

称号及び氏名 博士(獣医学) 岡崎 健一

学位授与の日付 平成21年9月30日

論文名 真菌感染によってマウス血清中に誘導される感染誘導型
ヘモペキシンの発見とその性状解析

論文審査委員 主査 山崎 伸二
副査 笹井 和美
副査 三宅 眞実

論文要旨

緒言

真菌は、キノコ、カビや酵母を含む微生物の総称である。人類は、古くから真菌と密接な関係を保って共存してきた。例えば、真菌の発酵能力によるアルコール飲料、パン、チーズなどの食品への利用、さらには、青カビから産生されるペニシリン、免疫抑制剤のサイクロスポリンAなどの医薬品への利用が知られている。一方、真菌による有害作用も少なくなく、真菌が産生するカビ毒のマイコトキシンや発ガン作用を示すアフラトキシンなども知られている。しかも近年、ガンや臓器移植、エイズなど免疫力の低下した患者に発症する致死率の高い深在性真菌症が大きな問題となってきている。これら深在性真菌症の中でもカンジダ症とアスペルギルス症が発生率、死亡率の両面で大半を占め、最も重要である。深在性真菌症の治療は、抗真菌化学療法が適用されている。しかし、宿主の免疫系が著しく低下した状態では、抗真菌化学療法による効果を十分に得られない場合が多い。それゆえ、基礎疾患により免疫能が低下した状態でも有効な治療法として生体由来の抗真菌物質が注目されている。申請者は、生体由来の新たな抗真菌物質を探索する過程で、*Candida albicans* KE-2 株 (以下 KE-2 株) を感染させたマウス (以下 *Candida* 感染マウス) の血清中に強い抗真菌活性が誘導されることを見出した。

本研究では、新規抗真菌薬の探索研究を目的として、*Candida* 感染マウス血清中に見いだされた抗真菌活性を有する物質の性状を解析し、抗真菌物質の精製及び同定した。

第一章 真菌接種によりマウス血清中に誘導される抗真菌活性について

Candida 感染マウス血清中に KE-2 株の増殖を抑制する抗真菌活性が誘導されることを見出した。この現象が KE-2 株に特異的か否かを調べることを目的に、*C. albicans* IFM4009 株(以下 *C. albicans*)、*Cryptococcus neoformans* IFM49624(以下 *C. neoformans*) および *Aspergillus fumigatus* IFM40835 (以下 *A. fumigatus*) の死菌、あるいは生菌をマウス尾静脈よりそれぞれ投与し、血清中に同様の抗真菌活性が誘導されるか否かについて検討した。抗真菌活性の測定は、10% Fetal Bovine Serum (FBS)を含む RPMI1640 培地と *C. albicans* Ca-15 株 (以下 Ca-15 株) を用いて行った。その結果、*C. albicans* の生菌を投与した群の血清中に最も強い抗真菌活性が誘導された。また血清中に誘導された抗真菌活性は生菌、死菌に関わらず投与した菌数と正の相関を示し、*C. albicans* だけでなく *C. neoformans* や *A. fumigatus* に対しても認められた。*C. albicans* の死菌をマウスに投与するとトランスフェリン (TF) が誘導され、抗真菌活性を示すことが報告されている (1)。そこで、本活性が TF に起因するか否かについて検討した。*C. albicans* KE-2 株の生菌を接種したマウス血清を 10%含む RPMI1640 培地に 10 μM の塩化鉄(II) (Fe^{2+})を添加した群では *Candida* 感染マウス血清の抗真菌活性の低下が見られ、100 μM 以上添加した群では全く抗真菌活性を示さなくなった。以上のことから、*Candida* 感染マウス血清中には、トランスフェリンもしくは、真菌の鉄イオンの利用を阻害している何らかの物質が誘導されている可能性が考えられた。次に、10% FBS を含む RPMI1640 培地あるいは 10%FBS を含まない RPMI1640 培地(以下単に RPMI1640 培地)に TF を加え、*C. albicans*、*C. neoformans* や *A. fumigatus* に対する抗真菌活性を調べた。さらに、鉄に対してキレート作用を持つラクトフェリン (LF) と鉄に加え、亜鉛や銅に対してもキレート作用を持つカルプロテクチン(CA)について調べた。その結果、RPMI1640 培地では TF、LF あるいは、CA を RPMI1640 培地に添加した群においては全ての群で抗真菌活性を示したが、10%FBS を含む RPMI1640 培地では抗真菌活性を示さなかった。真菌感染マウス血清に見いだされた抗真菌活性は、10%FBS を含む RPMI1640 培地でも認められることから、マウス血清中に誘導された抗真菌活性を示す物質は既知の TF、LF あるいは CA で無い可能性が示唆された。

