

# 病原性カンジダ酵母における人体内生戦略遺伝子ネットワークの研究

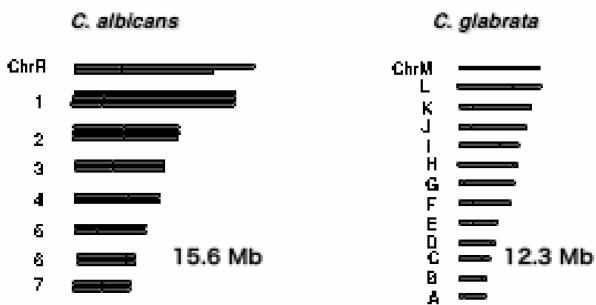
●知花博治<sup>1)</sup> ◆宇野 潤<sup>1)</sup> ◆中山浩伸<sup>2)</sup>

1) 千葉大学真菌医学センター 2) 鈴鹿工業高等専門学校

## 〈研究の目的と進め方〉

カンジダは人体内に常在する極めて珍しい真菌である。健常者にとっては大きな問題とはならないが、エイズや免疫抑制剤の投与によって免疫力の低下した患者に対しては重篤な日和見深在性感染症を起こすため問題となっている。真菌は、分類学的に細菌、植物や粘菌よりもむしろ動物に近い生物である。このために抗真菌活性を持つ物質の多くは人間に対しても作用があり、抗真菌薬の開発が難しい状況にある。またカンジダは複雑な病原性を有しており、病原因子についても未解明な部分が多いため治療方法も確立できていない。このような状況の中、これまで分子生物学的解析の難しかった病原真菌についてゲノムシーケンスプロジェクトが次々に立ち上がった。申請者は、日和見真菌症の中で世界的に最も大きな問題となっているカンジダのゲノムシーケンスプロジェクトに貢献し、ポストゲノムにおいて、病原性の解明と優れた抗真菌薬の開発を目指している。

カンジダ属のうち最も高頻度で臨床的に分離されるのは、*Candida albicans*で、次に頻度の高い種は最近患者数が増加している*C. glabrata*である。*C. albicans*は異数性、ゲノムの不安定性などの原因により網羅的遺伝子機能解析が難しい。これに対し、*C. glabrata*の病原性は*C. albicans*に比べるとやや低いものの、遺伝子操作が容易で網羅的な組換え体の構築に適している。また*C. glabrata*は分類学的に*C. albicans*よりもむしろ*Saccharomyces cerevisiae*に近く*S. cerevisiae*において蓄積されたゲノム情報を参考に遺伝子ネットワークの解析を進めることができる。我々は*C. albicans*(強病原性)、*C. glabrata*(弱病原性)、*S. cerevisiae*(非病原性)のそれぞれの利点を活かしてゲノムレベルでの比較を行いながら研究を進める。

