

病原性 *Candida* 属酵母の酸性プロテアーゼ産生能の比較

大川 喜男*, 小島 芳香, 川嶋美江子, 岡本 英治

Comparison of Acid Protease Producibility by Different Strains of Pathogenic *Candida* Species

Yoshio OKAWA*, Yoshika KOJIMA, Mieko KAWASHIMA, and Eiji OKAMOTO

(Received November 22, 2005)

Acid protease (AP) producibility of 10 strains of pathogenic *Candida* species, 3 strains (NIH A-207, NIH B-792, and IFO 1060) of *Candida albicans*, 2 strains (ATCC 20408 and ATCC 36232) of *C. stellatoidea*, 5 strains (IFO 0587, IFO 0589, IFO 0199, IFO 1647, and IFO 1400) of *C. tropicalis*, and one strain (X2180-1A-5) of *Saccharomyces cerevisiae* as a negative control was compared in media supplemented with bovine serum albumin (BSA) and collagen in a yeast carbon base medium (YCB). We found that *C. albicans* NIH B-792 strain had the highest AP producibility in both the media. The AP producibility of all the strains used was observed in the order IFO 1060, IFO 36232 = IFO 0589, NIH A-207, IFO 20408, and NIH B-792, in YCB-BSA, and in the order NIH A-207, IFO 20408 = IFO 0589, IFO 1060, IFO 36232, and NIH B-792, in YCB-Collagen. In contrast, the other strains (IFO 0587, IFO 0199, IFO 1647, IFO 1400, and X2180-1A-5) did not show the AP producibility in both the media. The AP producibility of each strain was correlated with the ability to growth in both the media.

Key words — *Candida*; acid protease; producibility; growth; pathogenic

真菌症の成立には、菌体側・宿主側要因の両面からの理解が必要である。*Candida* の病原性に関与する重要な因子の一つとして酸性プロテアーゼ (AP) が知られており多くの研究がある。¹⁻⁸⁾ また、*Aspergillus* のプロテアーゼも重要な病原因子の一つと考えられている。⁹⁾ APは血清診断の有効な特異抗原であること¹⁾ や線溶系への関与³⁾ などが示されている。マウス全身(静脈内)感染において、APを有する菌株の方がAP欠損変異株よりもマウスの死亡率が高いことが知られている。^{4,5)} *Candida* の菌種によりAPの産生量に差があり、病原性の強い *C. albicans* で高く、*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* がこれに次ぎ、その他の *Candida* 種では産生されないことが報告されている。¹⁰⁻¹³⁾ しかし、病原性とAP産生能は必ずしも相関しないという報告もみられる。¹⁴⁻¹⁸⁾

我々は前報で、*C. albicans* serotype A並びにB株の産生するAPの諸性質の比較を行い、両株とも同一のAPを産生することを報告した。¹⁹⁾ 今回は、各種 *Candida* 属酵母の病原性とAP産生能との関連性を明らかにすることを目的に、まず *C. albicans* 3菌株、*C. stellatoidea* 2菌株、*C. tropicalis* 5菌株、並びに陰性対象として *Saccharomyces cerevisiae* 1菌株の計11菌株を用いて、各種窒素(N)源を添加した培地でAP産生能の比較検討を行った。

材料及び方法

1) 使用菌株

C. albicans は NIH A-207 株, NIH B-792 株 (いずれも明治薬科大学由来), 並びに IFO 1060

(J-1012)株(大阪発酵研究所より購入)を用いた。*C. stellatoidea* はATCC 20408株 並びに ATCC 36232株(いずれも American Type Culture Collection)を用いた。*C. tropicalis*は IFO 0587, IFO 0589, IFO 0199, IFO 1647 並びに IFO 1400株(大阪発酵研究所より購入)を用いた。*S. cerevisiae* 変異株(X2180-1A-5)は Dr. Ballou (Department of Biochemistry, University of California, Berkeley) から分与されたものを用いた。これらの略称として, A-207, B-792, 1060, 20408, 36232, 0587, 0589, 0199, 1647, 1400 並びに 1A を用いた。

2) 菌株の培養

菌株の培養は次のように2回ずつ行った。各菌株のシード培養は酵母エキス加サブロー液体培地(YSLM)²⁰⁾を用い、振とう培養器(150 rpm)で、27℃、24時間培養した。メイン培養は次のようにそれぞれ行った。

