

博士論文

病原性酵母 *Candida albicans* における菌糸形成阻害剤の探索と二形性形態変換機構の解析  
(Development of hyphal formation inhibitors and analysis of dimorphic transition mechanism in the  
pathogenic yeast *Candida albicans*)

2021 年 9 月

佐藤 達記

山口大学大学院創成科学研究科

## 要旨

カンジダ症は病態によって、皮膚の表面にあらわれる表在性真菌症と内臓等にあらわれる深在性真菌症に分類され、深在性真菌症は、真菌が肺、肝臓、脳など、体の深部に入り込んで感染を起こす感染症で予後不良なことが多い。日本における深在性カンジダ症の 30-50%は *Candida albicans* を起因菌として発症し、*C. albicans* により引き起こされる深在性カンジダ症は、その制御が難渋する感染症の一つとなっている。

*C. albicans* は生育環境に応じて酵母形と菌糸形の二つの形態を呈する二形性真菌で、酵母形から菌糸形への二形性変換は、生育温度や pH などの外部環境や血清等による誘導物質によって引き起こされる。菌糸形成は本菌の病原性と関連しているため、二形性変換の解明は、病原性の解明並びに新たな治療薬の開発に重要である。本研究では、*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル伝達系の解明、菌糸誘導条件の単純化、並びに菌糸形成阻害剤の探索を行った。

第2章では、*C. albicans* の形態変換に関与する二つのシグナル伝達系の解明を行った。まず、クオラムセンシング分子 farnesol による菌糸形成阻害メカニズムを解明した結果、farnesol は mitogen-activated protein キナーゼの系を抑制することにより菌糸形成を阻害していることを明らかにした。続いて、*C. albicans* の菌糸形成時における  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルの解明を行った。カルモジュリン阻害剤による菌糸形成の阻害には、cyclic adenosine monophosphate 依存性プロテインキナーゼ (以下 cAMP-PKA) の系で制御されている菌糸特異的 mRNA の発現の抑制が関与していることを明らかとした。さらに、カルモジュリン阻害剤は、菌糸誘導時において菌体内 cAMP の生成に影響を与えなかったため、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の系の cAMP よりも下流、又は、cAMP-PKA の系とは別の経路から菌糸特異的 mRNA の発現を誘導し、菌糸形成を引き起していると考えられた。

第2章では *C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル伝達系の解析による二形性変換の解明を行ったが、ここで *C. albicans* の菌糸誘導条件について着目した。広く使用されている *C. albicans* の菌糸誘導条件は、温度 (37°C)、 $\text{CO}_2$ 、や pH などの環境条件や、菌糸誘導因子である血清、*N*-アセチルグルコサミン (以下 GlcNAc)、又は特定のアミノ酸等を YPD 培地、DMEM 培地、又は RPMI-1640 培地等の基礎培地に添加して培養する条件であるが、これらの条件には、添加される菌糸誘導因子に加え、基礎培地中の炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、pH、及び  $\text{CO}_2$  などの様々な因子が含まれている。さらに、これらの成分や濃度は基礎培地間で異なる。このような様々な因子が入り混じった複雑な菌糸誘導条件下で細胞内シグナル伝達系の解析による二形性変換の解明は難しいと考え、まず菌糸誘導における不要な因子を排除し菌糸誘導条件の単純化を図ることが *C. albicans* の二形性変換の解明に必要と考えた。

第3章では、複雑な菌糸誘導条件を単一成分まで単純化し、*C. albicans* の菌糸誘導を引き

起こす誘導因子の同定を行った。RPMI-1640 培地を用いて菌糸誘導因子の同定を検討した結果、プロリンを特定することができた。プロリンは 0.02 mM 以上を単独で水に添加するだけで菌糸誘導を引き起こせることを明らかとした。これにより、単純化した *C. albicans* の菌糸誘導条件を確立することができた。

第 4 章では、プロリンアナログ等をスクリーニングし菌糸形成阻害剤の探索を行った。その結果、L-azetidine-2-carboxylic acid (以下 AZC)、L-4-thiazolidinecarboxylic acid (以下 T4C)、及び  $\alpha$ -N-methyl-L-proline (以下 mPro) が効果的な菌糸形成阻害剤として特定することができた。これらの化合物は、プロリンアナログでありながら、プロリンによる菌糸誘導だけでなく GlcNAc による誘導も阻害し、それぞれで、その阻害効果が異なっていた。AZC はプロリンと GlcNAc の両方を阻害できたが、T4C はプロリンに対して阻害を示し、mPro は GlcNAc を阻害した。これらのことから、プロリンと GlcNAc の菌糸誘導には関連があるものの、その誘導経路は別々に存在していることが示唆された。血清にはプロリンと GlcNAc が含まれているため、これらが血清による菌糸誘導の主因子と仮説を立て、プロリンアナログによりプロリンと GlcNAc を阻害することで血清による菌糸誘導を阻害できるか検証した。AZC、T4C、及び mPro は、血清による *C. albicans* の菌糸形成を阻害できたため、血清による主な菌糸誘導因子はプロリンと GlcNAc であることを明らかとした。さらに、AZC 単独、又は T4C と mPro の併用によってプロリンと GlcNAc の両経路を阻害することで、高濃度の血清でも菌糸形成を阻害できた。さらに、AZC 又は T4C と mPro の併用は酵母形での細胞増殖に影響を与えることなく血清による *C. albicans* の菌糸誘導を阻害できた。これらの薬剤は、*C. albicans* に対して増殖抑圧をかけることなく菌糸形成を抑制できたため、プロリンと GlcNAc の阻害を標的とする薬剤は、薬剤耐性菌の出現しづらい新たな治療薬の開発につながると考えられた。

以上、本研究では、菌糸誘導の単純化によるアプローチにより、*C. albicans* の血清による菌糸形誘導因子の特定と効果的な菌糸形成阻害剤を発見することができた。

## Abstract

Candidiasis is classified into superficial mycosis that appears on the surface of skin, and deep mycosis that appears in the internal organs, depending on pathological conditions. Deep mycosis is often an infection in which the fungus enters deep part of the body such as lung, liver, brain, etc., thus its prognosis is poor. In Japan, 30 - 50% of deep candidiasis is caused by *Candida albicans*, therefore, deep candidiasis caused by *C. albicans* is one of the infectious diseases for which the control is difficult.

*C. albicans* is a dimorphic fungus that exhibits two forms, a yeast form and a hyphal form, depending on the growth environment. Dimorphic conversion from the yeast form to the hyphal form is caused by external environments such as growth temperature, pH, and serum. Since hyphal formation is associated with the pathogenicity of the yeast, elucidation of dimorphic transformation mechanism is important for understanding of pathogenicity and development of new therapeutic agents. In this study, I clarified the hyphal formation signal for morphological change of *C. albicans* from the yeast form to the hyphae form, simplified the hyphal induction conditions, and searched for hyphae formation inhibitors.

In chapter 2, I explored two signaling pathways involved in morphological transformation in *C. albicans*. First, the mechanism of hyphal formation inhibition by the quorum-sensing molecule farnesol was elucidated. As a result, it was found that farnesol inhibits hyphal formation by suppressing the mitogen-activated protein kinase system. The  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin signal during hyphal formation in *C. albicans* was subsequently elucidated. Inhibition of hyphal formation by calmodulin inhibitors involved inhibition of hyphal-specific mRNA expression regulated by cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase (cAMP-PKA). Furthermore, since calmodulin inhibitors did not affect the formation of intracellular cAMP during hyphal induction, the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin signal of *C. albicans* was considered to induce hyphal formation by the expression of hyphal-specific mRNA downstream of cAMP in the cAMP-PKA system or from a pathway different from the cAMP-PKA system.

In chapter 2, the dimorphic transformation of *C. albicans* was elucidated by analyzing the morphological transition signaling system from the yeast form to the hyphal form. Next, I focused on the hyphal induction conditions of *C. albicans*. The widely-used hyphal induction conditions for *C. albicans* include environmental conditions such as temperature (37°C),  $\text{CO}_2$ , and pH, and the addition of hyphal inducers such as serum, *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), or certain amino acids to a basal medium such as YPD, DMEM, or RPMI-1640 medium, which include a variety of factors such as carbohydrates, peptides, amino acids, vitamins, minerals, pH, and  $\text{CO}_2$  in the basal medium. These basal medium components also contain hyphal inducers. In addition, these components and concentrations vary between the basal media. Under such complicated hyphal induction conditions, it is difficult to elucidate dimorphic transformation mechanism by analyzing intracellular signaling pathways. Therefore, it is necessary to remove unnecessary factors for hyphal induction and simplify

the hyphal induction conditions in order to elucidate dimorphic transformation of *C. albicans*.

In chapter 3, the complex hyphal induction conditions were simplified to a single component to identify the inducers that cause hyphal induction of *C. albicans*. Proline was identified when hyphal inducers were tested in RPMI-1640 medium. I found that proline caused hyphal induction only by adding 0.02 mM or more of proline alone to water. This allowed us to establish simplified hyphae induction conditions for *C. albicans*.

In chapter 4, proline analogs were screened to search for hyphal formation inhibitors. As a result, L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC), L-4-thiazolidinecarboxylic acid (T4C), and  $\alpha$ -N-methyl-L-proline (mPro) were identified as effective hyphae formation inhibitors. Although these compounds were proline analogs, their inhibitory effects were different. AZC was able to inhibit both proline and GlcNAc, while T4C inhibited mainly proline, and mPro inhibited only GlcNAc. These results suggest that although proline and GlcNAc induce hyphal formation, their induction pathways are different. Since serum contains proline and GlcNAc, I hypothesized that these are key factors for serum-induced hyphal induction and evaluated whether inhibition of proline and GlcNAc by proline analogs can inhibit serum-induced hyphal induction. Since AZC, T4C, and mPro were able to inhibit hyphal formation of *C. albicans* by serum, proline and GlcNAc were identified as major hyphal inducers by serum. Furthermore, inhibition of proline and GlcNAc by AZC alone or a combination of T4C and mPro inhibited hyphal formation even at high serum concentrations. Furthermore, AZC or T4C in combination with mPro could inhibit the hyphal induction of *C. albicans* by serum without affecting cell growth in the yeast form. Since these drugs were able to suppress hyphal formation without suppressing the growth of *C. albicans*, it was considered that drugs targeting the inhibition of proline and GlcNAc would lead to the development of new therapeutic drugs that are unlikely to develop drug-resistant bacteria.

In conclusion, our simplified hyphal induction approach allowed us to identify a serum-derived hyphal form inducer of *C. albicans* and to discover effective hyphal formation inhibitors.

## 目次

第1章 序論.....	8
第2章 <i>C. albicans</i> の形態変化メカニズムの解析.....	17
2.1 緒言.....	17
2.2 材料及び方法.....	18
2.3 結果.....	20
2.3.1 クオラムセンシング分子 farnesol による <i>C. albicans</i> の菌糸形成阻害メカニズムの 解析.....	20
2.3.1.1 Farnesol による <i>C. albicans</i> の菌糸形成の阻害効果.....	20
2.3.1.2 Farnesol による菌糸特異的 mRNA 発現の抑制.....	20
2.3.2 <i>C. albicans</i> の菌糸形成における Ca <sup>2+</sup> /カルモジュリンシグナルの役割.....	22
2.3.2.1 カルモジュリン阻害剤による <i>C. albicans</i> の菌糸形成の阻害効果.....	22
2.3.2.2 カルモジュリン阻害剤による菌糸特異的 mRNA 発現の抑制.....	23
2.3.2.3 カルモジュリン阻害剤による菌体内 cAMP 量の変化.....	24
2.3.2.4 cAMP による Ca <sup>2+</sup> /カルモジュリンシグナルへの影響.....	24
2.4 考察.....	26
2.5 結言.....	29
第3章 <i>Candida. albicans</i> の菌糸誘導条件の単純化.....	30
3.1 緒言.....	30
3.2 材料及び方法.....	31
3.3 結果.....	32
3.3.1 RPMI-1640 培地における菌糸誘導因子の特定.....	32
3.3.2 L-プロリンによる菌糸形成最少濃度の決定.....	34
3.4 考察.....	35
3.5 結言.....	36
第4章 プロリンアナログによる <i>Candida. albicans</i> の菌糸形成阻害.....	37
4.1 緒言.....	37
4.2 材料と方法.....	37
4.3 結果.....	39
4.3.1 プロリンによる <i>C. albicans</i> の菌糸形成を阻害する化合物の探索.....	39
4.3.2 GlcNAc による <i>C. albicans</i> の菌糸誘導と GlcNAc による菌糸形成を阻害するプロリ ンアナログ等の探索.....	40

4.3.3 血清による菌糸誘導条件下におけるプロリンアナログの菌糸形成阻害 .....	42
4.4 考察.....	46
4.5 結言.....	49
第5章 結論.....	50
参考文献 .....	51
謝辞.....	56

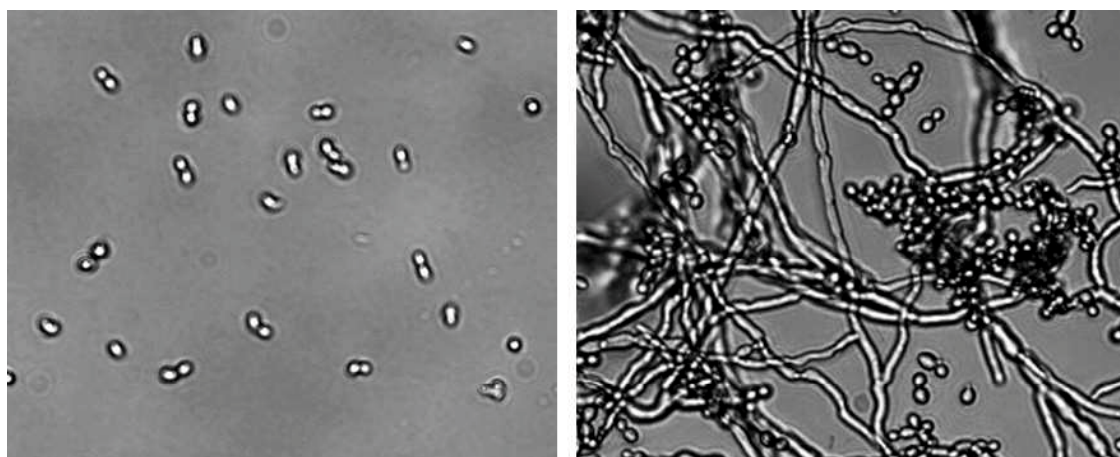
## 第1章 序論

カンジダ症は、*Candida albicans* (Fig. 1.1) をはじめとする *Candida glabrata*、*Candida parapsilosis*、及び *Candida tropicalis* などのカンジダ属の真菌によって引き起こされる日和見感染症である。通常は、皮膚、口腔粘膜、胃、腸管、そして膣などの粘膜に定着している常在菌で、感染力・病原性共に弱いため原則として健常者に感染しない [1]。しかし、悪性腫瘍、糖尿病、臓器移植、ステロイド等の免疫抑制薬や抗腫瘍薬による化学療法、並びに後天性免疫不全症候群(AIDS)などにより宿主の抵抗力が低下した場合に感染症を引き起こす。近年の医学・医療の高度化や抗腫瘍薬及び免疫抑制薬の頻用による感染リスク患者の増加に伴って、1980年代頃からカンジダ症は新興感染症として注目されている [2]。

カンジダ症は病態によって、皮膚の表面にあらわれる表在性カンジダ症と内臓等にあらわれる深在性カンジダ症に分類される。表在性カンジダ症には皮膚、爪、口腔、及び膣カンジダ症が知られており、一般に抗真菌剤による治療が可能である。一方、深在性カンジダ症は、真菌が肺、肝臓、脳など、体の深部に入り込んで感染を起こし、多くの場合、免疫力が低下した患者で発症するため予後不良なことが多い。深在性カンジダ症のおよそ 30-50%は *C. albicans* を起原因菌として発症し、*C. albicans* は深在性カンジダ症の代表的原因菌である [3]。

*C. albicans* による深在性カンジダ症の中でも、菌が血中で増殖して感染症を引き起こす血流感染症（カンジダ血症）は、29-47%の死亡率と高く、また、*C. albicans* は米国において4番目に多い血流感染症原因菌である [4]。この高い死亡率の原因の一つとして、治療が難しく効果的な治療方法が少ないことが挙げられる。さらに、医療費高騰の側面からも問題となっており、カンジダ血症を引き起こすとおよそ3から13日間の治療が必要となり、これはUS\$ 6000から29000の費用に相当する [5]。カンジダ血症の発症には、中心静脈カテーテル（central venous catheter : CVC）等による治療が関与していることが多く、そのほとんどがカテーテル関連血流感染症である。カテーテル治療により感染症が起こる経路として、①カテーテル皮膚挿入部から菌が侵入する経路、②カテーテル接合部から侵入し内腔を介する経路、③薬液に菌が混入することにより侵入する経路、及び、④他の感染部位から血液を介する経路が考えられている (Fig.1.2)。近年の血管カテーテル等の医療デバイスの汎用により、今日においてカンジダ血症は、臨床の現場での制御が難渋する感染症の一つとなっている [6]。





