

Candida albicans の宿主生体内増殖機構の解析と新規抗菌物質の開発

渡部 俊彦

Analysis of the Growth System of *Candida albicans* in a Host and the Development of New Antifungal Material

Toshihiko WATANABE

Department of Microbiology, Tohoku Pharmaceutical University,
4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received March 19, 2003)

Hyphal cells of *Candida albicans* bind to human hemoglobin, but not yeast cells. The amount of hemoglobin receptor is significantly higher in hyphal cells than on yeast cells. Only the hyphal cells of *C. albicans* use hemoglobin as a source of iron. The culture supernatant of *C. albicans* promoted the disruption of human red blood cells (RBC). Hemolytic activity was detected in a sugar-rich fraction (about 200 kDa) purified by Sephacryl S-100 chromatography. As the hemolytic activity was adsorbed by concanavalin A (Con A)-Sepharose, the hemolytic factor might be a mannoprotein. The activity was inactivated by periodate oxidation, indicating that the sugar moiety of the mannoprotein plays an important role in hemolysis. The structure of the sugar moiety of the mannoprotein was identified as a cell wall mannan by ¹H-NMR analysis, and purified *C. albicans* mannan promoted the disruption of RBC. The binding of mannan to RBC was demonstrated by flow cytometric analysis and was inhibited by the addition of the band 3 protein inhibitor, 4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). The hemolysis caused by mannan is inhibited by DIDS, 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid, and Bis (sulfosuccinimidyl) suberate, but not by pyridoxal-5'-phosphate. A new platinum derivative of the form H [Pt (IV) (Hdigly)Cl₂(OH)₂] (Hdigly=glycylglycine) has candidacidal activity 10-fold lower than that of cisplatin.

Key words—*Candida albicans*; hemoglobin; band 3 protein

1. はじめに

C. albicans は病原性真菌の一種で、日和見感染原因菌として知られている。¹⁾ *C. albicans* は血清やビオチンなどの存在下で酵母形から菌糸形に形態を変化させる特徴を持ち、菌糸形 *C. albicans* は、酵母形と比較してより強い病原性を示す。²⁻⁴⁾

C. albicans には、二形性、^{5,6)} タンパク質分解酵素産生、^{7,8)} 脂質分解酵素産生^{9,10)} などの特徴が知られており、これらの因子は生体組織への侵襲及び傷害に関与していると考えられている。しかし、生体内に侵入した *C. albicans* の生体内増殖機構については詳細な解析が行われておらず、特に、増殖必須因子である鉄の獲得機構に関しては不明な点が多い。

鉄は細胞増殖必須因子の1つで、¹¹⁾ DNA合成、

タンパク質発現などに関与しているが、¹²⁻¹⁴⁾ *C. albicans* の場合においても、鉄の補給は増殖に不可欠である。^{15,16)} 血清中の鉄の大部分は、ホロ型トランスフェリンとして存在しているが、^{17,18)} *C. albicans* はトランスフェリンに結合した鉄を利用する能力が欠けており、生体内増殖のための鉄源としては利用できない。

最近、*C. albicans* がヘモグロビンを鉄源として利用できることが確認され、¹⁹⁾ 赤血球成分であるヘモグロビンが生体内増殖のための鉄源として利用されている可能性が示唆された。

本稿では、*C. albicans* が鉄源として利用可能なヘモグロビンを得るための赤血球破壊機構とヘモグロビン取り込み機構の解析を行った。また、*C. albicans* に対する新規抗菌活性物質の開発を行ったので、その効果についても報告する。

