

N-アセチルノイラミン酸による *Candida albicans* 形態変化の制御について

小笠原綾子*, 渡部俊彦, 三上 健, 松本 達二

N-acetylneuraminic acid Regulates the Transformation of *Candida albicans*

Ayako OGASAWARA*, Toshihiko WATANABE, Takeshi MIKAMI, Tatsuji MATSUMOTO

(Received November 22, 2003)

Candida albicans is a dimorphic fungus and generally grows in hyphal form in RPMI1640 medium. However, addition of *N*-acetylneuraminic acid inhibited the hyphal growth. The expression of *CGR1* mRNA in *C. albicans* was inhibited by addition of *N*-acetylneuraminic acid. Diltiazem, a calcium channel blocker, inhibited the yeast to hyphal transformation in *C. albicans* as well as addition of *N*-acetylneuraminic acid.

These results indicated that inhibition of hyphal growth of *C. albicans* by *N*-acetylneuraminic acid was mediated by interruption of *CGR1* mRNA expression.

Key words — *Candida albicans*; *N*-acetylneuraminic acid; morphological transition

緒 言

C. albicans はヒトの常在菌の一種で、特に口腔粘膜には高い頻度で存在する。¹⁾ 口腔カンジダ症はステロイド療法時、²⁾ 臓器移植後、³⁾ AIDS 発症時⁴⁾ など、免疫能が低下した状態で現れるが、健康なヒトで発症する例は少ない。*C. albicans* は二形性真菌で、周囲の様々な因子の影響により酵母から菌糸へ形態を変化させ、組織に吸着、侵襲する。⁵⁾ プロテアーゼ等の病原因子活性の比較から、一般に酵母形より菌糸形の病原性が高いと考えられている。⁶⁾

C. albicans の形態変化に関わる因子として、RBF1 (酵母形から菌糸形の形態変化を抑制すると考えられている因子)、⁷⁾ EFG1 (菌糸成長に関わる因子)、⁸⁾ TPS (trehalose-6-phosphate synthase をコードし、菌糸形を誘導すると考えられる因子)、⁹⁾ *CGR1* (*Candida* growth regulation 1)¹⁰⁾ など、多数の因子が知られている。*CGR1* は *C. albicans* の発芽直前に発現が増加するタンパク質で、酵母での増殖停止と発芽誘導に必要なタンパク質であると考えられる。また、*CGR1* 発現が飢餓状態で増加することなどから、この因子は ストレスタンパク質の一種

であると考えられている。

シアル酸とは、ノイラミン酸の *N*-アセチル、*N*-グリコリル、*N*, *O*-ジアセチル化体の総称で、広く自然界に存在し、ムチン、糖タンパク質、ガングリオシド、ミルクオリゴ糖、微生物ポリマーなどに含まれている。¹¹⁾

今回我々は、*N*-アセチルノイラミン酸に *C. albicans* 酵母形から菌糸形への形態変化を抑制する作用のあることを見出し、その作用機構の解析を行った。

材料及び方法

1. 供試菌株

C. albicans NIH A-207 株は、Sabouraud's 培地 (グルコース 20g/L, ペプトン 10g/L, 酵母エキス 5g/L) で 27 °C, 24 時間培養を行い、実験に使用した。

2. 菌糸誘導阻害効果の測定

菌糸形の *C. albicans* は、Sabouraud's 培地で前培養した菌体を RPMI1640 培地 (日本製薬) に懸濁し (1 × 10⁴ cells/ml), 37 °C, 5% CO₂ 条件下で培養することで誘導した。*N*-アセチルノ

