

病原性真菌 *Candida albicans* の

バイオフィーム形成機序の解析および形成阻害薬の探索

Biofilm Formation Mechanisms of Pathogenic Fungus *Candida albicans* and Screening of Biofilm Inhibitors

平成 29 年度 論文博士申請者 倉門 早苗 (Kurakado, Sanae)

指導教員 杉田 隆

我が国では、医療技術が進歩する一方、易感染性宿主の増加に伴い、日和見感染症である深在性真菌症の発症も増加の一途を辿っている。剖検例における原因菌別の発生頻度では、カンジダ症およびアスペルギルス症の発生頻度が高く、临床上問題となっている (Fig. 1)。カンジダ血症は *Candida albicans* を主要起因菌として発症し、その致死率は 40 % 以上に及ぶ予後不良の感染症である。発症のリスクファクターとしては、中心静脈カテーテル等の体内留置物が挙げられる。*C. albicans* は、カテーテル等の基質上にバイオフィームを形成し、抗真菌薬に対して耐性化することで難治化し、バイオフィームの一部が播種することによってカンジダ血症を引き起こす。従って、バイオフィームを原因とするカテーテル関連血流感染症の制御は、我が国において重要な課題の一つである。

C. albicans のバイオフィームは、酵母形および菌糸形で形成される高次構造体であり、その周囲を多糖・タンパク質・核酸等を成分とする細胞外マトリックスが覆っている。酵母形から菌糸形への二形性変換は、*C. albicans* の病原因子として考えられており、バイオ

フィルム形成においても重要な因子の一つである。本研究では、I. *C. albicans* のバイオフィルム形成に関与する因子を明らかにするために、バイオフィルム状態で発現亢進している遺伝子を抽出し、遺伝子破壊株を用いて、当該遺伝子のバイオフィルム形成への影響を評価した。次に、二形性変換を抑制する化合物として、II. 17β -estradiol の作用機序について検討した。また、III. バイオフィルム感染症の克服を目指し、*C. albicans* のバイオフィルム形成を阻害する薬剤を探索した。

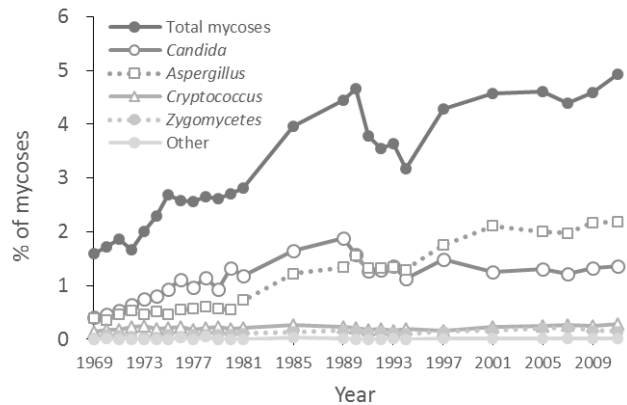


Fig. 1 Changes in the rate of mycoses among total autopsy cases and causative agents due to monopathogenic infection from 1969 to 2011 in Japan.

I. バイオフィルム形成に関与する遺伝子の解析

サブトラクション法によるトランスクリプトーム解析の結果、バイオフィルム状態では、亜鉛獲得システムを担う *PRA1* および *ZRT1* の発現が亢進していた。*Pra1* は、亜鉛結合モチーフを有し、菌体から分泌された後、宿主の亜鉛と結合する。その後、亜鉛トランスポーターである *Zrt1* の元へ亜鉛を運ぶ *Zincophore* システムとして機能する可能性が報告されている。そこで、両遺伝子の破壊株 ($\Delta pra1$, $\Delta zrt1$) を作製し、バイオフィルム形成能を野生株と比較した結果、 $\Delta pra1$, $\Delta zrt1$ は、野生株と比較して強固なバイオフィルムを形成することができず、バイオフィルム形成率は野生株の 50 % 程度まで減少した (Fig. 2)。また、 $\Delta pra1$, $\Delta zrt1$ は菌糸誘導条件下において、野生株と比較して短い菌糸を形成した。*Pra1* および *Zrt1* は、亜鉛