真菌が利用できる鉄源として FBS 中には遊離鉄以外に血球由来のヘム鉄(ヘミン)が存在する。そこで、感染マウス血清中に誘導された抗真菌活性に及ぼすヘミンの影響について検討した。RPMI1640 培地中での TF の抗真菌活性は、少量のヘミンの添加で消失され真菌が増殖したのに対し、この系に *Candida* 感染マウス血清を添加した場合、再び抗真菌活性が認められた。これらの結果から、真菌感染マウス血清に誘導された抗真菌活性は、ヘム鉄の利用を阻害することに基づく可能性が考えられた。

第二章 マウス血清中に誘導された抗真菌物質の精製と性状解析

Candida 感染マウス血清から抗真菌物質を精製するにあたり、抗真菌活性の測定法の構築を行った。遊離鉄イオンの影響を排除するため、各種濃度の TF を RPMI1640 培地に加え Ca-15 株の増殖に対する影響を検討し、100%増殖阻止濃度の 4 倍量に相当する 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加えることとした。また、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TF を含む RPMI1640 培地に各種濃度のヘミンを加え、Ca-15 株の増殖に対する影響を調べた結果、TF の Ca-15 株に対する増殖阻止効果は、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヘミン添加で完全に解除された。以上の結果より、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TF と 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヘミンを含む RPMI1640 培地を抗真菌物質のアッセイ培地とした。このアッセイ培地を用いて *Candida* 感染マウス血清中に誘導された抗真菌物質を Blue Sepharose CL-6B を用いて精製した。素通り画分を回収後、1.5 M KCl を含む緩衝液で蛋白を溶出した。その結果、1.5 M KCl で溶出されたアルブミン画分のピークの後半部に抗真菌活性が認められた。この画分を濃縮し、Mono Q を用いてさらなる精製を行った。0.15 M と 0.7 M の KCl を含む緩衝液を用いたステップワイズ法で溶出し、抗真菌活性を測定したところ 0.15 M KCl で溶出したフラクションに抗真菌活性が認められた。約 5 mL (約 277 mg) のマウス血清から最終的に 1 mg の精製蛋白を得、比活性は約 17 倍上昇した。精製蛋白は、SDS-PAGE で分子量約 6 万の単一なバンドとして確認された。また、精製産物の純度を逆相 HPLC で確認したところ、シングルピークとして溶出され、純度は 98%以上であることを確認した。精製した抗真菌物質の N 末端アミノ酸配列をエドマン分解法で決定した結果、マウスのヘモペキシンと一致した。ヘモペキシンは、肝臓で産生される血漿糖蛋白で、哺乳動物の血清中に存在しヘムと強く結合する急性相反応物質の一種である。

精製したヘモペキシン（以下感染誘導型ヘモペキシン）を用いて *Candida* および *Aspergillus* に対する抗真菌活性を調べた結果、特定の *C. albicans* に対してのみ抗真菌活性を示すのではなく、4 株の異なる *C. albicans* を始め *C. parapsilosis*, *A. fumigatus* 及び *A. flavus* に対しても抗真菌活性を示した。さらに、感染誘導型ヘモペキシンは、リンパ球減少マウスやリンパ球・好中球減少症マウスを用いた *Candida* 全身感染に対して、投与量に依存した抗真菌活性を示した。感染誘導型ヘモペキシンは、*in vivo* においても抗真菌活性を示し、真菌の感染防御において重要な役割を担っている可能性が考えられた。

第三章 感染誘導型ヘモペキシンと正常型ヘモペキシンの比較

ヘモペキシンは正常マウス血清中にも含まれている蛋白である。しかしながら、正常マウス血清では非常に弱い抗真菌活性しか認められず、正常マウス血清中に含まれるヘモペキシン（正常型ヘモペキシン）は感染誘導型ヘモペキシン（以下感染誘導型）と異

