

氏 名	たかぎ ゆきのぶ 高 木 幸 信
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 136 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Genetic Approaches to the Study of Virulence in the Pathogenic Fungus <i>Candida albicans</i> (病原性真菌 <i>Candida albicans</i> における病原性研究に向けた遺伝学的アプローチ)
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 本 憲 二 教 授 石 川 冬 木 教 授 永 尾 雅 哉

論 文 内 容 の 要 旨

*Candida albicans*は、免疫機能が著しく低下した未熟児、臓器移植患者、エイズ患者などにとって生命を脅かすほどの危険な日和見性病原菌である。本菌は血清などの環境因子に応答して酵母型から菌糸型へと形態を変化させることが知られており、この形態変化が病原性に重要であると認識されている。最近の研究により、形態変化には細胞内のcAMPによるプロテインキナーゼAの活性化(cAMP-PKA経路)が重要であることが明らかにされている。一方、近縁種である*Saccharomyces cerevisiae*では、cAMP/PKA経路が形態変化の一種である偽菌糸形成を活性化し、また、その経路の最上流ではGタンパク質共役型受容体Gpr1がグルコースセンサーとして機能することが明らかになっている。しかしながら、*C. albicans*ではこうした環境因子を認識するセンサーは同定されていなかった。本論文の第一部では、この2種類の酵母における形態変化の制御機構の類似性に着目し、*C. albicans*ゲノムデータベースから*S. cerevisiae* GPR1遺伝子のホモログを見出してCaGPR1と命名し、その機能解析を行った。まず、CaGpr1及びCaGpa2(CaGpr1に共役することが予想されるGタンパク質)の欠損株を各々作製し、様々な角度からそれらの表現型を解析した。両欠損株は菌糸誘導する固体培地において著しい形態変化不全を示すが、これらは培地にdibutyryl cAMPを添加することで回復することを発見した。また、グルコースに依存したcAMPレベルの一過的な上昇が野生株では観察されるが、両欠損株では殆ど認められないことを見出した。更に、エピスタシス解析により、CaGpr1はCaGpa2の上流で機能すること、酵母Two-Hybrid法によりCaGpr1のC末端領域がCaGpa2と相互作用することを明らかにした。また、Northern blot解析を行うことによって、cAMP依存性の菌糸形成特異的な遺伝子(*HWPI1*, *ECE1*)の発現レベルが両欠損株では野生株に比べて減少していることを明らかにした。一方で、両欠損株は血清(菌糸誘導因子の一つ)を含む液体培地では野生株と同程度の菌糸形成を示すことを観察したことから、CaGpr1やCaGpa2に依存した菌糸形成が病原性に関与するかを調べた。その結果、マウスを用いた病原性試験により、両欠損株が野生株と同様の病原性を保持していることを明らかにした。以上の結果から、*C. albicans*において、CaGpr1及びCaGpa2はcAMP/PKA経路の上流因子として固体培地における形態変化を制御するが、液体培地における血清による菌糸誘導や病原性の付与には関与しないという結論を得た。

*C. albicans*では、ここ数十年間に遺伝子解析が飛躍的に進んだ。しかしながら、二倍体であるがためにその遺伝子破壊は非常に煩雑であり、網羅的な遺伝子解析は遅れている。本論文の第二部では、Loss of heterozygosity (LOH; 相同染色体上のヘテロ座位がホモ座位となる染色体改変)に着目し、*C. albicans*における効率的な遺伝子破壊の可能性を検証した。*ADE2*座位を人為的にヘテロな状態にした変異株を構築し、これを用いて様々な角度からLOHの頻度を調べた結果、LOH頻度はUV照射によって飛躍的に上昇すること、また、EMS変異処理も同様にLOHを有意に誘発することを見出した。更に、このUV誘導性LOHは定常期よりも対数増殖期の細胞において頻発することを明らかにした。7番染色体上の様々な座位におけるLOH頻度の解析から、UV誘導性LOHはセントロメア付近では殆ど誘発されないが、そこから離れるほど顕著に起こることを明らかにした。一方、*RAD52*(*S. cerevisiae*におけるそのホモログは相同組み換えによるDNA修復に関与する)

