

氏名 (本籍)	Mirbod Fariba (イラン)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 343 号
学位授与日付	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Molecular cloning of a Rho family, <i>CDC42Ca</i> gene from <i>Candida albicans</i> and its mRNA expression changes during morphogenesis
審査委員	(主査) 教授 北島 康雄 (副査) 教授 野澤 義則 教授 江崎 孝行

### 論文内容の要旨

*Candida albicans* (*C. albicans*) は、ヒトで最も頻繁に単離される二形性病原真菌である。この真菌の有する病原性の程度 (virulence) を規定する因子として、これまでにいくつかの物質が提唱されており、プロテアーゼやホスホリパーゼなどの細胞外に分泌される加水分解酵素、宿主組織への接着物質が代表的なものである。また、二形性変換と病原性との関連も指摘されているが、その詳細は現在のところ明らかではない。

申請者は、*C. albicans* の virulence に関連する遺伝子を同定することを目的として、これまでに、virulence 因子の一つと考えられているホスホリパーゼの分泌能が異なる、病原性の強い株と弱い株を用い、遺伝子の発現パターンの違いを differential display 法を用いて比較分析した。その結果、CaTIF (*C. albicans* 転写開始因子) の発現が病原性の強い株に高度であることが明らかになった。本研究では、*C. albicans* の形態の二形性 (dimorphism) が virulence に関係していることに着目した。Ras をはじめとする低分子量 GTP 結合蛋白質は、酵母や哺乳類細胞で、細胞形態を含むさまざまな細胞機能を制御していることが判明しつつあるが、なかでも *CDC42* は、*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) の出芽形成 (budding) に関与していることが明らかになっている。そこで本研究では、*C. albicans* *CDC42* 遺伝子 (*CDC42Ca*) をクローニングし、*C. albicans* の温度変化に伴う形態変化における *CDC42* 発現を調べた。

### 実験材料および方法

*Candida albicans* *CDC42* 遺伝子のクローニングに用いるプローブは PCR 法によって以下のように合成した。プライマーは、ヒト、*S. cerevisiae*、および *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) の *CDC42* の間で高度に保存された領域 (エフェクタードメインおよび GTP 結合ドメイン) のアミノ酸配列にもとづいて設計した。鋳型 DNA には *C. albicans* (ATCC 10261) ゲノム DNA ライブラリーを用い、上記プライマーにて PCR を行い、予想されたサイズ (約 350bp) に近いサイズの産物を pMOSBlue T-ベクターにクローニングした。塩基配列を決定したところ、ヒトおよび *S. cerevisiae* の *CDC42* と高い相同性を有していたので、これをプローブとして用い、ブランクハイブリダイゼーション法で *C. albicans* ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニングを行い、*C. albicans* *CDC42* 遺伝子をクローニングした。

温度変化に伴う形態変化および *CDC42* mRNA 発現量の変化の観察には、*C. albicans* 1594 IFO 株を用いた。株の維持はサブローグコース寒天培地で、形態変化の観察はアミノ酸添加最小培地で行った。まず 28°C 下で early stationary phase にまで培養した後、新鮮な培地に回収して 2 つに分割し、それぞれをさらに 28°C と 37°C で培養した。28°C では、細胞は培養開始 2 時間後に発芽を形成しはじめた。一方、37°C では、細胞は発芽管を生じ、培養開始 24 時間後に菌糸集落を形成した (菌糸型)。試料は 2, 4, 8, 20, および 24 時間の時点で採取し、ガラスビーズで細胞破碎し、ついでフェノール・クロロホルムを用いて常法に従って全 RNA を抽出した。

ノーザンブロット分析は、各時点の等量的全 RNA を試料として、上記プローブを用いて標準的方法により行った。塩基配列の決定はジデオキシ法を用いた。塩基およびアミノ酸レベルでの相同性検索には、それぞれ blastn

およびblastpプログラムを用いた。

## 実験結果

PCR法で合成したプローブを用い約50,000個のブラークをスクリーニングした。最終的に得られた陽性クローンは、EcoRIで制限分解した後pUC118プラスミドにサブクローニングし、その中からプローブとハイブリダイズする4.2kbの断片を単離した。塩基配列の解析の結果、この4.2kbの断片は、190アミノ酸からなる推定分子量20.5kDaのタンパク質をコードする単一open reading frame (570bp) を有していることが判明した。さらに相同性検索の結果、アミノ酸レベルで*S. cerevisiae* CDC42と87.8%、*S. pombe* CDC42と82.8%、ヒトCDC42と76.4%の相同性を示した。

次に、形態変化に伴うCDC42Ca mRNA量の変化をノーザンプロット法を用いて解析した。CDC42CaのmRNAは約1.5kbで、その発現量はstationary phaseではごく僅かであった。細胞を28℃の新鮮な培地に移すと、mRNA発現量は出芽形成に従って培養開始2時間後でピークとなる上昇を示した。この時、少なくとも培養開始2時間後までは細胞数に変化はなかった。一方、37℃の新鮮な培地に移した細胞では、発芽管の形成、それに続く菌糸型への移行と共に軽度なCDC42Ca mRNAの発現の上昇を示し、培養開始12~24時間後にはプラトーに達した(約4倍の上昇)。

## 考 察

低分子量GTP結合蛋白質は、酵母から哺乳動物に至るまで、これまでに50種類以上見出されており、スーパーファミリーを形成している。このスーパーファミリーは、Ras, Rho, Rab, Arf, その他の5つのグループに分類され、細胞の分化・増殖、細胞運動・細胞形態の制御、細胞内小胞輸送といった幅広い細胞機能に関与することが明らかにされつつある。CDC42はRhoファミリーに属する低分子量GTP結合蛋白質の一つで、哺乳類細胞では細胞骨格の構築およびMAPキナーゼ系に至るシグナル伝達において重要な役割を果たしており、また、*S. cerevisiae*では出芽の形成に関与していることが明らかにされている。今回申請者は、CDC42Caを*C. albicans*からクローニングし、それが、出芽酵母の*S. cerevisiae*、分裂酵母の*S. pombe*、およびヒトのCDC42と高い相同性を有し、特に、*S. cerevisiae* CDC42との相同性が最も高いことを明らかにした。また、*C. albicans*の温度変化による形態変化に伴うCDC42Ca mRNAの発現レベルを検索した結果、その出芽及び発芽管、菌糸の形成に相関して上昇することが示された。これらの結果は、CDC42Caが、*S. cerevisiae*の場合と同様に、形態変化に関連することを示唆している。*C. albicans*の形態の二形性がvirulence因子の一つと考えられていることから、CDC42Caが*C. albicans*のvirulenceに関与している可能性が強く示唆された。ところが、CDC42Caが*C. albicans*のvirulenceに必須な分子であるか否かに関しては、CDC42Caのノックアウト株を樹立し、その病原性及び二形性に対する影響を検討することによって明らかにされる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者Mirbod Faribaは、日和見真菌感染を引き起こす代表的菌種である*C. albicans*から、RhoファミリーのGTP結合蛋白質のCDC42をコードする遺伝子(CDC42Ca)をクローニングし、それが*C. albicans*の形態変化およびvirulenceに関与している可能性を示した。この結果は、分子医真菌学の発展のみならず、臨床的にきわめて重要な日和見真菌感染症の発症予防および治療の研究の発展に少なからず寄与するものと認める。

### [主論文公表誌]

Molecular cloning of a Rho family, CDC42Ca gene from *Candida albicans* and its mRNA expression changes during morphogenesis

J. Med. Vet. Mycol. 1997, 印刷中