

令和元年6月17日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08791

研究課題名(和文) 病原真菌の鉄欠乏応答システムの解明に基づいた真菌感染症の治療戦略の創製

研究課題名(英文) Development of therapy for fungal infections based on understanding the system to cope with iron starvation in pathogenic fungi

研究代表者

中山 浩伸 (Nakayama, Hironobu)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：40369989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：真菌の鉄欠乏ストレスの応答機構の解明にむけ、鉄欠乏時に働く遺伝子群の同定や機能解析を行なった結果、転写因子SEF1やミトファジーの開始因子ATG32が鉄欠乏に応答した因子で、抗真菌薬の標的候補として有望であることが示唆された。さらに、鉄結合ストレスとは関連しなかったものの、バキュオロ・プロトンATPaseのアッセムブリー因子VPH2の実験から、バキュオロ・プロトンATPaseが抗真菌薬の標的となりうる可能性や薬剤耐性機構に関連する新たな知見を見いだした。このように、本研究の成果は、真菌治療薬の開発につながる知見示したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、宿主体内での生存において重要となる鉄欠乏環境に適応した真菌の鉄恒常性の維持機構の解明に貢献する知見となる。また、深在性真菌症は免疫不全患者に発症する感染症として、医療の高度化や人口の高齢化などに関連して増加の一途をたどり、新しい真菌感染症の治療薬の開発が急務となっている社会背景において、有効な真菌感染の診断や治療につながる標的を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Current therapies for treating systemic fungal infection have limited effectiveness and have created problems of adverse reactions and drug resistance. These issues therefore motivate us to develop novel antifungals. We focused on stress response for iron starvation to identify potential targets for novel antifungals because iron starvation occurs in blood, where pathogenic fungi often infect. As the results of several studies including transcriptomics and fungal-infection models, we revealed that SEF1(transcription factor controlling iron uptake) and ATG32 (mitochondrial outer membrane protein required to initiate mitophagy) would be promising targets for antifungals among the factors induced by iron starvation. Furthermore, we also suggested that vacuolar-ATPase would be promising targets for antifungals although VPH2 (assembly factor of vacuolar-ATPase) does NOT participate in stress response to iron starvation directly.

研究分野：微生物学、遺伝学、分子生物学

キーワード：鉄欠乏ストレス 真菌感染症 カンジダ 病原性発現 標的分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 深在性真菌症は免疫不全患者に発症する感染症として、医療の高度化や人口の高齢化などに関連して増加の一途をたどり重大な問題となっている。真菌は、細菌などと異なり真核生物であるため薬の標的分子を設定しにくいこと、感染メカニズムが未解明なことなどの理由で治療薬に限られている。また、現在使用されている真菌症の治療薬では、重篤な副作用や抗真菌スペクトラムの狭さなどがしばしば問題になるため、新しい真菌感染症の治療薬の開発が急務となっている。有効な治療法を開発する方法として、真菌のストレス環境下の応答機序の解明が挙げられ、種々の真菌を用いた多様な研究が進んでおり、小胞体ストレスの応答機構をはじめ、様々なストレス応答についての研究成果報告がなされている。

(2) 細胞内で、鉄は酸化還元反応を中心に多くの化学反応を触媒しており、増殖に必須な元素である。一方で、過剰な鉄の蓄積は無秩序な酸素の受け渡しを惹起してフリーラジカルの産生元となり細胞障害性を有するため、生物種を問わず細胞は鉄代謝を厳密に調整するシステムを備えている。真菌が、宿主体内で感染、特に全身性の血流感染を引き起こしている状態では、トランスフェリンなどの血中鉄キレートタンパク質の働きによって、菌が利用できる遊離鉄の濃度は極めて低い環境に置かれている。そのため、真菌が宿主体内で増殖し、病原性を発揮するためには、宿主体内における鉄の取り込みや鉄代謝を行うことが重要であることが示唆されている。

