

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15683

研究課題名(和文) 侵襲性カンジダ症原因菌の強酸(胃酸)耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Acid-resistance systems in *Candida glabrata*

研究代表者

高橋 梓 (Takahashi-Nakaguchi, Azusa)

千葉大学・真菌医学研究センター・技術職員

研究者番号：20607949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性カンジダ症の原因菌 *Candida glabrata* は、強酸(pH2)耐性であり、胃を通過して腸管に常在し病原性を発揮する。しかし *C. glabrata* における強酸耐性機構の分子メカニズムは全く分かっていなかった。申請者は、独自の *C. glabrata* 遺伝子欠損株ライブラリー(5,000株)を用いたスクリーニングにより、転写制御因子RIM101が強酸耐性機構に必須であることを新たに見出した。さらにRIM101の上流および下流で機能する因子を網羅的解析により同定し、強酸耐性機構の全貌を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンジダ症原因菌において酸耐性に関する研究は少ない。真菌ではなく細菌である大腸菌や乳酸菌において、プロトン排出ポンプ、細胞壁構成成分が酸耐性に重要である可能性が示されている。菌種によってRIM101経路に関わる遺伝子層に大きなバリエーションがあり(Cornet, 2014)、*C. glabrata* においてRIM101経路に関わる遺伝子、またRIM101に制御される遺伝子を明らかにすることにより、抗真菌薬に対する耐性菌が出現しやすい *C. glabrata* への対処の幅が大きく広がることが期待される。

研究成果の概要(英文)： *Candida glabrata*, a member of invasive candidiasis, is resistant to strong acids (pH 2), passes through the stomach, resides in the intestinal tract, and exerts its pathogenicity. However, the molecular mechanism of the strong acid tolerance mechanism in *C. glabrata* was unknown at all. We newly found that the transcription factor RIM101 is essential for the mechanism of strong acid resistance by screening using a unique *C. glabrata* gene-deficient strain library (5,000 strains). Furthermore, the factors that function upstream and downstream of RIM101 were identified by exhaustive analysis, and the entire mechanism of the strong acid tolerance mechanism was clarified.

研究分野：医真菌学

キーワード： *Candida glabrata* 酸耐性

1. 研究開始当初の背景

カンジダ症原因菌において酸耐性に関する研究は少ない。真菌ではなく細菌である大腸菌や乳酸菌において、プロトン排出ポンプ、細胞壁構成成分が酸耐性に重要である可能性が示されている。*C. glabrata* において、pH3 の酸性条件下に対する3つの耐性遺伝子が見つかるが (Wu et al., 2015)、これらの遺伝子は pH2 の強酸条件には対処できず、また、Rim101 に制御されているものではないことを確認している。

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、アルカリ耐性に関する代表的な遺伝子として *RIM101* が報告されており (Maeda, 2012)、*C. albicans* では *RIM101* が病原性に関わることも明らかとなっているが (Davis, 2003)、*C. glabrata* における *RIM101* 経路に関する研究は例がない。菌種によって *RIM101* 経路に関わる遺伝子層に大きなバリエーションがあり (Cornet, 2014)、*C. glabrata* において *RIM101* 経路に関わる遺伝子、また *RIM101* に制御される遺伝子を明らかにすることにより、抗真菌薬に対する耐性菌が出現しやすい *C. glabrata* への対処の幅が大きく広がることが期待される。

2. 研究の目的

免疫抑制を伴う高度医療には常に感染症への対策が必要とされる。表皮や腸管粘膜の常在菌である病原性酵母 *Candida glabrata* は、免疫抑制を伴う治療により侵襲性カンジダ症を引き起こす。*C. glabrata* の特性として酸耐性機構があり、pH2 の強酸条件化においても増殖可能であるが、その分子メカニズムは明らかになっていない。申請者はこれまでに、所属研究室の所有する *C. glabrata* 遺伝子欠損株ライブラリーを用いて酸耐性遺伝子のスクリーニングを行い、*RIM101* 遺伝子が強酸耐性に関わり、マウス胃内での生存に重要であることを明らかにした。*RIM101* 経路は、パン酵母および *Candida albicans* において、アルカリ条件に応答して転写因子 Rim101 タンパクを限定分解し活性化する経路として知られている。そこで本研究では、*C. glabrata* において *RIM101* 経路上に位置し、強酸耐性を制御する遺伝子群について詳細な解析を行う。はじめに、Rim101 の上流で機能すると予測される遺伝子の欠損株を用いて Rim101 タンパクの活性化有無を調べ、*C. glabrata* において Rim101 タンパクの活性を制御する遺伝子を特定する。次に、次世代シーケンサーを活用し、*RIM101* 欠損株における RNA-seq および ChIP-seq を行い、Rim101 が結合し、発現を制御している下流の遺伝子群を特定し、強酸耐性メカニズムの詳細な解析を行う。最後に、これらの遺伝子の病原性への関与を評価するため、哺乳動物細胞および動物を用いた実験を行う。これらの研究により *C. glabrata* の酸耐性機構の概要が明らかとなり、抗真菌薬の開発等への応用が期待される。

3. 研究の方法

C. glabrataにおける RIM101 経路の特定

上流: RIM101 経路上流で機能する遺伝子の特定

- A. *C. glabrata* において Rim101 上流で機能すると予測される 11 の遺伝子(図3)の欠損株の強酸耐性と、Rim101 タンパクの活性化有無をウエスタンブロットィングによる Rim101 タンパクのサイズ変化有無により判定する。Rim101 抗体による検出ができない場合には、パン酵母で行われている手法を採用し、HA タグを付けた Rim101 を強制発現させて活性化有無を評価する。
- B. 予備実験においてパン酵母等にはない新規のセンサータンパクが存在する可能性が示されているため、*C. glabrata* 欠損株ライブラリーのうち、細胞膜に局在することが予測される因子の欠損株を用いて上記試験を行うことにより新規センサータンパク質を探索する。

下流: RIM101 が制御する強酸耐性遺伝子の特定

Wild type 株および *RIM101* 遺伝子欠損株を異なる pH 条件で培養し、次世代シーケンサーを用いて mRNA 発現動態を比較解析する(RNA-seq)。強酸条件下において欠損株で発現せず、wild type 株でのみ発現する遺伝子を酸耐性関与遺伝子群として以降の解析に用いる。細胞壁合成酵素、イオンチャネル・トランスポーターなどが予測される。

4. 研究成果

RIM101 の遺伝子破壊株を用いて RNA-seq を行い、Rim101p が発現を制御している下流の遺伝子群(198 遺伝子)を特定した。さらに、酸耐性株のスクリーニングと RNA-seq の結果を統合することにより RIM101 上流候補遺伝子(2171 遺伝子)を選出した。これらの遺伝子の欠損株を用いて Rim101 タンパクの活性化有無を調べ、Rim101 タンパクの活性を制御する遺伝子を特定した。以上の結果から、*C. glabrata* の強酸耐性には、*S. cerevisiae* のアルカリ耐性 Rim101p 活性化経路との共通遺伝子と相違遺伝子が存在し、さらに新規の RIM101 経路構成遺伝子が存在することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T.	4. 巻 20(3)
2. 論文標題 Aspergillus fumigatus adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e12802.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.12802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----