

平成28年度 共同利用・共同研究報告

2016 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 16-1

遺伝子サイレンシングと自然免疫反応のクロストーク機構の解析

程久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Molecular interaction between gene silencing and innate immune response

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年のトランスクリプトーム解析から、多くのタンパク質をコードしないノンコーディングRNAの存在が明らかになってきた。ノンコーディングRNAの中でもsmall interfering RNA (siRNA) やmicroRNA (miRNA) などの小分子二本鎖RNAは、RNAサイレンシングという塩基配列特異的な遺伝子抑制機構によって、広く多様な遺伝子機能を制御している。一方、ウイルスは、ほぼすべての生物に感染する病原体である。哺乳類細胞では、ウイルスなどの外来性RNAが侵入すると、米山らにより発見されたRIG-I like receptors (RLRs) と呼ばれるウイル

スセンサータンパク質が発現誘導される。RLRsはウイルスRNAを認識すると、インターフェロン誘導を伴う抗ウイルス反応を引き起こす。RLRsはRNAヘリカーゼタンパク質であり、RIG-I, MDA5, LGP2の3つが知られている。

RNAサイレンシングも抗ウイルス反応もともに二本鎖RNAによる機構であり、両経路はクロストークしている可能性が考えられる。我々は、特定の種類のウイルス感染により抗ウイルス反応が誘導されると、RNAサイレンシングにおける主要な因子であるTAR-RNA binding protein (TRBP) とLGP2が直接相互作用し、RNAサイレンシングを抑制することを見出し、現在、その詳細な分子機構を解析している。さらに、TRBPは限られたmiRNA群の機能を制御し、ゲノムワイドな遺伝子発現調節が起こると想定される。抗ウイルス反応は哺乳類に保存された機構であり、両経路のクロストーク機構を明らかにすることで、哺乳類特異的なウイルス感染に伴う生命現象の作用機序の解明に結びつくと期待できる。

なお、本研究成果の一部は、現在論文投稿中である。

学会発表

- 1) 高橋朋子, 中野悠子, 尾野本浩司, 小森千晶, 米山光俊, 程久美子
ヒト細胞における, RNAサイレンシングと抗ウイルス反応のクロストーク
Crosstalk mechanism between RNA silencing and antiviral response in human cells
第39回日本分子生物学会年会 (2016.11.30) 横浜
(優秀ポスター賞受賞)
- 2) Takahashi T., Nakano Y., Onomoto K., Komori C., Yoneyama M., Ui-Tei K
Mutual regulation between RNA silencing and anti-virus defense system.
Cell Symposia Functional RNAs (2016.11.7-8) Langham Place Hotel, Guangzhou, China

研究課題 '16-2

Dectin-1シグナル伝達系を標的にした新規難治性疼痛制御法の開発

栗原 崇

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体情報薬理学分野)

西城 忍・米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of a new treating strategy for intractable pain by controlling dectin-1 signaling pathway

Takashi Kurihara

(Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University)

Shinobu Saijyo, Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

C型レクチン受容体ファミリーに属するdectin-1は、自然免疫受容体として真菌感染等の防御に重要な役割を担っているが、慢性炎症や神経障害に伴う疼痛など、難治性疼痛発症との関連を検討した報告はなされていない。

申請者らはまず、dectin-1遺伝子欠損マウスを用い、後肢の機械的刺激に対する逃避閾値を測定したところ、野生型に比べ雌雄ともに有意な閾値低下(過敏行動)を示した。さらに、完全フロインドアジュバンド後肢皮下投与(遷延性炎症性疼痛モデル)、あるいは第4/第5脊髄神経結紮手術(末梢神経障害性疼痛モデル)を適用することで後肢の機械的刺激に対する逃避閾値に与える影響を検討したところ、野生型に比べ欠損マウスにおいては、両モデルとも逃避閾値のさらなる低下が誘発された。

そこでdectin-1作動薬として使用されるzymosan depleted (10~100 µg/ml)をアジュバント後肢皮下投与後72時間目、および末梢神経障害後5週間目に(共に野生型マウスに対して)、処置側後肢に皮下投与すると、有意な機械的閾値の上昇(すなわち、鎮痛効果)が観察された。しかし、zymosan depleted (100 µg/ml)を野生型正常マウスに同様に皮下投与しても、有意な機械的閾値の上昇は観察され

なかった。

以上の結果から、dectin-1は末梢感覚神経終末において皮膚感覚(機械)受容調節、すなわち、dectin-1刺激は機械的感覚を鈍麻させる方向に調節することが示唆された。

研究課題 '16-3

感染に応答した自然免疫誘導の分子機構の解析

藤田尚志

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

加藤博己

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Innate immune responses against pathogen infection

Takashi Fujita

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Hiroki Kato

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究では、高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において重要な役割を担うウイルス感染センサーであるRIG-I-like受容体(RLR)に着目し、それらによるウイルスRNA検知の分子機構と生理機能について継続して解析を行っている。特に近年は、細胞内ストレス顆粒(SG)の形成を介したRLR活性化の分子機構について解析しており、これまでにPumilioの機能解析など複数の報告を行ってきた(PLoS Pathogens, 2016, 2014; Curr Opin Immunol, 2015)。本年度は、SGに局在する新たなRNA結合タンパク質(RBP)の同定とそれについての機能解析を実施した。その結果、この新規RBPは、ウイ

ルス感染に応答してSGに局在すること、遺伝子破壊細胞においてRNAウイルス感染に応答したI型インターフェロン (IFN) 遺伝子誘導などの抗ウイルス応答が顕著に減弱していたこと、さらに強制発現した細胞ではI型IFN遺伝子の発現誘導が増強していたことなどから、この分子がSG局在を介して抗ウイルス自然免疫誘導を正に制御する因子であることが強く示唆された。さらにこの分子は、ウイルス非感染細胞でRLRの一つであるLGP2と構成的に会合していることを見出した。これまでにLGP2は抗ウイルスシグナル活性化をウイルス種の違いで正あるいは負の制御因子として機能することは報告されているものの、その分子メカニズムはほとんど明らかになっておらず、本研究から得られた知見は、新たなウイルス検知制御機構の一端を示唆している可能性がある。今後、この分子のノックアウトマウスの解析を通じて生理的な機能解析へとつなげる計画である。

学会発表

- 1) Narita R, Takahasi K, Murakami E, Hirano E, Yamamoto SP, Yoneyama M, Kato H, Fujita T. A novel function of human pumilio proteins innate immune responses. International Congress of Immunology, Aug. 21-26, 2016, Melbourne, Australia.

研究課題 '16-4

IL-17により制御される好中球依存性 *Candida albicans* 感染防御機構の解明

若林正一郎・岩澤真里・松岡悠美
(千葉大学大学院医学研究院皮膚科学)
西城 忍
(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of neutrophil-dependent protective mechanisms of *Candida albicans* regulated by IL-17.

Seiichiro Wakabayashi, Mari Iwasawa, Yuumi Nakamura
(Dermatology, Chiba University)
Shinobu Saijo
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ヒトの皮膚における感染防御機構においてTh17細胞が重要な役割を持つことが慢性皮膚粘膜カンジダ症などによって示されている。 *Il17af*^{-/-}マウスに *Candida albicans* を感染させると、野生型マウスと比較して感染の感受性が亢進することや、宿主の抗原提示細胞上に存在するDectin-1, Dectin-2が真菌細胞壁成分を認識することでTh17細胞の分化に必要なサイトカインを誘導することから、Th17型免疫応答が真菌感染防御に強く関わっていることが示唆されている。これまでに我々は野生型マウス、 *Il17af*^{-/-}マウスそれぞれの骨髄から分離した好中球と *C. albicans* の菌糸を共培養し、貪食・排除する機能に差があることを発見した。この結果に着目し、RNAシーケンスに基づいた遺伝子解析や、Live imagingによる *C. albicans* に対する好中球の反応について解析・検討を行った。

