

総 説

## *Candida* 属酵母に対する抗真菌剤標的候補としての 必須遺伝子群の探索

宮川 洋三<sup>1</sup> 知花 博治<sup>2</sup> 宇野 潤<sup>2</sup>  
三上 襄<sup>2</sup> 中山 浩伸<sup>3</sup>

<sup>1</sup>山梨大学工学部生命工学

<sup>2</sup>千葉大学真菌医学研究センター

<sup>3</sup>鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学

### 要 旨

一般に感染症対策として特定の病原微生物に対して抗菌性をもつ薬剤を開発する際には、その標的となる分子が菌の増殖にとって必須であるか否かが一つの重要な点となる。われわれはこの観点から、抗真菌剤の標的候補としての必須遺伝子に着目している。ここでは、通常一倍体として増殖する *Candida glabrata* の温度感受性変異株を用いた必須遺伝子群の探索に関する研究の一端を紹介するとともに、カンジダ属酵母のなかで最も病原性が強いとされる *C. albicans* より分離したリン酸代謝制御系 (PHO システム) における負の制御因子として知られる *PHO85* の必須性に関する研究についても言及する。

**Key words:** *Candida*, 必須遺伝子 (essential gene), 温度感受性変異株 (temperature-sensitive mutant), *PHO85* 遺伝子 (*PHO85* gene), 遺伝子破壊 (gene disruption), Tet システム (Tet system)

### 1. はじめに

ヒト常在菌でありながら易感染性の宿主 (immuno-compromised host) においてしばしば重篤な疾病を惹起させるカンジダ属酵母は、高齢化社会を迎えた現在、日和見感染症の主要な原因菌としてその重要度を増している。カンジダ属酵母の研究における最近の分子生物学的手法の進歩は目覚ましく、カンジダのもつ生物学的特性にかかわる基礎的研究とともに、カンジダ症対策という側面から、病原性発現機序の解明、新たな診断法・抗真菌剤の開発等の諸課題への取り組みとして分子生物学的手法を応用した試みが盛んである<sup>1-7)</sup>。こうした背景からわれわれは、カンジダ症対策の一環として、通常一倍体で遺伝解析が容易とされる *C. glabrata*、およびカンジダ症の主要な原因菌とされる *C. albicans* からの、新たな抗真菌剤の標的となり得る必須遺伝子群の探索を試みている。

### 2. 必須遺伝子に変異を持つと思われる条件致死変異体としての温度感受性変異株の分離

*C. albicans* が通常おもに二倍体として増殖するのに対し *C. glabrata* は一倍体として増殖するため、*C. albicans*

に比べ遺伝解析が容易である。また、必須遺伝子の解析に有力な武器となる tetracycline (以下 Tet) 応答性遺伝子発現制御系 (Tet システム) (後述) が中山ら<sup>8)</sup> によって確立されている。さらに本菌は *C. albicans* に比べて病原性は弱いものの、近年、その感染症例が急速な増加傾向にあることも知られている。われわれはこうした背景に基づき、*C. glabrata* を Tool として、高温 (発育制限温度) でコロニー形成能を失った温度感受性 (以下, TS) 変異株を用いて抗真菌剤の有力な標的候補と考えられる必須遺伝子群を効率的に分離・同定することを試みた。これまでに得られた多数の TS 変異株を宿主として *C. glabrata* Genomic DNA Library から各変異に対する相補性遺伝子を分離し、Tet システムによりそれらの必須性が立証されれば、抗真菌剤の標的候補の探索・同定に貢献できるものと期待される (Fig. 1)。

#### ・TS 変異株の取得:

*C. glabrata* 親株 2001HT (*his3 trp1*)<sup>9)</sup> に対して突然変異誘発剤 EMS 処理を施した後、レプリカ法により低温で正常に発育し、高温でのコロニー形成能を失った TS 変異株 (以下, TS<sup>-</sup>株) を多数分離した (Fig. 2)。得られた TS<sup>-</sup>株から、高温でのコロニー形成能を自然に回復する復帰突然変異率 (% of spontaneous reversion) の比較的低いものを優先的に選別し、次のステップに用いた。

