

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460519

研究課題名(和文)日和見感染性真菌カンジダグラブラータの侵襲感染メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the invasive infection mechanism of the opportunistic infectious fungus *Candida glabrata*

研究代表者

知花 博治 (CHIBANA, HIROJI)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：30333488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、東北大学倉田研究室と共同研究を行い、カンジダ・グラブラータの網羅的組換え体ライブラリーの中から、ショウジョウバエの殺傷力を大きく低下させた菌株をスクリーニングした。その中から10菌株について着目し、カイコ幼虫を用いた感染実験を進めたところ、特に殺傷力が低下したA,B各遺伝子欠損した2株を特定することができた。A遺伝子がコードするタンパク質は細胞膜上に局在し、特殊な膜構造維持に必要な因子であり、血清中の成分を同化するために必要な遺伝子であるということが示唆された。現在我々は、それらの結果をまとめ、論文投稿準備中である。また、B遺伝子については、病原性との関わりを解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：We have screened strains by which greatly reduced a virulence to the *Drosophila* from the comprehensive gene knockout library of the *Candida glabrata*, on the collaboration with Tohoku University Kurata's laboratory. After focused on the 10 strains from that, and pushing forward the infection experiments with the silkworm larva, We identified A and B gene defective strains respectively in which virulence particularly decreased. The protein which encoded by gene A was located on the cell membrane, and it was a factor necessary to maintain the cell membrane, and it was suggested to be a gene necessary to assimilate serum ingredient. We settle those results, and we are preparing publishing a paper. About the B gene, we are going to analyze a relation with the pathogenicity.

研究分野：医真菌学

キーワード：病原真菌 病原因子 薬剤標的

## 1. 研究開始当初の背景

病原性カンジダ菌は、腸管粘膜や、膣、泌尿器の粘膜に常在する真菌であるが、健常者では特に問題とはならない。しかし、臓器移植に伴う免疫抑制剤や癌患者への抗癌剤、抗生物質、ステロイドの長期投与、AIDS、高齢化などにより免疫力が低下し、易感染状態になった患者に対して重篤な日和見感染症を発症する。血流感染菌（細菌感染も含む）のうちカンジダは第4位（9%）に位置し（Shorr AF et al, Crit Care Med, 2007）、死亡者数は40万人/年に達している（Morgan J et al, Infect Control Hosp Epidemiol, 2005）。国内においても、カンジダ血症患者数は1万人、死亡者数は1,000～5,000人/年と推定され、生存者の予後も不良である（日本医真菌学会総会2016）。また、アルツハイマーにカンジダ等の真菌が関与することを強く支持する調査結果が報告されている（Pisa D et al, Nature, 2015）。さらに、川崎病は年間1万人の乳幼児で発症し、近年増加中であるが、その原因としてカンジダを示唆する結果が報告されており（Rodó X et al, PNAS USA, 2014）これまで原因不明とされていた疾患にカンジダが関係していることが分かりつつある。今後、国内の超高齢化社会において易感染患者の増加は不可避であり、カンジダを原因とする疾患は益々大きな問題になると予測されている。

カンジダ属の中で注目すべきは、カンジダ・グラブラータ(*Candida glabrata*)である。本菌種はカンジダ属の中で臨床的な分離頻度は、現在2番目であるが、致死率は40-50%とカンジダ種の中で最も高く（Nevitt and Thiele, PLoS Pathog, 2011）近年症例数が最も上昇し問題となっている（Pfaller MA et al, PLoS One, 2014）。その原因はカンジダ症の二大主要治療薬であるアゾールに対して自然耐性でありことと、エキノキャンディンに対する耐性株率が8%と高いためである。さらに内蔵真菌症では他に類がない耐性株の人から人への伝播が示唆されている（Vallabhaneni S et al, ASM microbe 2016）。しかし、これまでカンジダ・グラブラータの宿主への感染機構についての知見が少なく、現在、最も重要な研究対象である。一方でカンジダ・グラブラータは、研究材料としても使用する利点が多い。まず、他の病

