Candida albicans の二形性の分子生物学

長 環

福岡歯科大学 口腔細菌学教室
〒814-0193 福岡市早良区田村2-15-1

〔受理：1999年2月15日〕

はじめに

Candida albicans (以下 *C. albicans*) はヒトの口腔、消化管、膣、皮膚などに常在する真菌であるが、ストレスあるいは免疫抑制、化学療法などにより宿主の抵抗力が低下した場合日和見感染を起こすことが知られている。*C. albicans* の病原性の指標として、二形性（環境に応じて酵母形あるいは菌糸形発育を示す形態変換形質）、菌体外酵素であるプロテアーゼやホスホリパーゼ産生能、生体表面への付着能などが指摘されている。加えて薬剤排出ポンプによる薬剤耐性に関する研究も行われている (7, 16)。

C. albicans の二形性が病原性の指標の一つとして注目されるようになったのは1958年 Young (18) の論文以来のことで、マウス腹腔内に *C. albicans* の生菌を注射した場合、酵母形の細胞は好中球により殺菌されたにもかかわらず、菌糸形は脾臓組織や単核細胞に侵入し排除されなかった所見に基づいている。一方 *C. albicans* の菌糸形発育を生活環の中で捉え、環境が悪化した場合に、酵母形の細胞は孢子を形成するのではなく素早く菌糸形に転換する。菌糸 (hypha) の初期段階は発芽管 (germ tube) と呼ばれ、この管がある長さになると管の内側に孔を持つ隔壁がで

き、分離された細胞質には核が一つ入る。さらに菌糸が伸長し、良好な環境に達するとそこで再び酵母形の出芽が見られるようになることもある。また仮性菌糸 (pseudohypha) と呼ばれるものは、一端からの出芽により長い娘細胞が連なった酵母形と菌糸形の中間的形成様式を示すものである。*C. albicans* の菌糸の伸び方に関し Gow (10) は、微小穴のあるポリスチレン膜上で酵母形の細胞を菌糸発現させた詳細な観察から、*C. albicans* が管、溝、あるいは縁に沿って菌糸を伸ばしていく性質 (tigmotropism) を有することを発見した。*C. albicans* の二形性に関わる研究は数多く報告されているが、一昔前までは形態発現を誘導する環境因子並びにその生化学的解析が主流であった (15)。しかし近年の分子生物学的手法の著しい進歩により、無性二倍体 (asexual diploid) である *C. albicans* においても、遺伝子レベルの解析が進んできた。さらに *C. albicans* における染色体の全塩基配列の決定は今世紀中にも終了する見通しがなされている。*C. albicans* の分子生物学に関しては、中川による本学会誌総説 (14) でわかりやすくまとめられている。*C. albicans* の二形性に関連した分子生物学的解析は、最近主に MAP (mitogen-activated protein) キナーゼカスケードを中心としたシグナル伝達系との関係で研究が進んできている。本稿ではこれらのことを踏まえ、形態変換に関連する遺伝子解析の現状および我々が行っている形態変換調節因子の解析について述べる。

Tamaki CHO
Molecular Biology of Dimorphism in *Candida albicans*
Fukuoka Dental college, Fukuoka 814-0193, Department
of Oral Microbiology

1. 形態変換に関与する遺伝子群の解析の現状

1992年 Fink ら (9) は、二倍体の *Saccharomyces cerevisiae* (以下酵母) が窒素飢餓環境下で、仮性菌糸発育を示す事を発見した。他の研究者により Ras (rat 由来 sarcoma 遺伝子産物) 経路が環境によるストレスに応答していることが報告され、Fink らは、窒素飢餓というストレスが酵母の Ras 経路および仮性菌糸を誘発するシグナル経路を誘導するのではないかと考えた。以後、酵母におけるシグナル伝達系と仮性菌糸発現との関係を解析する研究が進められ、*C. albicans* の形態変換における分子生物学的解析のガイドとして用いられるようになった。シグナル伝達系に関しては動物細胞や酵母における研究が盛んで、MAP キナーゼカスケードがシグナル伝達系の中心的働きを担っていることが明らかとなった。さらに増殖に関わる古典的 MAP キナーゼカスケードに加え、紫外線、浸透圧刺激、熱ショックなど外界からの多様なストレスに対応する新 MAP キナーゼスーパーファミリーも次々に解明されてき

