

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	田中 大（宮城県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	薬科 第3号
学位授与の日付	平成30年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当
学位論文題名	病原性真菌の細胞壁保全性調節機構とその分子に関する研究
論文審査委員	主査 教授 永田 清
	副査 教授 久下周佐
	副査 教授 柴田 信之

病原性真菌の細胞壁保全性調節機構とその分子に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

感染生体防御学教室 田中 大

真菌細胞壁はヒト病原性に関わる抗原である一方、いくつかの抗真菌薬の標的であり、さらに、外的な環境ストレスから身を守るための防護壁でもある。一般に数種類の多糖から構成される真菌細胞壁は、環境ストレス負荷に応答して糖組成や結合様式、分岐度などのパラメータをダイナミックに操り、多彩な構造を構築することで、様々な外的要因への順応に寄与する。このような環境の変化応答性に細胞壁保全性 (Cell Wall Integrity: CWI) を調節・制御する機構は CWI 経路と呼ばれており、ほとんどの真菌に保存されている。興味深いことに、一部の病原性真菌は、ストレス応答 MAP キナーゼを介した古典的 CWI 経路の他に、あるいはこれとクロストークする形で、種特異的な CWI 機構を持つことが明らかになってきた。本研究では、臨床上重要な病原性真菌である *Candida glabrata*、および、*Aspergillus fumigatus* の種特異的な CWI 機構やそれに関わる分子について解析した。

1) *C. glabrata* における *IRE1-HAC1* 経路非依存的な小胞体ストレス応答性細胞壁キチン生合成活性化機構

C. glabrata は代表的な *Candida* 症原因菌であり、高頻度に臨床分離される *C. albicans* に比べて、一部のアゾール系抗真菌薬に低感受性であることが臨床上の課題である。加えて、*C. glabrata* はキャンディン系抗真菌薬の暴露によって CWI 経路活性化を誘導する性質を持つ。すなわち、細胞壁キチン生合成を活性化することでキャンディン系薬による β グルカン合成阻害を補償し、実効的な最小発育阻止濃度を高める現象 (Paradoxical Effect) を誘導することが知られている。このような β グルカン構造異常に伴うキチン生合成活性化は古典的 CWI 機構の一つであり、Slt2 MAP キナーゼがその中核を担うことが知られている。近年、小胞体 (ER) における糖タンパク質生合成不全、すなわち ER ストレスに対する応答と古典的 CWI 経路とのクロストークが注目されている。しかしながら、*C. albicans* や *A. fumigatus* では、ER を起源とする *IRE1-HAC1* 経路が CWI 調節に関与するのに対して、興味深いことに、

C. glabrata は *IRE1-HAC1* 経路を機能的に欠損することがわかっている。加えて、実験的事実として、*C. glabrata* は ER ストレス誘導剤であるツニカマイシン (TM) や還元剤ジチオスレイトールに対する感受性が近縁種 *C. albicans* に比べて低い。以上の理由から、*C. glabrata* における ER ストレス応答と CWI 調節のクロストークの有無やその制御には不明な点が多かった。

ER 局在タンパク質 Kre5p は、分子シャペロンタンパク質 Cne1p と協調して、ER における変性糖タンパク質の再フォールディングを担っている。これら遺伝子の機能異常は、ER 内変性糖タンパク質の増加、すなわち ER ストレスを誘導する。加えて、*S. cerevisiae* や *C. albicans* では、これら遺伝子の欠損は細胞壁 β グルカン含量の減少をもたらすことが知られている。そこで、*C. glabrata* におけるこれら遺伝子の変異株を作製して、TM 暴露下の表現型と比較解析することで、ER ストレスと CWI の関わりについて検討した。

まず、ドキシサイクリン (DOX) 依存性に *KRE5* 遺伝子の発現を抑制する *C. glabrata* 株を作製し、細胞壁糖組成を測定したところ、*KRE5* 遺伝子発現が減弱した群では、細胞壁 β 1-6 グルカン含量が減少する一方、細胞壁キチン含量が増大することが明らかになった。また、*KRE5* 遺伝子発現抑制に伴い、TM 暴露条件と同様に、ER ストレス標的遺伝子の mRNA 発現レベルが増大した。続いて、*CNE1* 遺伝子欠損株 (*cne1 Δ*) についても解析したところ、*KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様に、細胞壁 β グルカン含量の減少、細胞壁キチン含量の増大、ER ストレスマーカーの発現上昇が観察された。これらのことは、*C. glabrata* も他の菌と同様、ER ストレスに応答する何らかの機構を有していることを示唆している。また、TM 処理、あるいは *KRE5* 遺伝子発現抑制や *CNE1* 遺伝子の欠損によって、Slt2 MAP キナーゼのリン酸化が活性化することがわかった。これらのことは、Slt2 MAP キナーゼを介したキチン生合成の活性化が ER ストレス応答によって誘導されることを示唆している。興味深いことに、カルシウムキレーターやカルシニューリン阻害剤をこれらの株に処理すると、Slt2p のリン酸化とキチン生合成活性化が更に亢進するにも関わらず、細胞凝集が解消され、菌の生育が大幅に抑制されることがわかった。これらのことは、TM 暴露や遺伝子発現抑制に伴うキチン生合成活性化にはカルシウムシグナル伝達が関与していること、さらに、カルシウムシグナル伝達の機能が正常な CWI 調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。

以上のことから、*C. glabrata* は *IRE1-HAC1* 経路を機能的に欠損しているにも関わらず ER ストレス応答を誘導できること、ER ストレス誘導と古典的 CWI 経路のクロストークのあること、さらに、この調節にはカルシニューリン経路やカルシウムシグナリングが重要な働きをしていることが明らかになった (Fig. 1)。

