

総 説

Candida albicans 呼吸欠損株の細胞生物学

青 木 茂 治¹ 久 和 彰 江¹ 仲 村 健 二 郎¹
中 村 康 則²

¹ 日本歯科大学新潟歯学部先端研究センター

² 同 薬理学講座

要 旨

呼吸欠損変異は、呼吸器官であるミトコンドリアが遺伝的障害を受けて呼吸能が失われる変異である。酵母類には、呼吸欠損変異を誘導される種類と誘導されない種類がある。*Candida albicans* は後者の酵母群に入るとされていたが、われわれは、化学変異原として acriflavine を加えた液体培地で高温培養することにより呼吸欠損変異株を誘導分離することができた。本論文では、得られた呼吸欠損変異株の呼吸活性とチトクローム、細胞の微細構造、ミトコンドリア、病原性、酸化ストレス感受性、活性酸素産生、抗菌物質作用と活性酸素との関係などについて、これまでわれわれがおこなってきた研究の概略を紹介したい。さらにカンジダ研究における呼吸欠損変異株の応用の可能性についても述べる。

Key words: カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*), 呼吸欠損変異 (petite mutation), 細胞生物学 (cell biology)

1. はじめに

呼吸欠損変異はパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で最初に観察された現象で、ミトコンドリアが何らかの障害を受けて呼吸によるエネルギー産生ができない。そのため生育が極端に遅くなり、寒天培地上で微小コロニーを作ることから petite mutation と呼ばれている¹⁾。

パン酵母の場合、呼吸欠損変異は容易に誘導され、培養集団のすべての細胞が呼吸欠損になることもある。しかし、すべての種類の酵母で呼吸欠損変異が起こるわけではない。Bulder²⁾ は多数の酵母種について呼吸欠損変異誘発性を調べ、誘発された酵母は20種で、63種では誘発されなかった。そして、誘発される酵母を petite-positive yeasts, 誘発されない酵母を petite-negative yeasts にグループ分けした。*Candida* 属酵母では、*Candida* (*Torulopsis*) *glabrata* と *C. robusta* からは呼吸欠損株が誘発された。しかし、ヒトから分離される *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea* を含む16種は petite-negative yeasts に分類された。

われわれは、カンジダ細胞学研究^{3, 4)} の過程で *C. albicans* の呼吸欠損株を誘導することを試み、分離することができた。以後、変異株の形態学、生理生化学、病原性などについて研究を進めてきている。本稿では、*C. albicans* の呼吸欠損変異についてのわれわれの研究の経過とともに、呼吸欠損株の研究材料としての有用性につ

いて紹介したい。

2. 呼吸欠損変異の誘発と分離

パン酵母などに呼吸欠損変異を誘発する条件を基本に、いろいろな誘発培養を試みた結果、ポリペプトン、酵母エキスおよびグルコースを含む液体培地に acriflavine (0.1 g/ml) を加え、42°C でカンジダ細胞を振とう培養すると呼吸欠損が誘発されることが分かった^{5, 6)}。誘発培養した細胞を eosin Y と trypan blue を含む鑑別用色素寒天培地⁷⁾ に播くと、正常な呼吸能をもつ親株による淡青色のよく発育したコロニーのほかに、約1%の頻度で呼吸欠損株の濃青紫色の小コロニーが出現してきた。

3. 呼吸活性とチトクローム

呼吸欠損株は、非発酵性の炭素源である乳酸や酢酸などは利用できない。呼吸活性 (酸素消費) を測定すると、親株の数%に低下していた。また、チトクロームの酸化還元差スペクトル測定から、呼吸欠損株ではチトクロームが欠損していた。このことから、ミトコンドリアに大きな障害が起こっていることが示された⁵⁾。

