

【総説】

病原真菌におけるカルシニューリン情報伝達経路の解明と新たな真菌症治療戦略への応用

宮崎 泰可・河野 茂

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座（第二内科）*

（平成23年7月29日受付・平成23年8月2日受理）

現在の抗真菌薬には抗真菌スペクトルや副作用の問題があり、臨床医の治療薬選択の余地は狭く、特に免疫不全患者に発症した侵襲性真菌感染症は治療に難渋することも少なくない。有効な治療法を開発していくには、病原真菌のストレス応答機序や病原因子を解明し、真菌特異的な治療標的分子を同定する必要がある。これまでに、*Candida albicans* や *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* などいくつかの主要な病原真菌において、タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが、種々のストレス応答に重要な役割を担っていることが明らかにされている。カルシニューリン情報伝達経路の阻害は菌の病原性を低下させるのみならず、既存抗真菌薬の有効性を高め、同時に耐性化の抑制効果も併せ持つ新たな真菌症治療戦略として期待される。本稿では、われわれの *Candida glabrata* における知見を中心に、病原真菌のカルシニューリン情報伝達機構について概説したい。

Key words: *Candida glabrata*, calcineurin, Crz1, drug-resistance, virulence

深在性真菌症は、主に免疫不全患者における日和見感染症として発症し、致死経過をとることも少なくない。一般に、*Candida* 感染症は最も高頻度に見られる真菌症の一つであり、*Candida* 属は菌血症患者から分離される原因微生物の第4位を占める。なかでも、*Candida albicans* に次いで分離頻度の高い *Candida glabrata* は、アゾール系薬、特にフルコナゾールに対して低感受性であり、有効な治療薬の投与が遅れることも多い¹⁾。*Aspergillus fumigatus* などの *Aspergillus* 属による侵襲性アスペルギルス症は、高度免疫不全患者では高い致死率を示す²⁾。*Cryptococcus neoformans* や *Cryptococcus gattii* による肺クリプトコックス症は健康人にも発症し、免疫不全患者においてはしばしば重篤な髄膜炎を合併する³⁾。現在、これらの真菌症に対して有効な抗真菌薬はきわめて限られており、新たな治療薬の開発は急務とされている。新規抗真菌薬やワクチンの標的分子を探索し、有効な抗真菌治療戦略を開発していくには、菌側の病原因子やストレス応答機序の詳細な解明が必要不可欠である。そこでわれわれは、種々のストレス応答に関与しているカルシニューリン情報伝達経路に着目し、研究を進めている。本稿では、病原真菌、特に *C. glabrata* におけるカルシニューリン情報伝達経路の役割について、筆者らのデータを中心に紹介したい。

I. *Candida glabrata* の特徴

C. glabrata は、一般にカンジダ血症の原因真菌として *C. albicans* に次ぐ分離頻度であり、カンジダ症の予防および治療に頻用されているフルコナゾールに低感受性である。有効な治療薬が限られており、*C. glabrata* 感染症は

治療に難渋する場合も少なくない。*C. glabrata* は臨床上重要な菌種であることに加え、本真菌を用いた分子生物学的研究には以下のような利点がある。①1倍体であり遺伝子操作が比較的容易であること、②モデル酵母である *Saccharomyces cerevisiae* に遺伝子背景が近いこと、*S. cerevisiae* で得られた知見や実験ツールがある程度応用可能であること、③ *S. cerevisiae* では行えない病原性の研究に利用できることなどである。尚、*C. glabrata* の genome database は、フランス・パスツール研究所を中心としたゲノムプロジェクトによってつくられ、Genolevures (<http://www.genolevures.org/>) に公開されている⁴⁾。

II. カルシニューリンとカルシニューリン情報伝達経路

カルシニューリンは、カルシウム依存性に活性化されるタンパク質脱リン酸化酵素である。触媒サブユニット calcineurin A (CNA) と制御サブユニット calcineurin B (CNB) によるヘテロダイマーを構成しており、どちらか一方でも欠けると、その酵素活性は失われる^{5,6)}。カルシニューリンを介した細胞内シグナル伝達は種々のストレス応答に関与していることが *S. cerevisiae* などでも明らかにされており、その主たるシグナル伝達機序を Fig. 1 に示す。ある種のストレスを受けた細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、カルモデュリン- Ca^{2+} 複合体が形成される。カルシニューリン触媒サブユニットはこの複合体と結合することによって自己抑制ドメインによる触媒部位