野生型マウス、 *Il17af*^{-/-}マウスの骨髄から分離した好中球についてRNAシーケンスを行い、両者間のmRNA発現を比較したが、明らかな有意差は見られなかった。好中球の認識機構 (*Dectin-1, 2*) や殺菌能 (*S100a7, 8, 9*) に関わる遺伝子の発現についてqPCRを用いて確認したが、やはり有意差は見られなかった。最後にそれぞれのマウスの好中球を *C. albicans* の酵母、菌糸と共培養しLive

imagingで解析した。どちらのマウスの好中球も酵母に対しては反応しなかったが、野生型マウスの好中球は菌糸に対して遊走、貪食し、菌糸の伸長を抑制した。対して *Il17af*^{-/-}マウスの好中球では遊走、貪食ができず、菌糸の伸長を抑制できなかったが、リコンビナントIL-17を添加することで野生型とほぼ同等の能力を獲得したことから、IL-17による直接制御であることが示唆された。今後、両マウスの好中球の蛋白発現レベルでの解析を予定している。

学会発表

- 1) 岩澤真理 IL-17による皮膚カンジダ排除機構
第60回日本医真菌学会総会・学術集会 シンポジウム12真菌感染防御と糖鎖認識(招待講演) 2017年10月2日東京都立産業貿易センター(東京)

研究課題 '16-5

真菌成分認識に関わる新たな自然免疫受容体の解析

河合太郎

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on innate immune responses to the fungal cell wall component

Taro Kawai

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

植物のキチン受容体の一つであるCERK1受容体のキチン認識モチーフであるLysine motif (LysM)と相同性を示すヒト及びマウスの蛋白質をデータベース検索から6種類見つけ出した。これらの中にはキチンに対する自然免疫応答を制御するものが含まれる可能性があることから、遺伝子欠損マウスの樹立を行うことを目的の一つ

として、本年度CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により、2種類について作製に成功した。現在キチン投与後の自然免疫応答について、肺胞洗浄液中の免疫細胞集積や炎症関連遺伝子の発現を中心に解析を行っている段階である。また、これら6種類の蛋白質については発現ベクターを構築し、HEK293細胞内へと過剰発現し、NF- κ BやIRFファミリーの活性化誘導をレポーターアッセイにより検討したが、有為な上昇は認められなかった。今後、リガンド刺激後の活性化に影響を与えるか検討が必要である。さらに、キチン粒子とこれら遺伝子を発現する細胞の可溶化物を混合し、キチンとこれらファミリー分子との結合を検討したところ、3つの分子についてLysMドメイン依存的なキチンとの結合を認めた。今後、これら3つを中心に、遺伝子欠損マウスを用いてさらに解析を継続していく。

関連論文

- 1) Kawasaki T, Ito K, Miyata H, Akira S, Kawai T. Deletion of PIKfyve alters alveolar macrophage populations and exacerbates allergic inflammation in mice. *EMBO J.* 2017 May 22. pii: e201695528. doi: 10.15252/embj.201695528.
- 2) Ori D, Murase M, Kawai T. Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation. *Int Rev Immunol.* 2017 Mar 4; 36(2): 74-88.
- 3) Kitai Y, Kawasaki T, Sueyoshi T, Kobiyama K, Ishii KJ, Zou J, Akira S, Matsuda T, Kawai T. DNA-containing exosomes derived from cancer cells treated with Topotecan activate a STING-dependent pathway and reinforce antitumor immunity. *J Immunol.* 2017 Feb 15; 198(4): 1649-1659.

研究課題 '16-6

ショウジョウバエを用いた真菌病原性発現機構と宿主自然免疫応答の解析

倉田祥一郎

(東北大学大学院薬学研究科)

知花博治・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of fungal virulence mechanism and host innate immune responses using *Drosophila*

Shoichiro Kurata

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Hiroji Chibana, Azusa Takahashi-Nakaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

日和見感染症に代表される感染症を引き起こす病原真菌の病原性発現機構は、依然として不明であり、大きな脅威となっている。真菌医学研究センター知花准教授は、*Candida glabrata*を用いて、5,150遺伝子を組換えた変異体ライブラリーを作成している。このリソースを用いると、病原性の発現に関わる遺伝子をゲノムワイドに探索できる。しかしながら、マウスなどの哺乳動物を宿主として用いて網羅的に解析することは、現実的に不可能である。一方、自然免疫研究によく利用されているショウジョウバエは、生活環が短く網羅的に解析に優れている。そこで、本研究では、センターの有する真菌のリソースを利用した、ショウジョウバエでの解析から病原真菌の病原性発現機構の解明と新たな抗真菌薬の標的に迫ることとした。

そのために、平成26年度に確立したショウジョウバエ網羅的感染実験系を用いて（採択番号14-11）、平成27年度に通常の培養条件では生育に必須ではない遺伝子を欠損した変異体2,026系統を解析し、病原性が低下した系統を57系統同定した（採択番号15-13）。今年度は、これらの病原性が低下した系統の宿主体内での増殖を調べた。宿主体内での増殖能が低下していた11系統では、二つのアデニン合成酵素とそれらの遺伝子発現を制御する転写因子、二つの葉酸合成酵素、ウラシル合成酵素、チロシン合成酵素、二つのミトコンドリア関連タンパク質、

SNAREタンパク質、ヒストン結合タンパク質が欠損していた。葉酸合成経路は、抗真菌作用を示すサルファ剤の作用点として知られている。したがって、ショウジョウバエでの網羅的感染実験系を用いて同定した宿主体内での増殖能が低下する系統を調べることで、新たな抗真菌剤の標的が同定できる可能性を指摘できた。

学会発表

- 1) 知花博治, 高橋(中口)梓, 佐藤(岡本)美智代, 渡辺 亮, 倉石貴透, 倉田祥一郎, 宇野 潤: *Candida glabrata*の体系的全遺伝子組換えを用いた病原性と抗真菌薬の研究. 東京, 2016年10月

研究課題 '16-7

*Candida glabrata*細胞壁構築関連遺伝子欠損が菌体の性質に及ぼす影響

柴田信之・佐々木雅人・伊藤文恵・田中 大

(東北医科薬科大学)

知花博治・山口正規・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of the mutant set involving the cell wall integrity of *Candida glabrata*

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Ito,

Yutaka Tanaka

(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana, Masaki Yamaguchi, Susumu

Kawamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原性酵母 *Candida glabrata* の細胞壁は、複数種の多糖から成る多層構造を形成しており、それぞれヒト病原性あるいは薬剤ストレス抵抗性に関わる分子である。近年、*C. glabrata* において、環境ストレス応答をきっかけに生じる細胞壁のヘテロ再構築が、既存の抗真菌薬耐性や致死的な環境ストレスに対して有利に働くことが相次いで報告された。このことは、細胞壁構造最適化 (Cell Wall Integrity: CWI) の仕組みと病原性・抗真菌薬耐性との

あいだに密接な関わりがあることを示唆している。今回我々は、*C. glabrata* CBS 138株の全遺伝子について作製した変異株ライブラリを用いて、特に①小胞体-ゴルジ体局在型糖転移酵素をコードする遺伝子、②糖タンパク質の品質管理に関わるシャペロン群あるいはストレス耐性遺伝子の欠損株を中心に、細胞壁糖鎖構造構築と環境ストレス応答能、およびCWIに及ぼす影響を解析した。

*KRE5*および*CNE1*は小胞体局在するタンパク質であるkre5pおよびcne1pをそれぞれコードしており、糖タンパク質品質管理を担うカルネキシンシャペロンサイクルを形成している。*KRE5*遺伝子の発現抑制株、および*CNE1*遺伝子欠損株の細胞壁を解析した結果、いずれの株においても、 β 1-6グルカン含量の減少と、細胞壁キチン含量の増加が認められた。このとき、小胞体ストレスマーカーである*KAR2*や*BAG7*のmRNA転写活性化も同時に認められた。興味深いことに、カルシニューリン阻害剤FK-506で処理したところ、これら変異株における細胞壁キチン含量はさらに増大し、かつCWIを司るMAPキナーゼであるSlt2pのリン酸化が極端に亢進することがわかった。加えて、各変異株は野生株に比べて（生育は遅いものの）細胞死はほとんど見られなかったのに対し、FK-506を処理した変異株は細胞周期の停止および細胞死と異形細胞凝集像が観察された。以上のことから、①*KRE5*や*CNE1*の変異によりCWIが誘導されるとともに小胞体ストレスが惹起されること、②カルシニューリン経路を介した小胞体ストレス応答を阻害することで、深刻な細胞壁ダメージと細胞死をもたらすことが明らかになった。これらのことは、カルシニューリン経路を介した小胞体ストレス応答が、CWI誘導を調節する因子として機能している可能性を示唆している。現在、小胞体糖タンパク質品質管理に関わる他の遺伝子、あるいはゴルジ体や分泌経路に関わる遺伝子の欠損株についても同様に解析を実施しており、小胞体ストレス応答とCWIとの関連をより詳細に調べていく予定である。

