

## pH変化による *Candida albicans* 形態変化シグナルの解析

吉川 直樹, 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 pH

Naoki YOSHIKAWA, Yukihiro UENO, Ayako OGASAWARA,  
Toshihiko WATANABE, Takeshi MIKAMI and Tatsuji MATSUMOTO

(Received November 22, 2004)

*Candida albicans* generally grows in hyphal form in RPMI-1640 medium. However, transformation of hyphal form to yeast form is inhibited by declining pH in RPMI-1640 medium and low pH enhance the yeast like forming. The expressions of *RAS1*, *EFG1*, *ALS1* and *CYR1* mRNA in low pH conditions are significantly decreased compared with that of neutral pH conditions.

These results suggested that the transformation of *C. albicans* may be regulated by pH-dependent stimulation system, and the system was regulated by *RAS1* expression.

Key words — *C. albicans*; pH; transformation; *RAS1*

## 緒 言

*Candida albicans* は、ヒトの皮膚や口腔、腸管、膣、消化管などの粘膜などに定着する常在菌であり、代表的な病原性真菌としても知られている。<sup>1)</sup> 特に、悪性腫瘍、臓器移植後の免疫抑制剤の投与、後天性免疫不全症候群 (AIDS) などによる宿主の抵抗力が低下した場合に、重篤な真菌症として発病することがある。<sup>2)</sup>

本菌は酵母形と菌糸形の二つの形態をとる二相性真菌としても知られている。<sup>3, 4)</sup> 粘膜や皮膚表面に定着した状態では酵母形として存在するが、組織内に侵入し、病原性を示す場合には菌糸形として発育することが多い。

*C. albicans* の酵母形から菌糸形への形態変化の要因として温度や血清などが知られている。<sup>5, 6)</sup> *C. albicans* の形態変化はRASタンパク質によって制御されており、RASによって活性化されるMAPキナーゼとcAMP pathwayが形態変化に必要なタンパク質を誘導している。<sup>7, 8)</sup>

また、*C. albicans* 形態変化を制御する環境条件の一つとしてpHの変化が知られている。培地

のpHを酸性にした場合、菌糸形成用培地であっても酵母形分裂が促進されることが知られているが、その詳細なメカニズムは知られていない。そこで今回、pH変化による*C. albicans* 二相性形態変化機構の解析を行った。

## 材料及び方法

### 1. 供試菌株

*C. albicans* NIH-A207株は、サブロー培地 (Peptone 10g/L, Glucose 20g/L, Yeast Extract 5g/L) で27℃, 24h培養を行い、実験に使用した。

### 2. 形態変化の観察

RPMI1640培地のpHを、1M HClを用いてpH 3.4 5.4 7.2及び9.4に調整した。各pHの培地を用いて*C. albicans* 懸濁液を調整 ( $1 \times 10^5$  cells/mL), 37℃, 5%CO<sub>2</sub>条件下で3h培養後、IX-51 (オリンパス株式会社) を用いて*C. albicans* の増殖形態を観察、撮影した (倍率×600倍)。

### 3. 菌糸形成率の測定

RPMI1640培地のpHを, 1M HClを用いてpH 3.4 5.4 7.2及び9.4に調整し, これらの培地を用いて*C. albicans*酵母形生菌を $1 \times 10^5$  cells/mLに調整した. この懸濁液を, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>条件下で3h培養後, 顕微鏡下で形態変化を観察し, 菌糸形成率を算出した. 顕微鏡下で, 母細胞の直径より長く伸長した細胞を菌糸形として計測し, 総菌数当たりの菌糸型菌の占める割合を菌糸形成率 (%) として算出した.

### 4. mRNA発現量の測定

*C. albicans* 菌糸形成に関与する遺伝子の配列は, 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用のプライマーを設計した (Table1).