C. albicans の呼吸はチトクローム鎖を介しておこなわれる。しかし、細胞を非栄養的条件に曝すとシアンやアンチマイシン A で阻害されないシアン耐性呼吸が発現してくる⁴⁾。呼吸欠損株でシアン耐性呼吸が発現してくるかどうかを調べたところ、その発現を確認できなかった。

別刷請求先: 青木 茂治

〒951-8580 新潟市浜浦町 1-8

日本歯科大学新潟歯学部先端研究センター

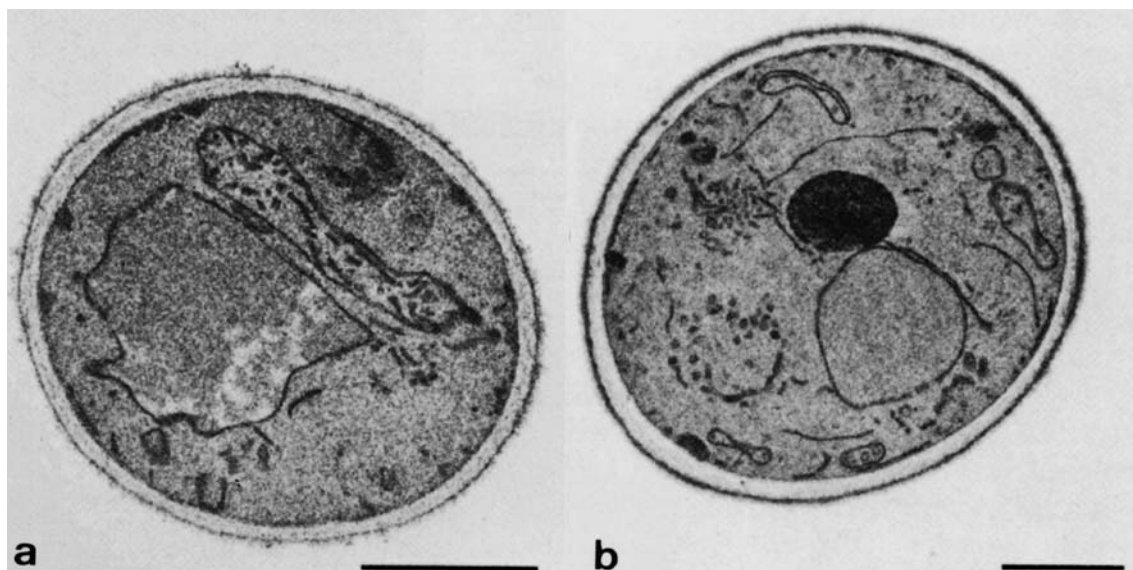


Fig. 1. Electron microscopic structures of *Candida albicans* cells. a, Wild-type strain cell; b, petite mutant cell. Cristae are not observed in mitochondria of the petite mutant cell. Bars indicate 1 μ m.

4. ミトコンドリア

親株細胞にはクリステのよく発達したミトコンドリアが認められた。一方、呼吸欠損株ではクリステのない嚢状のミトコンドリアが観察された⁵⁾ (Fig. 1)。ミトコンドリアに特異的な蛍光色素 (DASPMI) で染色すると、親株細胞では分岐をもった大きな形態のミトコンドリアが鮮明に染色された。これに対して、呼吸欠損株細胞のミトコンドリアは鮮明に染色されなかった⁸⁾。しかし、電顕の連続切片から呼吸欠損株細胞の3次元構造を構築すると、親株と同様に巨大形態のミトコンドリアが観察された。したがって、蛍光染色でミトコンドリアが観察されなかったのは、呼吸活性がないために蛍光色素による染色性が低かったためと推定された。