発表論文

- 1) Yutaka Tanaka, Masato Sasaki, Fumie Ito, Toshio Aoyama, Michiyo Sato-Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Nobuyuki Shibata: KRE5 Suppression Induces Cell Wall Stress and Alternative ER Stress Response Required for Maintaining Cell Wall Integrity in *Candida glabrata*, *PLOS ONE*, pone. 0161371

- 2) Yutaka Tanaka, Masato Sasaki, Fumie Ito, Toshio Aoyama, Michiyo Sato-Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Nobuyuki Shibata: Cooperation between ER stress and calcineurin signaling requires maintaining the cell wall integrity in *Candida glabrata*, *Fungal Biology* (Under review)
- 3) Fumie Itoh, Shizuka Takahashi, Yutaka Tanaka, Atsushi Kudoh, Masato Sasaki, Michiyo Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Masashi Yamaguchi, Kazuyoshi Kawakami, Hiroji Chibana and Nobuyuki Shibata: Glycosyltransferase Alg6 is required for cell wall integrity and virulence of *Candida glabrata*, *FEBS Journal* (Under review)

学会発表

- 1) 伊藤文恵, 田中 大, 佐々木雅人, 工藤 敦, 高橋 梓, 山口正規, 知花博治, 柴田信之, *Candida glabrata* 糖鎖合成酵素関連遺伝子欠損株alg6 Δ の性質, 日本医真菌学会, 東京, 2016年10月
- 2) 伊藤文恵, 高橋静香, 田中 大, 工藤 敦, 佐々木雅人, 岡本美智代, 高橋 梓, 山口正規, 山本秀輝, 丹野大樹, 横山 隣, 川上和義, 知花博治, 柴田信之, *Candida glabrata* 細胞壁糖鎖合成酵素遺伝子欠損株alg6 Δ 及びmnn2 Δ の性質, 日本薬学会, 仙台, 2017年3月

薬剤標的開発を目指したパン酵母とカンジダ・グラブラータの生育必須遺伝子多様性解析

Aiming drug targets development, analysis of gene diversity for growth essential between the baker's yeast and the *Candida glabrata*

Erwin Lamping

(Sir John Walsh Research Institute, University of Otago, New Zealand)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

実験モデル生物のパン酵母では、遺伝学的解析により生育に必須な遺伝子が約1,200同定されており、抗真菌薬の標的開発の際に極めて重要な情報源となっているが、真菌医学研究センターの知花らがカンジダ・グラブラータの相同遺伝子について解析を行ったところ、パン酵母では生育に必須でありながら、カンジダ・グラブラータでは必須ではない、またその逆のケースがそれぞれ約200遺伝子存在することが示唆された。パン酵母とカンジダ・グラブラータにおける生育必須遺伝子の多様化について、遺伝子重複の相違について比較したところ、約3割の遺伝子について遺伝子重複の相違点が示された。残る7割の遺伝子の多様性の原因については、現在検討中である。今後、カンジダ・グラブラータにおける生育必須遺伝子情報が加味されることによって効率的な抗真菌薬標的開発を進めていくことが期待できる。

学会発表

- 1) 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

Antifungal drug resistance in *Candida glabrata* from transcriptional control to drug extrusion: aiming improved diagnosis and therapeutics

Miguel C Teixeira

(Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico/Bioengineering Department)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

深在性真菌症適応薬の一つである5-FC (5-flucytosine) は、他の抗真菌薬と比較し耐性株の出現率が高いが、その耐性化機序については、明らかにされていない。今回、病原真菌カンジダ・グラブラータに対して5-FCに暴露によるiTRAQ (タンパク質の網羅的解析) のアプローチを使用した細胞膜プロテオーム解析を実施した。その結果、細胞壁構成成分、脂質代謝、アミノ酸とヌクレオチド代謝、リボゾーム成分、ミトコンドリア機能、糖代謝、薬剤排出など、合計32のタンパク質に顕著な発現量の変化が確認された。これらのタンパク質の中から特に薬剤耐性との関連が示唆されたプロトンアンチポーターCgFlr1並びにCgFlr2に着目した。これら遺伝子の欠損株では、5-FCの細胞内蓄積が増加していることが示された。このことから、CgFlr1並びにCgFlr2は5-FCを細胞外へ排出する機能を有していると考えられた。したがって、プロトンアンチポーターCgFlr1並びにCgFlr2の活性を阻害する薬剤の開発によって、5-FCの薬効を増強もしくは耐性菌の出現を抑制することが期待できる。

発表論文

- 1) 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. 12.

研究課題 '16-10

千葉大学が保有するオリジナル化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬シーズの開発

荒井孝義

(千葉大学大学院理学研究科)

知花博治・宇野 潤・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of the antifungal seeds from the original compound library in Chiba University

Takayoshi Arai

(Graduate School of Science, Chiba University)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Jun Uno

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

当研究室が保有する1,000種類のオリジナル合成化合物のうち、平成26年度は450種類、平成27年度は、残る550種類の化合物について *Candida glabrata* を用いて生育阻害活性物質の一次スクリーニングを終了した。その結果、6種類の化合物について *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* 等の主要な病原真菌に対して生育阻害活性が確認された。次にこれらの化合物について、マウスの培養細胞を用いて呼吸阻害活性を指標とした細胞毒性を測定したところ、5種類の化合物に細胞毒性が確認されず、抗真菌薬「シーズ候補」とした。これらの実績に基づき、製薬企業との共同研究を開始することができた。さらに、AMEDの創薬総合支援事業「創薬ブースター」に申請中である。平成29年度はこれまでと同様に、シーズ候補のスクリーニングを進めると共に、化合物の作用機序の解明に取り組んで行くことにした。

学会発表

- 1) 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

研究課題 '16-11

病原真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

高木博史

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

知花博治・高橋 梓・宇野 潤・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of synthetic regulatory mechanism and physiological function of nitric oxide in pathogenic fungus

Hiroshi Takagi

(Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

Hiroji Chibana, Azusa Takahashi, Jun Uno, Susumu Kawamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

一酸化窒素 (NO) はシグナル分子として、哺乳類の幅広い生命現象に関与している。高木らは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NOがアセチルトランスフェラーゼ Mpr1およびフラボタンパク質 Tah18 依存的にアルギニンから合成され、酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。また、Tah18と複合体を形成する Dre2 タンパク質が酸化ストレスセンサーとして働き、Tah18 依存的な NO 合成を制御する機構を提唱した。一方、病原真菌はヒトに感染する際、温度・低酸素などのストレスに応答して耐性を獲得し、病原性を示すことから、NO がストレス耐性や病原性に関与する可能性がある。

本研究では、*S. cerevisiae* と同様の NO 合成経路の存在が示唆される病原真菌 (*Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) について、NO と増殖・感染・病原性との関連性を解析する。平成28年度には、以下の研究成果が得られた。

1) *C. glabrata*: カイコ幼虫のテトラサイクリン転写抑制系を用いて、NO代謝との関連が予想される *S. cerevisiae* の遺伝子 (*DRE2*, *YHB1*, *SFA1*, *NCP1*, *MET10*, *CYT1*, *COX9*, *YNO1*, *RIB1*など) のオルソログ遺伝子についてカイコ感染実験を行った。その結果、生育に必須とされる遺伝子については、転写を抑制すると感染性が低下していたことから、NO代謝(合成・分解など)との関連性が明確な遺伝子は見出せなかった。

2) *C. neoformans*: アルギニン代謝系に着目し、各酵素(Mpr1, Arg7, Car1, Car2など)のオルソログ遺伝子の破壊株を用い、NO産生量、アルギニン含量、各種ストレスに対する表現型などの解析を試みている。

3) *A. fumigatus*: NOドナー(SNAP)を添加した際のトランスクリプトーム解析をRNA-seqによって行った。その結果、*S. cerevisiae*で見出された銅代謝(銅イオンの還元、取込みなど)や酸化ストレス応答に関与する遺伝子の発現には影響がなかったが、オルニチンから合成されるシデロフォア(鉄キレート物質)の合成系遺伝子の発現が低下していた。一方で、NOにより *A. fumigatus* の病原性に関与する二次代謝が活性化される可能性が示された(糸状菌では報告例なし)。

発表論文以外の特筆すべき成果

高木らは、これまでに発芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) および分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) で得られた研究成果を中心に、下記の総説を執筆した。今後、病原真菌におけるNOの生理的役割を解析する上で有益な情報となる。

1) Rika Indri Astuti*, Ryo Nasuno*, Hiroshi Takagi: Nitric oxide signaling in yeast.