ている。さらに細胞質から核内への伝達機構の解明も試みられている。図1は *C. albicans* のシグナル伝達系のうち、cyclic AMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (A キナーゼ) カスケード、タンパク質リン酸化酵素 C (C キナーゼ) カスケードおよび MAP キナーゼカスケードの想像図である。*C. albicans* から既に単離されたホモログ遺伝子については対応する産物名をカッコ内に示している。*C. albicans* ではまだホモログ遺伝子の存在が解明されていないものもある。また *INT1* (後述) のように *C. albicans* には存在するが酵母には存在しないものもある。動物細胞で重要な役割を担っているレセプター型チロシンキナーゼは酵母および *C. albicans* では見いだされていない。*C. albicans* においても MAP キナーゼカスケードはシグナル伝達系の中心的働きを担っているものと考えられる。またキナーゼカスケードという酵素反応系に流れ込む外界のシグナルは、レセプターを介すものと介さないものがある。さらに GTP 結合タンパク質から Ras へと伝達されたり、あるいは酵素反応をとらないタンパク質モジ

図1. *C. albicans* におけるシグナル伝達系の想像図

ュールによる伝達なども存在すると思われる。以下、形態変換に関与するいくつかの遺伝子について概説するが、これらは図1にも示したようにシグナル伝達系と直接あるいは間接的に関係があると考えられている遺伝子である。

1) *STE12* (sterile gene)

STE12 は、酵母における接合特異的遺伝子の発現に必要な転写因子をコードする。良好な栄養環境下で異なる一倍体 (haploid) 酵母 (a-cell, α -cell) が共存する場合、ペプチドフェロモン (a-factor, α -factor) のシグナルがフェロモンレセプターを介し GTP 結合タンパク質, MAP キナーゼカスケードを経由後、二手にわかれ一方では細胞周期を G1 期で停止し (sterile 現象), 他方では標的因子 Ste12p に伝達され接合へと展開する。窒素飢餓環境下におかれた二倍体酵母 (a/ α -cell) では、窒素飢餓という外界シグナルがフェロモンレセプターや G タンパク質を介さずに MAP キナーゼカスケードを経由後 Ste12p を活性化し、仮性菌糸を生じる。この *STE12* の *C. albicans* におけるホモログとして Fink らが *CPH1* (11) を単離した。この *CPH1* を *STE12* 欠損の一倍体および二倍体酵母に導入すると、*STE12* 欠損を相補する機能を示す。また *C. albicans* における *CPH1* の完全欠損株 (*cph1/cph1*) は、固形培地上で酵母形発育を示すが、液体培地や血清に対しては菌糸形への形態変換を示すことから、*C. albicans* では *CPH1* の他にも菌糸発現のための系が存在するであろうと考えられている。

2) *TUP1* (ability to take up dTMP)

TUP1 は、酵母において広範囲にわたる転写抑制因子としての機能を示す。これによって抑制を受ける遺伝子としては、グルコース抑制遺伝子 (*MIG1*), 酸素欠乏性 (hypoxi) 遺伝子 (*ROX1*), DNA 損傷による誘導遺伝子 (*CRT*), a-factor 特異的接合遺伝子 (*α 2-MCM1*), 一倍体特異的遺伝子 (hsg) などがある。Johnson ら (1) は、*C. albicans* におけるホモログ *TUP1* を単離した。*C. albicans* における *TUP1* 欠損株の形態発現を調べた結果、野生株 (*TUP1/TUP1*) および 1 アレルのみの欠損株 (*TUP1/tup1*) は酵母形発育を示すことができるが、完全欠損株 (*tup1/tup1*)

は通常は酵母形発育を示す条件下でも菌糸形発育を呈した。即ち、*C. albicans* における *TUP1* は、菌糸形発現を抑制する機能を有することが示された。特に菌糸形発現の初期に必要な遺伝子を抑制していると考えられている。また *C. albicans* と酵母では *TUP1* により抑制を受ける遺伝子に違いがあるらしく、それぞれの欠損株の表現型には違いが認められている。

3) *INT1* (gene encoding an integrin-like protein)

