装置を用いた培養の結果、濁度により連続的に菌系の増殖が計測された(図3A)。使用した培地により増殖曲線の増加開始時間や曲線の傾きに違いが認められた。そこで、増殖曲線から菌系生育開始を算出したところ、濁度の閾値を 0.05 とした場合、AMM, RPMI, YG でそれぞれ 12.4 ± 1.3 , 7.5 ± 0.8 , 7.0 ± 0.2 h であった(図3A)。また、濁度の傾きから計算される倍加時間は AMM で 1.78 ± 0.13 h, RPMI で 3.55 ± 0.91 h, YG で 1.28 ± 0.15 h であった(図3B)。



抗真菌薬濃度依存的な生育抑制も定量的かつ経時的に測定できた(図3C)。細胞膜のエルゴステロール合成を阻害するポリコナゾール(VRCZ)存在下では、最少生育阻止濃度(MIC)以下の濃度における増殖開始の時間は薬剤非存在下と同じであった一方、細胞膜に結合して殺菌的に作用するアムホテリシン B (AMB)が MIC 以下の場合、生育開始が遅延した(図3C)。以上のことから、菌系生育を連続的に濁度で追跡することで、本菌の抗真菌薬存在下での生育の挙動の影響の違いを可視化することに成功した。[論文投稿中]

(3) 菌系に抗真菌薬を与えた場合の生育応答の観察



糸状菌の薬剤感受性評価は、一般的に分生子に対して抗真菌薬を含む培地を与え、菌系生育が見られるか否かでその効果を判定する。一方、臨床においては菌系が伸長した像を捉えてから抗真菌薬の投与を開始することが多いため、菌系に対する抗真菌薬感受性や生育の変化を捉える必要がある。菌系が塊を形成している場合、生育の変化を定量的にとらえることは困難である。今回、分散株を菌系が生育するまで培養し、活発に増殖が見られる時点で抗真菌薬を投与した。

AMM および RPMI 培地で培養した場合は、殺菌的なアムホテリシン B (AMB)を投与した場合は即座に濁度の上昇が停止した一方、静菌的なポリコナゾール(VRC)を与えた場合は濁度がしばらく上昇続けた(図4A, B)。また、興味深いことに、YG 培地で培養中の菌系に AMB を与えた場合は、即座に濁度の増加が停止したが、数時間後には再び濁度が増加を始めた(図4C)。すなわち、細胞膜と結合して孔を形成する AMB の結合が菌系内ではばらつきがあること、菌系中の隔壁を越えて殺菌活性を示さないことが示唆された。AMM および RPMI 培地で培養した菌系に細胞壁 - グルカンの生合成を阻害するミカファンギン(MFG)を添加した場合、濁度の上昇は停止したが、菌系の凝集が認められ生育の停止とは同調していないことが示唆された(図4D, E)。YG 培地に MFG を添加した場合、非添加時との生育曲線の違いは認められなかった(図4F)。顕微鏡下で MFG 投与時に特徴的な菌系の多分岐化が観察されたことから、MFG が細胞壁 - グルカンの生合成を阻害する効果を発揮しているにもかかわらず菌体の増殖が継続していることが示唆された。現在、培地や薬剤により異なる生育応答を示したメカニズムについて解析を進めている。[論文投稿中]

(4) GAG による接着の分子機構の解析

菌糸間の接着は主に -1,3-グルカンと GAG に依存して起こることをこれまで明らかにしてきた[引用 4]。すなわち、-1,3-グルカンに起因する接着条件、GAG による接着条件をそれぞれ理解することで、遺伝子破壊に依らない菌糸分散化が達成できると考えられた。本研究では GAG 側の接着機構に着目して解析を進めた。GAG を介した菌糸接着機構を解析するため、培養上清をエタノール沈殿し GAG を得た。GAG 存在下の菌糸凝集性の評価を試みたが、*A. fumigatus* 由来 GAG は水に高度に不溶で解析が困難であった。種々の界面活性剤や pH 条件を検討したが、可溶化した条件はリチウム塩を含む有機溶媒に対してのみで、生理的な環境では不溶化状態が維持された。GAG 欠損株はバイオフィルム形成が起こらなくなることが分かっていることから[引用 7]、バイオフィルム形成阻害剤の探索に方針を転換し解析を進めている。

(5) 臨床分離株からの新たな接着分子の探索

当施設では、難治症例や診断困難例を対象に真菌の同定等に関する検査を実施しており、多数の臨床分離株が収集されている。こうした臨床分離株は、種々の形質を獲得・欠失させて宿主体内の環境に馴化していると考えられる。これら臨床分離株の形質や細胞壁成分の解析を通して、新たな接着分子の探索を試みた。当施設で保有する約 50 株の臨床分離株の液体振盪培養時の性状を観察した結果、1 株で菌糸が分散傾向を示し、バイオフィルム形成能の低下が認められた。細胞壁 -1,3-グルカン量には他の株との有意な差は認められなかったことから、バイオフィルム形成能低下から GAG 量の減少が示唆されたものの、GAG 単独破壊株では菌糸ペレット形成能は親株と同等という結果から考えると、未知の分子が本株の菌糸接着能低下に寄与していることが示唆された。現在、本株の菌糸接着能低下要因について探索を継続している。

