

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460541

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機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying exogenous sterol uptake in pathogenic fungus

研究代表者

田辺 公一 (Tanabe, Koichi)

龍谷大学・農学部・准教授

研究者番号：80370964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌 *Candida glabrata* は、ヒト消化管に常在する酵母であるが、免疫の低下した患者において播種性の感染を引き起こす。*C. glabrata* は宿主体内で細胞外のステロールを取り込んで利用することが示唆されているが、その生理的意義や詳細な分子メカニズムについては明らかにされてこなかった。本研究では、遺伝子破壊 *C. glabrata* 株の解析結果より、ステロールトランスポーター Aus1p および細胞壁マンノプロテイン Tir3p がステロール取り込みに必須であること、また AUS1 および TIR3 の発現量は血流感染時と同程度の鉄欠乏条件で顕著に増加することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic fungus *Candida glabrata*, a commensal yeast that is resident in the human gastrointestinal tract, causes disseminated infection in immune-compromized host. Although *C. glabrata* has been thought to take up extracellular sterols in the host body, its physiological significance and molecular mechanisms have not been elucidated. From the analysis of the gene-disrupted *C. glabrata* strain, we demonstrated that the sterol transporter Aus1p and the cell wall mannoprotein Tir3p were essential for sterol uptake, and the expression levels of AUS1 and TIR3 were up-regulated under the iron deficiency condition similar to blood stream infection.

研究分野：微生物学

キーワード：カンジダ ABCトランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

病原真菌 *Candida glabrata* は、ヒト消化管に常在する酵母であるが、免疫の低下した患者において播種性の感染を引き起こす。これまでの研究報告から、*C. glabrata* は自身でステロールを合成することも可能であるが、宿主体内においては細胞外のステロールを取り込んで利用することが示唆されている。宿主体内でのステロール取り込みは病原性や抗真菌薬耐性、特にステロール合成阻害剤に対する耐性と関連があると予想される。しかしながら、*C. glabrata* を含む病原真菌におけるステロール取り込みの生理的意義や詳細な分子メカニズム、活性化機構などについてはこれまでほとんど研究されてこなかった。

## 2. 研究の目的

*C. glabrata* における細胞外ステロールの取り込みに関わる因子(遺伝子)を同定することを目的とした。また、通常の培養条件下では活性化されないステロール取り込みが、どのような細胞外刺激に反応して活性化されるかを明らかにし、ステロール取り込みの播種性感染時の生理的役割を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞外ステロールの取り込みに関しては遺伝学的に近縁種であり、モデル酵母である *Saccharomyces cerevisiae* で先行研究が行われている。ステロール取り込みに関わると予想される遺伝子を破壊した *C. glabrata* 株を作製し、ステロール取り込み活性の変化を調べた。ステロール取り込みが低下するような変異株について、マウス感染実験を行い、臓器定着率の変化を野生型株と比較検討した。また、種々の培養条件下で *C. glabrata* を培養し、ステロール取り込みを活性化するような細胞外シグナルのスクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

遺伝子破壊 *C. glabrata* 株の解析結果より、ステロールトランスポーター Aus1p および細胞壁マンノプロテイン Tir3p がステロール取り込みに必須であることを明らかにした。AUS1 遺伝子破壊株は、マウス感染実験において肝臓や腎臓への臓器定着率すなわち病原性が低下することを見出した。腎臓に形成された菌塊より RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った結果、感染臓器内において AUS1、TIR3 とともに発現量の著明な上昇が認められた。また、AUS1 および TIR3 の発現量は鉄欠乏条件下で顕著に増加することを見出した。血液中の鉄イオンはトランスフェリ

ンと結合しており、利用可能な鉄イオン濃度はきわめて低く保たれている。以上の結果より、*C. glabrata* は血流感染時に鉄欠乏シグナルを介してステロール取り込みが活性化されると考えられた。この結果は、*C. glabrata* におけるステロール取り込みが、病原性を持たない近縁種 *S. cerevisiae* とは異なるシグナル伝達経路によって活性化されることを示唆している。また、GFP を融合させた Aus1p を発現させた *C. glabrata* 株の蛍光顕微鏡観察の結果、Aus1p は分裂時には娘細胞に局在しており、新しい世代の細胞において選択的にステロール取り込みを活性化していると考えられた。

以上の結果および *S. cerevisiae* における先行研究の結果から、AUS1 と TIR3 の発現量の上昇がステロール取り込みの活性化に必要な十分条件であると推測された。しかし、AUS1 と TIR3 遺伝子を強制発現させた *C. glabrata* 株は、細胞外ステロールを取り込まなかったことから、AUS1 と TIR3 以外にもステロール取り込み活性を調節する遺伝子の存在が示唆された。

## 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8件)

Noguchi H, Hiruma M, Maruo K, Jono M, Miyata K, Tanaka H, Tanabe K, Miyazaki Y, Ihn H. Localized Cutaneous Cryptococcosis: Summary of Reported Cases in Japan. Med Mycol J. 査読あり 2016;57(3):E35-9. doi: 10.3314/mmj.15-00024.