1: まず、*C. albicans* A-207株を用い、AP産生における培養条件を検討した。予め調製したYeast extract 2%-G glucose 20%(YG)培地 30mlにN源として牛血清アルブミン(BSA)、ウシアキレス腱のコラーゲン(Type I)、牛血液のヘモグロビンはいずれもSigma社製、カゼイン(ミルク)、ケラチンはナカライテスク(株)製を2%になるように加え、オートクレーブ後の培地に、シード培養菌液を1mlずつ加え、27℃で7日間振とう培養を行った。

2: *C. albicans* A-207株を用い、予め調製したYeast carbon base培地(YCB)30mlにN源として、BSAまたはコラーゲンを0.2%と2%濃度で加えオートクレーブ後の培地に、シード培養菌液を1mlずつ加え、27℃で7日間振とう培養を行った。

3: 1)に記載した*C. albicans* 3菌株、*C. stellatoidea* 2菌株、*C. tropicalis* 5菌株、*S. cerevisiae* 1菌株を用いて、予め調製したYCB培地30mlにN源としてBSAまたはコラーゲンを0.2%に加え、オートクレーブ後の培地(YCB-BSAとYCB-Collagen)に先のシード培養菌液を1mlずつ加え、27℃で7日間振とう培養を行った。

3) 培養液のサンプリングと測定

各培養で、培養液は経時的(1, 2, 3, 7日目)にサンプリングを行った。菌数の測定は正確に希釈後、血球計算盤を用いて計数し、菌数/mlで表示した。培養液を3000 rpm, 10分間遠心後、上清のAP活性を測定した。

4) AP活性の測定

Kobayashiらの方法²³⁾に準じて行った。すなわち、酵素液として培養上清0.2ml, 基質として0.6%に50mMクエン酸緩衝液(pH 3.6)に溶解した牛ヘモグロビン(Sigma社製)2mlを混和、37℃、60分間反応させた後、0.44 M トリクロロ酢酸溶液を2ml加え氷冷し、反応を停止、4℃にて一夜放置後、3000rpm, 10分間遠心分離、上清の吸光度を275nmにて測定した。1分間に吸光度を0.001上昇させる酵素量を1単位(U)とし、U/mlで表示した。

実験結果と考察

真菌感染の菌体側の因子として、重要なものの一つに酸性プロテアーゼ(AP)がある。現在まで*Candida*のAPについては多くの報告があり、病原性に関与するとの報告が圧倒的に多い。^{1-8,10,11)}しかし、AP産生能は必ずしも病原性と相関しないとの報告もみられる。¹⁴⁻¹⁸⁾各種病原性*Candida*の病原因子の解明を目的に、本論文では、*Candida*属酵母10菌株を用い菌株間でのAP産生能を比較した。

まず、*C. albicans* NIH A-207株を用いて、BSA、カゼイン、コラーゲン、ヘモグロビン、ケラチンをN源として2%含むYG培地でAP産生能の検討を行った(Fig. 1)。その結果、コラーゲンをN源とした培地で最も高い活性が認められた。このAP活性は培養2日目でピークに達し、その後7日目まで持続した。BSAをN源とした系でも高い活性が認められ、カゼインでは2日目をピークとする一過性の活性が認められた。一方、ヘモグロビン、ケラチンではこの培養条件におけるAP産生は新たなN源未添加群との差異は認められなかった。*Candida* APは、グルコース2%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%,

100 × minimum essential medium vitamins 0.25% の組成の Remold medium に添加した各種 N 源 (BSA, カゼイン, ヘモグロビン, コラーゲン, ケラチン) により効率よく産生されることが報告されている.¹²⁾ 今回の栄養十分な YG 培地への N 源としての更なる BSA とコラーゲンの添加で, このように高い AP 産生がみられたことは, 本菌が BSA とコラーゲンをよりよく利用する能力をもつためと考えられる.

次に, *C. albicans* NIH A-207 株を用いて, AP 産生能が高かった BSA とコラーゲンを 0.2% または 2% 含む YCB 培地で AP 産生能の検討を行った. その結果, いずれも高い活性が得られた (データは示さない). このことから, 次の菌株間での AP 産生能の比較実験には, BSA とコラーゲン両者とも 0.2% 濃度で使用した.

