

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07494

研究課題名（和文）侵襲性カンジダ症原因菌の強酸（胃酸）耐性を担う新規遺伝子群の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel gene cluster responsible for strong acid resistance in the causative agent of invasive candidiasis.

研究代表者

高橋 梓（Takahashi, 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Candida glabrataの特性である強酸耐性機構に、これまでアルカリ耐性にのみ関するとされてきたRim101が関与することを初めて示し、その詳細な機構について検討を行った。欠損株ライブラリーのスクリーニングおよびRIM101欠損株におけるRNAseqの結果より、Rim101pの上流に位置すると同定された遺伝子の欠損株を用いて解析を行った。Rim101タンパクにタグをつけて発現し、ウエスタンブロットティングを行う手法は、発現量の問題により解決が難しかったが一部について結果が得られ、これまでに報告されていなかった強酸耐性遺伝子を検出できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パン酵母*S. 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、*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、*C. glabrata*におけるRIM101経路に関する研究は例がなかった。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、*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）：We demonstrated for the first time that Rim101, which was previously thought to be involved only in alkaline tolerance, is involved in the mechanism of strong acid tolerance, a characteristic of *Candida glabrata*, and investigated the detailed mechanism. We screened a library of RIM101-deficient strains and performed RNAseq on RIM101-deficient strains, and analyzed them using strains deficient in genes identified as upstream of Rim101p. The method of tagging and expressing the Rim101p protein by Western blotting was difficult to solve due to expression levels. However, some results were obtained and a previously unreported strong acid resistance gene was detected.

研究分野：医真菌学

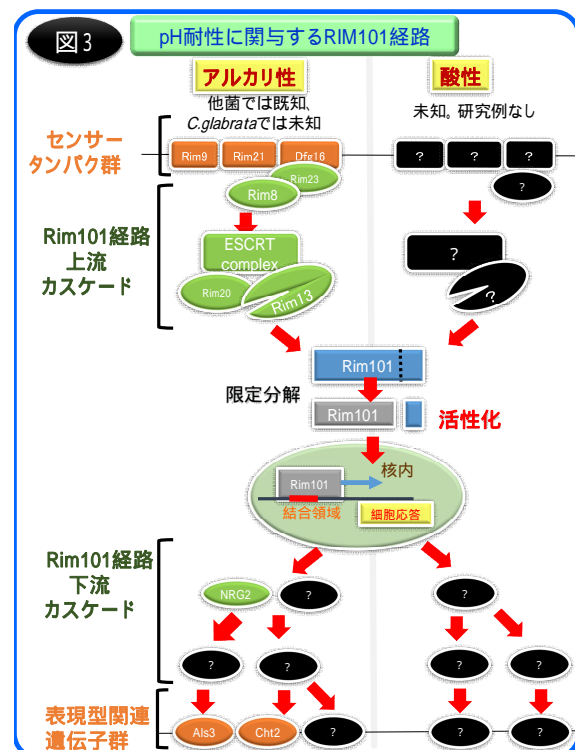
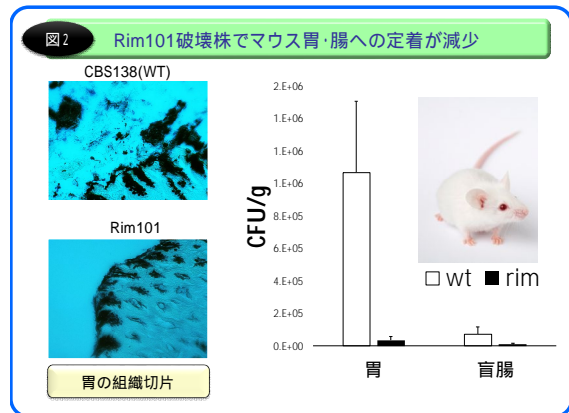
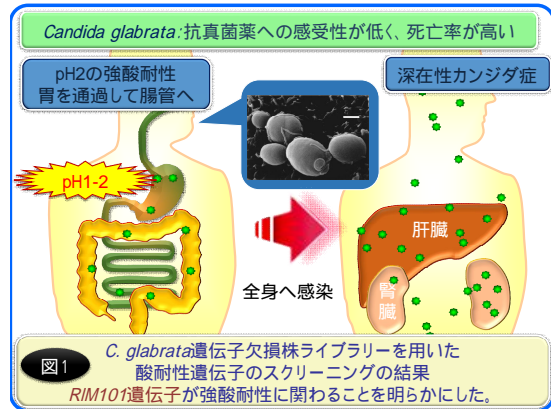
キーワード：酸耐性

