

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590540

研究課題名(和文)血清刺激に应答する病原真菌のステロール取り込み機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of serum-induced sterol uptake 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・准教授

研究者番号：40369989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌カンジダ・グラブラータ(*Candida glabrata*)は、宿主内の血清に应答してステロール取り込みが起こり、真菌の感染成立に深い関わりがある。この取り込み機構において、1)血清成分中のトランスフェリン等による鉄欠乏がそのスイッチとなること、2)マウス感染モデルの実験から、ステロールトランスポータCgAUS1が真菌の感染成立に寄与していること、3)モノプロテインCgTIR3もステロールの取り込みに必要で、CgAUS1と同様に転写因子UPC2A、UPC2Bに制御されていること、4)ステロール取り込みには、CgAUS1とCgTIR3以外の因子も必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Limited uses of antifungals due to narrow spectrum and severe side effects motivate the development of novel antifungals and therapy. Elucidation of stress response mechanisms and/or isolation of virulence factors is necessary steps to address this. Sterol uptake would participate in infection process in a pathogenic fungus, *Candida glabrata*, since this sterol uptake is induced by adding serum. As the first step to understand mechanism of serum-induced sterol uptake, we revealed the four things describing as follows: 1) iron depletion by host factor such as transferrin induces sterol uptake, 2) a mouse infection model demonstrated that a sterol transporter CgAUS1 contribute to infection process, 3) a monnoprotein CgTIR3 participates in sterol uptake and its expression is controlled by UPC2A and UPC2B as well as the CgAUS1 gene, 4) the factor(s) other than CgAUS1 and CgTIR3 would be required for sterol uptake.

研究分野：分子微生物学

キーワード：微生物 感染症 発現制御 脂質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

- (1) 現在の抗真菌薬には抗真菌スペクトルが狭いことや耐性菌の出現頻度が高いこと、そして副作用の問題があるため、治療薬選択の余地は狭く、有効な治療法の開発が急務となっている。真菌感染症の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り、分子レベルの研究が盛んに行われている。病原性真菌 *Candida glabrata* は、临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から、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因子の探索・評価に用いられている。
- (2) 抗真菌薬の多くはステロール合成阻害剤であるが、病原真菌の中には宿主からステロールを取り込んで生育に利用するものがあること、また、ステロールの恒常性を制御する転写因子の転写阻害が抗真菌薬活性を持つことが報告されていることから、ステロールの取り込みが真菌の感染成立や薬剤耐性獲得と深い関わりがあると考えられている (Bien CM, & Espenshade PJ. *Eukaryot Cell*. 9: 352-9, 2010: 総説)。我々は、*C. glabrata* において、宿主からのストレスである血清刺激により発現するステロールトランスポータ AUS1 を発見した (Nakayama H et al., *J Antimicrob Chemother* 60: 1264-72, 2007)。これらの状況を考慮し、血清添加によるストレス応答からステロール取り込みまでの経路とその取り込み機構の解明は、真菌の宿主内環境への適応や生存戦略の解明の糸口となると考え、本研究に着手した。
- (3) 同定した AUS1 は ABC (ATP-binding cassette) トランスポータに属し、メジャーな ABC トランスポータと一次配列上、大きな差異はないが、輸送の方向が逆で、基質であるステロールを取り込む。そのため、本トランスポータの作用機序の解明からの基質の輸送方向を規定するメカニズムの解明につながると考えられた。また興味深いことに、このトランスポータは、恒常的に発現させた株でも通常の培養条件ではステロールの取り込みが観察されなかった Nakayama H et al., *J Antimicrob Chemother* 60: 1264-72, 2007)。そのため、宿主因子に起因する何らかのストレスが AUS1 のトランスポータによるステロールの取り込み活性を発現させていると考え、その取り込みの活性化に関わる遺伝子と活性化する宿主側の要因の同定を試みた。その結果、AUS1 遺伝子の発現を正に制御する転写因子 UPC2A と UPC2B を同定した