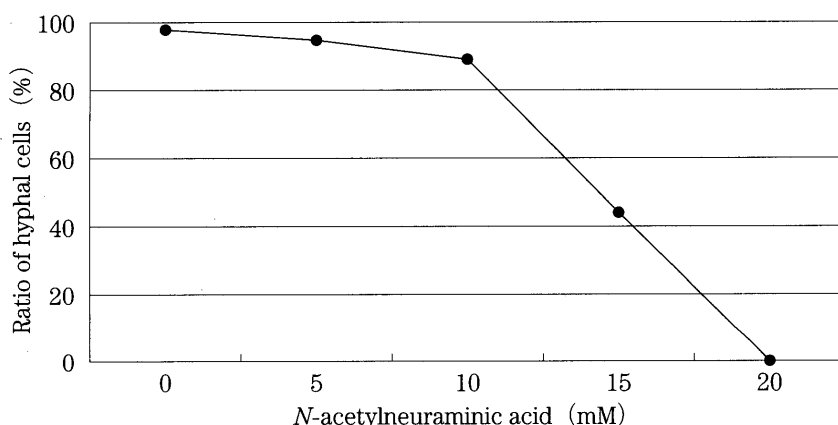


Fig. 1. Effect of *N*-acetylneuraminic Acid on The Transformation of *C. albicans* Cultured in RPMI1640 Medium. *C. albicans* were suspended in RPMI1640 medium (1×10^4 cells/ml), and exposed to various concentrations of *N*-acetylneuraminic acid for 18 h at 37 °C in 5% CO₂.

イラミン酸 (Nacalai tesque 社) またはジルチアゼム (Sigma-Aldrich 社) の菌糸誘導阻害効果の測定は, この培養系に *N*-アセチルノイラミン酸またはジルチアゼムをそれぞれ最終濃度 5, 10, 15, 20mM または 5, 10mM となるように添加して培養した. 培養終了後, 酵母形菌体数を血球計算盤を用いて測定した. また総菌数の測定はクリスタルバイオレットを用いた比色法により行った. すなわち, 培養懸濁液 1 ml に対して 0.2% クリスタルバイオレット 10 μ l を加え, 15 分間染色後, 2000 rpm で遠心し, 上清中に残った色素量を 590 nm の吸光度として測定し, 菌体に吸収された色素量から総菌数を算出した. 菌糸誘導率は, [(総菌数 - 酵母菌数) / 総菌数] \times 100 の式により算出した.

3. *CGR1* mRNA の発現量の比較

C. albicans を *N*-アセチルノイラミン酸 (20 mM) で 37 °C, 3 時間処理した後, Cells-to-cDNA™ (Ambion 社) を用いて cDNA を作製した. 作製した cDNA は Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich 社) と, iCycler (Bio-Rad Laboratories 社) を用いた PCR で増幅し, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies 社) により DNA 量を測定した. *CGR1* mRNA の相対比は *ACT1* (アクチン) mRNA を対照に算出した.

PCR 用プライマーは Search Launcher in Human Genome Sequencing Center (Baylor College of Medicine) を利用して設計した.

PCR に用いたプライマーの配列は以下に示した:

CGR1: 5'-TTCAACCCGAAGGTAAATTATATCGAA-3', 5'-TCTTTTGGCAGCAATTTTAATTTCG-3',
ACT: 5'-ACTCACGTTGTTTCGAATTTACGCT-3',
 5'-ACCACCAGACATAACAATGTTACCG-3'.

実験結果

1. *N*-アセチルノイラミン酸の菌糸形成阻害効果

C. albicans の酵母形菌体を *N*-アセチルノイラミン酸を含む RPMI1640 培地で培養し, 菌糸形成率を測定した (Fig. 1). *C. albicans* 酵母菌体を RPMI1640 培地で培養すると, 培養開始後 3 時間目から菌糸形が誘導された. この培養系に, *N*-アセチルノイラミン酸を添加すると, 濃度依存的に菌糸形成が阻害され, 酵母形で増殖することが明らかになった.

