

## 菌密度変化に伴う *Candida albicans* の増殖時形態変化メカニズムの解析

福松 真\*, 上野 将明, 小笠原綾子, 渡部 俊彦, 三上 健, 松本 達二

### Analysis of Transformation System in *Candida albicans* Regulated by Cell Density

Makoto FUKUMATSU, Yukihiro UENO, Ayako OGASAWARA, Toshihiko WATANABE,  
Takeshi MIKAMI, and Tatsuji MATSUMOTO

(Received November 22, 2003)

*Candida albicans* generally grows in hyphal form in RPMI-1640 medium. However, transformation of hyphal form to yeast form is observed by increasing of the cell density in RPMI-1640 medium. Intracellular  $Ca^{2+}$  was increased in yeast growth condition (high cell density condition) compared with that of hyphal growth condition. The expression of *CGR1* mRNA was inhibited in the yeast growth condition.

These results indicated that the transformation of *C. albicans* was mediated by  $Ca^{2+}$ -dependent stimulation system, and the system was regulated by *CGR1* expression.

**Key words** — *C. albicans*; cell density; transformation;  $Ca^{2+}$ ; *CGR1*

## 緒 言

*Candida albicans* は日和見感染菌の一種で、発育条件に依存して菌糸形と酵母形のいずれか、または両者の発育形態をとる二形成真菌である。一般的に生体組織内では菌糸形として発育するが、全身への伝播の際には酵母形で拡散することが予想される。

*C. albicans* の形態変化を制御するタンパク質として、*ENO1* (enolase) 遺伝子の調節因子である Rbf1 (RPG-box-binding factor) タンパク質、細胞伸長因子 (cell elongation factor, *ECE1*)、キチナーゼ (*CHT*) あるいは、*Candida* growth regulator (*CGR*) 1 が報告されている。<sup>1-4)</sup> *CGR1* は calmodulin とは異なるカルシウム結合能を持った heat shock protein の一種で、老化マーカータンパク質 (senescence marker protein 30, *SMP30*) ファミリーに属する細胞内タンパク質であることが報告されている。<sup>4)</sup> *SMP30* はカルシウムイオノフォアによる細胞死を一部回復する機能を有することから、*CGR1* タンパク質は細胞内  $Ca^{2+}$  輸送に関与すると考えられている。*CGR1* 欠損株では、菌糸形成能が失われる

ことから、*CGR1* を介したカルシウム輸送系が形態変化の制御に関与していると考えられる。

今回、*C. albicans* の菌密度は、その増殖形態を方向づける重要な因子であることを見出し、この作用には  $Ca^{2+}$  を介した刺激伝達系が関与することを明らかにした。

## 材料及び方法

### 1. 供試菌株

*C. albicans* NIH-207 株は、サブロー培地 (10g/L Peptone, 20g/L Glucose, 5g/L Yeast Extract) で 27 °C, 24 時間培養を行い、実験に使用した。

### 2. 菌糸形成率の測定

*C. albicans* 酵母形生菌を菌糸形成培地 (RPMI-1640) に  $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/mL の任意の濃度となるように懸濁し 37 °C, 5%  $CO_2$  条件下で 3 時間培養した。培養終了後、菌糸形菌体の占める割合を血球計算盤を用いて測定した。

### 3. 培養上清による菌糸形成阻害作用

*C. albicans* が酵母形で増殖する菌密度 ( $5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640) で3時間培養後, 上清を濾過により回収した. この上清を用いて *C. albicans* を  $1 \times 10^5$  cells/mL に懸濁し 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で3時間培養した. 培養終了後, 顕微鏡下で形態を観察した.

### 4. 菌体内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の測定

*C. albicans* を RPMI-1640 培地に懸濁し, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で3時間培養後, 遠心して上清を除去し, Zymolyase (10mg/mL in PBS) 0.2mL を加え 37 °C, 20 分間反応させた. これを ATP 抽出液 (Kikkoman, Japan) で処理した後, 濾過滅菌を行い, 得られた濾液をサンプルとして使用した. これに Aequorin™ (Molecular Probes, USA) を加え発光量を MiniLumat™ (Berthold, Germany) を用いて測定した. Aequorin は free の Ca<sup>2+</sup> と結合することで発光するタンパク質である. Ca<sup>2+</sup> 濃度は sample 中に含まれる ATP に対する相対比として結果を示した.

