

論文の内容の要旨

論文題目 糸状真菌アスペルギルス フミガツスの病原性に関する

血清応答機構の解析

氏名 犬飼 達也

【背景・目的】

ヒトに影響を及ぼす真菌の感染症は、真菌症と称される。真菌症は、水虫や爪白癬のような表在性真菌症や、肺や脳といった深部臓器に感染する深在性真菌症に分類され、深在性真菌症は致命的な転帰をたどる可能性の高い感染症の一つである。本邦の病理剖検輯報によれば、深在性真菌症を引き起こす3大病原真菌であるアスペルギルス属、カンジダ属、クリプトコックス属の真菌症は、近年増加傾向にあり、中でもアスペルギルス属が引き起こすアスペルギルス症は、最も頻度が高い。背景として、高齢者の増加、高度医療の発展に伴い、抗がん剤による化学療法、臓器移植による大量ステロイド投与や免疫抑制薬による治療によって免疫状態の低下した患者が増加していることに起因し、今後ますます増加することが懸念されている。さらに、真菌はヒトと同じ真核生物であるがゆえに、治療標的が限られ、細菌感染症に比べて使用できる治療薬の数が少ない。さらにアスペルギルス属の薬剤耐性菌の出現が世界的にも問題となっており、新規治療法・治療薬開発は急務である。

アスペルギルス症の主な原因菌種は、*Aspergillus fumigatus* であり血清成分を利用し細胞外マトリックスの産生亢進することが報告されている。慢性肺アスペルギルス症の腐生増殖した菌球の周囲には、厚い細胞外マトリックスが観察されている。さらに侵襲性肺アスペルギルス症においても環境中の分生子（孢子）が組織内で菌糸形態となって増殖・侵襲が観察されていることから、宿主成分との菌体の増殖機構の理解が非常に重要であることが考えられる。

以上の背景から、宿主成分が関与する菌体の増殖機構を理解することは、アスペルギルス症の感染メカニズムの解明に貢献でき意義があると考えられる。本研究は、血清存在下における菌体増殖機構の解明を目的として、病原性に関わり血清中の増殖に必須な遺伝子を同定、その機能を解析し、さらに増殖制御に関与する血清成分の同定を試みた。

【結果・考察】

分泌タンパク質 B11b の機能と病原性

A. fumigatus は、血清を含む培地を用いると、菌糸の増殖および細胞外マトリックス形成が亢進することが知られている。細胞外マトリックスの構成成分の一つであるタンパク質は、菌体から積極的に分泌されたものと考えられるため、分泌タンパク質をコードする遺伝子の破壊株が血清存在下での細胞マトリックス形成能に関連するかをクリスタルバイオレット法により定量した。その結果、*A. fumigatus* の分泌タンパク質をコードする *B11b* 遺伝子破壊株は、ウシ胎児血清 FBS 存在下でのバイオマスの亢進が認められず、増殖の低下が理由に考えられた。さらにそれを確認するために、実体顕微鏡観察及び XTT assay によって、FBS 添加による増殖能を検討した結果、バイオマスの低下は、マトリックス形成ではなく、出芽および菌糸の増殖が阻害されたことに起因していたことが明らかとなった。次に、FBS 存在下における *B11b* 遺伝子発現及びタンパク質発現を定量 RT-PCR 及びウエスタンブロット法により解析した。その結果、FBS 添加によりその遺伝子発現およびタンパク質産生が上昇することが明らかとなり、この発現上昇が血清存在下で増殖できる要因の 1 つと考えられた。次に、*B11b* の病原性への関与を調べる目的で、*B11b* 遺伝子破壊株を作製し、侵襲性肺アスペルギルス症マウスモデルで感染実験を行ったところ、*B11b* 遺伝子破壊株の感染群において生存率の上昇が見られた。以上のことから、*A. fumigatus* 分泌タンパク質 B11b は、血清存在下での菌糸増殖に必須な因子であることが示唆され、血清存在下での増殖とマウス感染モデルでの病原性への寄与が示唆された。

