

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15696

研究課題名(和文) 病原酵母が行うマイトファジーの宿主貪食細胞内生存における役割

研究課題名(英文) Role of pathogenic fungal mitophagy in survival in host phagocytic cells.

研究代表者

名木 稔 (Nagi, Minoru)

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・室長

研究者番号：60711687

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)：病原酵母 *Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジー(マイトファジー)は病原性、宿主体内環境適応、鉄欠乏環境における生存の維持に関与している事が明らかにされていたが、それらにおける詳細な役割はわかっていなかった。本研究では、*C. glabrata* のマイトファジー必須遺伝子である CgATG32 が、好中球内における生存に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原酵母 *Candida glabrata* のマイトファジーは病原性や宿主体内環境における生存に関与しているが、その詳細は不明であった。本研究において、*C. glabrata* のマイトファジーに必須な CgATG32 の遺伝子破壊株は、好中球と共培養した際の生存率が顕著に低下することが明らかになった。*C. glabrata* を含むカンジダ属の感染において重要なステップは、血中で好中球やマクロファージに貪食された後の生存である。感染における重要ステップにマイトファジーが関与していることが明らかになったことは、マイトファジーの新たな生理的役割の発見であり、CgATG32 は真菌症の新たな治療標的となり得る。

研究成果の概要(英文)：Although mitophagy in the pathogenic yeast *Candida glabrata* has been shown to be involved in pathogenicity, adaptation to the host environment, and maintenance of survival in an iron-deficient environment, its detailed role in these processes was not known. In this study, we show that CgATG32, a mitophagy essential gene in *C. glabrata*, is involved in survival in neutrophils.

研究分野：医真菌学、生化学、分子生物学

キーワード：マイトファジー *Candida glabrata* 貪食細胞 好中球

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) は、栄養飢餓に適応するためのアミノ酸調達に参与している (文献 1)。また、機能不全に陥ったミトコンドリアを選択的に分解し、ミトコンドリアの機能維持に参与していると考えられている (文献 2)。

Candida glabrata は、免疫低下に伴い全身性感染を引き起こす病原酵母であり、特に好中球減少患者において重症化リスクが高いことが知られている (文献 3)。申請者らは、*C. glabrata* においてマイトファジー活性検出系を構築し、マイトファジーに必須な遺伝子である *ATG32* を同定した。*C. glabrata* において *ATG32* 遺伝子破壊株 (*atg32* 株) を作製し、以下の結果を得た (文献 4 にて報告)。

C. glabrata のマイトファジーは鉄欠乏条件において活性化

マイトファジーは鉄欠乏条件におけるミトコンドリア膜電位維持に関与

atg32 株は鉄欠乏条件における経時寿命 (分裂を停止した細胞の生存期間) が顕著に低下
マウス臓器内に感染状態の *C. glabrata* において *ATG32* の発現量が顕著に増加

atg32 株はマウス臓器への定着 (病原性) が顕著に低下

申請者らによって *C. glabrata* のマイトファジーが病原性に参与していることは示されたが、その病原性における詳細な役割はわかっていない。*C. glabrata* を含むカンジダ属の全身性感染において重要なステップは、血中で好中球やマクロファージに貪食された後の生存である (文献 5)。好中球やマクロファージ内にはラクトフェリン等の鉄結合タンパク質が存在しており、細胞内は厳しい鉄欠乏環境であることが報告されている (文献 6)。鉄欠乏環境での *C. glabrata* の生存にはマイトファジーが必要であることが明らかにされているため、貪食細胞内における生存にもマイトファジーが参与していることが推測される。また、経時寿命の維持にはミトコンドリア膜電位の維持が重要であることが報告されており (文献 7)、*C. glabrata* ではマイトファジーによって膜電位を維持することが鉄欠乏環境における生存率の維持に参与していると考えられる (文献 4)。

2. 研究の目的

病原酵母 *C. glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) は病原性と鉄欠乏環境における生存の維持に参与している事が明らかにされたが、病原性における詳細な役割はわかっていない。本研究では、鉄欠乏環境である貪食細胞内での生存にマイトファジーが参与しているという仮説を立て、この仮説を検証するために以下の 3 点を明らかにする。