Yeast form

Hyphae form

Figure 1.1 *C. albicans* の酵母形と菌糸形の形態写真

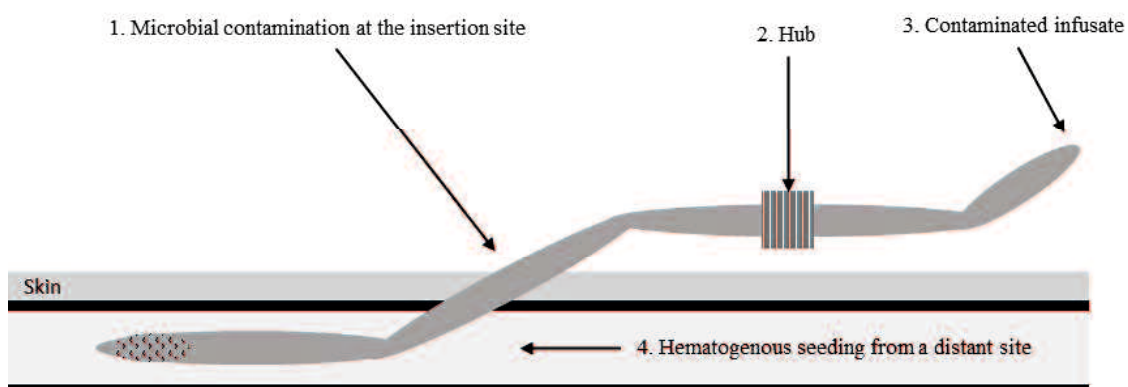


Figure 1.2 カテーテル関連血流感染症の発生機序 1. カテーテル挿入部位の汚染、2. 接続部位の汚染、3. 薬液の汚染、4. 他の感染原からの汚染

*C. albicans* によるカンジダ血症の治療が困難な原因として、本菌がバイオフィルムを形成することが挙げられる。バイオフィルムとは、細菌や真菌などの微生物が不特定の場所に接着し、菌体外マトリックスと共に形成している高次構造体であるが、微生物がバイオフィルムを形成することによって自らの生存に適當ではない乾燥や紫外線存在下の環境でも生き残ることができる。バイオフィルムは身近な生活環境の中においても存在しており、洗い場の隅のヌメリなどもその一つである。このバイオフィルムがヒトの体内で形成されると、その治療を困難とする。例えば、バイオフィルムを形成した緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) では抗生物質に対する耐性が浮遊細胞に比べて数百倍も上昇し、薬剤治療を難しくしている [7]。 *C. albicans* でもバイオフィルムを形成すると抗真菌薬への抵抗性を獲得し、その効果は限定的となるため治療が困難となることが知られている。このような *C. albicans* のバイオフィルム形成機序は、まず酵母がカテーテル等の基質表面に付着し、一部の細胞が酵母形から接着能の高い菌糸形へと形態変換してコロニーを形成する。次に細胞外マトリックスを産生して物理的な刺激への抵抗性を獲得し、その後、成熟したバイオフィルムから一部を酵母形として崩壊させ、血流を介して新たな基質でバイオフィルムを形成し感染症を拡大していく (Fig. 1.3) [8]。この過程の中で、本菌の形態変換が二つの点で重要な役割を担っている。一つ目は酵母形から菌糸形への形態変換で、この変換によって基質への接着が可能となる。もう一つは菌糸形から酵母形への形態変換である。バイオフィルム形成後の崩壊において、接着能の高い菌糸形から可動性が高い酵母形に変換することにより血流を介して新たな基質に到達することを可能とする。つまり、 *C. albicans* の二形性変換が本菌のバイオフィルム形成において重要な役割を担っていることがわかる。

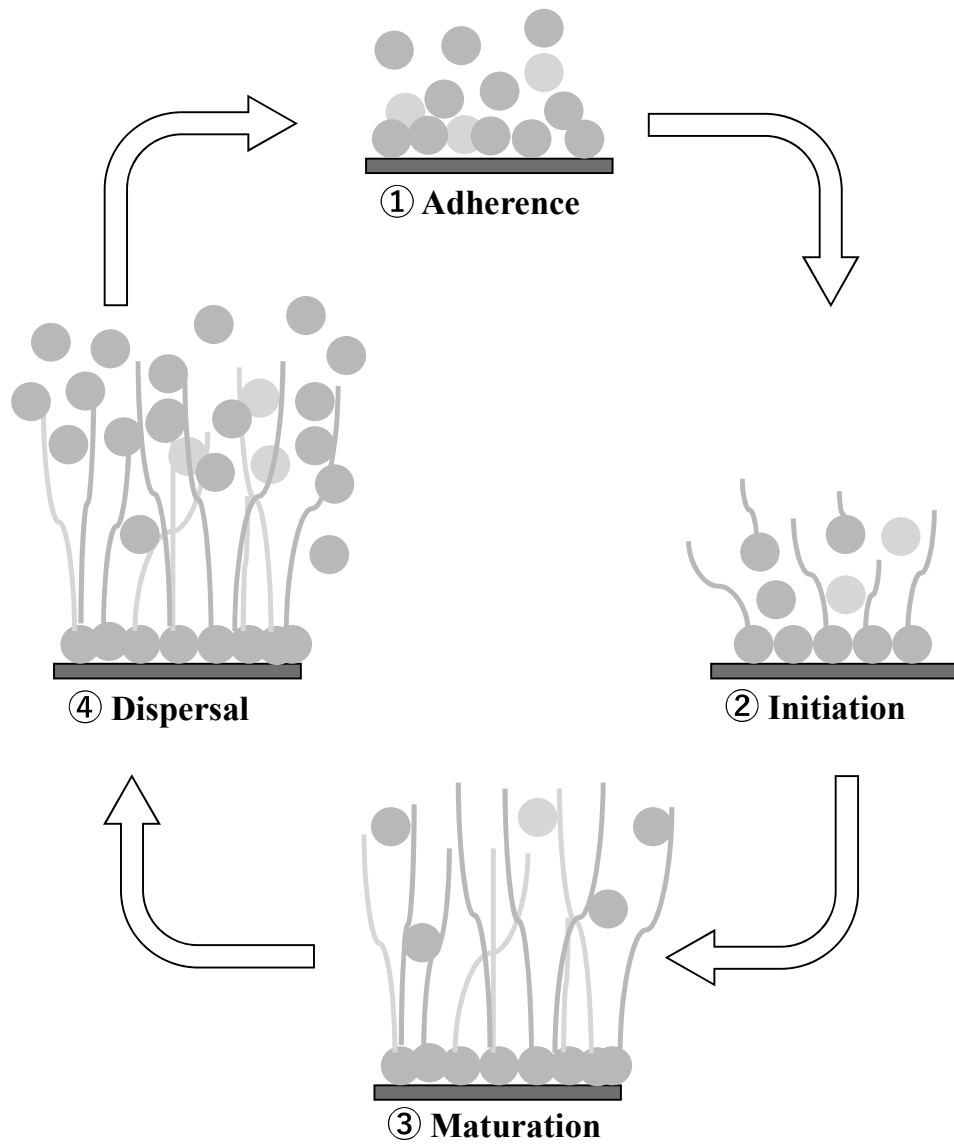


Figure 1.3 *C. albicans* のバイオフィーム形成。①酵母形が基質表面に付着②一部の細胞が酵母形から接着能の高い菌糸形へと形態変換してコロニーを形成③細胞外マトリックスの産生により物理的な刺激への抵抗性を獲得④成熟したバイオフィームから一部を酵母形として崩壊

*C. albicans* の二形性変換は本菌の病原性と深く関与しているため、これまでに多くの二形性変換メカニズムの解明に関する研究が行われてきた。酵母形から菌糸形への形態変換には、外部温度の上昇 (37°C)、CO<sub>2</sub>、及び窒素飢餓といった環境条件や、特定のアミノ酸、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、及び血清等、の誘導因子によって引き起こされる [9-19]。これらの誘導因子等によって活性化又は抑制されるシグナル伝達系は、多くの研究によって解明された (Table 1.1)。 *C. albicans* の Ras1 欠損株は酵母形での培養環境下において親株と同様の増殖を示すが、血清を添加した菌糸形での培養環境下では菌糸形を誘導できず酵母形で増殖を示したため、血清による菌糸誘導には Ras1 が関与していると考えられている [9, 10]。また、プロテインキナーゼ A を欠損させた株は、GlcNAc、及び窒素飢餓による菌糸誘導条件下で菌糸形を示さなかったため、これらによる菌糸誘導にはプロテインキナーゼ A が関与していることが報告された [20]。さらに、CO<sub>2</sub> による菌糸誘導はアデニル酸サイクラーゼが関与していることも報告された [21]。これまでの研究成果を集約すると、 *C. albicans* の二形性変換に関与するシグナル伝達系は、Ras1 を上流として分岐する mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの系と cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 依存性プロテインキナーゼ (cAMP-PKA) の系の二つに大別される (Fig. 1.4)。MAP キナーゼのシグナル伝達系は、酵母からヒトにいたる真核生物において、増殖、細胞分裂、代謝、自然免疫、細胞ストレス反応、アポトーシス、及び生存機能の制御に関わる重要な細胞機能である。 *C. albicans* の MAP キナーゼの系は、下流に存在する転写調節因子 Cph1 が菌糸特異的遺伝子を制御している [22, 23]。さらに、 *S. cerevisiae* では飢餓環境下に Ras から MAPK 系へシグナルが伝達されることが報告されているが、 *C. albicans* でも窒素飢餓による菌糸形誘導において MAP キナーゼの系の働きが報告されている [24]。一方 cAMP は、adenosine triphosphate (ATP) から合成される環状ヌクレオチドの一種で、タンパク質リン酸化酵素を活性化する重要な細胞内伝達物質である。 *C. albicans* の cAMP-PKA の系は、その下流に存在する転写因子 EFG1 が *C. albicans* の形態変化及び代謝の転写調節において中心的な役割を担っている [25, 26]。

*C. albicans* が酵母形から菌糸形に変換すると、細胞への接着に関与する HWP1 や ALS (Agglutinin like sequence) ファミリーを菌体表面に発現し、ヒトの細胞膜に接着する [27, 28]。細胞表面に接着後、エンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、プロテアーゼやリパーゼなどの侵襲因子を分泌して感染を拡大させる。別の研究では、菌糸形成のための必須遺伝子を破壊した菌糸形成能欠損株をマウスに感染させても、病原性を示さないことが報告された [29]。このように、二形性変換は本菌の病原性因子であるため、形態変化メカニズムの解明は本菌の病原性の理解に重要である。そこで、第 2 章では、まだ解明されていない *C. albicans* の形態変換に関与するシグナル伝達系の解明を試みた。

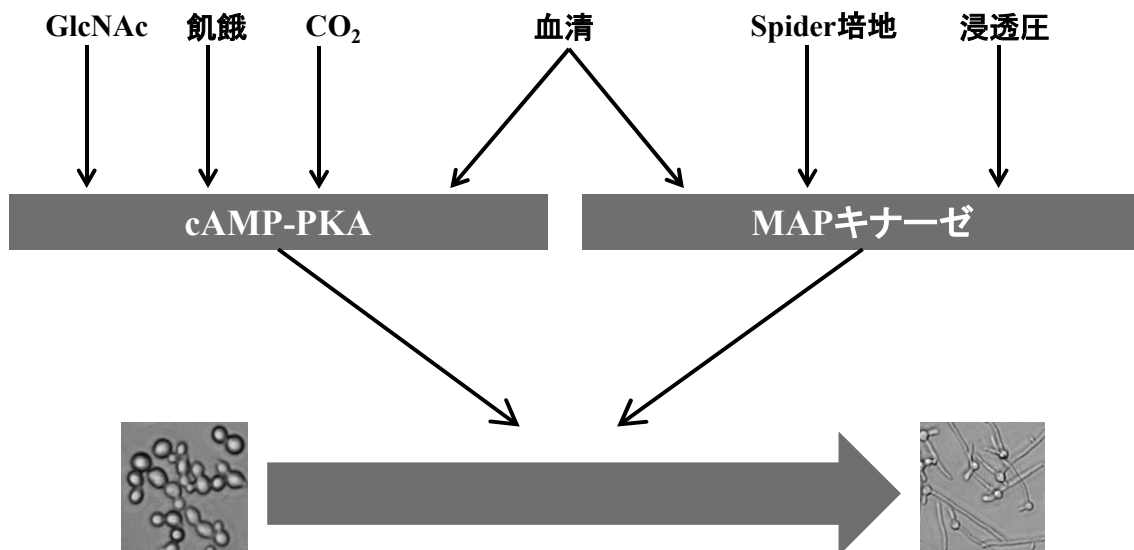


Figure 1.4 *C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル

*C. albicans* の形態変化シグナル伝達系に関する研究が盛んになされてきた一方で、菌糸形成を誘導する外部因子の探索や、菌糸誘導条件を単純化する研究は行われてこなかった。*C. albicans* を酵母形で培養する条件は、yeast peptone dextrose (YPD) 培地にて 25 から 30°C で培養する条件が一般的に広く使われているが、菌糸形に誘導する条件は複数存在している。一般的な菌糸誘導条件として、YPD 培地、Spider 培地、Lee's 培地、DMEM 培地、M-199 培地、及び RPMI-1640 培地等の基礎培地に血清又は GlcNAc 等の菌糸誘導分子を添加して 37°C で培養する条件が広く使われている [9-19]。しかしながら、これらの条件は GlcNAc や血清等の菌糸誘導因子に加えて、炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、pH、CO<sub>2</sub>、及び緩衝液成分などの様々な因子が基礎培地に含まれている。これらの成分の中には菌糸を誘導する因子も含まれており、その濃度は基礎培地間で異なっている。これまでに行われた二形性変換に関する研究成果より、*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化は様々なシグナル伝達系が関与した複雑なメカニズムであることが報告されているが、このように解釈されてきた原因の一つとして菌糸誘導条件の複雑さが関与していると考えられる。すなわち、複数の異なる菌糸誘導条件が混在している中で、各々の研究が様々な菌糸誘導条件を用いて分子生物学的手法によるシグナル伝達系の解明によって研究を進めてきたため、形態変化シグナルの解明を複雑化してしまったのではないかと考えられる (Table 1.1)。従って、菌糸誘導における不要な因子を排除し菌糸誘導条件を単純化することが *C. albicans* の形態変化メカニズムの解明に必要と考える。そこで、本研究の第 3 章では、複雑な *C. albicans* の菌糸誘導条件を最大限まで単純化、単純な菌糸誘導条件を確立した。

Table1.1 これまで報告されている *C. albicans* の菌糸誘導因子とシグナル伝達系並びに使用された菌糸誘導条件

菌糸誘導因子	使われた菌糸誘導条件	同定されたシグナル伝達系	参考文献
血清、 GlcNAc、 飢餓、 窒素飢餓、 グルコース	Lee's 培地+10% FCS		
	YPD+10% FBS		
	Imidazole 培地+10% Horse serum		[9-10, 20,
	Imidazole 培地+10 mM GlcNAc	Ras1→cAMP-PKA の系	25-26, 29-
	RPMI-1640+10% FBS		30]
CO <sub>2</sub>	YPD+20% FCS		
	M-199 培地		
血清、 Spider 培地	DMEM+5% CO <sub>2</sub>	cAMP-PKA の系	[21]
	YPD+10% FBS		
	YPD+10% FCS		
	Spider 培地		[9-10, 23-
	Spider 培地+10% FBS	Ras1→MAP キナーゼの系	24, 31-
pH	GMM 培地+10% FBS		35]
	Lee's 培地		
	RPMI-1640 培地		
GlcNAc	TC199 培地 pH4.0-8.0	Rim101、Phr1、Phr2	[36-38]
浸透圧	BYNB 培地+0.1-100 mM GlcNAc	Ng1→Hxk1→Dac1→Nag1	[39]
低酸素条件	YPD+5% FBS	MAP キナーゼの系	[40-41]
	YPD+20% Horse serum 低酸素	Czf1、Mkc1	[42]

現在、本邦において臨床で使用されている抗真菌薬は、azole 系薬剤、polyene maclorides 系、及び Echinocandins 系の 3 系統があるが、薬剤種はほぼこの 3 系統に限られているため、限定された抗真菌スペクトル、薬剤耐性菌の出現等の課題がある (Fig. 1.5)。Azole 系抗真菌薬は真菌の細胞膜を構成するエルゴステロールの合成経路であるラノステロール C14 $\alpha$  脱メチル化酵素を阻害し、細胞膜に対して有害なステロールを生成することで殺菌的に作用する。しかし、Azole 系抗真菌薬は古くからその耐性菌の出現が問題となっている。一方、Echinocandins 系抗真菌薬の作用機序は、 $\beta$ -1,3-グルカンの合成酵素を阻害して細胞壁が正常な形態を保てなくすることによって殺真菌効果を示す。Echinocandins 系抗真菌薬の代表的な薬剤として micafungin (MCFG) があるが、これも、急速な使用の拡大によって耐性菌の出現が課題となっている。薬剤耐性菌の出現の主な原因は、薬剤が菌に対して高い増殖抑制圧の環境を与えることが挙げられる。このような現状から、薬剤耐性菌が出現しづらい新しい治療薬が求められているが、真菌はヒトと同じ真核生物であるため、真菌特異的に作用する標的が限られてしまうことから、抗真菌薬の開発は抗細菌薬に比べて難しいことが知られている。

これまで述べたように *C. albicans* の二形性変換は病原性と深く関与しているため、*C. albicans* の菌糸形成阻害は新たな治療薬の標的として期待されてきた。Fazly らは 30,000 の低分子化合物を用いたハイスループットスクリーニングにより filastatin を見つけた。Filastatin は *C. albicans* のポリスチレン表面、上皮細胞への接着、バイオフィルムの形成、並びに菌糸形への形態変化も阻害することができた [43]。一方、Pierc らは 20,000 の低分子化合物からスクリーニングを行い、*C. albicans* のバイオフィルム形成及び菌糸形成を阻害する物質を同定し、マウスを使った実験で菌糸形成阻害剤の高い治療効果を立証した [44]。本薬剤は酵母形の増殖に影響を与えない低い増殖抑制圧であることから、薬剤耐性菌の出現が抑えられると期待された。さらに、二形性変換の必須遺伝子を破壊した株は、マウスに感染させても病原性を示さないことが報告されている [29, 45]。以上より、二形性変換は本菌の病原性因子であるため、これら *C. albicans* の増殖を阻害せずに病原性に作用する菌糸形成阻害剤は、従来の抗真菌剤に比較して耐性菌の出現を抑えられる治療薬になることが期待されている。

本論文の第 4 章では、第 3 章で単純化して同定した菌糸誘導因子プロリンを阻害できる分子は新しい治療薬として期待できると考え、血清による菌糸誘導条件下において菌糸誘導を阻害できる化合物を探索した。

