研究成果報告書

1．研究課題名：生体防御機能を攪乱する糸状菌エフェクタ分子の機能解析

2．研究代表者氏名：宮澤 拳

3．研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

なし

4．研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

糸状菌 *Aspergillus fumigatus* はアスペルギルス症の主要な起因菌であり、免疫不全者に発症すると致命的な転帰となることが多い。植物病原真菌やヒト感染性の細菌では、分泌タンパク質（エフェクタ）を宿主に注入してその代謝を攪乱して感染を有利にする機構が知られる [1)]。一方、ヒト感染性の真菌においては、グリオトキシンなどの二次代謝産物が寄与することは知られている一方、宿主への感染成立に寄与するエフェクタは、2021 年にムーコル目真菌において初めて報告されたのみである [2)]。我々は、*A. fumigatus* の遺伝子破壊株のスクリーニングから、Cdf5a（Cell Death-inducing Factor 5a）の欠損株において、免疫不全マウスを用いた侵襲性肺アスペルギルス症モデルにおいて病原性が顕著に低下することを見出した**（図 1A）**。また、異種発現させた Cdf5a が肺胞上皮細胞（A549）の増殖を停止させる機能を有することを見出した**（図 1B）**。本研究では、*A. fumigatus* の病原性に対する Cdf5a の寄与の分子機構を明らかにすることを目的とした。

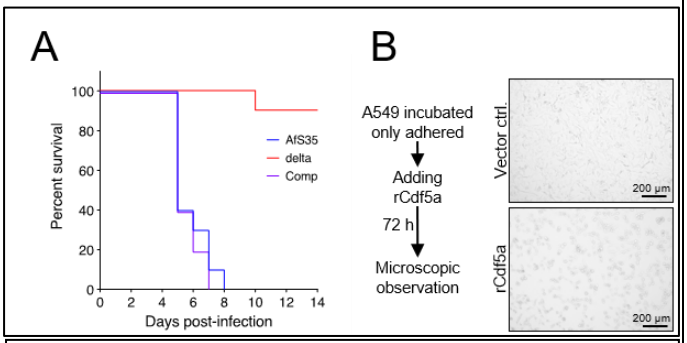


図 1．Cdf5a の機能：（A）感染時の生存率と（B）細胞増殖停止活性

まず、侵襲性肺アスペルギルス症モデルでの病態をさらに解析した。肺感染時の病理解析を行ったところ、Cdf5a 欠損株においては親株である AfS35 株に比べて肺内での菌糸生育が低下していることが明らかとなった**（図 2A）**。一方、Cdf5a 相補株では菌糸伸長が親株並みとなった**（図 2A）**。また、肺感染時の肺胞洗浄液中の乳酸脱水素酵素（LDH）量を定量し、細胞傷害を評価したところ、Cdf5a 欠損株において親株および相補株に比べて顕著に LDH 量が低下した**（図 2B）**。さらに、この LDH 産生量の要因を検証する目的で、感染時の肺内の細胞を解析した。その結果、Cdf5a 欠損株感染時には $CD45^-$細胞において $7\text{-}AAD^+$細胞が親株よりも低下した**（図 2C）**。$Apopxin^+$細胞には変化が見られなかった**（図 2C）**。また、$CD45^+$細胞においては $7\text{-}AAD^+$細胞および $Apopxin^+$細胞とも変化がなかった**（図 2C）**。すなわち、Cdf5a 欠損株においては非免疫系細胞の細胞死が抑制されており、これはアポトーシスには由来しないことが示唆された。

