

9. 生物活性物質部

部長 宮崎 義継

概要

当部では難治性真菌感染症の制圧と感染症制御薬の創薬を目標として研究を推進している。難治性真菌症に関して、平成12年度よりカンジダ属を対象として薬剤耐性や病原因子制御に関する研究と、4類感染症であるコクシジオイデス症を含む輸入真菌症の疫学研究を行っているが、カンジダ症と並ぶ二大深在性真菌症のひとつであるアスペルギルス症の制御を目的とした研究を平成19年度から開始した。

第1室ではカンジダ属の薬剤耐性機構や病原因子、並びに輸入真菌症に関する研究を中心に行っている。第2室では微生物と宿主の細胞内シグナル伝達を応用した増殖制御に関する研究、並びに、新規抗微生物薬のスクリーニングと活性相関、第3室は真菌感染症のレファレンス業務とアスペルギルス症制御、並びに、感染症難治化の宿主因子に関する研究をそれぞれ展開している。第4室は、放線菌の遺伝情報と二次代謝産物を応用して新規感染制御薬の創薬研究を行っている。

平成19年度は以下の項目について研究が行われた。

I. 真菌感染症の病態解明と新しい診断・治療法開発のための研究.

II. 深在性真菌症と輸入真菌症に関する疫学と新しい検査法開発のための研究

III. 新しい活性評価系とスクリーニング及び生物活性物質の研究

IV. 微生物の有用遺伝子探索による創薬と薬剤耐性機構に関する研究

研究費としては、基盤的研究費、真菌感染症対策事業費のほかに厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業、難治性疾患対策事業）、ヒューマンサイエンス振興財団・政策創薬総合研究事業、文部科学省科学研究費補助金の支援を受けた。

今年度より、レファレンス業務を拡張し全国の病院、大学等の研究機関、報道機関からの真菌症および抗菌化学療法に関する問い合わせや検査依頼への随時対応を開始した。

宮崎は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の専門委員などの任をつとめた。

国際交流の一環として、新見室長は、ヒューマンサイエンス振興財団「外国の研究機関等への委託研究事業」（新興・再興感染症研究事業プログラム、主任 研究者：新見昌一）により、ニュージーランド、オタゴ大学分子微生物学研究室（RD Cannon主任教授）と「アスペルギルス症：真菌の薬剤耐性の克服」の共同研究を行い、同財団「外国人研究者招へい事業」によりオタゴ大学 Dr Mikhail Keniyaを招へいして「真菌の薬剤耐性を克服するための新規阻害物質の探索系の導入-真菌の細胞膜P-タイプATPaseに対する阻害剤の探索」に関する共同研究を行った。

人事異動では、平成19年4月1日付で宮崎義継が部長に着任し、9月1日付で金子幸弘第2室研究員が採用された。高野幸枝主任研究官が平成20年3月末日に定年退官した。

以下に本年度の主な調査・研究、レファレンス業務、品質管理業務の業績を記す。

業績 調査・研究

I. 真菌感染症の病態解明と新しい治療法開発のための基盤研究.

1. 病原真菌の新規分子の探索

(1) 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞膜ある

いは細胞外に存在する蛋白質の網羅的同定

アスペルギルス症の診断に応用されている標的分子は、細胞壁の β -D-グルカンとアスペルギルス・ガラクトマンナン抗原であるが、感度と特異性に問題があり、より特異的かつ感度の高いアスペルギルス属の検出系が求められている。そこで、新しい検出系の確立のために、新たな標的となる細胞壁あるいは分泌される真菌由来蛋白質をコードする遺伝子をシグナルシーケンストラップ法により同定した。75種類の細胞膜あるいは分泌されると推定される遺伝子を得ることができ、その中でこれまでに報告のあるものは12種類のみであった。今後、組換え体、抗体の作成等により診断応用性を検証するとともに、病原性についても検討する予定である。

[山越 智、大川原明子、橋本ゆき、石川 淳、宮崎義継]

(2) *Candida albicans* 細胞壁の表層のマンナンに関する研究 .

病原性真菌 *C. albicans* の最表層を構成する N 結合型糖鎖は共通のコア構造を持っているが、コア構造から伸びた末端構造部分の糖鎖は、株によってさまざまな構造をしている。*C. albicans* マンノース転移酵素をコードしていると考えられる遺伝子を網羅的に破壊し、変異株の mannoprotein (MP) を解析することにより、炎症惹起に關与する MP の構造について検討を行った。ゲノム情報から 46 種類のマンノース転移酵素が MP 分画に影響すると予想されたが、論文等で報告のないものから遺伝子破壊を行い、11 種類のマンノース転移酵素破壊株を作製し、増殖速度、菌糸形成など基本的な性質について検討を行った。また、それらの株から MP を精製し、抗体を用いて表面の抗原性を解析すると共に炎症の指標として単球系培養細胞 (J774A.1 cell line) による IL-6 と TNF- α の産生誘導能について基礎検討を行った。

[大川原明子、山越 智、臺 由紀、橋本 ゆき、宮崎

義継]

(3) *Candida albicans* の biofilm についての検討

Candida albicans は、日和見感染症の重要な原因微生物であり、抗菌薬無効の感染症として治療が困難である。また、近年 biofilm がその難治性と関連していることが知られるようになった。特に *in vitro* での検討では、アゾール系抗真菌薬は biofilm に対して無効である。また、amphotericinB や micafungin など、単剤では biofilm に対する MIC が、planktonic の状態と比較して 4-8 倍程度上昇する。そこで、biofilm 感染症に対する有効な治療方法について探索するため、現在 *in vitro* でのアッセイを検討している。

[金子幸弘、宮崎義継]

2 . 抗真菌薬に対する感受性と耐性に関する研究

(1) *Candida glabrata* の Calcineurin を介するストレス応答と薬剤耐性に関する研究 .