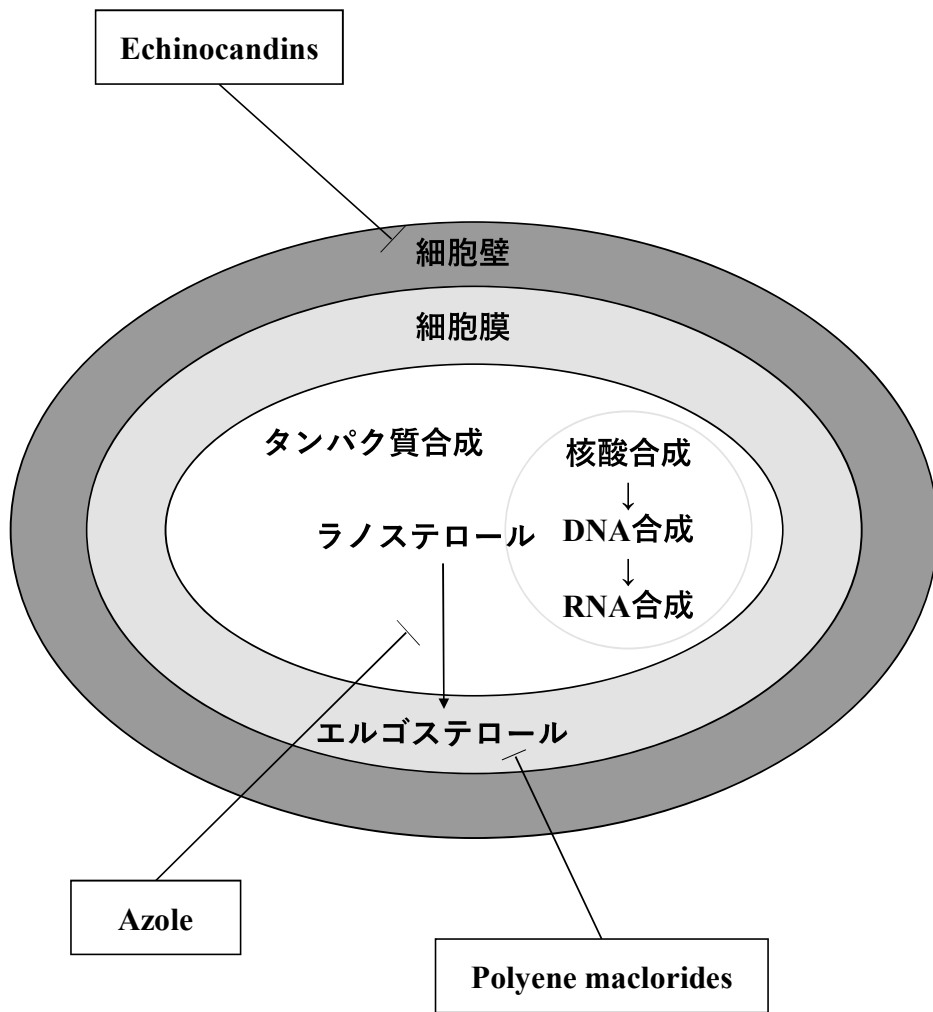


Figure 1.5 真菌細胞における主要な抗真菌薬の標的



## 第2章 *C. albicans* の形態変化メカニズムの解析

### 2.1 緒言

*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化は、病原性並びにバイオフィルムの形成に深く関連しているため、本菌の形態変化メカニズムの解析は病原性の解明並びに新たな抗真菌薬の開発に重要と考えられている。

*C. albicans* は、菌密度が概ね  $1 \times 10^6$  cells/mL 以上になると、菌糸誘導条件下でも菌糸を形成しないため、この菌糸形成の抑制には細胞密度感知機構であるクオラムセンシングが関与していると考えられていた。クオラムセンシングは、菌が生育環境の菌数依存的に autoinducer を介して生物活性を制御するシステムであるが、ビブリオでも菌の増殖に応じて蛍光クオラムセンシング分子を産生することが報告されている [46]。2001年 Hornby らは、30°C 栄養培地で静止期に達した菌体を一旦 4°C でストックした後、グルコース・リン酸・プロリン合成培地に  $1 \times 10^7$  cells/mL 条件で接種し、24 時間培養した培養上清から直鎖セスキテルペンの一種である farnesol を単離した [47-48]。この物質は、培地中の窒素源や炭素源などの栄養素、あるいは培養温度 (23°C から 43°C) を変えても上清から検出された。さらに farnesol は、*C. albicans* の酵母形での発育に影響することなく、酵母形から菌糸形への形態変化を抑制したため、クオラムセンシング分子として報告されたが、farnesol が作用するシグナル伝達系は不明であった。本章では、farnesol が作用する *C. albicans* のシグナル伝達系を解明することを目的として、farnesol によって抑制される菌糸特異的 mRNA の発現量を評価することによって明らかとした。

また、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは菌糸形成に関与していることが知られている。Roy らは GlcNAc による *C. albicans* の菌糸誘導を、カルモジュリン阻害剤である Trifluoperazine (TFP) 及び  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害剤 A23187 を添加することによって阻害できることを報告した [49]。さらに Sabie らは、培地中に 1.5 mM の  $\text{CaCl}_2$  を添加して培養すると *C. albicans* の菌糸誘導を起こすことを報告した [50]。また、Lusia らは、*C. albicans* の菌糸誘導時に、 $\text{Ca}^{2+}$ キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加すると菌糸形成を阻害することを報告した [51]。以上のことから、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは菌糸形成に関与すると考えられているが、菌糸形成時における *C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンのシグナル伝達系は不明であった。カルモジュリンは、酵母、植物、昆虫からヒトに至る真核生物に存在している  $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質で、この  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン複合体は多くのタンパク質の活性化の調節を行って様々な細胞機能の制御を行っている。これらのことから、我々は *C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは、特に菌糸形成時に重要な役割を担い、菌糸特異的タンパク質の発現等へ関与して菌糸形成を引き起こしていることを推測した。本章ではカルモジュリン阻害剤を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンが関与する *C. albicans* の菌糸誘導シグナル伝達系を解明した。

## 2.2 材料及び方法

### 使用株及び培養条件

*C. albicans* NIHA-207 株をサブロー培地（0.5%酵母エキス、2.0%グルコース、1.0%ペプトン）で 30°C、24 時間振とう培養し、酵母形菌体を得た。

### Farnesol による *C. albicans* 形態変化の測定

サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^4$  cells/mL になるように RPMI-1640 培地（Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan）が入った 24-well プレートに懸濁し、farnesol（Sigma Chemical, USA）を終濃度 3  $\mu$ M、30  $\mu$ M、又は 300  $\mu$ M になるように添加した後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。培養後、0.2%クリスタルバイオレット溶液を 10  $\mu$ L 添加し、血球計算版を用いて酵母形菌体数を測定した。また、15,000 rpm で 3 分、遠心処理後、上清を回収し、上清の色素量を 590 nm で測定して菌体内に吸収された色素量から総菌数を測定した。これらの測定値から総菌数当たりの酵母菌数を算出し、菌糸形成率を示した。

### カルモジュリン阻害等による *C. albicans* 形態変化の測定

サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10% Fetal bovine serum（FBS）を含むサブロー培地が入った 24-well プレートに懸濁し、カルモジュリン阻害剤 Trifluoperazine（TFP；SIGMA Chemical, USA）を終濃度 100  $\mu$ M 添加、カルモジュリン阻害剤 [N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide]（W-7；SIGMA Chemical, USA）を終濃度 250  $\mu$ M、又はアデニレートサイクラーゼ阻害剤である cis-N-(2-phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine（MDL-12-330A；SIGMA Chemicals, USA）を終濃度 100  $\mu$ M 添加し、37°C で 3 時間培養後、光学顕微鏡で増殖形態を撮影した。

### RT-PCR 法による菌糸特異的 mRNA の定量

サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように RPMI-1640 培地が入った 24-well プレートに懸濁し、farnesol を終濃度 30  $\mu$ M 又は 300  $\mu$ M になるように添加した後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 3 時間培養した。カルモジュリン阻害及びアデニレートサイクラーゼ阻害剤による mRNA 発現量の実験では、サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄し、洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10% FBS 含有サブロー培地が入った 24-

well プレートに懸濁し、TFP を終濃度 100  $\mu\text{M}$ 、W-7 を終濃度 250  $\mu\text{M}$ 、又は MDL-12-330A を終濃度 100  $\mu\text{M}$  になるように添加して、37°C、3 時間培養した。培養終了後、各プレートから菌体を回収し、Cell-to-DNA (Ambion, USA) を使用して *C. albicans* cDNA library を作製した。PCR 反応は 10×PCR buffer、0.2 mM dNTPs、2.5 mM  $\text{MgSO}_4$ 、1  $\mu\text{M}$  プライマー、及び作製した cDNA 50 ng を含む 50  $\mu\text{L}$  の反応液中で行った。PCR 条件は、94°C 120 秒、94°C 15 秒、64°C 30 秒、68°C 60 秒のサイクルを 30 サイクル行い、その後 68°C 420 秒で反応を終了した。増幅された DNA 含量は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) で解析し、定量した。菌糸特異的 mRNA の発現量は、形態変化等のシグナルに影響を受けずに常に一定の mRNA 発現量を示すと報告されている Actin1 (*ACT1*) の発現量に対する相対値として算出した [52]。

#### *C. albicans* 菌体内の cAMP の定量

cAMP の定量は Lorenz らの方法を用いて行った [53]。サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄し、洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10% FBS 含有サブロー培地が入った 24-well プレートに懸濁し、TFP を終濃度 100  $\mu\text{M}$ 、又は W-7 を終濃度 250  $\mu\text{M}$  になるように添加して 37°C で培養した。培養開始 60 分後、180 分後、及び 300 分後にそれぞれ細胞を回収した。回収した細胞を滅菌水で 2 回洗浄し、Mini Beadbeater (直径 0.3 mm の glass beads を使用；Central Scientific Commerce, Tokyo, Japan) を用いて破碎処理し、その上清を回収した。破碎液の総タンパク質含有は 280 nm の吸光度で定量し、cAMP 量は EIA system-cAMP immunoassay (Amersham Pharmaceutical Biotech, USA) により定量した。

#### cAMP 処理 *C. albicans* の菌糸形成率の測定

サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄し、洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10 mM cAMP (SIGMA Chemical, USA) を含む 10% FBS 含有サブロー培地が入った 24-well プレートに懸濁し、TFP を終濃度 100  $\mu\text{M}$ 、又は W-7 を終濃度 250  $\mu\text{M}$  になるように添加して 37°C、3 時間培養した。菌糸形成率の測定は培養 3 時間の間、30 分間隔で測定した。

#### データの解析

データはスチューデント *t* 検定を使って解析した。なお、*p* 値 < 0.05 を統計学的な有意差とした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 クオラムセンシング分子 farnesol による *C. albicans* の菌糸形成阻害メカニズムの解析

#### 2.3.1.1 Farnesol による *C. albicans* の菌糸形成の阻害効果

*C. albicans* NIH A-207 株を RPMI-1640 培地で菌糸に誘導する条件において、farnesol が菌糸形成を阻害するか測定した。*C. albicans* を RPMI-1640 培地に懸濁し、farnesol を終濃度 3  $\mu\text{M}$ 、30  $\mu\text{M}$ 、又は 300  $\mu\text{M}$  の 3 濃度条件になるように添加して 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 24 時間培養した。結果を Table 2.1 に示す。Control では 100%の菌糸形成率を示したのに対して、farnesol を 30  $\mu\text{M}$  添加した条件では 15%の菌糸形成率で 300  $\mu\text{M}$  では 0%と、farnesol により菌糸形成が阻害された。一方で、3  $\mu\text{M}$  の farnesol 条件では菌糸形成率が 95%と control と変わらなかった。

以上より、30  $\mu\text{M}$  以上の farnesol は、RPMI-1640 培地によって誘導される *C. albicans* の菌糸形成を阻害することが明らかとなった。

Table 2.1 Effect of farnesol on hyphal transformation of *C. albicans* in RPMI-1640 medium

	Hyphae cells ( $1 \times 10^5$ cells/mL)	Total cells ( $1 \times 10^5$ cells/mL)	Hyphae formation (%)
Control	40 $\pm$ 5	40 $\pm$ 5	100
Farnesol 3 $\mu\text{M}$	36 $\pm$ 3	38 $\pm$ 1	95
Farnesol 30 $\mu\text{M}$	5 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	15
Farnesol 300 $\mu\text{M}$	0	47 $\pm$ 6	0

#### 2.3.1.2 Farnesol による菌糸特異的 mRNA 発現の抑制

次に farnesol による *C. albicans* の菌糸特異的 mRNA 発現量の変化を測定した。*C. albicans* の菌糸誘導シグナル伝達系は、主に cAMP-PKA の系と MAP キナーゼの系の二つが知られているため、これらのシグナルで制御されている菌糸特異的 mRNA の発現量を測定した。*C. albicans* を RPMI-1640 培地に懸濁し、farnesol を終濃度 30  $\mu\text{M}$  又は 300  $\mu\text{M}$  になるように添加したものを 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 3 時間培養後、菌体から cDNA library を作製し、PCR で増幅された DNA 含量を定量した。cAMP-PKA の系で制御されている菌糸特異的 mRNA 発現量を Fig. 2.1 (A) に示し、MAP キナーゼの系で制御されている mRNA 発現量を Fig. 2.1 (B) に示す。菌糸特異的 mRNA の発現量は、*ACT1* の発現量に対する相対値として示した。Fig. 2.1 (A)より、cAMP-PKA の系で調節される菌糸特異的 mRNA、*ALSI*、*HYR1*、及び *HWPI*、は control と farnesol 添加群で差が認められなかった。一方、MAP キナーゼの

系で調節されている菌糸特異的 mRNA 発現量は、control に対して 30  $\mu$ M 及び 300  $\mu$ M の farnesol 添加群で *HST7* がおよそ 6 分の 1、*CPH1* と *GAP1* はおよそ 2 分の 1 以下、に低下した。以上より、farnesol は MAP キナーゼの系に関与し、これが制御している菌糸特異的 mRNA の発現を抑制していることが明らかとなった。

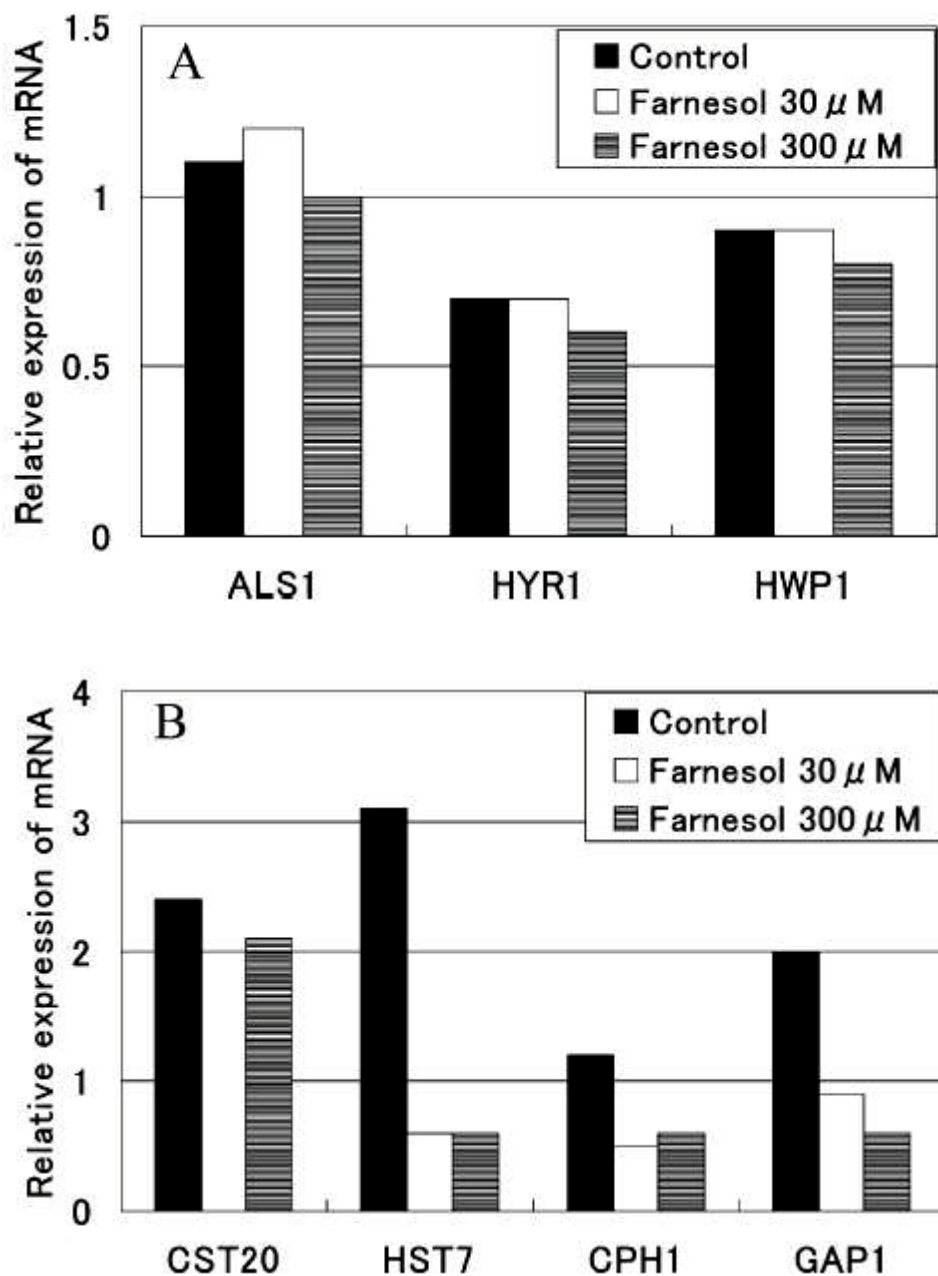


Figure 2.1 Expression of mRNAs in *C. albicans* Treated with Farnesol

*C. albicans* was cultured with and without farnesol for 3 h in RPMI-1640 medium. cAMP-PKA cascade (A), MAP kinase cascade (B) were analyzed by RT-PCR method.