### 5. *CGR1* mRNA の定量

*C. albicans* *CGR1* gene の配列は, National Center for Biotechnology Information (NCBI) の

Entrez システムを利用して検索した. この配列を基に, Search Launcher in Human Genome Sequencing Center (Baylor College of Medicine) を利用して PCR 用プライマーを設計した.

*C. albicans* cDNA library は, Cells-to-cDNA™ (Ambion, USA) を使用して作製し, *CGR1* primer (5'-TTCAACCCGAAGGTAAATTATATCGAA-3', 5'-TCTTTTGGCAGCAATTTTAATTCG-3') と KOD-Plus-DNA polymerase (TOYOBO, Japan) を用い, サーマルサイクラー (Bio Rad, USA) で *CGR1* cDNA を増幅した. mRNA の相対比は, McCreath らの方法に従い, Actin の mRNA (*ACT1* mRNA) を対象に算出した.<sup>5)</sup>

## 実験結果

### 1. 菌濃度と増殖形態との関係

*C. albicans* を菌糸形成培地に菌密度を変えて懸濁し, 菌糸形成率の変化を測定した.  $1 \times 10^5$  cells/mL 条件下で培養した *C. albicans* は菌糸形で増殖するが, 菌密度の増加に伴い酵母形で増殖する割合が増加した (Fig. 1).

### 2. 培養上清による菌糸形成阻害作用

*C. albicans* は培養上清中に酵母誘導因子を放出しているという報告がある.<sup>6)</sup> 菌濃度の増加

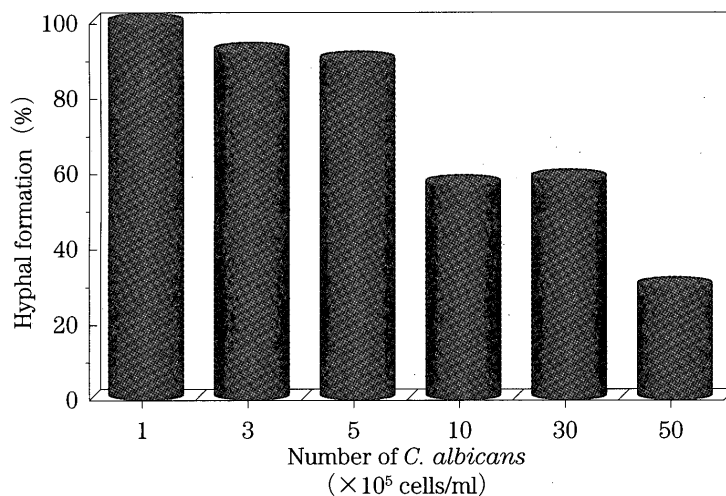


Fig. 1. Corelation of hyphal formation and the cell density.

*C. albicans* ( $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 3h, and the ratio of hyphal cells was counted.