(3) 鉄の取込み因子の研究は各真菌で進んでおり、ヘムトランスポータやフェリチントランスポータ、シデロフォア・鉄イオントランスポータなど複数の因子が同定されている。しかしながら、それらの経路の使い方は、真菌間で共通しておらず、治療薬の標的の選定を難しくしている。また、細胞内の応答機構や細胞内の鉄の代謝調節機構についての研究は、十分に進んでおらず、治療薬の標的となる具体的な分子の発見には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、感染時におこる様々なストレスのうち、鉄欠乏ストレスに着目したもので、その際に構築される鉄代謝ネットワークの解明から、真菌症の治療戦略を創出することを目的としている。具体的には、遺伝学的解析や生化学・細胞生物学的解析から、鉄欠乏ストレスの応答因子を同定し、鉄取り込みや代謝調節との関連性の解明を進めること、そして、感染モデルを用いた実験を行い、鉄欠乏応答システムに関わる因子の宿主感染における位置づけについて確認することから、鉄欠乏応答システムの全容解明を目指す。また、そこで得られた知見をもとに抗真菌薬の標的分子の選出することや抗真菌活性をもつ化合物のスクリーニングを行うためのスクリーニング系(細胞レベルおよび組換えタンパクを用いた再構築系)の構築することで、真菌感染症の治療戦略の創製につなげる。

3. 研究の方法

カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*) は、カンジダ・アルビカンズ (*C. albicans*) に次いで多く分離される真菌で、臨床上重要な菌種であることに加え、ゲノム配列が公開されていること、1 倍体であることや分子生物学的研究のツールが揃っていることに加え、マウスやカイコなどを用いた感染モデルが確立している。本研究は、適宜、研究分担者および研究協力者の協力を得ながら、主にこの真菌を用いて下記の方法により、鉄欠乏ストレスに応答する因子の同定とそれらの機能解析を行った。

(1) RNA-seq および DNA マイクロアレイを用いた発現解析から、鉄欠乏ストレスによって発現が上昇する遺伝子群を同定し、それら遺伝子の欠損株を作製した。これらの株の増殖と培地中に含まれる鉄濃度の関連を調べ、野生株と比較して高濃度の鉄でしか増殖できない株を選抜し、鉄欠乏ストレス応答因子の候補の探索を試みた。

(2) 鉄の恒常性維持には、ミトコンドリアやバキューオロが深く関連することから、これらのオルガネラに関連する遺伝子について、また、先行の発現解析からカルシニューリンのシグナル伝達との関連も考えられたので、それに関与すると予想された遺伝子について、既存の抗真菌薬の感受性への関与も含めて、優先的に機能解析を進めた。

(3) カイコおよびマウスの感染モデルを用いて、同定した因子が宿主内での生育に対して必須であるかどうかを確認した。

(4) 鉄欠乏ストレスに対する応答について、他の真菌との共通性を考察するために、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) を用いて、真菌の鉄欠乏状態を起こす血清存在下の生育において必須となる遺伝子を探索やそれら遺伝子の機能解析を試みた。

(5) 抗真菌活性を有する化合物の探索を可能にするため、同定因子の変異株を利用にした細胞レベルの化合物スクリーニング系の立ち上げを試みるほか、候補因子が酵素などの場合、組換えタンパクを用いた再構築系を利用したスクリーニング系の構築も考察する。

4. 研究成果

RNA-seq および DNA マイクロアレイによる発現解析から、鉄欠乏により発現が上昇する遺伝子群を選抜し、それらの欠損株から、低濃度の鉄で増殖できない株を選抜し、鉄欠乏時に働く遺伝子群を同定した。また、鉄取り込みの実行因子 (FET3、FET4、ARN1) やそれらの発現を制御する転写因子 (SEF1) について病原性への関与を検証した (1)。鉄の恒常性維持には、ミトコンドリアやバクテリオキシンが深く関連することから、鉄欠乏時に起こるミトコンドリア分解で重要な役割をする ATG32 (2) とバクテリオキシンでの pH 調節を担うプロトン ATPase のアッセムブリ因子 (VPH2) (3) の機能解析を行った。また、カルシニューリンのシグナル伝達経路に支配されているセリン・スレオニンカイネース ELM1 についても機能解析を行った (4)。さらに、アスペルギルス・フミガタスにおいて、鉄欠乏ストレスに対する応答遺伝子の検索やそれら遺伝子の機能解析を試みた (5)。最後に、抗真菌活性を有する化合物の探索を目指したスクリーニング系の構築を試みた (6)。下記にその詳細を示す。