Nagi M, Tanabe K\*, Nakayama H, Ueno K, Yamagoe S, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y. Iron-depletion promotes mitophagy to maintain mitochondrial integrity in pathogenic yeast *Candida glabrata*. Autophagy. 査読あり 2016 Aug 2;12(8):1259-71 (\*Corresponding author) doi: 10.1080/15548627.2016.1183080.

Ikeda-Dantsuji Y, Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Ueno K, Nagi M, Yamagoe S, Kinjo Y, Miyazaki Y. Interferon- $\gamma$  promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. J Infect Chemother. 査読あり 2015 Dec;21(12):831-6. doi: 10.1016/j.jiac.2015.08.001.

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*. 査読あり 2014 Nov 11;1851(2):141-151.  
doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.11.002.

Tarumoto N, Watanabe N, Tanabe K, Hashikita G, Takahashi S, Yuki A, Hirose Y, Sekine S, Kanoh I, Shimojima M, Kaneda, M, Yamaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Maesaki S. Trend of susceptibility testing of clinical isolates of *Candida* species from aseptic samples in hospitals in Saitama Prefecture. *Jpn J Antibiot*. 査読あり 2014 Apr;67(4):215-221. Japanese,  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420317>

Urai M, Kaneko Y, Niki M, Inoue M, Tanabe K, Umeyama T, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. *J Infect Chemother*. 査読あり 2014 Oct;20(10):612-5.  
doi: 10.1016/j.jiac.2014.06.004.

Saraya T\*, Tanabe K\*, Araki K, Yonetani S, Makino H, Watanabe T, Tsujimoto N, Takata S, Kurai D, Ishii H, Miyazaki Y, Takizawa H, Goto H. Breakthrough invasive *Candida glabrata* in patients on micafungin: A novel *FKS* gene conversion correlated with sequential elevation of minimum inhibitory concentration. *J Clin Microbiol*. 査読あり 2014 Jul;52(7):2709-12. (\*These authors equally contributed)  
doi: 10.1128/JCM.03593-13.

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*. 査読あり 2014 Jun;19(6):478-503.  
doi: 10.1111/gtc.12147.

〔学会発表〕(計 11件)

名木 稔、田辺公一、中山浩伸、上野圭吾、犬飼達也、中村茂樹、梅山 隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継 *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)が病原性

に及ぼす影響 第60回日本医真菌学会総会・学術集会 平成28年10月2日 東京

Minoru Nagi, Koichi Tanabe, Hironobu Nakayama, Keigo Ueno, Satoshi Yamagoe, Takashi Umeyama, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki “Iron-depletion promotes mitophagy in pathogenic yeast *Candida glabrata*” 14th International Congress on Yeasts 平成28年9月11-15日 兵庫

名木 稔、田辺公一、犬飼達也、上野圭吾、中村茂樹、梅山 隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込みが抗真菌薬感受性、病原性に及ぼす影響 第64回日本化学療法学会総会 平成28年6月9-11日 兵庫

中山 浩伸、犬飼 達也、名木 稔、伊藤 茉里奈、近藤 健太、田辺 公一 病原性真菌 *Candida glabrata* のエルゴステロール取込に関連する新たな因子の同定 第89回日本細菌学会総会 平成28年3月23-25日 大阪

田辺 公一、名木 稔 鉄欠乏条件において誘導される *Candida glabrata* のストレス応答 第89回日本細菌学会総会 平成28年3月23-25日 大阪

名木 稔、田辺公一、中山浩伸、犬飼達也、梅山 隆、山越 智、中村茂樹、大野秀明、宮崎義継 カンジダ属の薬剤耐性の現状と課題 第59回日本医真菌学会総会・学術集会 平成27年10月9-10日 北海道

名木 稔、田辺公一、犬飼達也、中山浩伸、梅山 隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込みが抗真菌薬感受性、病原性に及ぼす影響 第59回日本医真菌学会総会・学術集会 平成27年10月9-10日 北海道

名木 稔、田辺公一、犬飼達也、梅山隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継 *Candida glabrata* の細胞外ステロール取り込みが抗真菌薬感受性、病原性に及ぼす影響 第63回日本化学療法学会総会 平成27年6月4-6日 東京

名木 稔、田辺公一、石野敬子、梅山 隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継 真菌の薬剤耐性の現状と課題 第63回日本感染症学会東日本地方学術集会 平成26年10月26-28日 東京

田辺公一、大野秀明、名木 稔、浦井 誠、  
金子幸弘、梅山 隆、山越 智、知花博  
治、亀井克彦、宮崎義継 カンジダ属の  
抗真菌薬感受性の変貌 第 88 回日本感  
染症学会学術講演会・第 62 回日本化学  
療法学会総会 平成 26 年 6 月 18 - 20  
日 福岡

田辺公一、大野秀明、名木 稔、浦井 誠、  
金子幸弘、梅山 隆、山越 智、宮崎義  
継 カンジダ属の抗真菌薬耐性 第 35  
回関東医真菌懇話会 平成 26 年 6 月 7  
日 東京

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田辺 公一 (TANABE, Koichi)  
龍谷大学・農学部・准教授  
研究者番号：80370964