*長崎県長崎市坂本1-7-1

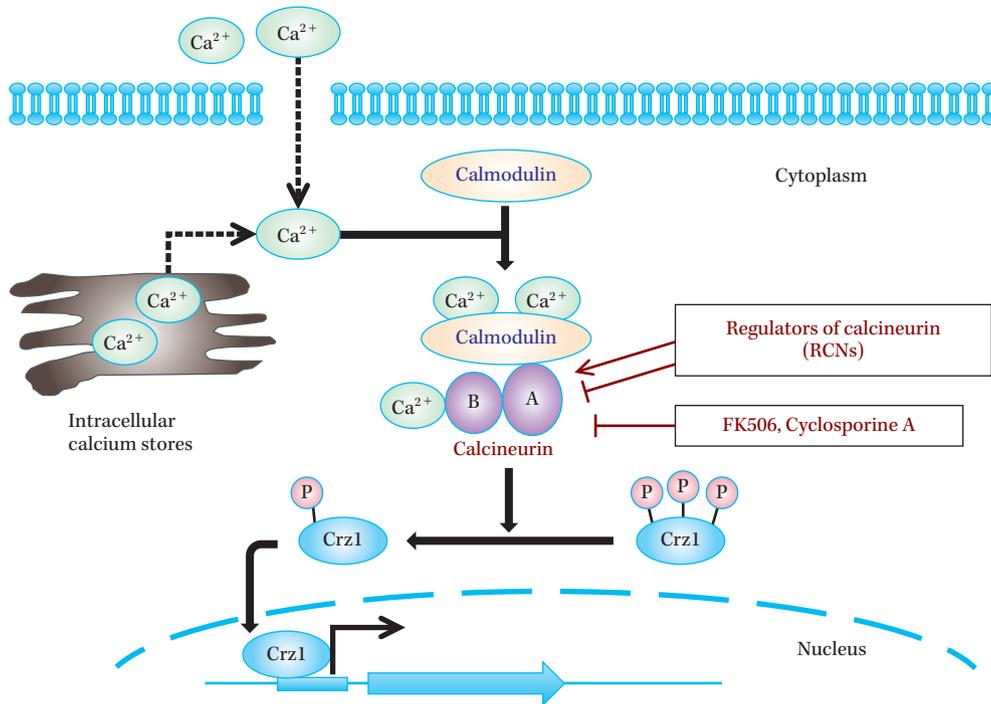


Fig. 1. Schematic representation of the calmodulin-calcineurin-Crz1 signaling pathway in yeast. When fungal cells are exposed to certain environmental stimuli, the intracellular calcium concentration increases, and then the calmodulin- Ca^{2+} complex binds to the catalytic subunit of calcineurin to activate calcineurin. Active calcineurin dephosphorylates the downstream transcription factor Crz1 in the cytoplasm. The dephosphorylated Crz1 translocates to the nucleus and subsequently induces transcription of its target genes to activate various cellular processes.

Table 1. Azole susceptibilities of the *C. glabrata* strains¹⁴⁾

Strain	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	fluconazole	itraconazole	voriconazole	miconazole
Wild-type	16	2	0.25	0.5
Δcnb1	4	0.5	0.125	0.125
$\Delta\text{cnb1} + \text{CNB1}$	16	2	0.25	0.5
Δcrz1	32	1	0.5	1
$\Delta\text{crz1} + \text{CRZ1}$	16	1	0.25	0.5

の抑制が解かれ、カルシニューリンが活性化される^{6,7)}。活性化されたカルシニューリンは、標的分子である Crz1 転写調節因子を脱リン酸化する。細胞質内で脱リン酸化された Crz1 は、その後核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節することによって種々の細胞反応を促進する⁸⁻¹⁰⁾。

カルシニューリンは真核生物において広く保存されており、ヒトでは、FK506 (タクロリムス) や cyclosporine A (シクロスポリン) といったカルシニューリン阻害剤が免疫抑制剤として臨床使用されている。これらは真菌細胞においてもカルシニューリン情報伝達経路の阻害作用を示す^{7,11)}。また、カルシニューリン情報伝達経路の活性は、regulators of calcineurin (RCNs) と呼ばれる内因性の制御因子によっても調節されている^{12,13)}。