2. *C. albicans* の宿主生体内増殖機構の解析

2-1. ヒトヘモグロビンの *C. albicans* に対する

東北薬科大学微生物学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

*本総説は、平成14年度日本薬学会東北支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

親和性 *C. albicans* NIH A-207 株が、ヘモグロビンに対して親和性を示すか否かを検討した。ヒトヘモグロビンでコートした試験管内壁に対する *C. albicans* の付着性を測定したところ、*C. albicans* 菌糸形菌体は試験管内壁に強固に付着していたが、酵母形菌体では、試験管内壁への菌体付着量が菌糸形の 1/4 まで低下していた。*C. albicans* のヒトヘモグロビンに対するレセプター発現量が酵母形と菌糸形で異なっている可能性のあることから、FITC 標識ヘモグロビンを用いて、菌体表面のヘモグロビンレセプター発現量の比較を行った。*C. albicans* 酵母形菌体を RPMI1640 培地中で 4 時間培養することで得られた菌糸形菌体をホルマリン（最終濃度 1%）で処理した後、FITC-ヘモグロビンを用いて標識した。FACScan (Becton Dickinson) を用いて菌体あたりの蛍光強度を測定したところ、菌糸形菌体の蛍光強度は酵母形菌体の蛍光強度に比べ、有意に増強しており、菌糸形菌体表面のヘモグロビンレセプター発現量が酵母形に比べて増加していることが明らかになった。また、この結合が過剰量の未標識ヘモグロビンにより阻害されることから、このレセプターがヘモグロビンに特異的に反応することも明らかになった。

2-2. *C. albicans* のヘモグロビン利用能 *C. albicans* のヘモグロビン親和性が、菌糸形への形態

変化により増強されることから、ヘモグロビンを鉄源として利用する能力にも違いがあるのか検討を行った。

C. albicans はホロ型トランスフェリン（鉄結合型）を鉄源として利用できないことから、培地中の鉄分をアポ型トランスフェリン（非鉄結合型）を加えることで吸収し、*C. albicans* にとっての鉄欠乏状態を作製した。この培養系に鉄源としてヒトヘモグロビン溶液を加え培養後、生菌数の差を Alamar blue 法を用いて測定した。アポ型トランスフェリンの添加により *C. albicans* の増殖は著しく抑制されたが、この抑制状態は菌糸形菌体の場合、ヘモグロビンを添加することにより濃度依存的に回復した (Fig. 1A)。この結果から、*C. albicans* 菌糸形菌体はヘモグロビンを鉄源として利用し、増殖できることが明らかになった。一方、酵母形菌体の場合、アポ型トランスフェリンによる増殖抑制状態がヘモグロビン添加でも回復しておらず、酵母形では、ヘモグロビンを鉄源として取り込めないことが明らかになった (Fig. 1B)。

2-3. *C. albicans* 培養上清の溶血活性 *C. albicans* は、赤血球を破壊することによりヘモグロビンの放出を促進させるか否かについて検討を行った。*C. albicans* の培養上清とヒト赤血球を混和・培養し、培地中に放出されるヘモグロビン量を測定