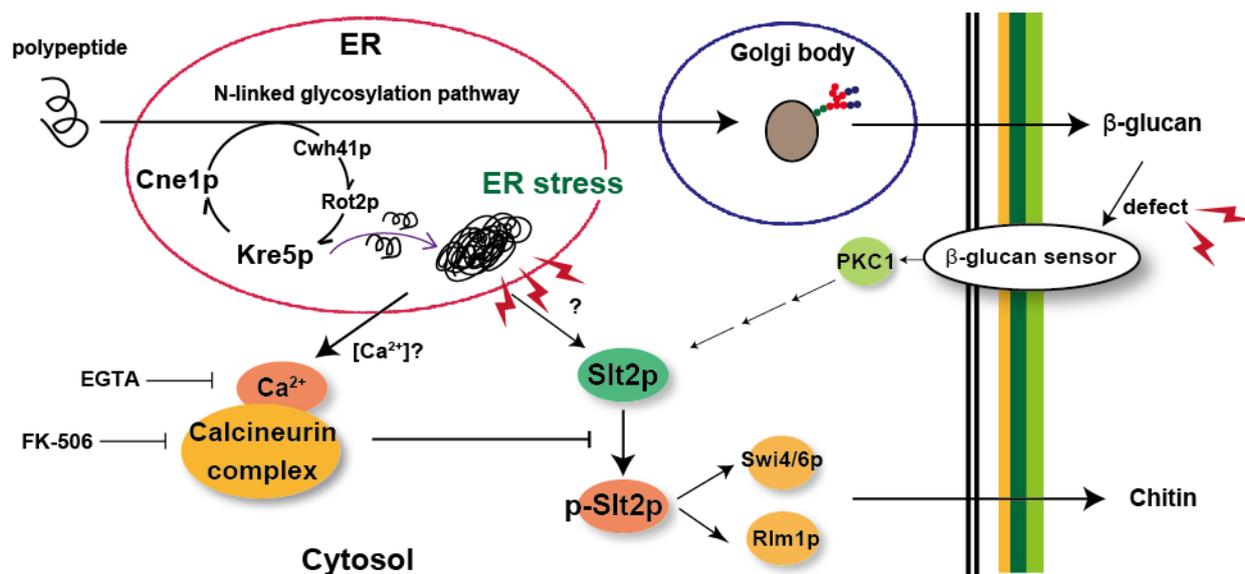


Fig.1. *C. glabrata* の糖タンパク質分泌経路と ER ストレス応答性 CWI 制御

2) *A. fumigatus* における細胞壁 5 員環型ガラクトース糖鎖生合成および分解に関わる遺伝子の同定と遺伝子産物の酵素学的解析

A. fumigatus の細胞壁ガラクトマンナン (GM) は、 β グリコシド結合から成る 5 員環型ガラクトース (Gal_f) 糖鎖構造を含んでいる。 β 結合 Gal_f 糖鎖は *A. fumigatus* 菌糸の付着性やヒト侵襲性にかかわることが示唆されており、当研究室では、この β 結合 Gal_f 糖鎖が炭素源制限や低 pH に応答して構造変化することを見出している。このことは、この β 結合 Gal_f 糖鎖が CWI 調節を受ける可能性を示唆しているが、GM 生合成に関わる Gal_f 転移酵素、および分解に関わる Gal_f 加水分解酵素 (Gal_fase) は未同定であった。本研究では、Gal_f 転移酵素候補遺伝子 *gfsA* の細胞壁 GM 生合成に及ぼす役割を明らかにする目的で、リコンビナント GfsA を作製して *in vitro* 酵素活性を評価するとともに、*gfsA* 遺伝子欠損株 ($\Delta gfsA$) を作製して細胞壁 GM の構造解析を行い、*in vivo* 細胞壁構造に及ぼす影響を確かめた。また、*A. fumigatus* の分泌型 Gal_fase の分離精製法を確立し、精製 Gal_fase の酵素学的解析を実施した。

まず、大腸菌発現系にてリコンビナント GfsA を用いて *in vitro* 酵素活性を評価したところ、GfsA は β 1-5Galf 転移活性を有するタンパク質であることがわかった。次に、 Δ *gfsA* の細胞壁画分を抽出し、NMR とメチル化分析を行ったところ、細胞壁 GM 中の β 1-5Galf 糖鎖長が短くなっていることが明らかになった。このことから、*gfsA* 遺伝子は GM の β 1-5Galf 生合成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、*A. fumigatus* の培養上清を出発原料とし、イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることで精製したところ、高純度の Galfase タンパク質が得られた。これを用いて、反応温度や pH、基質特異性を検討したところ、精製 Galfase は 37°C、pH5.5 付近で最も高い活性を示し、D-Galf や L-アラビノフラノースに高い特異性を持つことが分かった。さらに β 1-5Galf 糖鎖、および、 β 1-6Galf 糖鎖を用いて、精製 Galfase の基質特異性を調べた。その結果、精製 Galfase は β 1-5、および β 1-6 いずれの Galf 糖鎖にもエキソグリコシダーゼ活性を示すことが明らかになった。

主論文（原著論文）

1. 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***, 11: e0161371(2016)
2. Tanaka Y, Sasaki M, Ito F, Aoyama T, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Shibata N. Cooperation between ER stress and calcineurin signaling contributes to the maintenance of cell wall integrity in *Candida glabrata*. ***Fungal biology***, in press (2017).
3. 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 β 1,5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. ***Glycobiology***, 27:568-581(2017)
4. 田中 大、佐々木 雅人、伊藤 文恵、柴田 信之、*Aspergillus fumigatus* における菌体外分泌型ガラクトフラノシダーゼの酵素学的解析、東北医科薬科大学研究誌、63、71-81 (2016)