

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860296

研究課題名(和文) 病原酵母Candida glabrataのミトファジーが病原性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Role of mitophagy of Candida glabrata in pathogenicity.

研究代表者

名木 稔(Minoru, Nagi)

国立感染症研究所・真菌部・研究員

研究者番号：60711687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原酵母Candida glabrataにおけるミトファジーの活性化条件の探索を行い、鉄欠乏条件でミトファジーが活性化することを見出した。鉄欠乏条件におけるミトファジーには、出芽酵母と同様、ATG32が必須であった。ATG32遺伝子破壊株を用いた解析により、ATG32は、鉄欠乏条件でのミトコンドリア機能維持に必要であること、鉄欠乏条件での長期間生存に重要な役割を果たしていること、マウス病原性に関与していることを明らかにした。C. glabrataのミトファジーは鉄欠乏環境および宿主臓器内における生存に関与しており、病原性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Screening of mitophagy activation conditions indicated that mitophagy was induced in Candida glabrata cells under iron-poor conditions, and that the disruption of ATG32, which is responsible for mitophagy in Saccharomyces cerevisiae, blocked mitophagy in C. glabrata. Unexpectedly, the mitophagy-deficient mutant of C. glabrata (atg32) exhibited decreased longevity under iron-depleted conditions. The mitochondrial membrane potential in atg32 cells was significantly lower than that in wild-type (WT) cells under iron-depleted conditions. In a mouse model of disseminated infection, the atg32 strain resulted in significantly decreased kidney and spleen fungal burdens compared with WT strain. These results indicate that mitophagy in C. glabrata occurs in an iron-poor host tissue environment, and it may contribute to the longevity of cells through mitochondrial quality control, and to their pathogenesis.

研究分野：医真菌学、分子生物学、生化学

キーワード：ミトファジー ATG32 オートファジー 病原真菌 酵母 ミトコンドリア Candida glabrata 病原性

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、非選択的なオートファジーと同様に、栄養飢餓に適応するためのアミノ酸調達に役立つと考えられている(文献)。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、細胞内ミトコンドリアの品質管理にも関わることが示唆されているが、詳細は明らかにされていない(文献)。

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るが、ミトコンドリアにおける呼吸機能を失った呼吸欠損突然変異株がしばしば臨床から分離される。呼吸欠損株は合成培地では生育速度が極端に低下しているため、宿主体内での生存率も低くなると考えられていたが、予想に反して一部の呼吸欠損株は野生型株よりも病原性が高いことがマウス感染実験によって示された(文献)。このように、*C. glabrata* の病原性とミトコンドリアの機能には関連があることが示されているが、ミトコンドリア機能を調節する機構は全く明らかにされていない。

申請者は、マウス感染実験を行い、感染臓器内における *C. glabrata* の遺伝子発現解析を行ったところ、合成培地中で生育している場合と比べ、感染臓器内ではマイトファジー関連遺伝子 *ATG32* の発現量が著明に増加していることを見出した(文献)。*C. glabrata* のマイトファジーは感染臓器内において活性化していることが推測され、これがミトコンドリアの機能調節に関与していると考えられた。

2. 研究の目的

申請者は、病原酵母 *C. glabrata* のマイトファジー関連遺伝子 *ATG32* の発現量が感染臓器内において著明に増加することを見出し、マイトファジーによるミトコンドリアの機能調節が *C. glabrata* の宿主内での生育(病原性)においてなんらかの役割を果たしていると考えた。本研究では以下の3点を明らかにすることを目的とする。

(1) *C. glabrata* におけるマイトファジー活性調節機構、(2) *C. glabrata* のマイトファジーがミトコンドリア機能に及ぼす影響、(3) 感染臓器、食細胞内でのマイトファジーの役割

3. 研究の方法

(1) *C. glabrata* における *ATG32* の発現およびマイトファジー活性調節機構

S. cerevisiae におけるマイトファジーは、「窒素飢餓培地で培養した条件」、「非発酵性培地で長期間培養を続けた条件」で誘導されることが報告されている(文献)。*C. glabrata* でも同様の培養条件において、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

べる。マイトファジー活性の確認は、ミトコンドリアに高発現させた GFP 融合ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)が液胞で分解を受けて GFP が切り出される活性によって評価する(文献)。宿主体内でマイトファジーが起きるといふ仮説を検証するために、*C. glabrata* が宿主体内で暴露されると予想される、血清、活性酸素、鉄欠乏、低酸素などの培養条件において、マイトファジーおよびマイトファジー関連遺伝子の発現誘導が起こるかを調べる。