Calcineurin は病原真菌で広く保存されており、その阻害により病原性の低下やアゾール系抗真菌薬耐性化と関連することが知られている。今回、カンジダ属における Calcineurin pathway の解明の目的で Calcineurin 破壊株を作成し、抗真菌薬治療の有効性に影響する新たな pathway が存在することを示した。

[宮崎義継、金子幸弘、石川 淳；宮崎泰可、河野 茂（長崎大・感染免疫学講座）]

(2) 病原真菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討

ABC タンパク質は、ATP の加水分解エネルギーによって立体構造を変化させて、様々な生体異物を細胞外に排出する。病原真菌において ABC タンパク質は、アゾール系抗真菌薬を排出して真菌を薬剤耐性化するため、抗真菌薬による真菌症治療を困難にしている。本研究では、病原真菌 *Candida albicans* の ABC タンパク質 Cdr1p (CaCdr1p) とその阻害剤として働く FK506 との相互作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

CaCDR1 遺伝子上の FK506 非感受性化変異をこれまで

に 17 種類同定した。FK506 非感受性化変異をもつ *CaCDR1* 遺伝子を出芽酵母に発現させた株を作製し、薬剤感受性試験および阻害剤感受性試験を行った。ほぼすべての変異株は、fluconazole、rhodamine 6G、cycloheximide に対する耐性を保持していた。しかし、8 番目の膜貫通ヘリックスに N1240D 変異を有する株はローダミン 6G に対する耐性度が著しく低下し、1 番目の膜貫通ヘリックスに N535I 変異をもつ株は fluconazole に対する耐性度が特異的に低下した。この結果は、CaCdr1p における FK506 による阻害効果と CaCdr1p の薬剤輸送との間に相関があることを示唆している。さらに、変異株は構造の異なる阻害剤、enniatin B と beauvericin に対しては野生型 CaCdr1p 発現株と同程度の感受性を示したことから、本研究で同定した遺伝子変異は FK506 に対する感受性を特異的に低下させるものであると考えられた。

[田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、新見昌一]

(3) ステロールトランスポーターと抗真菌薬耐性

ステロール合成阻害剤であるアゾール系抗真菌薬は、深在性真菌症治療薬として優れた薬効を持つが、耐性化を引き起こすことが知られている。アゾール耐性株の多くは ATP-binding cassette (ABC) タンパク質による薬剤の細胞外排出能の亢進に起因する。一方で我々は、*Candida glabrata* の ABC タンパク質 CgAus1p が細胞外から代替ステロールを取り込んで、アゾール剤によるエルゴステロール合成阻害を回避することを明らかにした。血清や胆汁存在下では *C. glabrata* はアゾール剤に低感受性になる。しかし、*CgAUS1* が欠失すると真菌へのステロールの取り込みが低下し、アゾール剤に高感受性となった。宿主体内は比較的嫌気性であるため、酸素を必要とする真菌のステロール合成は抑制される。従って、*C. glabrata* の CgAus1p による代替ステロール供給メカニズムが宿主体内での病原真菌の増殖に関与していることが示唆された。

[田辺公一、臺 由紀、新見昌一]

(4) キメラタンパク質を用いた真菌 ABC タンパク質の基質認識メカニズムの解明

Candida albicans の ABC タンパク質、CaCdr1p と CaCdr2p のドメインを交換したキメラタンパク質を出芽酵母に発現させて、機能解析を行った。キメラタンパク質発現株の解析から、oligomycin や nigericin、monensin、bafilomycin A1 の基質認識部位が N 末端側の transmembrane domain (TMD1) に存在することを明らかにした。さらに、膜貫通ドメインをより狭い領域で交換したキメラタンパク質を出芽酵母に発現させて、機能解析を行った。その結果、TMD2 の中央部分(膜貫通ヘリックス 9 番から 11 番)が rhodamine 6G の基質認識にかかわることを明らかにした。しかしながら、発現させたキメラタンパク質の中には薬剤排出活性が大幅に低下したものが複数認められ、上記の基質認識にかかわる領域をさらに詳細に限定することはできなかった。この結果は、膜貫通ドメインの複数の領域が複雑に相互作用することで立体構造、基質認識部位が構成されていることを示唆している。

[田辺公一、臺 由紀、新見昌一]

(5) アスペルギルス属の膜輸送蛋白質と薬剤耐性

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の異種タンパク質発現系を用い、*Aspergillus fumigatus* の ATP binding cassette (ABC) 輸送体 *AfuMDR1*、*AfuMDR2*、*AfuMDR4* およびアゾール剤標的遺伝子 *AfuERG11A* と *AfuERG11B* をクローニングした。それぞれの耐性遺伝子発現株の抗真菌剤感受性を測定し、細胞膜画分における各タンパクの発現レベルを比較した。その結果、*AfuMdr1p* がアゾール耐性に最も寄与していると推測された。これら遺伝子の GFP 付加発現株を作製し、タンパクの局在を観察した。*AfuMdr1p*、*AfuMdr4p* は細胞膜に、*AfuMdr2p* はミトコンドリア膜に、またアゾール剤標的酵素 (*AfuErg11Ap*、*AfuErg11Bp*) は細胞内小胞体に局在することが証明された。