1. 研究開始当初の背景

病原性酵母 *Candida glabrata* は、カンジダ症の原因菌として *C. albicans* について検出率が高く、免疫不全あるいは衰弱患者に深在性カンジダ症を発症する。アゾール系抗真菌薬への感受性が *C. albicans* に比して低く、死亡率が高いことから、新規抗真菌薬の開発においてもその病原特性に関する知見を深めることが急務となっている。しかしながら *C. glabrata* の感染メカニズムについては研究の蓄積が少なく未解明な点が多いため、治療法や予防法が確立されていない。そこで *C. glabrata* の強酸耐性に着目し、本研究テーマを立案した。

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 *C. 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ตอบสนอง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が、RIM101 欠損株の RNA-seq の結果から、*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は、アルカリ耐性と一部異なることを示した。そこで本研究では、これらの遺伝子群がどのようなカスケードにのっとり、どのような機能をもって強酸耐性を担っているのか? について詳細な解析を行う。

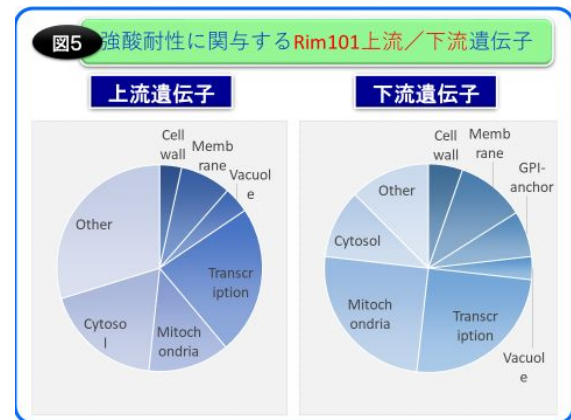
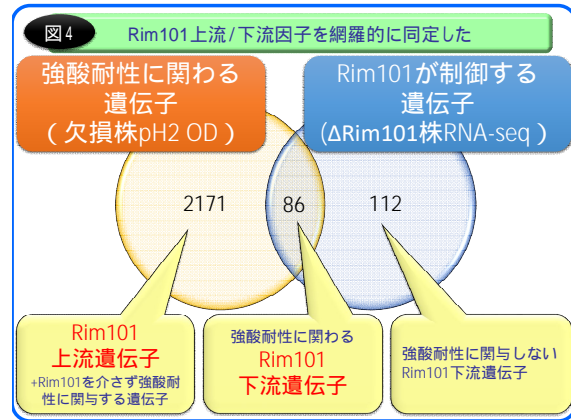


3. 研究の方法

欠損株ライブラリーのスクリーニング及び *RIM101* 欠損株における RNA-seq の結果より、Rim101p 上流に位置すると同定された遺伝子のうち(2171 遺伝子の一部)、Gene Ontology 解析により細胞膜および細胞壁に局在することが予測された 249 遺伝子を対象とする。これらの遺伝子欠損株について、HA タグ付き Rim101 タンパクの活性化有無をウエスタンブロッティング法により確認し、さらに GFP を付加したタンパクが膜への局在を示すものをセンサータンパクとして選抜する。