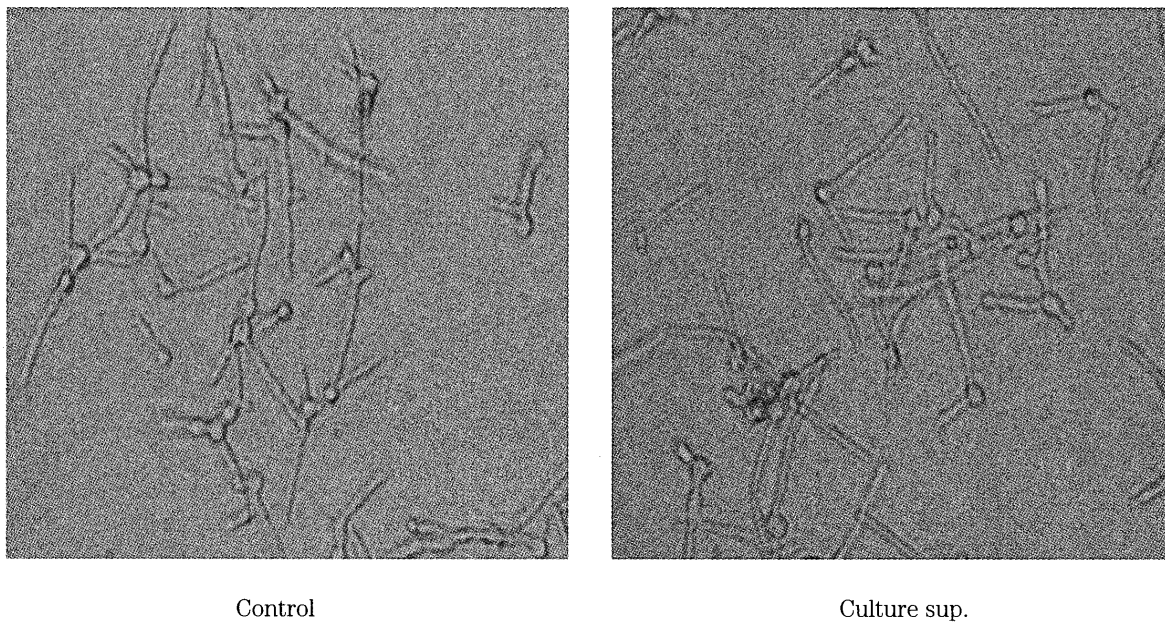


Fig. 2. Effect of culture supernatant of *C. albicans* on H-Y transformation of *C. albicans*. *C. albicans* ( $5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured for 3h, and the supernatant was collected. Then, *C. albicans* ( $1 \times 10^5$  cells/mL) incubated with the culture supernatant for 3h, and morphological change was observed.

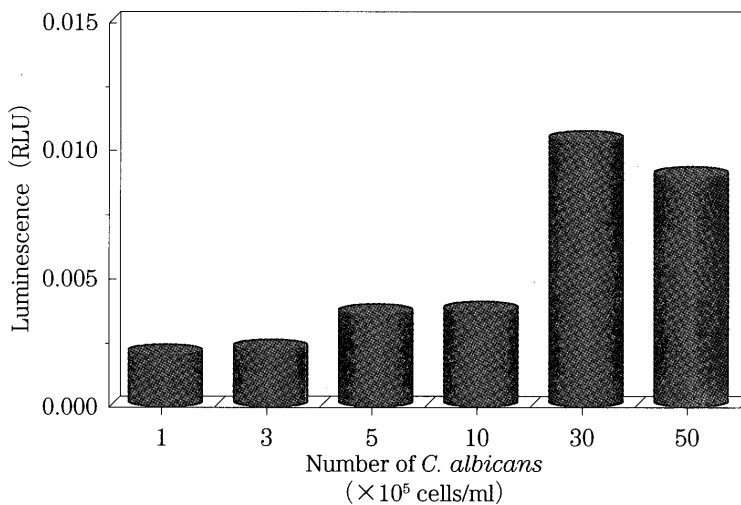


Fig. 3. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of *C. albicans*. *C. albicans* ( $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured for 3h. Then the cells were disrupted and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the supernatant was measured by Aequorin.

に伴う酵母分裂の促進は、菌体が産生する酵母誘導因子によるものか検討した。酵母形分裂が主として起こる培養上清中で *C. albicans* を培養し形態変化を観察したところ、上清で培養した *C. albicans* の菌糸形成阻害は認められなかった (Fig. 2)。

### 3. 菌体内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化

*C. albicans* の菌密度と菌体内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の関係について検討した。菌糸形増殖を起こす *C. albicans* の低濃度培養条件下と比べ、酵母分裂が主となる高濃度培養条件下では、菌体内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が有意に増加していた (Fig. 3)。

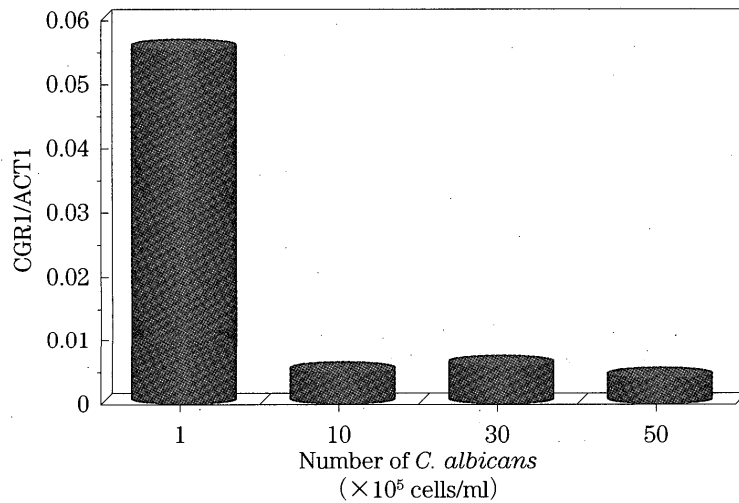


Fig. 4. Expression of *CGR1* mRNA in *C. albicans*

*C. albicans* ( $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured for 3h, and expression of *CGR1* mRNA was analyzed by RT-PCR method.