別刷請求先: 宮川 洋三

〒400-8511 甲府市武田 四丁目3-1  
山梨大学工学部 生命工学科

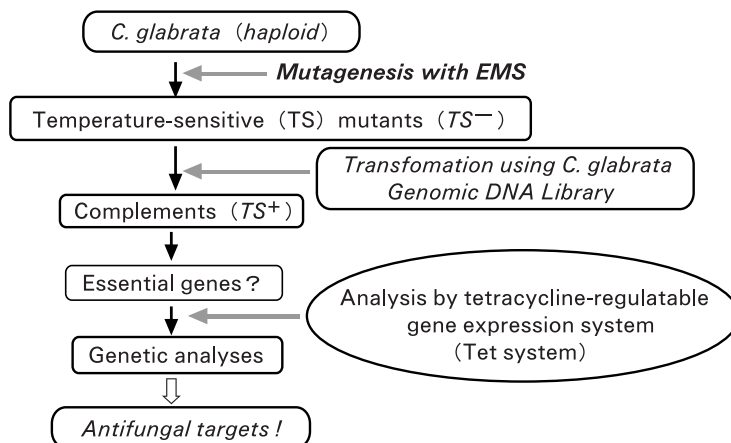


Fig. 1. Strategy for screening of essential genes using temperature-sensitive mutants of *Candida glabrata*. Temperature-sensitive (TS<sup>-</sup>) mutants, which have lost the colony-forming ability at restrictive temperature (39°C) are isolated from EMS-mutagenized populations of the *C. glabrata* parent, 2001HT (*his3 trp1*)<sup>9</sup>. Using each of these TS<sup>-</sup> isolates as a host, DNA fragments (TS<sup>+</sup>), which possess the complementing activities for TS<sup>-</sup> are screened from *C. glabrata* genomic DNA library. The Tet system (see text) is considered to be feasible to demonstrate the essentiality of the TS<sup>+</sup>-DNA sequences.

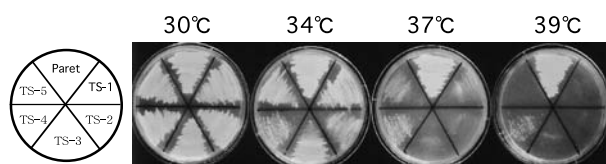


Fig. 2. Temperature sensitivity of the representative mutants. The parent and TS mutants were streaked onto agar plates and incubated overnight at the indicated temperature. Growth of the TS mutants was severely inhibited at 39°C, and some of them stopped growing over 37°C, suggesting their usefulness for *in vivo* assay.

#### ・ *C. glabrata* Genomic DNA Library の構築:

Genomic DNA Library 構築の際の Donor DNA として、親株より調整した全ゲノム DNA を制限酵素 *Sau3A* により部分切断し、5-15 kbp の DNA 切断断片を選択的に抽出した。Library 構築のための vector としては *C. glabrata* の *ARS*, セントロメア (*CEN*), および選択マーカー *HIS3* を有する plasmid, pCgACH-3<sup>9, 10</sup> を用い、その *Bam*HI 切断部位に、先に調整した Donor の *Sau3A* 部分切断断片を挿入した。

#### ・ 各変異に対する相補性遺伝子 (TS<sup>+</sup>) の分離:

構築した上記の Library を用いて、各 TS 変異株を宿主とした形質転換実験を行い、高温でのコロニー形成能を獲得した *HIS*<sup>+</sup>コロニーより TS 変異 (point mutation) に対する高い相補活性を保有するクローンの分離を試みた。得られたクローンのインサート内に出芽酵母ゲノムの一部ときわめて高い相同性を示す ORF (Open Reading Frame) 領域の存在が推定され、前述の Tet システム<sup>8)</sup> を用いた解析により当該遺伝子の必須性が確認されている。