*C. albicans* cDNA libraryは, Cell-to-cDNA™ (Ambion) を利用して作製し, 標的配列に対する増幅用の各プライマーとKod-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて, サーマルサイクラー (Bio-Rad) で目的のmRNAを増幅した. PCRは, 94°C, 2minの反応後, (94°C, 15sec → 64°C, 30sec → 68°C, 60sec) のサイクルを35回繰り返す, その後, 68°C, 7min間処理し反応を終了させた. PCR産物はAgilent 2100

Bioanalyzerで解析し, 結果は, McCreach等の方法に従い, ActinのmRNA (*ACT1* mRNA) を対象に算出した.<sup>9)</sup>

## 実験結果

### 1. pHと増殖形態との関係

*C. albicans*をpHの異なるRPMI1640培地にそれぞれ懸濁し,  $1 \times 10^5$  cells/mL条件下で培養した. *C. albicans*は, 中性条件下では菌糸形で増殖するが, pHが低下することで菌糸形の分裂が抑制され, 酵母形での分裂が促進された (Fig. 1). pH条件が異なるRPMI1640培地に, *C. albicans*を懸濁し, 3h培養後の菌糸形成率を測定した. その結果, pH低下により菌糸形成率が低下し, 酵母形での分裂が促進されることが明らかになった (Fig. 2). 培養24h目の*C. albicans*の数を, 濁度で比較した場合, 低pH条件下でも菌は中性条件下と同程度に分裂し, 低pH条件下での菌は増殖形態が酵母形であることも確認していることから (Date not shown), 菌糸形成阻害が細胞死によるものでないことを確認している.

### 2. RT-PCR法による菌糸形成関連タンパク質 mRNAの定量

pH変化により, RAS1-cAMPシグナルの下流に存在する*C. albicans*菌糸特異的mRNA発

Table 1. DNA primer sequence

primaer	sequence (5'→3')
<i>ACT1</i> (sense)	ACTCACGTTGTTCGAATTTACGCT
<i>ACT1</i> (antisense)	ACCACCAGACATAACAATGTTACCG
<i>RAS1</i> (sense)	GTGGTGTGGTAAATCCGCTTTAA
<i>RAS1</i> (antisense)	TGGACCATTATCAGAATCTTTGACTCG
<i>CYR1</i> (sense)	GAAAAACATGATCCAACCAATCGT
<i>CYR1</i> (antisense)	GACAATGACGCAAATTTTTATCGGT
<i>EFG1</i> (sense)	ATAGTAATATCCCGTATCCGTTTCGG
<i>EFG1</i> (antisense)	CAATTCTAACACAATAGCTCGTCTCGT
<i>ALS1</i> (sense)	TACATTAACATGTACTGTGAACGACGC
<i>ALS1</i> (antisense)	AACTAAATGATTTCAGATGAAACCGGAT

現量が低下するかどうかをRT-PCR法により検討した。菌糸形態表面抗原の1つである *ALS1* や *C. albicans* 菌糸シグナルの関連タンパク質である *RAS1*, *EFG1*, *CYR1* を測定対象とし,<sup>10)</sup>

各mRNA産生量を *actin1* (*ACT1*) に対する相対比として算出した。<sup>9)</sup> Fig. 3に示すように、酸性条件下では菌糸形成に関与するいずれのmRNAでも、その発現量が有意に抑制されていた。