DNA に特異的な蛍光色素 (DAPI) で染色すると、親株細胞では核のほかに細胞質中の10個前後のミトコンドリア核様体が染色された。呼吸欠損株細胞にも同様の粒子構造が観察された⁸⁾。親株ミトコンドリアDNAの制限酵素断片を調べると、Wills ら⁹⁾ が報告した41kbpの環状構造と完全に一致した。しかし、呼吸欠損株細胞からミトコンドリアを分離することは非常に困難であった。これは呼吸欠損株のミトコンドリアはクリステを欠いているために構造的に不安定であるためではないかと推定された。結果的にミトコンドリアDNAを抽出できず、その分子構造がどうなっているかは不明のままである。

5. 病原性

実験動物に尾静脈接種したときの病原性を、50%致死量 (カンジダ細胞数/動物) で求めたところ、親株では、 7.2×10^6 /マウスおよび 4.8×10^7 /ラットであった^{10, 11)}。しかし、呼吸欠損株では接種限度の 1×10^8 細胞を接種してもマウス、ラットともにまったく致死は認められな

かった。標的器官である腎臓におけるカンジダ細胞の消長を調べたところ、親株細胞は増加したのに対して、呼吸欠損株細胞は接種直後にはやや増加するもののやがて減少した。したがって、呼吸欠損株細胞は増殖速度が遅いため、病原性を発揮できないまま宿主から排除されると示唆された。また、親株はラットに高率で関節炎を発症させるが^{12, 13)}、呼吸欠損株には発症能はなかった。

6. 活性酸素感受性と superoxide dismutase (SOD)

微生物から高等真核生物まで、好氣的細胞が消費する酸素の2~3%は活性酸素に変換する。活性酸素は細胞成分と反応して、いろいろな障害をひき起こす。細胞内での主要な活性酸素産生部位はチトクローム呼吸鎖であることを考えると、*C. albicans*の呼吸欠損株で活性酸素の産生と消去は、非常に興味ある問題である。

まず、カンジダ細胞の過酸化水素に対する感受性を調べたが、親株と呼吸欠損株では大きな差は認められなかった¹⁴⁾。つぎに細胞外および細胞内で産生されたスーパーオキシド (O_2^-) に対する感受性を調べた。カンジダ細胞をリボフラビン液に懸濁し、可視光線を照射して細胞外に産生されたスーパーオキシドに曝し、経時的に生存率を調べたところ、親株と呼吸欠損株で生存率減少に差は見られなかった。カンジダ細胞内にスーパーオキシドを産生させるためには、除草剤 paraquat (PQ) を用いた。いろいろな濃度のPQを含む寒天培地に一定数のカンジダ細胞を播き、形成されてきたコロニー数を調べた。その結果、親株はPQ濃度の上昇とともにコロニー数が減少した。これに対して、呼吸欠損株はPQに対して非感受性であった。

両株のPQに対する感受性の差にスーパーオキシドの消去酵素であるSODが関係しているかどうかを確かめるため、SODの活性とゲル電気泳動バンドを調べた。その結果、親株および呼吸欠損株細胞ともに、細胞質の