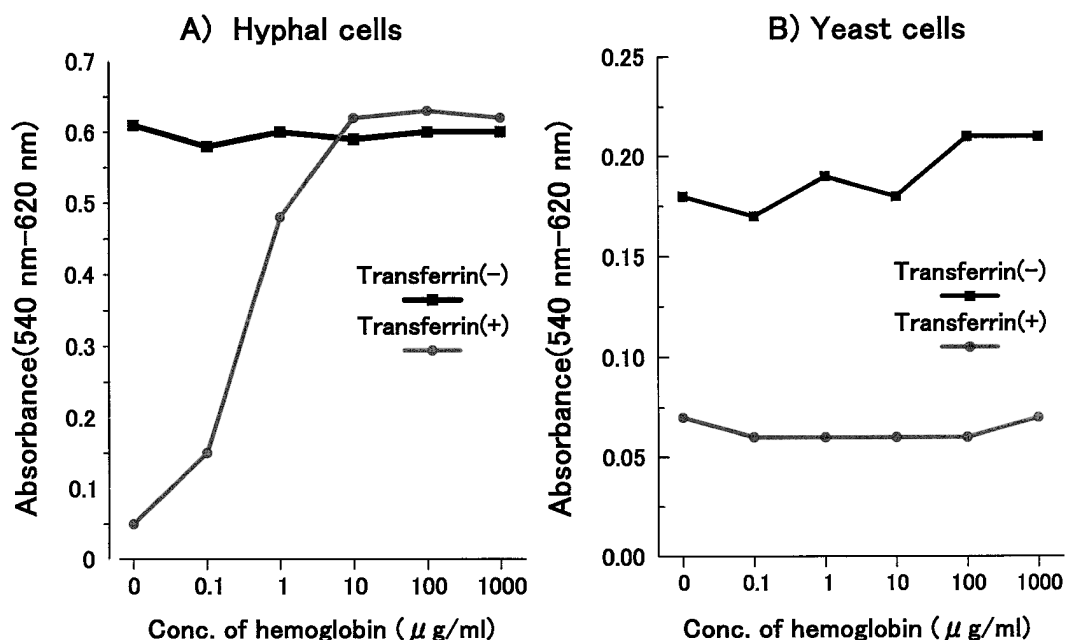


Fig. 1. Restoration of Transferrin-Inhibited *Candida* Growth by Hemoglobin

し、溶血率に換算した。*C. albicans* の溶血因子の放出は、培養開始 2 日目から確認され、その溶血活性は $27.8\%/3 \times 10^7$ *Candida* cells であった。この溶血活性は、加熱処理 (100°C, 10 分間) や Pepstatin A の添加などで阻害されないことから、この溶血現象が、菌体の産生するタンパク質分解酵素に因るものではないと予想した。

2-4. *C. albicans* の産生する溶血因子の解析
C. albicans 培養上清の濃縮液を Hiprep[®] 16/60 Sephacryl[®] S-100 カラムを用いてゲルろ過を行い、200 kDa 付近の糖を豊富に含む高分子画分から溶血活性 (糖 50 μ g あたりの溶血率 39%) が検出された。この多糖体画分は、抗原因子 1 抗体に反応しており、この画分にマンナンが含まれていることが証明された。溶血活性を示す多糖体画分を Con A-Sepharose で処理し、マンノプロテインを吸収、除去したところ、糖濃度は約 90% 減少し、溶血活性もまた 90% 減少した。この結果から、多糖体画分に含まれるマンノプロテインが溶血を促進させていることが明らかになった。

また、このマンノプロテインを過ヨウ素酸処理することにより、溶血活性が消失することから、糖鎖部分 (マンナン) が溶血に関与する可能性が示唆された。溶血活性を示すマンノプロテインの糖鎖構造を ¹H-NMR 法により解析した (¹H-NMR スペクトルの帰属は、Shibata ら²⁰⁾ の報告を参照して行った) と、*C. albicans* 細胞壁マンナンの 1,2- β -結合側鎖構造で認められる 4.84, 4.85 ppm のピーク及び α -結合側鎖を示す 5.38, 5.27, 5.14, 5.03,

4.91 ppm のピークが検出され、細胞壁より抽出されるマンナンと構造的に類似していることが明らかになった。

そこで、*C. albicans* 細胞壁より精製したマンナンの溶血活性を確認した。マンナンの精製は、Suzuki らの方法²¹⁾ に従って行い、DEAE-Sephadex による分画では、0.05 M NaCl 溶出画分の酸性マンナン (糖含量 95%, タンパク質含量 5% 以下) を実験に使用した。また、溶血がマンナン添加による浸透圧の変化に依存するものでないことを証明する目的で、デキストラン及びマンノースを陰性コントロールとして使用した。その結果、溶血はマンナン濃度に依存して促進されたが、デキストラン及びマンノースの添加では溶血は認められなかった。

2-5. マンナンの赤血球結合性 マンナンによる溶血が浸透圧の変化によるものでないことから、マンナンが赤血球へ直接結合し、溶血を誘発すると予想された。ここでは、マンナンと赤血球との結合を FACSscan を用いて確認した。Figure 2 で示したように、マンナン処理赤血球への抗原因子 1 抗体の結合量は、マンナン未処理群と比較して著しく増加しており、マンナンが赤血球表面に結合していることが確認された。赤血球膜に存在する Band 3 は、溶血に関与することが知られていることから、²²⁾ Band 3 阻害剤 (DIDS: 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) を使用し、マンナンと赤血球との結合阻害実験を行った。その結果、DIDS 処理した赤血球へのマンナン結合量が著しく減少しており、マンナンが Band 3 を介して赤血球