#### 4. *CGR1* mRNA 転写抑制

*C. albicans* の形態変化に,  $\text{Ca}^{2+}$  を介した刺激伝達系の関与が予想されることから, Ca 輸送タンパク質と考えられている *CGR1* mRNA 発現量を RT-PCR 法により測定した. 菌糸形で増殖する菌密度と酵母形で増殖する菌密度での *CGR1* 含量を比較すると, 酵母形で増殖する条件下では明らかな *CGR1* mRNA 発現量の低下が認められた (Fig. 4).

#### 考 察

*C. albicans* は宿主生体内侵入後, 感染局所において菌糸形で増殖し, 感染局所周辺の組織を破壊する. 感染の進行に伴い, 菌は全身に広がり播種性カンジダ症を引き起こすことから, 感染局所において菌糸形で増殖した菌体は, 一旦酵母形に形態を変化させ増殖部位から遊離すると考えられる.

本研究では, *C. albicans* の増殖に伴う菌密度の増加が酵母分裂を促進することを明らかにした.

菌糸形成培地として使用した RPMI-1640 は, 菌糸形成に必要なビオチン, カルシウム等を含んでおり, この培地中では *C. albicans* の大部分が菌糸形で増殖することが知られている.

我々は, RPMI-1640 培地で *C. albicans* の菌密度を変えて培養を行ったところ, 菌密度の上昇に伴って菌糸形での増殖が阻害されていることを見出した (Fig. 1). *C. albicans* は自己調節物質 (farnesol) を分泌することで酵母形での増殖を誘導するという報告がある.<sup>6)</sup> 菌密度の増加による酵母分裂にもこのような自己調節物質が関与しているか検討を行った. 高濃度で培養した *C. albicans* の培養上清で *C. albicans* を培養しても酵母形での増殖を促進できないことから (Fig. 2), 菌密度の増加による菌糸形成の阻害作用には培養上清中に分泌された自己調節物質によるものではなく, 菌体同士の接触による刺激が細胞内情報伝達系に影響していると推察された. *C. albicans* の形態変化には,  $\text{Ca}^{2+}$  を介した刺激伝達系が関与していることから,<sup>7,8)</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を測定したところ菌糸形成阻害時に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が認められた (Fig. 3). 酵母形から菌糸形への形態変化を調節する因子として, Cho らは, Ca 輸送タンパク *CGR1* の存在を報告している.<sup>4)</sup> *CGR1* は *C. albicans* 酵母形菌体中には発現されないが, ストレス環境下でその転写が促進され, *CGR1* の発現により菌糸形への形態変化が開始されることが明らかになっている. 菌密度の増加が *CGR1* の発現を抑制してい

るかどうかを検討したところ, *CGR1* mRNA 量は低濃度培養条件下と比較して高菌密度培養条件下で明らかな低下が認められた (Fig. 4). この結果から, 接触による刺激が *CGR1* gene の転写を抑制し,  $\text{Ca}^{2+}$  を介した刺激伝達系を抑制していることが推察された.

菌体内  $\text{Ca}$  プールから遊離した  $\text{Ca}^{2+}$  は Calmodulin と結合して, タンパク質リン酸化反応を活性化させ, 菌糸形成に必要なタンパク質の活性化を引き起こしている. 高濃度培養条件下では,  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高いにも関わらず酵母分裂が促進されていたのは, *CGR1* の発現抑制により  $\text{Ca}^{2+}$  プールから  $\text{Ca}^{2+}$  の遊離が低下した結果, 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  が増加したことが推察される.

#### REFERENCES

- 1) Ishii N., Yamamoto M., Yoshihara F., Arisawa M., Aoki Y., *Microbiology.*, **143**, 429-435 (1997).
- 2) Sharkey L. L., McNemar M. D., Saporito Irwin S. M., Sypherd P. S. & Fonzi W. A., *J. Bacteriol.*, **181**, 5273-5279 (1999).
- 3) Gow N. A. R., *Microbiology.*, **140**, 3193-3205 (1994).
- 4) Cho T., Sudoh M., Tanaka T., Nakasima Y., Chibana H., Kaminishi H., *Biochim. Biophys. Acta.*, **26**, 288-292 (2001).
- 5) Birse C. E., Irwin M. Y., Fonzi W. A., Sypherd P. S., *Infect. Immun.*, **61**, 3648-3655 (1993).
- 6) Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Janke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K.W., *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2982-2992 (2001).
- 7) Sabie F.T., Gadd G.M., *Mycopathologia.*, **108**, 47-54 (1989).
- 8) Paranjape V., Roy B.G., Datta A., *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2149-2154 (1990).