(1) 鉄欠乏時に働く遺伝子群のうち、鉄欠乏ストレスによって発現誘導されるもののうち転写因子 UPC2A および UPC2B に着目して実験を進めた。UPC2A および UPC2B は、ステロールの恒常性 (合成と取り込み) を制御しており、鉄欠乏の際、外部からのステロールの取り込みを誘導していることを明らかにした。宿主体内では、アゾール系薬剤を投与してステロール合成を阻害しても細胞外からのステロールの取り込むことができ、アゾール系薬剤に対する耐性を獲得する可能性があることを発表した (学会発表 4)。しかしながら、UPC2A および UPC2B の下流にある遺伝子群 (UPC2A および UPC2B の発現を人工的に ON-OFF できる株 TET 株の発現解析により選抜) について、欠損変異株の培地中の鉄濃度依存性を調べたが、現在のところ、鉄キレターに対して野生株より感受性が上がった株は取得できない。次に、カンジダ・グラブラータの鉄取り込み因子の欠損変異株 (*fet3*, *fet4*, *arn1*) および転写因子欠損株 *sef1* について、鉄キレート作用のある血清の感受性を調べたところ、*fet3*, *sef1*, *fet4*, *arn1* の順に感受性が落ち、*arn1* では野生株に近い感受性を示した。それらの株をカイコに感染させ、病原性低下の有無を確認したところ、血清感受性と対応して、感受性の高かった *fet3*, *sef1* の病原性低下が確認され、シデロフォアトランスポーターの欠損株である *arn1* では野生株と同等の病原性を示した (雑誌論文 3, 4, 学会発表 3)。このことから、FET3 (高親和性鉄トランスポーター) と SEF1 についてさらなる機能解析を行うこととした。

(2) ATG32 の欠損変異株 (*atg32*) を作製し、機能解析を以下のように行った。*atg32* では低濃度の鉄では増殖が観察されず、ATG32 が細胞内鉄濃度の恒常性維持に寄与していることが示唆された。また、マウス感染実験および感染臓器内における遺伝子発現解析を行ったところ、*atg32* は野生株と比較し、腎臓、脾臓における生菌数が低下しており、腎臓内では ATG32 遺伝子の発現量が著明に増加していた。これらことから、ATG32 が宿主体内のような鉄欠乏環境においてマイトファジーは活性化し、生存率の維持、病原性に関与していることを明らかにした (雑誌論文 6, 学会発表 5, 7-9, 11)。

(3) VPH2 の欠損変異株 (*vph2*) を作製し、機能解析を以下のように行った。酸性領域 (pH 5.0) と中性領域 (pH 7.2) における *vph2* の増殖速度を野生株と比べたところ、中性領域での生育遅延が観察されたり (倍加時間が野生株の約 7 倍) 酸性領域でも鉄キレターの添加によって、*vph2* の増殖がほとんど見られなかったりした。また、*vph2* のオルガネラの状態を観察したところ、ミトコンドリアの機能欠損は見られなかったが、バクテリオキシン内の pH 低下 (酸性化) が観察された。このほか、既存の抗真菌薬であるアゾール系薬剤やアムホテリシンに対して超感受性を示しただけではなく、カルシニューリンのシグナル伝達に対する阻害薬である FK506 に対しても高い感受性を示した。さらに、マウス感染実験により、*vph2* は野生株と比較し、腎臓、脾臓、肝臓における生菌数の低下が観察された。VPH2 の欠損による上記の表現型の変化のメカニズムを理解するため、酸性領域と中性領域における *vph2* の発現解析を DNA マイクロアレイによって行ったところ、酸化ストレスへの応答が関連することが示唆された。そこで、細胞内の活性酸素種 (ROS) の濃度を測ったところ、*vph2* では著しく上昇していることが示された。この ROS の上昇は、SOD2 および CTA1 遺伝子の大量発現によって抑えられたことから、VPH2 がこれら遺伝子の発現に関与していることが示唆された。次に *vph2* に鉄や銅を添加し、細胞内の ROS の濃度を測ったところ、銅の添加で ROS 濃度の上昇は抑えられたが、鉄ではそれが観察されなかった。このことは、*vph2* では、銅の取り込みは起こっているが、鉄の取り込みは不十分であることと予想され、細胞内 pH の上昇による ROS の上昇が鉄の取り込みに直接関わっていないことが示唆された。これらことから、VPH2 が鉄欠乏ストレスからの鉄代謝制御には関わりは薄いものの、酸化ストレスに応答するため、宿主体内の生存率の維持、病原性に関与していることを示唆することができた (雑誌論文 1, 5)。