#### 3. リン酸代謝系負の制御因子 *PHO85* の必須性

次に、前項とは別に、細胞周期制御因子として知られる *CaCDC28* 遺伝子の一部をプローブとしてこれまでに

*C. albicans* ゲノムより得られたいくつかのクローンのうち、出芽酵母リン酸代謝制御系 (*PHO* システム) における負の制御因子 *PHO85* に対し高い相同性をもつホモログ (以下、本稿では *CaPHO85* とする)<sup>11)</sup> の必須性について解析した。*CaPho85* は、細胞周期を制御する *Cdc28*<sup>12)</sup> と同様、その機能に cyclin を必要とする cyclin-dependent protein kinase (CDK) の一つである。出芽酵母 *Cdc28* とはかなり高いアミノ酸配列相同性 (50% identity) をもつが、*CDC28* は必須遺伝子、*PHO85* は非必須遺伝子であることも知られている<sup>13)</sup>。*CaPHO85* についてすでに明らかにされている分子性状は、以下にまとめられる<sup>11)</sup>。

- ・ *C. albicans* ゲノムより分離した *CaPHO85* は 326 アミノ酸をコードする ORF を含み、出芽酵母 *PHO85* ORF と高い相同性 (62% identity) を有している。
  - ・ 出芽酵母 *pho85* 変異に対する相補活性を示す。
  - ・ イントロンが、出芽酵母 *PHO85* では N 末端アミノ酸 MSSSSQ の第 6 コドン内に存在するのに対し、*CaPHO85* では N 末端アミノ酸 MTGSSSQ の第 7 コドン内に存在する。
  - ・ *CaPho85* は *Pho85* のもつ ATP 結合ドメインおよびキナーゼドメイン等のコンセンサス配列を保有する。
- これらの解析結果より、出芽酵母 *PHO85* との分子生物学的性状の近似性がきわめて高いことが明らかになっ

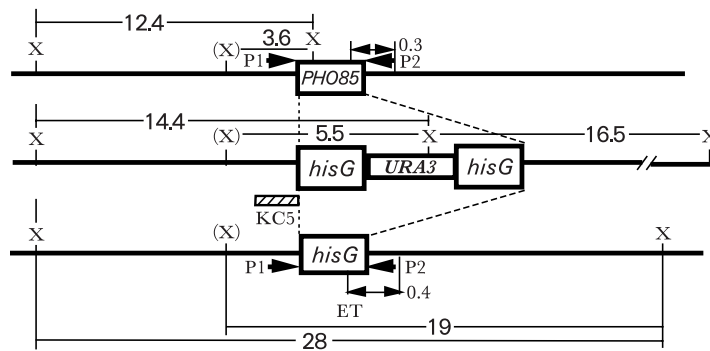


Fig. 3. A micro-heterogeneity in *PHO85* regions used for gene disruption by the Ura-blaster technique. One allele of *C. albicans PHO85* gene was replaced by the Ura-blaster cassette. From this Ura-blaster disruptant, the Ura<sup>-</sup> derivative was isolated by 5-FOA selection. A micro-heterogeneity is indicated by (X), which exists only on one allele in the diploid genome of *C. albicans*. The DNA fragment, KC5 (indicated by hatched bar) located in the upper region of the ORF, was used as a hybridization probe in the Southern blot analysis.

た。

以上の事実を基礎に、本遺伝子の性状をさらに解析するため、*C. albicans*における遺伝子破壊法として通常用いられている Ura blaster 法<sup>14)</sup>による遺伝子破壊実験を行った。

そのために、*CaPHO85*のコード領域内のほぼ全領域が Ura-blaster cassette に置換された変異株の作製を試みた。本菌は通常二倍体として存在するため、両方の allele に同 cassette を組み込む必要がある。まず、どちらか一方の allele にこの cassette が組み込まれた株 (heterozygous mutant) を作製したところ、Fig. 3 に示すように、*CaPHO85* 遺伝子を含むその近傍の制限酵素切断部位に関して両 allele 間に micro-heterogeneity が存在するため、サザンプロット解析により、cassette の挿入されていないコントロール株と、cassette が各々異なる allele に挿入された 2 種の変異株との区別が明瞭となる。さらに、各々の変異株から 5-FOA (5-fluoro-orotic acid) による選択圧下で一方の allele のみを破壊した Ura<sup>-</sup> heterozygous mutant を作製し、次に、これらより、他方の allele にも同 cassette が挿入された homozygous mutant の作製を試みた。しかしながら、その結果、この変異株のみならず、ORF 領域内の数カ所に対しても同 cassette の挿入を試みたが、いずれも目的の homozygous mutant を得ることはできなかった (data not shown)。この実験結果から、一つの可能性として、*CaPHO85* が細胞 (菌) の生存に必須である可能性が考えられた。

