原 著

Candida albicans が産生するカルボキシル プロテアーゼによる血液凝固因子の活性化

上 西 秀 則 長 環 佐 喜 真 敏 子 萩 原 義 郷
岩 田 充 了 河 崎 邦 夫 伊 藤 恒 一 藤 井 達 彦

福岡歯科大学口腔細菌学教室（主任：萩原義郷教授）

〔受付：平成5年1月11日〕

Activation of plasma clotting factors by *Candida albicans* proteinase

Hiddenori Kaminishi, Tamaki Cho, Toshiko Sakima, Yoshisato Hagihara,
Atsunori Iwata, Kunio Kawasaki, Tsunekazu Itoh and Tatsuhiko Fujii

Department of Oral Microbiology, Fukuoka Dental College

(Chief: Prof. Yoshisato Hagihara)

Tamura 2-15-1, Sawara-Ku, Fukuoka 814, Japan

[Accepted for publication: January 11, 1993]

Key words: *C. albicans*/proteinase/clotting/Hageman factor/thrombin

Abstract: Secretory proteinase from *Candida albicans* was studied for its ability to activate plasma clotting. The experiments were carried out by using the proteinase with normal plasma, Hageman factor deficient plasma and Factor X deficient plasma. When each plasma was treated with the proteinase, the thrombin activity occurred in the normal plasma as well as in the Hageman factor deficient plasma and Factor X deficient plasma. Moreover, in experiments using purified Factor II and Factor X and Factor XII, the proteinase converted all factors in a way that allowed it to initiate the clotting cascade. The evidence suggests that the activation of each plasma and each factor by *C. albicans* proteinase is due to a limited proteolysis of Hageman factor, Factor II, and Factor X. Conversion of each factor except Factor IX to the active form, and the generation of thrombin in each plasma by the proteinase were observed at a pH range between 4.5 to 6.0. The result indicates that *Candida* proteinase has the potential to activate the blood clotting system and aggravate the infection process.

緒 言

口腔に常在する *Candida albicans* (以下 *C. albicans*) は、いわゆる日和見病原体の一種で、易感染性宿主にしばしば重篤な感染症を起こすことが知られ

ている¹⁻⁴⁾。また *C. albicans* は義歯性口内炎を起こすことも知られており、表層から深部まで多彩な感染症を引き起こす^{5,6)}。

C. albicans はヒトのみならず、マウスに対しても病原性を示すことが知られており、本菌の病原因子解析に関する多くの報告がなされているにも拘らず、不明な点が多い⁷⁻⁹⁾。本菌は菌体外に酸性領域 (pH 3.2~4.0) で至適活性を示すカルボキ

シルプロテアーゼ (EC 3. 4. 23. 6) を産生し¹⁰⁻¹²⁾, 生体防御タンパク質である免疫グロブリンのほか, アルブミン, ヘモグロビンさらにはケラチン, コラーゲンなどのタンパク質を分解することが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。また, プロテアーゼ産生菌と非産生菌との間でマウスに対する病原性が明らかに異なっていることから¹⁶⁾, このプロテアーゼが *C. albicans* の病原性発現に関与する重要な因子として取り上げられている^{17,18)}。また, 著者らは *C. albicans* プロテアーゼがプラズマ中の Kallikrin-Kinin system を活性化することにより, 局所の炎症発現に深く関与していることを報告した¹⁹⁾。

この研究では *C. albicans* プロテアーゼが Hageman 因子から始まる血液凝固カスケード反応を活性化し, プラズマ中にトロンビン活性を発現させることを見出したので, その成績を報告し, *C. albicans* の病原性発現におけるプロテアーゼの役割について考察する。

材料と方法

1. 使用真菌および培養

Sabouraud 培地で継代保存した *C. albicans* 1002 (教室保存株, serotype B) を用いた。

2. プロテアーゼの分離

牛血清アルブミンを窒素源として添加し Yeast Carbon Base (YCB, Difco) で *C. albicans* を培養し, 培養上清からすでに報告した方法¹⁹⁾でプロテアーゼを分離し, 5 mM citrate buffer, pH 6.7 で 2.1 mg/ml に調整し, -80°C で保存した。