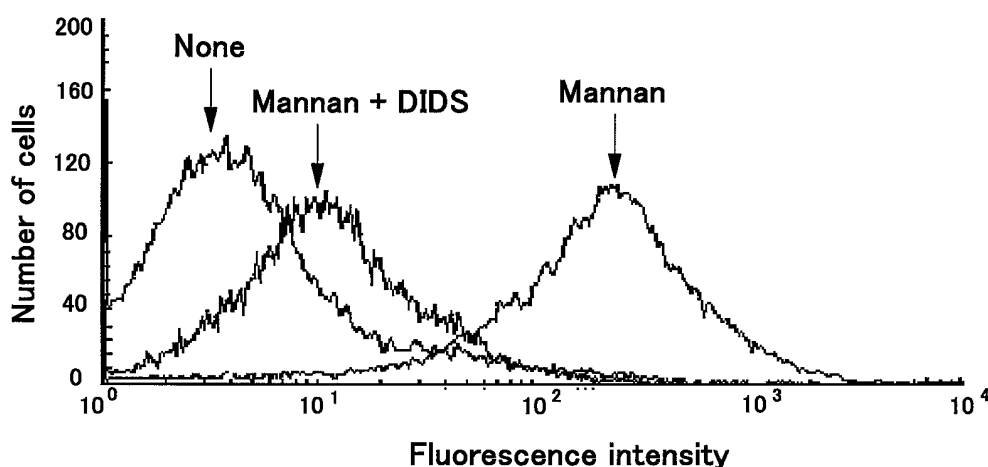


Fig. 2. Measurement of Mannan-Binding to RBC by FACSscan

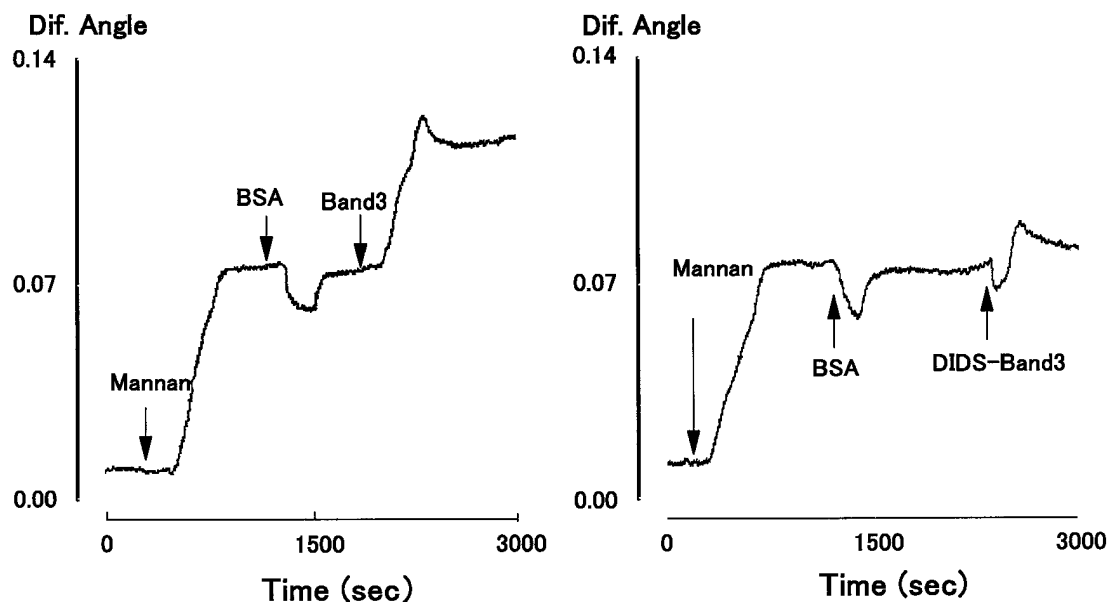


Fig. 3. Measurement of Mannan-Binding to Band 3 Protein by the Surface Plasmon Resonance Apparatus

に結合していると推察された。

マンナンと Band 3 の結合を, SPR670 (日本レーザー&エレクトロニクス) を用いて確認した。

Figure 3 で示したように, マンナンの添加後 Dif. angle の値が上昇しており, センサーチップにマンナンが結合したことが確認された。BSA によるブロッキング後, Band 3 を挿入することで Dif. angle の値が上昇したことから, マンナンに Band 3 が結合したことが証明された。また, この結合は DIDS により阻害されており, Fig. 2 の結果とも一致した。