## 2.3.2 *C. albicans* の菌糸形成における $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルの役割

### 2.3.2.1 カルモジュリン阻害剤による *C. albicans* の菌糸形成の阻害効果

初めにカルモジュリン阻害剤が、*C. albicans* NIHA-207 株を血清により誘導する菌糸形成を阻害できるか測定した。カルモジュリン阻害剤に加えて、cAMP-PKA の系の上流に存在する酵素アデニレートサイクラーゼを阻害する MDL-12-330A も比較対象として使用した。*C. albicans* に TFP を終濃度 100  $\mu\text{M}$ 、W-7 を終濃度 250  $\mu\text{M}$ 、又は MDL-12-330A を終濃度 100  $\mu\text{M}$  になるように添加し、10% FBS 含有サブロー培地にて 37°C で 3 時間培養後、形態を顕微鏡で観察して撮影した。Fig. 2.2 に示すように control では菌糸形での増殖を示したが、TFP、W-7、及び MDL-12-330A 添加群では菌糸形成が抑制され酵母形での増殖を示した。

以上より、カルモジュリン阻害剤並びにアデニレートサイクラーゼ阻害剤は *C. albicans* を 10% FBS で誘導する菌糸形成を阻害することが明らかとなった。

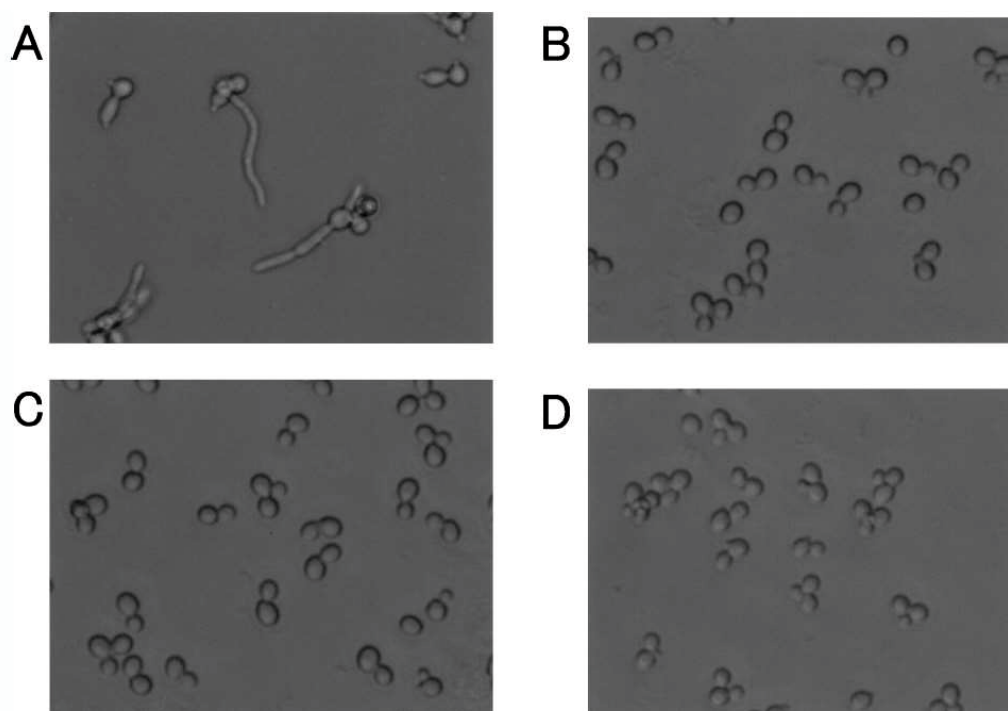


Figure 2.2 Effect of calmodulin Inhibitors on the hyphal transformation of *C. albicans*.

*C. albicans* was cultured in Sabouraud's medium containing 10% FBS for 3 h. After incubation, growth forms of *C. albicans* were observed under a microscope. (A) Control; (B) TFP (100  $\mu\text{M}$ ) added; (C) W-7 (250  $\mu\text{M}$ ) added; (D) MDL-12-330A (100  $\mu\text{M}$ ) added.

### 2.3.2.2 カルモジュリン阻害剤による菌糸特異的 mRNA 発現の抑制

次に、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンが関与するシグナル伝達系の解明のために、TFP、W-7、及び MDL-12-330A による菌糸特異的 mRNA 発現量の変化を測定した。*C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10% FBS 含有サブロー培地に懸濁し、TFP を終濃度  $100 \mu\text{M}$ 、W-7 を終濃度  $250 \mu\text{M}$ 、又は MDL-12-330A を終濃度  $100 \mu\text{M}$  になるように添加して  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間培養した。培養終了後、cDNA library を作製し PCR で増幅された DNA 含量を定量した。*C. albicans* の菌糸特異的 mRNA 発現量の結果を Fig. 2.3 に示す。菌糸特異的 mRNA の発現量は、*ACT1* の相対比として算出した。Control と比較して TFP、W-7、及び MDL-12-330A の添加群は菌糸特異的 mRNA、*ALS3*、及び *ALS8* の発現を抑制した (Fig. 2.3)。*ALS3* 及び *ALS8* は、cAMP-PKA の系の下流に存在する EFG1 によってその転写が制御されているため、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の系に関与していることが示された。MDL-12-330A は、cAMP-PKA の系において ATP を cAMP に変換する酵素アデニレートサイクラーゼの阻害剤であるため、MDL-12-330A は期待通りに *ALS3* と *ALS8* の発現を抑制した。

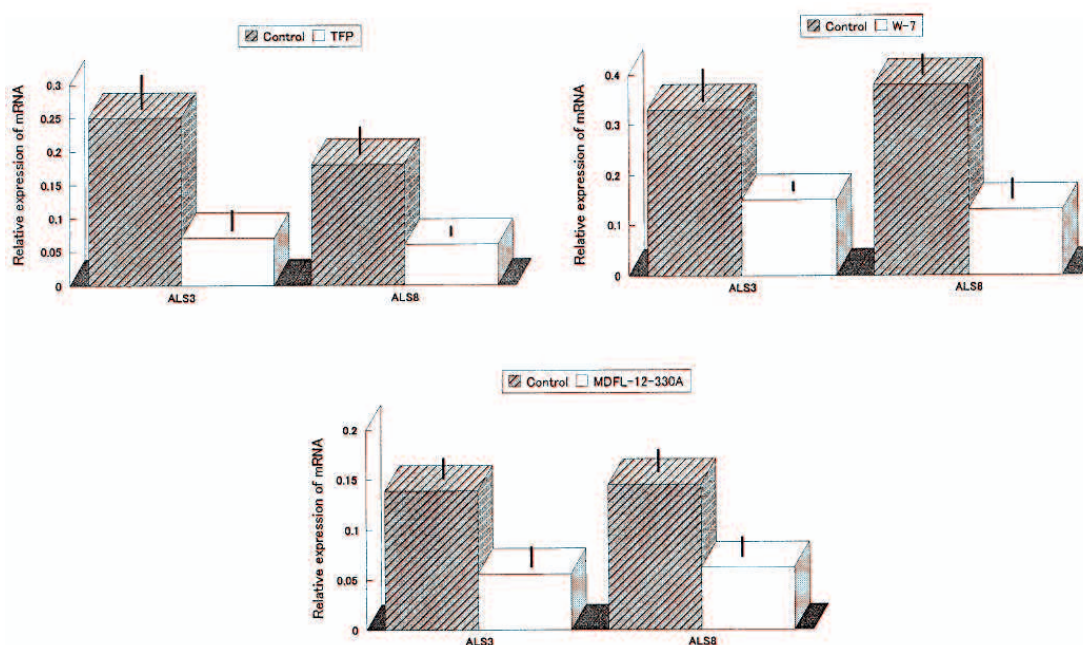


Figure 2.3 Expression of hyphae-specific mRNAs in *C. albicans* treated with calmodulin and adenylatecyclase inhibitors. *C. albicans* was cultured with or without inhibitor for 3 h, and the expression of hyphae-specific mRNAs were analyzed using the RT-PCR method.

### 2.3.2.3 カルモジュリン阻害剤による菌体内 cAMP 量の変化

カルモジュリン阻害剤が、cAMP-PKA の系によって制御されている菌糸特異的 mRNA の発現を抑制したため、カルモジュリン阻害剤により菌体内の cAMP 生成が抑制されるか測定した。*C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10% FBS 含有サブロー培地に懸濁し、TFP を終濃度  $100 \mu\text{M}$ 、又は W-7 を終濃度  $250 \mu\text{M}$  になるように添加したものを  $37^\circ\text{C}$  で培養し、培養開始 60 分、180 分、及び 300 分に菌体を回収して菌体内 cAMP 量を定量した。Fig. 2.4 の結果より、control と TFP 及び W-7 添加群を比較すると、いずれの時間でも菌体内 cAMP 量に差が認められなかった。

以上より、カルモジュリン阻害剤は *C. albicans* の菌体内の cAMP 生成に影響を与えずに菌糸形成を抑制していることが示唆された。

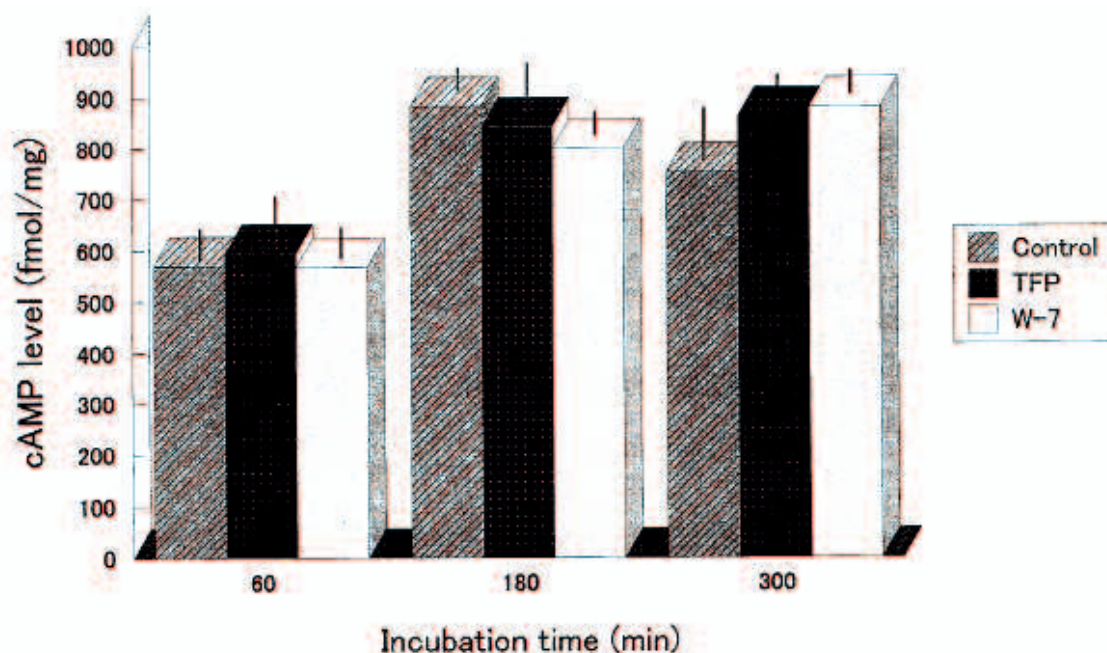


Figure 2.4 Concentration in *C. albicans* treated with calmodulin Inhibitors

cAMP levels in *C. albicans* cultured with Sabouraud's medium containing 10% FBS were measured at certain times.

### 2.3.2.4 cAMP による $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルへの影響

次に、cAMP を外部から添加することによって、カルモジュリン阻害剤による菌糸形成の抑制を回復できるか検討した。*C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10 mM cAMP を含む 10% FBS 含有サブロー培地に懸濁し、TFP を終濃度  $100 \mu\text{M}$ 、又は W-7 を終濃度  $250 \mu\text{M}$  になるように添加して  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間培養し、菌糸形成率を 30 分間隔で測定した。Fig. 2.5 に



示す通り、control が培養開始 90 分から菌糸形成を示したのに対して、TFP 及び W-7 添加群では培養 180 分の間、菌糸形成が認められなかった。以上、cAMP を外部から添加してもカルモジュリン阻害剤による菌糸形成阻害を回復することができなかった。

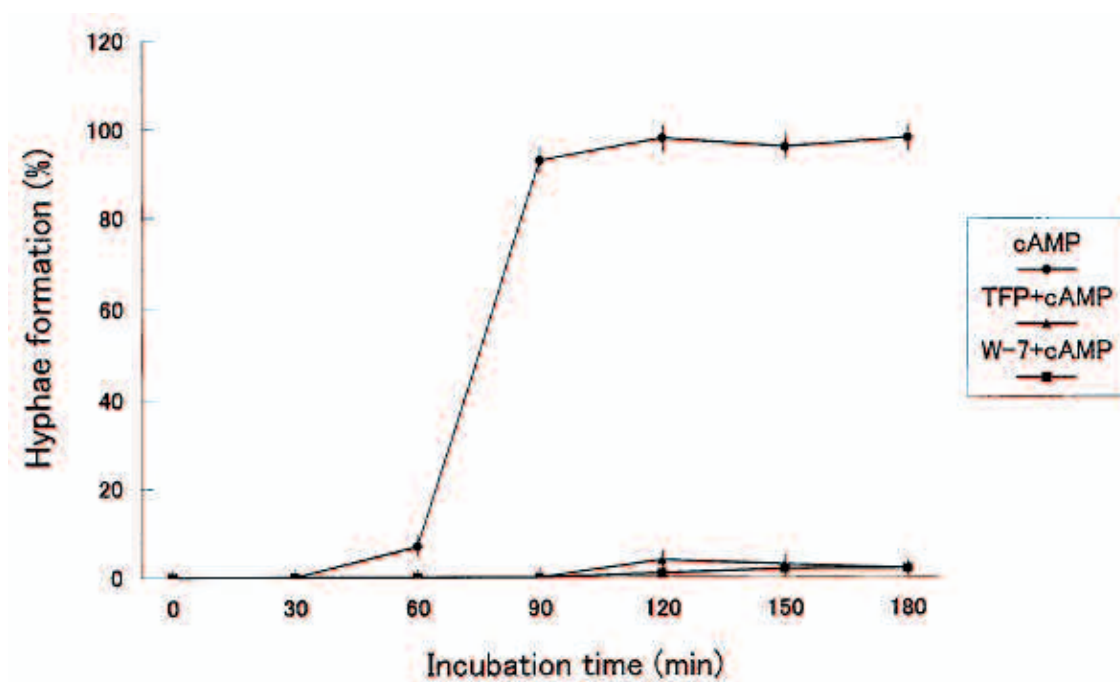


Figure 2.5 Effect of cAMP on the Inhibition of Hyphae Formation Induced by Calmodulin Inhibitors

*C. albicans* was mixed with 10 mM cAMP, and was cultured with or without calmodulin inhibitors in Sabouraud's medium containing 10% FBS. The ratio of hyphal formation was measured at the indicated time. ●, Control (10 mM cAMP); ▲, TFP (100  $\mu$ M) + 10 mM cAMP; ■, W-7 (250  $\mu$ M) + 10 mM cAMP.

## 2.4 考察

Farnesol は *C. albicans* を菌糸に誘導する条件下で、菌糸形成を抑制し酵母形での増殖を誘導することが報告されたが、farnesol が作用するタンパク質やシグナル伝達系は不明であった。そこで、本研究では farnesol が関与する形態変化シグナル伝達系の解明を行った。

初めに、30  $\mu\text{M}$  以上の farnesol は、*C. albicans* の菌糸形成を抑制することを確認した。以前の研究でも、30  $\mu\text{M}$  以上の farnesol が菌糸形成を阻害することが報告されたため、本研究においても同じ結果が得られた [47, 48]。

次に、farnesol が関与するシグナル伝達系を解明するために、*C. albicans* の菌糸特異的 mRNA 発現量を測定した。*C. albicans* の酵母形から菌糸形への変換機構に関与するシグナル伝達系は、主に cAMP-PKA の系と MAP キナーゼの系の二つが知られているため、これらのシグナル伝達系で制御されている mRNA 発現量を評価した。30  $\mu\text{M}$  又は 300  $\mu\text{M}$  の farnesol は MAP キナーゼの系で制御されている菌糸特異的 mRNA 発現を抑制した。一方で、cAMP-PKA の系で制御されている菌糸特異的 mRNA 発現は、300  $\mu\text{M}$  の farnesol を添加しても抑制されなかった。これらの結果より、farnesol は MAP キナーゼの系で誘導される菌糸誘導シグナル伝達系を抑制して菌糸形成を阻害していることが示唆された (Fig. 2.6)。

MAP キナーゼの系は窒素飢餓による菌糸誘導に関与していることが報告されているため、farnesol はこの窒素飢餓によって引き起こされる菌糸誘導シグナルを抑制している可能性が考えられる [24]。さらに、farnesol により mRNA 発現量の抑制が認められた GAP1 (general amino acid permease) はアミノ酸の取り込みに関与するタンパク質で、MAP キナーゼの系によってその転写が制御されている [19]。プロリンやアルギニン等の一部のアミノ酸は、*C. albicans* の菌糸誘導を引き起こすことが報告されている [12-16]。従って、farnesol による菌糸形成阻害は、GAP1 の発現抑制により菌糸誘導に関与するアミノ酸の取り込み抑制によって引き起こされている可能性も考えられる。

*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは菌糸形成に関与していることが考えられているが、シグナル伝達系は不明のままであった。本研究では *C. albicans* の菌糸形成時における *C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルの解析を行った。初めに、カルモジュリン阻害剤である TFP と W-7 が血清による *C. albicans* の菌糸誘導を阻害することを確認した。

次に TFP 及び W-7 による *C. albicans* の菌糸特異的 mRNA 発現量の変化を測定した。結果より、いずれの薬剤でも菌糸特異的 mRNA である *ALS3*、及び *ALS8* の発現を抑制した。*ALS3* と *ALS8* は、cAMP-PKA の系の下流に存在する転写因子 EFG1 により転写が制御されている [30]。これらの結果より、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の系に関与して菌糸形成を誘導していることを示唆した。

続いて *C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の系の cAMP よりも上流に関与しているのか、下流に関与しているのか、あるいは cAMP に関与せずに作用しているのか検討した。TFP 及び W-7 が *C. albicans* の cAMP 生成に影響を与えるか、経時的に

菌体内 cAMP 含量の変化を測定したが、control と比較して TFP 及び W-7 添加群の菌体内 cAMP 含量に差が認められなかった。さらに、cAMP を外部から培地に添加しても TFP 及び W-7 による菌糸形成阻害を回復することができなかった。

以上より、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA よりも下流又は、cAMP-PKA と別の経路で EFG1 を活性化して菌糸形成を誘導していることが明らかとなった (Fig. 2.6)。

