

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590546

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 kinase in *Aspergillus fumigatus*

研究代表者

梅山 隆 (Umeyama, Takashi)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20360696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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5クラス8種類のプロテインキナーゼを解析し、Mps1 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 8 protein kinases by inhibitors, gene disruption, gene downregulation, and chemical genetics. I found that 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.

研究分野：医真菌学

キーワード： *Aspergillus fumigatus* アスペルギルス症 シグナル伝達 プロテインキナーゼ 病原真菌 真菌症
糸状菌 細胞周期

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(無性孢子)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

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の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

A. *fumigatus* の 5 クラス 8 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の遺伝子破壊株および相補株の作製

プロテインキナーゼ遺伝子の上流および下流の 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。また、プロテインキナーゼ遺伝子および

ピリチアミン耐性遺伝子を含む遺伝子相補用の DNA カセットを PCR 増幅し、遺伝子破壊株へ形質転換した。プロテインキナーゼ遺伝子によって相補された株をピリチアミ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。

(2)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。

(3)核小体蛋白 NopA-mCherry 融合蛋白の発言と 4D ライブイメージング

核小体蛋白をコードする NopA に赤色蛍光蛋白 mCherry を融合させる蛋白を発現させる、ピリチアミン耐性遺伝子を含む DNA カセットを MPS1 アナログ感受性変異株に導入し、ピリチアミンを含む寒天培地上で組換え株を選択した。共焦点顕微鏡を用いて、4D イメージングを行うことにより、MPS1 キナーゼ活性阻害条件下における核の挙動を観察した。

4 . 研究成果

(1)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 MPS1 キナーゼ活性阻害

ATP アナログ変異株に 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ることから、MPS1 が生育に必須であることがこれまでの研究で明らかになっている。

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。これが、核の分配の異常によって引き起こされたのかどうかを確認するために、核小体蛋白 NopA-mCherry 融合蛋白を発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Z 軸方向のスライス数枚を経時的に観察する 4D イメージングを行った。その結果、MPS1 キナーゼ活性抑制状態では、核の分配が正常に行われず、それによって生育が抑制されていることが示唆された。

(2)プロテインキナーゼ PLK1 の遺伝子破壊株の表現型

Aspergillus fumigatus の Polo-like キナーゼ相同蛋白 (AfPlk1) が増殖に及ぼす影響について検討した。哺乳類細胞における Polo-like キナーゼ (Plk) は抗腫瘍薬の標的分子としても注目されている。*A. fumigatus* において遺伝子破壊に成功したことから、必須遺伝子ではないことが示唆された。破壊株のコロニー生育速度は親株と比べて約 60% に低下していた。また、出芽が親株よりも 2 時間早く、37 10 時間培養で親株は分岐菌糸を示さないが、破壊株では高頻度に観察された。分生子形成効率が、親株と比較して約 12% に低下し、親株のような円柱状の分生子頭を形成していなかった。遺伝子破壊株の分生子の電子顕微鏡解析を行ったところ、表層構造に異常が観察され、分生子頭形成だけでなく、分生子そのものが未成熟であり、これが出芽時期が早い原因となっていることが推察された。抗真菌薬感受性には影響はなかった。以上の結果から、AfPlk1 は菌糸の分岐と分生子形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。今後病原性について検討し、新しいクラスの抗真菌薬の標的としての可能性を探る。

(3) プロテインキナーゼ AUK4 の遺伝子破壊株の表現型

A. fumigatus のプロテインキナーゼをコードする AUK4 の遺伝子破壊による上皮細胞への接着およびバイオフィーム形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。遺伝子破壊株のコロニーの生育速度は親株と比べて約 75%に低下し、分生子形成効率は大幅に低下した。血清有無の条件でバイオフィームを形成させ、Crystal violet を用いてバイオフィーム形成を定量したところ、親株では血清添加によってバイオフィーム形成量が増加するが、破壊株ではその増加は観察できなかったことから、AUK4 がバイオフィーム形成に関与することが示唆された。今後、AUK4 の血清にตอบสนองしたバイオフィーム形成における役割を詳細に探索する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Hisao Yoshida, Masafumi Seki, Takashi Umeyama, Makoto Urai, Yuuki Kinjo, Isao Nishi, Masahiro Toyokawa, Yukihiko Kaneko, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki, Kazunori Tomono. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus*: Successful treatment of a liver transplant patient. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 、査読有、 21: 479-481, 2015. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.02.010.

Masatomo Kimura, Osamu Maenishi, Eisuke Enoki, Takaaki Chikugo, Takashi Umeyama, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki. *Aspergillus* fungal ball in central cavity of a pulmonary cryptococcal nodal lesion. *Pathology International*. 、査読有、 65: 329-331, 2015. DOI: 10.1111/pin.12266.

Makoto Urai, Yukihiko Kaneko, Mamiko Niki, Manabu Inoue, Koichi Tanabe, Takashi Umeyama, Hidesuke Fukazawa, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki. Potent drugs that attenuate anti-*Candida*

albicans activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. *Journal of Infectious Diseases*. 、査読有、 20: 612-615, 2014. DOI: 10.1016/j.jiac.2014.06.004.

Yoichiro Okubo, Megumi Wakayama, Hideaki Ohno, Shuhei Yamamoto, Naobumi Tochigi, Koichi Tanabe, Yukihiko Kaneko, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Minoru Shinozaki, Tetsuo Nemoto, Haruo Nakayama, Daisuke Sasai, Takao Ishiwatari, Kayoko Shimodaira, Yoshiro Yamamoto, Katsuhiko Kamei, Yoshitsugu Miyazaki, Kazutoshi Shibuya. Histopathological Study of Murine Pulmonary Cryptococcosis Induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 、査読有、 66: 216-221, 2013. DOI: 10.7883/yoken.66.216.