この可能性を検討するため、中山らにより開発された Tet による *C. albicans* の遺伝子発現制御系 “Tetracycline-regulatable (TR) expression system”<sup>15)</sup> を用いて解析した。この系においては、当該遺伝子のプロモーターを Tet により ON/OFF 調節可能な TR プロモーターに置換した株 (Tet 株) を用いることにより、Tet 存在下では当該遺伝子の発現が抑制され、非存在下でのみ発現される。この Tet 株を構築するため、まず一方の allele のコード領域を Ura-blaster cassette で置換 (Ura<sup>+</sup>)、5-FOA 選択

で Ura<sup>-</sup> とした後、*PHO85* の他方の allele のプロモーターを TR プロモーターで置換 (Tet 株) した。その結果、Tet 存在下ではこの Tet 株の増殖抑制が認められたことより、本遺伝子は出芽酵母 *PHO85* とは異なり必須遺伝子であることが示された。さらに、*In vivo*、Tet システム下で本遺伝子の重要性を検証した (詳細は別稿にて述べる)。

#### 4. おわりに

1) 本研究では抗真菌剤の標的候補としての必須遺伝子群を探索・同定する一つの手段として温度感受性 (TS) 変異株を用いている。一般に TS 変異株は、ある特定の遺伝子の塩基配列の変異 (通常は点突然変異と考えられる) によりその遺伝子産物が低温では正常に機能し、高温ではそのタンパクが conformation change 等により機能しなくなった結果、高温でのコロニー形成能を失ったものと考えられている。したがって、TS 変異を相補する DNA 断片は必須遺伝子を保有していると考えられ、必須遺伝子群を探索する際の一つの有効な武器となる。この方法では、TS 変異株の変異部位を明らかにすることで、この部位が当該遺伝子の必須性に関与していることがただちに明らかになる点、また、当該遺伝子産物 (タンパク) の高次構造が高温シフト後ただちに異常をきたし機能停止するため、遺伝子機能の解析が容易になる点などが大きな利点といえよう。こうした必須遺伝子の機能的探索法に対し、既知の遺伝子 (塩基配列) に着目しその必須性を証明する構造的方法も多く用いられる。本研究でも紹介した Tet システム<sup>8, 15)</sup> による必須性の証明はその一つであり、任意の遺伝子のプロモーター領域を Tet のような原核生物に対する抗生物質により ON/OFF が調節されるプロモーターに置換することによりその遺伝子発現を容易に制御可能なものにしたもので、必須遺伝子の解析法としてきわめて優れた方法である。その他にもこれまでに様々な遺伝子発現制御系が考案されている<sup>16-19)</sup>。

2) Pho85 は当初、出芽酵母リン酸代謝制御系における

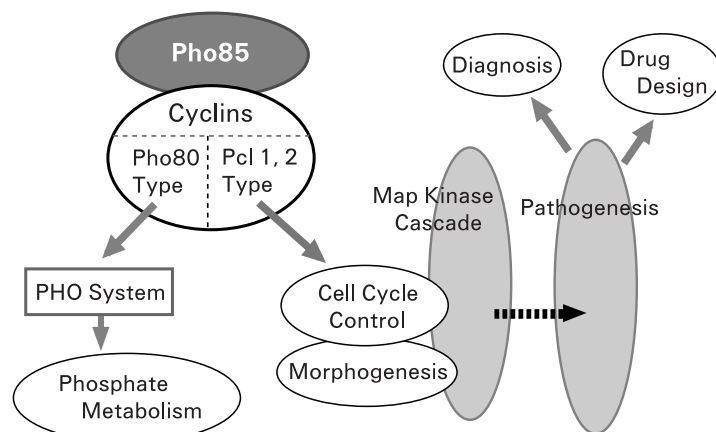


Fig. 4. Pleiotropic function of Pho85. Pho85, one of the cyclin-dependent kinases (CDKs), functions as a key factor of various cellular events, depending upon the cyclin partner which is selected by Pho85 itself. Various cyclin partners, besides Pcl1/2 shown in this model, have been reported (see text).