[田辺公一、新見昌一；Erwin Lamping、Richard D. Cannon（オタゴ大学）]

（6）*C. albicans*の脂肪酸不飽和化酵素の解析

脂肪酸は細胞膜の主たる構成要素である。大部分の真菌は脂肪酸不飽和化酵素を複数有し、多価不飽和脂肪酸を産生するが、*S. cerevisiae*等一部例外もある。*C. albicans*の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*CaFAD2*および*CaFAD3*）の機能を明らかにする目的で、破壊株の表現型と転写レベルでの変化を解析した。PI核染色を行うと、破壊株の蛍光強度は相補株の1/3であった。*CaFAD2*破壊株のアレイ解析では4倍以上の発現の差があった遺伝子が15、1.5倍以上の遺伝子が34あり、real-time PCRで確認した。転写因子*EFG1*など、13遺伝子の発現が低下していた。

[新見昌一；山口正視、川本進（千葉大・医真菌医学研究センター）；梶原 将（東工大院・生命理工）；村山琮明（北里大・北里生命科学研究所）]

II．深在性真菌症と輸入真菌症に関する疫学と新しい検査法開発のための研究

1．深在性真菌症の疫学ならびに臨床病態に関する研究．

（1）造血幹細胞移植患者における糸状菌感染症疫学研究．

侵襲性アスペルギルス症は造血幹細胞移植患者におけるもっとも頻度が高いと推定されるが、我が国では前向きな疫学研究のデータは無い。そこで、米CDCとデータの共同利用が可能なプロトコルを作成した。平成20年度より、前向き疫学研究を開始予定である。

[宮崎義継、金子幸弘；吉田 稔（帝京大・血液内科）、Park B（米CDC・真菌疫学部門）]

（2）抗菌薬による肝傷害とN-acetyltransferase 2 遺伝子．

抗菌薬投与による肝機能傷害の出現頻度と、患者の遺

伝子多型に関して解析したところ、

N-acetyltransferase 2 遺伝子との優位な相関が認められた。

[宮崎義継；塚元和弘（長崎大・臨床薬学講座）]

（3）副腎皮質ステロイド剤とクリプトコックス症．

副腎皮質ステロイド剤投与中に出現した肺病変に対して気管支鏡を試行した際に気管粘膜の白斑を認め、クリプトコックスによる気管支病変を証明した。クリプトコックスの粘膜病変は希であり、その発症因子について解析を行っている。

[宮崎義継；井上祐一（健康保険諫早病院）、泉川公一、河野 茂（長崎大）]

2．感染症における免疫制御分子の研究

（1）*Candida albicans* 感染に対する生体防御におけるLECT2の機能

昨年度に引き続きLECT2 遺伝子欠損マウスにおける感受性を調べた。尾静脈からの*C. albicans*の接種により感染させ、野生型との生存率を比べたところ*C. albicans*感染に抵抗性を持つこと示唆され、LECT2が*C. albicans*感染防御に関与することが考えられた。

[金子幸弘、山越 智、宮崎義継]

(2) Staphylococcal enterotoxin Aにより誘導されたエンテロトキシンショックにおけるLECT2の役割の解析

サイトカインLECT2 遺伝子欠損マウスを使い、staphylococcal enterotoxin Aによりエンテロトキシンショックを惹起した。その結果、LECT2の抑制効果を示唆する結果が得られた。

[山越 智；加藤秀人、Dang Hung MINH、八木淳二（東京女子医大）]

(3)造血におけるLECT2の役割の解析

造血機能におけるLECT2の作用を調べるために、

LECT2 遺伝子欠損マウスの骨髄、肝臓、脾臓での造血幹細胞の指標とされるSP細胞についてフローサイトメーターにより存在量について調べた。また、ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞を用いたin vitro培養系にてLECT2の作用を検討した。

[山越 智、岡部智也、奥村彰典；水上拓郎、倉光 球、浜口 功（血液・安全性研究部）]

3. 深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、並びに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

(1) 輸入真菌症の国内発生状況については、ヒストプラズマ症が増加傾向にあった。潜在的ヒストプラズマ症患者を検索する目的で肺線維症（3例）の抗ヒストプラズマ抗体検査を行ったが、陽性症例はなかった。ヒストプラズマ症血清診断法の開発については抗原抽出法を確立し、新規抗原候補タンパク質の検索を行った。

(2) LAMP法を用いたニューモシスチス症遺伝子診断法および主要マラセチア症起因菌の表現形質による同定法を開発し、臨床の有用性が示唆された。

(3) 真菌症の病理診断において、PCR法に加えて形態診断の補助診断法であるISH法を併用すると、診断精度が向上することが示唆された。

(4) 臨床応用可能なマルネッフィー型ペニシリウム症起因菌の非培養系定量検出法を開発し、また新規抗真菌薬の開発を目指し子嚢菌および担子菌の両方に抗真菌活性を有する海生菌由来のエキスを見出した。

(5) 臨床背景の明らかな1200臨床分離株をデータベース化した。*Candida*属の遺伝的多様性をしらべ、新菌種の可能性が示唆される菌株も見出された。本データベースは疫学的解析などに有用であると考えられる。

