

# プリオン化による抗真菌剤耐性獲得機構の研究

理化学研究所 タンパク質構造疾患研究チーム

鈴木 元治郎

## 1. はじめに

### 諸言

このたびは貴財団の研究助成金を賜りましたこと、光栄に感じるとともに深く感謝いたします。また、応募から研究発表にいたるまで、各種手続き等を大変ご丁寧に対応していただいた事務局の方々に心より感謝いたします。アステラス病態代謝研究会の今後の益々の発展を祈念するとともに、貴財団からのご支援を忘れることなく、今後も疾患の解明や治療法の開発につながるような研究を行いたいと思います。このたびは本当にありがとうございました。

### 目的

真菌類の感染は医療においては様々な真菌症を引き起こし人々の生命を脅かし、農業においても深刻な農作物の収量の低下などを引き起こしている。真菌類の感染に対しては、抗真菌剤の利用が有効であるが、抗真菌剤に耐性を持つ耐性真菌の出現が大きな問題となっている。申請者は、真菌の一つである出芽酵母で、タンパク質の凝集を伴う構造変化（プリオン化）によって、抗真菌剤のターゲットとして知られているエルゴステロールの合成量が変化し、抗真菌剤に対する耐性を獲得することを発見した（Suzuki *et al.* Science, 2012）。そこで、本研究計画ではタンパク質のプリオン化により抗真菌剤耐性菌が出現する現象が、実験室株だけでなく野生株や病原性酵母でも起きているかを調べ、抗真菌剤耐性獲得機構へのプリオン化の関与とその普遍性を明らかにする。また、プリオン化を抑制することによって耐性菌の出現を抑圧することができるかを調べ、産業への応用の可能性を検討することを目的とする。

## 2. 方法

さまざまな出芽酵母株およびカンジダ酵母株における[MOD+]プリオン化株の単離

申請者らは出芽酵母の実験室株の一つである 74D-694 株において新規酵母プリオンである[MOD+]を同定した。[MOD+]は tRNA 修飾酵素である Mod5 タンパクが凝集しプリオン化したものであり、[MOD+]酵母ではエルゴステロールの合成量が増加し、その結果エルゴステロールをターゲットとする抗真菌剤に耐性となる。一方で、出芽酵母で多く同定されている酵母プリオンは、実験室株に特異的な現象であり、自然界に存在する野生株酵母では酵母プリオンはほとんど存在しないのではないかという報告もある(Nakayashiki *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005)。そこで、他の実験室株や野生株酵母においても[MOD+]酵母が存在するかを調べた。[MOD+]酵母は他の酵母プリオンと同様に Hsp104 シャペロンタンパク質の阻害剤であるグアニジンを含む培地で培養することによって非プリオン酵母へと変化する。そこで、酵母をグアニジンで処理する前と後で抗真菌剤への耐性を調べ、グアニジン処理によって耐性が低下するものを単離した。また、申請者らは抗真菌剤の存在下では[MOD+]酵母の出現頻度が上昇することを見出している。そこで、様々な酵母株を抗真菌剤の存在下で培養し、[MOD+]酵母の単離を試みた。病原性酵母として知られているカンジダ酵母でも同様の手法を用いて[MOD+]酵母の単離を試みた。単離された酵母において、Mod5 タンパク質の凝集を申請者が作成した抗 Mod5 抗体を用いて評価し、[MOD+]酵母の同定を試みた。

プリオン化と耐性菌出現との相関の解析

抗真菌剤への耐性獲得がゲノム変異を伴わないプリオンという現象によって引き起こされるということは、画期的な発見である。そこで、プリオン化の抑制によって耐性菌出現を抑圧できるかを検討した。プリオン化を抑圧するグアニジンを含んだ培地で酵母を培養し、抗真菌剤耐性菌の出現頻度が変化するかを検討する。出現した耐性菌が[MOD+]酵母であるかを上述の方法で調べた。また、抗真菌剤耐性になることが示唆されている酵母プリオンである[MOT3+]酵母が出現しているかも上述の方法で調べた。