A. 貪食細胞内におけるマイトファジー活性

B. 貪食細胞内でのミトコンドリア機能維持におけるマイトファジーの役割

C. 貪食細胞内での生存におけるマイトファジーの役割

3. 研究の方法

前項に記載の内容 (A, B, C) の検証のため、以下 3 点の方法にて研究を行った。

A. 貪食細胞内における *ATG32* 発現解析およびマイトファジー活性解析

貪食細胞に貪食された菌体を用いて遺伝子発現解析およびマイトファジー活性解析を行う。

B. 貪食細胞内でのミトコンドリア機能維持におけるマイトファジーの役割の解明

貪食された状態での、ミトコンドリア量、形態、呼吸活性、膜電位、reactive oxygen species (ROS) 産生量がどのように変化するのかを明らかにする。以上の観点において野生株と *atg32* 株の比較を行う。

C. 貪食細胞内での生存におけるマイトファジーの役割の解明

C. glabrata をマクロファージ、好中球細胞に貪食させ、野生株と *atg32* 株の貪食効率および貪食抵抗性を比較する。

4. 研究成果

前項研究方法 A, B, C によって得られた成果について以下記載する。

A. 貪食細胞内における *ATG32* 発現解析およびマイトファジー活性解析

申請者らは、*C. glabrata* におけるマイトファジーが「鉄欠乏条件」で誘導されることを報告した (文献 4)。細胞内が鉄欠乏環境である貪食細胞に貪食された *C. glabrata* でもマイトファジーおよびマイトファジー活性化遺伝子の発現誘導が観察されるかどうかを調べた。株化されたマクロファージ様細胞、Raw264、J774、分化させた THP-1 細胞、マウス骨髄および腹腔から調整した好中球細胞、マクロファージ、ヒト血液から調整した好中球細胞に *C. glabrata* を貪食させ、貪食した状態におけるマイトファジー関連遺伝子の発現解析を行った。前述の複数種類の細胞全てについて、貪食された *C. glabrata* ではマイトファジー関連遺伝子の発現増加が認められたが、特にマウス骨髄およびヒト血液由来の好中球細胞に貪食された場合において顕著な発現量増加が認められた。貪食細胞内における *C. glabrata* のマイトファジー活性検出のため、出

芽酵母の液胞内プロテアーゼをコードする *PEP4* の *C. glabrata* におけるホモログである CAGLOM02211g の破壊株にミトコンドリア移行シグナルと GFP を付加したジヒドロ葉酸リダクターゼを高発現させた菌株 (*pep4* -mitoDHFR-GFP 株) を作製した。CAGLOM02211g の破壊株では、マイトファジーの過程で液胞へと運ばれたミトコンドリアが液胞内で分解されずに蓄積するため、ミトコンドリアに発現した GFP の細胞内局在を観察することでマイトファジーによって液胞へ運ばれたミトコンドリアの観察が容易となり、マイトファジー活性化を検出することができる。*pep4* -mitoDHFR-GFP 株をマウス骨髄およびヒト血液由来の好中球細胞に貪食させ、傾向顕微鏡観察によって液胞内局在ミトコンドリアの検出を試みたが、液胞内に明らかな蛍光は観察されなかった。貪食細胞内ではマイトファジー関連遺伝子の発現増加が認められているため、マイトファジーの活性化を予想したが、前述の方法で観察できるほどのマイトファジー活性化は認められなかった。

B. 貪食細胞内でのミトコンドリア機能維持におけるマイトファジーの役割の解明

GFP を付加したミトコンドリア局在タンパク質発現 *C. glabrata* 株をヒト血液から調整した好中球に貪食させ、*C. glabrata* のミトコンドリア形態観察を行った。好中球に貪食された状態と、通常の合成培地 (YNB+2% glucose 培地) で培養された状態のミトコンドリアは、形態や量の顕著な差は認められなかった。貪食された状態の菌の呼吸活性、ミトコンドリア膜電位、ROS 産生量の測定に関しては、貪食後に好中球を破裂させ、フローサイトメーターによって破裂した好中球と貪食された菌体を分離し、各種指標依存的染色薬によって染色した菌体の解析を試みたが、破裂後の好中球と菌体が分離できず、定量的なデータが得られていない。