負の制御因子として分離された<sup>13)</sup>. Cdc28等と同様、その細胞内機能に cyclin partner を必要とする CDK のひとつであるが、出芽酵母を中心とした最近の知見によれば、細胞内には Pho85 の partner となり得る多種の cyclin が存在し、Pho85 が選択する partner により形成されたヘテロダイマー (CDK-cyclin 複合体) が各々固有の細胞内機能を担うこと (pleiotropic effects) が報告されている<sup>20-22)</sup>. 本稿で述べたリン酸代謝制御系における負の制御因子として Pho85 が機能するとき、その cyclin partner は Pho80 であるが、partner として Pcl1/Pcl2 が選択されたときには細胞周期の制御に関わる<sup>23)</sup> (Fig. 4). その他の cyclin として、アミノ酸飢餓時に機能する転写因子 Gcn4 を制御する Pcl5<sup>24, 25)</sup>、グリコーゲン合成系で機能する Gsy2 を制御する Pcl8/Pcl10<sup>22)</sup> 等が存在する. また最近、カンジダ属以外の真菌で *Aspergillus nidulans*<sup>26)</sup> や *Sporothrix schenckii*<sup>27)</sup> の PHO85 ホモログについての解析も報告されている. 本稿で *C. albicans* における Pho85 の必須性について論じたが、その機序についてはこうした種々の真菌の Pho85 ホモログの分子性状や細胞内機能の比較とその cyclin partner レベルにおける解析が待たれるところである.

3) 抗真菌剤の標的候補となる条件として本稿ではとくにその必須性に注目してきたが、その他、選択毒性 (真菌特異性) や病原性も重要な点であることは論を待たない. ヒトゲノムのみならず、医療上重要なカンジダ属酵母のうち *C. albicans*<sup>7)</sup> および *C. glabrata*<sup>6)</sup> においてすでに全ゲノム解読が完了したことにより、抗真菌剤開発におけるこうした諸課題についてもポストゲノムの観点からのアプローチが期待される時代に入ってきたといえよう.

(会員外共同研究者: 富士原浩介, 原 貴彦, 河邊 亮, 山梨大・生命工学)

#### 謝 辞

本研究において *C. glabrata* genomic DNA library 作

製に必要な plasmid vector, pCgACH-3 およびその親株としての *C. glabrata* 2001HT を快くご分与いただきました中外製薬 北田邦雄博士ならびに須藤正幸博士に深謝申し上げます.

#### 文 献

- 1) Tourmu H, Serneels J, Van Dijk P: Fungal pathogens research: novel and improved molecular approaches for the discovery of antifungal drug targets. *Current Drug Targets* **6**: 909-922, 2005.
- 2) Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP: A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384, 2005.
- 3) Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR: Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533-540, 2004.
- 4) Berman J, Sudbery PE: *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**: 918-930, 2002.
- 5) Magee PT, Gale C, Berman J, Davis D: Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect Immun* **71**: 2299-2309, 2003.
- 6) Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P,



