

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780079

研究課題名（和文）病原性アスペルギルスにおける細胞周期関連プロテインキナーゼの研究

研究課題名（英文）Cell cycle-related protein kinases in *Aspergillus fumigatus*

研究代表者

梅山 隆 (UMEYAMA TAKASHI)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任研究官

研究者番号：20360696

研究成果の概要（和文）：侵襲性アスペルギルス症は致死率 50%を越えるため、新しい治療法の開発が渴望されている。本研究ではアスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* のプロテインキナーゼの解析を通じて細胞周期と菌糸成長速度との関係を解明することを目的とする。阻害剤、遺伝子破壊、遺伝子発現抑制、化学遺伝学などの手法を用いて 4 種類のプロテインキナーゼを解析し、Auk1 および Mps1 が生育に必須であることを見いだした。アスペルギルス症の新しい治療戦略の基礎を構築するのに貢献でき、基礎生物学的にもユニークな細胞周期の制御メカニズムという新しい知見を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Overall mortality with invasive pulmonary aspergillosis was over 50%, leading to strong expectation for development of a novel therapeutics. Aim of study is to elucidate correlation between cell cycle regulation and filamentous growth via analysis of protein kinases in *Aspergillus fumigatus*, the major causative agent of aspergillosis. I analyzed 4 protein kinases by inhibitors, gene disruption, gene downregulation, and chemical genetics. I found that Auk1 and Mps1 are essential for the growth. These results could contribute to basic research for a novel therapeutics of aspergillosis and give a new insight of unique mechanism for cell cycle regulation into basic biology field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	0	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	0	2,800,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物制御学

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 抗真菌薬開発の必要性

カビによる全身性の感染症である深在性真菌症が増加の一途を辿っており、年々問

題が深刻になってきている。その背景には臓器移植や癌化学療法などの医療の高度化、エイズ患者の増加、生活習慣病の蔓延等の原因によって易感染性患者が急増している現代の事情が挙

げられる。また、国際交流の活発化によって健常者でも感染しうる輸入真菌症も増加しており、国民が新たな危険に曝され始めている。一刻も早く対応策を講じる必要がある。実際に臨床で使われている深在性真菌症に適応する抗真菌剤はまだ 10 種類に満たず、抗菌剤の約 160 種類に比べ、治療法の選択の幅が狭い。「新しい作用機作を持ち」「副作用がなく」「広い抗菌スペクトラムを有する」ような新しい抗真菌剤への期待とその必要性は非常に高い。

## (2) アスペルギルス症と病原性

深在性真菌症の中でも侵襲性アスペルギルス症は、好中球減少症や造血幹細胞移植患者などに発症し、現在最も有効とされている治療薬を用いてもなお致死率が 50%を超える。環境中から吸入された分生子(無性胞子)が肺胞に達すると、菌糸が血管内に侵入し、全身の臓器に播種する。临床上大きな問題となっており、新しい治療法の開発が期待されているが、アスペルギルスのヒト体内での生態の詳細は未だ明らかになっていない。アスペルギルス症の患者から最も高頻度で分離される *Aspergillus fumigatus* は 37° C での生育速度が他のアスペルギルス属に比べて格段に速い。ヒトの体温で生存できる能力はヒトの全ての病原体に必須のものであり、37° C での高速成長能がヒトへの病原性の一つであることは明らかである。

## (3) 病原糸状菌の細胞周期とプロテインキナーゼ

細胞周期は分裂してできた細胞が次の分裂を起こすまでの過程である。真核生物の細胞の増殖・成長には細胞周期が正しく回ることが必須である。プロテインキナーゼはタンパク質をリン酸化することによりシグナル

伝達を中心を担っている酵素である。糸状菌においても、細胞周期を制御するキナーゼに異常がある変異株では菌糸の伸長が止まる。一方、カンジダ症の主要原因菌 *Candida albicans* において、細胞周期を制御するキナーゼの発現抑制により菌糸の伸長が促進される。このように、菌糸の成長速度の調節には細胞周期の制御が深く関わっており、抗真菌薬の新しい標的候補として適していると考えられる。