(6) 海洋微生物由来の化合物および培養液をスクリーニングし、その中から真菌の薬剤耐性に関わるABCトランスポーターを阻害する新規物質unnarmicin

Aおよびunnarmicin Cを見出した。

(7) 炎症惹起に關与する*C. albicans*のmannoproteinを解析するためマンノース転移酵素遺伝子の破壊株作製に着手した。11種類のマンノース転移酵素破壊株を作製し、基礎検討を行った。

(8) 患者側の真菌症に対する認知度の調査および情報入手経路の調査を行った。その結果、認知度が低いことが分かり、医学雑誌などのメディアを用いることが認知度向上のために有効であると思われた。

[新見昌一、大川原明子、宮崎義継；亀井克彦（千葉大学真菌医学研究センター）、菊池 賢（順天堂大学医学部・感染制御科学）、槇村浩一（帝京大学医真菌研究センター）、渋谷 和俊（東邦大学医学部・病院病理学研究室）、上 昌広（東京大学医科学研究所）、杉田 隆（明治薬科大学・微生物学教室）、上原至雅（岩手医科大学薬学部・微生物薬品創薬学講座）]

III. 新しい活性評価系とスクリーニング及び生物活性物質の研究

1. 宿主および病原微生物の細胞内シグナル伝達制御に関する研究

(1) プロテインキナーゼ阻害物質の検定

文部科学省がん特定領域研究・統合がん「化学療法基盤情報支援班」においてプロテインキナーゼ阻害剤の評価を担当している。今年度は167検体の評価を行った。また平成20年度より評価系を変更することになり、新たに血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor, PDGF) 刺激により活性化されるPDGFレセプターチロシンキナーゼおよび主要な細胞内シグナル伝達経路(PI3 kinase-AKT pathway, classical MAP kinase pathway, PLC-PKC pathway) に対する阻害効果を評価する系を作成した。

[福山まり、矢守隆夫（癌研）、深澤秀輔]

2. 新規抗HCVウイルス薬の探索と作用機序に関する研究

生物活性物質部

(1) ビスインドリルマレイミドによるC型肝炎ウイルス(HCV)の阻害作用の解析

培養細胞のHCV(JFH1)感染系を用いたスクリーニングにより見いだした既知化合物のうち、未だ報告のないビスインドリルマレイミド I (BIM I) のHCVの阻害作用について検討を加えた。BIM I は IC_{50} 0.1 $\mu\text{g/ml}$ および TC_{50} 30 $\mu\text{g/ml}$ で dose-dependent に培養液中および細胞内のHCV RNA、core 蛋白質を阻害した。また、遺伝子型 2a および 1b のHCVレプリコン細胞のNS5A蛋白質も阻害した。さらにBIM I は感染24時間後に添加すると効果が少ないことから、主にウイルスの複製に作用すると考えられた。BIM I はプロテインキナーゼC(PKC)の阻害剤であり類似構造の誘導体を調べたが、PKC活性のないものもBIM I と同等以上の阻害活性があったので、PKCはHCV複製に関わっていないと思われる。

[村上裕子、鈴木哲朗・脇田隆字(ウイルス第二部)、深澤秀輔]

(2) 新規天然物由来の化合物のC型肝炎ウイルス(HCV)の阻害作用の解析

天然物およびその誘導体からなる化合物ライブラリーより IC_{50} が約 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 以下のHCV阻害活性のある物質を数個見いだした。これらについて、レプリコン細胞での阻害活性および作用の時間等を調べたところ、レプリコン細胞には効かない化合物がいくつか見つかり、これらはこれまでは知られていない、ウイルスの侵入および遊離の過程を阻害している可能性があるので、さらに解析を進めている。

[村上裕子、鈴木哲朗・脇田隆字(ウイルス第二部)、深澤秀輔]

(3) 抗EBウイルス剤の探索

昨年度確立したELISA系を用い *in vitro* でEBNA-1のDNAへの特異的な結合を阻害する化合物のスクリーニングを行った。AnalytiCon社微生物代謝産物、植物

代謝産物、化学合成物ライブラリーからいくつかの阻害剤の候補が見つかった。

[山越 智、村上裕子、深澤秀輔]

(4) 持続性感染に関わる蛋白質の同定

C型肝炎ウイルスコア蛋白質、NS4B、NS5Aに結合する宿主蛋白質の解析を行った。

昨年に引き続き、ピトーブタグをつけたウイルス蛋白質を免疫沈降し、相互作用をする宿主蛋白質を同定した。LC-MS/MSによりNS5Aから169種類の蛋白質、NS4Bから202種類の膜由来蛋白質を同定した。その中には、すでに報告のある AmphophysinII, hVAP-33等も含まれていた。

[山越 智、橋本ゆき、村上裕子、深澤秀輔；鈴木哲郎(ウイルス二部)、鈴木健裕(理研)]

IV. 微生物の有用遺伝子探索による創薬と薬剤耐性機構に関する研究

1. 創薬に関する研究

(1) *Nocardia farcinica* IFM 10152 の nocobactin 生合成遺伝子クラスターの同定

Nocobactin 生合成遺伝子クラスターと推定される *nbtA-H* と *nbtS-T* のうち、*nbtA*、*nbtE* および *nbtS* の遺伝子破壊を行った結果、各破壊株では nocobactin の生産性が大幅に減少あるいは消失し、さらに破壊した遺伝子の相補によって生産性が回復した。このことから、これらの遺伝子を含むふたつのクラスターは、nocobactin 生合成遺伝子クラスターであることが明らかとなった。