III. カルシニューリンの阻害が *C. glabrata* の抗真菌薬感受性に与える影響

われわれは、*C. glabrata* のカルシニューリン情報伝達経路と抗真菌薬耐性の関連を調べるため、カルシニューリンの制御サブユニットをコードしている *CNB1* 遺伝子、およびカルシニューリンの標的転写因子をコードしている *CRZ1* 遺伝子の欠損株をそれぞれ作製し、その表現型の解析を行った¹⁴⁾。各遺伝子欠損株は、one-step PCR 法により増幅した deletion construct (*HIS3* 選択マーカー) と標的遺伝子との相同組換えを利用して作製した^{14,15)}。標的遺伝子の回復株はプラスミドを用いて作製した。

各 *C. glabrata* 株に対するアゾール系薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を Table 1 に示す。カルシニューリン欠損株

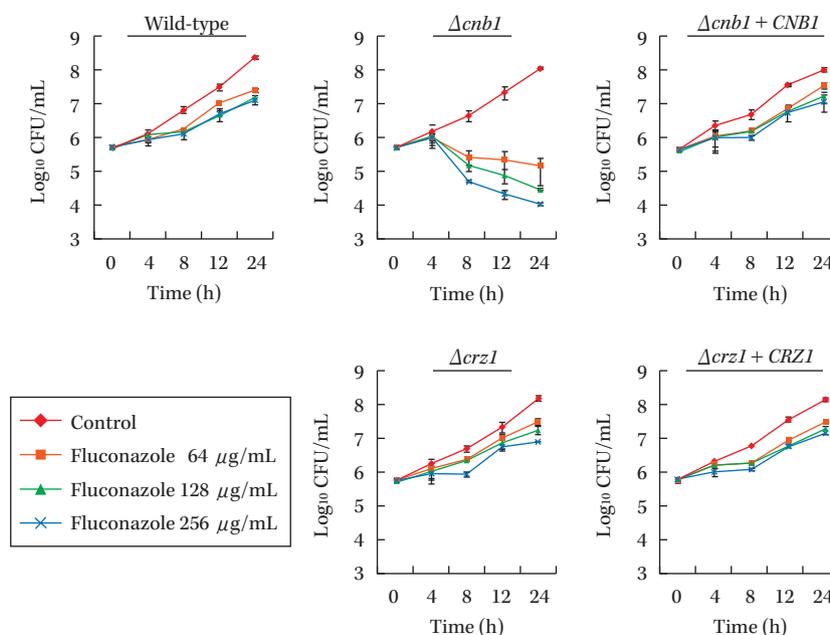


Fig. 2. Time-kill curves of *C. glabrata* wild-type and mutant strains exposed to fluconazole. Logarithmic-phase cells (5×10^5 CFU/mL) were incubated in minimal medium with agitation in the presence or absence of fluconazole at the indicated concentrations. Viable cell counts were determined by plating appropriate dilutions on yeast extract-peptone-dextrose plates at each time point. The limit of quantitation was 50 CFU/mL. Geometric means and standard deviations for three independent experiments are shown.

($\Delta cnb1$) は、野生株と比較して高いアゾール感受性を示したが、 $Crz1$ 転写調節因子欠損株 ($\Delta crz1$) ではアゾール感受性の増強は認められなかった。このことより、*C. glabrata* のカルシニューリンは $Crz1$ 非依存性の機序でアゾール耐性に関与している可能性が示唆された。次にわれわれは、標準的な time-kill assay^{16,17)} を用いて、フルコナゾール存在下での経時的な生菌数のモニタリングを行った (Fig. 2)。 *C. glabrata* の野生株、 $\Delta crz1$ 株、各遺伝子回復株は、高濃度のフルコナゾールに曝露されても増殖を続けることが可能であった。一方、 $\Delta cnb1$ 株は、通常の培養環境では野生株と同等の増殖能を示すが、フルコナゾール存在下では生菌数の有意な減少が確認された。アゾール系薬による真菌細胞の増殖抑制は、通常静菌的作用であり、このことが耐性菌を生み出す一因ともされている。今回の実験結果から、カルシニューリンを阻害することによって、フルコナゾールに殺菌的作用を誘導できることが確認された。