(2) マイトファジーがミトコンドリアの機能に及ぼす影響

上記実験でマイトファジーが活性化した培養条件において、ミトコンドリアの量、形態、呼吸活性、膜電位、ROS 産生量がどのように変化するのかを調べる。量、形態の観察に関しては、mtDHFR-GFP を高発現させた *C. glabrata* および、ミトコンドリア染色試薬 SYTO18 による染色を行った菌体を蛍光顕微鏡観察することで行う。画像解析ソフト Image J を用い、撮影した蛍光画像の解析を行い、蛍光強度と染色された面積の解析からミトコンドリア量および形態の変化を数値化して客観的に評価する。膜電位の観察は、ミトコンドリア膜電位依存的蛍光染色試薬 DiOC₆(3)を用い、Flow cytometry によって定量する。呼吸活性は細胞の酸素消費量測定キット MitoXpress-Xtra を用いて測定する。活性酸素種産生量に関しては、ROS 検出蛍光プローブ H₂DCFDA および Dihydroethidium を用いて細胞内の H₂O₂ および superoxide 産生量を Flow cytometry を用いて定量する。全ての実験を野生株と *atg32Δ* 株について行い、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を明らかにする。

(3) マウス感染臓器中または貪食細胞でのマイトファジーの活性および役割

マイトファジーが感染宿主内で起きているのかどうかを、マウス感染実験によって明らかにする。また、野生株と *atg32Δ* 株をマウスに感染させ、臓器定着率を比較することで、病原酵母の病原性におけるマイトファジーの重要性を調べる。

マウスに *C. glabrata* を感染させて、2日目、7日目において、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出する(文献)。臓器内の *C. glabrata* 菌体のみを密度勾配用媒体 Percoll を用いた密度勾配遠心法によって臓器から分離し、前述のように、マイトファジー活性の検出とミトコンドリア機能を調べる。同様の条件において野生株と *atg32Δ* 株の臓器定着率を比較し、マイトファジーが病原性に関与しているかどうかを調べる。

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の貪食された後の生存である(文献)。株化されたマクロファージ様細胞、Raw264、J774、分化させた THP-1

細胞などを用いて、貪食された状態でのマイトファジー活性と菌の生存率を調べる。野生株と *atg32Δ* 株を上記マクロファージ様細胞と混合し、12 時間後に細胞を滅菌蒸留水で破裂させて寒天培地に塗布し、生存菌数を計数する。また、同じ操作で得られる *C. glabrata* を回収し、前述のようにウエスタンブロットと顕微鏡観察を行い、貪食細胞内でのマイトファジー活性を検討する。

4. 研究成果

(1) 宿主臓器内においてマイトファジー関連遺伝子 *ATG32* の発現量が増加することを既に明らかにしていたため、宿主体内において菌が遭遇しうるストレス条件でスクリーニングを行ったところ、鉄欠乏条件においてマイトファジーが活性化することが明らかとなった。宿主体内、特に血液中ではトランスフェリンなどの鉄キレートタンパク質の働きにより、菌が利用することのできる遊離鉄濃度は非常に低く保たれている。そのため、病原真菌にとって鉄欠乏に適応することは病原性を発揮するために重要であると考えられている。マイトファジーによるミトコンドリア分解が鉄欠乏での生育に何らかの役割を果たしていることが示唆され、*C. glabrata* の病原性についての新たな知見が得られた。

(2) 鉄欠乏条件におけるミトコンドリア機能調節におけるマイトファジーの役割を明らかにするために、ミトコンドリア機能指標である mitochondrial membrane potential (MMP)、reactive oxygen species (ROS) 産生量について、WT と *atg32Δ* とで比較を行った。鉄欠乏条件では MMP が WT と比べて *atg32Δ* で有意に低下していることを明らかにした。また、鉄欠乏条件下での ROS 産生量に関しても *atg32Δ* で有意に低下している事が明らかになり、マイトファジーがミトコンドリア機能に何らかの影響を与えている事が示唆された。

鉄欠乏条件において野生株および *ATG32* 遺伝子破壊株の長期間培養を行い、増殖を停止した細胞の生存期間である Chronological lifespan (CLS) の測定を行った。通常の合成培地 (鉄有り) 条件では WT、*atg32Δ* 共に 20% 程度の生存率を 12 日間維持した。一方で、鉄欠乏培地条件では WT は鉄有り条件と同様の生存率を示したものの、*atg32Δ* では 5 日間の培養で生存率が 0.1% 以下となり、鉄欠乏条件における CLS の維持に *ATG32* が関与していることが示唆された。

(3) マウスに野生株または *ATG32* 遺伝子破壊株を尾静脈感染させ、7 日後の腎臓および脾臓における生菌数の測定を行ったところ、*atg32Δ* では WT と比較して両臓器内の生菌数が有意に低下していることが明らかとなった (図 1)。マウス尾静脈から *C. glabrata*