BSA を N 源として 0.2% 含む YCB 培地 (YCB-BSA) で, *Candida* 属酵母 10 菌株と陰性対象として *S. cerevisiae* 1A 株の AP 産生能の検討を行った (Fig. 2-A). その結果, 他と比較して B-792 株が著しく高い値を示し, 次いで 20408 株に高い活性が認められた. A-207 株は, 2 日目に低下

がみられ, その後上昇した. 36232 と 0589 株はいずれも 2 日目から 5 日目まで急激に上昇した. 次に 1060 株が続き, 0587, 0199 並びに 1A 株はほとんど活性を示さず, 1647 と 1400 株は全く活性を示さなかった. 菌の増殖 (Fig. 2-B) は, 20408 と B-792 株で高く, 次いで A-207 株であり, AP 産生能とよく相関することがわかった. BSA は AP 産生の N 源として最もよく用いられている.^{1,2,7,8,10-16,19)}

コラーゲンを N 源として 0.2% 含む YCB 培地 (YCB-Collagen) で, *Candida* 属酵母 10 菌株と陰性対象として *S. cerevisiae* 1A 株の AP 産生能の検討を行った (Fig. 3-A). その結果, 他と比較して B-792 株が著しく高い値を示し, 1 日目から 7 日目まで顕著な活性が認められた. 36232 や 1060, 0589 並びに 20408 株では 5 日目まで上昇し続け比較的高い活性が認められた. A-207 株にもわずかに活性が認められたが, 0587, 0199, 1647, 1400 並びに 1A 株は全く活性を示さなかった. 菌の増殖 (Fig. 3-B) は, 20408, B-792, 36232 株で特に高く, 次いで 1060, 0589, A-207, 1400 株がそれに次ぎ, 1A, 0587, 0199, 1647 株では低

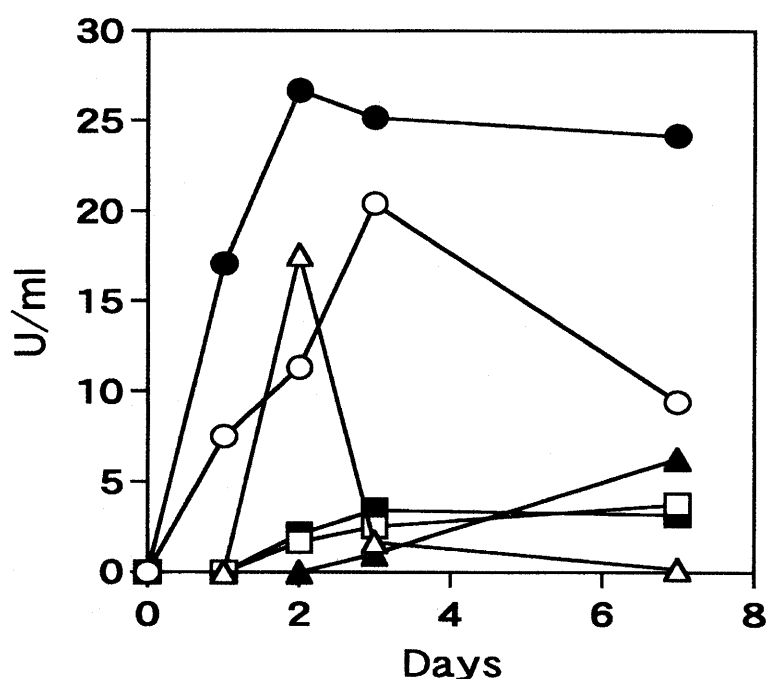


Fig. 1. AP Producibility of *C. albicans* NIH A-207 Strain Cultured in Several Protein-Supplemented Media
○, BSA; ●, Collagen; △, Casein; ▲, Hemoglobin; □, Keratin; ■, None

かった。20408株で増殖能が特に高いのが特徴的であるが、菌の増殖はAP産生能とよく相関した。現在まで、*Candida* のAP産生において、BSAに比べてコラーゲンを使用した研究は少ない。^{12,22,23)} *C. albicans* のコラーゲナーゼはオートクレーブしたコラーゲンでは誘導されないことが報告されているが、^{24,25)} 今回の我々の結果は、オートクレーブ牛アキレス腱コラーゲンでも十分なAP産生がみられることを示している。このAP産生能が結合組織での *Candida* の病原