そこで, マンナンの溶血が DIDS で阻害できるか否かについて検討を行った。Table 1 で示したように, マンナンによる溶血は DIDS 処理により完全に抑制された。スチルベン化合物 (DIDS, SITS : 4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) 及び BS³ (Bis-(sulfosuccinimidyl) suberate) は, Band 3 の 539 番目及び 542 番目の Lys 残基に結合することが知られている。²²⁾ SITS, BS³ を用いて実験を行ったところ, DIDS と同様にマンナンによる溶血が著しく抑制された。PLP (Pyridoxal-5'-phosphate) も, また Band 3 親和性物質として知られ, Band 3 の 851 番目の Lys 残基に結合することが知られている。²³⁾ しかし, PLP の添加ではマンナンによる溶血を抑制することはできなかった。

Table 1. Effects of Anion Transport Inhibitors on Hemolytic Activity of Mannan

Inhibition	Concentration (mM)	Inhibition (%)
DIDS	0.10	86.0±2.2
SITS	0.50	91.8±1.0
BS ³	4.00	78.5±0.6
PLP	0.25	0.4±0.1

3. 新規抗菌物質の開発

細菌に対して有効な抗生物質は, 数多く開発されているのに比べ, 抗真菌剤の開発に関する研究は遅れており, 臨床に应用されている抗真菌剤の種類は少ないのが現状である。そこで, 工学院大学共通科学教室と共同研究を行い, 白金を分子内に保有した抗真菌性白金誘導体の開発を行った。新規白金化合物 (H [Pt (IV) (Hdigly) Cl₂ (OH)₂]) (Hdigly = glycylglycine) の抗カンジダ活性を, *C. albicans* 12 株を使用して検討した。H [Pt (IV) (Hdigly) Cl₂ (OH)₂] は, 使用した *C. albicans* 12 株すべての増殖を抑制し, その MIC の平均値は 0.077±0.003 mM であった。また, H [Pt (IV) (Hdigly) Cl₂ (OH)₂] の動物細胞に対する細胞傷害活性は, *C. albicans* に対する作用に比べて低く, 感染宿主細胞に対する傷害活性を低いレベルで抑えることに成功した。

4. 考 察

C. albicans の菌糸形への形態変化が病原性に関係することは、これまでもいくつかの報告がなされている。²⁴⁻²⁶ 酵母形から菌糸形への形態の変化は、生体内の環境に適応するための変化と考えられるが、その詳細については明らかとされていなかった。本稿では、*C. albicans* 形態変化がヘモグロビンを鉄源として利用する能力に深く関与することを見出し、この解析を行った。

はじめに、*C. albicans* の形態変化により、ヘモグロビン親和性が変化するか検討を行った。親和性は、ヘモグロビンでコートした試験管に対する酵母形及び菌糸形菌体の付着性を比較することで測定した。菌糸形菌体のヘモグロビン処理試験管への吸着量は、酵母形菌体と比べて著しく増加しており、菌糸形菌体がヘモグロビンと強く結合することが明らかになった。また、FITC-ヘモグロビンで各種菌体を標識し菌体表面のヘモグロビンレセプター量を測定したところ、菌糸形菌体表面のヘモグロビンレセプター発現量が酵母形に比べて有意に増加しており、ヘモグロビンレセプターの発現量の増加が、ヘモグロビン親和性の増加の要因と考えられた。このヘモグロビン親和性の差は、ヘモグロビン利用能にも影響を与えていることが予想されることから、ヘモグロビンを鉄源として利用する能力について解析を行った。アポ型トランスフェリンを用いて調製した鉄欠乏状態に、鉄源としてヘモグロビンを加え、菌の増殖状態から鉄源としての働きを検討した。アポ型トランスフェリンを含む培地中では、菌糸形菌体の増殖は著しく抑制されたが、ヘモグロビンの添加により増殖の回復が認められた (Fig. 1)。一方、酵母形菌体では、ヘモグロビンを加えても菌の増殖抑制状態は回復しなかった。この結果から、*C. albicans* は菌糸形への形態変化に伴い、ヘモグロビン利用能力を発現することが示唆された。また、*C. albicans* は菌体外に溶血因子を放出し、ヘモグロビン獲得効率を高めていることも明らかになった。これまでも *C. albicans* による溶血反応は報告されているが、²⁷ 補体でコートした赤血球と *C. albicans* 菌体表面の補体活性化因子との相互作用によるものであり、生体内で起こる現象を証明するものではなかった。しかし、本稿において示したように、*C. albicans* 培養上清中から溶血因子が検出されたこと