なる可能性が考えられた。そこで、正常マウス血清から正常型ヘモペキシン（以下正常型）を精製し、感染誘導型と比較した。第2章と同様の方法（で正常型を精製し、Ca-15株に対する抗真菌活性について感染誘導型と比較した。感染誘導型のIC₅₀は5.2 µg/mLであったのに対し正常型のIC₅₀は7.6 µg/mLであり、感染誘導型が正常型に比べ1.5倍強い抗真菌活性を示した。ヘモペキシンはヘミンと強く結合することから、感染誘導型と正常型のヘミン結合容量の比較を行った。その結果、感染誘導型は、正常型に比べ約1.5倍高い結合容量を示した。以上より感染誘導型と正常型の比活性の違いは、ヘミンの結合容量と相関性が認められたことから、両蛋白の構造上の違いを想定しSDS-PAGEで移動度の比較を行った。感染誘導型は正常型に比べ、若干低分子側に泳動された。そこで、感染誘導型のアミノ酸配列を正常型と比較するため、エドマン分解法、MALDI-TOF質量分析法、nano-LC-ESI-イオントラップ質量分析法で解析した。その結果、シグナル配列を除くアミノ酸配列437残基中434残基（99.3%）について解析し、調べた範囲でマウスの正常型との違いを見出せなかった。

ヘモペキシンにはN型糖鎖結合配列が6ヶ所存在し、分子量の約20%が糖である。そこで、N型およびO型糖鎖をそれぞれ酵素で切断し、SDS-PAGEで解析した。その結果、感染誘導型と正常型のN型糖鎖を酵素でそれぞれ切断したものは、感染誘導型と正常型とも同じ位置に泳動されたことから、感染誘導型と正常型の違いはN型糖鎖に起因する可能性が示された。感染誘導型の糖鎖付加サイトをMALDI-TOF質量分析法、nano-LC-ESI-イオントラップ質量分析法を用いて調べた結果、6箇所のN型糖鎖結合部位全てに糖鎖が付加されていることが確認された。さらに、感染誘導型および正常型の糖組成分析を行い、単糖モル比で比較した。感染誘導型と正常型で中性糖のフコースで違いが見られ、感染誘導型は正常型に比べ2.4倍少ないモル比であった。以上の結果より、感染誘導型と正常型の違いはN型糖鎖のフコースの欠損に起因する可能性が考えられた。

総括

1. *C. albicans*, *A. fumigatus* 及び *C. neoformans* は生菌・死菌を問わずマウス血清中にトランスフェリンと異なる抗真菌活性を誘導することを見いだした。
2. 真菌感染によってマウス血清中に誘導される物質はヘモペキシン（感染誘導型）であることを見出した。
3. 感染誘導型ヘモペキシンは、正常マウス血清中に存在する正常型ヘモペキシンと比べてより強い抗真菌活性を示し、その違いがN型糖鎖中に含まれるフコース含量の減少に起因すると考えられた。
4. 感染誘導型ヘモペキシンは、*in vitro* のみならず *in vivo* においても様々な真菌に対して抗真菌活性を示した。

以上の結果より、感染誘導型ヘモペキシンは、深在性真菌症の新たな治療薬としての可能性が期待される。

審査結果の要旨

真菌はパンやチーズなどの発酵食品や抗生物質などの医薬品生産において欠かすことのできない微生物として、古くから人類に様々なかたちで利用されている。一方、真菌が産生するマイコトキシンや発ガン性を有するアフラトキシン、さらにはヒトに病気を引き起こす真菌感染症など、ヒトに対する真菌の有害作用も知られている。特に近年、ガンや臓器移植、エイズなど免疫力の低下した患者に発症する致死率の高い深在性真菌症が大きな問題となっている。これら深在性真菌症の中でも *Candida* 症と *Aspergillus* 症が発生率、死亡率の両面で大半を占め最も重要である。現在、抗真菌化学療法が深在性真菌症の治療に適用されているが、宿主の免疫力が著しく低下した状態では効果を十分に発揮できない場合が多い。それゆえ、基礎疾患により免疫力が低下した状態でも有効な治療法として生体由来の抗真菌物質が注目されている。生体由来の新たな抗真菌物質を探索する過程で、*Candida albicans* を感染させたマウスの血清中に強い抗真菌活性が誘導されることを見出した。