### 3. 結果

実験室酵母株である74D-694株をフルコナゾールやケトコナゾールといって抗真菌剤存在下で培養し[MOD+]酵母の出現頻度を調べたところ、抗真菌剤非存在下や塩化ナトリウム存在下に比べて著しく[MOD+]プリオン化酵母の出現が誘導されることがわかった。そこで、広く使用されている実験室株であるBY4741株を同様に抗真菌剤化で培養し[MOD+]酵母の単離を試みたところ、グアニジン塩酸塩処理によって耐性が低下する[MOD+]酵母の候補株がいくつか単離された。これらの株でMod5が凝集体を作っているかを調べたところ、野生株と比べてMod5が凝集体を形成しているものが単離された。また、これらの候補株の表現型が優性であることも二倍体酵母の形成によって確認された。しかし、これらの[MOD+]酵母の候補株は表現型が比較的弱く、不安定であることが多く、表現型が強い、安定した[MOD+]酵母を単離するには至らなかった。

いくつかの実験室出芽酵母株、野生株酵母、ヒト患者より単離されたカンジダ酵母株において抗真菌剤耐性菌の出現をグアニジン存在下と非存在下で比較したところ、すべての株においてグアニジンの存在下では抗真菌剤耐性菌の出現は抑圧されることがわかった。抗真菌剤存在下で出芽酵母を培養し、[MOD+]酵母の原因となるMod5タンパク質、[MOT3+]酵母の原因となるMot3タンパク質、[PSI+]の原因となるSup35タンパク質の凝集状態を、抗Mod5抗体、抗His抗体、抗Sup35抗体を利用してそれぞれ調べたところ、抗真菌剤存在下ではMod5タンパク質とMot3タンパク質の凝集が増加していることがわかった。一方Sup35タンパク質については変化がみられなかった。

### 4. 考察

フルコナゾールやケトコナゾールなどの抗真菌剤の耐性がプリオン化によって獲得されるという現象の普遍性を検証した結果、実験室酵母だけでなく野生株酵母やカンジダ酵母においても同様の現象が存在することが示唆された。広く利用されている実験室酵母株であるBY4741株においても[MOD+]酵母は存在していることが強く示唆されている。今後、非メンデル遺伝であるかを調べるなどのさらなる解析を行うことによって[MOD+]酵母の存在を証明することが必要であると考えられる。

グアニジンによって抗真菌剤耐性菌の出現を抑圧することができたことは非常に大きな成果であると考えられる。特に病原性真菌であるカンジダ菌の抗真菌剤耐性菌の出現を抑圧することが明らかになったことは、今後の医療・産業への応用なども考えられ非常に有意義であると考えられる。また、この結果はカンジダ菌の抗真菌剤耐性菌も[MOD+]酵母や[MOT3+]酵母などのプリオン化が原因であることを示唆している。このことはカンジダ酵母にもプリオンが存在することを示唆しており証明ができれば大きな発見である。しかし、カンジダ菌と出芽酵母との間のゲノムの相同性はさほど高くなく、Mod5やMot3といったプリオン化の原因となっているタンパク質のアミノ酸配列の相同性もさほど高くはない。そのため抗Mod5抗体や抗His抗体も使用することができず、プリオン化したカンジダ菌の存在が証明することができていない。一方、あまり相同性の低いカンジダ菌のMod5やMot3が本当にプリオン化タンパク質としてふるまうことができる可能性があるというのは非常に興味深い点である。特にMod5はプリオン化に重要であるとされるグルタミン/アスパラギンに富む配列を持っておらず、どのような配列がプリオン化に必要であるかという点でも非常に興味深いと考えられる。また、出芽酵母以外でのプリオンが発見されれば、哺乳類プリオン病において大きな問題となっている種間障壁（スパーシズバリア）のモデルとなることも考えられる。

### 5. 発表論文

Expanding the yeast prion world: Active prion conversion of non-glutamine/asparagine-rich Mod5 for cell survival.

Suzuki G, Tanaka M. Prion. 2013 7(2):109-13

Active prion conversion as a molecular switch for cellular adaptation to environmental stress.

Suzuki G, Tanaka M. Bioessays. 2013 35(1):12-6

新規な酵母プリオンタンパク質Mod5の凝集が生存に有利に働くことを発見

鈴木元治郎・田中元雅 化学と生物 Vol151, No. 4, 2013年4月

参考文献

A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. Suzuki G, Shimazu N, Tanaka M. *Science*. 2012 336(6079):355-9

Yeast prions [URE3] and [PSI+] are diseases. Nakayashiki T, Kurtzman CP, Edskes HK, Wickner RB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 102(30):10575-80