Takashi Umeyama, Hideaki Ohno, Fujihiko Minamoto, Taeko Takagi, Chiyoko Tanamachi, Koichi Tanabe, Yukihiko Kaneko, Satoshi Yamagoe, Kazuma Kishi, Takeshi Fujii, Hiromu Takemura, Hiroshi Watanabe, Yoshitsugu Miyazaki. Determination of Epidemiology of Clinically Isolated *Cryptococcus neoformans* Strains in Japan by Multilocus Sequence Typing. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 、査読有、 66: 51-55, 2013. DOI: 10.7883/yoken.66.51.

Minoru Nagi, Koichi Tanabe, Keigo Ueno, Hironobu Nakayama, Toshihiro Aoyama, Hiroji Chibana, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Takahiro Oura, Hideaki Ohno, Susumu Kajiwara, Yoshitsugu Miyazaki. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter *Aus1p*, is regulated by iron limitation. *Molecular Microbiology*. 、査読有、 88: 371-381, 2013. DOI: 10.1111/mmi.12189.

Hideaki Ohno, Koichi Tanabe, Takashi Umeyama, Yukihiko Kaneko, Satoshi Yamagoe, Yoshitsugu Miyazaki. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 、査読有、 19: 999-1003, 2013. DOI: 10.1007/s10156-013-0548-2.

Keigo Ueno, Akiko Okawara, Satoshi Yamagoe, Takashi Naka, Takashi

Umeyama, Yuki Utena-Abe, Norihito Tarumoto, Masakazu Niimi, Hideaki Ohno, Matsumi Doe, Nagatoshi Fujiwara, Yuki Kinjo, Yoshitsugu Miyazaki. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Medical Mycology*. 、査読有、 51: 385-395, 2013. DOI: 10.3109/13693786.2012.733892.

Minoru Nagi, Koichi Tanabe, Hironobu Nakayama, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Takahiro Oura, Hideaki Ohno, Susumu Kajiwara, Yoshitsugu Miyazaki. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 、査読有、 . 19: 138-143, 2013. DOI: 10.1007/s10156-012-0531-3.

Tomo Mihara, Koichi Izumikawa, Hiroshi Kakeya, Popchai Ngamskulrungraj, Takashi Umeyama, Takahiro Takazono, Masato Tashiro, Shigeki Nakamura, Yoshifumi Imamura, Taiga Miyazaki, Hideaki Ohno, Yoshihiro Yamamoto, Katsunori Yanagihara, Yoshitsugu Miyazaki, Shigeru Kohno. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Medical Mycology*. 、査読有、 51: 252-260, 2013. DOI: 10.3109/13693786.2012.708883.

Norihito Tarumoto, Keisuke Sujino, Toshiyuki Yamaguchi, Takashi Umeyama, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki, Shigefumi Maesaki. First Report of *Rothia aeria* Endocarditis Complicated by Cerebral Hemorrhage. *Internal Medicine*. 、査読有、 51: 3295-3299, 2012. DOI: 10.2169/internalmedicine.51.7946.

[学会発表](計 件)

梅山 隆、山越 智、田辺公一、名木稔、大野秀明、宮崎義継、アスペルギルスの抗真菌薬耐性、第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会、11 月 1-2 日、2014、横浜

梅山 隆、大野秀明、田辺公一、山越 智、

名木稔、宮崎義継、症例から学ぶ感染症セミナー—ム—コル症の真菌同定検査、第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会、6 月 18-20 日、2014、福岡

梅山 隆、山越 智、田辺公一、名木稔、金子幸弘、金城雄樹、大野秀明、宮崎義継、病原糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の Polo-like キナーゼ遺伝子破壊株の菌糸成長・分生子形成・抗真菌薬感受性への影響、第 88 回日本感染症学会学術講演会・第 62 回日本化学療法学会総会合同学会、6 月 18-20 日、2014、福岡
梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、壇辻百合香、中山靖子、荒岡秀樹、高野淳一郎、中島由紀子、大川原明子、山越 智、名木稔、上野圭吾、金城雄樹、大野秀明、宮崎義継、国立感染症研究所の真菌同定検査の取り組みと培養陰性で遺伝子検査で同定できた 4 症例、第 25 回日本臨床微生物学会総会、2 月 1-2 日、2014、名古屋

梅山 隆、山越 智、田辺公一、名木稔、金子幸弘、金城雄樹、大野秀明、宮崎義継、*Aspergillus fumigatus* の Polo-like キナーゼは菌糸伸長と分生子形成を制御している、第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、9 月 27-28 日、2013、東京。

Takashi Umeyama, Satoshi Yamagoe, Koichi Tanabe, Minoru Nagi, Yukihiro Kaneko, Yuki Kinjo, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki, Mps1 kinase is required for normal nuclear segregation in *Aspergillus fumigatus*. 2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology, June 19-23, 2013, Chengdu, China."

梅山 隆、山越 智、田辺公一、大

野 秀明、 宮崎義継、 *Aspergillus fumigatus* の肺胞上皮細胞への接着と侵入機構、第 33 回関東医真菌懇話会学術集会、5 月 2012、東京、

梅山 隆、 山越 智、 田辺公一、 大野秀明、 宮崎義継、 *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害による病原性制御、第 60 回日本化学療法学会学術集会、4 月 2012、長崎、

梅山 隆、 山越 智、 田辺公一、 大野秀明、 宮崎義継、 侵襲性肺アスペルギルス症の主要原因菌 *Aspergillus fumigatus* による肺胞上皮細胞への接着と侵入、第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会、4 月 2012、長崎、

〔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・真菌部・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