C. 貪食細胞内での生存におけるマイトファジーの役割の解明

ヒト血液から調整した好中球と *C. glabrata* 野生株またはマイトファジー欠損株を混合し、貪食効率および貪食後の生存率の測定を実施した。野生株とマイトファジー欠損株における被貪食効率に有意な差はなかったが、貪食後の生存率においては、野生株が欠損株と比べて有意に高い事を明らかにした。

参考文献

- 1) J Cell Biol. 1992 Oct;119(2):301-11.
- 2) J Biol Chem. 2012 Jan 27;287(5):3265-72.
- 3) Clin Infect Dis. 2001 Jun 15;32(12):1713-7.
- 4) Autophagy. 2016 Aug 2;12(8):1259-71.
- 5) Microbiol Mol Biol Rev. 1997 Jun;61(2):170-92.
- 6) Microbes Infect. 2007 Nov-Dec;9(14-15):1662-70.
- 7) Biochem Biophys Res Commun. 2013 Sep 13;439(1):126-31.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okamoto Michiyo, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Tejima Kengo, Sasamoto Kaname, Yamaguchi Masashi, Aoyama Toshihiro, Nagi Minoru, Tanabe Kohichi, Miyazaki Yoshitsugu, Nakayama Hironobu, Sasakawa Chihiro, Kajiwara Susumu, Brown Alistair J. P., Teixeira Miguel C., Chibana Hiroji	4. 巻 10
2. 論文標題 Erg25 Controls Host-Cholesterol Uptake Mediated by Aus1p-Associated Sterol-Rich Membrane Domains in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.820675	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 -

1. 著者名 Nagi Minoru, Tanabe Koichi, Tanaka Kazuko, Ueno Keigo, Nakayama Hironobu, Ishikawa Jun, Abe Masahiro, Yamagoe Satoshi, Umeyama Takashi, Nakamura Shigeki, Sugai Motoyuki, Hazen Kevin C., Miyazaki Yoshitsugu	4. 巻 4
2. 論文標題 Exhibition of antifungal resistance by sterol-auxotrophic strains of <i>Candida glabrata</i> with intact virulence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JAC-Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jacamr/dlac018	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 -

1. 著者名 Khalifa Hazim O., Hubka Vit, Watanabe Akira, Nagi Minoru, Miyazaki Yoshitsugu, Yaguchi Takashi, Kamei Katsuhiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basis of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of <i>Candida krusei</i> Recovered from an International Collection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 643-650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01856-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama S, Okamoto K, Ogura K, Sugita C, Nagi M.	4. 巻 72(5)
2. 論文標題 Histoplasmosis among HIV-Infected Patients in Japan: a Case Report and Literature Review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 330-333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2018.354.	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 -

