

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¹⁾ ◆宇野 潤¹⁾ ◆中山 浩伸²⁾ ◆青山 俊弘²⁾

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ほとんどがヒトへも作用するために副作用のないあるいは副作用の低い薬剤の開発は難しい状況である。最近のゲノムシーケンスの結果等から真菌は、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、このような状況の裏付けとなった。したがって、真菌に特異的に作用し、ヒトへの副作用を回避する薬剤の開発は、無作為なスクリーニングでは、困難であると我々は考えている。そこで、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と、優れた抗真菌薬の開発を目的とした *Candida glabrata* の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るため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いずれも体系的に構築している。本計画では、いくつかの小計画ごとに目標を設定しており、最初の目標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。最後にその他、問題になっている病原真菌 *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* についても各遺伝子の生育への影響を調べる。

<2007 年度の研究の当初計画>

- 1) 構築した 180 の Tet 株を用いて詳細な生育実験を行い、ゲノムの中から抗真菌薬の標的として適したトップ 30 の遺伝子を抽出する。
- 2) トップ 30 の Tet 株を用いてマウス感染実験を行い抗真菌薬の標的として適した遺伝子の順位を決定する。
- 3) 選出した抗真菌薬の標的のタンパク構造解析を検討する。
- 4) *in silico* で抗真菌薬の設計を検討する。
- 5) YKU80 ノックダウンシステムの採用とコロニーピッカーの導入によって、必須遺伝子について組換え菌株を構築する手法の迅速化を進める。
- 6) 平成 20 年度に終了を予定していた推定 1,000 の必須遺伝子に

ついて Tet 株の構築を前倒しを行い、本年度中に完成させる。

- 7) データベースの公開に向けて内容を充実させる。
- 8) トランスクリプトームの実験系を確立する。

<2007 年度の成果>

- 1) 構築した 180 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た。その結果と、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、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。
- 2) トップ 30 の Tet 株を用いてマウス感染実験は現在も進行中である。
- 3) 選出した抗真菌薬の標的遺伝子のコードするタンパクについて、プロテインデータベースの情報をもとに、4 つのタンパクについてホモロジーモデリングを行うことができた。
- 4) 標的タンパクに対するドッキングシミュレーションを行い、*in silico* で二量体形成を阻害するようなペプチドを設計、合成を行った。現在、ピアコアを用いて合成したペプチドが標的タンパクに親和性が高いことを確認した。
- 5) ニッポンテクノクラスター、ジェノミックソリューションズ、マイクロテックニチオンのコロニーピッカーのデモ機を用いて各シャーレから *C. glabrata* の形質転換後のコロニーを 30 個ずつピッキングするプログラムを組み、その作業効率を比較した。マイクロテックニチオン社の PM-2 が最も条件に合致していた。
- 6) 推定 1,100 の必須遺伝子 (当初、パン酵母で同定された必須遺伝子のオーソログス遺伝子のみであったが、ホモログス遺伝子 150 個を追加) のうち、1,000 遺伝子について Tet 株を構築した。非必須遺伝子についてはノックアウト株を構築しており、YKU80 ノックダウンシステム (Ueno et al. 2007) の採用により、組換え株の構築は大幅にペースアップした。
- 7) プロモーター領域のシスエレメント情報を追加した。
- 8) トランスクリプトーム解析については、進行が停滞している。

<国内外での成果の位置づけ>

日本、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、報告することができた。最も多かったコメントは、ペプチド設計の難しさが予測されることであった。組換え株の構築システムに多くの質問があった。多くの真菌では YKU80 (NHEJ) ノックアウトシステムが採用されている。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た。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- 1) 予定通り遂行することができた。
- 2) Tet 株を用いてマウス感染実験を行う予定であったが、人員の確保が出来ず、次年度に持ち越すことになった。
- 3) 選出した抗真菌薬の標的のタンパク構造解析を行う予定であったが、*in silico* でモデリング等実施できる研究協力者が得られ、コスト面の軽減も考慮した結果、本年度は *in silico* でモデリングのみとなった。
- 4) 予定通り遂行することができた。
- 5) 予定していた以上に組換え菌株の構築ペースをアップさせることができた。
- 6) 平成 20 年度に終了を予定していた推定 1,000 の必須遺伝子について Tet 株の構築を前倒しし、本年度中に完成できる見通しとなった。
- 7) 予定通り遂行することができた。
- 8) トランスクリプトームの実験系を確立する予定であったが、人員の確保が出来ず、次年度に持ち越すことになった。

<今後の課題>

ハイスループットな感染実験系の確立とトランスクリプトーム解析の実験系を確立することである。最大の問題は、人員配置であるので、次年度はスタッフの確保を重点的において研究マネージメントに取り組みたい。

<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 (2007)

・ 0705071542

Ueno, K., Uno, J., Nakayama, H., Sasamoto, K., Mikami, Y., and Chibana, H. Development of a highly efficient gene targeting system induced by transient repression of YKU80 expression in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell.* 6(7):1239-47 (2007)

・ 0705071503

van Het Hoog, M., Rast, T.J., Martchenko, M., Grindle, S., Dignard, D., Hogues, H., Cuomo, C., Berriman, M., Scherer, S., Magee, B., Whiteway, M., Chibana, H., Nantel, A., and Magee, P. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. *Genome Biol.* 8(4):R52 (2007)

・ 本計画研究成果から得られた情報を元にゲノム創薬へと発展させるために民間企業との共同研究も行っている。

・ 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)