3. 凝固因子, 血清および試薬

血液凝固第 II, IX, X (以上 Sigma) および XII (Enzyme research Lab.) 因子を使用した。正常ヒトプラズマは健康なボランティアから提供された。凝固因子欠乏プラズマとして Hageman 因子 (第 XII 因子) 欠乏プラズマ (George King Biomedical) および第 X 因子欠乏プラズマ (Sigma) を用いた。amino-methylcoumarin (AMC), t-Butyloxycarbonyl-Glutaminyl-L-Glycyl-L-Arginine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (Boc-Gln-Gly-Arg-MCA: 第 XII 因子用基質), t-Butyloxycarbonyl-L-Isoleucyl-L-Glutamyl-L-Glycyl-L-Arginine 4-

Methyl-Coumaryl-7-Amide (Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA; 第 X 因子用基質) および t-Butyloxycarbonyl-L-Valyl-L-Prolyl-L-Arginine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (Boc-Val-Pro-Arg-MCA; 第 II 因子用基質) はペプチド研究所製を用い, dimethyl sulfoxide で 10 mM に調整して -80°C で保存した。その他の一般試薬は和光純薬製を使用した。

4. プロテアーゼによる凝固因子の活性型変換

凝固因子の活性型変換は 2 段階の反応系を用意して実験した。初めに, それぞれの因子 $20\mu\text{l}$ とプロテアーゼ $10\mu\text{l}$ を $470\mu\text{l}$ の 10 mM acetate buffer (pH 4.0-7.0, 含 0.1% 牛血清アルブミン) に加え, 37°C , 1 分間反応させた。反応後, 2 番目の反応として, それぞれに Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8.0) を $490\mu\text{l}$ およびそれぞれの凝固因子用 MCA 基質 $10\mu\text{l}$ を加えてさらに 37°C , 10 分間反応させた。反応終了後 $500\mu\text{l}$ の 17% acetate を加えて反応を停止させ, 基質から放出された AMC を蛍光分光光度計 (励起: 380 nm, 吸収: 460 nm) で測定した。対照としてプロテアーゼの代わりに生理食塩水を用いた。なお, プロテアーゼによる第 IX 因子の活性化実験は 2 番目の反応系に上記 Tris-HCl buffer $470\mu\text{l}$, 第 X 因子 $20\mu\text{l}$ および第 X 因子用基質 $10\mu\text{l}$ を加えて 37°C , 10 分間反応させ, 以下同様にして AMC を測定した。

Fig. 1 {Cascade theory} of blood clotting system by Macfarlane (20).

Fig. 2 Activation of plasma clotting factors by *C. albicans* proteinase. Clotting factor XII (A), X (B) or II (C) were treated at different pH with *C. albicans* proteinase; closed symbol represent intact proteinase, open symbol represent control. AMC: amino-methylcoumarin. For experimental details see methods.

Fig. 3 Generation of thrombin in the plasmas by *C. albicans* proteinase. Normal (A), Hageman factor deficient (B) or Factor II deficient (C) plasmas were treated at different pH with *C. albicans* proteinase; closed symbol represent intact proteinase, open symbol represent control. AMC: amino-methylcoumarin. For experimental details see methods.

5. プロテアーゼによるプラズマ中の トロンビン活性の発現

プロテアーゼ 20 μ l, プラズマ 100 μ l を 880 μ l acetate buffer (10 mM, pH 4.0~6.5, 含0.05% polybrene) に加え, 37°C, 20 分間反応させた。反応後, それぞれに Tris-HCl buffer (100 mM, pH 9.0) 100 μ l とトロンビン用基質 10 μ l を加えてさらに10分間反応を続けた。反応終了後 390 μ l の17% acetate を加えて反応を停止させ, 基質から放出された AMC を蛍光分光光度計 (励起: 380 nm, 吸収: 460 nm) で測定した。対照としてプロテアーゼの代わりに生理食塩水を用いた。

結 果

凝固因子の活性化は図1に示すように, 生体内で酵素前駆体として存在するそれぞれの因子が順次活性化され, 最終的にトロンビン (Factor IIa) が形成される。これがフィブリノーゲンに作用して凝固が起こる。

それぞれの凝固因子に対するプロテアーゼの作用を図2に示した。図1に示した凝固カスケードを構成する因子のうち, 第XII, XおよびII因子は *C. albicans* が産生するプロテアーゼにより活性化

Fig. 4 Generation of thrombin in human plasma by *C. albicans* proteinase. Human plasma was mixed with *C. albicans* proteinase and incubated for different times, aliquots were removed and tested for thrombin activity. AMC: amino-methylcoumarin. For experimental details see methods.