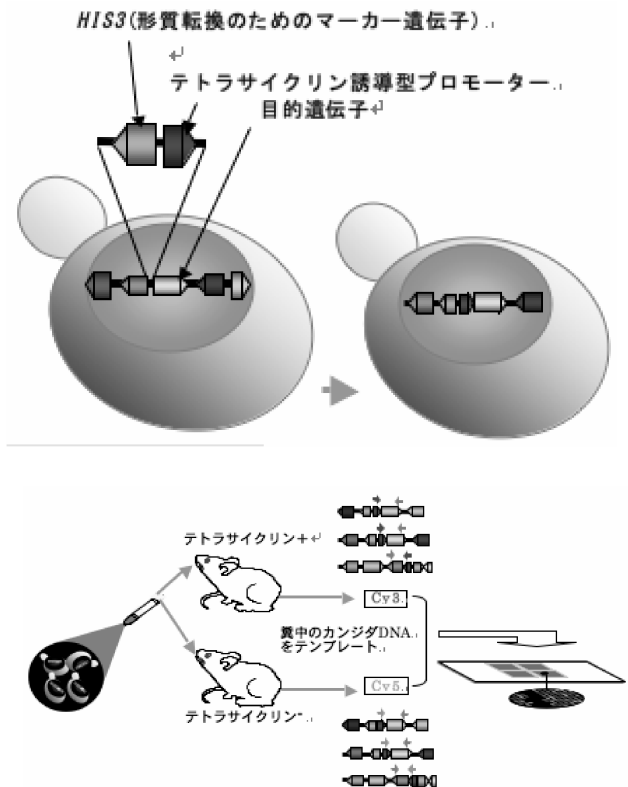


## 〈研究開始時の研究計画〉

*C. albicans*ならびに*C. glabrata*の全ゲノムシーケンスは、ほぼ終了しており、我々はシーケンス情報を用いて各遺伝子機能を解析する。機能解析は、テトラサイクリン制御型プロモーターを各遺伝子のプロモーターと置換し、テトラサイクリンの有無によって表現型の違いを観察する。この系は、*in vitro* および*in vivo*での遺伝子解析が可能である。*C. albicans*の場合は2倍体なので一方の対立遺伝子は削除しておく。

テトラサイクリン制御型プロモーターを導入した菌株をマウスに経口投与し、飲料水中のテトラサイクリンの

有無によりマウス体中の*Candida*の標的遺伝子の発現を制御することができる。まとまった数の組換え体を同時に投与し糞中から全DNAを回収し、TETpの3'側にプライマーをアニールさせCy3, Cy5で各々ラベルしDNAアレイにハイブリダイズさせる。この方法によって腸管常在性に関係する遺伝子の組換え体はシグナルの強さに大きな変化が現れスクリーニングする。



## 〈研究期間の成果〉

1994年に開始されたゲノムプロジェクトは、スタンフォード大学、ミネソタ大学、千葉大学によって進められ、15.6 Mb×2のドラフトゲノムシーケンスを2004年に発表した(1)。2005年には染色体7番(1Mb)についてfinishingの報告を行った(5) [http://www.suzuka-ct.ac.jp/info/lab/aoyama/Candida\\_albicans\\_ch7/pageAll.html](http://www.suzuka-ct.ac.jp/info/lab/aoyama/Candida_albicans_ch7/pageAll.html)。残る全染色体についてはカナダBRCが中心となりfinishing作業を進めており、我々も引き続き共同研究を行っている<http://candida.bri.nrc.ca/alignments/index.cfm>。

得られたゲノムシーケンス情報を基に下記の研究を行った。

カンジダ・アルビカンスの形態は酵母形と菌糸形があり、病原性には菌糸形が関与すると考えられており、菌糸形誘導時に特異的な遺伝子の発現量を測定した(2)。カンジダ・アルビカンスのゲノムは異数性を示し、このことが薬剤感受性に影響している。異数性が染色体不分離によるものであり、染色体不分離が反復配列(MRS)の反

復回数に影響することを示した(3)。カンジダ・アルビカンスの遺伝子ノックアウト法で宿主として主に用いられているCAI-4株では、URA3とともに隣接するIRO1も破壊されている。これまで遺伝子ノックアウト株を用いた解析においてIRO1破壊の影響は考慮されていなかったが、IRO1も病原性に影響することを我々は示した(4)。カンジダ・アルビカンスのゲノム中には172bpのタンDEM反復配列が存在し、その反復回数によって菌株を識別できることを以前示した。これを応用して臨床分離株の菌株識別を行った(6)。

*S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*の真菌類およびヒトゲノムのデータベースを用いて、真菌類に高く保存され、人には類似性の低い遺伝子を抽出した。*S. cerevisiae*では富栄養下での生育必須遺伝子が同定されており、我々が抽出した遺伝子の中からこれらの遺伝子に対する187のオーソログ遺伝子を抽出した。これらを抗真菌薬標的候補とし、TetPを各遺伝子のプロモーター領域に導入した株(Tet株)を体系的に構築しており、これまでに183株を完成させた。非必須遺伝子に対しては、生育の必須性を指標にしたスクリーニングが不可能であるためTet株の構築が非効率的である。*Saccharomyces cerevisiae*においてYKU80が、Non-homologous End Joiningを誘導することが知られている。我々は*C. glabrata*におけるYKU80に対するオーソログ遺伝子について欠損株を構築し、ターゲティングの効率が上昇することを既に確認した。しかし、YKU80のDNA修復において重要な遺伝子であるため欠損株では、ゲノムの不安定化などの支障を来すことが予測される。したがって、TetPの導入後に速やかにYKU80を復帰させなければならない。現在YKU80のノックアウトあるいはノックダウン、TetPの導入、YKU80の復帰の一連の作業をハイスループットで行える系を構築した。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

