

# カンジダ酵母における網羅的発現制御株の構築と応用—病原性ゲノム機能学—

●知花 博治<sup>1)</sup> ◆宇野 潤<sup>1)</sup> ◆中山 浩伸<sup>2)</sup> ◆青山 俊弘<sup>2)</sup>

1) 千葉大学真菌センター 2) 鈴鹿高専

## <研究の目的と進め方>

カンジダ (*Candida*) をはじめとする病原真菌の中には、重篤な日和見感染の原因菌が存在する。しかし、病原性には複数の因子が関与し病原性を呈していると考えられており、未解明な点が多い。治療の第一選択は抗真菌薬が処方されるが、抗真菌薬の多くはヒトに毒性を示し、より優れた新規抗真菌薬の開発が望まれている。抗真菌活性を示す物質の多くが、ヒトへの副作用も有するため、真菌への選択性が高く、ヒトへの副作用のない抗真菌薬の開発は難しい状況である。ゲノムシークエンス解析の結果から、真菌はこれまで考えられていた以上にヒトに近縁ということが分かってきており、選択性を上げることの困難さが、遺伝子レベルで確認されている。したがって、優れた抗真菌薬の開発は、無作為なスクリーニングでは、困難であると考えられる。我々は、病原真菌における病原性の普遍性を追求することを最終目的とした *Candida glabrata* のフェノームプロジェクト（網羅的遺伝子機能解析）を展開している。*C. glabrata* は、病原真菌の中で遺伝子操作が最も容易であり網羅的機能解析に最適である。本計画では *C. glabrata* のゲノム (5,300 遺伝子) の中で、必須遺伝子に対してテトラサイクリン転写抑制株 (Tet 株) を、非必須遺伝子に対してはノックアウト株を体系的に構築している。本計画では、いくつかの応用研究 (サブプロジェクト) を設定し、研究を進めており、最初の応用研究は全ゲノムから抗真菌薬の最適な標的を抽出することである。最適な標的の条件として 1) ヒトに相同性がないか、あるいは極めて低いこと、2) ゲノム配列が公開されている病原真菌に高く保存されていること、3) *in vivo* で必須であること、以上の 3 点を掲げている。1) と 2) の条件を満たす遺伝子をまず、相同性検索により抽出する。次に 3) の条件を満たすために *C. glabrata* において Tet 株を構築し、Tet 株を用いて *in vivo* での生育評価を行う。以上、組換え株の構築を軸として、構築した株を利用した応用研究を展開して行く。

## <2008 年度の研究の当初計画>

1) KU80 ノックダウンシステムを用いた KO 株 (遺伝子欠損株) の作製：カンジダ・グラブラータでは、短い相同配列 (100bp 以下) を介したターゲティングの効率が低く、多数の遺伝子を処理することは困難であった。そこで、我々は相同組換えの効率を上げるために YKU80 ノックダウンシステムを構築した (Ueno et al. 2007)。このシステムを用いて生育必須遺伝子については、Tet 株 (テトラサイクリン制御プロモーターを導入した株) を構築し、生育非必須遺伝子に対しては、遺伝子欠損株の構築を進めている。平成 20 年度は合計 1,000 遺伝子について組換えの構築を行う。

2) ハイスループットな感染実験系の構築：組換え株を用いた最初の応用研究として、抗真菌薬の標的の探索を進めている。ヒト遺伝子への相同性の低さ、他の病原真菌への相同性の高さなどを比較し、全ゲノムの中から抗真菌薬の標的として有望なタンパクをコードする遺伝子を 180 遺伝子抽出した。これらの遺伝子について Tet 株を構築し、その Tet 株を用いて、培養温度、血清の有無、菌体密度などの条件変化に対する各遺伝子の影響を詳細に調べ、抗真菌薬の標的のランキングを行い、トップ 30 の遺伝子を選出した。本研究では、これらの株をマウスに感染させ *in vivo* での必須性を判定する。しかし、これまでのマウスを用いた感染実験では、1 株あたり 30 頭以上のマウスが必要であった。我々は今後、多数の株を用いて感染実験を実施しなければならず、マウスの使用頭数を抑える必要がある。そこで、本研究では、ハイスループットなマウス感染実験系を構築することとしている。

3) 全 cDNA の配列決定：カンジダ・グラブラータのゲノムシークエンスは公表されているが (Nature 2004)、cDNA 解析の報告は未だない。最近アノテーションに間違いあることが分かってきた。我々は全遺伝子の機能解析を目標としており、より正確なアノテーションデータを得ることは重要なことである。そこでまず、未同定遺伝子の検出や転写開始点を解析するために全 cDNA 配列の決定を行う必要が生じた。本邦でも次世代シークエンサーの導入が進んでおり比較的低コストでの解析が可能となって来たので、次世代シークエンサーを用いて cDNA の全長シークエンスの決定を行う。その情報をもとにゲノムシークエンスのリアノテーションを実施する。シークエンスの解析ならびに再アノテーションは、連携研究者の鈴鹿高専 中山浩伸、青山俊弘が行う。