獲得システムに関与するタンパク質であるため、細胞内の亜鉛恒常性がバイオフィーム形成に影響を与えていることが考えられた。亜鉛添加条件でのバイオフィーム形成能を評価した結果、亜鉛非添加条件と比較して、バイオフィーム形成の増加が認められた。

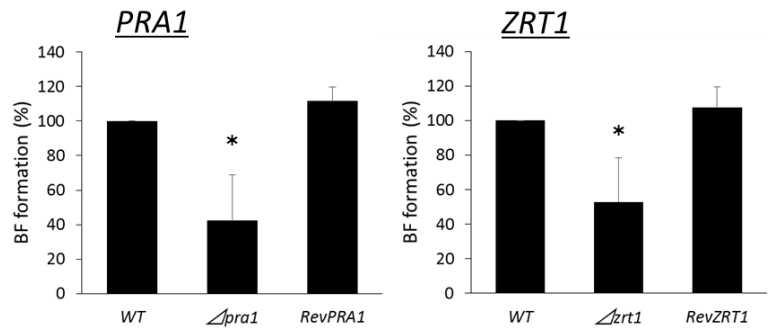
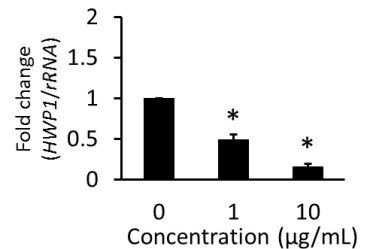


Fig. 2 Biofilm formations of $\Delta pra1$ and $\Delta zrt1$ mutant strains. * $P < 0.05$

II. ステロイド薬による二形性変換阻害作用と新規二形性変換経路

本研究室におけるこれまでの検討において、ステロイド薬が二形性変換阻害作用を有する知見が得られている。エストロゲンは、estrone, estradiol, estriol を主要成分とするステロイドホルモンである。その中でも、最もエストロゲン活性の高い 17β -estradiol の菌糸形成への影響を評価した。その結果、 17β -estradiol は、*N*-acetylglucosamine 培地および Spider 培地によって誘導された菌糸形成を阻害した。また、 17β -estradiol 添加条件では、菌糸特異遺伝子である *HWP1* の発現が低下した (Fig. 3)。

A. GlcNAc medium



B. Spider medium

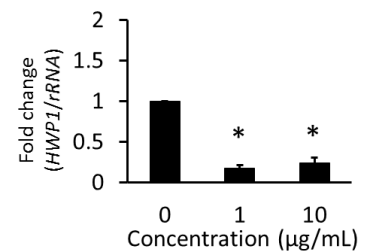


Fig. 3 *HWP1* expression levels of *Candida albicans* grown with 17β -estradiol. * $P < 0.05$

二形性変換は、様々な刺激により誘導され、それぞれ異なるシグナル経路を介して菌糸形を誘導する (Fig. 4)。エストロゲンは、ヒトではエストロゲンレセプターを介して生殖細胞の分化等を制御する。*C. albicans* においては、エストロゲン結合タンパク質 (Ebp1) を

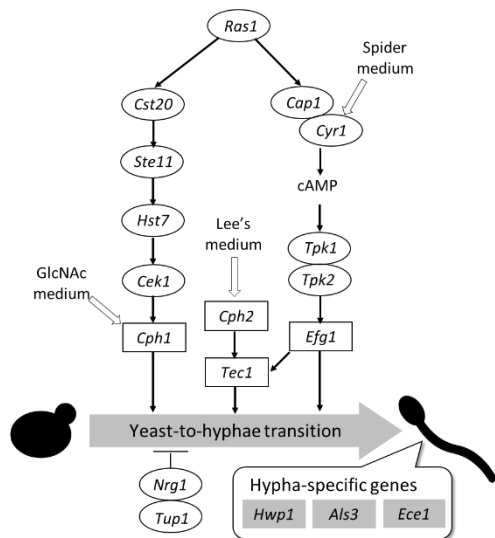


Fig. 4 Yeast-to-hyphae transition pathway in *Candida albicans*.