性を反映しているかどうか、新たな実験モデルで検討する必要がある。

本実験のデータは再現性を確認しているが、*C. albicans* と *C. albicans* 類縁の *C. stellatoidea* は、5菌株いずれも強弱はあるがAP産生能があり、*C. tropicalis* は5菌株のうち、0589株を除いてAP産生は認められず、菌種間、菌株間で産生能に差のあることが明らかになった。

現在まで、*C. albicans* の病原性とAP産生能についてはさまざまな報告があり、考察がなさ

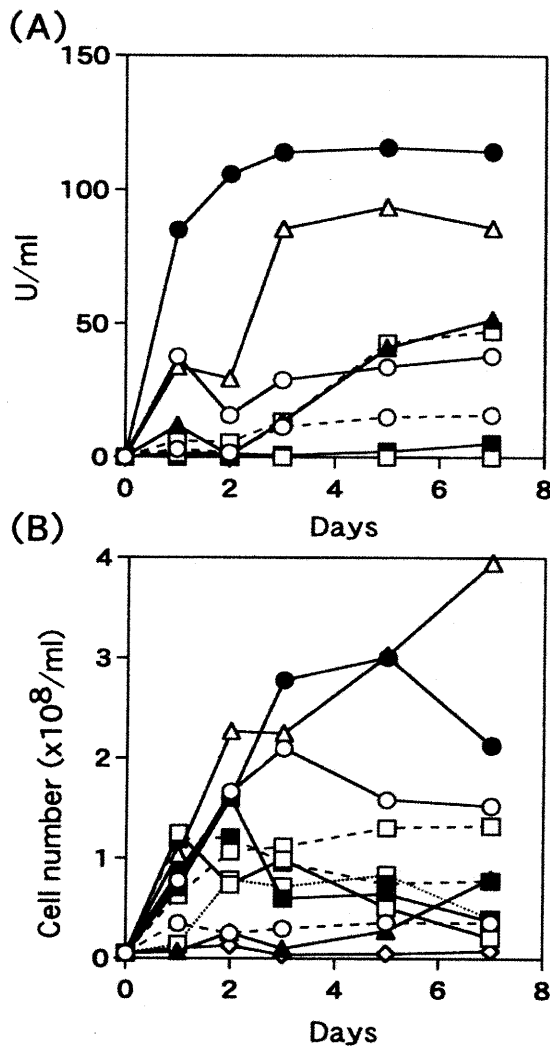


Fig. 2. AP Producibility (A) and Growth (B) of Different Strains of *Candida* Species Cultured in YCB-BSA

○—○, A-207; ●—●, B-792; ○--○, 1060; △—△, 20408; ▲—▲, 36232;
□—□, 0587; □--□, 0589; _—_, 0199; □··□, 1647; ■--■, 1400; ◇—◇, 1A

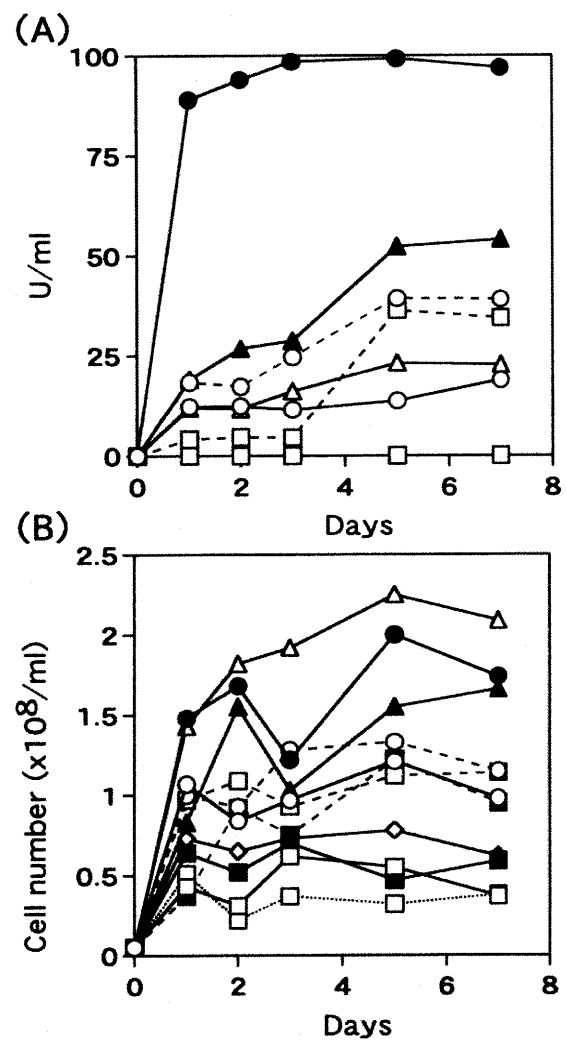


Fig. 3. AP Producibility (A) and Growth (B) of Different Strains of *Candida* Species Cultured in YCB-Collagen