2. *N*-アセチルノイラミン酸の *CGR1* mRNA 発現抑制

CGR1 は *C. albicans* の形態変化に関わるカルシウム輸送タンパク質であることから, ¹⁰⁾ *N*-ア

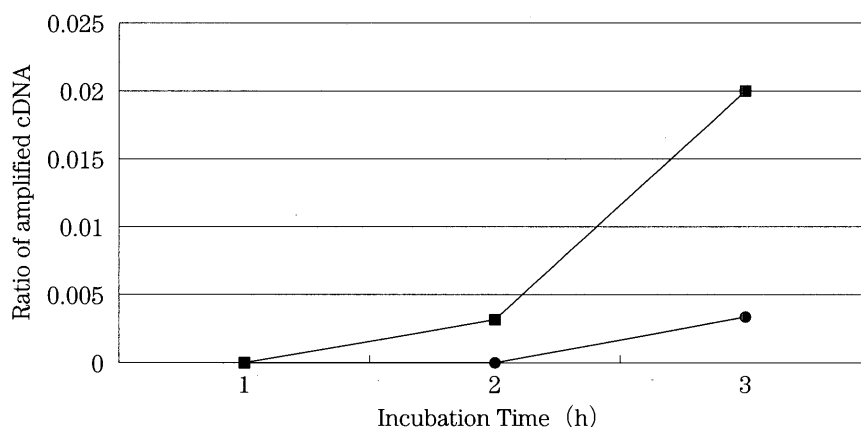


Fig. 2. Effect of *N*-Acetylneuraminic Acid on Expression of *CGR1* mRNA. *C. albicans* (1×10^5 cells/ml) was incubated with (●) or without (■) 20mM *N*-acetylneuraminic acid at 37 °C in RPMI1640 medium. After the incubation, the expression of *CGR1* mRNA was measured by RT-PCR method.

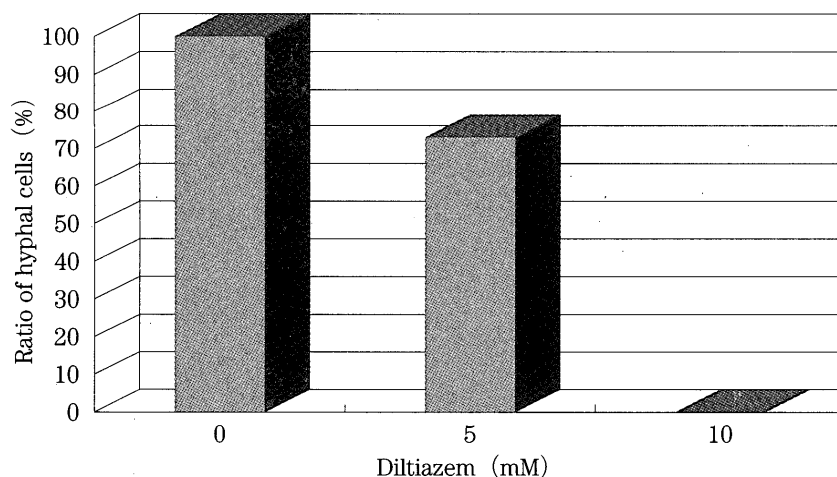


Fig. 3. Effect of Diltiazem on The Transformation of *C. albicans*. *C. albicans* were suspended in RPMI1640 medium (1×10^4 cells/ml), and exposed to various concentration of Diltiazem for 18 h at 37 °C in 5% CO₂. After the incubation, the ratio of hyphal cells was measured as described in Materials and Methods.

セチルノイラミン酸を添加1, 2, 3時間後に *CGR1* mRNA 発現量の比較を行った。その結果, RPMI1640 培地で培養した群では, *CGR1* mRNA 発現量が経時的に増加し, 菌糸形の誘導が始まる3時間目で最も高い値を示した。それに対し, *N*-アセチルノイラミン酸添加群では, いずれの時間帯においても *CGR1* mRNA 発現が著しく抑制された (Fig. 2)。

3. カルシウムチャンネル阻害剤の影響

N-アセチルノイラミン酸が *CGR1* mRNA の発現を抑制していることから, 菌糸形誘導阻害効果はカルシウムを介した刺激伝達系の抑制により引き起こされていると推察された。そこで, カルシウムを介した刺激伝達系を抑制する目的でカルシウムチャンネル阻害剤であるジルチアゼムを菌体に添加し, 菌糸形成が阻害されるか否かを検討した。その結果, ジルチアゼムを添加

した群では菌糸形成の抑制が認められた (Fig. 3). ジルチアゼム添加群の細菌数は培養終了時点で約 1×10^6 cells/ml まで増殖していたことから, ジルチアゼム添加による菌糸形成阻害が細胞死によるものではないことを確認している.

考 察

C. albicans は日和見感染症を引き起こす真菌であり, 口腔カンジダ症の原因菌としてよく知られている.¹²⁾ 健康なヒトの口腔内では *C. albicans* は病原性を示さないが, 基礎疾患が原因による免疫不全状態では, 口腔内で増殖し, 障害を引き起こす. 口腔カンジダ症の要因の一つに唾液の減少が報告されている.¹³⁾ 唾液は口腔内を清潔に保つ重要な役割をしており,¹⁴⁾ 抗カンジダ活性を示すタンパク質も唾液中に多く含まれている.¹⁵⁾ しかし, 唾液中の形態変化に関わる因子の存在についての報告はない.