[千葉和宏、星野泰隆、石川 淳]

(2) Nocobactin の *Nocardia* 病原性への関与

N. farcinica IFM 10152 の野生株と nocobactin 生合成遺伝子の破壊株である *nbtA*、*nbtE* および *nbtS* をマウス培養細胞 J774A.1 に感染させた結果、野生株は細胞死をもたらしたが、*nbtA* および *nbtS*

の殺細胞活性は大幅に減弱し、*nbtE*の殺細胞活性は消失した。さらに、破壊した遺伝子を相補した株では、殺細胞活性が野生株と同等までに回復したことから、nocobactin は *N. farcinica* の病原性に関与していることが示唆され、nocobactin 生合成経路がノカルジア症治療薬のターゲットとなる可能性が考えられた。

[石野敬子、千葉和宏]

(3) *Nocardia* 感染マクロファージの遺伝子発現変化の検討

N. farcinica IFM 10152 を感染させたマウスマクロファージ様細胞 J774A.1 の遺伝子発現変化を感染後 1 時間から 24 時間まで経時的に検討した。マイクロアレイは Agilent 社 GE カタログアレイ whole mouse genome を用いた。その結果、炎症系サイトカイン誘導関連、ケモカイン関連、細胞死関連遺伝子等の発現変化が認められた。これらの発現に関わる *Nocardia* 側因子を探索中である。

[石野敬子、石川 淳]

(4) *Nocardia* の高コピープラスミドベクターの開発
pNV18 および pNV19 は、当部第四室で開発された *Nocardia* 属において唯一の実用的なクローニングベクターであるが、その利用価値をより高めるために、*repA* 遺伝子に 3 塩基の欠失を導入し、コピー数が約 5 倍に上昇した pNV118 および pNV119 を開発した。これにより、*Nocardia* 属における有用遺伝子の大量発現等への利用が可能となった。

[石川 淳]

(5) *Kitasatospora setae* NBRC 14216 のゲノム塩基配列の決定

Bafilomycin B1 (setamycin) を生産する *K. setae* の全ゲノム配列 (8.8 Mb) を決定した。遺伝子予測の結果、ポリケチド合成酵素、ペプチド合成酵素、ポリプレニル合成酵素、シトクロム P450 遺伝子などの、創

薬に有用な遺伝子が多数見出された。

[石川 淳、高橋洋子 (北里生命研)、池田治生 (北里生命研)、製品評価技術基盤機構]

(6) リファンピシン変換物の構造解析

N. farcinica IFM 10152 においてリファンピシン耐性因子として見出された、リファンピシンモノオキシゲナーゼを大腸菌にて発現させ、リファンピシンの変換反応を行った。変換反応によって得られた化合物の構造解析を質量分析および NMR によっておこなった。質量分析の結果から、分子量が 16 増加しており酸素原子 1 個付加されていることが判明し、NMR の結果から、リファンピシンに酸素原子が付加している構造であることが確かめられた。変換物は依然として抗菌活性を有していることから、新たな誘導体作製のためのリードとなる可能性が考えられた。

[星野泰隆、篠永英樹 (大正製薬)、宮崎義継、石川 淳]

2. 薬剤耐性機構に関する研究

(1) *N. farcinica* IFM 10152 のアミノグリコシドリン酸化酵素 (APH) 遺伝子

N. farcinica において APH 遺伝子とアノテーションされた *nfa31340*、*nfa38480* および *nfa38620* 遺伝子を *E. coli* で発現させ、生産されたタンパク質の各種アミノグリコシドに対するリン酸化活性を測定した結果、それらのすべてに APH 活性が認められた。さらに、基質特異性およびリン酸化物を既知の APH のそれらと比較した結果、それぞれ新規な APH(2"), APH(3) あるいは APH(6) であることが明らかとなった。

[藤井匠子、千葉和宏、石野敬子、星野泰隆、石川 淳]

レファレンス業務

病院や研究機関、報道機関からの真菌感染症に関する各種質問や診断依頼に関する対応を行った。主な内

容は、アスペルギルス症、カンジダ症や接合菌症などの疑診例など個々の深在性真菌症例に関する診断支援、分離された真菌の原因菌同定、報道機関に対する真菌感染症や難治性感染症に関する情報提供等であった。延べ24回の依頼に対応した。

[宮崎義継、新見昌一、金子幸弘]

品質管理に関する業務

収去検査5品目に関して含有量の測定を、細菌第2部と共同で実施した。

[村上裕子、金子幸弘、石川 淳、石野敬子]