から、*C. albicans* には溶血により放出されるヘモグロビンを鉄源として利用する鉄獲得機構の存在することが明らかになった。そこで、*C. albicans* の培養上清中に放出される溶血因子の同定と溶血機構の解析を行った。

C. albicans は菌体外にタンパク質分解酵素 (Aspartyl proteinase) を放出することが知られており、^{7,8)} 溶血現象にタンパク質分解酵素の関与する可能性が推察された。しかし、Aspartyl proteinase 阻害剤 (Pepstatin A) の添加及び培養上清の加熱処理 (100°C, 10 分間) では、溶血活性を抑制することができないことから、溶血因子は、タンパク質分解酵素以外の物質であると考えられた。培養上清に含まれる成分をゲルろ過により精製したところ、分子量約 200 KDa の多糖体画分から溶血活性が検出された。この画分は抗原因子 1 抗体に対し反応性を示すことから、マンナンを含んでいることが明らかになった。この画分の多糖体の大部分は、Con A-Sepharose により吸収され、Con A-Sepharose に吸着しない画分からは、溶血活性は検出されなかった。これらの結果から、溶血活性を示す多糖体画分の主要成分はマンノプロテインであり、これが溶血の要因であることが示唆された。マンノプロテインの溶血活性は、過ヨウ素酸処理により著しく低下することから、溶血反応にはマンナンが関与する可能性が示唆された。溶血性マンノプロテインの糖鎖構造を ¹H-NMR 解析したところ、*C. albicans* 細胞壁マンナンと類似したピークを示しており、構造的に両者は極めて類似していることが明らかになった。多糖体が溶血に関与することを証明する目的で、細胞壁マンナンをサンプルとして使用し、溶血活性の測定を行った。マンナンの添加により溶血が促進されており、マンナンが溶血に関与することが明らかになった。マンナン添加による溶血が浸透圧変化によるものと考えられたが、デキストランやマンノースの添加では溶血が促進されないことから、この可能性は否定された。赤血球表面へのマンナンの結合は、FACScan 解析により証明されたが、この結合は DIDS (Band 3 阻害剤) により著しく阻害されており、マンナンが赤血球膜に存在する陰イオン輸送タンパク質の一種である Band 3 を介して赤血球に結合する可能性が示唆された (Fig. 2)。Band 3 とマンナンとの結合は、表面プラズモン共鳴装置を

用いた測定で確認を行い、その結合性及び DIDS による結合阻害を証明した (Fig. 3). DIDS がマンナン-赤血球結合を阻害することから、マンナンによる溶血もまた DIDS で阻害できるものと考え、検討を行った。この実験では、Band 3 上のマンナン結合部位を推定する目的で、Band 3 への結合部位が異なる複数の Band 3 阻害剤を使用した。スチルベン化合物 (DIDS, SITS) 及び BS³ は、赤血球表面の Band 3 の 539 及び 542 番目の Lys 残基に特異的に結合し、PLP は 851 番目の Lys 残基に結合することが知られている。^{22,23)} Table 1 で示したように、スチルベン化合物 (DIDS, SITS) 及び BS³ は、マンナンによる溶血を著しく抑制したが、PLP では溶血を阻害できなかった。この結果から、マンナンと Band 3 との結合には、539 及び 542 番目の Lys 残基が関与すると推察された。

マンナンによる溶血機構は明らかにできなかったが、Band 3 は陰イオン輸送以外にも細胞膜の安定化への関与が報告されていることから、²²⁾ マンナンの Band 3 への結合が、膜の不安定化を引き起こし、溶血を促進させるものと考えられる。

生体内に侵入した *C. albicans* に対する抗生物質の種類は限られており、細菌に対する抗生物質に比べてその数、種類共に少ないのが現状である。本稿では、工学院大学共通科学教室と共同研究を行い、白金を分子内に保有した抗真菌性白金誘導体の開発を行った。新規白金化合物 (H[Pt(IV)(Hdigly)Cl₂(OH)₂]) には強い抗カンジダ活性が認められ、動物細胞に対する細胞傷害活性は、*C. albicans* に対する作用に比べて低く、感染宿主細胞に対する傷害活性を低いレベルで抑えることに成功した。今回の実験結果から、白金へのペプチドの導入は、ほ乳細胞への傷害性を低下させ、真菌に対する傷害性を増強させることが明らかになった。