上記 (1)から(3)に関しては、総説 (雑誌論文 3、4) および招待講演 (学会発表 3) においても成果の一部を発表した。このほか、モノアミンオキシターゼ A (MAO-A) の活性発現において鉄が重要な働きをしているため、MAO-A の活性低下が鉄代謝に関連する可能性を考え、以下の実験を行なった。MAO-A 阻害薬クロルギリン (clorgyline) 存在下で血清感受性を調べたが、クロルギリン非存在下の感受性と有意な差は見られなかった。しかしながら、クロルギリンは、真菌の薬剤排出ポンプ (CDR1) 阻害活性も持つことから、アゾール剤との併用で、アゾール剤の感受性をあげることが予想された。また、他のタイプの抗真菌剤である micafungin や amphotericin B に対しても感受性をあげることが報告されている。そこで、cdr1 欠損変異株を用いて、この仮説を確認したところ、クロルギリンの存在下でも cdr1 欠損株のアゾール剤感受性は変化がなかった。しかしながら、ミカファンギン (micafungin) やアムホテリシン B (amphotericin B) に対しての感受性は、野生株と同様に感受性が上がった。このことから、ミカファンギンやアムホテリシン B の薬剤排出に関しては、アゾール剤とは異なる機構が存在していることが示唆された (雑誌論文 2)。

(4) ELM1 の欠損変異株 (*elm1*) を作製し、機能解析を以下のように行った。*elm1* では、増殖遅延が見られたほか、細胞形態の異常 (細長く伸びた形態で細胞のサイズが野生株より大きくなっている) を示し、電子顕微鏡で細胞断面を観察したところ、細胞壁が野生株に比べて肥大していた。そこで、細胞壁成分の解析し、野生株と比べたところ、グルカンの含量に変化はなかったもののキチン含量の増加が見られた。薬剤感受性においては、キャンディン系薬、カルコフロールホワイト、コンゴレッド など細胞壁ストレスに関連する薬剤に高感受性を示した。興味深いことに、鉄キレーター作用を持つ血清添加培地では *elm1* の増殖がほとんど見られないが、鉄の添加により、その増殖は回復するが形態は細長く伸びた形態のままであった。また、カイコ感染モデルを用いて病原性への関与を検討したところ、カイコの生存率は、欠損株と野生株で有意な差は見られなかった (学会発表 1、6)。

(5) 真菌の鉄欠乏状態を起こす血清存在下でアスペルギルス・フミガタスの菌糸生育が低下する変異株を取得 (B11b 遺伝子破壊株) し、これを用いて、本菌の血清存在下での生育に関与する因子を探索したところ、3 遺伝子の破壊により、血清存在下の生育能及びマウスへの病原性の低下を示すことがわかった (学会発表 4、10)。現在、これら 3 遺伝子と鉄代謝との関連を調べている。

(6) 上記の結果から、ATG32 の機能阻害を指標とした細胞レベルの化合物スクリーニング系の構築を計画した。現在、ATG32 のプロモーター領域 (上流 1,000bp) にレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) をつないだコンストラクトを導入した株を作製し、鉄欠乏時にレポーター活性が上昇するかどうかを確認している。

以上のように、鉄欠乏時に働く遺伝子群や鉄結合欠乏時に働く転写因子の下流で動く遺伝子の同定や機能解析を行なった結果、転写因子 SEF1 やミトファジーの実行因子 ATG32 が鉄欠乏に応答した因子で、抗真菌薬治療の標的の候補として有望であることが示唆できた。本研究の期間内に ATG32 の機能阻害を指標とした細胞レベルの化合物スクリーニング系が確立するに至らなかったが、確立後は化合物スクリーニングを実施する予定である。また、SEF1 については、その下流の遺伝子群の同定を進めており、新たな治療の標的因子の候補の発見につながると考えている。さらに、鉄結合ストレスとは関連しなかったものの、プロトン ATPase の抗真菌薬治療の標的の可能性や薬剤耐性機構に関する新たな知見を見いだすことができた。このように、今回の研究成果は、真菌の鉄欠乏ストレスの応答機構の解明や真菌治療薬の開発につながる知見示したものと見える。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Vacuolar proton-translocating ATPase is required for antifungal resistance and virulence of *Candida glabrata*. Minematsu A, Miyazaki T, Shimamura S, Nishikawa H, Nakayama H, Takazono T, Saijo T, Yamamoto K, Imamura Y, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H, Izumikawa K. PLoS One. 2019 14(1): e0210883. doi: 10.1371/journal.pone.0210883.
2. Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in *Candida glabrata* and other pathogenic *Candida* species. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Shimamura S, Nakayama H, Minematsu A, Yamauchi S, Takazono T, Nakamura S, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H, Izumikawa K. PLoS One. 2017 12(7): e0180990. doi: 10.1371/journal.pone.0180990.
3. Promising Therapies for Fungal Infection Based on the Study to Elucidate Mechanisms to Cope with Stress in *Candida* Species [Translated Article]. Hirai K, Inukai T, Nakayama H. Med Mycol J. 2017 58(2): E79-E86. doi: 10.3314/mmj.17.007. Review.