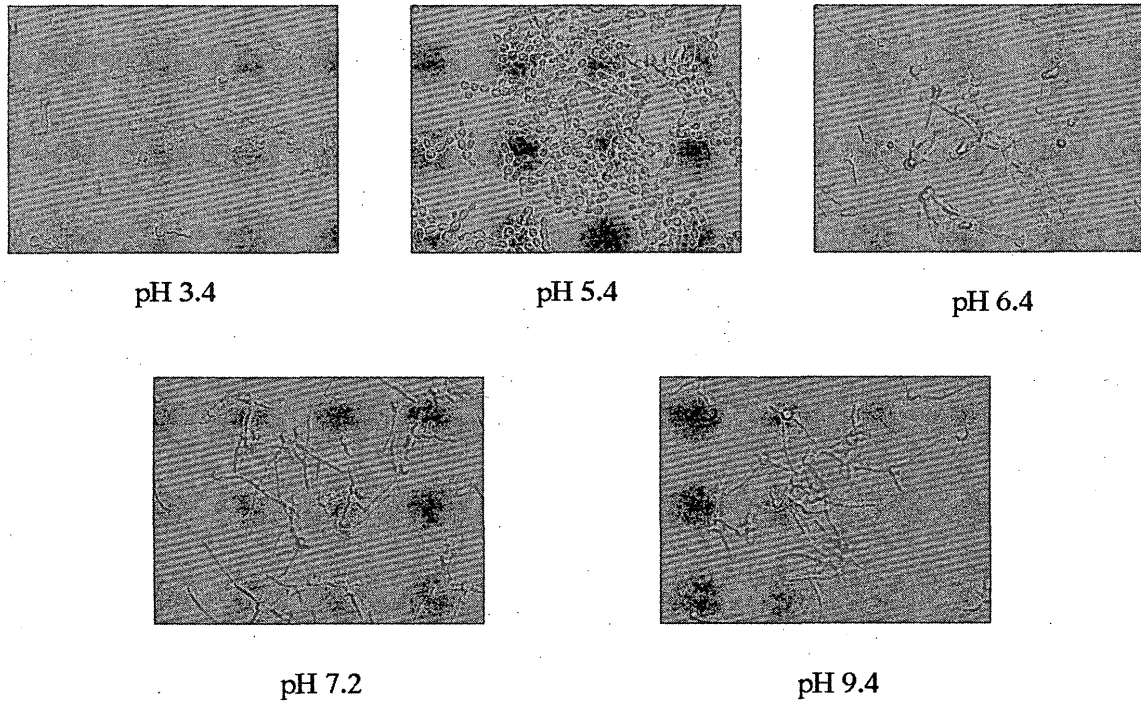


Fig. 1. Growth form of *C. albicans* cultured in several pH conditions

*C. albicans* ( $1 \times 10^5$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured in 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C for 3h, and the growth form of *C. albicans* was photographed by IX-51 (OLYMPUS CO.).

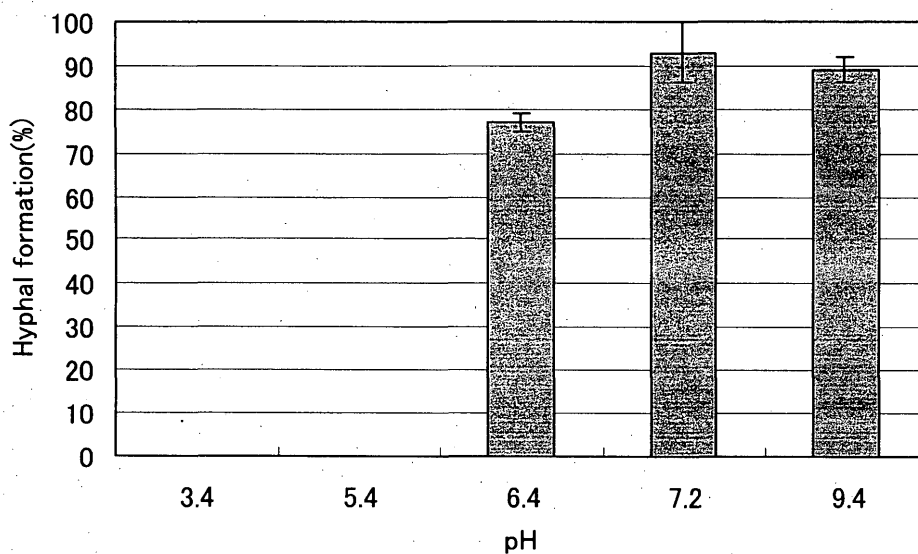


Fig. 2. Ratio of *C. albicans* hyphal cells cultured in several pH conditions

*C. albicans* ( $1 \times 10^5$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured in 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C for 3h, and the ratio of hyphal cells was counted.