## 2. 研究の目的

4 種類の細胞周期を制御すると予想されるプロテインキナーゼについて、*A. fumigatus* の生育および病原性に与える影響を調べ、治療法の開発につながる基礎的な知見を得ることを目標とする。本研究の結果より、アスペルギルス症の新しい治療戦略の基礎を構築するのに貢献でき、基礎生物学的にもユニークな細胞周期の制御メカニズムという新しい知見を与えることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) プロテインキナーゼ阻害剤による *A. fumigatus* の生育への影響

*A. fumigatus* の分生子を塗布した寒天培地上に、市販の Aurora キナーゼ阻害剤 2 種類および MPS1 キナーゼ阻害剤 1 種類を染みこませたペーパーディスクを載せて培養した。37°C 2 日間培養することにより、生育阻止円が出るかどうかを観察した。

### (2) プロテインキナーゼの遺伝子破壊

プロテインキナーゼ遺伝子上流および下流の DNA 断片およびハイグロマイシン耐性遺伝子を含む遺伝子破壊用の DNA カセットを PCR 増幅し、Ku80 破壊株 Afs35 へ形質転換した。ハイグロマイシン耐性遺伝子をキナーゼ遺伝子と相同組換えにより置換した株をハイグロマイシンを

含む寒天培地上で選択した。得られた株について生育および分生子の着生について観察を行った。

### (3) NiiA プロモーター置換による遺伝子発現抑制

NiiA プロモーターはアンモニウム塩存在下で転写が抑制されることが知られている。遺伝子破壊の結果より必須と考えられる遺伝子について、そのプロモーターを NiiA プロモーターと置換することにより遺伝子発現抑制株を作製した。

### (4) ATP アナログ阻害剤およびアナログ感受性変異株を組み合わせたキナーゼ活性阻害

MPS1 のアナログ感受性変異株を作製し、膜透過性 ATP アナログ阻害剤 (1NM-PP1) を用いて、*A. fumigatus* の MPS1 キナーゼのリン酸化活性を特異的に阻害する系を構築した。578 番目のメチオニンをグリシンに置換した MPS1 遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子を形質転換し、相同組換えにより染色体上の MPS1 遺伝子にアナログ感受性変異を導入した。

## 4. 研究成果

### (1) プロテインキナーゼ阻害剤による *A. fumigatus* の生育への影響

市販の Aurora キナーゼ阻害剤 2 種類は *A. fumigatus* の生育には影響なかった。キナーゼ阻害剤の特異性がヒトと *A. fumigatus* との間で異なることが予想される。

また、ヒトの Mps1 キナーゼ阻害剤では *A. fumigatus* の生育を阻害しなかったが、真菌の Mps1 キナーゼ阻害剤である LY83583 によって生育阻害が観察された (図 1)。この結果より、ヒトと真菌の Mps1 の阻害様式が異なることが示唆された。

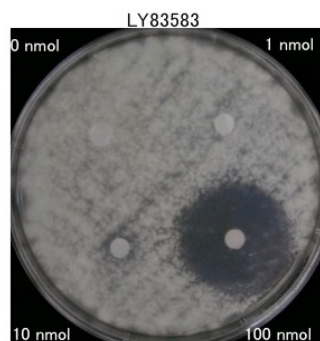


図 1 MPS1 阻害剤 LY83583 による *A. fumigatus* の生育への影響

### (2) プロテインキナーゼの遺伝子破壊

Aurora キナーゼ 1 (Auk1) および 2 (Auk2)、MPS1 キナーゼの遺伝子破壊株が数度の試行でも取得できなかったことから、これらは生育に必須であることが予想される。

### (3) NiiA プロモーター置換による遺伝子発現抑制

必須と考えられる Auk1、MPS1 キナーゼの遺伝子発現抑制株を作製したところ、Auk1 および MPS1 キナーゼを抑制した場合に生育が顕著に抑制された (図 2)。