4. Promising Therapies for Fungal Infection Based on the Study to Elucidate Mechanisms to Cope with Stress in *Candida* Species. Hirai K, Inukai T, Nakayama H. Med Mycol J. 2016;57(4): J163-J170. https://www.jstage.jst.go.jp/article/mmj/57/4/57_16.007/_article/-char/ja/ Review. Japanese.
5. Roles of vacuolar H⁺-ATPase in the oxidative stress response of *Candida glabrata*. Nishikawa H, Miyazaki T, Nakayama H, Minematsu A, Yamauchi S, Yamashita K, Takazono T, Shimamura S, Nakamura S, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno S, Mukae H. FEMS Yeast Res. 2016 16(5). pii: fow054. doi: 10.1093/femsyr/fow054.
6. Iron-depletion promotes mitophagy to maintain mitochondrial integrity in pathogenic yeast *Candida glabrata*. Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Ueno K, Yamagoe S, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y. Autophagy. 2016 12(8): 1259-71. doi: 10.1080/15548627.2016.1183080.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Role of Elm1 in cell wall integrity and virulence of *Candida glabrata*. Ito Y, Miyazaki T, Nakayama H, Morita A et al.(13 人中の 3, 4 番目)ISHAM 2018(国際学会)Amsterdam, Holland.
2. *Aspergillus fumigatus* の血清存在下の生育に関する因子の探索と病原性への影響 犬飼達也、梅山 隆、宇田 晶彦、青山 俊弘、中山 浩伸 他(15 人中の 5 番目)第 62 回 日本医真菌学会総会(2018) 東京
3. 病原真菌の環境適応の分子機構の解明 中山 浩伸(招待講演)第 30 回 微生物シンポジウム(2018) 東京
4. Exogenous sterol uptake: A potential cause of azole resistance 田辺 公一、名木 稔、犬飼 達也、中山 浩伸、梅山 隆、山越 智、中村 茂樹、宮崎 義継 第 91 回日本細菌学会・総会(招待講演)(2018) 福岡
5. 病原性および鉄欠乏環境下における *Candida glabrata* のミトファジーの役割 名木 稔、田辺 公一、上野 圭吾、中山 浩伸、中村 茂樹、梅山 隆、山越 智、宮崎 義継 第 61 回 日本医真菌学会総会(2017) 金沢
6. *Candida glabrata* におけるカルシニューリン関連分子 Elm1 の機能解析 伊藤 裕也、宮崎 泰可、中山 浩伸、他 (14 人中の 3 番目)第 61 回 日本医真菌学会総会(2017) 金沢
7. 病原真菌 *Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジーと病原性 名木 稔、田辺 公一、上野 圭吾、中山 浩伸、中村 茂樹、梅山 隆、山越 智、宮崎 義継 第 90 回日本細菌学会総会(2017) 仙台
8. Iron-depletion promotes mitophagy in pathogenic yeast *Candida glabrata*. Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Ueno K, Yamagoe S, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y. 14th International Conference on Yeasts (ICY2016)(国際学会) 兵庫
9. *Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジーと病原性 名木 稔、田辺 公一、中山 浩伸、上野 圭吾、犬飼 達也、中村 茂樹、梅山 隆、山越 智、大野 秀明、宮崎 義継 第 60 回 日本医真菌学会総会(2016) 東京
10. *Aspergillus fumigatus* の血清存在下における菌糸生育に関連する因子の同定 犬飼 達也、梅山 隆、山越 智、青山 俊弘、中山 浩伸、名木 稔、田辺 公一、中村 茂樹、宮崎 義継 第 60 回 日本医真菌学会総会(2016) 東京
11. *Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジー(ミトファジー)が病原性に及ぼす影響 名木 稔、田辺 公一、中山 浩伸、上野 圭吾、犬飼 達也、中村 茂樹、梅山 隆、山越 智、大野 秀明、宮崎 義継 第 60 回 日本医真菌学会総会(2016) 東京

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森田 明広

ローマ字氏名：Morita Akihiro

所属研究機関名：鈴鹿医療科学大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：20382228

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田口 博明

ローマ字氏名：Taguchi Hiroaki