*These authors contributed equally to this work. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 100, 9483-9497 (2016).

2) 高木博史: 酵母における一酸化窒素の分子機能と応用. *バイオサイエンスとインダストリー*, 75, 214-218 (2017).

3) 那須野亮, 吉川雄樹, 高木博史: 酵母に見出した一酸化窒素(NO)の合成制御機構と生理機能. *化学と生物*, 印刷中.

研究費の取得

基盤研究(A), H27-29. 真菌における一酸化窒素の合成制御機構と生理機能の解明

研究代表者: 高木博史

研究分担者: 渡辺大輔, 那須野亮, 知花博治, 川本 進, 萩原大祐.

研究課題 '16-12

Aspergillus fumigatus の病原性におけるガラクトフラノース糖鎖の機能解析

岡 拓二

(崇城大学・応用微生物工学科)

田中 大・柴田信之

(東北薬科大学・感染生体防御学研究室)

亀井克彦・渡辺 哲・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Functional analysis of galactofuranose-containing oligosaccharides in the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*

Takuji Oka

(Department of Applied Microbial Technology, Sojo University)

Yutaka Tanaka, Nobuyuki Shibata

(Department of Infection and Host Defense, Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Daisuke

Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* 由来の GfsA に関する機能解析を進め、本酵素が β 1,5-ガラクトフラノース (Gal_f) 転移酵素であることを示す確固たる証拠を得た。pNP- β - Gal_f と大腸菌を用いて発現および精製した組換え GfsA を UDP- Gal_f とともに反応させることで新規に合成された化合物 A を精製し、LC-MS, $^1\text{H-NMR}$ およびメチル化分析に供した。その結果、化合物 A の構造は $\text{Gal}_f\beta$ 1,5 Gal_f - β -pNP であった。以上より、GfsA は、UDP- Gal_f : β 1,5-ガラクトフラノース転移酵素であることが明らかになった。一方で、*gfsA* 破壊株より抽出した真菌型ガラクトマンナンの構造を $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ およびメ

チル化分析によって解析したところ, *gfsA*破壊株では, 真菌型ガラクトマンナン中のGal₇β1,5-Gal₇結合が顕著に減少していることが示された. これは, GfsAが真菌型ガラクトマンナン中のGal₇β1,5-Gal₇結合の生合成を担っていることを示す初めての証拠となった. さらに, パラログであるGfsCの解析についても進めた結果, GfsAとGfsCの二重破壊株では真菌型ガラクトマンナン中のGal₇β1,5-Gal₇結合が全て消失することを明らかにした. すなわち, GfsAとGfsCが協調的にはたらくことで*A. fumigatus*内のGal₇β1,5-Gal₇結合を生合成していることを明らかにすることができた. さらに, *gfsC*破壊株, *gfsAC*破壊株についてマウスを用いた病原性試験を実施した. その結果, *gfsC*破壊株や*gfsAC*破壊株の病原性は親株と比較して有意に差は認められなかった.

発表論文

- 1) Katafuchi Y, Li Q, Tanaka Y, Shinozuka S, Kawamitsu Y, Izumi M, Ekino K, Mizuki K, Takegawa K, Shibata N, Goto M, Nomura Y, Ohta K, Oka T: GfsA is a β1,5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 27: 568-581, 2017

研究課題'16-13

アスペルギルス症原因菌が産生する環状ペプチドの宿主免疫応答反応への影響

梅村舞子

(産業技術総合研究所)

亀井克彦・渡辺 哲・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Effect of cyclic peptides produced by pathogenic *Aspergillus* species on host immune response

Maiko Umemura

(National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Daisuke

Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アスペルギルス症の原因菌である糸状菌 *Aspergillus flavus* において, 近年, 強い微小管重合阻害活性を有する環状ペプチド *ustiloxin* の産生が申請者らによって見出された. 微小管重合は宿主のインフラマソーム形成に必須なため, 本化合物が宿主の正常な免疫反応を抑制する可能性が高い. そこで本研究では, *ustiloxin* と同種の経路 (*ust-RiPS* 経路) で生合成される環状ペプチドが本菌の新規病原因子として機能するかを, 当該経路遺伝子破壊株を用いた動物細胞感染実験等から検証した.

Aspergillus fumigatus Af293 株は, *ust-RiPS* 経路における前駆体ペプチドと考えられる遺伝子を2つ保有する (*rps1a* および *rps2a* と呼称). 前実験では, これら2つの遺伝子は YGMM 培地上でアクチン比3~7倍と高発現していた. そこでこれらをそれぞれ欠失させた遺伝子破壊株 $\Delta rps1a$ および $\Delta rps2a$ を用いて, Transwell システムによるヒト肺上皮細胞 (Calu-3) への侵入試験, ヒト肺上皮細胞 (A549) を用いた細胞障害性試験, コルチコステロイド免疫抑制マウスおよび好中球減少マウスに対する感染実験等を行った. 結果, $\Delta rps2a$ 株において, 細胞侵入活性が有意に低く, またマウス肺内増殖率が低い傾向が見られた (Umemura et al., 7th Advances Against Aspergillosis

(2016, Manchester, UK)にて発表). このように本研究では, *A. fumigatus*においてust-RiPS経路が新規病原因子として機能している可能性が示唆された. 今後は結果をまとめるとともに, *A. fumigatus*に比べてより多くのust-RiPS経路を保有する*A. flavus*を用いて, 同様に同経路の病原性への影響を調べる予定である.

発表論文

- 1) Myco Umemura, Nozomi Nagano, Daisuke Hagiwara, Lea Gregson, Margherita Bertuzzi, Elaine Bignell, “Effect of *A. fumigatus* RiPS precursor-like genes in pH response and pathogenicity”, *Proceedings of the 7th Advances Against Aspergillosis*, pp.80, 2016.

研究課題 '16-14

アスペルギルスのバイオフィーム形成および抗真菌薬耐性に関連する新規遺伝子群の探索

梅山 隆

(国立感染症研究所)

宮崎義継

(国立感染症研究所)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Screening of novel genes involved in biofilm formation and antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*

Takashi Umeyama

(National Institute of Infectious Diseases)

Yoshitsugu Miyazaki

(National Institute of Infectious Diseases)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

深在性真菌症の中でも *Aspergillus fumigatus* を主要病原菌とするアスペルギルス症は増加傾向にあり, 予後が非常に悪い. 近年, アスペルギルスのバイオフィーム形成がアスペルギルス感染に関与することが示唆されている.

特にアスペルギローマ (菌球) の菌糸塊に見られる菌糸周囲には厚い細胞外マトリクスが観察されている. このようなバイオフィームを形成する状態では, いくつかの抗真菌薬に対する感受性が低下する現象が示され, 難治性の原因の1つになっていると考えられる. しかしながら, バイオフィーム形成, および, それによる抗真菌薬耐性の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い. 本研究では, バイオフィーム形成に関わる新規遺伝子を同定し, 抗真菌薬耐性との関連性を明らかにすることを目的とする. 平成28年度では, Cas9/CRISPRゲノム編集技術を*A. fumigatus*に応用し, 血清存在下での生育に必須な遺伝子群の探索を行った.

幅広い生物種で用いられているCas9/CRISPRゲノム編集技術を*A. fumigatus*で利用可能にし, 遺伝子スクリーニングを行った. ランダムな20塩基を含むsgRNAとCas9蛋白質を導入するためのプラスミドライブラリを大腸菌において作製した. *A. fumigatus*にプラスミドライブラリDNAを形質転換し, 形質転換体の分生子ライブラリを得た. 変異が導入されると予想される分生子ライブラリを血清存在下・非存在下で培養し, DNAを抽出後, PCRにより増幅した20塩基の配列を次世代シーケンサーにより解析を行い, 血清存在下でコピー数が減少している配列から候補遺伝子を26種類抽出できた. これらの26種類の遺伝子は, 血清存在下での生育に必須であることが予想され, 今後, 個々の遺伝子についての解析を行うことにより, 血清刺激に応答する新しい遺伝子群を同定したい.