発表業績一覧

. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Kohno Y, Ohno H, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Yanagihara K, Hirakata Y, Fukushima K, Kohno S. In Vitro and In Vivo Activities of Novel Fluoroquinolones Alone and in Combination with Clarithromycin against Clinically Isolated Mycobacterium avium Complex Strains in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 51(11):4071-6. 2007.
- 2) Imamura Y, Yanagihara K, Fukuda Y, Kaneko Y, Seki M, Izumikawa K, Miyazaki Y, Hirakata Y, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Kohno S. Effect of anti-PcrV antibody in a murine chronic airway Pseudomonas aeruginosa infection model. Eur Respir J.;29(5):965-8. 2007.
- 3) Nakamura S, Yanagihara K, Seki M, Izumikawa K, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Kohno S. Clinical characteristics of pneumonia caused by beta-lactamase negative ampicillin resistant Haemophilus influenzae (BLNAR). Scand J Infect Dis. 39(6-7):521-4. 2007.
- 4) Izumikawa K, Morinaga Y, Kondo A, Hara K, Izumikawa K, Miyazaki Y, Kohno S, Igari N, Akaboshi M, Kawakami J, Eguchi K. Adult Still's disease associated with cytomegalovirus infection. J Infect Chemother. 13(2):114-7. 2007.
- 5) Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Miyazaki Y, Hirakata Y, Soejima Y, Mizuta Y, Kohno S. Leukocytoclastic vasculitis after pneumococcal pneumonia in an elderly adult. Intern Med. 46(8):487-90. 2007.
- 6) Inoue Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Kakeya H, Sawai T, Hirakata Y, Kohno S. Pulmonary cryptococcosis presenting as endobronchial lesions in a patient under corticosteroid treatment. Intern Med. 46(8):519-23. 2007.
- 7) Seki M, Kosai K, Yanagihara K, Higashiyama Y, Kurihara S, Izumikawa K, Miyazaki Y, Hirakata Y, Tashiro T, Kohno S. Disease severity in patients with simultaneous influenza and bacterial pneumonia. Intern Med. 46(13):953-8. 2007.
- 8) Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y, Kobayashi T, Yoshiura K, Niikawa N, Wen CY, Isomoto H, Shikuwa S, Omagari K, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K.. NAT2 6A, a haplotype of the N-acetyltransferase 2 gene, is an important biomarker for risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. World J Gastroenterol. 7;13(45):6003-8. 2007.
- 9) Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, and Cannon RD. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell, 6, 1150-1165, 2007.
- 10) Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, and Monk BC. *Candida albicans* drug resistance - another way to cope with stress. Microbiology, 153, 3211-3217, 2007.
- 11) Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M and Uehara Y. Inhibition of fungal ABC transporters by

生物活性物質部

- unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 990-995, 2007.
- 12) Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1264-1272, 2007.
- 13) Asano R, Watanabe Y, Kawaguchi H, Fukazawa H, Nakanishi T, Umetsu M, Hayashi H, Katayose Y, Unno M, Kudo T, Kumagai I. Highly effective recombinant format of a humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with retargeting of lymphocytes to tumor cells., *Journal of Biological Chemistry* 282: 27659-27665, 2007.
- 14) Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Takahashi N, Yamagoe S, Uehara Y. Gamma-herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies., *Cancer Science* 98: 1288-1296, 2007.
- 15) Okumura A, Saito T, Otani I, Kojima K, Yamada Y, Ishida-Okawara A, Nakazato K, Asano M, Kanayama K, Iwakura Y, Suzuki K, Yamagoe S. Suppressing role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 58: 413-421, 2008.
- 16) Nagao T, Matsumura M, Mabuchi A, Ishida-Okawara A, Koshio O, Nakayama T, Minamitani H, Suzuki K. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody *Nephrology Dialysis and Transplantation*, 22, 77-87, 2007
- 17) Ishida-Okawara A, Nagi-Miura N, Oharaseki T, Takahashi K, Okumura A, Tachikawa H, Kashiwamura S, Okamura H, Ohno N, Okada H, Ward PA, Suzuki K.
- 18) Neutrophil Activation and Arteritis Induced by *C. albicans* Water-soluble Mannoprotein- α -glucan Complex (CAWS) *Experimental Molecular Pathology*, 82, 220-6, 2007
- 19) Ramadan MM, Tachikawa H, Kodama M, Okawara A, Mitsuma W, Ito M, Kashimura T, Ikrar T, Hirono S, Okura Y, Suzuki K, Aizawa Y. A pilot-controlled study of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (MPO-ANCA) in the coronary circulation *International Journal of Cardiology*, 2007, in press
- 20) Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K. Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in murine systemic vasculitis and glomerulonephritis model mice. *Microbiol Immunol.* 51(5):551-66 2007
- 21) Hoshino A, Nagao T, Nakasuga A, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. Nanocrystal Quantum Dot-Conjugated Anti-Myeloperoxidase Antibody as the Detector of Activated Neutrophils. *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE*, 6, 341-45, 2007
- 22) Hoshino Y, Watanabe K, Iida S, Suzuki S, Kudo T, Kogure T, Yazawa K, Ishikawa J, Kroppenstedt RM, Mikami Y. *Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1456-60, 2007
- ## 2. 和文発表
- 1) 中村茂樹, 宮崎義継, 三原智, 関雅文, 泉川公一, 柳原克紀, 大野秀明, 東山康仁, 平湯洋一, 副島佳文, 田代隆良, 河野茂: シェーグレン症候群に合併し多発性肺結節影を呈した肺アミロイドーシスの1例 *日本呼吸器学会雑誌*, 45(4): 356-360, 2007.
- 2) 宮崎義継: 日和見真菌感染症 1) *Candidiasis*, *Cryptococcosis* 2) *Aspergillosis*, 接合菌症. 病原真菌ハンドブック 医薬ジャーナル社 宮治誠編