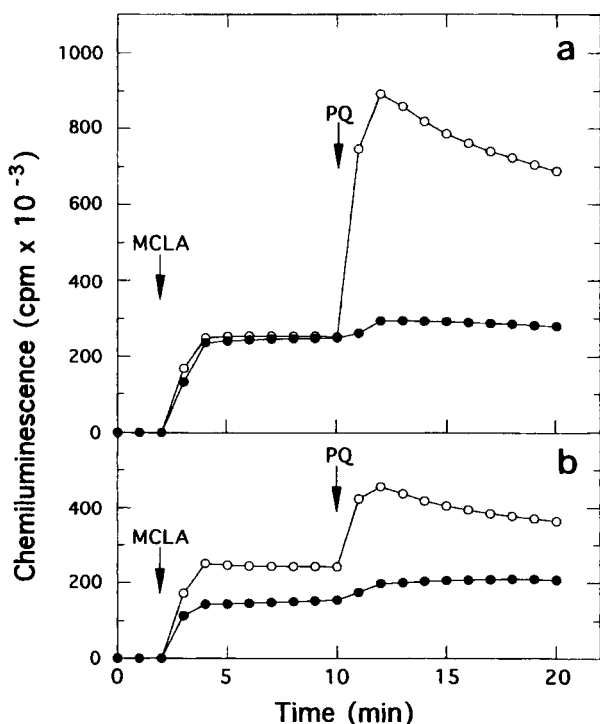


Fig. 2. Chemiluminescent measurement of superoxide generated by cells of a wild-type parent strain (a) and of a petite mutant (b). ○, exponential phase cells; ●, stationary phase cells. The chemiluminescent probe MCLA and the superoxide generator paraquat (PQ) were sequentially added to cell suspensions. Superoxide generation is vigorously stimulated by PQ in the wild-type strain. Higher superoxide generation is observed in exponential phase cells in both strains, as compared with stationary phase cells.

CuZn-SOD とミトコンドリアの Mn-SOD が検出された。しかし、呼吸欠損株では親株に比べて Mn-SOD が少なかった。したがって、PQ に対する両株の感受性の差は、SOD の種類と量からは説明できなかった。親株と呼吸欠損株の PQ に対する感受性の差は、SOD の質的・量的差によるものではないことが明らかになった¹⁴⁾。

7. 活性酸素産生の測定と画像化

PQ は細胞内で適当な電子伝達系から 1 電子を受けて PQ ラジカルに変わることが知られている。この PQ ラジカルは、細胞内で分子酸素に電子を渡しスーパーオキシド (O_2^-) を産生する。したがって、もし呼吸系から電子の供給がされていると仮定すると、呼吸欠損株では電子の供給が十分でないためにスーパーオキシド産生も少ないと推定される。そして、結果的に呼吸欠損株は PQ に対して抵抗性を示したと考えられる。

このことを解決するために、カンジダ細胞からのスーパーオキシド産生を直接測定を試み、ウミホタルシフェリン類似体 (MCLA) を用いた化学発光法を開発した¹⁵⁾。その結果、PQ によるスーパーオキシド産生は、呼吸欠損株に比べて親株ではるかに旺盛であった。また、発育時期との関係を見ると、対数増殖中期が

旺盛で、定常期には減少していた (Fig. 2)。これにより、親株と呼吸欠損株の PQ に対する感受性の差がスーパーオキシド産生量の違いで説明できた。親株発育過程におけるスーパーオキシド産生は、呼吸活性および SOD 活性の消長と一致しており、これらの 3 つの酸素関連活性が連動していることが示された¹⁵⁾。

つぎにカンジダ細胞からの活性酸素産生をより詳細に観察するため、超高感度カメラで画像として捉えることを試みた。寒天培地上で発育している親株および呼吸欠損株のコロニーに MCLA と PQ の混液を静かに滴下し、暗黒下で活性酸素による MCLA の発光をカメラで記録した。親株の生長中のコロニーでは、その周辺部からの発光が強かった¹⁶⁾。すなわち、コロニー中心部に老化した細胞を残しながら周辺部の呼吸活性の高い若い細胞が盛んに増殖している様子がうかがえた。呼吸欠損株のコロニーからの活性酸素産生は弱かった。現在単一のカンジダ細胞からの活性酸素産生を記録する条件を検討しているが、もしこれが可能になれば細胞内での活性酸素産生の部位などについての新しい情報が得られるであろう。

8. 活性酸素による Amphotericin B 活性の増強

Amphotericin B (AmB) の抗真菌活性は、真菌の細胞膜に結合・破壊して細胞質を漏出させることにある。ところで AmB の活性発現には酸化的障害に関連していることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。そこで AmB の抗カンジダ活性に対してスーパーオキシドがどのような効果を示すかを調べた。液体培養において、PQ は単独ではカンジダの増殖を阻害しない濃度範囲で、親株に対する AmB の最小発育阻止濃度 (MIC) を約 1/10 にまで低下させた。一方呼吸欠損株では、親株で観察されたような著明な MIC の低下は見られなかった²⁰⁾。このような PQ による AmB の抗カンジダ活性の増強は、寒天培地でのディスク法でも確認された。活性酸素の作用は、少なくとも細胞質の漏出とは関係ないことが分かったが、なお詳細な検討をしている。