(Nagi et al., *Genes Cells*. 16:80-9, 2011)。

2. 研究の目的

真菌感染症の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。我々は、血清添加のストレス応答に関与したステロール恒常性維持機構に着目し、この解明をすることから、真菌特異的な治療標的分子を同定することを計画した。上記の状況を踏まえ、同定した転写因子やその上流および下流の因子について機能解析していくことで、血清刺激(ストレス応答)から AUS1 によるステロール取り込みまでの経路の詳細を明らかにすること、また、真菌感染症の治療薬開発に向け、感染実験によりステロール取り込みに関わる因子の宿主体内での重要性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

血清添加によるストレス応答から AUS1 までのシグナル伝達経路及びステロール取り込みの分子機構について、以下の方法で適宜、連携研究者の協力を得ながら解析した。

- (1) ステロールを取り込むとアゾール系薬剤に対する感受性が著しく下がることを利用し、血清中の種々の成分を薬剤感受性測定培地に加えることで、血清のどの成分が、ステロール取り込みのスイッチになるかを調べた。
- (2) 目的遺伝子の発現を人工的に制御できる株 (TET 株、Nakayama H et al., *Microbiology* 144: 2407-15, 1998) のステロール取り込み能を測定することで (HPLC を用いて、培養した細胞のステロール組成を分析し、添加した 7-dehydro cholesterol が検出されるかを見る) ステロール取り込みに必須な因子の同定を行った。
- (3) マンノプロテイン (TIR3) については、AUS1 遺伝子の発現時期や局在との共通性および相違性をイムノプロテイングなどの方法を用いて確認した。
- (4) 野生株および転写因子 UPC2A および UPC2B の変異体 (欠損株) の血清添加における遺伝子発現プロファイルを比較することで、転写因子の上流および下流の因子の同定を試みた。
- (5) 感染モデルを用いて、ステロール取り込みに関わる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. 研究成果

- (1) 好気条件下でのステロールの取り込みは、単にステロールの添加だけでは起こらないことが以前の研究成果から明らかとなっていたため (Nakayama H, et al., *Antimicrob Agents Chemother*.

44:2411-, 2000), 今回ステロールに lipoprotein deficient serum を加えた培地と加えない培地で、アゾール系薬剤の一つであるフルコナゾールの薬剤感受性を測定した。その結果、ステロールに lipoprotein deficient serum を加えた培地でのみ、薬剤感受性が著しく下がったことが確認できた。このことから、血清中のステロール以外の成分が、好気条件下でのステロール取り込みのスイッチとなっていることが明らかとなった。以上の結果は、雑誌論文5として発表した。

- (2) 血清中のステロール以外のどの成分がスイッチとなっているかを確認するため、血清中に含まれる成分を考慮し、アポトランスフェリン、塩化鉄や硫酸マグネシウムなどをそれぞれ測定用培地に加え、フルコナゾールの薬剤感受性を測定した。結果、アポトランスフェリンを添加した場合、無添加培地と比べて薬剤感受性が著しく下がることが確認できた。アポトランスフェリンは、鉄キレターの役割をしていることが考えられたので、鉄キレターである ferrozine を加えた場合と血清に塩化鉄を加えた場合でのフルコナゾールの薬剤感受性を測定した。その結果前者では、無添加培地と比べて ferrozine を加えることで薬剤感受性が著しく下がった。また、後者では、塩化鉄を血清中に追加することで、血清添加で見られたような薬剤感受性の変化は見られず、無添加培地と同様な薬剤感受性を示した。このことから、鉄不足が、好気条件下でのステロール取り込みのスイッチとなっていることが明らかとなった。

そこで、ステロールトランスポータ *AUS1* や *AUS1* 遺伝子の発現を制御する転写因子 *UPC2A* および *UPC2B* が、鉄キレターの添加によって変化するかどうかを半定量 RT-PCR を用いて評価したところ、血清添加と同様、鉄キレター添加によって、いずれの遺伝子の発現も増加することが確認できた。

さらに、マウス感染モデルの実験から、*aus1* 欠損株では、腎臓における生菌数が野生株で有為に低下していることを明らかにし、*AUS1* が真菌の感染成立に寄与していることを確認した。これら3点については、雑誌論文4として発表した。