有することが知られており、 17β -estradiol による二形性変換阻害作用が Ebp1 を介しているかどうかを検証するため、*ebp1* 破壊株 ($\Delta ebp1$) を作製し、機能の解析を行った。その結果、 $\Delta ebp1$ に対する 17β -estradiol の菌糸形成阻害作用は、野生株および *EBP1* 再導入株に対する場合と比較して減弱

が認められた (Fig. 5)。 17β -estradiol に二形性変換阻害作用が認められたため、バイオフィーム形成に対する作用も併せて評価したところ、 17β -estradiol はバイオフィーム形成も阻害した。また、二形性変換に対する作用と同様に、 $\Delta ebp1$ に対する 17β -estradiol のバイオフィーム形成阻害作用にも減弱が認められた。

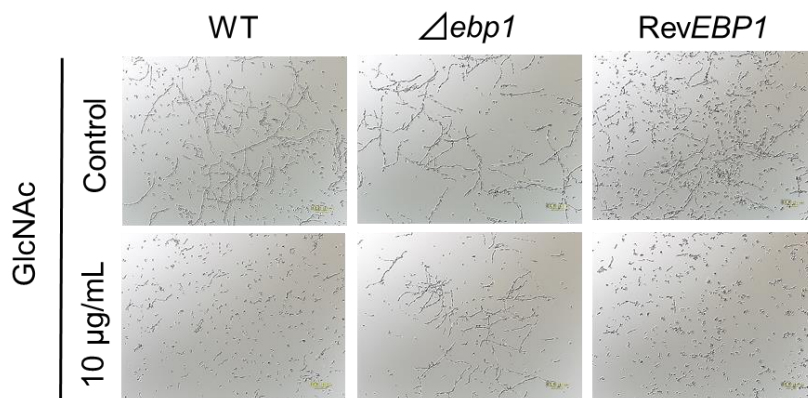


Fig. 5 Loss of Inhibitory effect of 17β -estradiol on hyphal formation against $\Delta ebp1$ mutant strains.

Ⅲ. ミノサイクリンによるバイオフィーム形成阻害作用とその機序の解析

抗細菌薬について、*C. albicans* のバイオフィーム形成阻害作用を探索したところ、ミノサイクリンにバイオフィーム形成阻害作用が認められた。また、ミノサイクリンは二形性変換阻害作用も示した (Fig. 6)。ミノサイクリン添加条件における、二形性変換関連遺伝子

の発現変動を測定した結果、菌糸特異遺伝子である *HWPI*, *ECE1*, *ALS3* に発現の低下が認められた。二形性変換を正に制御する転写因子 *EFG1*, *CPH1*, *TEC1* およびバイオフィーム制御遺伝子 *BCR1* の発現もミノサイクリン存在下で減少した。また、ミノサイクリン添加条件では、細胞の接着性の指標である疎水性も低下した。バイオフィームを覆う細胞外マトリックスの構成成分である β 1, 3-glucan の上清中の濃度を測定したところ、ミノサイクリン添加条件では非添加条件と比較して低下しており、マトリックスの産生量にも影響していると考えられた。本研究でバイオフィーム形成阻害作用が認められた 5 μ g/mL は、通常ミノサイクリンの点滴静注（血中濃度