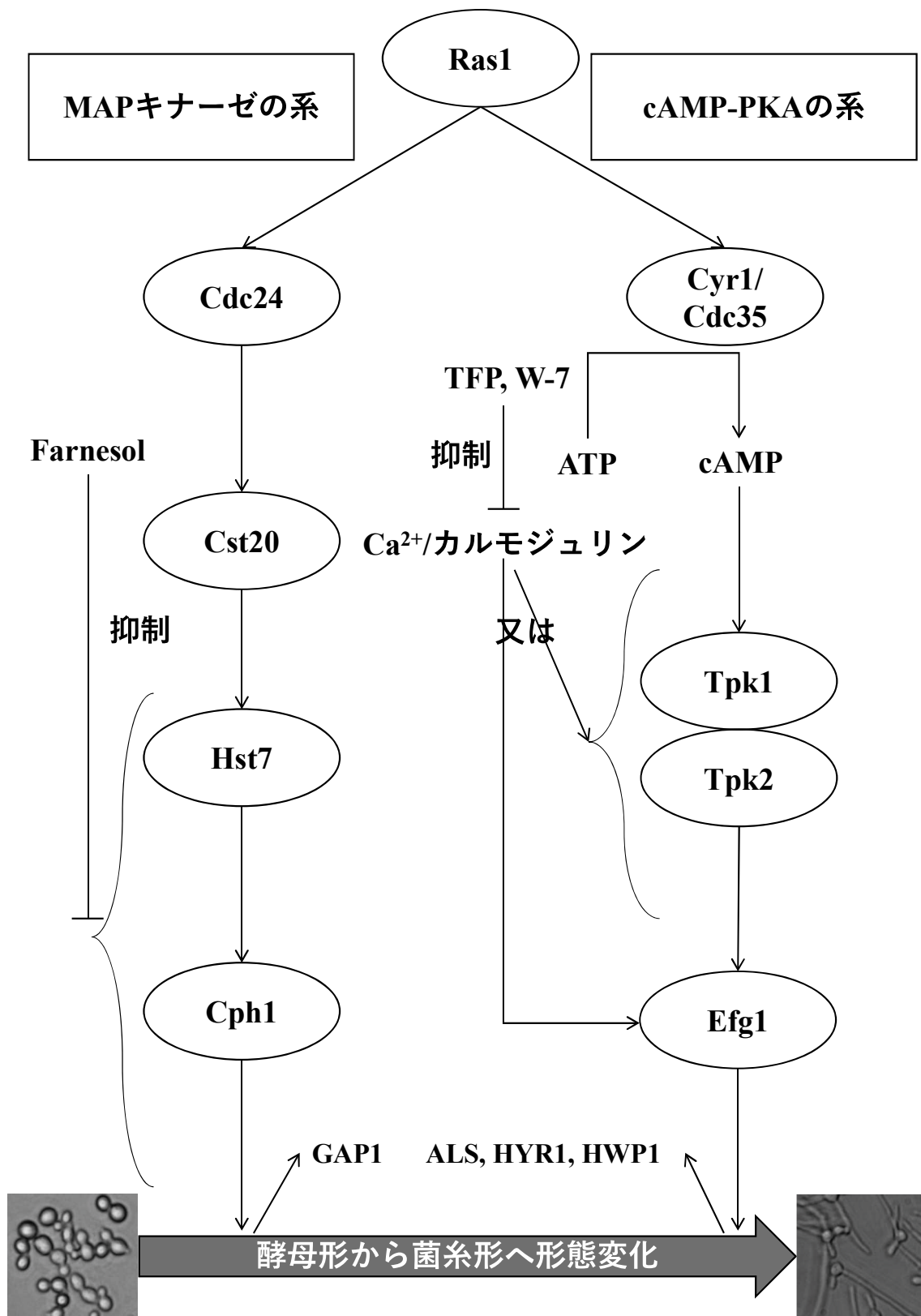


Figure 2.6 *C. albicans* の菌糸形成において、farnesol と Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリンが関与するシグナル伝達系

## 2.5 結言

第2章では菌糸特異的 mRNA の発現量を評価することによって、クオラムセンシング分子 farnesol が *C. albicans* の MAP キナーゼの系を抑制し、菌糸形成を阻害して酵母形への変換を行っていることを示した。Farnesol はバイオフィーム形成成熟後期において、菌糸形から酵母形に形態を変換し、感染のさらなる拡大に寄与している成分と考えられている。本研究で得られた結果が、このクオラムセンシング機能のさらなる解析、並びにバイオフィーム後期におけるメカニズムの解析につながることを期待する。

さらに、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の cAMP よりも下流を活性化、又は cAMP-PKA を介さずに菌糸特異的タンパク質の転写因子 EFG1 を活性化して菌糸形成を誘導している可能性を示した。本研究結果により、これまで解明されていない新たな *C. albicans* の形態変化シグナルの解析につながることを期待される。

## 第3章 *Candida. albicans* の菌糸誘導条件の単純化

### 3.1 緒言

これまでに *C. albicans* の形態変化メカニズムに関する研究は盛んに行われ、そのほとんどが分子生物学的手法による菌糸誘導因子と関連するシグナル伝達系の解明に重きを置いてきた。一方で、*C. albicans* の菌糸誘導因子の特定や菌糸誘導条件の単純化等に関する研究は行われてこなかった。*C. albicans* の菌糸誘導を引き起こす代表因子として、温度 (37°C)、CO<sub>2</sub>、中性からアルカリ性 pH、血清、GlcNAc、窒素飢餓、及び特定のアミノ酸などが知られており、*in vitro* で使われている一般的な菌糸誘導条件は、これらの誘導因子を YPD 培地、Spider 培地、Lee's 培地、DMEM 培地、M-199 培地、又は RPMI-1640 培地等の基礎培地に添加して培養する条件で、これらの条件を使って菌糸誘導因子と関連するシグナル伝達系の解明がされてきた [9-19]。

しかしながら、これらの条件は添加される菌糸誘導因子に加えて、基礎培地中に炭水化物、ペプチド、アミノ酸、ビタミン、ミネラル、pH、CO<sub>2</sub>、及び緩衝液成分などの様々な成分が存在し、これらの成分の中には菌糸を誘導するアミノ酸等も含まれている。さらに、これらの成分や濃度は基礎培地間で異なる。*C. albicans* の形態変化は様々なシグナルが関与した複雑なメカニズムであることが知られているが、このように解釈されてきた原因の一つとして、菌糸誘導条件の複雑さが関与していると考えられる。すなわち、複数の異なる菌糸誘導条件が混在している中で、様々な因子が入り混じった複雑な菌糸誘導条件を用いて分子生物学的手法を中心としたシグナル伝達系の研究を中心に進められてきたため、形態変化シグナルの解明を複雑化してきてしまったということである。

第2章までは *C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル伝達系の解析に着目して行ってきたが、*C. albicans* の形態変化メカニズムの解明には、まず菌糸誘導における不要な因子を排除し、菌糸誘導条件を単純化することが必要と考えた。本章では全成分が既知である RPMI-1640 培地を用いて、*C. albicans* の菌糸誘導を引き起こす因子の同定を行い、菌糸誘導条件の単純化を行った。

## 3.2 材料及び方法

### 使用株及び培養条件

*C. albicans* JCM1542 株をサブロー培地で 30°C、24 時間、150 rpm で振とう培養し、酵母形菌体を得た。菌糸形への誘導は次の通りに行った。まず、サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように RPMI-1640 培地 (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) が入った 24-well プレートに懸濁し、37°C 又は 30°C で 24 時間培養し、顕微鏡で撮影した写真から菌糸の長さを測定した。菌株は理研バイオリソース研究センターよりご提供いただいた。

### RPMI-1640 培地に含まれる菌糸誘導成分のスクリーニング

サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように、次の溶液が入った 24-well プレートに懸濁した； グルコース水 (終濃度 2.0 mg/mL)、50×RPMI-1640 amino acid solution (終濃度 1×, Sigma-Aldrich: R7131, St. Louis, MO)、100×RPMI-1640 vitamin solution (終濃度 1×, Sigma-Aldrich: R7256)、又は inorganic salts (終濃度 100 mg/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 50 mg/L  $\text{MgSO}_4$ , 400 mg/L KCl, 及び 6000 mg/L NaCl)。いずれの溶液も pH を 6.5 - 7.5 になるように調整し、ろ過滅菌して調製した。次に 24-well プレートを 37°C で 24 時間培養し、顕微鏡で画像を撮影した。

RPMI-1640 培地に含まれるアミノ酸による菌糸誘導の検証でも同様に、*C. albicans* を終濃度  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように次の溶液が入った 24-well プレートに懸濁した； L-アラニン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、グリシン、L-ヒスチジン、L-メチオニン、L-アスラパギン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-バリン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-ヒドロキシプロリン、及び L-プロリン (各アミノ酸の濃度は Table 3.1 に示す)。いずれの溶液も pH を 6.5 - 7.5 になるように調整し、ろ過滅菌して調製した。次に 24-well プレートを 37°C で 24 時間培養し、顕微鏡で画像を撮影した。アミノ酸は Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) から購入した。

### L-プロリンによる *C. albicans* の菌糸誘導

L-プロリンを水で所定濃度になるように 96-well プレートに調整し、そこに *C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように懸濁した。37°C で 24 時間培養した後、顕微鏡で画像を撮影した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 RPMI-1640 培地における菌糸誘導因子の特定

初めに、*C. albicans* の菌糸誘導を引き起こす成分の同定を目的として、*C. albicans* JCM1542 株が RPMI-1640 培地で菌糸形成を起こすか測定した。結果より、*C. albicans* を RPMI-1640 培地に懸濁して 37°C で 24 時間培養すると、*C. albicans* は菌糸形での増殖を示した (Fig. 3.1 (a))。一方、*C. albicans* を RPMI-1640 培地に懸濁して 30°C で 24 時間培養した場合、菌糸形を示さず酵母形での増殖を示した (Fig. 3.1 (a))。この結果より、*C. albicans* の菌糸誘導において、温度 (37°C) は必須の因子であることが明らかとなった。

次に RPMI-1640 培地のどの成分が菌糸誘導を引き起こすか同定した。まず、RPMI-1640 培地成分を炭水化物、アミノ酸群、ビタミン群、及び無機塩類の 4 つのカテゴリーに分類し、それらの菌糸誘導を評価した。*C. albicans* を 2 mg/mL グルコース、1×RPMI-1640 amino acid solution、1×RPMI-1640 vitamin solution、又は inorganic salts に懸濁して 37°C で 24 時間培養したところ、RPMI-1640 amino acid solution で最も強い菌糸誘導 ( $31.7 \pm 9.3 \mu\text{m}$ ) を示した (Fig. 3.1 (a))。RPMI-1640 培地で誘導される菌糸長 ( $52.0 \pm 7.3 \mu\text{m}$ ) と比較すると、それよりも短い菌糸長であった。一方、2.0 mg/mL グルコースと RPMI-1640 vitamin solution は短い菌糸を誘導した (それぞれ  $12.0 \pm 6.8 \mu\text{m}$  及び  $14.4 \pm 7.3 \mu\text{m}$ )。inorganic salts は菌糸誘導を示さなかった。これらの結果より、RPMI-1640 培地に含まれる主要な菌糸誘導因子は、RPMI-1640 amino acid solution に含まれていることが明らかとなった。

続いて RPMI-1640 培地に含まれるアミノ酸のうち、どのアミノ酸が菌糸誘導を引き起こすか個々のアミノ酸の菌糸誘導能を検証した。Fig. 3.1 (b) と Table 3.1 に示す通り、L-プロリンは 50%以上の菌糸誘導を示したが、他のアミノ酸は L-プロリンよりも低い菌糸形成率であった (25%以下)。以上より、RPMI-1640 培地に含まれる成分で、L-プロリンは最も重要な *C. albicans* の菌糸誘導因子であることが明らかとなった。



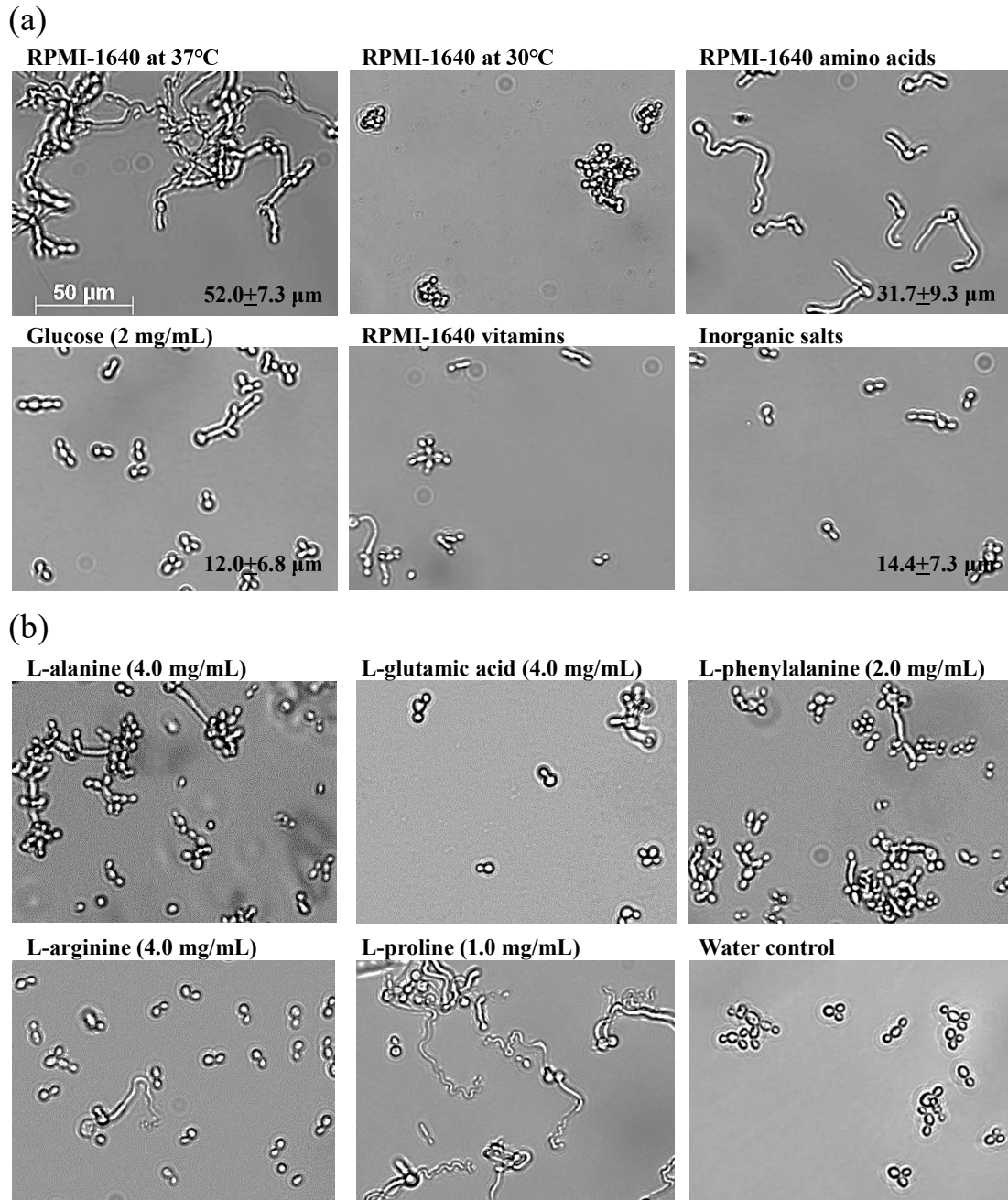


Figure 3.1 (a) Morphology of *C. albicans* and hyphal length under different hyphal-inducing conditions. Standard deviations are shown for each sample. (b) Effect of amino acids in the RPMI-1640 medium. Cells of *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) were incubated at 37°C except for RPMI-1640 at 30°C for 24 h. RPMI-1640 amino acids and vitamins were purchased from Sigma-Aldrich and used at 1× concentration. Inorganic salts were 100 mg/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 50 mg/L  $\text{MgSO}_4$ , 400 mg/L KCL, and 6000 mg/L NaCl. The scale bar was applied to all images.

Table 3.1 Hyphal formation ability with amino acid in *C. albicans*

Amino acid	Concentration (mg/mL)	Hyphal formation
L-alanine	4.0	+
L-cysteine	0.4	-
L-aspartic acid	4.0	-
L-glutamic acid	4.0	+
L-phenylalanine	2.0	+
Glycine	4.0	-
L-histidine	0.4	-
L-methionine	0.4	-
L-asparagine	1.4	-
L-glutamine	2.0	-
L-arginine	4.0	+
L-serine	2.0	-
L-isoleucine	0.2	-
L-threonine	0.2	-
L-hydroxyproline	2.0	-
L-proline	1.0	+++
Water control		-

-: <5% hyphal formation; +: >5% to <25% hyphal formation; ++: >25% to <50% hyphal formation; +++: >50% hyphal formation.

### 3.3.2 L-プロリンによる菌糸形成最少濃度の決定

次に、L-プロリンが *C. albicans* の菌糸を誘導できる最少濃度を検証した。*C. albicans* を様々な濃度の L-プロリン水に懸濁し、37°Cで24時間培養した。結果より、0.02 mM までは菌糸形を誘導することができたが、0.01 mM では菌糸を誘導することができなかった (Fig. 3.2)。RPMI-1640 培地にはおよそ 0.17 mM の L-プロリンが含まれているため、本結果は RPMI-1640 培地に *C. albicans* の菌糸を誘導するのに十分な量の L-プロリンが含まれていることも明らかとなった。

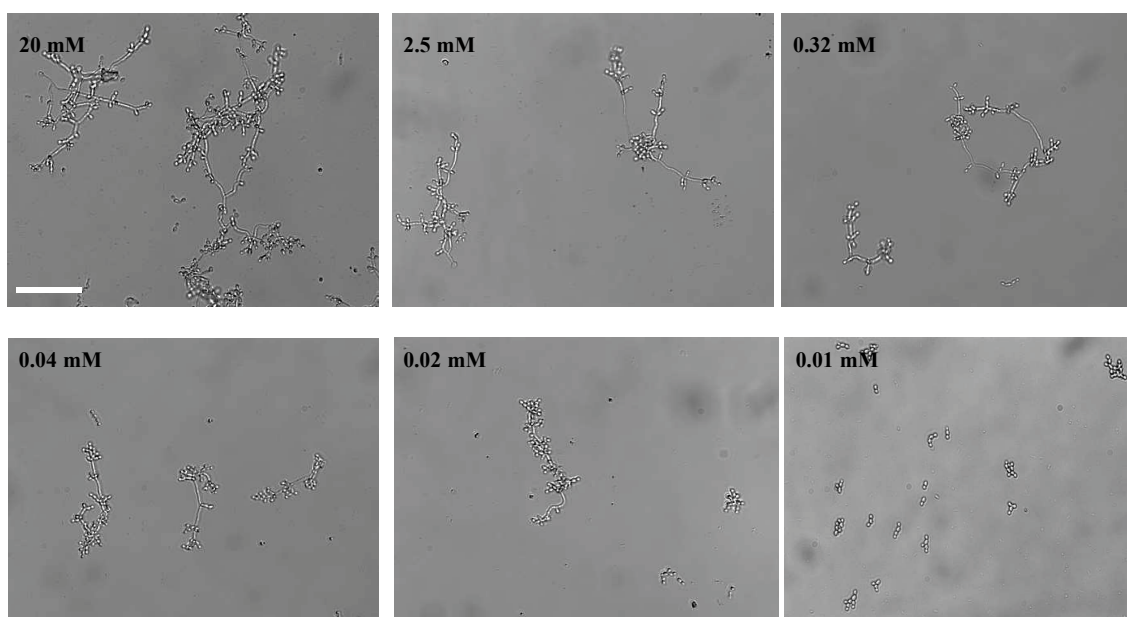


Figure 3.2 Hyphal induction in different concentration of L-proline. Cells of *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) were incubated with various concentration of L-proline at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h. No hyphal formation was observed in 0.01 mM L-proline. The white scale bar (50  $\mu\text{m}$ ) was applied to all images.