- (3) HA-tag をシグナルペプチドの直後に挿入した *TIR3* と GFP をカルボキシ(C)末端にもつ *AUS1* 株 (*AUS1*-GFP/*TIR3*-HA) を作成し、ウエスタン解析および蛍光顕微鏡観察により、*AUS1* の機能発現に必要であるマンノプロテイン *TIR3* の局在を調べた。その結果、細胞膜に局在する *AUS1* とは異なり、細胞壁であることが確認できた。また、*TIR3* がステロールトランスポータ

AUS1 と同様に転写因子 *UPC2A* および *UPC2B* に制御されていることを半定量 RT-PCR を用いて確認した。さらには、ステロール取り込みに直接関わる因子を同定するため、*AUS1* 遺伝子および *TIR3* 遺伝子、そして、その両方の発現を人工的に制御できる株3つの TET 株 (99*AUS1*、99*TIR3*、99*AUS1*/99*TIR3*) を作成し、それらの株のステロール取り込み能を測定した。結果、99*AUS1* および 99*TIR3* では外部ステロールの取り込みは見られなかったが、*AUS1* と *TIR3* の両方を発現させた場合に、細胞からわずかに外部ステロールである 7-dehydro cholesterol が検出できた。しかしながら、その量は、血清添加時と比べはるかに少ない量であったため、ステロール取り込みには、*AUS1* と *TIR3* だけでは不十分で、その他の因子が必要であることを明らかとなった。これらの成果は、雑誌論文1として発表した。

TIR3 の病原性の関与を調べるために、カイコ感染モデルを用いて *tir3* 欠損株と野生株の感染性を比較したところ、有意な差は見られなかった。上述のように、マウスの感染モデルを用いた際、*AUS1* が病原性に関与していることが示されたことから、今後、マウスの感染モデルを用いて、*TIR3* の病原性における重要性を追試する必要があると考えている。

- (4) DNA マイクロアレイを用いて、野生株および転写因子 *UPC2A* 遺伝子および *UPC2B* 遺伝子、そして2つの遺伝子の両方を欠損させた変異株の鉄欠乏状態における遺伝子発現プロファイルと比較したところ、*UPC2A* が、*UPC2B* 遺伝子の発現を正に制御していることが示され、鉄欠乏によるシグナル伝達においては、*UPC2A* が *UPC2B* の上流に位置することが示された。このほか、*ERG3* 遺伝子などのステロール合成に関わる遺伝子群を制御していることが示唆された。また *UPC2B* は、ステロール取り込み因子である *AUS1* 遺伝子や *TIR3* 遺伝子のほか、*TIR3* が属するマンノプロテインファミリーの遺伝子 *TIR1* 遺伝子や *TIR2* 遺伝子の発現を制御していることが、ステロール合成系の遺伝子群の制御には関わっていないことが示唆された。

現在、*UPC2A* および *UPC2B* の TET 株を用いて、*UPC2A* および *UPC2B* を発現させた場合と発現を抑制した場合の遺伝子発現プロファイルの比較について、DNA マイクロアレイを用いた解析を行っており、*UPC2A* および *UPC2B* による発現制御の詳細の解明を進めている。

- (5) ステロール取り込みの更なる解明を行うため、ステロール合成遺伝子欠損株が変異することでステロール要求生株として好気条件下で生育できる株を取得し、それ

解析を行った。これらの株はステロール取り込みが常に ON になっており、マイクロアレイ解析から、AUS1 の機能発現までのシグナル伝達経路に関連する因子の候補を同定した(学会発表 1)。

- (6) ステロール取り込み機構の解明に付随する研究成果として、以下の 2 点を挙げる。

ステロール取り込みに関わる因子を漏れなく同定する目的で、カンジダ・グラブラータのゲノムワイドな転写開始点の同定を行い、新規 59 遺伝子を発見した(雑誌論文 2 として発表)。

アゾール剤に対する薬剤耐性する他のトランスポータを検索し AUS1 との関連を調べる目的の第一段階として、drug:H⁺ antiporter の解析を行った(雑誌論文 3 として発表)。