9. 将来への展望

最後に、呼吸欠損株のカンジダ研究への応用について述べる。とくに新しい応用が期待されるのは活性酸素研究分野である。ドイツのグループはカンジダの二形性との関係で、酵母形より菌糸形の細胞の方が活性酸素を旺盛に産生していることから、病原性との関連性を指摘している²¹⁾。われわれも同様の観察をしている²²⁾。活性酸素の毒性を考えると、病原性との関係は今後大事な課題となり、カンジダにおける活性酸素産生と SOD との関係もさらに解明する必要がある。また、AmB の他に唾液中の抗菌物質 histatin 5²³⁾ や miconazole²⁴⁾ の作用には活性酸素が関係していることが報告されている。これらの研究には、呼吸欠損株が有用な材料となる。

われわれは呼吸を通して *C. albicans* を研究してきたが、たとえばその菌糸伸長は屈気性を示すことから、本菌種

は酸素要求性が高いとの印象をもっている²⁵⁾。カンジダ酵母と酸素との関係は、まだまだ多くの研究課題を含んでいる。

謝 辞

本総説で記載した研究成果の一部は、つぎの方々との共同研究によるものであり、ここに深謝いたします（敬称略）。又賀 泉・岡本祐一（本学口腔外科学第2講座）、馬島敏郎・増居茂樹（ポーラ化成工業・医薬品部）、竹尾漢治（千葉大学・真菌医学研究センター）、長船哲齊（日本体育大学・生命科学講座）、Valerio Vidotto（トリノ大学・感染症研究所）。研究の一部は科学研究費（63570880, 13671788, 16591843）の補助を受けました。