## <2008 年度の成果>

- 1) KU80 ノックダウンシステムを用いた KO 株 (遺伝子欠損株) の作製：本年度の株の構築状況は 300 程となっており、予定の 1,000 に及ばない。これまで、約 1,100 遺伝子があると推測される必須遺伝子に対して網羅的に Tet 株の構築を進めて来たが、そのうち約 10% の遺伝子については Tet 株を構築できていない。現在これらの遺伝子に対して、再度 DNA カセットの再設計などを行い、Tet 株の構築を進めている。
- 2) ハイスループットな感染実験系の構築：マウス (ICR) に対して、定期的に免疫抑制剤とドキシサイクリンを効かせながら、*C. glabrata* の Tet 株 3 種類を混合した菌懸濁液を静脈に接種した。その後、7 日目、14 日目、21 日目と一週間毎にマウスの 5 頭分の腎臓をそれぞれ摘出し、これを破碎し、寒天培地に塗抹した。3 日後それぞれ、30 個のコロニーを 1 つのチューブにまとめて、懸濁した。これを 20 本調整し、それぞ

れのチューブ毎にDNAを回収し、テンプレートDNAとした。30種類のTet株に対して、それぞれ特定のプライマーを設計してあり、チューブ毎にPCR産物の検出の確認を行った。この方法により、25頭のマウスを用いて、合計210本分のテンプレートサンプルを調整し、6,300回のPCRを行った。その結果を集計し、各遺伝子の*in vivo*での必須性を検証し、抗真菌薬の標的候補を13遺伝子に絞ることができた。

3) 網羅的なcDNA 5'解析：網羅的にRNAを回収するために、最少培地 (SD) を基準に37°C、42°C、C源飢餓、N源飢餓、血清、6種類の条件により*C. glabrata*の菌体を培養し、total RNAを調整した。IniTIA法 (Hashimoto et al., Nat. Biotech., 2004)によって、cDNAの5' シークエンス25bpを調整し、イルミナ社Solexaを用いてシークエンスを決定した。約1,000万リードの中で、有効なタグシークエンスは、約130万であった。このタグシークエンス (25 bp) のうち、約40万タグが*C. glabrata*のゲノムシークエンス上に完全一致したタグシークエンスをゲノム上にマッピングし、解析を進めた。約90%のORFが、第1ATGの前後にタグがマップされ、本実験の高い感度が確認された。しかし、本来、転写開始点を示すはずのタグがORFの内部にも多くマップされたため、その信憑性について検討した。その結果、IniTIA法において、RNAをBAP処理する際に脱リン酸化が不十分であり、不完全長でGcapが付与されていないRNAもcDNA化され、今回の解析データに含まれている可能性が示唆された。現在、その結果を考慮に入れながら、転写開始点の改訂、イントロン、未同定遺伝子の検出などのゲノムリアノテーションを進めている。

#### <国内外での成果の位置づけ>

米国、ニュージーランドでのシンポジウムあるいは学会へシンポジウムに招待され、研究成果の報告をすることができた。本特定領域のサポートにおいて、我々が独自に開発したYKU80ノックダウンシステムについて高い評価が得られており、8件の研究室に本システムの分与を行った。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- 1) KU80ノックダウンシステムを用いたKO株 (遺伝子欠損株) の作製：いくつかの遺伝子について、転写開始点など公開されているアノテーション情報に間違いがあり、Tetプロモーターの導入ができていない。現在進めているゲノムリアノテーションの結果を踏まえ、再度Tetプロモーターの導入を実施する。
- 2) 網羅的なcDNA 5'解析：当初、完全長cDNAの解析を実施する予定であった。Read数の多いSolexaを用いることにより、定量的な発現情報も得られることが期待されたために、予定をcDNA 5'に変更した。

#### <今後の課題>

コロニーピッカーの導入を行い、組み換え株の作業の効率化を進める。ゲノムリアノテーションの結果を踏まえ、Tet株やKO株を作製し、ゲノムリアノテーションの検証を進め、実験結果に基づいてゲノムリアノテーションを行う。

#### <成果公表リスト>

・ 0801291734

Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori, D., Aoyama, T., Kumaraswami, NS., Metzler, L., Takano, Y., Chibana, H., Niimi, M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene CgAUS1 protects cells against azoles in the presence of serum. *J Antimicrob Chemother.* 60(6):1264-72

・ 0901131647

Cho T, Aoyama T, Toyoda M, Nakayama H, Chibana H, Kaminishi H. Transcriptional changes in *Candida albicans* Genes by both farnesol and high cell density at an early stage of morphogenesis in N-acetyl-D-glucosamine medium. *Jpn J Med Mycol.* 48(4); 159-167. 2008.

・ 現在は既存のデータのみであるが、*C. glabrata*フェノミクスのデータを掲載して行くサイトを構築している。

<http://www.suzuka-ct.ac.jp/info/lab/aoyama/genome/index.html>  
(ID: candida パスワード: glabrata)