また、*C. glabrata* におけるカルシニューリンの欠損は、アムホテリシン B 感受性には影響を与えないが、カンディン系薬ミカファンギンに対する感受性を高めることが確認された¹⁴⁾。ミカファンギンは β -D-グルカンの合成阻害剤であるが、他に β -D-グルカンとキチンのファイバー形成を阻害する Congo red やキチンのポリマー形成を阻害する calcofluor white など細胞壁ストレスを

誘導する薬剤として知られている。 $\Delta cnb1$ 株ではこれらの薬剤に対する寛容性が著しく低下しており (Fig. 3)、カルシニューリンは細胞壁ストレス応答にも重要な役割を担っていることが示唆された。一方、 $CRZ1$ の欠損は、 $\Delta cnb1$ 株とほぼ同等のミカファンギン感受性を誘導したが、Congo red に対してはわずかに感受性を高めたのみで、calcofluor white 感受性に対してはまったく影響を及ぼさなかった (Fig. 3)。このことより、細胞が受けたストレスの種類に応じて、カルシニューリンは $Crz1$ 依存性および非依存性の機序でストレス応答に関与していることが示唆された。

C. glabrata はアゾール系薬に低感受性であることが最も重要な問題であるが、カルシニューリンを阻害することによって、フルコナゾールに殺菌的作用を誘導し、また、他のアゾール系薬やミカファンギンに対しても感受性を高めることが可能であった。

IV. カルシニューリンの阻害が *C. glabrata* の病原性に与える影響

C. glabrata の病原性解析では、免疫抑制をかけていないマウスに菌を経静脈的に接種し、約 1 週間後に腎臓、脾臓、肝臓などの感染臓器内菌数を比較する手法が一般的に用いられている^{18,19)}。われわれの研究においても、*C. glabrata* の野生株、 $\Delta cnb1$ 株、 $\Delta crz1$ 株および各遺伝子回復株の病原性を、上述の播種性カンジダ症マウスモデル

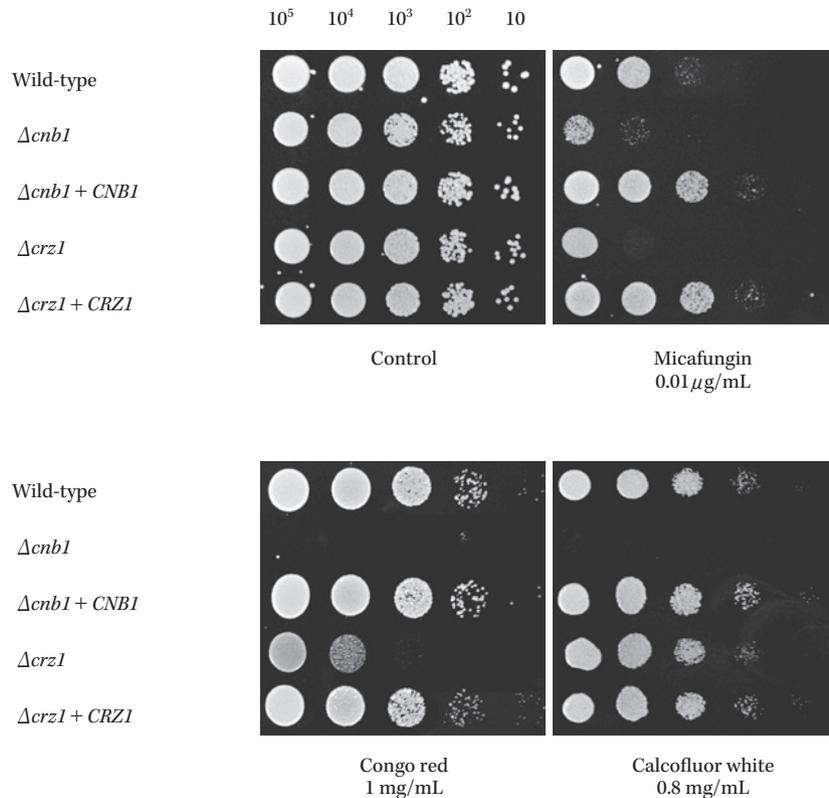


Fig. 3. Spot dilution assay¹⁴⁾. Serial 10-fold dilutions of *C. glabrata* log-phase cells were spotted onto minimal medium plates containing micafungin, Congo red, or calcofluor white at the indicated concentrations. Plates were incubated at 30°C for 48 h. All sensitivity tests were repeated at least three times.