が及ぼすLOHへの影響を調べた結果、*RAD52*がその遺伝子コピー数に依存した形でLOHを活性化することを見出した。これらの結果から、高頻度のUV誘導性LOHが*C. albicans*における遺伝子解析を行うにあたって強力なツールとなりうることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文の著者は、*C. albicans* とその近縁種である*S. cerevisiae*の間でシグナル伝達経路やゲノム配列が高く保存されていることに着目し、以下の2つの研究を行った。

*C. albicans*が酵母型から菌糸型へ形態を変化させるにはcAMP-PKA経路の活性化が必要であることが知られていたが、本論文の第一部では、その経路の上流で機能するGタンパク質共役型受容体CaGpr1を見出し、それがGタンパク質CaGpa2と共にcAMP-PKA経路を制御することを解明した。また、本論文の著者は、CaGpr1及びCaGpa2が菌糸誘導性の液体培地、特に液体血清培地において菌糸形成に全く関与しないことから、CaGpr1が血清に応答する受容体である可能性が低いことを示した。一方、菌糸誘導性の固体培地ではCaGpr1またはCaGpa2の欠損株が菌糸形成不全となることを見出し、CaGpr1がグルコースやシュクロースといった糖などの栄養源を認識する受容体として働き、形態変化の制御に関わることを明らかにした。このように培地の状態（固体または液体）に応じて異なる表現型が観察されたことは、複数の因子に応答する菌糸誘導メカニズムを解明する上で非常に興味深い結果であると考えられる。CaGpa2に関しては先行論文が存在し、*C. albicans*では*S. cerevisiae*とは異なり、CaGpa2がcAMP/PKA経路ではなくMAPKカスケードを介して形態変化を制御すると報告されていた。しかし、著者はCaGPR1及びCaGPA2の両欠損株を用いて生化学的・分子生物学的な解析を行うことによって、CaGpa2がCaGpr1と共にcAMP/PKA経路を介して形態変化を制御することを証明した。本研究は、*C. albicans*の菌糸誘導メカニズムの解明に一石を投じたという点で、非常に価値がある。また、cAMP-PKA経路の構成因子とは異なり、CaGpr1及びCaGpa2が病原性に関与しないという結果を得た。更には、寒天内では著しい菌糸形成を示す*CaADH1prCaGPA2^{Q355L}*変異株が低病原性であるという興味深い性質を見出した。菌糸形成と病原性の間の関連を示すこのような知見を得たことは、*C. albicans*の宿主への感染メカニズムを明らかにする上で大きな寄与となる。他方、cAMP/PKA経路が病原性に必須であると報告されている多くの病原性真菌では本経路に関わるGタンパク質共役型受容体は未だ発見されていないことから、これらの病原性に対する研究に本研究が与えたインパクトは非常に大きいと考えられる。

*C. albicans*は常に二倍体であるためにその遺伝子破壊には多大な時間を要していた背景から、本論文の第二部では、それを解消するためにLoss of heterozygosity (LOH) という染色体改変に着目し、これを*C. albicans*における遺伝子破壊に応用することを試みた。*C. albicans*ではLOHに関する知見は殆ど報告されていなかったが、著者はLOHがUV照射やEMS変異処理によって高頻度に引き起こされること、セントロメアを除く座位では効率的にLOHが起こることを見出し、LOHが*C. albicans*における遺伝子破壊に応用できる可能性を提示した。また、*RAD52*遺伝子とその遺伝子コピー数に依存した形でLOHを活性化させることも発見した。この結果は、Rad52の作用機序を明らかにするだけでなく、その発現調節によってLOH誘発を制御できるという可能性を考慮すると、応用面においても重要な知見を与えるものである。また、本研究は*C. albicans*だけでなく二倍体または多倍体である他の生物種における遺伝子解析の発展にも、大きく寄与するものと考えられる。

以上のことから、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。尚、平成20年1月29日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。