### 3.4 考察

*C. albicans* の菌糸誘導は通常、RPMI-1640 培地、Lee's 培地、Spider 培地、YPD 培地 + 血清、及び YPD 培地 + GlcNAc など、複雑な成分が入った条件で行われているが、これらの条件には、菌糸誘導因子に加えて様々な栄養成分等の因子が入っている [9-19]。本研究では、不要な因子を可能な限り排除し、*C. albicans* の菌糸誘導因子の特定と菌糸誘導条件の単純化を目的として実施した。初めに、*C. albicans* の菌糸形成を誘導することが知られている RPMI-1640 培地を用いて、菌糸形成を誘導する成分の同定を行った。RPMI-1640 培地は全ての成分が既知であるため、単独成分まで特定できることから、本研究の菌糸誘導条件として選択した。結果より、プロリンが菌糸誘導因子として同定され、プロリンは 0.02 mM 以上を水に添加することで菌糸形成を誘導できることを明らかとした。本研究で確立された、0.02 mM 以上のプロリンを単独で水に添加し  $37^\circ\text{C}$  で培養する条件は、これまでに報告されている *C. albicans* の菌糸誘導条件の中でも、最も単純化された菌糸誘導条件と考える。以前の研究でも、プロリンは菌糸を誘導することが報告されているが、これらの報告で使われているプロリン濃度 (10-50 mM) に比べて、我々の条件はおよそ 1000 分の 1 濃度 (0.02 mM) で菌糸を誘導できることを明らかとした [12-16]。さらに、過去に報告されている条件は 10-50 mM のプロリンを基礎培地等に加えて使用しているため、これらは炭水化物、窒素源、ビタミン類、緩衝液成分、又は無機塩類が他の成分が含まれた複雑な条件である [12-16]。

また、プロリンに加えてアラニン、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、及びリシンも菌糸誘導を引き起こすと報告されたが、本研究ではこれらのアミノ酸を単独で水に添加しても菌糸形成を誘導できなかった [14-16]。このことから、基礎培地等に含まれる栄養成分等は相加的又は相乗的に菌糸誘導を補助すると考えられるため、基礎培地等による菌糸誘導効果を把握することは重要である。

プロリンはアミノ酸の中で唯一の 2 級アミンであり、この 1 級アミンと 2 級アミンの違いが、*C. albicans* の増殖に使用されるのか、それとも菌糸の伸張に利用されるのかなど、異なる代謝経路を誘導している可能性も示唆される。本研究においてプロリンで誘導された菌糸長は RPMI-1640 培地で誘導されたものに比べて短かった。これは RPMI-1640 培地に含まれる他の栄養成分がプロリンによって誘導した菌糸の伸張を補助していると考えられる。これらのことより、プロリンは酵母形から菌糸形へ変換するのに適切な成分であるが、細胞増殖並びに菌糸の伸張のためには適切な栄養成分ではないと考えられる。

### 3.5 結言

第 3 章では、*C. albicans* の菌糸誘導を引き起こす因子の同定を目的として、成分既知の RPMI-1640 培地を使って *C. albicans* の菌糸形成を引き起こす誘導因子を明らかとした。菌糸誘導条件を単一成分まで単純化し、複雑な *C. albicans* の菌糸誘導条件を単純化することができた。すなわち 0.02 mM 以上のプロリンを単独で水に添加した条件である。

今回確立した単純な菌糸誘導条件は、今後、新たな治療薬の開発、又は分子生物学的手法等と組み合わせることによって、さらなる *C. albicans* の形態変化メカニズムの解明につながることを期待される。

## 第4章 プロリンアナログによる *Candida. albicans* の菌糸形成阻害

### 4.1 緒言

現在、本邦で臨床に使用されている抗真菌薬は、polyene maclorides 系、azole 系薬剤、及び、Echinocandins 系の 3 系統が使用されている。しかしながら、これらの抗真菌薬は耐性菌の出現や安全性等に課題がある。このような現状から、耐性菌が出現しづらく安全性の高い治療薬の開発が求められている。

これまで述べたように、*C. albicans* の菌糸形成は本菌の病原性に深く関与しているため、二形性変換機構は新しい治療薬の魅力的な標的としてなっている。以前の報告で、*C. albicans* の酵母形での増殖を阻害することなくバイオフィルムと菌糸形成を阻害する物質 2-[(2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-7-[[4-(propan-2-yl)phenyl]methyl]-2,7-diazaspiro[4.5]decan-6-one は、マウスの実験において有意にその病原性を抑制したことが報告された [44]。また、二形性変換の必須遺伝子を破壊した株では、マウスに感染させた場合に野生株と比較して病原性が著しく低下することが報告されている [29, 45]。菌糸形成阻害を標的とするもう一つの利点は、菌の増殖を抑制せずに菌糸形成阻害により病原性の抑制を対象とすることから、耐性菌出現の選択圧が低い状態で維持できることにある。また、*C. albicans* は常在菌として、ヒトの皮膚や環境中の至る所で存在し共存しているため、増殖抑制を標的とするのではなく、病原性を抑制し共存することを標的とすることは効果的な治療方法と考えられている。

第3章では、RPMI-1640 培地を使って *C. albicans* の菌糸誘導条件を単一成分まで単純化した結果、L-プロリンを水に添加した条件が確立された。このことより、プロリンは菌糸誘導において重要な役割を担っている成分と考えた。我々は、プロリンを抑制することによって *C. albicans* の菌糸形成を効果的に阻害できると考え、これが新規の治療薬の開発につながると考えた。本章では、複数の L-プロリンアナログ等を菌糸形成阻害剤の候補として選択し、*C. albicans* の菌糸形成を阻害剤の探索を行った。

### 4.2 材料と方法

#### 使用株及び培養条件

*C. albicans* JCM1542 株をサブロー培地（0.5%酵母エキス、2.0%グルコース、1.0%ペプトン）で 30°C、24 時間、150 rpm で振とう培養し、酵母形菌体を得た。

#### プロリンによる *C. albicans* の菌糸形成を阻害する化合物の探索

初めにプロリンによる菌糸誘導を阻害できる化合物の探索を行った。サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 5 mM L-プロリン水が入った 24-well プレートに懸濁した。さらに次の化合物を終濃度 20 mM になるように添加して 37°C で 24 時間培養後、顕微鏡で画像を撮影した； L-4-thiazolidinecarboxylic acid (T4C; Sigma-Aldrich: T27502)、tetrahydro-2-furoic acid (THFA; Sigma-Aldrich: 341517)、L-pipecolic acid (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan (TCI) : P1404)、L-azetidine-2-carboxylic acid (AZC; TCI: A1043)、L-pyroglutamic acid (TCI: P0573)、 $\alpha$ -N-methyl-L-proline (mPro; TCI: M2077)、L-lactic acid (TCI: L0165)、及び N-trifluoroacetyl-D-glucosamine (TCI: T0973)。化合物はまず 100 mM になるように水で溶解した後、pH を 6.5 - 7.5 になるように調整してろ過滅菌した。

#### GlcNAc 及び FBS による *C. albicans* の菌糸誘導

GlcNAc (Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)、及び FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を水で所定濃度になるように 96-well プレートに調整し、そこに *C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように懸濁した。GlcNAc は 37°C で 24 時間培養した後、顕微鏡で画像を撮影した。FBS については 37°C で 4 時間培養した後、顕微鏡で画像を撮影した。

#### *C. albicans* の菌糸形成阻害剤の探索

GlcNAc による菌糸誘導を阻害できるプロリンアナログ等の探索を行った。サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように 10 mM GlcNAc 水が入った 24-well プレートに懸濁した。さらに次の化合物を終濃度 20 mM になるように添加して 37°C で 24 時間培養後、顕微鏡で画像を撮影した。化合物はまず 100 mM になるように水で溶解した後、pH を 6.5 - 7.5 になるように調整してろ過滅菌した。

続いて、L-プロリン又は GlcNAc による菌糸誘導を阻害した AZC、T4C、及び mPro について、菌糸誘導を阻害できる最少濃度を検証した。10 mM L-プロリン又は 5 mM GlcNAc が入った 96-well プレートに、所定濃度になるように AZC、T4C、又は mPro を添加した。続いて *C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように懸濁し、37°C で 24 時間培養した。その後、顕微鏡で画像を撮影した。顕微鏡画像から酵母形と菌糸形の数を測定し、菌糸数を総数で除して菌糸の割合をパーセントで算出した。

AZC、T4C、及び mPro について FBS による菌糸誘導の阻害効果を検証した。FBS を所定濃度になるように 96-well プレートに調整し、そこに 20 mM の AZC、T4C、又は mPro を添加した。続いて *C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように懸濁し、37°C で 4 時間培養した後、顕微鏡で画像を撮影した。顕微鏡画像から酵母形と菌糸形の数を測定し、菌糸数を総数

で除して菌糸の割合をパーセントで算出した。

次に AZC、又は T4C と mPro の併用により、FBS の菌糸誘導を阻害できる最少濃度を検証した。FBS を 96-well プレートに異なる濃度（終濃度 50、25、12.5、及び 6.3%）になるように添加して、次に AZC 又は T4C と mPro を異なる濃度（終濃度 20、10、及び 5 mM）で添加した。続いて *C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように懸濁し、37°C で 4 時間培養し、顕微鏡で画像を撮影した。顕微鏡画像から酵母形と菌糸形の数測定し、菌糸数を総数で除して菌糸の割合をパーセントで算出した。

菌糸形成阻害剤による *C. albicans* の酵母形での増殖に対する影響

AZC、又は T4C と mPro の併用が *C. albicans* の酵母形での増殖に影響を与えるかどうか検証した。サブロー培地で 24 時間培養した *C. albicans* 酵母形菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるように菌体を滅菌水で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL になるようにサブロー培地に懸濁し、20 mM AZC、又は 20 mM T4C と 20 mM mPro を添加した。増殖曲線は TVS062CA Biophotorecorder (Toyo Seisakusho, Ltd, Chiba, Japan) を用いて 30°C、70 rpm で振とうしながら 660 nm の吸光度を 15 分間隔で測定した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 プロリンによる *C. albicans* の菌糸形成を阻害する化合物の探索

第 3 章でプロリンが重要な菌糸誘導因子と同定されたため、我々はプロリンアナログ等によりプロリン又はその代謝を阻害することで、*C. albicans* の菌糸誘導を阻害できると考えた。プロリンを阻害できる化合物として複数のプロリンアナログ、THFA [16, 54-57]、T4C [12, 13, 58, 59]、L-pipecolic acid [54, 56]、AZC [12, 13, 58, 60]、L-pyroglutamic acid、及び  $\alpha$ -N-methyl-L-proline (mPro) と、プロリンの代謝を阻害することが報告されている L-lactic acid [55, 60, 61] を選択した。*C. albicans* を 10 mM の L-プロリンと 20 mM のそれぞれのアナログ等を加えて 37°C で 24 時間培養し、形態を測定した。Fig. 4.1 より、AZC と T4C は L-プロリンによる菌糸誘導条件を阻害したが、他のアナログ等は阻害することができなかった。

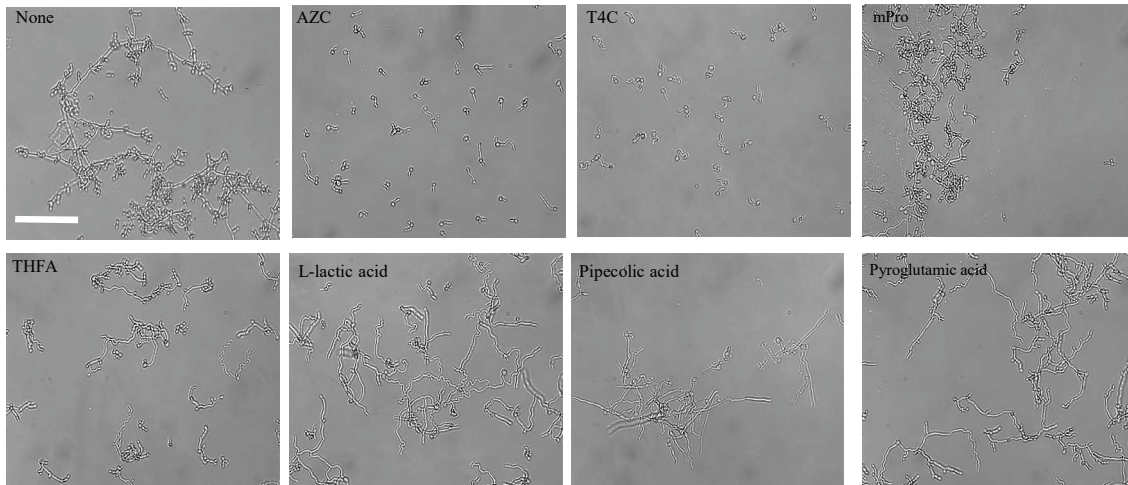


Figure 4.1 Effect of proline analogs, proline metabolite inhibitors on 10 mM L-proline-induced hyphal formation. Cells of *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) with various compounds (final 20 mM) were incubated at 37°C for 24 h. The white scale bar (100  $\mu$ m) was applied to all images.

#### 4.3.2 GlcNAc による *C. albicans* の菌糸誘導と GlcNAc による菌糸形成を阻害するプロリンアナログ等の探索

続いて、プロリンがあらゆる *C. albicans* の菌糸誘導条件において重要な役割を担っていることを検証するために、プロリンが含まれていないと考えられる菌糸誘導条件を探索した。GlcNAc は広く *C. albicans* の菌糸を誘導することが知られており、その代謝等にプロリンが関与している可能性が低いと考えた。一般に使われている GlcNAc による菌糸誘導条件は、炭水化物、窒素源（酵母エキス、ペプトン、及びアミノ酸など）、並びにビタミン類などが入った基礎培地に、GlcNAc を 2-5 mM 加えて 37°C で培養する。これらの条件には基礎培地中のプロリンが菌糸形成に影響している可能性が考えられた。そこで、我々は GlcNAc がプロリンの存在なしで *C. albicans* の菌糸形成を誘導できるか検証するために、GlcNAc を単独で水に入れて菌糸誘導を起こすか検証した。Fig. 4.2 に示す通り、GlcNAc は単独で菌糸誘導を示し、その最少濃度は 0.005 mM と一般的に使用される濃度 2-5 mM の 100 分の 1 であることが明らかとなった。



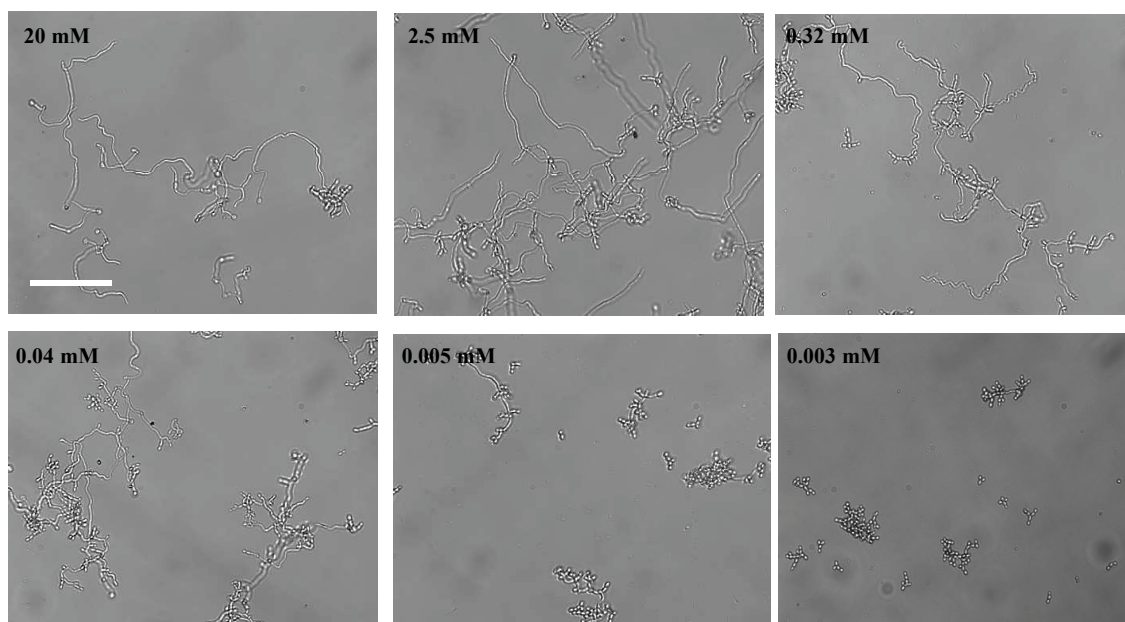


Figure 4.2 Hyphal induction in different concentration of GlcNAc. Cells of *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) were incubated with various concentration of GlcNAc at 37°C for 24 h. No hyphal formation was observed in 0.003 mM GlcNAc. The white scale bar (100  $\mu$ m) was applied to all images.

GlcNAc がプロリンの存在なしで菌糸誘導を引き起こしたため、次にプロリンアナログ等が GlcNAc による菌糸誘導を阻害できるか検証した。7つのプロリンアナログ等に加えて、GlcNAc アナログである *N*-trifluoroacetyl-D-glucosamine も試験した。Fig. 4.3 より、AZC と mPro は GlcNAc による菌糸誘導条件を強く阻害し、T4C でもわずかな阻害が認められた。しかし、GlcNAc アナログを含む他のプロリンアナログ等では阻害することができなかった。これまでの結果をまとめると、AZC はプロリンと GlcNAc による菌糸誘導を阻害し、T4C はプロリンによる菌糸誘導を阻害するが、GlcNAc に対する阻害はわずかであった。また、mPro はプロリンアナログであるが、プロリンによる菌糸誘導を阻害できず、GlcNAc による菌糸誘導を阻害した。

これらの結果より、プロリンアナログにより GlcNAc による菌糸形成を阻害できることが明らかとなったが、阻害を示した 3 種類のプロリンアナログの阻害効果とその標的はそれぞれで異なることも明らかとなった。

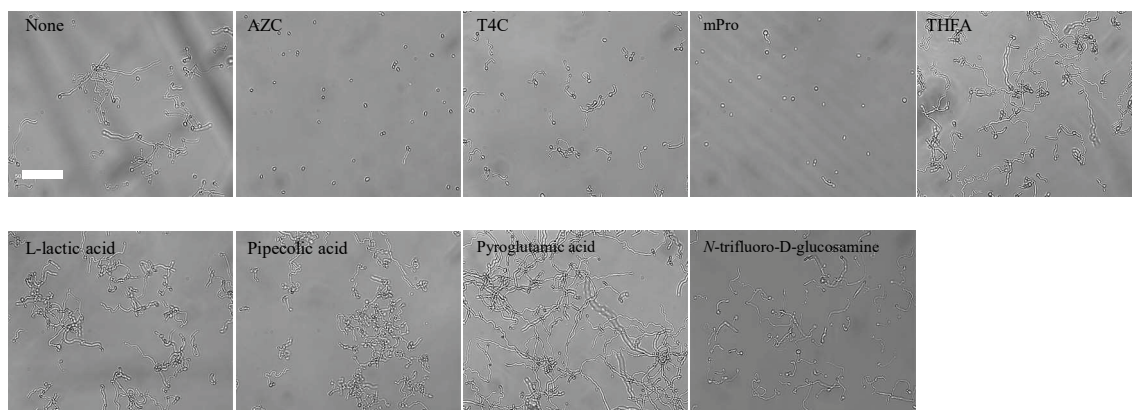


Figure 4.3 Effect of proline analogs, proline metabolite inhibitors, and GlcNAc analog on 5 mM GlcNAc-induced hyphal formation. Cells of *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) with various compounds (final 20 mM) were incubated at 37°C for 24 h. The scale bar (100  $\mu$ m) was applied to all images.