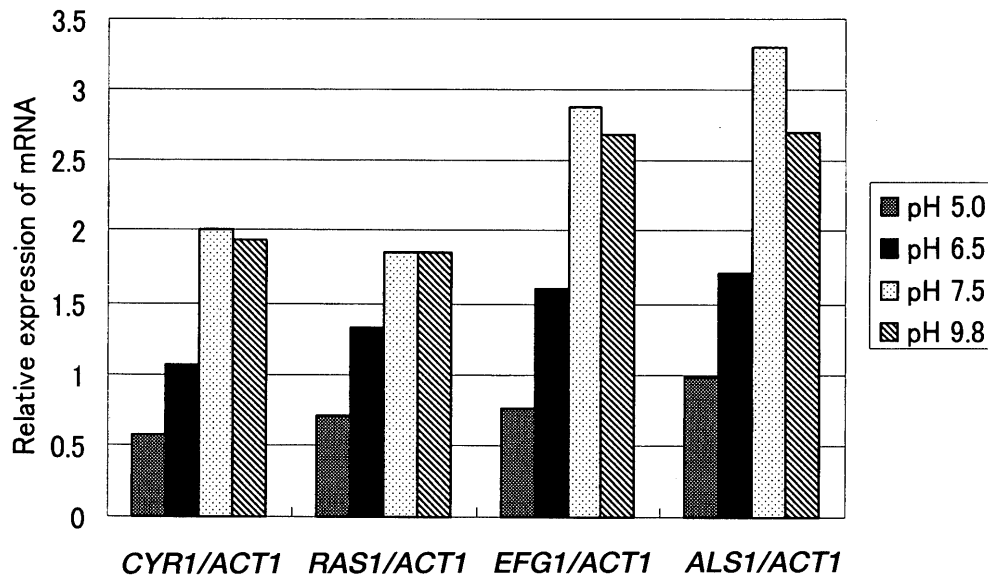


Fig. 3. Relative expression of mRNA in *C. albicans* cultured in several pH conditions  
*C. albicans* ( $1 \times 10^5$  cells/mL in RPMI-1640) was cultured in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C for 3h, and expression of mRNA was analyzed by RT-PCR method.

## 考 察

*C. albicans* は二相性真菌<sup>3,4)</sup>であり、感染組織内では酵母形と比較し、菌糸形の方が、病原性が強いといわれている。<sup>11~14)</sup> *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。

*C. albicans* の形態変化メカニズムには、様々な経路が存在するが、本研究では、pH変化による形態変化機構の一端を示唆した。

菌糸形成誘導用培地として使用したRPMI1640培地は、菌糸形成に必要なビオチン、カルシウム、種々のアミノ酸等を含んでおり、この培地中では大部分が菌糸形で増殖することが知られている。<sup>14)</sup> 我々は、RPMI1640培地に*C. albicans*を懸濁し、pHを調整し酸性側とすることによる、*C. albicans*の形態変化を観察した。*C. albicans*の菌糸形成が、酸性のpHでは抑制されたことから (Fig. 2), pHは*C. albicans*の菌糸形成シグナルの活性化に関与していることが確認できた。

これまで報告されている菌糸形成に関わる刺激伝達系として、RAS1-cAMPシグナルが知られている。今回著者らは、pH変化による形態変

化メカニズムはRAS1-cAMPシグナルに関与して菌糸形成を引き起こすのではないかと推察した。そこで、RAS1-cAMP pathwayを構成するタンパク質の発現をmRNAレベルでの検討を行った。その結果、pH低下によりRAS1の発現量が著しく減少した。これに伴い、RAS1の下流に存在するタンパク質のmRNAも発現が低下していた (Fig. 3)。

このことから、酸性のpHでは、RAS1-cAMP pathwayによる菌糸形成シグナルの伝達が抑制され、その結果、*C. albicans*の菌糸分裂が阻害されたことが明らかになった。

## REFERENCES

- 1) Odds, F. *C. Candida and Candidosis*, 2nd edn. London: Ballilliere Tindall (1998).
- 2) Georgopapadakou NH., Walsh TJ., *Science*, **264**, 371-373 (1994).
- 3) 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. USA.*, **91**, 6216-6220 (1994).

- 4) 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).
- 5) Buffo J., Hermann M. A., Soll D. R., *Mycopathologia*, **85**, 21 – 30 (1984).
- 6) Domer J. E., Human L. G., Andersen G. B., Rudbach J. A., Asherson G. L., *Infect. Immun.*, **61**, 2122 – 2130 (1993).
- 7) Jain, P., Akula, I., Edlind, T., *Antimicrob Agents Chemother.*, **47**, 3195-3201 (2003).
- 8) Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y., Schroppel, K., *Mol Microbiol.*, **42**, 673-687 (2001).
- 9) Sharkey L. L., McNemar M. D., Saporito. I. S. M., Sypherd P. S., Fonzi W. A., *J. Bacteriol.*, **181**, 5273 – 5279 (1999).
- 10) Hoyer L. L., Payne. T. L., Bell. M., Myers. A. M., Schere. S., *Curr. Genet.*, **33**, 451 – 459 (1998).
- 11) Casanova, M., Lopez-Ribot, J. L., Martinez, J. P., Sentandreu, R., *Infect. Immun.*, **60**, 4898 – 4906 (1992).
- 12) Sherwood, J., Gow, N. A. R., Gooday, D. W., Marshall, D., *J. Med. Vet. Mycol.*, **30**, 461 – 469 (1992).
- 13) Cutler, J. E., *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 187-218 (1991).
- 14) Manns J. M., Mosser D. M., Buckley H. R., *Infect. Immun.*, **62**, 5154-5156 (1994).