今回我々は, 唾液中の構成糖の一つ, *N*-アセチルノイラミン酸に *C. albicans* の形態変化を抑制する活性があることを見出した. 今回実験で使用した菌糸形誘導培地 (RPMI1640 培地) で *C. albicans* を培養すると菌糸形で増殖することが知られている.¹⁶⁾ この培地に *N*-アセチルノイラミン酸を添加すると *C. albicans* 酵母形菌体は菌糸形に変化せず, 酵母形のまま増殖していくことを見出した (Fig. 1). *CGR1* は酵母形の増殖停止と germination の開始に関与するという報告があることから, *N*-アセチルノイラミン酸で刺激した *C. albicans* の *CGR1* mRNA の発現量を測定した (Fig. 2). *CGR1* mRNA の発現は, 菌体を RPMI1640 培地で培養した場合, 菌糸形に変化する 3 時間目で高い発現が確認された. それに対し, *N*-アセチルノイラミン酸添加群では 3 時間目の発現量が著しく減少し, この現象は菌糸形の増殖が始まる時間とほぼ一致することから *CGR1* mRNA の発現量が減少することにより酵母形から菌糸形への形態変化が抑制されることが推察された. カルシウム輸送タンパク質である *CGR1* 発現抑制が *N*-アセチルノイラミン酸の菌糸形成阻害に関係していると推

察されることから, カルシウムを介した刺激伝達系を抑制することにより酵母形から菌糸形への形態変化を抑制することができるか否かを検討した (Fig. 3). カルシウムチャネル阻害剤を *C. albicans* に添加した結果, *N*-アセチルノイラミン酸と同様に菌糸形への形態変化が抑制され, 酵母形で増殖することが認められた.

以上の結果より, *N*-アセチルノイラミン酸の菌糸形成抑制効果は *CGR1* mRNA 転写阻害によるカルシウム刺激伝達系の抑制によるものであることが明らかになった.

REFERENCES

- 1) Hauman C. H., I. O. Thompson, F. Theunissen, and P. Wolfaart., *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **76**, 570-572 (1993).
- 2) Knight L., and Fletcher J., *J. Infect. Dis.*, **123**, 371-377 (1971).
- 3) Clift R. A., *Am. J. Med.*, **77**, 34-38 (1984).
- 4) Klein R. S., C. A. Harris, C. B. Small, B. Moll, M. Lesser, and G. H. Friedland., *N. Engl. J. Med.*, **311**, 354-357 (1984).
- 5) Shibuya K., W. F. Coulson, J. S. Wolman, M. Wakayama, T. Ando, T. Oharaseki, K. Takahashi, and S. Naoe, *Int. J. Infect.*, **5**, 78-85 (2001).
- 6) Cutler J. E., *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 187-218 (1991).
- 7) Ishii N., M. Yamamoto, F. Yoshihara, M. Arisawa, and Y. Aoki, *Microbiology*, **143**, 429-435 (1997).
- 8) Stoldt V. R., A. Sonneborn, C. E. Leuker, and J. F. Ernst, *EMBO J.*, **16**, 1982-1991 (1997).
- 9) Zaragoza O., Blazquez A. M., Gancedo C., *J. Bact. eriol.*, **180**, 3809-3815, (1998).
- 10) Cho T., Sudoh M., Tanaka T., Nakashima Y., Chibana H., Kaminishi H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1517**, 288-292 (2001).
- 11) Jourdan W. G., Dean L., Roseman S., *J. B. C.*, **246**, 2, 430-435 (1971).
- 12) Crockett D. N., O'Grady J. F., Reade P. C., *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **73**, 559-563 (1992).
- 13) Wahlin Y. B., *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*,

- 71, 689-695 (1991).
- 14) Mandel I. D., *J. Am. Dent. Assoc.*, **119**, 298-304 (1989).
- 15) Helmerhorst J. E, Murphy P. M, Troxler F. R., Oppenheim G. F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 73-80 (2002).
- 16) Manns J. M., Mosser D. M., Buckley H. R., *Infect. Immun.*, **62**, 5154-5156 (1994).