#### 4.3.3 血清による菌糸誘導条件下におけるプロリンアナログの菌糸形成阻害

プロリンと GlcNAc は血清中に含まれているため、血清による *C. albicans* の菌糸誘導には、プロリンと GlcNAc が主に関与していると仮説を立て、血清による *C. albicans* の菌糸誘導を AZC、T4C、及び mPro で阻害できるか検証した。*C. albicans* を様々な濃度の FBS が入った条件下で、AZC、T4C、及び mPro（最終濃度 20 mM）を加えて 37°C にて 4 時間培養し、形態変化を観察した。Fig. 4.4 に示す通り、FBS による *C. albicans* の菌糸形成最少濃度は 0.6%（菌糸形成率  $57.7 \pm 4.5\%$ ）であった。一方、AZC は 20% の FBS 条件下で誘導される菌糸形成を阻害した（菌糸形成率  $0.4 \pm 0.6\%$ ）。T4C は 2.5% の FBS 以下の濃度で菌糸形成を阻害（菌糸形成率  $3.0 \pm 3.6\%$ ）し、mPro は 1.3% FBS 以下の濃度を阻害した（菌糸形成率 0.0%）。

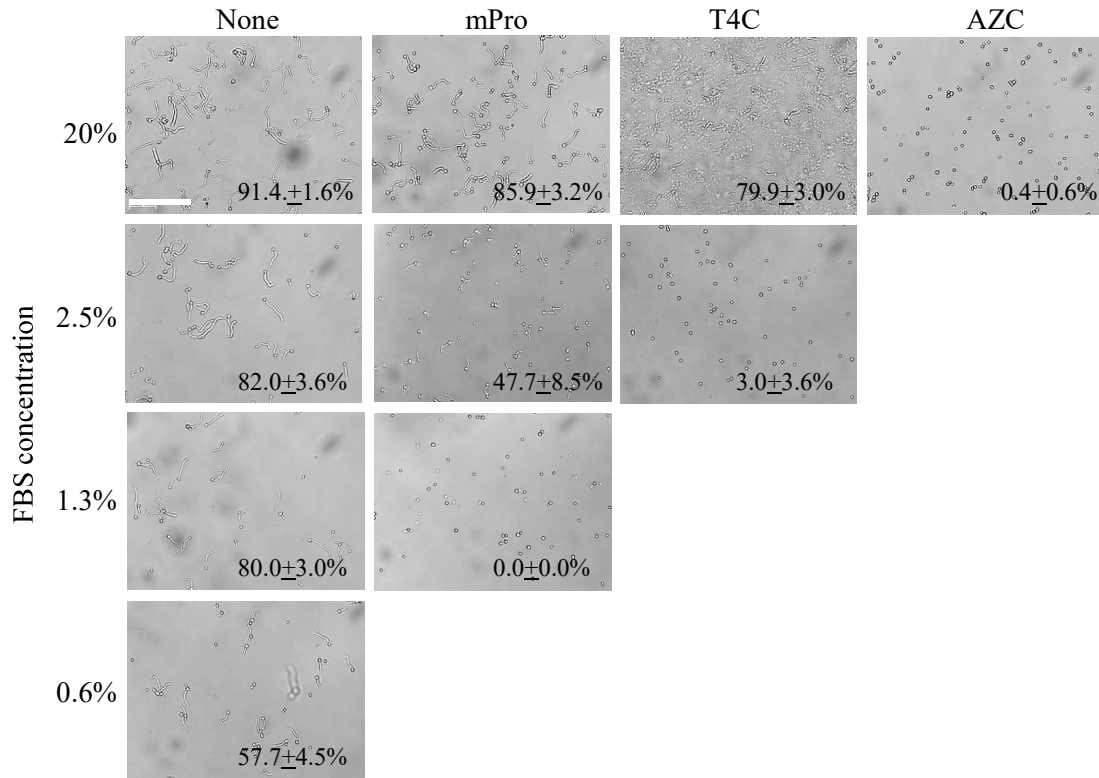


Figure 4.4 Effect of proline analogs on FBS-induced hyphal formation. Cells of *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) with various compounds (20 mM) were incubated at 37°C for 4 h. All assays were triplicated, and at least 30 cells were counted for hyphal formation percentage with standard deviations. The scale bar (100  $\mu$ m) was applied to all images.

ここまで、AZCはプロリンとGlcNAcの両方の菌糸形成を阻害し、さらに20% FBSと高濃度の血清による菌糸誘導条件も阻害できた。一方で、T4Cはプロリンによる菌糸誘導を阻害したが、GlcNAcに対してはわずかな阻害を示した。そして、血清に対しては2.5% FBSと低濃度の菌糸誘導を阻害した。mProはプロリンによる菌糸形成を阻害できなかったがGlcNAcによる菌糸誘導阻害し、1.3% FBSによる菌糸誘導を阻害と血清に対しては効果が低かった。以上、AZCは高濃度の血清にも高い菌糸形成阻害を示し、T4CとmProは血清に対してわずかな効果しか認められなかったことから、血清による菌糸誘導を阻害するためには、プロリンとGlcNAcの両方の阻害が必要であることが示唆された。そこで、T4CとmProを併用することによりAZCと同様に高濃度の血清に対して菌糸形成を阻害できるか検証した。*C. albicans*を20 mM AZC、10 mM AZC、5 mM AZC、又はT4CとmProの併用(20 mM T4Cと20 mM mPro、10 mM T4Cと10 mM mPro、又は5 mM T4Cと5 mM mPro)で、異なる濃度のFBSで培養して菌糸誘導阻害効果を検証した。Fig. 4.5 (a)に示す通り、

AZC は強い菌糸誘導阻害効果を示した (20 mM AZC では 50% の FBS 条件下で菌糸形成率 30% 以下を示し、10 mM AZC では 50% の FBS 条件で菌糸形成率 50%)。また、T4C と mPro の併用でも高い菌糸形成阻害効果が認められた (20 mM の併用により 50% FBS 条件下で菌糸形成率が 50%、25% FBS 条件では 30%、12.5% FBS 条件では 20% 程度であった)。さらに、これらの化合物が *C. albicans* の酵母形での増殖に影響を与えるか評価した。Fig. 4.5 (c) に示す通り、AZC、又は T4C と mPro の併用によって酵母形での増殖に影響がないことが明らかとなった。

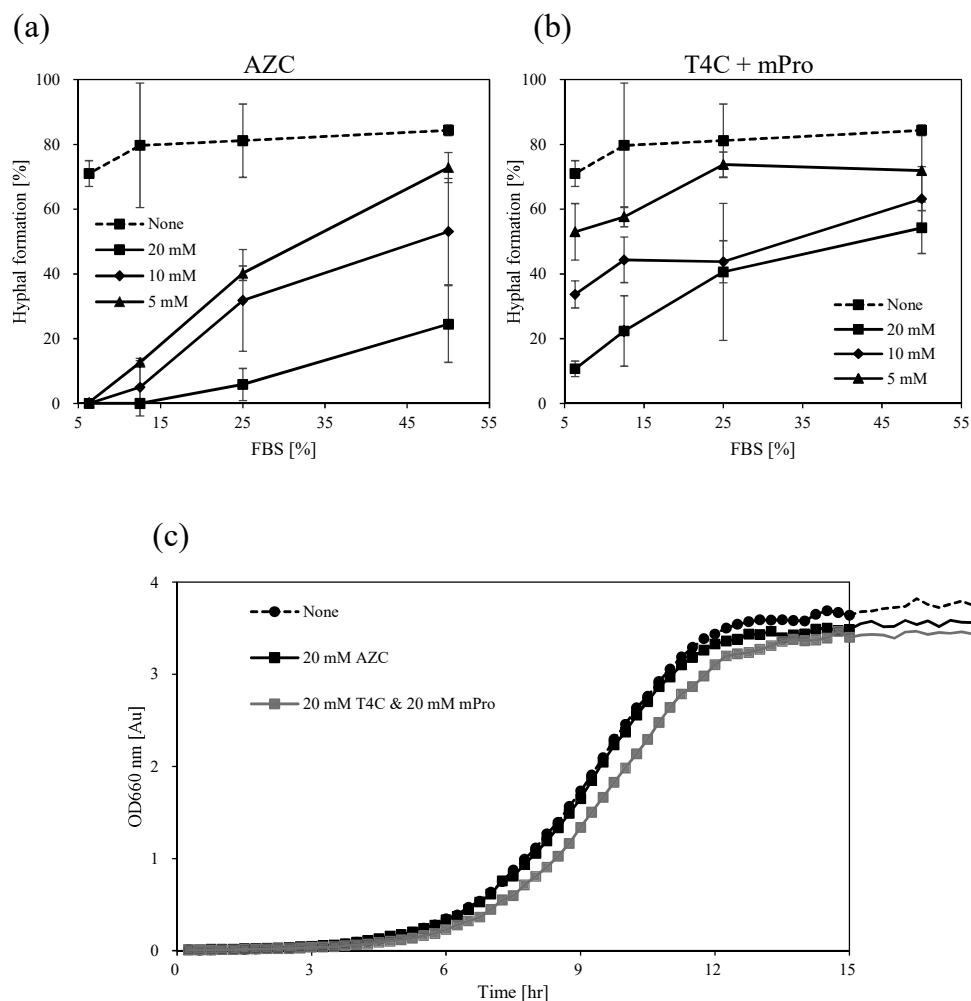


Figure 4.5 Effect of proline analogs. (a) Effect of AZC on different concentration of FBS yeast-to-hyphal transition. (b) Effect of simultaneous addition of T4C and mPro on yeast-to-hyphal transition in different concentration of FBS. *C. albicans* ( $10^5$  cells/mL) with various compounds (final concentration was 20 mM) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 4 h. At least 30 cells were counted and all assays were triplicated. Standard deviation is shown for each sample. (c) Effect of proline analogs on yeast form growth of *C. albicans*. *C. albicans* cells ( $10^5$  cells/mL) in Sabouraud's medium were cultured with 20 mM AZC, 20 mM T4C, and 20 mM mPro, or without at  $30^\circ\text{C}$  and OD 660 nm was recorded every 15 minutes by Biophotorecorder.

#### 4.4 考察

近年、抗真菌薬に対する耐性菌の増加が問題になっている。臨床で使用されている主な抗真菌薬は、polyene maclorides 系、azole 系薬剤、及び Echinocandins 系の 3 系統があるが、これらの抗真菌薬に対する耐性菌の出現が課題となっている。このような現状から、耐性菌が出現しづらく安全性の高い治療薬の開発が求められている。これまで述べたように、*C. albicans* の菌糸形成は本菌の病原性に深く関与しているため、二形性変換機構は新しい治療薬の魅力的な標的としてなっている。例えば、タンパク質分解酵素や脂質分解酵素などの病原性因子は *C. albicans* の菌糸形で分泌される [26, 27, 62]。さらに、菌糸形に変換できない *C. albicans* 遺伝子欠損株はマウスモデルの実験で病原性を示さないことが知られている [29, 45]。

第 3 章において、プロリンは単独で水に添加することで菌糸誘導を引き起こせる成分として同定したため、我々はプロリンを抑制することにより *C. albicans* の菌糸誘導を阻害できる治療薬になりえると考えた。複数のプロリンアナログ等を選択し、*C. albicans* の菌糸形成を抑制できるか評価した結果、AZC と T4C はプロリンによる菌糸誘導を阻害できることを明らかとした。

続いて、プロリンを含まずに菌糸を誘導できる条件でもプロリンアナログにより菌糸誘導を阻害できるか検証した。GlcNAc は代表的な菌糸誘導因子として知られているため、初めに GlcNAc がプロリンを含まない条件でも菌糸誘導を起こせるか検証した。GlcNAc を単独で水に添加して菌糸を誘導できるか検証した結果、0.005 mM を添加することで菌糸を誘導できることを明らかとした。

次に、GlcNAc による菌糸誘導をプロリンアナログで阻害できるか検証した。結果より、AZC と mPro は GlcNAc による菌糸形成を阻害し、T4C でもわずかな阻害が認められた。AZC と T4C はプロリンによる菌糸誘導を阻害した化合物であるため GlcNAc による菌糸誘導も阻害できたことは期待通りの結果であったが、mPro はプロリンによる菌糸誘導を阻害できなかった化合物であるため、GlcNAc による菌糸誘導を阻害できたことは予想外の結果であった。

これらの結果より、AZC はプロリンと GlcNAc の両方の菌糸誘導を阻害できるプロリンアナログで、T4C はプロリンによる菌糸誘導を阻害するが、GlcNAc による菌糸誘導の阻害は弱いプロリンアナログであった。一方で、mPro は GlcNAc による菌糸誘導を阻害することができるが、プロリンによる菌糸誘導は阻害できないプロリンアナログであった。これらの 3 つ化合物は同じプロリンアナログであるが、その標的は異なることが予想された。プロリンと GlcNAc がどのように関連して菌糸形成を誘導し、さらに 3 つのプロリンアナログがどのようにこれらの菌糸誘導を抑制しているのか明らかではない。以前の研究では、GlcNAc を代謝する酵素を欠損した株は、GlcNAc による菌糸誘導条件下で菌糸形成を示したことから、GlcNAc の菌糸誘導はその代謝が関係しているのではなく、GlcNAc 自体が菌糸誘導シ

グナルに関与している可能性があることが報告された [63]。また、後生動物において GlcNAc はインスリンシグナルやセルサイクルを刺激するセンサーの役割を果たすことも報告されている [39]。本研究においても、プロリンアナログがプロリンによる菌糸誘導だけでなく GlcNAc による菌糸形成も阻害できたことと合わせて考えると、プロリンと GlcNAc の間には菌糸誘導におけるシグナル伝達経路で関連性があると考えられる (Fig. 4.6)。さらに、プロリンも GlcNAc と同様にその代謝が菌糸誘導に関与しているのではなく、プロリン自体が直接菌糸誘導シグナルを刺激して誘導している可能性も考えられる。さらに、これらの GlcNAc とプロリンを認識するシグナルは密接に関連しており、その刺激がプロリンアナログによって阻害されていることも考えられた。

血清は、*C. albicans* がヒトの体内で菌糸形成を引き起こす代表的な誘導因子として知られており、菌糸形成阻害を標的とする治療薬の開発において、血清による菌糸誘導を阻害できることは重要である。血清中には様々な成分が含まれているが、血清のどの成分が *C. albicans* の菌糸形成を誘導するのかは明らかとされていない。プロリンと GlcNAc は血清に含まれていることが知られており、我々はこの 2 つの物質が血清による菌糸誘導の主因子と仮説を立て、プロリンアナログによって血清による菌糸誘導を阻害できると考えた。

初めに AZC、T4C、及び mPro が FBS による *C. albicans* の菌糸形成を阻害できるか検証した。20 mM の AZC は 20% の FBS で誘導される菌糸形成を阻害した。20 mM の T4C は 2.5% の FBS による菌糸誘導を阻害でき、20 mM の mPro は 1.3% 以下の FBS による菌糸誘導を阻害することができた。プロリンと GlcNAc の両方を阻害できる AZC が 20% の FBS による菌糸誘導を阻害できたことは、プロリンと GlcNAc が血清における菌糸誘導主因子であるという仮説を裏付ける結果となった。また、T4C が 2.5% よりも高い濃度の FBS を阻害できなかったことは、2.5% よりも高濃度の FBS には菌糸を誘導できる濃度以上の GlcNAc が残存しているが、2.5% よりもさらに低濃度に希釈されると GlcNAc による効果が無視できるまで希釈されてしまったと考えられる。一方、プロリンは血清中に 0.13-0.63 mM 含まれていることが報告されている [64]。従って、2.5% 程度までは菌糸を誘導できるプロリン (約 0.02 mM) が存在しているため、プロリンによる菌糸誘導を阻害できる T4C は GlcNAc による菌糸誘導が無視できる濃度まで希釈された 2.5% 以下で菌糸形成を阻害することができ、プロリンによる菌糸誘導を阻害できない mPro はプロリンによる菌糸誘導が無視できる 1.3% よりも低濃度の血清の菌糸形成を阻害できると考えられる。これらの結果より、血清による菌糸形成を阻害するためにはプロリンと GlcNAc の両方の阻害が必要であることが示唆された。

このことから、T4C と mPro を併用してプロリンと GlcNAc の両方を阻害すれば、AZC と同様に高濃度の血清条件下でも菌糸誘導阻害できると考えた。結果より、AZC、又は T4C と mPro の併用により高濃度の FBS による菌糸誘導を阻害することができた。これらの結果はプロリンと GlcNAc は、血清による菌糸形成において主要な因子であることが示唆された。

また、AZC、及び T4C と mPro の併用は、酵母形での増殖に影響を与えなかった。このことから、これらの薬剤は低い選択圧で効果的に菌糸形成を阻害できると期待できる。

以上より、プロリンアナログ AZC、T4C と mPro の併用は、*C. albicans* の酵母形での増殖に影響を与えずに、血清による菌糸形成を阻害できた。これらのことから、これらの薬剤は薬剤耐性菌の出現を最大限に抑えた効果的な治療薬として貢献できると考えられる。