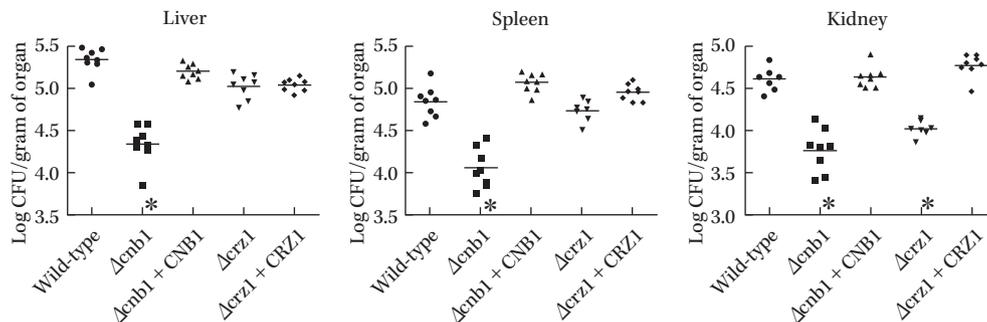


Fig. 4. Virulence assay using a mouse model of disseminated candidiasis¹⁴⁾. Groups of 8 mice were intravenously inoculated with 8×10^7 cells for each *C. glabrata* strain. Three target organs (liver, spleen, and bilateral kidneys) were excised 7 days after injection. Appropriate dilutions of organ homogenates were plated, and the numbers of CFU were counted after 3 days of incubation at 30°C. Numbers of recovered CFU from each organ are indicated for individual mice in the scatter plots. The geometric mean is shown as a bar. Representative data of two independent experiments are shown. *, $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis test with Dunn's posttest).

を用いて解析した¹⁴⁾。それぞれ、0.2 mL の菌液 (4×10^8 cells/mL) を尾静脈より接種し、7 日後の臓器内菌数を比較した。 $\Delta cnb1$ 株を感染したマウスの肝臓、脾臓、腎臓内菌数は、野生株および CNB1 回復株を感染したマウスと比較して有意に少なく、 $\Delta cnb1$ 株の病原性の低下が確認

された (Fig. 4)。一方、 $\Delta crz1$ 株の腎臓内菌数は野生株よりも有意に少なかったが、肝臓および脾臓内菌数については野生株と有意差がみられなかった。

以上の結果より、*C. glabrata* のカルシニューリンは病原性に重要であり、Crz1 がその部分的な役割を担ってい

ると考えられた。つまり、カルシニューリンによって調節されている Crz1 依存性および非依存性の経路はともに病原性に関与しているものと推察される。

V. 内因性のカルシニューリン制御因子

カルシニューリンはカルモデュリン-Ca²⁺複合体によって活性化されるが、それとは別にカルシニューリン活性を調節している内因性のカルシニューリン制御因子が *S. cerevisiae* で同定され、Rcn1 と名付けられた¹²⁾。Rcn1 が過剰発現すると、他のカルシニューリン標的分子と競合してカルシニューリンに結合するため、下流へのシグナル伝達が抑制される。一方、Rcn1 はカルシニューリンの生合成もしくは再利用の課程でシャペロンとしても機能しており、生理的な発現レベルの場合にはカルシニューリンの活性化に寄与している。つまり、Rcn1 はその発現の程度によってカルシニューリンを活性化と抑制の両方向に調節することができ、カルシニューリンから下流へのシグナル伝達を微調整している。

近年、*S. cerevisiae* で Rcn2 が同定された¹³⁾。Rcn2 は、Rcn1 と同様、過剰発現するとカルシニューリンからのシグナル伝達を抑制するが、Rcn1 のようなカルシニューリン活性化の機能は有していない。Rcn1 ではカルシニューリンの活性化に必要なドメインとリン酸化部位が同定されており、これらは酵母からヒトにいたるまで保存されている。一方、Rcn2 は下等真核生物にのみ存在し、Rcn1 に認められたようなカルシニューリン活性化に必要なドメインは同定されていない。これまでに、*C. albicans* の Rcn1 ホモログが *S. cerevisiae* の Rcn1 と同様の機能を有していることは確認されているが²⁰⁾、病原真菌で Rcn2 についての報告はない。われわれは、*C. glabrata* の Rcn1 および Rcn2 を同定し、それぞれ *S. cerevisiae* のホモログと類似の機能を有していることを確認した（未発表データ）。今後、他の病原真菌でも解析が必要であるが、内因性のカルシニューリン制御因子を介したカルシニューリン情報伝達経路の阻害は、将来的な真菌症治療戦略の一つになりえるかもしれない。