INT1 は、酵母のホモログとして単離されたものではない。脊椎動物の白血球インテグリン (細胞接着因子) のモノクローナル抗体が *C. albicans* の酵母形細胞および発芽管の表面に結合すること、一方抗体が結合した *C. albicans* はヒト表皮への接着性を示さないことなどの結果に基づき、Gale ら (8) は *C. albicans* におけるインテグリン様タンパク質をコードする遺伝子 *INT1* を単離し、機能解析を行なった。酵母は細胞接着性を示さないの、酵母に *INT1* ホモログはない。酵母に *INT1* を導入すると、細胞接着性が出現する。また *STE12* 欠損酵母に *INT1* を導入すると、仮性菌糸を形成する。即ち、*INT1* は細胞接着性のみならず形態形成にも関与していると考えられる。*INT1* 欠損 *C. albicans* を注射したマウスは深在性カンジダ症の軽減を示した。最近動物細胞では、インテグリンレセプターが細胞間の接着因子として作用するのみならず、レセプターから入ってきたシグナルが 14-3-3 タンパク質 (後述) を介し、細胞の延命などを導くことが解明されてきている。これらのことから、*INT1* も外界シグナルと核内での遺伝子発現を結ぶ伝達系になんらかの役割を担っている可能性はあると思われるが、Calderone (2) は Gale らの実験系に多少の疑問を投げかけており、*INT1* の機能は未だ不明瞭であるというコメントを出している。

4) 14-3-3 タンパク質

14-3-3 タンパク質は、最初脳に豊富に存在する伝達ホルモンとしてヒツジの脳から単離されたタンパク質であるが、最近その多彩な機能が注目されてきている。Fink ら (17) は、酵母におけるホモログ *BMH1* および *BMH2* の仮性菌糸発現との関係を調べた。14-3-3 タンパク質は

Ste20p と共同作用することにより Ras から Cdc (cell division cycle) 42 と経由してきたシグナルを MAP キナーゼカスケードに伝達し、その結果接合あるいは仮性菌糸発現が展開されるというモデルを提唱した。*C. albicans* におけるホモログの単離と機能解析は Sturtevant らによって現在進行中である (16)。

以上酵母や *C. albicans* から単離された四種類の遺伝子について述べたが、酵母で始まった仮性菌糸発現に関連するシグナル伝達系の解析は広く他の真菌にも応用されはじめており、形態分化や接合などにどのシグナル伝達経路がどのように関係しているのか研究されている (12)。そのような背景のなかで、*C. albicans* における遺伝子解析のために酵母をガイドに用いることは有効な手段である。しかし一方で、*C. albicans* の遺伝子の 5 % は酵母のホモログではなく、さらにそれらの大部分の遺伝子が代謝に関わっていることもわかってきた (13)。即ち *C. albicans* が酵母と違ってヒトに常在し、しかも病原性を発現することが、これら *C. albicans* に特有の遺伝子による可能性もあると考えられている。現在それぞれに重要性を持った *C. albicans* の遺伝子が着々と単離されその機能解析も進みつつあるが、形態変換を促す外界シグナルの入り口から細胞質へ、細胞質から核内への伝達、遺伝子産物の相互関係、酵母-菌糸形態変換のスイッチングなど、まだこれから明らかにされなければならない多くのことが残されている。

2. 形態変換調節因子の解析

ここでは我々が単離した *CGR1* (Candida growth regulatory gene) についてこれまでの経緯を含め紹介する。

1) 形態変換と増殖停止

酵母形で対数増殖中の *C. albicans* は静止期のものに比べ発芽管が誘導されにくい。我々はこの対数期の *C. albicans* から発芽管を誘導できる 2 種類の培地 (グルコース培地と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 培地) を作製した。これらの培地には次のような特徴がある。グルコース培地を用いる際には、対数期の *C. albicans* を一旦水中に10分以上放置した後接種しなければ

発芽管の誘導が見られない。一方 GlcNAc 培地では、そのような菌の前処理を必要としない。即ちグルコース培地における形態変換のためのこの水中放置という処理の意義は何か。また GlcNAc 培地ではなぜこのような処理が必要ないのか。水中放置処理を行うと、シグナル伝達因子の一つであるサイクリック AMP 量の増加 (3) や栄養培地に戻したときの世代時間の延長がみられた。またヒドロキシウレア (DNA 合成阻害剤)、デオキシグルコース (グルコース代謝拮抗剤)、マロン酸塩 (呼吸阻害剤) などにより増殖抑制処理をした対数期の *C. albicans* も、グルコース培地中で発芽管を発現した (4)。これらの結果から *C. albicans* が酵母形から菌糸形へ形態変換するには、先ず酵母形増殖の停止即ち DNA 複製の停止が必要ではないかと予想した。