原真菌が二倍体、異数体、多核体であることに対して、カンジダ・グラブラータは一倍体で、1細胞あたり1核であり、最も単純なゲノム構成である。そのため、病原真菌の中で最も高精度なゲノムシーケンス情報が提供されている。また、本菌種は、遺伝子重複が他の病原真菌に比べて少なく、全遺伝子数は5,223個であり、カンジダ・アルビカンスの6,400個やアスペルギルス・フミガタスの9,000個などと比較してコンパクトである。さらに倍加時間が60分と短く実験効率が高い。遺伝子操作も簡便で有り、1遺伝子操作が表現型へ反映されるため遺伝子機能解析も容易である。病原真菌の病原性大規模解析では、Johnson ADの研究室において、カンジダ・アルビカンスの2つの相同遺伝子欠損（null変異）組換え体が、674遺伝子（全遺伝子の11%）について作製されることにより、病原性に関する115遺伝子見出された（Noble SM et al, Nature genet, 2010）。また、クリプトコックス・ネオホルマンズの研究においては、Noble SMの研究室において、1,201（全遺伝子の18%）について欠損株（null変異）が作製され、病原性に関する40遺伝子が見出された（Liu OW et al, Cell, 2008）。アスペルギルス・フミガタスの研究における大規模組換え体の作製は、Roemer Tが行った抗真菌薬の標的となり得る54遺伝子（0.5%）の解析に限られている（Hu W et al, PLoS Patho, 2007）。カンジダ・グラブラータの研究においては、Kuchler Kが舵を取り、619（全遺伝子の12%）遺伝子について、欠損株（null変異）を作製したが、解析は抗真菌薬感受性に関する培地上での解析に留まっている（Schwarzmueller et al, PLoS Patho, 2014）。これら以外にも全遺伝子の20%を超えるようなカバー率の病原性解析を行った研究は未だなく、申請者らが作製した5,200遺伝子（全遺伝子の99.5%）に対する組換え体は、ゲノムワイドな病原性解析を可能にする世界初の組換え体コレクションである。

## 2. 研究の目的

カンジダの感染経路は、腸管粘膜に定着し、腸管粘膜の突破、血流浸入し全身感染へ移行すると考えられている。本研究計画では、カンジダ・グラブラータの組換え体コレクションを用いて血流感染の各プロセスに必要な

機能遺伝子をスクリーニングし、抽出した遺伝子の生理的機能を解析する。これにより、感染に關与する遺伝子群の個々の機能と各感染プロセスとの因果關係を明らかにし、抗真菌薬の開発に寄与する。

### 3. 研究の方法

カンジダ・グラブラータ全遺伝子組換え体ライブラリーは、約 3,500 の遺伝子欠損株と約 1,500 の遺伝子発現抑制株で構成されている。本研究では、遺伝子欠損株の中から生育への影響がないことを確認した約 2,000 の遺伝子欠損株を用いた。宿主のショウジョウバエは、カンジダ・グラブラータに対する感受性の高い Toll 経路の変異株を用いた。カイコは、5 令幼虫を用いた。血清培地は、貧栄養培地に牛血清 5%(v/v)を添加した。

### 4. 研究成果

我々は、東北大学倉田研究室と共同研究を行い、カンジダ・グラブラータ全遺伝子組換え体ライブラリーの中から培地上での生育状態が良好にも関わらず、ショウジョウバエの殺傷力を大きく低下させた菌株をスクリーニングした。その中から 10 菌株について着目し、カイコ幼虫を用いた感染実験を進めたところ、特に殺傷力が低下した A,B 各遺伝子欠損した 2 株を特定することができた。分子系統分類学的に近縁種であるサッカロマイセス・セレピシエでの情報より A 遺伝子がコードするタンパク質は細胞膜上に局在し、特殊な膜構造維持に必要な因子であることが報告されている。カンジダ・グラブラータの A 遺伝子欠損株は、富栄養培地での生育状況は野生株と比較して遜色は見られなかった。カンジダ・グラブラータは貧栄養（最少）培地では、生育が大きく低下するが、それに血清を添加すると生育状態が良好となる。しかし、A 遺伝子欠損株は、貧栄養培地に血清を添加しても、生育状態は不良のままであった。この結果より、A 遺伝子は、血清中の成分を同化するために必要な遺伝子であるということが推測された。現在我々は、その血清中の成分を明らかに、それらの結果をまとめ、論文投稿準備中である。また、B 遺伝子については、病原性との関わりを解析する予定である。A,B 両遺伝子がコードするたんぱく質は共に抗真菌薬の分子標的になり得ると考

えられ、今後の薬剤開発へ寄与することが期待できる。

### 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 8 件)

1. Bernardo RT, Cunha DV, Wang C, Pereira L, Silva S, Salazar SB, Schröder MS, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Aoyama T, Sá-Correia I, Azeredo J, Butler G, Mira NP. The CgHaa1-regulon mediates response and tolerance to acetic acid stress in the human pathogen *Candida glabrata*. *G3-Genes Genomes Genetics*. 5;7(1):1-18. 2017. 査読有
2. Pais P, Pires C, Costa C, Okamoto M, Chibana H, Teixeira MC. Membrane proteomics analysis of the *Candida glabrata* response to 5-flucytosine: unveiling the role and regulation of the drug efflux transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Frontiers in Microbiology*. 21;7:2045. 2016. 査読有
3. Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H: Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol* 25;1(6):16054. 2016. 査読有
4. Tanaka Y, Sasaki M, Ito F, Aoyama T, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Shibata N: *KRE5* Suppression Induces Cell Wall Stress and Alternative ER Stress Response Required for Maintaining Cell Wall Integrity in *Candida glabrata*. *PLoS One* 22;11(8):e0161371. 2016. 査読有
5. Yamaguchi M, Aoyama T, Yamada N, Chibana H: Quantitative measurement of hydrophilicity/hydrophobicity of the plasma-polymerized naphthalene film (Super Support Film) and other support films and grids in electron microscopy. *Microscopy (Oxf)* 65(5):444-450. 2016. 査読有
6. Yamaguchi M, Yamada H, Higuchi K,