VI. 他の病原真菌におけるカルシニューリン情報伝達経路の役割

カルシニューリンが抗真菌薬に対する抵抗性と病原性の両者において重要な役割を担っていることは、*C. albicans*、*Candida dubliniensis*、*C. neoformans*、*A. fumigatus* など他の病原真菌においても明らかにされている¹¹⁾。カルシニューリン欠損株の表現型には菌種に特異的なものもあり、例えば、*C. albicans* や *C. dubliniensis* では血清感受性の増強^{21, 22)}、*C. neoformans* では 37°C での発育不能^{23, 24)}、*A. fumigatus* においては通常の培養環境でも著しい形態異常と発育の阻害が認められる²⁵⁾。いずれも病原性低下の一因と考えられる。

また、heat shock protein 90 (Hsp90) は分子シャペロンとして機能しており、カルシニューリンはその client

の一つである。Cowen らは、*C. albicans* や *A. fumigatus* の Hsp90 を阻害すると、カルシニューリンが正常に機能せず、アゾール系およびキャンディン系薬に対する感受性の増強と著しい病原性の低下が誘導されることを報告している²⁶⁻³¹⁾。

このように、主要な病原真菌においては、カルシニューリンが抗真菌薬耐性と病原性の両者に関与していることが明らかにされている。しかし、カルシニューリンよりも下流のシグナル伝達機序、特に Crz1 非依存性経路については未解明な点も多く残されている。

VII. おわりに

近年、新規抗真菌薬の開発が滞りを見せるなか、われわれは病原性の制御や既存の抗真菌薬の有効利用にも目を向け、新たな治療戦略を開発していく必要がある。カルシニューリンは、種々のストレス抵抗性に関与し、感染宿主内での生育に重要な役割を担っていることが主要な病原真菌においてすでに証明されており、新たな治療標的候補として注目されている^{7, 11)}。しかし、カルシニューリンは病原真菌で高度に保存されている一方で、ヒトにもそのホモログが存在するため、阻害剤の選択毒性が最も重要な課題である。タクロリムスやシクロスポリンのような現在臨床で使用されているカルシニューリン阻害剤は免疫抑制作用を有しており、そのまま抗真菌薬として使用することは困難である。しかし、免疫抑制作用を有さないカルシニューリン阻害剤もすでにいくつか開発されており³²⁻³⁵⁾、これらは真菌症の治療を大きく発展させるものと期待される。また、病原真菌特異的なカルシニューリン関連分子は抗真菌薬の新規標的になりえると考えられ、現在多くの研究者がその検索に取り組んでいる。カルシニューリン、もしくはその関連分子の阻害は菌の病原性を低下させるのみならず、既存抗真菌薬の有効性を高め、同時に耐性化の抑制効果も併せ持つ新たな真菌症治療戦略として期待される。

謝辞

千葉大学の知花博治先生、鈴鹿医療科学大学の中山浩伸先生には、*C. glabrata* 2001T 株およびプラスミド pCgACT をお譲りいただき深謝いたします。本論文は、第 59 回日本化学療法学会総会（2011 年 6 月、札幌）で受賞した「第 22 回上田記念感染症・化学療法研究奨励賞」の援助により達成されたものであり、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Pfaller M A, Diekema D J: Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 2010; 36: 1-53
- 2) Marr K A, Carter R A, Crippa F, Wald A, Corey L: Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 909-17
- 3) Chayakulkeeree M, Perfect J R: Cryptococcosis. In-

