

# (西條 知見) 論文内容の要旨

主 論 文

「*Candida glabrata* において、Skn7p は酸化ストレス応答および病原性に関与する」  
“Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*”

西條 知見, 宮崎 泰可, 泉川 公一, 三原 智, 高園 貴弘, 小佐井 康介  
今村 圭文, 関 雅文, 掛屋 弘, 山本 善裕, 柳原 克紀, 河野 茂

Mycopathologia: Accepted; 4 August 2009 / Published online; 20 August 2009, [10p]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員: 河野 茂 教授)

## 緒 言

深在性真菌症は、臓器移植後の免疫抑制療法の進歩やエイズの増加に伴い症例数が増加しており、*Candida* 属による深在性真菌症において *Candida glabrata* は *Candida albicans* に次いで頻度の高い原因菌である。*C. glabrata* 感染症では、アゾール系抗真菌薬に対する低感受性や耐性化が問題となることが多く、新たな機序の抗真菌薬の模索が必要である。

宿主の防御機構として、貪食細胞による病原真菌に対する酸化ストレスが重要な役割を果たしているが、真菌側は酸化ストレス応答を起こすことでこれに対応している。真菌の酸化ストレス応答機序の解明は、深在性真菌症の治療における一助となると考えられる。

真菌の酸化ストレス応答に関与する転写調節因子の一つに、Skn7p が知られている。Skn7p 欠損による酸化ストレス応答の低下は *Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans* といった他の酵母型真菌では報告されているが、*C. glabrata* では報告されていない。今回、*C. glabrata* SKN7 欠失株を作成し、酸化ストレス応答や病原性の変化を検討した。

## 対象と方法

菌株は、*C. glabrata* の野生株、SKN7 欠失株、SKN7 再挿入株を使用した。SKN7 欠失株は、相同組み換えにより SKN7 遺伝子をマーカー遺伝子 (*hisG-URA3-hisG*) に置き換えることで作成した。SKN7 再挿入株は、SKN7 欠失株に対して SKN7 遺伝子が組み込まれたプラスミドを導入することにより作成した。SKN7 遺伝子の欠失、および SKN7 以外の遺伝子に変異がないことを、PCR 法およびサザンブロッティング法で確認した。

表現型の検討では、酸化ストレスを与える薬剤である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) を含有した培地上で菌の増殖能を比較した。Skn7p 標的遺伝子 (*TRX2*; thioredoxin, *TRR1*; thioredoxin reductase, *TSAL*; cytosolic thioredoxin peroxidase, *CTAL*;

catalase, *GLR1*; glutathione reductase) に関しては、 $H_2O_2$  刺激開始後 15 分～120 分における標的遺伝子発現量の変化を、定量的 real-time PCR にて経時的に測定した。病原性の変化を検討するため、7 週齢、メスの C57BL/6 マウスに *C. glabrata* 野生株、*SKN7* 欠失株、*SKN7* 再挿入株を尾静脈から接種してカンジダ血症マウスを作成した。7 日後の肝・脾・腎における臓器内菌数を菌株間で比較し、有意差の有無を検討した。

## 結 果

*SKN7* 欠失株は野生株と比較すると、通常の培地における増殖能に変化は見られなかったが、 $H_2O_2$  や t-BOOH を含有する培地上での増殖能は低下していた。また、*SKN7* 再挿入株は野生株と同等の増殖能を示したことから、 $H_2O_2$  や t-BOOH 存在下での増殖能の低下は、*SKN7* の欠損による表現型の変化と結論付けられた。

*Skn7p* 標的遺伝子の解析については、野生株では  $H_2O_2$  刺激開始 15 分後の *TRX2*, *TRR1*, *TSA1*, *CTA1* の発現量は  $H_2O_2$  非刺激に対して 20～140 倍の発現量の増加が見られた。これに対し、*SKN7* 欠失株での上記 4 種の遺伝子発現量は、同条件において何れも 5 倍以下であり、*SKN7* 欠失によるこれら標的遺伝子の発現抑制が示された。

カンジダ血症マウスの肝・脾・腎における臓器内菌数の検討では、何れの臓器においても *SKN7* 欠失株は野生株と比較して、統計学的に有意な菌数の低下が確認された。

## 考 察

*SKN7* 欠失株の  $H_2O_2$  や t-BOOH に対する感受性の変化は *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* の変化と同様であり、*Skn7p* は *C. glabrata* においても酸化ストレス応答に重要な役割を果たしていることが示唆された。Real-time PCR の結果からは、*Skn7p* は *TRX2*, *TRR1*, *TSA1*, *CTA1* といった遺伝子の発現を調節することにより、酸化ストレスに対応していると考えられる。

病原性に関しては、*SKN7* 欠失株は野生株および *SKN7* 再挿入株と比較すると、カンジダ血症マウスの臓器内菌数の低下が見られたことから、*Skn7p* は *C. glabrata* の病原性に関与していると考えられる。*SKN7* 欠失による酸化ストレス応答の低下と病原性低下の関係については、以前に *C. glabrata* の *API* (Activator protein 1) 欠失株において酸化ストレス応答の低下は見られたものの、病原性に変化は見られなかったという報告があり、直接的な因果関係の証明は困難である。*Skn7p* が酸化ストレス応答以外の機序で *C. glabrata* の病原性に関与している可能性もあり、他の病原因子への関与などを今後検討していく必要がある。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。