され、それぞれの特異的基質を分解した。それぞれの因子に対するプロテアーゼの作用で、最も強い活性化が見られた pH は、第Ⅻ因子では6.0、第Ⅹ因子では5.0、第Ⅱ因子では5.0であった。しかし、第Ⅸ因子に対しては活性型への変換は見られなかった。

一方、プラズマを用いたトロンビン活性発現実験では、正常ヒトプラズマ、第Ⅻ因子欠乏プラズマ、あるいは第Ⅹ因子欠乏プラズマのいずれにおいてもプロテアーゼの作用により、トロンビン活性の発現が確認された。また、活性発現の pH については、プロテアーゼでそれぞれのプラズマを処理した時、高いトロンビン活性が発現されたのは正常プラズマでは5.7、第Ⅻ因子欠乏プラズマでは5.5、第Ⅹ因子欠乏プラズマでは5.0であった(図3)。さらに正常ヒトプラズマ中でのトロンビン活性発現はプロテアーゼの作用時間に比例して高まることが確認された(図4)。

考 察

血液凝固に関与する諸因子のうち、第Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ、ⅩⅠおよびⅫ因子はいずれもセリン系酵素で、生体内では酵素前駆体として存在することが

知られている。凝固系は上流の因子が活性型に変換されると、下流の因子を限定分解により活性型に変換して行くカスケードを構成し、最終的にトロンビンが形成され、これがフィブリンを凝固させる²⁰⁾。

今回 *C. albicans* プロテアーゼによる血液凝固因子の活性化とプラズマ中のトロンビン活性発現について調べた。結果で示したように *C. albicans* プロテアーゼはそれぞれの因子の活性型としての作用を示さないが、第Ⅸ因子を除いて第Ⅻ、ⅩおよびⅡ因子を活性型に変換することが明らかにされた。生体因子以外の物質で凝固系に作用する物質として、菌体内毒素が知られている^{21,22)}が、微生物由来のプロテアーゼがカスケードを構成する3種の凝固因子を活性化し、さらに正常プラズマのみならず因子欠乏プラズマにもトロンビン活性を発現させるという興味ある成績が得られた。プラズマ中でのトロンビン活性発現はアンチトロンビンやアンチトリプシン等のインヒビターの作用が及ばないことが前提条件になるが²³⁻²⁵⁾、プロテアーゼはこれらのインヒビターを短時間のうちに不活性化することを確認した(未発表)。

C. albicans プロテアーゼの至適活性 pH は3.0~4.0にあり、それ以上の pH 領域ではタンパク分解活性をほとんど示さず、7.0以上では不可逆的なアルカリ変性を起こす。本研究ではこのプロテアーゼの作用がタンパク質の構造破壊をもたらすものではなく、プロエンザイムの状態にある凝固因子に部分分解的に作用してその活性を発現させ、さらにその作用環境 pH がタンパク分解至適 pH よりもやや中性寄り(4.5~6.0)にあることを見出した。

C. albicans プロテアーゼの病因作用に関する研究で、これまでにタンパク基質の分解、生体防御タンパクの機能喪失、上皮細胞への付着および侵入等にプロテアーゼが関与していることが明らかにされてきた¹²⁾。著者らは先に *C. albicans* プロテアーゼは生体因子を限定分解し、それに継発される組織障害を起こすことを見出した。

今回の成績は、*C. albicans* プロテアーゼが感染局所に循環障害を起こして生体防御機構を回避する環境を作り、病巣の拡大を可能にすることを示

唆するものである。

C. albicans プロテアーゼの病因作用の分子機構解析に関するこの分野の研究は比較的少なく、今後明らかにされるべき点が多く残されている。

抄録：病原真菌 *Candida albicans* を牛血清アルブミン添加合成培地 (YCB) で培養し、培養上清からカルボキシプロテアーゼを分離し、その血液凝固因子に対する作用を調べた。血液凝固因子 (いずれもセリン系酵素) は通常生体内では酵素前駆体として存在するが、実験の結果、*Candida* プロテアーゼは凝固カスケード反応を構成する第Ⅻ因子、第Ⅹ因子および第Ⅱ因子をそれぞれ活性型に変換した。また、本酵素は正常ヒトプラズマのみならず、第Ⅻ因子欠乏プラズマおよび第Ⅹ因子欠乏プラズマにトロンビン活性を出現させた。本酵素による凝固因子の活性化およびプラズマ中へのトロンビン活性発現はいずれも pH 4.5 から 6.0 の環境で観察された。これらの結果から、本酵素は感染局所の循環障害をもたらし、さらに感染拡大を容易にするための環境作りに作用するであろうことが示唆された。