- fect Dis Clin North Am 2006; 20: 507-44, v-vi
- 4) Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, et al: Genome evolution in yeasts. *Nature* 2004; 430: 35-44
 - 5) Aramburu J, Rao A, Klee C B: Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36: 237-95
 - 6) Hemenway C S, Heitman J: Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys* 1999; 30: 115-51
 - 7) Bastidas R J, Reedy J L, Morales-Johansson H, Heitman J, Cardenas M E: Signaling cascades as drug targets in model and pathogenic fungi. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; 9: 856-64
 - 8) Cai L, Dalal C K, Elowitz M B: Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature* 2008; 455: 485-90
 - 9) Matheos D P, Kingsbury T J, Ahsan U S, Cunningham K W: Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1997; 11: 3445-58
 - 10) Stathopoulos A M, Cyert M S: Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 1997; 11: 3432-44
 - 11) Steinbach W J, Reedy J L, Cramer R A Jr, Perfect J R, Heitman J: Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 418-30
 - 12) Kingsbury T J, Cunningham K W: A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 2000; 14: 1595-604
 - 13) Mehta S, Li H, Hogan P G, Cunningham K W: Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 2777-93
 - 14) Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, et al: Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1639-43
 - 15) Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, et al: Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res* 2010; 10: 343-52
 - 16) Klepser M E, Ernst E J, Lewis R E, Ernst M E, Pfaller M A: Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1207-12
 - 17) Pfaller M A, Sheehan D J, Rex J H: Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 268-80
 - 18) Jacobsen I D, Brunke S, Seider K, Schwarzmüller T, Firon A, d'Enfert C, et al: *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infect Immun* 2010; 78: 1066-77
 - 19) Kaur R, Ma B, Cormack B P: A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7628-33
 - 20) Reedy J L, Filler S G, Heitman J: Elucidating the *Candida albicans* calcineurin signaling cascade controlling stress response and virulence. *Fungal Genet Biol* 2009; 47: 107-16
 - 21) Blankenship J R, Wormley F L, Boyce M K, Schell W A, Filler S G, Perfect J R, et al: Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot Cell* 2003; 2: 422-30
 - 22) Chen Y L, Brand A, Morrison E L, Silao F G, Bigol U G, Malbas F F Jr, et al: Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryot Cell* 2011; 10: 803-19
 - 23) Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti D L, Perfect J, Heitman J: Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* 1997; 16: 2576-89
 - 24) Fox D S, Cruz M C, Sia R A, Ke H, Cox G M, Cardenas M E, et al: Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2001; 39: 835-49
 - 25) Steinbach W J, Cramer R A Jr, Perfect B Z, Asfaw Y G, Sauer T C, Najvar L K, et al: Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 1091-103
 - 26) Shapiro R S, Uppuluri P, Zaas A K, Collins C, Senn H, Perfect J R, et al: Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. *Curr Biol* 2009; 19: 621-9
 - 27) Cowen L E: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 187-98
 - 28) Cowen L E: Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000471
 - 29) Singh S D, Robbins N, Zaas A K, Schell W A, Perfect J R, Cowen L E: Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000532
 - 30) Cowen L E, Singh S D, Köhler J R, Collins C, Zaas A K, Schell W A, et al: Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 2818-23
 - 31) Cowen L E, Lindquist S: Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 2005; 309: 2185-9
 - 32) Cruz M C, Del Poeta M, Wang P, Wenger R, Zenke G, Quesniaux V F, et al: Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 143-9
 - 33) Cruz M C, Goldstein A L, Blankenship J R, Del Poeta

- M, Davis D, Cardenas M E, et al: Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. EMBO J 2002; 21: 546-59
- 34) Odom A, Del Poeta M, Perfect J, Heitman J: The immunosuppressant FK 506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 156-61
- 35) Onyewu C, Blankenship J R, Del Poeta M, Heitman J: Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 956-64

Elucidation of the calcineurin signaling pathway in pathogenic fungi to develop a novel antifungal strategy

Taiga Miyazaki and Shigeru Kohno

Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, Japan

Invasive fungal infections which have developed in immunocompromised patients are often difficult to treat in part because physicians have very few therapeutic options and the current antifungal agents have some issues regarding adverse effects and a limited antifungal spectrum. Elucidation of stress response mechanisms and virulence factors in pathogenic fungi is required to develop an effective antifungal strategy, in addition to the identification of a fungal-specific molecule. It has been reported that the protein phosphatase calcineurin plays critical roles in various stress responses in several important fungal pathogens including *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*. Inhibition of calcineurin signaling has attracted attention as a novel antifungal strategy that attenuates fungal virulence and increases the efficacy of the existing antifungals while concurrently suppressing the development of antifungal resistance. This article outlines the calcineurin-signaling cascade in pathogenic fungi especially focusing on our data in *Candida glabrata*.