2005年5月、フランスにおいて*C. glabrata*ゲノム機能解析に関する会合を開催し、協調的に研究を進めていくことの合意を得た。来年会合を再度開催し、菌株の構築法の統一や作製菌株共有等を検討することになった。我々の系が標準化されることをめざしており、現時点で我々が他のメンバーをリードしている。メンバーはKarl Kuchler (Austria), Dominique Sanglard (Switzerland), Ken Haynes (UK), Steffen Rupp (Germany), Brendan Cormack (USA)。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

スタンフォード大学において進められて来た*C. albicans*ゲノムシーケンシングプロジェクトの進行が遅れたため、我々も協力シドラフトシーケンシング(15Mbp)を完成させた。*C. albicans*は二倍体生物で有性生殖は行わないとされており、これが原因で相同染色体間でヘテロな塩基配列が多く見られシーケンシングのアセンブルに混乱を来している。ドラフトシーケンシングは421本のコンティグで構成されており、各ギャップのシーケンシングをPCR法によって増幅、配列の決定を行い、さらに修正を加え1Mbpのシーケンシングを完成させた。

#### 〈今後の課題〉

構築したTet株を用いて、*in vivo*での生育について解析する。マウスの糞中(常在性能)および腎臓(深在感染能)から全DNAを回収し、これを鋳型として用い各ORF

上とTetpDNA上には蛍光標識したプライマーを設計しPCRを行う。標識されたPCR産物をDNAチップにハイブリダイズさせることにより、各遺伝子の腸管常在性および深在感染性への影響を経時的、定量的に解析する。またTetpカセットの非同相組換えにより、約1,000と推測される生育必須遺伝子を網羅的に探索する。さらにTet株の作製は最終的に全ゲノムを対象とするためさらに高度なハイスループット化を行う。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 0405261330: Ted Jones, Nancy A. Federspiel, Hiroji Chibana, Jan Dungan, Sue Kalman, B. B. Magee, George Newport, Yvonne R. Thorstenson, Nina Agabian, P. T. Magee, Ronald W. Davis and Stewart Scherer, The diploid genome sequence of *Candida albicans*, *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, 101(19):7329-7334, 2004
- 2) 0602110739: Mika Toyoda, Tamaki Cho, Hidenori Kaminishi, Masayuki Sudoh and Hiroji Chibana: Transcriptional profiling of the early stages of germination in *Candida albicans* by real-time RT-PCR, *FEMS Yeast Research*, 5(3):287-96, 2004.
- 3) 0602102011: Paul R. Lephart, Hiroji Chibana and Paul T. Magee: Effect of the Major Repeat Sequence on Chromosome Loss in *Candida albicans* *Eukaryotic Cell*, 4(4):733-741, 2005.
- 4) 0403311030: Hiroji Chibana, Nao Oka, Hironobu Nakayama, Toshihiro Aoyama, B.B. Magee, P.T. Magee and Yuzuru Mikami: Sequence finishing and gene mapping for *Candida albicans* Chromosome 7, and syntenic analysis against *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Genetics*, 170(4) 1525-1537, 2005.
- 5) 0602110745: Hiroji Chibana, Jun Uno, Tamaki Cho, and Yuzuru Mikami, A mutation in IRO1 tightly linked with URA3 gene reduces virulence of *Candida albicans*, *Microbiol Immunol*, 49(10), 937-939, 2005.
- 6) 0602110801: Takako Iwata, Hisao Hattori, Hiroji Chibana, Yuzuru Mikami, Yasushi Tomita, Akihiko Kikuchi, Toshio Kanbe. Genotyping of *Candida albicans* on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS). *J. Dermatol. Sci.* 41, 43-54, 2006.

データベース

<http://candida.bri.nrc.ca/alignments/index.cfm>

[http://www.suzukact.ac.jp/info/lab/aoyama/Candida\\_albicans\\_ch7/pageAll.html](http://www.suzukact.ac.jp/info/lab/aoyama/Candida_albicans_ch7/pageAll.html)