4. 研究成果

Candida glabrata の特性である強酸耐性機構に、これまでアルカリ耐性にのみ関与するとされてきた Rim101 が関与することを初めて示し、その詳細な機構について検討を行った。欠損株ライブラリーのスクリーニングおよび *RIM101* 欠損株における RNAseq の結果より、Rim101p の上流に位置すると同定された遺伝子の欠損株を用いて解析を行った。Rim101 タンパクにタグをつけて発現し、ウエスタンブロッティングを行う手法は、発現量の問題により解決が難しかったが一部について結果が得られ、これまでに報告されていなかった強酸耐性遺伝子を検出できた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi Masashi, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Uematsu Katsuyuki, Yamada Hiroyuki, Sato-Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji	4. 巻 71
2. 論文標題 Ultrastructural examination of mouse kidney glomerular capillary loop by sandwich freezing and freeze-substitution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 289 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac031	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 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 820675
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 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 Pais Pedro, Galocha Monica, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Chibana Hiroji, Teixeira Miguel C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Multiple genome analysis of <i>Candida glabrata</i> clinical isolates renders new insights into genetic diversity and drug resistance determinants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Cell	6. 最初と最後の頁 174 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15698/mic2022.11.786	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 Okamoto Michiyo, Nakano Keiko, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Sasamoto Kaname, Yamaguchi Masashi, Teixeira Miguel Cacho, Chibana Hiroji	4. 巻 9
2. 論文標題 In <i>Candida glabrata</i> , ERMES Component GEM1 Controls Mitochondrial Morphology, mtROS, and Drug Efflux Pump Expression, Resulting in Azole Susceptibility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 240 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof9020240	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 Cavalheiro Mafalda, Romao Daniela, Santos Rui, Mil-Homens Dalila, Pais Pedro, Costa Catarina, Galocha Monica, Pereira Diana, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Chibana Hiroji, Fialho Arsenio M., Teixeira Miguel C.	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of CgTpo4 in Polyamine and Antimicrobial Peptide Resistance: Determining Virulence in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1376 ~ 1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031376	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 Cavalheiro Mafalda, Pereira Diana, Formosa-Dague Cecile, Leitao Carolina, Pais Pedro, Ndlovu Easter, Viana Romeu, Pimenta Andreia I., Santos Rui, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Okamoto Michiyo, Ola Mihaela, Chibana Hiroji, Fialho Arsenio M., Butler Geraldine, Dague Etienne, Teixeira Miguel C.	4. 巻 4
2. 論文標題 From the first touch to biofilm establishment by the human pathogen <i>Candida glabrata</i> : a genome-wide to nanoscale view	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 02412-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02412-7	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 Yamaguchi Masashi, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Uematsu Katsuyuki, Taguchi Masaki, Sato-Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji	4. 巻 173
2. 論文標題 Rapid Freezing using Sandwich Freezing Device for Good Ultrastructural Preservation of Biological Specimens in Electron Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 62431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/62431	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 Yamaguchi Masashi, Taguchi Masaki, Uematsu Katsuyuki, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Sato-Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji	4. 巻 70
2. 論文標題 Sandwich freezing device for rapid freezing of viruses, bacteria, yeast, cultured cells and animal and human tissues in electron microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 215 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa049	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 Takahashi-Nakaguchi Azusa, Shishido Erika, Yahara Misa, Urayama Syun-ichi, Sakai Kanae, Chibana Hiroji, Kamei Katsuhiko, Moriyama Hiromitsu, Gonoï Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of an Intrinsic Mycovirus Associated With Reduced Virulence of the Human Pathogenic Fungus <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 3045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.03045	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 Takahashi-Nakaguchi Azusa, Shishido Erika, Yahara Misa, Urayama Syun-ichi, Ninomiya Akihiro, Chiba Yuto, Sakai Kanae, Hagiwara Daisuke, Chibana Hiroji, Moriyama Hiromitsu, Gonoï Tohru	4. 巻 11
2. 論文標題 Phenotypic and Molecular Biological Analysis of Polymycovirus AfuPmV-1M From <i>Aspergillus fumigatus</i> : Reduced Fungal Virulence in a Mouse Infection Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 607795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.607795	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 Santos Rui, Cavalheiro Mafalda, Costa Catarina, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji, Teixeira Miguel C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Screening the Drug:H+ Antiporter Family for a Role in Biofilm Formation in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.00029	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 Yamaguchi Masashi, Taguchi Masaki, Uematsu Katsuyuki, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Sato-Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji	4. 巻 70
2. 論文標題 Sandwich freezing device for rapid freezing of viruses, bacteria, yeast, cultured cells and animal and human tissues in electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 215 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa049	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 Cavalheiro Mafalda, Romao Daniela, Santos Rui, Mil-Homens Dalila, Pais Pedro, Costa Catarina, Galocha Monica, Pereira Diana, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Chibana Hiroji, Fialho Arsenio M., Teixeira Miguel C.	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of CgTpo4 in Polyamine and Antimicrobial Peptide Resistance: Determining Virulence in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1376 ~ 1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031376	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Azusa Takahashi-Nakaguchi, Kaname Sasamoto, Keiko Nakano, Michiyo Sato-Okamoto, and Hiroji Chibana
2. 発表標題 Genome-wide functional analysis of pathogenetic yeast, <i>Candida glabrata</i> in dissemination from the murine gastrointestinal tract
3. 学会等名 The 9th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 梓
2. 発表標題 真菌の病原性を抑制するマイコウイルス
3. 学会等名 細菌学会 (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------