- 3) 宮崎義継：慢性壊死性肺アスペルギルス症の診断は改訂版 深在性真菌症 Q&A 医薬ジャーナル社 河野茂編
 - 4) 宮崎義継、河野茂：深在性真菌症の治療 臨床環境医学会雑誌 16(1):17-20, 2007.
 - 5) 井上祐一、澤井豊光、土井誠志、大野秀明、泉川 公一、柳原克紀、東山康仁、宮崎義継、平潟洋一、田代隆良、河野茂：肺野孤立結節影を呈した肺非結核性抗酸菌症 (NTM) の検討 日本呼吸学会雑誌 45(9):655-660, 2007.
 - 6) 宮崎義継、河野茂：肺クリプトコックス症～画像による他疾患との鑑別は可能か SFI Forum 深在性真菌症;Oct.:40-41, 2007.
 - 7) 岩田敦子、泉川公一、関田孝晴、石本裕土、坂本 憲穂、中山聖子、宮崎義継、迎寛、河野茂：ステロイド投与が臨床的に有効であったマイコプラズマ細気管支炎・肺炎の1例 感染症学雑誌; 81(5):586-591,2007.
 - 8) 柳原克紀、森永芳智、福島和子、中村茂樹、栗原慎太郎、関雅文、泉川公一、掛屋弘、山本善裕、宮崎義継、平潟洋一、田代隆良、河野茂:高齢者市中肺炎に対する最適なキノロン薬と投与法の検討 Monte Carlo Simulationを用いて Japanese Journal of Antibiotics;60(5):251-256, 2007.
 - 9) 宮崎義継：中枢神経系の深在性真菌症に対する治療の進歩 神経治療学 Vol.24, No.6, 659-661,2007.
 - 10) 宮崎義継：敗血症 今日の治療指針 第50巻(2008年版) 医学書院
 - 11) 新見昌一：真菌学総論 戸田新細菌学 改訂33版 南山堂 pp.293-315, 2007.
 - 12) 深澤秀輔：プロテインキナーゼ阻害物質の探索 文部科学省がん特定研究・統合がん・化学療法基盤情報支援班の活動 化学工業 58: 295-299, 2007.
- 学会発表**
1. 国際学会
 - 1) Miyazaki, Y. Management of Invasive fungal infections in Japan. 14th Annual Meeting of Korean Society of Mycology. June 23 2007, Seoul.
 - 2) Tanabe K, Tomiyama S, Lamping E, Takano Y, Uehara Y, Niimi M. Novel mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* ABC protein, Pdr5p, result in insensitivity to the efflux pump inhibitor FK506. 2nd Advanced Lecture Course Human Fungal Pathogens: Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and Virulence, 11-17 May, 2006, La Colle sur Loup, France.
 - 3) Niimi M, Tanabe K, Lamping E, Niimi K, Holmes AR, Monk BC and Cannon RD. Mechanisms of drug resistance in pathogenic fungi. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, 1-5 September, 2007, Hyogo, Japan.
 - 4) Niimi M, Tanabe K, Niimi K, Lamping E, Takano Y, Holmes AR, Monk BC, Cannon RD, Uehara Y. Characterization of drug efflux pump inhibitors that chemosensitize fungal ABC transporters. 9th ASM conference on *Candida* and Candidiasis 24-28 March, 2008, New York, USA
 - 5) Niimi K, Monk BC, Maki K, Hatakenaka K, Ikeda F, Niimi M, Nakayama H, Cannon RD. Clinically significant micafungin resistance in *Candida glabrata* requires mutations in both *FKS1* and *FKS2*. 9th ASM conference on *Candida* and Candidiasis. 24-28 March, 2008, New York, USA.
 - 6) Keniya MV, Holmes AR, Niimi M, Cannon RD Monk BC. Heterologous expression of the *Candida albicans* plasma membrane proton pump in *Saccharomyces cerevisiae*. 9th ASM conference on *Candida* and Candidiasis. 24-28 March, 2008, New York, USA
 - 7) Kaneko, Y., Yanagihara, K. and Miyazaki, Y.: New strategies for control of chronic respiratory infections - focusing on microbial biofilms-. First Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalant in Asian Countries. November 6, 2007, Tokyo.
 - 8) Ishikawa, J., Chiba, K., Hoshino, Y., Ishino, K., Kogure, T., and Mikami, Y.: Development of a genetic analysis system for *Nocardia* species.

生物活性物質部

International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Aug. 26-30, 2007, Newcastle upon Tyne, U. K.