謝辞 本研究の遂行にあたり、終始懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました東北薬科大学微生物学教室・松本達二教授、東北薬科大学名誉教授・鈴木益子先生、並びに工学院大学共通化学教室・渡部正利教授に深く感謝申し上げます。本稿で紹介させて頂いた研究は、研究室の方々との共同研究によるものであり、皆様の御協力に対してこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

REFERENCES

- Orejas R. D., Molero G., Garcia F. N., Pla J., Nombela C., Perez M. S., *Infect. Immun.*, **65**, 833-837 (1997).
- Casanova M., Lopez-Ribot J. L., Martinez J. P., Sentandreu R., *Infect. Immun.*, **60**, 4898-4906 (1992).
- Sherwood J., Gow N. A. R., Gooday G. W., Gregory D. W., Marshall D., *J. Med. Vet. Mycol.*, **30**, 461-469 (1992).
- Cutler J. E., *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 187-218 (1991).
- Gow N. A. R., Robbins P. W., Lester J. W., Brown A. J. P., Fonzi W. A., Chapman T., Kinsman O. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6216-6220 (1994).
- Swoboda R. K., Bertram G., Colthurst D. R., Tuite M. F., Gow N. A. R., Gooday G. W., Brown A. J. P., *Microbiology*, **140**, 2611-2616 (1994).
- Fallon K., Bausch K., Noonan J., Huguene E., Tamburini P., *Infect. Immun.*, **65**, 551-556 (1997).
- Colina A., Aumont F., Deslauriers N., Belhumeur P., Pepentigny L., *Infect. Immun.*, **64**, 4514-4519 (1996).
- Ibrahim A. S., Mirbod F., Filler S. G., Banno Y., Cole G. T., Kitajima Y., Edwards J. E., Nozawa Y., Ghannoum M. A., *Infect. Immun.*, **63**, 1993-1998 (1995).
- Sakurai J., Ochi S., Tanaka H., *Infect. Immun.*, **61**, 3711-3718 (1993).
- Taetle R., Rhyner K., Castagnola J., To D., Mendelsohn J., *J. Clin. Invest.*, **75**, 1061-1067 (1985).
- Henderson B. R., Menotti E., Bonnard C., Kuhn L. C., *J. Biol. Chem.*, **269**, 17481-17489 (1994).
- Cerneus D. P., Strous G. J., Ende A., *J. Cell. Biol.*, **122**, 1223-1230 (1993).
- Roberts M. R., Han Y., Fienberg A., Hunihan L., Ruddle F. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6354-6358 (1994).
- Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M., *Biochem. Biophys. Acta*, **1121**, 130-132 (1992).

- 16) Boyd W. C., Behnke J., *Science*, **100**, 14–16 (1944).
- 17) Kubal G., Sadler P. J., Tucker A., *Eur. J. Biochem.*, **220**, 781–787 (1994).
- 18) Yamashita K., Ideo H., Ohkura T., Fukushima K., Yuasa I., Ohno K., Takeshita K., *J. Biol. Chem.*, **268**, 5783–5789 (1993).
- 19) Manns J. M., Mosser D. M., Buckley H. R., *Infect. Immun.*, **62**, 5154–5156 (1994).
- 20) Shibata N., Ikuta K., Imai T., Satoh Y., Satoh R., Suzuki A., Kojima C., Kobayashi H., Hisamichi K., Suzuki S., *J. Biol. Chem.*, **20**, 1113–1122 (1995).
- 21) Mikami T., Suzuki S., Schuerch C., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3933–3935 (1986).
- 22) Yamaguchi T., Matsumoto M., Kimoto E., *J. Biochem.*, **118**, 760–764 (1995).
- 23) Okubo K., Kang D., Hamasaki N., Jennings M. L., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1918–1926 (1994).
- 24) Casanova M., Lopez-Ribot J. L., Martinez J. P., Sentandreu R., *Infect. Immun.*, **60**, 4898–4906 (1992).
- 25) Sherwood J., Gow N. A. R., Gooday G. W., Gregory D. W., Marshall D., *J. Med. Vet. Mycol.*, **30**, 461–469 (1992).
- 26) Cutler J. E., *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 187–218 (1991).
- 27) Spötl L., Most J., Dierich M. P., *Infect. Immun.*, **62**, 1125–1127 (1994).