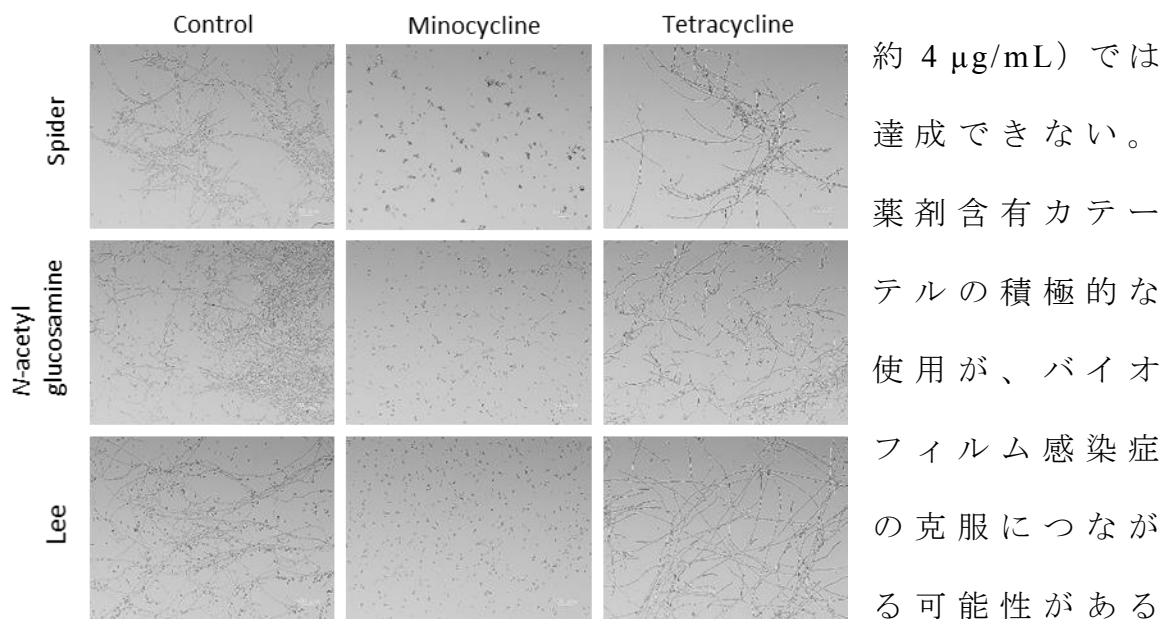


Fig. 6 Effects of minocycline and tetracycline on hyphal formation in *Candida albicans*.

以上、本研究では、*PRA1* および *ZRT1* がバイオフィーム形成に関与する遺伝子であることを見出した。また、両遺伝子は亜鉛の恒常性を介してバイオフィーム形成を制御していると考えられた (Fig. 7)。更に、 17β -estradiol に二形性変換抑制作用があることを見出し、その作用は *Ebp1* を介したものであることを明らかにした。これに

より、Ebp1 を介する新規二形性変換経路の存在が示唆された (Fig. 7)。また、抗細菌薬であるミノサイクリンに *C. albicans* のバイオフィーム形成阻害作用を見出した。その作用は、菌糸形成の抑制、接着能の低下、マトリックス産生の減少を介したものであると推測された (Fig. 7)。

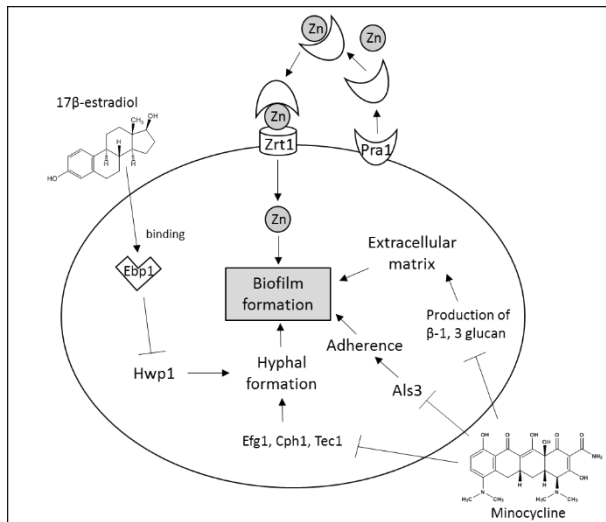


Fig. 7 Diagram of speculated pathway related to biofilm formation of *Candida albicans*.

本研究の結果から、*C. albicans* のバイオフィーム形成に関するいくつかの因子の存在を明らかにした。今後、難治なバイオフィーム感染症の制御法開発を目指したい。

本研究の結果から、*C. albicans* のバイオフィーム形成に関するいくつかの因子の存在を明らかにした。今後、難治なバイオフィーム感染症の制御法開発を目指したい。

《 参考文献 》

- 1) 17β-Estradiol inhibits estrogen binding protein-mediated hypha formation in *Candida albicans*. Kurakado S., Kurogane R., Sugita T., *Microb Pathog.*, **109**, 151-155 (2017).
- 2) Minocycline inhibits *Candida albicans* budded-to-hyphal-form transition and biofilm formation. Kurakado S., Takatori K., Sugita T., *Jpn J Infect Dis.*, **70**, 490-494 (2017).