血清存在下での増殖、および病原性に関与する新たな遺伝子の同定

B11b 遺伝子破壊株において、血清存在下で増殖が阻害され、病原性との関連が示唆されたため、*B11b* 遺伝子が関与する FBS 存在下での増殖に関連する遺伝子の探索を行なった。DNA マイクロアレイ解析によるスクリーニングおよび定量 RT-PCR による発現量の解析から、親株では FBS 存在下で発現が上昇し、*B11b* 遺伝子破壊株では上昇しない遺伝子として、23 種類の遺伝子が同定された。それら遺伝子の血清存在下における増殖能の関与を検討するために、それぞれの遺伝子破壊株を作製し、FBS 添加培地における増殖能を XTT assay 法により定量した。その結果、23 種類の破壊株の中で、3 種類の遺伝子 *gis5*、*gis22*、*gis32* の破壊株において、増殖能に低下が認められ、これらの遺伝子が *A. fumigatus* における血清存在下の増殖に必須であることが明らかとなった。*B11b* 遺伝子破壊株が血清存在下で増殖が阻害された理由の一つとして、血清存在下での増殖に必須な *gis5*、*gis22*、*gis32* 遺伝子の発現低下が考えられた。そこで、*B11b* 遺伝子破壊株の *gis5*、*gis22*、*gis32* の発現誘導が血清存在下の増殖を可能にするか検討するために、*B11b* 遺伝子破壊株にそれぞれの遺伝子を過剰発現させた株を作製し、FBS 存在下で

の増殖能を XTT assay 法により定量した。その結果、完全ではないが増殖能の回復を認めたことから *B11b* 遺伝子破壊株における *gis5*、*gis22*、*gis32* 遺伝子の発現誘導が血清存在下での増殖に必要であることが示唆された。以上のことから、*B11b* が *gis5*、*gis22*、*gis32* の遺伝子発現誘導に関与し、血清存在下の菌糸生育を可能性にしているメカニズムが考えられた。次に、血清存在下で増殖能の低下が観察された株の病原性を、マウスモデルを用いた感染実験により検討したところ、*gis5*、*gis22*、*gis32* 遺伝子破壊株についても病原性に関与することが明らかとなった。以上のように、本研究において *B11b* 遺伝子を含めた 4 つの遺伝子がそれぞれ病原性に関与することが明らかとなった。血清中の菌糸増殖能と病原性との間に強い相関関係がみられたことから、血清中での増殖とマウス生体組織での増殖を規定する何らかの共通する環境あるいは因子の存在が示唆された。

血清中菌糸生育阻害成分の同定

B11b 遺伝子破壊株の増殖抑制は、ウシ胎児血清だけでなく、ヒト血清でも観察されたため、共通する血清成分の関与が示唆された。そこで、*B11b* 遺伝子破壊株の増殖を抑制する血清中成分の分離同定を試みた。ウシ胎児血清 FBS を Folch 法により、水層及び有機層に分画した。*B11b* 遺伝子破壊株にそれぞれの画分を添加し、培養後、実体顕微鏡観察を行なった。その結果、水層画分を添加した菌体の増殖能に低下が観察され、水層画分に増殖阻害物質の存在が明らかになった。さらに、水層画分を用いて、熱処理（100℃、10 分）あるいはプロテアーゼ処理を行わない菌体に添加した。その結果、どちらの処理においても、菌体の増殖阻害活性は維持され、タンパク質ではないことが考えられた。Folch 法で分画された水層画分を用いて、カラムクロマトグラフィー、高速クロマトグラフィーによって阻害物質をほぼ単一物質にまで精製することができた。今後、構造解析により物質の同定を進める。

【結論】

本研究において、*A. fumigatus* の分泌タンパク質である *B11b* が血清存在下における増殖に必須であることを発見した。さらに、血清存在下の *B11b* の機能に関連すると考えられる因子 *GIS5*、*GIS22*、*GIS32* を同定した。血清存在下の増殖において、*B11b* が血清成分に応答して *Gis5*、*Gis22*、*Gis32* 遺伝子の発現を誘導し、血清中の増殖を可能にしていることが考えられた。また、血清存在下での菌体増殖とマウス感染モデルでの病原性と強く相関することからも、病態解明の一つのアプローチとして血清存在下での増殖メカニズムを解析することは意義があり、新規治療標的となる可能性も期待できると考えている。