1. 著者名 Bac ND, Anh LT, Quang LB, Luc NK, Nga TTT, Nagi M, Yoshitsugu M, Ha HTT, Anh DD, Quyet D, Anh DN.	4. 巻 11(2)
2. 論文標題 Prevalence of Candida bloodstream isolates from patients in two hospitals in Vietnam.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Iran J Microbiol.	6. 最初と最後の頁 108-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Nakamura S, Ikeda-Dantsuji Y, Jin L, Higashi Y, Abe M, Inukai T, Nagi M, Urai M, Miyazaki Y.	4. 巻 63(6)
2. 論文標題 Macrolides Inhibit Capsule Formation of Highly Virulent <i>Cryptococcus gattii</i> and Promote Innate Immune Susceptibility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02364-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura M, Araoka H, Yamamoto H, Nakamura S, Nagi M, Yamagoe S, Miyazaki Y, Ogura S, Mitsuki T, Yuasa M, Kaji D, Kageyama K, Nishida A, Taya Y, Shimazu H, Ishiwata K, Takagi S, Yamamoto G, Asano-Mori Y, Uchida N, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A.	4. 巻 62
2. 論文標題 Micafungin Breakthrough Fungemia in Patients with Hematological Disorders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e02183-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02183-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeyama T, Hayashi Y, Shimosaka H, Inukai T, Yamagoe S, Takatsuka S, Hoshino Y, Nagi M, Nakamura S, Kamei K, Ogawa K, Miyazaki Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Genome Editing To Demonstrate the Contribution of Cyp51A Gly138Ser to Azole Resistance in <i>Aspergillus fumigatus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e00894-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00894-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe K, Bonus M, Tomiyama S, Miyoshi K, Nagi M, Niimi K, Chindamporn A, Gohlke H, Schmitt L, Cannon RD, Niimi M, Lamping E.	4. 巻 63
2. 論文標題 FK506 Resistance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Pdr5 and <i>Candida albicans</i> Cdr1 Involves Mutations in the Transmembrane Domains and Extracellular Loops.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e01146-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.01146-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi M, Nishijima T, Nagi M, Miyazaki Y, Teruya K, Kikuchi Y, Gatanaga H, Oka S.	4. 巻 100
2. 論文標題 Case Report: Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Caused by Disseminated Histoplasmosis in a Venezuelan Patient with HIV and Epstein-Barr Virus Reactivation Who Traveled to Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	6. 最初と最後の頁 365-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4269/ajtmh.18-0478.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe K, Nagi M.	4. 巻 未定
2. 論文標題 Monitoring of Iron Depletion-Induced Mitophagy in Pathogenic Yeast	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2017_40.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeiyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 166-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2017.09.011.	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12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 名木稔、東祥嗣、鈴木健裕、知花博治、田邊公一、阿部雅広、堂前直、山越智、宮崎義継
2. 発表標題 Candida glabrataにおけるマイトファジー遺伝子ATG32の転写調節因子の探索
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名木稔
2. 発表標題 カンジダ属における薬剤耐性の現状と新規薬剤耐性機構に関する研究
3. 学会等名 第70回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第68回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名木稔
2. 発表標題 病原酵母Candida glabrataのマイトファジーの役割とATG32転写調節機構
3. 学会等名 第23回酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名木稔、東 祥嗣、鈴木 健裕、知花 博治、田辺 公一、阿部 雅広、堂前 直、山越 智、宮崎 義継
2. 発表標題 Candida glabrataにおけるマイトファジー遺伝子ATG32の転写調節機構の解明
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 名木 稔, 田辺公一, 上野圭吾, 犬飼達也, 山越 智, 梅山 隆, 中村茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 病原真菌 <i>Candida glabrata</i> は細胞外からステロールを取り込むことで抗真菌薬耐性となる
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名木 稔
2. 発表標題 病原真菌 <i>Candida glabrata</i> におけるミトコンドリア選択的オートファジーの生理的役割
3. 学会等名 第196回酵母細胞研究会例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 祥嗣, 名木 稔, 鈴木健裕, 知花博治, 犬飼達也, 阿部雅広, 堂前 直, 山越 智, 中村茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 <i>Candida glabrata</i> におけるマイトファジー活性調節機構の解明
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 名木 稔, 田辺公一, 上野圭吾, 犬飼達也, 山越 智, 梅山 隆, 中村茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 病原真菌 <i>Candida glabrata</i> は細胞外からステロールを取り込むことで抗真菌薬耐性となる
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 名木 稔, 田辺公一, 上野圭吾, 犬飼達也, 山越 智, 梅山 隆, 中村茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 病原真菌 <i>Candida glabrata</i> は細胞外のステロールを取り込むことで抗真菌薬耐性となる
3. 学会等名 第62回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 病原性および鉄欠乏環境下における <i>Candida glabrata</i> のミトファジーの役割
3. 学会等名 第61回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Exogenous sterol uptake: A potential cause of azole resistance
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 名木 稔, 田辺公一, 上野圭吾, 犬飼達也, 中村茂樹, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継
2. 発表標題 Uptake of exogenous sterol promotes antifungal resistance in <i>Candida glabrata</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------