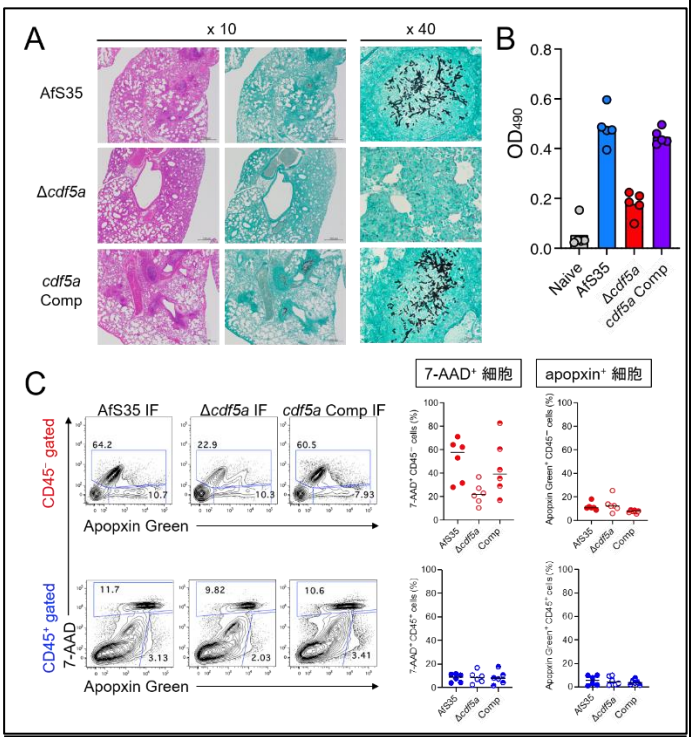


図 2．Cdf5a を介した病原性発現機構の解析

次に、*A. fumigatus* において Cdf5a-GFP 発現株を作製し、Cdf5a の局在を評価した。Cdf5a はシグナルペプチドを有することから、分泌型タンパク質であると想定される。Cdf5a-GFP 発現株を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、Cdf5a-GFP は菌糸の先端部や隔壁に局在した**（図 3A）**。また、菌糸が存在しない領域にも GFP 蛍光がドット状

に分布したことから**（図 3A）**、Cdf5a-GFP が細胞外にも分泌されることが示唆された。そこで、Cdf5a の細胞傷害の分子機構をさらに検証するため、*A. fumigatus* を用いた Cdf5a の発現精製を試みた。まず、AfS35 株で Cdf5a-6xHis 発現株を作製して培養上清を SDS-PAGE および Western blot 解析に供したが、上清中から Cdf5a-6xHis は検出されなかった**（図 3B）**。そこで、我々が独自に開発した細胞表層改変株 [3]を親株として Cdf5a-6xHis 発現株を作製して同様に評価した結果、上清中への Cdf5a-6xHis 分泌が確認された**（図 3B）**。この発現株を用いて Cdf5a-6xHis 発現が高い条件を検討し、富栄養培地である YPD 培地での培養時に顕著な分泌量となることを見出した**（図 3C）**。そこで、YPD 培地での培養上清を硫安分画ののち Ni レジンによるアフィニティ精製を行い、Cdf5a-6xHis を精製した。精製 Cdf5a-6xHis を SDS-PAGE に供したところ、目的である 25 kDa 付近にバンドが出現した**（図 3D）**。また、すでに取得している抗 Cdf5a モノクローナル抗体を用いて Western blot 解析に供した結果、同様の分子量にバンドが検出され**（図 3D）**、このバンドが Cdf5a 由来であることを確認した。現在、取得した精製 Cdf5a-6xHis を用いて細胞傷害活性を評価している。また、Cdf5a を介した細胞死の誘導機構について解析を進めている。

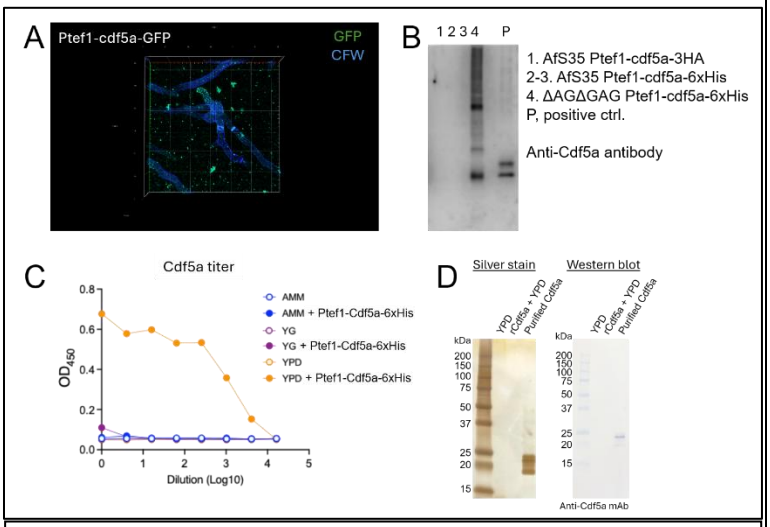


図 3. Cdf5a タンパク質の局在解析と発現精製

〈参考文献〉

1) de Wit et al., *Microbiol. Spectr.* (2016) 4: FUNK-0021-2016; 2) Soliman et al., *Nat. Microbiol.* (2021) 6:313-326; 3) Miyazawa et al., *Microbiol. Spectr.* (2022) 10:e00063-21