発表論文・学会発表

- 1) 犬飼達也, 梅山 隆, 山越 智, 中村茂樹, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* のバイオフィーム形成と抗真菌薬感受性に関与する真菌側因子の制御に向けた検討. 第64回日本化学療法学会総会. 6月9日-11日, 2016年, 神戸.
- 2) 梅山 隆, 壇辻百合香, 犬飼達也, 中村茂樹, 山越 智, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継. 次世代シーケンサーを用いた *Aspergillus fumigatus* 近縁種の網羅的ゲノム解析による抗真菌薬耐性の原因解明. 第64回日本化学療法学会総会. 6月9日-11日, 2016年, 神戸.
- 3) 犬飼達也, 梅山 隆, 山越 智, 青山俊弘, 中山浩伸, 名木 稔, 田辺公一, 中村茂樹, 宮崎義継, *Aspergillus fumigatus* の血清存在下における菌糸生育に

関連する因子の同定, 第60回日本医真菌学会総会・学術集会, 10月1-2日, 2016, 東京.

- 4) 梅山 隆, 犬飼達也, 山越 智, 名木 稔, 中村茂樹, 宮崎義継, 今話題のアスペルギルス基礎研究は?, 第60回日本医真菌学会総会・学術集会, 10月1-2日, 2016, 東京.
- 5) 犬飼達也, 梅山 隆, 山越 智, 中村茂樹, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, *Aspergillus fumigatus* の血清存在下でのバイオフィルム形成に関与する真菌側因子の制御に向けた検討, 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第63回日本化学療法学会東日本支部総会, 10月26-28日, 2016, 新潟.
- 6) 梅山 隆, 壇辻百合香, 犬飼達也, 中村茂樹, 山越 智, 名木 稔, 田辺公一, 大野秀明, 宮崎義継, *Aspergillus fumigatus* 隠蔽種のNGS解析による抗真菌薬耐性の原因解明, 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第63回日本化学療法学会東日本支部総会, 10月26-28日, 2016, 新潟.

研究課題 '16-15

Aspergillus fumigatus リボソーム標的薬剤耐性株における二次代謝活性化機構の解明

浅井禎吾

(東京大学大学院総合文化研究科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Activation of secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus* strains with resistance to ribosome-targeting chemicals

Teigo Asai

(Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

化学変異源の種類や濃度, 処理時間などを検討することで, *Aspergillus fumigatus* のハイグロマイシンB耐性株を作製した. その中に顕著に二次代謝が活性化した変異株を数多く見出した. 活性化される二次代謝物は変異株ごとにいくつかのタイプが存在することも見出した. 二次代謝活性化のタイプ毎に, それぞれ2から3株ずつピクアップし, 次世代シーケンサーを用いて二次代謝活性化変異株と野生株のmRNAを網羅的に比較解析した. 現在詳細な解析中である. また, それら変異株についてゲ

ノムシーケンスを行った。当初の予想よりはるかに多くの変異が導入されていたが、株間に共通する変異を指標に探索を行うことで、いくつかの候補遺伝子を見出した。現在、これらの変異について、野生株に一塩基変異の導入もしくは変異型タンパク質の過剰発現により、二次代謝活性化やハイグロマイシンB耐性に関わる変異の特定を目指している。以上のように、二次代謝が活性された *Aspergillus fumigatus* のハイグロマイシンB耐性株を作成することに成功し、また次世代シーケンサーを用いて、二次代謝活性化型変異株と野生株の網羅的な発現比較や変異株のゲノムシーケンスなど、メカニズム解明への基礎的な知見を得る事ができた。

研究課題 '16-16

臨床分離 *Aspergillus flavus* の新規二次代謝産物生合成クラスター構成遺伝子の発現解析

豊留孝仁

(帯広畜産大学)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Transcriptome analysis of a novel secondary metabolite biosynthesis cluster in a clinical isolate of *Aspergillus flavus*

Takahito Toyotome

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Aspergillus flavus はアスペルギルス症の重要な原因菌種の一つであるが、いまだ十分な知見が積み上げられていない。我々はこれまでに10株の臨床分離 *A. flavus* のドラフトゲノム解析を行った。その結果、これまでに *A. flavus* や *A. oryzae* で報告のない新たな構成の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの存在を10株中3株で見いだした。ゲノム解析株である *A. flavus* NRRL3357や *A. oryzae* RIB40には認められない配列が存在し、この領域には一つの転写

産物が予測されていた。そこで、本クラスターのユニークな領域での転写産物を明らかとすることを目的として、このクラスターを持つ *A. flavus* IFM58503株のトランスクリプトーム解析を行った。

トランスクリプトーム解析の結果、予測どおり新規転写産物が確認され、新たな構成を持って機能しているクラスターと強く推測された。この遺伝子は Ankyrin repeat を持つタンパク質をコードしていた。他の *Aspergillus* 種である *A. parasiticus* や *A. bombycis* の遺伝子が相同性の高い遺伝子として見いだされてきたが、これらの相同性も50%以下に留まっていた。このデータを含めて、現在論文投稿の最終段階にある。関連する報告をこれまでにマイコトキシン国際シンポジウム ISMYCO2016などで共同発表してきており、本成果も今後のマイコトキシン学会で発表予定である。また、今後の詳細な解析により、この菌株により産生される新たな二次代謝産物の発見につなげていきたいと考えている。

さらに、本研究の成果としては *A. flavus* IFM58503株の網羅的なトランスクリプトームデータが得られている。詳細に検討することによって他の IFM58503株ユニークな領域の遺伝子発現のみならず、*A. flavus* に共通する遺伝子の発現に関する新たな情報が得られると期待して、解析を進めている。

学会発表

- 1) Yamaguchi S, Takino M, Kamei K, Toyotome T: Production of aflatoxin and the biosynthetic cluster in clinical isolates of *Aspergillus flavus*. マイコトキシン国際シンポジウム ISMYCO2016 abstracts PS06.

新興強毒性真菌 *Cryptococcus gattii* の高病原性機序の免疫学的解析

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

亀井克彦・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Immunological analysis of a mechanism for high pathogenicity of *Cryptococcus gattii*

Kazuyoshi Kawakami, Keiko Ishii

(Tohoku University Graduate School of Medicine)

Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

1999年にカナダのバンクーバー島で *Cryptococcus gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生し、その後アメリカ合衆国の北西沿岸地域を中心に拡大しつつある。2007年には、わが国でも国内感染と考えられる *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告され、その後も症例が増加している。通常の *C. neoformans* によるクリプトコックス症と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、その高い致死率から高病原性クリプトコックス症とも呼ばれており、今後新興感染症として重要な問題に発展することが懸念される。本研究では、*C. gattii* と *C. neoformans* に対する免疫応答性を比較することで、本感染症の病態解明の手掛かりを探ることを目的とした。

これまでの我々の研究で、*C. neoformans* に対する Th1 免疫応答に TLR9 を介した DNA 認識が重要なことを明らかにしており、前年度の研究では、*C. gattii* (R265株) の DNA が、*C. neoformans* (H99株) に比べ、樹状細胞からの TLR9 に依存した IL-12 産生、そして抗原特異的な Th1 細胞誘導活性が弱いことを見出した。今年度は、その機序に迫るために、両菌株の全ゲノム DNA における TLR9 認識モチーフの頻度、さらに TLR9 刺激活性を低下させることが知られている認識モチーフのメチル化の有無について解析を行ったところ、明らかな違いを見出すことはできなかった。

本真菌の重要な病原因子である莢膜の主要な多糖成分グルクロノキシロマンナン (GXM) を両菌株から精製し免疫応答への影響を比較したところ、H99由来の GXM は樹状細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導したのに対して、R265由来の GXM ではそのような活性がみられなかった。これまでに我々は、*C. neoformans* による樹状細胞からのサイトカイン産生に Dectin-2 が必須なことを明らかにしていたことから、両真菌由来 GXM の Dectin-2 への作用について解析を行った。H99 GXM は Dectin-2-ヒト IgG 融合タンパクに結合し、Dectin-2 レポーターアッセイで明らかな刺激活性を示したのに対して、R265 GXM ではそのような活性はみられなかった。

以上の結果から、*C. gattii* と *C. neoformans* は TLR9 や Dectin-2 への異なる刺激活性を示すことで、その後の免疫応答が大きく異なり、このことが両真菌の病原性の違いに関与する可能性が示唆された。今後は、両真菌の TLR9、Dectin-2 に対する PAMPs の構造の違いとの関連性についてさらに詳細な解析を進める予定である。これらの成果は、第45回日本免疫学会学術集会、第91回日本感染症学会総会・学術講演会にて報告した。

学会発表

- 1) Kotone Kawamura, Tong Zong, Akiho Oniyama, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami. Effect of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* on helper T cell response in OT-II mice. 第45回日本免疫学会学術集会. 沖縄. 2016年12月5日～7日.
- 2) Akiho Oniyama, Anna Miyahara, Kotone Kawamura, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami. Differentiation of effector helper T cells in response to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* in transgenic mice expressing T cell receptor for 98kD mannoprotein. 第45回日本免疫学会学術集会. 沖縄. 2016年12月5日～7日.
- 3) 川村琴音, 宗 童, 石井恵子, 川上和義. *Cryptococcus neoformans* と *C. gattii* 由来 DNA による免疫活性化の違いとその機序の解析. 第91回日本感染症学会総会・学術講演会. 東京. 2017年4月6日～8日.