- Yamamoto Y, Arai S, Murata K, Mori Y, Furukawa H, Uddin MS, Chibana H: High-voltage electron microscopy tomography and structure analysis of unique spiral bacteria from the deep sea. *Microscopy (Oxf)* 65(4):363-369. 2016. 査読有
7. Pais P, Costa C, Pires C, Shimizu K, Chibana H, Teixeira MC: Membrane Proteome-Wide Response to the Antifungal Drug Clotrimazole in *Candida glabrata*: Role of the Transcription Factor CgPdr1 and the Drug:H<sup>+</sup> Antiporters CgTpo1\_1 and CgTpo1\_2. *Mol Cell Proteomics* 15(1):57-72. 2016. 査読有
8. Costa C, Ponte A, Pais P, Santos R, Cavaleiro M, Yaguchi T, Chibana H, Teixeira MC : New Mechanisms of Flucytosine Resistance in *C. glabrata* Unveiled by a Chemogenomics Analysis in *S. cerevisiae*. *PLoS One* 12;10(8):e0135110. 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 知花博治: 病原性酵母 *Candida glabrata* を用いた病原性解明と抗真菌薬開発に向けた取り組み. マイコトキシン学会第 76 回大会、千葉市千葉大学亥鼻記念講堂. 2015. 招待講演.
2. 知花博治: *Candida glabrata* を用いた抗真菌薬標的タンパクと化合物のスクリーニング. 第 59 回日本医真菌学会総会、札幌市さっぽろ芸文館、2015 招待講演
3. Chibana H: The launch of *Candida glabrata* PATHOME project to understand all pathogenic factors, Guiyang Medical University, Guiyang, China. 2016. 招待講演
4. 知花博治: 病原性酵母カンジダ・グラブラータの体系的且つ網羅的遺伝子組換え体コレクションを用いた抗真菌薬の開発、微生物科学研究所講演会、東京都微生物科学研究所. 2016. 招待講演
5. Chibana H: Genome wide research understanding the pathogenicity and development of antifungal drugs in *Candida glabrata*. 14<sup>th</sup> International Congress on Yeasts, session Yeasts in Health Science, Awaji Yumebutai, Awaji. 2016. 招待講演
6. 知花博治: 病原性酵母カンジダ・グラブラータの体系的且つ網羅的遺伝子組換え体コレクションを用いた病原性研究と抗真菌薬の開発、東北大学薬学部、仙台市東北大学薬学部、2016. 招待講演
7. 知花博治: カンジダ・グラブラータの体系的且つ網羅的遺伝子組換え体コレクションを用いた病原性研究と抗真菌薬の開発、日本微生物資源学会第 23 回大会、千葉市千葉大学けやき会館. 2016. 招待講演
8. 知花博治: 病原性酵母カンジダ・グラブラータを用いた病原性の研究と抗真菌薬開発、慶応義塾大学医学部、東京都慶応義塾大学医学部、2016. 招待講演
9. 知花博治、高橋(中口)梓、佐藤美智代、渡辺亮、倉石貴透、倉田祥一郎、宇野潤: *Candida glabrata* の体系的且つ網羅的遺伝子組換え体を用いた病原性研究と抗真菌薬の開発. 関東医真菌懇話会. 2016. 東京都京王プラザホテル.
10. 知花博治、佐藤(岡本)美智代、高橋(中口)梓、宇野潤: *Candida glabrata* における全必須遺伝子の同定と千葉大学化合物ライブラリーを用いた抗真菌活性物質のスクリーニング. 日本医真菌学会総会. 2016. 東京都東京都産業貿易センター台東館.
11. 知花博治、渡辺亮、倉石貴透、高橋(中口)梓、笹本 要、中山浩伸、青山俊弘、倉田祥一郎: ショウジョウバエ感染系を用いた真菌病原性発現機構のゲノムワイド解析. 共同利用・共同研究拠点事業平成 27 年度成果報告会 2016. 東京都 東京大学医科学研究所.
12. 知花博治: カンジダ・グラブラータ全遺伝子組換え体を用いた病原性研究と抗真菌薬開発. 日本細菌学会総会シンポジウム. 2017. 宮城県仙台市仙台国際センター.
13. 高橋梓、森山裕充、知花博治: *Candida glabrata* 遺伝子欠損ライブラリーを用いた病原因子解析. 細菌学若手コロッセウム. 2017. 茨城県つくば市筑波山江戸屋.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

知花 博治 (CHIBANA, Hiroji)  
千葉大学・真菌医学研究センター・准教授  
研究者番号：30333488

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

倉田 祥一郎 (KURATA Shoichiro)  
東北大学・大学院薬学研究院・教授  
高橋梓 (TAKAHASHI Azusa)  
千葉大学・真菌医学研究センター・技術職員  
佐藤美智代 (SATO Michiyo)  
千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教