2) *C. albicans* の形態変換と網膜芽細胞腫遺伝子ファミリー

正常な細胞周期では DNA の合成期 (S 期) の前に G1 期という間期が存在する。この間、細胞としては DNA 合成を行える状況にあるかチェック (チェックポイント制御) をし、不適當であれば細胞周期を G1 期で停止し修復までの時間稼ぎをする。動物細胞でこの G1 期の進行の中心的役割を担っているのが、網膜芽細胞腫 (retinoblastoma : Rb) 遺伝子産物としての Rb タンパク質である。Rb 遺伝子は当初その遺伝子欠損がガンを招くことから、ガン抑制遺伝子として単離された。活性型 Rb タンパク質は増殖関連遺伝子の転写因子に結合し、細胞を G1 期に留める。一方 Rb タンパク質がサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) などによりリン酸化されると、転写因子から離れ細胞は G1 期から S 期へと進む。即ち負の制御因子として働く。この Rb タンパク質はシグナル伝達系と細胞周期の接点に位置し重要な働きを担っている。最近さらに脱リン酸化状態の Rb タンパク質は、分化に関連する転写因子にも結合することが報告され、動物細胞の増殖と分化に深く関わっていることが解明されてきている。我々はこの Rb タンパク質の役割に興味を持ち、*C. albicans* の形態変換においても Rb 様タンパク質の作用が存在していないかを調べるために、先ず *C. albicans* の発芽管誘導に対する Rb

図2. *C. albicans* における *CGR1* の発現

対数期の酵母形細胞およびその飢餓処理菌 (a) と N-アセチルグルコサミン培地で培養した菌 (b) における全 RNA を抽出した時点 (矢印) (1), 細胞の形態 (2) および *CGR1* のノーザンブロット分析による発現 (3) を示している。対数期の *C. albicans* (飢餓処理 0 分), 60 分間の飢餓処理および N-アセチルグルコサミン培地での 60 分間の培養では酵母形を呈した。また N-アセチルグルコサミン培地での培養が 60 分を過ぎると発芽管が発現しはじめた。ノーザンブロット分析では, *CGR1* の発現量は, 対数期の菌に比べ飢餓処理菌および N-アセチルグルコサミン培地での培養菌で増加が見られた。rRNA 量がほぼ均一に見られることからアプライ量がほぼ均一であることを示している。文献 (6) からの引用。

タンパク質リン酸化阻害剤の作用を検討した(5)。サイクリック AMP 産生促進によるリン酸化阻害を示すフォルスコリン、リン酸化酵素阻害剤のオカダ酸および Rb タンパク質特異的リン酸化阻害剤のエリスロスフィンゴシンで対数期の *C. albicans* を処理後、洗菌、グルコース培地に接種すると発芽管を誘導した。この結果から *C. albicans* の形態変換に Rb 様機能が関与している可能性が示唆されたので、我々は *C. albicans* から Rb 様遺伝子を単離することを試みた。

3) *CGR1* の単離と発現

対数期の *C. albicans* を水中に放置したときに発現する遺伝子を RAP (RNA fingerprinting arbitrarily-primed PCR) 法を用いて探索した(6)。その結果 ORF (open reading frame) 1020bp, 想定分子量 38.4 KDa (340 アミノ酸) の *CGR1* を単離した。この *CGR1* は酵母の YBR053c (機能は不明であるが, *CDC28* モチーフを含んだ細胞周期依存性 (M/G1) 遺伝子と考えられている) と 28.5% のアイデンティティを示した。酵母では Cdc28 が Cdk キナーゼとして細胞周期を動かす中心的役割を担っている。酵母での G1 期停止は, Cdc28 と G1 サイクリン (G1 期を調節するサイクリン) によって制御されているが, *CGR1* はこれらの遺伝子とはシミュラリティを示さなかった。ノーザン分析による発現実験 (図 2) から, 対数期の *C. albicans* を水中に放置した直後および GlcNAc 培地での発芽管出現前に *CGR1* の発現が増加した。図には示されていないが, 代謝阻害剤により増殖が抑制された対数期の *C. albicans* や, 初期静止期の *C. albicans* でも *CGR1* の発現は増加した。このことから, *CGR1* は増殖停止に関係した細胞周期依存性遺伝子である可能性が考えられる。*CGR1* が我々の期待どおりに Rb 遺伝子のような増殖停止と形態分化に関わる機能を有すかどうかは未だわからないが, 現在変異株の作製や相互作用タンパク質の解析などを行い遺伝子の機能を推定しようとしている。

