

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790428

研究課題名(和文) 病原真菌における細胞外ステロール取り込みと病原性の関係

研究課題名(英文) The exogenous sterol uptake in pathogenic fungus, *Candida glabrata*

研究代表者

田辺 公一 (Tanabe, Koichi)

国立感染症研究所・国立感染症研究所 真菌部・主任研究官

研究者番号：80370964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：病原真菌 *Candida glabrata* は宿主に感染時に、細胞外ステロール取り込みを活性化させて、病原性を発揮すると考えられる。本研究では、ステロール取り込み活性化機構およびステロール取り込みが病原性において果たす役割を明らかにすることを目的とした。

C. glabrata において鉄欠乏条件下でステロール取り込みが活性化されること、また、マウス感染実験においてステロール取り込みができない AUS1 遺伝子破壊株の臓器定着率が低下することを明らかにした。またマンノプロテイン TIR3 も細胞外ステロール取り込みに必須であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic fungus, *Candida glabrata* is thought to take up exogenous cholesterol inside host body. Exogenous sterol uptake in *C. glabrata* was activated under iron-depleted conditions. Both ABC protein, AUS1 and mannoprotein, TIR3 was required for sterol uptake. Mouse infection model with AUS1-knockout mutant revealed that sterol uptake was thought to promote the *C. glabrata* survival inside host tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：病原真菌 ステロール ABCタンパク質

1. 研究開始当初の背景

病原真菌 *Candida glabrata* は宿主に感染した際に、細胞外ステロール取り込みを活性化させて、病原性を発揮するという仮説をたてた。モデル酵母である *Saccharomyces cerevisiae* においては細胞外ステロール取り込みを担うタンパク質が複数同定されていたが、病原真菌のステロール取り込みに関して、どのようなタンパク質が関係するのか、宿主体でどのような役割を持つのかについては全く解明されていなかった。

2. 研究の目的

病原真菌 *C. glabrata* において、ステロール取り込みが宿主体内（マウス感染実験）で起こるかどうかが、ステロール取り込みが活性化される分子機構、およびステロール取り込みが病原性において果たす役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

AUS1 の発現を誘導する環境因子 低酸素、鉄欠乏、界面活性剤、浸透圧など細胞膜の性質やステロール代謝に影響を及ぼす可能性のある条件において、*AUS1* の発現誘導、ステロール取り込みが活性化される条件を明らかにする。まず、アゾール剤（ステロール合成阻害剤）で *C. glabrata* の生育を抑制しておき、培地にステロールを添加する。通常の培養条件ではステロールの取り込みは起こらないが、上記ストレス条件の中でステロール取り込み活性化が起これば、細胞増殖の回復が認められる。この簡易アッセイ法を用いて、ステロール取り込みを活性化する培養条件、因子のスクリーニングを行う。ステロール取り込み活性化条件を見出せば、*AUS1*

および感染臓器内で発現上昇が認められた遺伝子の発現量についても調べる。この実験によって、感染時に具体的にどのようなストレスが引き金となってステロール取り込みが活性化されるのかを明らかにする。また、実際に細胞外ステロールが取り込まれることを脂質分析で明らかにする。

AUS1 以外のステロール取り込み必須因子の同定

S. cerevisiae では *AUS1* 以外に mannoprotein がステロール取り込みに必要であるとされている。*C. glabrata* においてステロール取り込みが活性化されている状態で発現量が上昇する mannoprotein 遺伝子の破壊株を作製し、ステロール取り込みに関係する遺伝子を同定する。

ステロール取り込み遺伝子の病原性における重要性

ステロール取り込みに関与する遺伝子破壊株を作製し、マウス感染実験を行い、ステロール取り込みの病原性における役割を明らかにする。臓器に定着した菌数を計数し、*AUS1* 遺伝子破壊株の病原性の評価を行う。

4. 研究成果

C. glabrata において鉄欠乏条件でステロール取り込みが活性化されることを見出した。また、マウス感染実験においてステロール取り込みに必須である *AUS1* 遺伝子を破壊した株の臓器定着率が低下することを明らかにした。最終年度は、1. 鉄欠乏条件において DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。2. 鉄欠乏条件で発現量が増加しかつステロール取り込みに関わると予想されるマンノプロテイン遺伝子破壊株を複数作製した。3. マンノプロ

テイン遺伝子破壊株のうち、*TIR3* 破壊株においてステロール取り込みができなくなることを見出した。*TIR3* は *AUS1* と同様に細胞外ステロール取り込みに必須であることが示された。4. *AUS1* の発現量調節にかかわる領域をプロモーターアッセイによって同定した。*AUS1* のコーディング領域の上流 900-1000bp の領域が鉄欠乏による発現量調節に必要であることを明らかにした。以上の結果より、*C. glabrata* のステロール取り込みに必須である因子を同定し、ステロール取り込みの生理的役割と活性化機構の一端を解明できたと考えられる。

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 2 件)

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.** **2013** Apr;88(2):371-81. (*Corresponding author)

9. 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.** **2013** Feb;19(1):138-43. (*Corresponding author)

[学会発表](計 5 件)

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：病原真菌 *Candida glabrata* における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

田辺公一、梅山 隆、金子幸弘、山越智、大野秀明、宮崎義継： *Candida glabrata* の生体内における病原因子；鉄欠乏における遺伝子発現調節 第 56 回 日本医真菌学会総会・学術集会 2012 年 11 月

田辺公一、名木 稔、山越 智、梅山隆、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込み活性化機構 第 41 回 薬剤耐性菌研究会 2012 年 10 月

田辺公一、名木 稔、梅山 隆、金子幸弘、山越 智、大野秀明、宮崎義継：*Candida glabrata* の鉄欠乏における遺伝子発現調節 第 95 回 日本細菌学会関東支部総会 2012 年 10 月

名木 稔、田辺公一、山越 智、梅山 隆、大野秀明、宮崎義継：病原真菌 *Candida glabrata* はユニークなステロールトランスポーターによりアゾール耐性となりうる 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会 2012 年 4 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田辺公一（国立感染症研究所・真菌部）

研究者番号：80370964

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：