以上(1)-(6)の研究成果は、ステロールの取り込み機構の詳細な解明に大きく貢献するものであるだけでなく、雑誌論文 1 が、Global Medical Discovery (ISSN 1929-8536) で Key Scientific Articles として取り上げられたように、真菌治療薬の開発につながる可能性や真菌治療以外の分野への貢献が期待できる可能性を示したものといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Inukai T, Nagi M, Morita A, Tanabe K, Aoyama T, Miyazaki Y, Bard M, Nakayama H. The mannoprotein *TIR3* (CAGL0C03872g) is required for sterol uptake in *Candida glabrata*. *Biochim Biophys Acta*. 1851(2):141-51, 2015. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.11.002 (Corresponding author) (査読有)
2. Aoyama T, Nakayama H, Ueno K, Inukai T, Tanabe K, Nagi M, Bard M, Chibana H. Genome-wide survey of transcriptional initiation in the pathogenic fungus, *Candida glabrata*. *Genes Cells*, 19(6):478-503, 2014. doi: 10.1111/gtc.12147 (Corresponding author) (査読有)
3. Costa C, Nunes J, Henriques A, Mira NP, Nakayama H, Chibana H, Teixeira MC. *Candida glabrata* drug:H⁺ antiporter CgTpo3 (ORF CAGL0I10384g): role in azole drug resistance and polyamine homeostasis. *J Antimicrob Chemother*, 69(7): 1767-76, 2014. doi: 10.1093/jac/dku044. (査読有)
4. Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. The *Candida*

glabrata sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation. *Mol Microbiol* 88(2): 371-81, 2013. doi: 10.1111/mmi.12189 (査読有)

5. Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. *J Infect Chemother* 19(1): 138-43, 2013. doi: 10.1007/s10156-012-0531-3 (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. 伊藤茉里奈、犬飼達也、名木稔、近藤健太、田辺公一、中山浩伸 病原性真菌 *Candida glabrata* のエルゴステロール取り込みに関連する因子の同定 日本薬学会 第 135 年会 2015 年 3 月 25 日~28 日、神戸
2. 犬飼達也、田辺公一、中山浩伸 病原性真菌 *Candida glabrata* のエルゴステロール合成の変異に対する復帰変異株の性質 第 87 回日本細菌学会総会 2014 年 3 月 26 日~28 日、東京
3. 犬飼達也、田辺公一、名木稔、中山浩伸 病原性真菌 *Candida glabrata* のマンノプロテイン *TIR3* のステロールの取り込みにおける役割 第 57 回日本医真菌学会総会 2013 年 9 月 27 日~28 日、東京
4. 名木稔、田辺公一、中山浩伸、梅山隆、山越智、知花博治、梶原将、大野秀明、宮崎義継 *Candida glabrata* もおける ABC タンパク質 Aus1p の細胞外ステロール取り込みと病原性における役割 第 57 回日本医真菌学会総会 2013 年 9 月 27 日~28 日、東京
5. 中山浩伸、田辺公一、知花博治 病原性真菌 *Candida glabrata* のマンノプロテイン *TIR3* のステロールの取り込みにおける役割 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18 日~20 日、千葉
6. 田辺公一、名木稔、中山浩伸、梅山隆、山越智、大野秀明、宮崎義継 病原性真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日~14 日福岡
7. 中山浩伸 病原性真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール取り込み機構 第 6 回細菌学若手コロッセウム 2012 年 8 月 8 日~10 日、八王子

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

Global Medical Discovery [ISSN
1929-8536]での掲載

<https://globalmedicaldiscovery.com/key-scientific-articles/the-mannoprotein-tir3-cag10c03872g-is-required-for-sterol-uptake-in-candida-glabrata/>

6．研究組織

(1)研究代表者

中山 浩伸 (NAKAYAMA Hironobu)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授
研究者番号：40369989

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

知花 博治 (CHIBANA Hiroji)
千葉大学・真菌医学研究センター・准教授
研究者番号：30333488