を感染させ、7 日後の腎臓から菌体を採取し、総 RNA を抽出して定量 RT-PCR によって感染状態における *ATG32* の発現量を調べたところ、感染状態では合成培地で培養されている状態と比較して顕著に *ATG32* の発現量が増加していることが明らかとなり (図 2)、感染時にはマイトファジーが活性化していることが示唆された。

C. glabrata のマイトファジーは鉄欠乏環境および宿主臓器内における生存に関与しており、病原性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

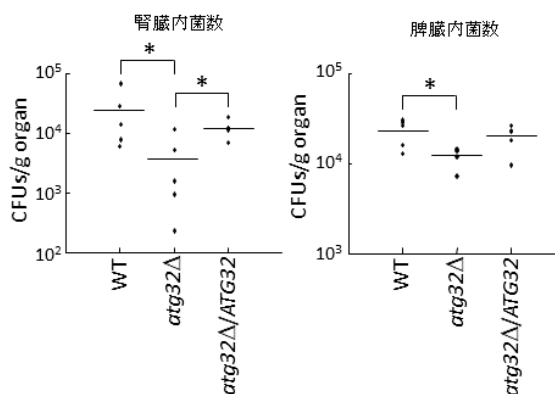


図1 野生株と *atg32Δ* 株のマウス感染実験における臓器内菌数

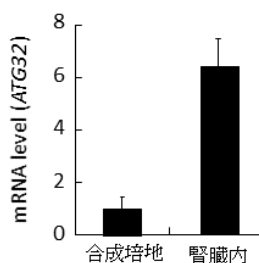


図2 マウス腎臓内生菌の *ATG32* の発現量

< 引用文献 >

K Takeshige, M Baba, S Tsuboi, T Noda, Y Ohsumi. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of Cell Biology*. 1992. 119(2):301-11.

Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. 27;287(5):3265-72.

Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F, Torelli R, Posteraro B, Vandeputte P, Sanglard D. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011. 55(5):1852-60

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*.2016. 2;12(8):1259-71.

Kanki T, Kang D, Klionsky DJ. Monitoring mitophagy in yeast: the Om45-GFP processing assay. *Autophagy*. 2009. 5(8):1186-9.

Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Developmental Cell*. 2009. 17(1):87-97

Jacobsen ID, Brunke S, Seider K, Schwarzmüller T, Firon A, d'Enfert C, Kuchler K, Hube B. *Candida glabrata* persistence in mice does not depend on host immunosuppression and is unaffected by fungal amino acid auxotrophy. *Infection and Immunity*. 2010. 78(3):1066-77.

Vázquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997. 61(2):170-92.

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4件)

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*. 査読有、2016、2;12(8):1259-71.

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-γ promotes phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* but not *Cryptococcus gattii* by murine macrophages. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 査読有、2015、21(12):831-6.

DOI: 10.1016/j.jiac.2015.08.001.

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 to Cells*. 査読有、2015、19(6):478-503.

DOI: 10.1111/gtc.12147.

Inukai T, Nagi M, Morita A, Tanabe K, Aoyama T, Miyazaki Y, Bard M, Nakayama H. The mannoprotein TIR3 (CAGLOC03872g) is required for sterol uptake in *Candida glabrata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 査読有、2015、1851(2):141-51.

DOI: 10.1016/j.bbali.2014.11.002.

〔学会発表〕(計10件)

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、*Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジーと病原性、第90回日本細菌学会総会、招待講演、2017年3月19日-21日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

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と病原性、第60回日本医真菌学会総会・学術集会、招待講演、2016年10月1日-2日、東京都立産業貿易センター台東館(東京都・台東区)

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、ポスター発表、2016年10月1日-2日、東京都立産業貿易センター台東館(東京都・台東区)

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、ポスター発表、2016年9月11日-15日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市)

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、ポスター発表、2016年6月9日-11日、神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

名木 稔、田辺公一、中村茂樹、梅山 隆、山越 智、大野秀明、宮崎義継、鉄欠乏条件において誘導される *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90回日本感染症学会総会・学術講演会、ポスター発表、2016年4月15日-16日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

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、ポスター発表、2015 年 10 月 10 日、ホテルさっぽろ芸文館（北海道・札幌市）

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、招待講演、2015 年 10 月 10 日、ホテルさっぽろ芸文館（北海道・札幌市）

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、ポスター発表、2015 年 6 月 6 日、京王プラザ新宿（東京都・新宿区）

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会学術集会、招待講演、2014 年 10 月 29 日、東京ドームホテル（東京都・文京区）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

名木 稔 (NAGI, Minoru)

国立感染症研究所・真菌部・研究員

研究者番号：60711687