- Soucié JL: Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44, 2004.
- 7) Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S: The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7329-7334, 2004.
  - 8) Nakayama H, Izuta M, Nagahashi S, Sihta EY, Sato Y, Yamazaki T, Arisawa M, Kitada K: A controllable gene-expression system for the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* **144**: 2407-2415, 1998.
  - 9) Kitada K, Yamaguchi E, Arisawa M: Cloning of the *Candida glabrata* *TRP1* and *HIS3* genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* **165**: 203-206, 1995.
  - 10) Kitada K, Yamaguchi E, Arisawa M: Isolation of a *Candida glabrata* centromere and its use in construction of plasmid vectors. *Gene* **175**: 105-108, 1996.
  - 11) Miyakawa, Y: Identification of a *Candida albicans* homologue of the *PHO85* gene, a negative regulator of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1045-1051, 2000.
  - 12) Reed SI, Ferguson J, Groppe JC: Preliminary characterization of the transcriptional and translational products of the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle gene *CDC28*. *Mol Cell Biol* **2**: 412-425, 1982.
  - 13) Toh-e A, Tanaka K, Uesono Y, Wickner RB: *PHO85*, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, *CDC28*, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **214**: 162-164, 1988.
  - 14) Fonzi WA, Irwin MY: Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728, 1993.
  - 15) Nakayama H, Mio T, Nagahashi S, Kokado M, Arisawa M, Aoki Y: Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 6712-6719, 2000.
  - 16) De Backer MD, Nelissen B, Logghe M, Viaene J, Loonen I, Vandoninck S, de Hoogt R, Dewaele S, Simons FA, Verhasselt P, Vanhoof G, Contreras R, Luyten WH: An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. *Nat Biotechnol* **19**: 235-241, 2001.
  - 17) Care RS, Trevethick J, Binley KM, Sudbery PE: The *MET3* promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Mol Microbiol* **34**: 792-798, 1999.
  - 18) Enloe B, Diamond A, Mitchell AP: A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J Bacteriol* **182**: 5730-5736, 2000.
  - 19) Willins DA, Shimer GH Jr, Cottarel G: A system for deletion and complementation of *Candida glabrata* genes amenable to high-throughput application. *Gene* **292**: 141-149, 2002.
  - 20) Measday V, Moore L, Retnakaran R, Lee J, Donoviel M, Neiman AM, Andrews B: A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **17**: 1212-1223, 1997.
  - 21) Huang D, Moffat J, Andrews B: Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. *Mol Cell Biol* **22**: 5076-5088, 2002.
  - 22) Huang D, Moffat J, Wilson WA, Moore L, Cheng C, Roach PJ, Andrews B: Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity *in vitro* and *in vivo*: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. *Mol Cell Biol* **18**: 3289-3299, 1998.
  - 23) Keniry ME, Kemp HA, Rivers DM, Sprague GF Jr: The identification of Pcl1-interacting proteins that genetically interact with Cla4 may indicate a link between G1 progression and mitotic exit. *Genetics* **166**: 1177-1186, 2004.
  - 24) Gildor T, Shemer R, Atir-Lande A, Kornitzer D: Coevolution of cyclin Pcl5 and its substrate Gcn4. *Eukaryot Cell* **4**: 310-318, 2005.
  - 25) Shemer R, Meimoun A, Holtzman T, Kornitzer D: Regulation of the transcription factor Gcn4 by Pho85 cyclin *PCL5*. *Mol Cell Biol* **22**: 5395-5404, 2002.
  - 26) Wu D, Dou X, Hashmi SB, Osmani SA: The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. *J Biol Chem* **279**: 37693-37703, 2004.
  - 27) de Jesus-Berrios M, Rodriguez-del Valle N: Expression of a Pho85 cyclin-dependent kinase is repressed during the dimorphic transition in *Sporothrix schenckii*. *Fungal Genet Biol* **37**: 39-48, 2002.

## Essential Genes as Potential Targets of Antifungal Agents in Pathogenic Yeast *Candida*

Yozo Miyakawa<sup>1</sup>, Hiroji Chibana<sup>2</sup>, Jun Uno<sup>2</sup>,  
Yuzuru Mikami<sup>2</sup>, Hironobu Nakayama<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi,  
4-3-1 Takeda Kofu, Yamanashi 400-8511, Japan

<sup>2</sup>Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University,  
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Suzuka National College of Technology,  
Shirako, Suzuka, Mie 510-0294, Japan

An important point in the development of an antimicrobial agent is whether its target molecules are essential for growth of the microorganism. From this viewpoint, we focused attention on essential genes as potential targets of antifungal agents in the pathogenic yeast *Candida*. Here we introduce recent attempts for screening, identification, and characterization of essential genes from a haploid yeast *Candida glabrata*, using temperature-sensitive mutants. Our experimental results suggesting the essentiality of *C. albicans* *PHO85*, the homologue of which is known as a negative regulator of the PHO system and as a non-essential gene in *Saccharomyces cerevisiae* are also described.

---

この論文は、第49回日本医真菌学会総会の“シンポジウム2：分子医真菌学の  
新展開”において発表されたものです。