○—○, A-207; ●—●, B-792; ○--○, 1060; △—△, 20408; ▲—▲, 36232;
□—□, 0587; □--□, 0589; _—_, 0199; □··□, 1647; ■--■, 1400; ◇—◇, 1A

れている。病原性株と非病原性株間の比較において、病原性の全てをAP活性で表示することが困難であり、他の因子の関与も必要であること、^{4,18)} また、試験管内AP活性の強さは本菌の病原性の全てと必ずしも相関しないが、生体内での菌の増殖能、すなわちAPの総生産量がその菌の侵襲性において重要な要素になり得ることが報告されている。¹⁵⁾ 今後、各種 *Candida* 属酵母の病原性が、N源としてのBSAやコラーゲンの利用能、血中や結合組織における菌の増殖そしてAP産生能、と相関するかどうか、マウスなどを使用した感染実験モデルで検討する必要がある。

REFERENCES

- 1) Macdonald F., Odds F. C., *J. Med. Microbiol.*, **13**, 423 – 435 (1980).
- 2) Rüchel R., Tegeler R., Trost M., *Sabouraudia.*, **20**, 233 – 244 (1982).
- 3) Rüchel R., *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, **255**, 524 – 536 (1983).
- 4) Macdonald F., Odds F. C., *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 431 – 438 (1983).
- 5) Kwon-Chung K. J., Lehman D., Good C., Magee P. T., *Infect. Immun.*, **49**, 571 – 575 (1985).
- 6) Ghannoum M., Elteen K. A., *J. Med. Vet. Mycol.*, **24**, 407 – 413 (1986).
- 7) Shimizu K., Kondoh Y., Tanaka K., *Microbiol. Immunol.*, **31**, 1045 – 1060 (1987).
- 8) Cassone A., Bernardis F. D., Mondello F., Ceddia T., Agatensi L., *J. Infect. Dis.*, **156**, 777 – 783 (1987).
- 9) Kolattukudy P. E., Lee J. D., Rogers L. M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B., Copelan E. A., *Infect. Immun.*, **61**, 2357 – 2368 (1993).
- 10) Rüchel R., Uhlemann K., Böning B., *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A*, **255**, 537 – 548 (1983).
- 11) Macdonald F., *Sabouraudia.*, **22**, 79 – 82 (1984).
- 12) Ray T. L., Payne C. D., *Infect. Immun.*, **58**, 508 – 514 (1990).
- 13) Yamamoto T., Nohara K., Uchida K., Yamaguchi H., *Microbiol. Immunol.*, **36**, 637 – 641 (1992).
- 14) Schreiber B., Lyman C. A., Gurevich J., Needham C. A., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **3**, 1 – 5 (1985).
- 15) Edison A. M., Manning-Zweerink M., *Infect. Immun.*, **56**, 1388 – 1390 (1988).
- 16) Kwon-Chung K. J., Wickes B. L., Merz W. G., *Infect. Immun.*, **56**, 1814 – 1819 (1988).
- 17) Togni G., Sanglard D., Monod M., *J. Med. Vet. Mycol.*, **32**, 257 – 265 (1994).
- 18) Kretschmar M., Felk A., Staib P., Schaller M., Heß D., Callapina M., Morschhäuser J., Schäuffer W., Korting H. C., Hof H., Hube B., Nichterlein T., *Microb. Pathog.*, **32**, 61 – 70 (2002).
- 19) Okawa Y., Suzuki A., Chiba T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1281 – 1285 (2005).
- 20) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167 – 171 (1994).
- 21) Kobayashi I., Kondoh Y., Shimizu K., Tanaka K., *Microbiol. Immunol.*, **33**, 709 – 719 (1989).
- 22) Kaminishi H., Hagihara Y., Hayashi S., Cho T., *Infect. Immun.*, **53**, 312 – 316 (1986).
- 23) Kaminishi H., Hagihara Y., Tanaka M., Cho T., *J. Med. Vet. Mycol.*, **26**, 315 – 318 (1988).