引用文献

- [1] Calam CT. 1969. The evaluation of mycelial growth, p 567–591. In Norris JR, Ribbons DW (ed), *Methods in Microbiology*, vol 1. Academic Press, Cambridge, England.
- [2] Loures FV, Levitz SM. 2015. XTT assay of antifungal activity. *Bio-protocol* 5:e1543
- [3] Latgé J-P, Chamilos G. 2019. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev* 33:e00140-18.
- [4] Miyazawa K, Yoshimi A, Sano M, Tabata F, Sugahara A, Kasahara S, Koizumi A, Yano S, Nakajima T, Abe K. 2019. Both galactosaminogalactan and -1,3-glucan contribute to aggregation of *Aspergillus oryzae* hyphae in liquid culture. *Front Microbiol* 10:2090.
- [5] Yoshimi A, Sano M, Inaba A, Kokubun Y, Fujioka T, Mizutani O, Hagiwara D, Fujikawa T, Nishimura M, Yano S, Kasahara S, Shimizu K, Yamaguchi M, Kawakami K, Abe K. 2013. Functional analysis of the -1,3-glucan synthase genes *agsA* and *agsB* in *Aspergillus nidulans*: AgsB is the major a-1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS One* 8:e54893.
- [6] Fontaine T, Delangle A, Simenel C, Coddeville B, van Vliet SJ, van Kooyk Y, Bozza S, Moretti S, Schwarz F, Trichot C, Aebi M, Delepierre M, Elbim C, Romani L, Latgé JP. 2011. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 7:e1002372.
- [7] Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, Xu W, Kravtsov I, Hoareau CMQ, Vanier G, Urb M, Campoli P, Al Abdallah Q, Lehoux M, Chabot JC, Ouimet M-C, Baptista SD, Fritz JH, Nierman WC, Latgé JP, Mitchell AP, Filler SG, Fontaine T, Sheppard DC. 2013. *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal -glucan from the immune system. *PLoS Pathog* 9:e1003575.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ken Miyazawa, Takashi Umeyama, Yasutaka Hoshino, Keietsu Abe, Yoshitsugu Miyazaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Quantitative Monitoring of Mycelial Growth of <i>Aspergillus fumigatus</i> in Liquid Culture by Optical Density	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e00063-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/Spectrum.00063-21	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 Ken Miyazawa, Takaaki Yamashita, Ayumu Takeuchi, Yuka Kamachi, Akira Yoshimi, Yuto Tashiro, Ami Koizumi, Makoto Ogata, Shigekazu Yano, Shin Kasahara, Motoaki Sano, Youhei Yamagata, Tasuku Nakajima, Keietsu Abe	4. 巻 2
2. 論文標題 A Glycosylphosphatidylinositol-Anchored α -Amylase Encoded by amyD Contributes to a Decrease in the Molecular Mass of Cell Wall α -1,3-Glucan in <i>Aspergillus nidulans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 Article 821946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ffunb.2021.821946	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 Ami Koizumi, Ken Miyazawa, Makoto Ogata, Yuzuru Takahashi, Shigekazu Yano, Akira Yoshimi, Motoaki Sano, Masafumi Hidaka, Takanori Nihira, Hiroyuki Nakai, Satoshi Kimura, Tadahisa Iwata, Keietsu Abe	4. 巻 3
2. 論文標題 Cleavage of α -1,4-glycosidic linkages by the glycosylphosphatidylinositol-anchored α -amylase AgtA decreases the molecular weight of cell wall α -1,3-glucan in <i>Aspergillus oryzae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 Article 1061841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/ffunb.2022.1061841	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮澤拳, 梅山隆, 星野泰隆, 阿部敬悦, 宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus細胞表層改変株を用いた濁度法による菌糸生育の測定
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会 / 真菌症フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮澤拳, 梅山隆, 星野泰隆, 阿部敬悦, 宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus細胞表層改変株の濁度による菌糸生長測定の試み
3. 学会等名 第14回アスペルギルス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮澤拳, 梅山隆, 星野泰隆, 阿部敬悦, 宮崎義継
2. 発表標題 糸状菌Aspergillus fumigatusの定量的生育測定法の検討
3. 学会等名 第104回細菌学会関東支部総会, 2021年インターラボセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Miyazawa, Takashi Umeyama, Yasutaka Hoshino, Shogo Takatsuka, Yasunori Muraosa, Keietsu Abe, Yoshitsugu Miyazaki
2. 発表標題 Quantitative monitoring of Aspergillus fumigatus mycelial growth by optical density
3. 学会等名 21th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮澤拳, 梅山隆, 高塚翔吾, 村長保憲, 星野泰隆, 阿部雅広, 阿部敬悦, 宮崎義継
2. 発表標題 病原性糸状菌Aspergillus fumigatusの臨床分離株の表現型と細胞壁成分の比較解析
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken Miyazawa, Takashi Umeyama, Shogo Takatsuka, Yasunori Muraosa, Yasutaka Hoshino, Keietsu Abe, Yoshitsugu Miyazaki
2. 発表標題 Analyses of function and biosynthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in Aspergillus fumigatus
3. 学会等名 The 9th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------