研究課題 '16-18

Aspergillus 呼吸器検体臨床分離株の菌種同定・薬剤感受性の検討

武田啓太

(国立病院機構東京病院呼吸器センター)

鈴木純子

(国立病院機構東京病院呼吸器センター)

萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

出された *Aspergillus* 培養陽性151株を遺伝子解析による菌種の同定、抗真菌薬耐性を検討した。108株が *A. fumigatus* で、*A. fumigatus* の隠蔽種である *A. udagawae* と *A. lentulus* は各1例ずつ同定された。その他、*A. niger* 3例、*A. tubingensis* 10例、*A. welwitschiae* 19例、*A. flavus* 4例、*A. nomius* 1例、*A. terreus* 4例であった。形態学的に *A. niger* と診断された呼吸器臨床分離株のうち実際は *A. welwitschiae* と *A. tubingensis* が大半を占め、*Aspergillus* section *Nigri* では菌種により MIC 値に差を認めた。

A. fumigatus 108株中では4株(3.7%)がITCZ耐性でうち2例はVRCZも耐性であった。108株中アゾール使用歴があったものは28株で、アゾール使用歴がある株での耐性率は14.3%(4/28株)であった。現在2016年以降の菌株についても検討を続けており、同一患者からの再検出株などについても検討を行っている。

Study of species identification and drug susceptibility of *Aspergillus* clinical isolates in respiratory specimen

Keita Takeda

(Center for Pulmonary Diseases, National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

Junko Suzuki

(Center for Pulmonary Diseases, National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

肺真菌症の病原真菌となる *Aspergillus* 属菌では、複数の遺伝子解析からアゾール系抗真菌薬などの感受性が低いその亜種(隠蔽種)が報告されており、治療上菌種の同定は重要である。また、慢性肺アスペルギルス症(CPA)では抗真菌薬による治療が長期に及ぶため、治療過程で薬剤獲得耐性が生じるとの懸念があるが、我が国における実際の臨床分離株でのデータは少ない。本研究では2012年から2015年まで東京病院で呼吸器検体から検

研究課題 16-19

質量分析計を用いたインフルエンザ菌莢膜型別に関する研究

佐藤 守

(千葉大学医学部附属病院・マスマススペクトロメトリ検査診断学)

土田祥央

(千葉大学医学部附属病院・マスマススペクトロメトリ検査診断学)

野村文夫

(千葉大学医学部附属病院・マスマススペクトロメトリ検査診断学)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Identification of *Haemophilus influenzae* capsular serotyping by use of matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

Mamoru Satoh, Sachio Tsuchida, Fumio Nomura

(Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University Hospital)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

インフルエンザ菌は a ~ f の莢膜血清型と無莢膜株 (NTHi) に分類される。小児へのインフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチン普及後、本邦でも Hib 侵襲性感染症は激減した。一方で、相対的に NTHi による侵襲感染症が増加し、e 型 (Hie) や f 型 (Hif) による侵襲性感染症も認められるようになってきている。また、インフルエンザ菌は鼻咽腔に常在し、その多くは NTHi であると考えられているが、非侵襲性感染症において、血清型解析はほとんど実施されていない。血清型分布を確実に把握することはインフルエンザ菌による感染症の動向および病原性を把握する上で極めて重要であるが、従来の凝集法や PCR 法による解析法は煩雑で時間も要する。そこで我々は MALDI-TOF MS を利用し、インフル

エンザ菌の莢膜血清型別が可能かどうかの検討を行った。方法としてエタノール・ギ酸抽出法にて質量スペクトルを得た Hib 6 株, Hie 6 株, Hif 6 株, NTHi 6 株を MALDI Biotyper (Bruker) の市販データベースに追加登録した。この home-brewed database を用いて、インフルエンザ菌全 79 株 (Hib 22 株, Hie 10 株, Hif 11 株, NTHi 36 株) を同定し莢膜型を決定し、凝集法による莢膜型を対照とし感度、特異度を求めた。検討した結果、検査対象株は全てインフルエンザ菌と同定された。各株 2 回の測定における血清型別の感度、特異度の平均はそれぞれ Hib が 100%, 95.5%, Hie が 100%, 99.1%, Hif が 95.4%, 100%, NTHi が 91.6%, 98.8% であった。本研究により、MALDI-TOF MS は Hi の莢膜型別決定に有用であり、凝集法に比べて簡便に莢膜型決定が可能であることを明らかにした。

学会発表等

- 1) 竹内典子, 石和田稔彦, 大楠美佐子, 瀬川俊介, 村田正太, 土田祥央, 佐藤 守, 野村文夫. 質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用いた *Haemophilus influenzae* の莢膜型決定法の検討. 第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 2017 年 1 月 22 日 長崎.
- 2) Takeuchi N, Segawa S, Ishiwada N, Ohkusu M, Tsuchida S, Satoh M, Matsushita K, Nomura F. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Infect Chemother. 2018 Mar 10. pii: S1341-321X(18)30062-X. doi: 10.1016/j.jiac.2018.02.007.

研究課題 '16-20

侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の病原因子に関する研究

西順一郎

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

藺牟田直子

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

徳田浩一

(鹿児島大学病院 感染制御部門)

菱木はるか

(千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with invasive disease

Junichiro Nishi

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Naoko Imuta

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Koichi Tokuda

(Kagoshima University Hospital)

Haruka Hishiki

(Chiba University Graduate School of Medicine)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

インフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチン導入後に発症した小児侵襲性感染症の血液・髄液等無菌部位から分離されたインフルエンザ菌28株に関して病原因子の解析を行った。血清型に関しては、全株、PCR法で無莢膜株と同定された。生物型はⅡ型とⅢ型が多かった。薬剤感受性に関しては、19株にペニシリン結合蛋白に変異を認め、うち2株はβラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラブリ酸耐性株であった。接着因子の有無、バイオフィルム産生能に関しては、呼吸器由来のインフルエンザ菌無

莢膜株と比較し、特徴は認められなかったが、莢膜株が保有する特異的な塩基配列である IS1016 を 10.7% の株が保有していた。MLST 解析において 28 株中 26 株が異なる ST 型を示した。本研究により、国内で分離される侵襲性感染症由来、インフルエンザ菌無莢膜株は多様性に富むことを明らかにした。Hib ワクチン普及後、日本における侵襲性インフルエンザ菌感染症の原因菌の主体は無莢膜株に変化しており、今後もその病原性解析を進めていく必要がある。

学会発表等

- 1) Naruhiko Ishiwada: Clinical and bacteriological analysis of non-typeable *Haemophilus influenzae* isolated from blood in pediatric patients. US-Japan ARI panel meeting 13rd Jan 2016 Washington DC, USA.
- 2) 内藤幸子, 石和田稔彦, 菱木はるか, 竹内典子, 大楠美佐子, 西順一郎, 藺牟田直子, 佐々木裕子, 下条直樹: 小児侵襲性感染症由来インフルエンザ菌無莢膜株に関する細菌学的検討. 第120回日本小児科学会学術講演会 2018年4月14日 東京.
- 3) Naito S, Takeuchi N, Ohkusu M, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Imuta N, Nishi J, Shibayama K, Matsuoka M, Sasaki Y, Ishiwada N. Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases, Japan, 2008-2015. *J Clin Microbiol* 2018 May 2. pii: JCM.00141-18. doi: 10.1128/JCM.00141-18.