おわりに

C. albicans の病原性の指標の一つと考えられている二形性に焦点を当て、酵母におけるシグナル伝達系と仮性菌糸発現との関係をガイドにした

C. albicans での形態変換機構解析の現状を紹介した。後半部では、増殖停止に関係した細胞周期依存性 (?) 遺伝子 *CGR1* について紹介した。*CGR1* をはじめ、形態変換に関わる一連の遺伝子解析が進みその機能や性状から形態変換機構が明らかにされることにより、将来的には抗真菌剤やワクチンの開発、免疫低下と真菌症の関係、さらに *C. albicans* に留まらず真核生物の G0 期・G1 期・分化 (differentiation) 点の相互関係までその意義を広げることができると期待される。

後半部の我々の研究成果は、第98回米国微生物学会 (ASM: 1998.5.17-21 Atlanta) シンポジウムで発表した内容をまとめたものである。尚これらの研究は、本学会会員でもあった故萩原義郷福岡歯科大学名誉教授 (平成10年7月29日逝去) が終生持ち続けた細胞の形態分化への強い興味によって支えられ、多くの大学院生、教職員、他の研究機関の共同研究者らの協力によってなされたものであることを付し、感謝いたします。また本誌への寄稿を勧めていただいた愛知学院大学教授吉村文信先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Braun, B.R., Johnson, A.D. (1997): Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science* **277**, 105-109.
- 2) Calderone, R.A. (1998): The INT1 of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol.* **6**, 300-301.
- 3) Cho, T., Hamatake, H., Kaminishi, H., Hagihara, Y., Watanabe, K. (1992): The relationship between cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and morphology in exponential phase *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**, 35-42.
- 4) Cho, T., Hagihara, Y., Kaminishi, H., Watanabe, K. (1994): The relationship between the glucose uptake system and growth cessation in *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**, 461-466.
- 5) Cho, T., Hamatake, H., Hagihara, Y., Kaminishi, H. (投稿中): Inhibitors of protein phosphorylation including the retinoblastoma protein enhance germination in *Candida albicans*.
- 6) Cho, T., Sudoh, M., Tanaka, T., Kuwano, M., Nakashima, Y., Watanabe, K., Chibana, H., Hagihara, Y., Kaminishi, H. (投稿中): Isolation and expression of a putative growth regulator gene

- (CGR1) from *Candida albicans*.
- 7) Cutler, J.E. (1991): Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu. Rev. Microbiol. **45**, 187-218.
 - 8) Gale, C.A., Bendel, C.M., McClellan, M., Hanser, M., Becker, J.M., Berman, J., Hostetter, M.K. (1998): Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene INT1. Science **278**, 1355-1358.
 - 9) Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R. (1992): Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. Cell **68**, 1077-1090.
 - 10) Gow, N.A.R. (1994): Growth and guidance of the fungal hypha. Microbiol. **140**, 3193-3205.
 - 11) Liu, H., Kohler, J., Fink, G.R. (1994): Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. Science **266**, 1723-1726.
 - 12) Madhani, H.D., Fink, G.R. (1998): The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. Trends in Cell Biol. **8**, 348-353.
 - 13) Magee, P.T., Scherer, S. (1998): Genome mapping and gene discovery in *Candida albicans*. ASM News **64**, 505-511.
 - 14) 中川善之 (1995): 総説 *Candida albicans* の分子生物学. 日本細菌学雑誌 **50**, 671-685.
 - 15) Odds, F.C. (1989): *Candida* and Candidosis, 2nd eds. London: Bailliere Tindall.
 - 16) Polonelli, L.O., Walsh, T.J. (1998): Proceedings of the XIV congress of the international society for human and animal mycology 6-13 June, 1997, Parma, Italy. Med. Mycol. **36**, Suppl 1.
 - 17) Roberts, R.L., Mosch, H-U., Fink, G.R. (1997): 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signal during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. Cell **89**, 1055-1065.
 - 18) Young, G. (1958): The process of invasion and the persistence of *Candida albicans* injected intraperitoneally into mice. J. Infect. Dis. **102**, 114-120.