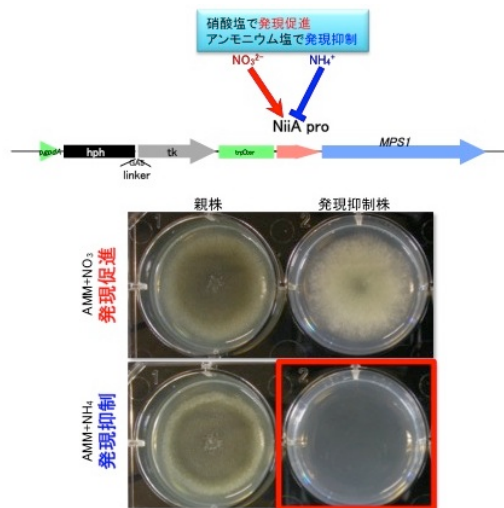


図 2 NiiA プロモーターの制御(上)と寒天培地上の生育(下)

### (4) ATP アナログ阻害剤およびアナログ感受性変異株を組み合わせたキナーゼ活性阻害

変異株に 1NM-PP1 を作用させたところ、寒天培地上で生育阻止円が観察された(図 3)。分生子の膨潤は阻害しなかったが、分生子からの出芽および菌糸成長が顕著に抑制された。DAPI 染色により核の挙動を観察したところ、MPS1 キナーゼ活性の阻害により染色体分裂が正常に行われず、巨大な核やちぎれた核が観察された。以上の結果から、MPS1 キナーゼは正常な核の分裂を制御し、分生子からの出芽と菌糸成長に重要な役割を担っていることが示された。

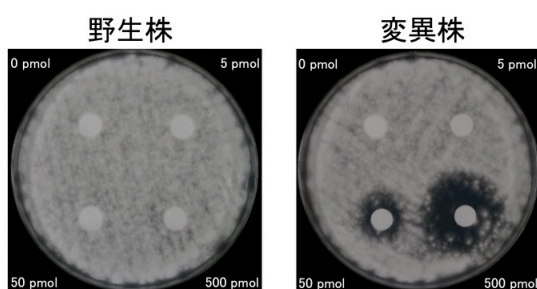


図3 アナログ感受性変異株の生育は1NM-PP1によって阻害される。

## 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 1 件)

Tsuda K, Nishiya N, Umeyama T, Uehara Y, Identification of LY83583 as a specific inhibitor of *Candida albicans* MPS1 protein kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、409、2011、p418-423、DOI 10.1016/j.bbrc.2011.05.010

[学会発表] (計 5 件)

- ① 梅山 隆、山越 智、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、アスペルギルス症の病原性に関する基盤研究、第 31 回関東医真菌懇話会、2010 年 7 月 3 日、東京

- ② 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、*Aspergillus fumigatus* の Mps1 キナーゼの新たな抗真菌薬ターゲットとしての可能性の検討、第 59 回日本化学療法学会総会、2011 年 6 月 23-25 日、札幌
- ③ 梅山 隆、山越 智、宮崎義継、アスペルギルス属の病原性制御にむけたアプローチ、第 55 回日本医真菌学会学術集会、2011 年 10 月 21, 22、東京
- ④ 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、*Aspergillus fumigatus* MPS1 キナーゼの化学的・遺伝学的アプローチによる解析、第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同集会、2011 年 10 月 26-28 日、山形
- ⑤ Takashi Umeyama, Satoshi Yamagoe, Koichi Tanabe, Hideaki Ohno, and Yoshitsugu Miyazaki, Mps1 kinase is essential for the growth in *Aspergillus fumigatus*, 5<sup>th</sup> Advances Against Aspergillosis, 2012 年 1 月 25-31 日、Istanbul, Turkey

[その他]

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-bioact.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅山 隆 (UMEYAMA TAKASHI)

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任研究官

研究者番号：20360696

(2) 研究分担者 (3) 連携研究者

なし