- 9) Hoshino, Y., Chiba, K., Fukai, T., Igarashi, Y., Mikami, Y., and Ishikawa, J.: Identification of the salicylate synthase gene of *Nocardia farcinica* and its role in the biosynthesis of nocobactin. International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Aug. 26-30, 2007, Newcastle upon Tyne, U. K.
2. 国内学会
 - 1) 宮崎義継：改正・深在性真菌症ガイドライン、呼吸器領域 第47回日本呼吸器学会学術講演会 平成19年5月10-12日 東京
 - 2) 宮崎義継：感染症におけるDDSの現況 第23回日本DDS学会総会 平成19年6月14日-15日 熊本
 - 3) 宮崎義継：神経感染症の治療の進歩と将来の展望。第25回日本神経治療学会総会 平成19年6月21日-22日 仙台
 - 4) 宮崎義継：アスペルギルス症への挑戦～診断から治療まで～ 真菌症フォーラム第9回学術集会 平成20年2月9日 東京
 - 5) 宮崎義継：バイオセキュリティとバイオセーフティ 第23回日本環境感染学会総会 平成20年2月22日 長崎
 - 6) 田辺公一、新見昌一 病原真菌ABCタンパク質と基質の相互作用 第4回真菌分子細胞研究会 平成19年8月26, 27日 千葉
 - 7) 新見昌一 医真菌学の現状と将来：私の専門分野から、抗真菌薬耐性機構 第15回医真菌学セミナー 平成19年10月6日 東京
 - 8) 田辺公一、富山 進、上原至雅、新見昌一出芽酵母ABCタンパク質Pdr5pの阻害剤FK506非感受性化変異 第51回日本医真菌学会総会 平成19年11月9-10日 高山
 - 9) 中山浩伸、田辺公一、知花博治、青山俊弘、新見昌一 *Candida glabrata*のステロールトランスポ
 - 10) 新見京子、牧克之、畠中千明、石川嵩彦、高田徹、田村和夫、新見昌一、中山浩伸、BC Monk, RD Cannon. Clinical micafungin resistance required functional homozygosity in *Candida glabrata* glucan synthase 第51回日本医真菌学会総会 平成19年11月9-10日 高山
 - 11) 村山そう明、山口正視、川本 進、新見昌一、梶原 将 *Candida albicans*脂肪酸不飽和化酵素遺伝子(CaFADs)破壊株の表現型とトランスクリプトーム解析 第51回日本医真菌学会総会 平成19年11月9-10日 高山
 - 12) 三好薫治、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、宮崎義継、新見昌一 病原真菌ABCタンパク質のFK506による阻害メカニズムの解明 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 平成19年12月11-15日 横浜
 - 13) 名木 稔、田辺公一、臺 由紀、高野幸枝、宮崎義継、新見昌一 ドメイン置換解析による *Candida albicans* ABCタンパク質の基質認識メカニズムの解明 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 平成19年12月11-15日 横浜
 - 14) 田辺公一、名木稔、新見昌一、宮崎義継：病原真菌 *Candida albicans* ABCタンパク質の基質認識メカニズムに関する研究 第6回 感染症沖縄フォーラム 2008年2月14-16日 沖縄
 - 15) 田辺公一、中山浩伸、知花博治、新見昌一、宮崎義継：病原真菌ABCタンパク質の抗真菌薬耐性との関わり 第81回日本細菌学会総会 2008年3月24-26日 京都
 - 16) 深澤秀輔、上原至雅：Cell-based screening approaches for identification of signal transduction inhibitors. 第66回日本癌学会学術総会 シンポジウム 分子標的としてのシグナル伝達 平成19年10月3-5日、横浜
 - 17) 村上裕子、山越智、鈴木哲朗、脇田隆字、深澤秀輔：培養細胞をもちいたC型肝炎ウイルス(HCV)の阻害剤のスクリーニング。第55回日本ウイルス学会学術集会 平成19年10月21-23日、札幌

生物活性物質部

- 18) 金子幸弘、柳原克紀、宮崎義継、河野茂、Pradeep Singh：ガリウム(Ga)の抗菌及び抗バイオフィルム作用についての検討。第36回薬剤耐性菌研究会 平成19年11月16-17日、伊香保
- 19) 金子幸弘、柳原克紀、宮崎義継、河野茂、Pradeep Singh：緑膿菌バイオフィルムに対するガリウム(Ga)の作用についての検討。第42回緑膿菌感染症研究会学術集会 平成20年2月1日、東京
- 20) 池田好美、鈴木岳之、上原至雅、深澤秀輔：HypothenymycinによるMEK-ERK経路の選択的阻害。日本薬学会第128年会、平成20年3月26-28日、横浜
- 21) Dang Hung MINH, 加藤秀人、上芝秀博、今西健一、鈴木和男、山越 智、内山竹彦、八木淳二：Role of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 in the toxic shock caused by staphylococcal enterotoxin A、第37回 日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20-22日、東京。
- 22) 加藤秀人、Dang Hung MINH、山越 智、鈴木和男、上芝秀博、今西健一、内山竹彦、八木淳二：新規ケモカインLECT2のトキシックショック抑制作用の解析、第81回 日本細菌学会総会、平成20年3月24-26日、京都。
- 23) 高橋俊二、豊田 敦、鈴木龍一郎、関山恭代、植木雅志、大利 徹、石川 淳、池田治生、榊 佳之、長田裕之：リペロマイシンA生合成遺伝子クラスターの解析。第22回日本放線菌学会大会、平成19年5月30-6月1日、広島
- 24) 五ノ井 透、星野泰隆、矢沢勝清、石川 淳、三上 襄：病原性放線菌 *Nocardia* 属64種が産生するシデロフォアの多様性の解析。第22回日本放線菌学会大会、平成19年5月30-6月1日、広島
- 25) 小暮高久、島田玲緒奈、矢沢勝清、石川 淳、三上 襄：*Nocardia farcinica*におけるアミノグリコシド高度耐性化機構の解析。第22回日本放線菌学会大会、平成19年5月30-6月1日、広島
- 26) 千葉和宏、星野泰隆、石野敬子、石川 淳：病原性放線菌 *Nocardia farcinica*におけるシデロフォア nocobactin の生合成遺伝子の同定。第81回日本細菌学会総会、平成20年3月24-26日、京都