研究課題 '16-21

新規抗真菌剤の合成および活性評価研究

椎名 勇

(東京理科大学理学部第一部応用化学科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Enantioselective synthesis of new antibacterial and antifungal agents and evaluation of its activity

Isamu Shiina

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo University of Science)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

東京理科大学理学部応用化学科 椎名研究室 (以下、椎名研) にて、2006年に *Eupenicillium shearii* より単離・構造決定されたユーシェアリライド天然物 (24員環マクロライド) の全合成方法を確立した。また、独自の不斉合成技術によりユーシェアリライド類縁体 (光学異性体およびジアステレオマー) のライブラリーを構築している。平成28年度の共同研究では、カンジダやクリプトコッカスなどの真菌と MRSA などの多剤耐性グラム陽性菌に対するユーシェアリライド立体異性体 (8種類) の発育阻止効果試験を実施したが、天然物よりも抗真菌活性と抗細菌活性ともに高い立体異性体があることを確認することが出来た。

また、母骨格である炭素骨格の不飽和度や官能基の異なるユーシェアリライド類縁体の発育阻止効果試験を実施した。その結果、特に官能基について明瞭な構造活性相関が確認され、標的に対するユーシェアリライド類縁体の作用部位について示唆を得た。

発表論文

- 1) Takayuki Tono, Ryo Kawahara, Takehiko Inohana and Isamu Shiina: Enantioselective total synthesis of naturally occurring eushearilide and evaluation of its antifungal activity: *The Journal of Antibiotics* 69, 697-701 (September 2016) (doi:10.1038/ja.2015.146).

研究課題 '16-22

*Molecular biological analysis of *Cryptococcus* and *Candida* species from selected Counties in Kenya*

Christine Bii

(KEMRI, Center for Microbiology Research)

Olga Mashedi

(KEMRI, Center for Microbiology Research)

Abdi Mohamed

(KEMRI, Center for Microbiology Research)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ケニア国内で採集した穀物試料 (トオモロコシ, 小麦, コメ, 稗) の50%以上が, アフラトキシン, デオキシニバレノール, オクラトキシン, フモニシンなどの何らかのカビ毒により高度に (西洋諸国, 日本の基準値を超えて) 汚染されていることが判明した。また2種以上のカビ毒に同時に汚染されている試料も多数見つかった。さらに研究を進めると, 現地で冠婚葬祭に頻繁に用いられる地ビールも高濃度のアフラトキシン (B1, G1) に, また牛乳もアフラトキシン M1 に西洋諸国の基準値を超えて汚染されていることが判明した。これらの結果は, 学術論文として発表するとともに, 現地の新聞, インターネット・ホームページを通じて公表し, 現地の人々に対し注意を喚起した。

また, ケニアに滞在する米国人医師と協力し, ケニアのエイズ患者に感染し, 直接の死因となる真菌クリプトコッカス属菌について研究・解析した。MultiLocus Sequence Typing と呼ばれる分子系統学手法を用いて解析したところ, 行き来の無い遠方に住む患者にも分子系統

学的に同種・同型の菌が感染していることが明らかとなり、ヒトに感染し易い菌の種類がいることが示唆された。

さらに、これらの研究過程で、新種の黒色アスペルギルス属菌4種を発見し、論文を作成している。また、関連ヒト病原真菌（アスペルギルス属菌等糸状菌）について、日本国内で分子生物学的、生理・生化学的、形態学的解析を進め、病原因子、病原因子発現機構、薬剤耐性機構に関する発見を行った。

発表論文

- 1) Gla dys Langat, Tetsuhiro Matsusawa, Tohru Gono, Vivienne Matiru, Christine Bii. Aflatoxin M1 Contamination of Milk and Its Products in Bomet County, Kenya. *Advance in Microbiology*, Vol.6: 528-536 (2016).

研究課題 '16-23

未利用微生物を素材とした深在性真菌症治療薬シード化合物の探索

久保田高明

(昭和薬科大学)

五ノ井透

(千葉大学真菌医学研究センター)

The search for seed compounds of antifungal drugs for deep-seated mycosis from unutilized microorganisms.

Takaaki Kubota

(Showa Pharmaceutical University)

Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

海綿動物からは多くの生物活性天然物が単離、構造決定されており、それらをもとに新たな医薬品が開発されている。近年、メタゲノム解析により、これら生物活性天然物の真の生産者は海綿動物に共生する難培養性微生物であることが明らかになってきた。今回、沖縄で採取した数種の海綿動物を対象に、深在性真菌症の原因真菌に対して抗真菌活性を示す新たな生物活性天然物の探索を

行った。

その結果、*Aspergillus niger*に対して抗真菌活性 (MIC, 4 µg/mL) を示す新規環状ヘプタペプチド *Stylissamide I* を *Stylissa* 属の海綿から単離、構造決定した。また、*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* に対して抗真菌活性 (MIC, 16 µg/mL, 16 µg/mL, and 2 µg/mL, respectively) を示す新規マンザミンアルカロイド *Zamamidine D* を *Amphimedon* 属の海綿から単離、構造決定した。今後も、深在性真菌症の原因真菌に対して抗真菌活性を示す新たな天然物の探索を継続して行う予定である。

発表論文

- 1) Kubota T, Nakamura K, Kurimoto S, Sakai K, Fromont J, Gono T, Kobayashi J: *Stylissamide I*, a new cyclic heptapeptide from an Okinawan marine sponge *Stylissa* sp. *Heterocycles*. 95, 799-806, 2017.
- 2) Kubota T, Nakamura K, Kurimoto S, Sakai K, Fromont J, Gono T, Kobayashi J: *Zamamidine D*, a manzamine alkaloid from an Okinawan *Amphimedon* sp. marine sponge. *J Nat Prod*. 80: 1196-1199, 2017.

研究課題 '16-24

ヒト病原性真菌に対する植物病原菌マイコウイルスタンパク質の生育阻害効果の解析とその医療素材としての開発

森山裕充

(東京農工大学大学院農学研究科)

五ノ井透・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Evaluation of anti-fungal proteins of mycoviruses infecting in plant pathogenic fungi and development of effective proteins derived from the mycoviruses

Hiromitsu Moriyama

(Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Susumu Kawamoto, Tohru Gono

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々はイネいもち病菌に感染するマイコウイルス Magnaporthe oryzae chrysovirus, MoCV1-Aが宿主菌に対して、菌糸生育抑制、異常な色素沈着や分生子形成抑制などの生育阻害現象をもたらすことを見出しており、MoCV1-Aウイルスの遺伝子がコードするタンパク質のうち、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子発現系の利用により ORF4が抗菌性タンパク質をコードすることを明らかにしてきた。MoCV1-AのORF4タンパク質の部分領域をパン酵母に発現させることで、抗菌活性領域を調査したところ、MoCV1-Aの近縁ウイルス間で保存性の高い、中央部の領域 (SUa領域) に活性があることが確認された。これまでにピキア酵母を利用した発現系を検討してきたが、本研究においては、タンパク質発現量多い大腸菌を利用してSUaの生産を試みた。その結果、不溶性画分ではあるが、高い産生効率でSUaタンパク質の産生が確認された。今後、可溶性タグなどを付加する事により、可溶性画分における調製方法を確立していく。

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主な原因菌である。五ノ井教授の研究グループにより、マウ

スに対する *A. fumigatus* の病原性を抑制するそれぞれ4本鎖、5本鎖dsRNAゲノムをもつマイコウイルス2種を見出し、新規抗真菌薬としての応用を目指して研究を行ってきた。ウイルスフリーの *A. fumigatus* (KU株) にウイルスゲノムのORFをそれぞれ強制発現させた株、protoplast fusion法によりウイルスを導入した株それぞれにおいて、宿主の形態、生育速度、ストレス耐性、および二次代謝産物生産能などの表現型を比較した。その結果、4本鎖dsRNAマイコウイルスのORFc、5本鎖dsRNAマイコウイルスのORFb, cの強制発現株で糸状菌生育抑制が観察された。さらに、これらの株を用いてマウス感染実験を行い、肺のCFUを比較した。4本鎖dsRNAマイコウイルスのORFc強制発現株、ウイルス導入株、5本鎖dsRNAマイコウイルスのORFb, d, e強制発現株で他の株よりコロニー数が減少する傾向が見られ、これらの遺伝子が *A. fumigatus* の病原性を抑制していることが示唆された。またイネいもち病菌マイコウイルスMoCV1-AのORF4をウイルスフリーの *A. fumigatus* (KU株) に発現させた場合においても糸状菌生育抑制が観察された。

学会発表

- 1) Hiromitsu Moriyama¹, Syun-Ichi Urayama^{1,2}, Yuri Kimura¹, Toshiyuki Fukuhara¹, Akio Toh-e³, Susumu Kawamoto³

Functional analyses of novel proteins of mycoviruses infecting phytopathogenic fungi using heterologous expression system in *Saccharomyces cerevisiae*

1. Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Research and Development Center for Marine Biosciences, 2. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC), 3. Division of Molecular Biology, Medical Mycology Research Center, Chiba University.