文 献

- 1) Ephrussi B, Hottinguer H, Chimenes AM: Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann Inst Pasteur **76**: 351-357, 1949.
- 2) Bulder CJEA. Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. Antonie van Leeuwenhoek **30**: 1-9, 1964.
- 3) Aoki S, Ito-Kuwa S: Respiration of *Candida albicans* in relation to its morphogenesis. Plant Cell Physiol **23**: 721-726, 1982.
- 4) Aoki S, Ito-Kuwa S: The appearance and characterization of cyanide-resistant respiration in the fungus *Candida albicans*. Microbiol Immunol **28**: 393-406, 1984.
- 5) Aoki S, Ito-Kuwa S: Induction of petite mutation with acriflavine and elevated temperature in *Candida albicans*. J Med Vet Mycol **25**: 269-277, 1987.
- 6) Aoki S, Yamaguchi H: Isolation and characterization of petite mutants of *Candida albicans*. In: Molecular Biology of Pathogenic Fungi: A Laboratory Manual (Maresca B, Kobayashi GS eds). p.207-211, Telos Press. New York, 1994.
- 7) Nagai S: Diagnostic color differentiation plate for hereditary respiration deficiency in yeasts. J Bacteriol **86**: 299-302, 1963.
- 8) Ito-Kuwa S, Aoki S, Watanabe T, Ehara T, Osafune T: Fluorescence microscopic studies on mitochondria and mitochondrial nucleoids in a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol **26**: 207-217, 1988.
- 9) Wills JW, Troutman WB, Riggsby WS: Circular mitochondrial genome of *Candida albicans* contains a large inverted duplication. J Bacteriol **165**: 7-13, 1985.
- 10) Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T: Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans*. Zbl Bak **273**: 332-343, 1990.
- 11) Ito-Kuwa S, Aoki S, Nakamura Y, Masuhara T: Virulence of a wild-type strain and a petite mutant of *Candida albicans* toward rats. Jpn J Oral Biol **32**: 702-705, 1990.
- 12) Nakamura Y, Masuhara T, Ito-Kuwa S, Aoki S: Induction of experimental *Candida* arthritis in rats. J Med Vet Mycol **29**: 179-192, 1991.
- 13) Nakamura Y, Noda S, Masuhara T, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S: Radiographic features of experimental *Candida* arthritis in rats. Mycopathologia **121**: 65-75, 1993.
- 14) Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S, Osafune T, Vidotto V, Pienthaweechai K: Oxidative stress sensitivity and superoxide dismutase of a wild-type parent strain and a respiratory mutant of *Candida albicans*. Med Mycol **37**: 307-314, 1999.
- 15) Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Nakamura Y, Vidotto V, Takeo K: Chemiluminescence of superoxide generated by *Candida albicans*: differential effects of the superoxide generator paraquat on a wild-type strain and a respiratory mutant. Med Mycol **40**: 13-19, 2002.
- 16) Masui S, Majima T, Nakamura K, Ito-Kuwa S, Takeo K, Aoki S: Chemiluminescent visualization of superoxide generated by *Candida albicans*. Med Mycol **42**: 427-432, 2004.
- 17) Sokol-Anderson ML, Brajtbrug J, Medoff G: Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. J Infect Dis **154**: 76-83, 1986.
- 18) Sokol-Anderson M, Sligh Jr JE, Elaberg S, Brajtbrug J, Kobayashi GS, Medoff G: Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother **32**: 702-705, 1988.
- 19) Hamilton AJ, Holdom MD: Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. Med Mycol **37**: 375-389, 1999.
- 20) Okamoto Y, Aoki S, Mataga I: Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. Mycopathologia **158**: 9-15, 2004.
- 21) Schröter C, Hipler UC, Wilmer A, Kunkel W, Wollina U: Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. Arch Dermatol Res **292**: 260-264, 2000.
- 22) Masui S, Majima T, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Aoki S: Visualization of superoxide generated from colonies of *Candida albicans*. Luminescence **19**: 162, 2004. (Abstract)
- 23) Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG: The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA **98**: 14637-14642, 2001.
- 24) Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N: Dendogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. Antimicrob Agents Chemother **46**: 3113-3117, 2002.
- 25) Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Vidotto V, Takeo K: Oxygen as a possible tropic factor in hyphal growth of *Candida albicans*. Mycoscience **39**: 231-238, 1998.

Cell Biology of Respiration-deficient Mutants of *Candida albicans*Shigeji Aoki¹, Shoko Ito-Kuwa¹, Kenjiro Nakamura¹,
Yasunori Nakamura²¹Advanced Research Center and ²Department of Pharmacology, Nippon Dental University at Niigata,
1-8 Hamaura-cho, Niigata 951-8580, Japan

Respiration-deficient (petite) mutation is caused by hereditary impairment in mitochondrial functions. Yeasts have been grouped into “petite-positive” and “petite-negative” yeasts. *Candida albicans* has been regarded as a member of the petite-negative yeasts in which the respiration deficiency cannot be easily induced. We have succeeded in inducing the petite mutation in *C. albicans* by culturing in the presence of a chemical mutagen, acriflavine, at an elevated temperature. In the present review, we describe the cell biology of *C. albicans* petite mutants on the basis of experiments performed by our research group: namely, on respiratory activity and cytochrome composition, fine structures of cells and mitochondria, mitochondrial DNA structure, pathogenicity, oxidative stress sensitivity, generation of reactive oxygen species (ROS) and the roles of ROS in antifungal actions. We discuss also the usefulness of petite mutants in *Candida* research.

この論文は、第48回日本医真菌学会総会の“シンポジウム3：カンジダとカンジダ感染症の研究の現状－基礎と臨床の連携を目指す－”において発表されたものです。