本研究では、新規抗真菌薬の探索研究を目的として、*C. albicans* を感染させたマウス血清中に見いだした抗真菌活性を示した物質の性状を解析し、抗真菌物質の精製、同定及び精製標品を用いて性状を解析した。

第1章では、*C. albicans* を感染させたマウス血清中に誘導された抗真菌活性は、*C. albicans* に特異的でなく *Cryptococcus neoformans* や *Aspergillus fumigatus* の感染によっても抗真菌活性が誘導されることを示した。また、生菌のみならず死菌においてもマウス血清中に抗真菌活性が誘導されること、抗真菌活性の強さは投与した菌数と正の相関を示し、*C. albicans* の生菌投与で最も強く誘導されることを示した。本抗真菌活性は鉄イオンの添加で解消されるが、従来から報告されているトランスフェリンではなく、ヘム鉄の利用を阻害する蛋白性の物質であることを明らかにした。

第2章では、*C. albicans* 感染によってマウス血清中に誘導された抗真菌活性を示す物質を精製することを目的として、まず、抗真菌活性のアッセイ培地を確立した。本アッセイ培地を用いて、Blue Sepharose、MonoQ によるイオン交換クロマトグラフィーで精製した結果、抗真菌活性を示した物質は分子量約 60 kDa の蛋白質であることを明らかにした。この 60 kDa の蛋白質は、N 末端アミノ酸配列の解析からヘモペキシンであ

ると考えられた。精製したヘモペキシンは、特定の *C. albicans* のみならず *Candida* 属菌、*Cryptococcus* 属菌や *Aspergillus* 属菌に対しても抗真菌活性を示した。精製ヘモペキシンは、易感染性マウス体内の *C. albicans* の増殖も阻害したことから、*in vitro* のみならず *in vivo* においても抗真菌活性を示すことを明らかにした。ヘモペキシンは、正常マウス血清中にも存在することが知られており、事実、正常マウス血清でも弱いながら抗真菌活性が認められた。しかしながら、正常マウス血清と感染マウス血清の抗真菌活性価から予想されたヘモペキシン量と ELISA で測定したヘモペキシン量とは一致せず、感染マウス血清中のヘモペキシン（感染誘導型）と正常マウス血清中のヘモペキシン（正常型）は質的に異なる可能性が示唆された。

第3章では、感染誘導型と正常型の違いを生化学的に明らかにすることを目的として、正常マウス血清から正常型を精製し、感染誘導型との性状を比較した。感染誘導型の IC₅₀ は 5.2 µg/mL であるのに対し正常型のそれは 7.6 µg/mL であり、感染誘導型が正常型に比べ 1.5 倍強い抗真菌活性を示すことが明らかになった。感染誘導型は、正常型に比べ約 1.5 倍高いヘミン結合容量を示した。ヘモペキシンは糖蛋白であることが知られている。そこで両ヘモペキシンのアミノ酸配列及び糖鎖構造を比較したところ、感染誘導型と正常型の全アミノ酸配列の 99.3% で完全に一致しているが、糖鎖構造、特に N 型糖鎖構造に違いがある可能性を見いだした。N 型糖鎖の糖組成分析結果から感染型と正常型の N 型糖鎖中のフコース含量の違いが抗真菌活性の違いに関与している可能性が考えられた。

以上の結果は、*C. albicans* 感染症によってマウス血清中に誘導された抗真菌活性は、従来から知られていたトランスフェリンでなくヘモペキシンであることを初めて明らかにした。しかも、*C. albicans* 感染症によって誘導される感染誘導型は、正常マウス血清中に存在する正常型と少なくとも糖鎖構造が異なることによりヘミンとの結合容量が増し、抗真菌活性が上昇していることを明らかにした。これらの成果は、感染誘導型ヘモペキシンが新たな抗真菌薬となる可能性を示しており、獣医学の分野のみならず医学領域においても多大な貢献をされると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。