ICY2016: 14th International Congress on Yeasts. 平成29年9月12日~15日 淡路国際夢舞台会議場 (兵庫県淡路島市)

- 2) 森山裕充 酵母異種発現系によるマイコウイルスタンパク質の機能探索 新産業酵母研究会 日時: 平成28年11月4日(金) 会場: 産総研: 臨海副都心センター
- 3) 宍戸絵里香¹, 高橋 梓², 酒井香奈江³, 萩原大祐², 森山裕充³, 五ノ井透² 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を

弱毒化するマイコウイルス遺伝子の発現量と機能解析 (1. 千葉大・医学薬学府, 2. 千葉大・真菌センター, 3. 農工大) 平成28年11月17日-18日(金)
場所: 宇治おうばくプラザ

研究課題 '16-25

Cryptococcus neoformans の感染サイクルにおけるゲノム再編成の分子機構とそれを標的とした新規治療戦略の開発に向けて

松浦 彰・久保田俊介

(千葉大学大学院融合科学研究科)

亀井克彦・川本 進・東江昭夫・高橋弘喜

(千葉大学真菌医学研究センター)

Towards development of novel therapeutic strategies targeting the mechanism of specific genome rearrangement during infection cycle of *Cryptococcus neoformans*

Akira Matsuura, Shunsuke Kubota

(Graduate School of Advanced Integration Science, Chiba University)

Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto, Akio Toh-e, Hiroki Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Cryptococcus neoformans は環境に常在する担子菌酵母であり、主に免疫機能の低下した人に感染し重篤なクリプトコックス症を引き起こす日和見感染真菌として知られている。本菌は、環状プラスミドが維持できない、遺伝子ターゲティングの効率が悪く、導入された直鎖状DNA断片の末端に高頻度でテロメア反復配列が付加される、などDNA修復に関連するユニークな性質をもつことが明らかにされている (Edman, 1992)。本研究では、*C. neoformans* 染色体末端近傍でのゲノム変化に注目し、テロメア末端およびDNA損傷末端で作用する分子の機能とゲノム変化、感染サイクルとの関連を明らかにするとともに、それを標的とした新規治療戦略の開発を目指す。

これまでに、DNA末端を維持・修復する過程に関す

る *C. neoformans* 特有の現象を主として遺伝学的、分子生物学的手法を用いて解析をしており、我々が同定した染色体末端を伸長する酵素であるテロメラーゼの触媒サブユニット *CnEST2* の欠損細胞が、一倍体で致死性を示すことを見出した。他の多くの生物種では、テロメラーゼの欠損は直ちには致死とはならないことから、この違いが *C. neoformans* 特異的な治療戦略として利用できる可能性が考えられる。

そこで、既知のヒトテロメラーゼ阻害剤を増殖中の *C. neoformans* に投与したところ、*CnEST2* 遺伝子のコピー数と相関して増殖の低下がみられることが明らかになった。さらに、薬剤添加時の遺伝子発現変化をRNA-Seqにより調べたところ、テロメラーゼ阻害と増殖抑制とを繋ぐ、未知の経路の存在が示唆された。

今後は、テロメラーゼ阻害により引き起こされる *C. neoformans* 特有の増殖阻害現象のメカニズムの分子機構、その感染サイクルにおける生理的意義を解析しつつ、*C. neoformans* テロメラーゼ活性をより特異的に阻害する化合物の探索を行う予定である。

学会発表

- 1) 久保田俊介, 高田実里, 今成百合子, 東江昭夫, 高橋弘喜, 川本 進, 亀井克彦, 松浦 彰. *C. neoformans* におけるテロメア維持機構の解析 酵母遺伝学フォーラム第49回大会, 神戸, 2016年9月
- 2) Shunsuke Kubota, Hideki Takahashi, and Akira Matsuura. Unique response to telomerase inhibition in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. The Second Symposium of Chiral Materials Science, Chiba, March 2017

研究課題 '16-26

臨床検体から分離されたテルビナフィン低感受性（耐性）白癬菌株における耐性化メカニズムの解明に向けた遺伝子工学的アプローチの導入

山田 剛

(帝京大学医真菌研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene

Tsuyoshi Yamada

(Teikyo University Institute of Medical Mycology)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

世界各地の臨床現場で白癬の治療に使用されているテルビナフィン (TBF) は耐性株の分離に関する報告が少ない。申請者らとスイス・ローザンヌにある Centre Hospitalier Universitaire vaudois (CHUV) の共同研究グループは、2013年~2016年にかけてCHUVを拠点に収集した臨床分離白癬菌2,056株を対象に、TBF (0.2 µg/ml) を含むサブローデキストロース寒天培地を用いた簡易培養試験を行い、約1%にあたる17株の培養陽性株を見出した。これらのTBF低感受性株について、薬剤の作用標的であるスクワレンエポキシダーゼをコードするSQLE遺伝子の塩基配列を解析したところ、ORF内にアミノ酸の置換を生じる幾つかの点変異 (SNP) が認められた。そこでTBFに感受性の白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* の遺伝子操作を行い、内在性のSQLE遺伝子に同様のSNPを導入した変異株を作出した。CLSI法を用いて、作出したSQLE変異株のTBF感受性を解析した結果、変異株の

感受性はコントロール株に比べ8~512倍低く、上記17白癬菌株のTBF感受性低下の主要原因がSQLE遺伝子内のSNPであることが判明した。

発表論文

- 1) Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Karine Salamin K, Fratti M, Monod M.: Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, doi:10.1128/AAC.00115-17, 2017.

研究課題 '16-27

薬剤耐性および感受性 *Aspergillus fumigatus* 株の代謝産物のメタボローム解析

細江智夫

(星薬科大学 薬化学教室)

武田 尚

(星薬科大学 薬化学教室)

若菜大悟

(星薬科大学 薬化学教室)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Metabolomics between drug-resistance and drug-sensitive *Aspergillus fumigatus*

Tomoo Hosoe

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Hisashi Takeda

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Daigo Wakana

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Aspergillus fumigatus は深在性真菌症であるアスペルギルス症の主たる原因菌である。その治療薬にはアゾール系、

キャンディン系，ポリエン系抗菌薬などが存在する．近年，深在性真菌症治療薬 amphotericin B (AMPH) に対し，薬剤耐性を示す *A. fumigatus* が発生し，原因菌の薬剤耐性に応じた治療薬の選択が重要となっている．我々は化学成分の観点から AMPH 耐性及び感受性株の違いを見出すことが可能ではないかと考え，各菌株の代謝産物について網羅的に解析可能なメタボロミクスの手法を用い，両者の分類を検討した．

千葉大学真菌医学研究センターよりご供与いただいた AMPH 耐性及び感受性 *A. fumigatus* 株を PDB 培地を用い，25 °C（自然条件下）及び 37 °C（5 % CO₂ 条件下）の異なる 2 種の条件での培養を行い，各菌株の代謝産物の ¹H-NMR スペクトルデータを用いてメタボローム解析を行った．その結果，両培養条件において OPLS-DA 解析の

スコアプロットから耐性株群と感受性株群の 2 群が観測された．25 °C（自然条件下）培養時のローディングプロットから，感受性株には共通して 6.6–7.0 ppm を示す芳香族化合物が存在することが示唆された．また，耐性株には 1.5–5.1 ppm を示す多数の物質の存在が示唆された．37 °C（5 % CO₂ 条件下）での培養では，感受性株は芳香族化合物の存在が示唆されたが，化学シフト値から 25 °C 培養時とは異なる物質が産生されていることが明らかとなった．一方，耐性株は 2.4–3.7 ppm 及び 4.0–4.6 ppm にピークを持つ物質が存在し，有機酸やアミノ酸が多く存在することが明らかとなった．

以上の結果から，耐性株群と感受性株群は産生成分が異なることが明らかとなったため，今後はより詳細な解析を行い，両者を分類する成分の特定を試みる予定である．