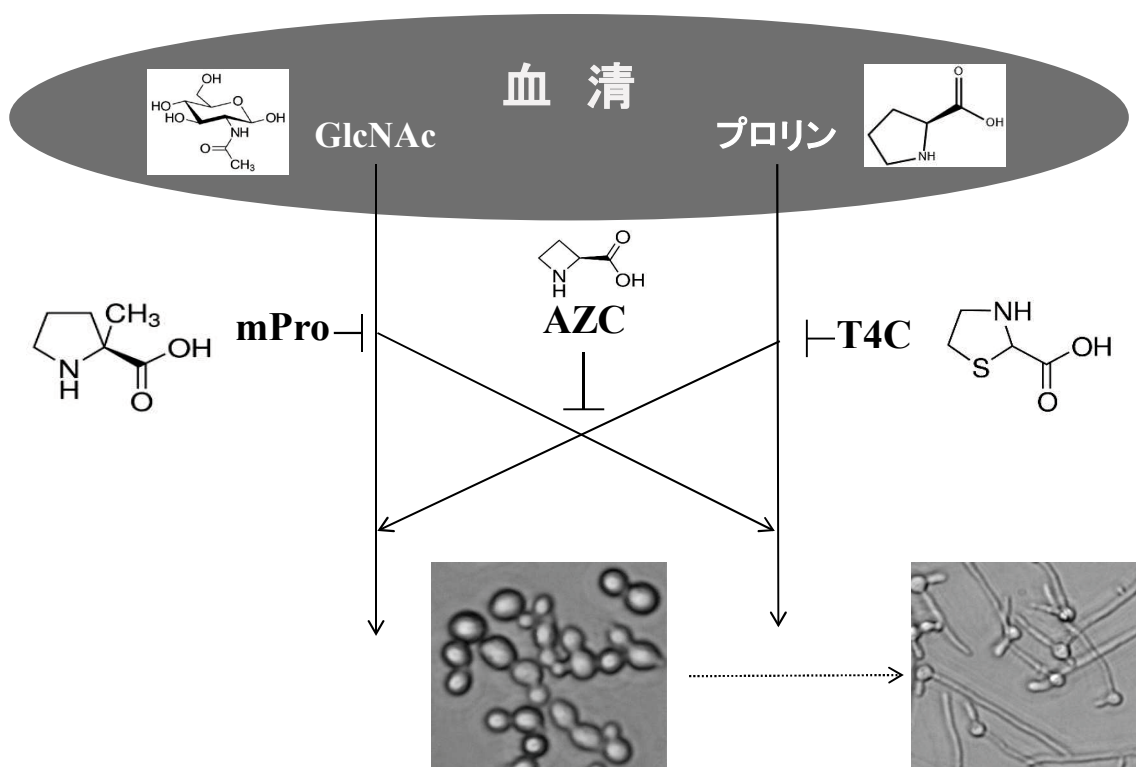


Figure 4.6 想定されるプロリンと GlcNAc による菌糸誘導シグナルと各プロリンアナログによる阻害標的



#### 4.5 結言

第4章では、第3章において菌糸誘導条件の単純化により菌糸誘導因子を同定することができたため、さらに二つの知見を得ることができた。一つが効果的な菌糸形成阻害剤（AZC, T4C, 及び mPro）を同定することができたことである。二つ目が血清による *C. albicans* の菌糸誘導はプロリンと GlcNAc が主因子として関与しており、これらを阻害することによって血清による *C. albicans* の菌糸形成を阻害できることを明らかにできたことである。AZC 又は T4C と mPro の併用は酵母形での細胞増殖に影響を与えることなく *C. albicans* の菌糸誘導を阻害できた。この酵母形での増殖に影響を与えず菌糸形成のみを阻害できるという性質は、*C. albicans* にとって低い増殖抑制圧であるため、薬剤耐性菌の出現を抑えることに貢献できると考えられている。

本研究で得られた、プロリンと GlcNAc の抑制による *C. albicans* の菌糸形成阻害の知見は、今後の *C. albicans* の形態変換メカニズムの解明並びに治療薬の開発に貢献できると期待する。

## 第5章 結論

本研究では、*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化シグナル伝達系の解明、複雑な菌糸誘導条件の単純化、並びに菌糸形成阻害剤の探索を行った。

第2章では、クオラムセンシング分子である farnesol が、*C. albicans* の MAP キナーゼの系を抑制することによって菌糸形成を抑制し、バイオフィーム形成成熟期に菌糸から酵母への変換を行って形態変化を調節していることを示した。さらに、*C. albicans* の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリンシグナルは cAMP-PKA の cAMP よりも下流に作用、もしくは cAMP-PKA の系とは別の経路に作用して菌糸特異的 mRNA 転写因子 EFG1 を活性化し、菌糸形成を誘導していることを示した。

第3章では、RPMI-1640 培地を用いて *C. albicans* の菌糸誘導条件の単純化を行った。プロリンは 0.02 mM 以上を単独で水に添加することにより菌糸誘導を引き起こせる成分であることを明らかとした。これにより、単純化した *C. albicans* の菌糸誘導条件を確立することができた。

第4章では、菌糸形成阻害剤の探索を行った。プロリンアナログ等をスクリーニングし、AZC、T4C 及び mPro が効果的な菌糸形成阻害剤として特定することができた。これらの化合物は、同じプロリンアナログでありながら阻害する標的、及び阻害効果が異なっていた。さらに、菌糸誘導条件を単純化できたことにより、血清による主な菌糸誘導因子はプロリンと GlcNAc であることを特定することができた。AZC、又は T4C と mPro の併用により、高濃度の血清でも *C. albicans* の菌糸形成を阻害することができ、これらの化合物は酵母形での細胞増殖に影響を与えないことを明らかにした。これらのことから、AZC、又は T4C と mPro の併用は、低い増殖抑制圧であることが考えられるため、薬剤耐性菌の出現を抑えた新たな治療薬の開発につながると考えられる。

本研究の第3章と4章では、細胞内シグナル伝達系の解明から形態変化メカニズムの解析を行う従来のアプローチではなく、菌糸誘導の単純化による *C. albicans* の菌糸誘導因子の特定と菌糸形成阻害剤の探索を行う手法により研究を行った。このアプローチによって、本研究では血清による菌糸誘導の主因子がプロリンと GlcNAc であることを同定し、プロリンと GlcNAc の阻害が菌糸形成阻害を標的とする治療薬の開発につながることを見出した。以上より、本研究で採択した *C. albicans* の菌糸誘導条件の単純化によるアプローチは、*C. albicans* の形態変化の解明、並びに治療薬の開発に寄与できると考える。

## 参考文献

- [1] Shao LC, Sheng CQ, Zhang WN: “Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds” Yao Xue Xue Bao, vol. 42, no. 11, pp. 1129-1136, 2007.
- [2] Yamazaki T., Kume H., Murase S., Yamashita E., Arisawa M.: “Epidemiology of Visceral Mycoses: Analysis of Data in Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan” J. Clin. Microbiol., vol. 37, no. 6, pp. 1732-1738, 1999.
- [3] Yapar N.: “Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis” The. Cli. Risk Manag., vol. 10, pp. 95-105, 2014.
- [4] Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M., Seifert H., Wenzel R.P., Edmond M.B.: “Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.” Clin. infect. dis. Vol. 39, pp. 309-317, 2004.
- [5] Shelley S. Magill, et. al., : “Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections.” N. Engl. J. Med., vol. 370, no. 13, pp. 1198–1208, 2014.
- [6] Leonard A. M., Michael A., Emilio B., Donald E. C., Patricia F., Naomi P. O. Issam I. R., Bart J. A. R., Robert J. S., David K. W.: “Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America” Clin. Inf. Dis., vol. 49, pp. 1-45, 2009.
- [7] Paula W., Roberto K.: “Biofilm, City of Microbes.” J. Bacteriol. Vol., 182, no. 10, pp. 2675-2679, 2000.
- [8] Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A.: “Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance” J. Bacteriol., vol. 183, no. 18, pp. 5385-5394, 2001.
- [9] Feng Q., Eric S., Bing G., Gerald F.: “Ras Signaling Is Required for Serum-Induced Hyphal Differentiation in *Candida albicans*” J. Bacteriol., vol. 181, no. 20, pp. 6339–6346, 1999.
- [10] Ernst J. F.: “Transcription factors in *Candida albicans* – environmental control of morphogenesis,” Microbiology, vol. 146, no. 8, pp. 1763–1774, 2000.
- [11] Heilmann C. J., Sorgo A. G., Siliakus A. R. “Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile,” Microbiology, vol. 157, no. 8, pp. 2297–2307, 2011.
- [12] Dabrowa N., Taxer S. S., Howard D. H., “Germination of *Candida albicans* induced by proline,” Infection and Immunity, vol. 13, no. 3, pp. 830–835, 1976.
- [13] Dabrowa N. and Howard D. H., “Proline uptake in *Candida albicans*” Journal of General Microbiology, vol. 127, no. 2, pp. 391–397, 1981.
- [14] Land G. A., McDonald W. C., Stjernholm R. L., Friedman T. L., “Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis,”

- Infection and Immunity, vol. 11, no. 5, pp. 1014–1023, 1975.
- [15] Holmes A. R., Shepherd M. G., “Proline-induced germtube formation in *Candida albicans*: role of proline uptake and nitrogen metabolism,” *Journal of General Microbiology*, vol. 133, no. 11, pp. 3219–3228, 1987.
- [16] Silao F. G. S., Ward M., Ryman K., et al., “Mitochondrial proline catabolism activates Ras1/cAMP/PKA-induced filamentation in *Candida albicans*,” *PLoS Genetics*, vol. 15, no. 2, article e1007976, 2019.
- [17] Mattia E., Carruba G., Angioletta L., Cassone A., “Induction of germ tube formation by *N*-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response,” *J. Bacteriology*, vol. 152, no. 2, pp. 555–562, 1982.
- [18] Gopal P., Sullivan P. A., Shepherd M. G., “Enzymes of *N*-acetylglucosamine metabolism during germ-tube formation in *Candida albicans*,” *J. General Microbiol.*, vol. 128, no. 10, pp. 2319–2326, 1982.
- [19] Biswas S., Roy M., Datta A., “*N*-acetylglucosamine-inducible CaGAP1 encodes a general amino acid permease which co-ordinates external nitrogen source response and morphogenesis in *Candida albicans*” *Microbiology*, vol. 149, no. 9, pp. 2597–2608, 2003.
- [20] Cassola A., Parrot M., Silberstein S., Magee B. B., Passeron S., Giasson L., Passeron S., Giasson L., Cantorel M. L. : “*Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot*” *Cell*, vol. 3, no. 1, pp. 190-199, 2004.
- [21] Klengel T., Liang W. J., Chaloupka J., Ruoff C., Schröppel K., Naglik J. R., et. al., “Fungal adenylyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing with cAMP signaling and virulence.” *Curr. Biol.*, vol. 15, pp. 2021-2026, 2005.
- [22] Kohler J., Fink G. R.: “*Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development.” *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, vol. 93, pp. 13223-13228, 1996.
- [23] Leberer E., H Marcus D., Broadbent I. D., Clark K. L., Dignard D., Ziegelbauer K., Schmidt A., Gow N. A. R., Brown A. J. P., Thomas D. Y. “Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 93, pp. 13217-13222, 1996.
- [24] Alonso R. M., Roman M., Nombela C., Pla J. : “The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*” *Microbiology*, vol. 152, pp. 905–912, 2006.
- [25] Lo HJ, Köhler J. R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G. R., “Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent.” *Cell*, vol. 90, pp. 939-949, 1997.
- [26] Bockmühl D. P., Ernst J. F.: “A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*.” *Genetics*, vol. 157,

- pp. 1523-1530, 2001.
- [27] Chaffin W. L., “*Candida albicans* Cell Wall Proteins” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, pp. 495-544, (2008)
- [28] Liu Y., Filler S. G., “*Candida albicans* Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin” *Eukaryot. Cell.*, vol. 10, pp. 168-173, (2011)
- [29] Rocha C. R., Schröppel K., Harcus D., Marcil A., Dignard D., Taylor B. N., Thomas D. Y., Whiteway M., Leberer E.: “Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*.” *Mol. Biol. Cell.*, vol. 12, pp. 3631-3643, 2001.
- [30] Harcus D., Nantel A., Marcil A., Rigby T., Whiteway M.: “Transcription profiling of cyclic AMP signaling in *Candida albicans*.” *Mol. Biol. Cell.*, vol. 15, pp. 4490-4499, 2004.
- [31] Braun B. R., Kadosh D., Johnson A. D.: “NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction.” *EMBO J.*, vol. 20, no. 17, pp. 4753-4761, 2001.
- [32] Murad A. M., Leng P., Straffon M., Wishart J., Macaskill S., MacCallum D., et. al.: “NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*.” *EMBO J.*, vol. 20, no. 17, pp. 4742-4752, 2001.
- [33] Hwang C. S., Oh J. H., Huh W. K., Yim H. S., Kang S. O.: “Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*.” *Mol. Microbiol.*, vol. 47, no. 4, pp. 1029-1043, 2003.
- [34] Kadosh D., Johnson A. D.: “Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis.” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, pp. 2903-2912, 2005.
- [35] Doedt T., Krishnamurthy S., Bockmühl D. P., Tebarth B., Stempel C., Russell C. L., et. al. “APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*.” *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, pp. 3167-3180, 2004.
- [36] Davis D., Edwards J. E., Mitchell A. P., Ibrahim A. S.: “*Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions.” *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 10, pp. 5953-5959, 2000.
- [37] Davis D., Wilson R. B., Mitchell A. P., RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 971-978, 2000.
- [38] El Barkani A., Kurzai O., Fonzi W. A., Ramon A., Porta A., Frosch M., et. al.: “Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*.” *Mol. Cell. Biol.* vol. 20, no. 13, pp.4635-4647, 2000.
- [39] Alvarez F. J., Konopka J. B.: “Identification of an *N*-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in *Candida albicans*.” *Mol. Biol. Cell*, vol. 18, pp. 965-975, 2007.
- [40] Stichternoth C., Ernst J. F.: “Hypoxic adaptation by Efg1 regulates biofilm formation by *Candida*

- albicans*.” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 11, pp. 3663-3672, 2009.
- [41] Stichternoth C., Fraund A., Setiadi E., Giasson L., Vecchiarelli A., Ernst J. F.: “Sch9 kinase integrates hypoxia and CO<sub>2</sub> sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*.” *Eukaryot. Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 502-511, 2011.
- [42] Arana D. M., Nombela C., Alonso-Monge R., Pla J.: “The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidativestress response in the fungal pathogen *Candida albicans*.” *Microbiology*, vol. 151, pp. 1033-1049, 2005.
- [43] Fazly A., Jain C., Dehner A. C. et al.: “Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis, and pathogenesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, vol. 110, no. 33, pp. 13594–13599, 2013.
- [44] Pierce C. G., Chaturvedi A. K., Lazzell A. L., Powell A. T., Saville S. P., McHardy S. F., Lopez-Ribot J. L., “A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance” *npj Biofilms and Microbiomes*, vol. 1, pp. 1-8, 2015.
- [45] Odds F. C.: “*Candida* and candidosis, 2nd ed. Bailliere Tindall, London, England
- [46] Neelson K. H., Platt T., Hastings J. W.: “Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system.” *J. Bacteriol.*, vol. 104, pp. 313–322, 1970.
- [47] Hornby J. M., Jensen E. C., Lisek A. D., Tasto J. J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K. W.: “Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol” *App. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 7, pp. 2982-2992, 2001.
- [48] Ramage G., Saville S. P., Wickes B. L., López -Ribot J . L.: “Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule” *App. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 11, pp. 5459-5463, 2002.
- [49] Roy B. G., Datta A.: “A calmodulin inhibitor blocks morphogenesis in *Candida albicans*.” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 41, pp. 327-329, 1987.
- [50] Sabie F.T., Gadd G.M.: “Involvement of a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin interaction in the yeast-mycelial (Y-M) transition of *Candida albicans*” *Mycopathologia*, vol. 108, pp. 47-54, 1989.
- [51] Luisa M. G., Casanova M., Martinez J. P.: “Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA” *Arch Microbiol*, vol. 161, pp. 489-494, 1994.
- [52] Sharkey L. L., McNemar M. D., Saporito-Irwin S. M., Sypherd P. S., Fonzi W. A.: “HWP1 Functions in the Morphological Development of *Candida albicans* Downstream of EFG1, TUP1, and RBF1” *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 17, pp. 5273-5279, 1999.
- [53] Lorenz M. C., Pan X., Harashima T., Cardenas M. E., Xue Y., Hirsch J. P., Heitman J.: “The G Protein-Coupled Receptor Gpr1 Is a Nutrient Sensor That Regulates Pseudohyphal Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*” *Genetics*, vol. 154, pp. 609-622, 2000.

- [54] Zhu W., Gincherman Y., Docherty P., Spilling C. D., Becker D. F.: "Effects of proline analog binding on the spectroscopic and redox properties of PutA," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 408, no. 1, pp. 131–136, 2002.
- [55] Zhang M., White T. A., Schuermann J. P., Baban B. A., Becker D. F., Tanner J. J., "Structures of the *Escherichia coli* PutA proline dehydrogenase domain in complex with competitive inhibitors," *Biochemistry*, vol. 43, no. 39, pp. 12539-12548, 2004.
- [56] Krishnan N., Dickman M. B., Becker D. F.: "Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 44, no. 4, pp. 671–681, 2008.
- [57] Natarajan S. K., Zhu W., Liang X., et al.: "Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 53, no. 5, pp. 1181–1191, 2012.
- [58] Elthon T. E., Stewart C. R.: "Effects of the proline analog L-thiazolidine-4-carboxylic acid on proline metabolism," *Plant Physiology*, vol. 74, no. 2, pp. 213–218, 1984.
- [59] Magdaleno A., Ahn I. Y., Paes L. S., Silber A. M. : "Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*," *PLoS One*, vol. 4, no. 2, article e4534, 2009.
- [60] Scarpulla R. C., Soffer R. L.: "Membrane-bound proline dehydrogenase from *Escherichia coli*. solubilization, purification, and characterization," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 253, no. 17, pp. 5997–6001, 1978.
- [61] Kowaloff E. M., Phang J. M., Granger A. S., Downing S. J.: "Regulation of proline oxidase activity by lactate," *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, vol. 74, no. 12, pp. 5368–5371, 1977.
- [62] Sudbery P. E.: "Growth of *Candida albicans* hyphae," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 9, no. 10, pp. 737–748, 2011.
- [63] S. Naseem, A. Gunasekera, E. Araya, J. B. Konopka "N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Induction of Hyphal Morphogenesis and Transcriptional Responses in *Candida albicans* Are Not Dependent on Its Metabolism" *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 33, pp. 28671–28680, 2011.
- [64] Liang S., Sanchez-Espiridion B., Xie H., Ma J., Wu X., Liang D., "Determination of proline in human serum by a robust LC-MS/MS method: application to identification of human metabolites as candidate biomarkers for esophageal cancer early detection and risk stratification," *Biomedical Chromatography*, vol. 29, no. 4, pp. 570–577, 2015

## 謝辞

山口大学大学院創成科学研究科教授 赤田倫治先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに心より謝意を表します。また、本研究に対してご討論とご指導を賜りました同研究科教授 星田尚司先生に感謝の意を表します。