文 献

- 1) Edwards, J.E.Jr., Lehrer, R.I., Stiehm, E.R., Fischer, T.J. and Young, L.S. : Sever *Candida* infections : clinical prespective, immune defense mechanisms, and current concepts of therapy. *Ann. Intern. Med.* **89** : 91-106, 1978.
- 2) Seelig, M.S. and Kozinn, P.J. : Clinical manifestation and management of candidosis in the compromised patient. In *Fungal infection in the Compromised Patient* (Warnock, D.W. and Richardson, M.D., ed.). 49-92, John Wiley & Sons, New York, 1982.
- 3) Klein, R.S., Harris, C.A., Small, C.B., Moll, B., Lesser, M. and Friedland, G.H. : Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **311** : 354-358, 1984.
- 4) Dupont, B., Graybill, J.R., Armstrong, D., Laroche, R., Touze, J.E. and Wheat, L.J. : Fungal infections in AIDS patients. *J. Med. Vet. Mycol.* **30** : sup. 19-28, 1992.
- 5) Olsen, I. : Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol. Scand.* **32** : 329-333, 1974.
- 6) Budtz-Jørgensen, E. : The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand. J. Dent. Res.* **82** : 151-190, 1974.
- 7) Hasenclever, H.F. and Mitchell, W.O. : Pathogenicity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Sabouraudia* **1** : 16-21, 1962.
- 8) Holder, I.A. and Nathan, P. : Effect in mice of injection of viable *Candida albicans* and a cell-free sonic extract on circulating platelets. *Infect. Immun.* **7** : 468-472, 1973.
- 9) Cutler, J.E. : Acute systemic candidiasis in normal and congenitally thymic-deficient (nude) mice. *J. Reticuloendothel. Sco.* **19** : 121-124, 1976.
- 10) Remold, H., Fasold, H. and Staib, F. : Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* **167** : 399-406, 1968.
- 11) Rùchel, R. : Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. : *Biochem. Biophys. Acta* **659** : 99-113, 1981.
- 12) Rùchel, R., De Bernardis, F., Ray, T.L., Sullivan, P.A. and Cole G.T. : *Candida* acid proteinases. *J. Med. Vet. Mycol.* **30** : sup. 123-132, 1992.
- 13) Hattori, M., Yoshiura, K., Negi, M. and Ogawa, H. : Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. *Sabouraudia* **22** : 175-183, 1981.
- 14) Kaminishi, H., Hagihara, Y., Hayashi, S. and Cho, T. : Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **53** : 312-316, 1986.
- 15) Kobayashi, I., Kondoh, Y., Shimizu, K. and Tanaka, K. : A role of secreted proteinase of *Candida albicans* for the invasion of chick chorio-allantoic membrane. *Microbiol. Immunol.* **33** : 709-719, 1989.
- 16) McDonald, F. and Odds, F.C. : Virulence for mice of a protease-secreting strain of *Candida albicans* and a protease-deficient mutant. *J. Gen. Microbiol.* **129** : 431-438, 1983.
- 17) Odds, F.C. : *Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of *Candida* infection. *Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A.* **260** : 539-542, 1985.

- 18) Kwon-Chung, K.J., Lehman, D., Good, C. and Magee, P.T. : Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. Infect. Immun. **49** : 571-575, 1985.
- 19) Kaminishi, H., Tanaka, M., Cho, T., Maeda, H. and Hagihara, Y. : Activation of the plasma Kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. Infect Immun. **58** : 2139-2143, 1990.
- 20) Macfarlane, R.G. : An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. Nature **202** : 498-499, 1964.
- 21) Roeise, O., Bouma, B.N., Stadaas, J.O. and Aasen, A.O. : Dose dependence of endotoxin-induced activation of the plasma contact system : an in vitro study. Circ. Shock **26** : 419-430, 1988.
- 22) Michaels, F.H. and Banks, K.L. : Contribution of various host factors to resistance to experimentally induced bacterial endotoxemia in calves. Am. J. Vet. Res. **49** : 557-562, 1988.
- 23) Abildgaard, U. : Evidence that antithrombin III is the main physiological inhibitor of coagulation enzymes. In : The physiological inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis (Collen, D., Wiman, B. and Verstrate, M. ed.), pp. 31-34, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam · New York · Oxford, 1979.
- 24) Highsmith, R.F. : Evidence that α_2 -antiplasmin is the primary physiological inhibitor of plasmin. In : ibid. pp. 103-114.
- 25) Abildgaard, U. : Role of α_2 -macroglobulin as an inhibitor of coagulation. In : ibid. pp. 239-242.