

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19090

研究課題名(和文)腸管粘膜付着における病原真菌カンジダ・グラブラータ マンナンタンパク質の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the mannoprotein that is involved in the host intestinal attachment in *Candida glabrata*

研究代表者

佐藤 美智代 (michiyo, Sato)

千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教

研究者番号：70525386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌カンジダは免疫不全患者において重篤な日和見感染症を引き起こす。カンジダ種の中でもカンジダ・グラブラータは、患者からの分離頻度が年々増加し問題となっている。本研究では、宿主細胞への腸管粘膜からの感染機構の解明を目的として、宿主細胞への腸管への付着に必要な因子の探索を行った。遺伝子欠損株ライブラリーをマウスに口腔摂取後、腸管からの菌体の回収し、次世代シーケンサーにより、腸管への付着率が低下する株を選別するスクリーニング系を構築した。付着因子の同定までには至らなかったが、スクリーニングの過程で有用な抗真菌剤の標的因子となりうる病原因子として、エルゴステロール合成酵素の一つを同定した。

研究成果の概要(英文)：Candida pathogens cause serious opportunistic infections to immunodeficient patients. *Candida glabrata* is particular problem among *Candida* pathogens, because its frequency of the isolations from patients tends to increase year by year. In this study, to reveal the infection mechanism of *Candida glabrata* through the host intestinal mucosa, we performed the screening of the factor that is involved in the adhesion to the host intestinal mucosa. We constructed the screening system to select the gene-disrupted strains by analyzing the samples isolated from the intestinal mucosa of the mice which were ingested the library composed various gene-disrupted strains with a next-generation sequencer. Though we cannot identify the factor involved in the adhesion to the host intestinal mucosa, we identified one of the the enzyme for ergosterol biosynthesis as the virulence factor that can become the useful target for the development of antifungal drugs.

研究分野：分子生物学

キーワード：Candida glabrata 病原性因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性カンジダ種は、ヒト腸管常在菌である一方、免疫力の低下や高齢によって易感染状態になった患者に対して、重篤な感染症を引き起こす。カンジダ種の中でも、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*) はカンジダ症の治療に頻用されているアゾール系抗真菌薬に低感受性であるため、易感染患者からの分離頻度が年々増加し問題となっている。グラブラータは、宿主の腸管粘膜へ付着し、その後血管内に侵入し、血流によって全身感染を引き起こす。カンジダ種の病原性実験については、感染後期の血流感染後の病原性ばかりが注目され、マウスの血中 (尾静脈) にカンジダを接種し、マウスの生存率や腎臓、肝臓における CFU (Colony forming unit) を測定することにより、病原因子を評価するのが主流である。そのため、感染初期過程で最も重要な腸管粘膜への付着における分子機序はほとんど分かっていない。

感染初期過程の腸管粘膜への付着において、グラブラータが宿主細胞と最初に接するのは細胞壁である。グラブラータは、分子系統分類学的にはモデル生物のパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に近縁であるが、グラブラータの細胞壁は、パン酵母に比べ、マンナンタンパク質の量が、50%も多いという特徴を持つ。このことから、カンジダ・グラブラータのマンナンタンパク質の発達と病原性との関連性が推測される。

2. 研究の目的

グラブラータの感染機序については不明な点が多く、特に感染初期において最も重要なステップである“腸管粘膜への付着”における知見は極めて少ない。本研究では、宿主との接点である「カンジダの細胞壁の最表層を構成する 110 個のマンナンタンパク質」に焦点を絞り、腸管粘膜への付着における同タンパク質の分子および生理機能を解明することを目指す。

3. 研究の方法

カンジダ・グラブラータの腸管粘膜への付着に必要な因子を同定するため、付着への関与が予想される 2 種類のマンナンタンパク質、GPI アンカー型タンパク質 (106 個) と Pir 型タンパク質 (4 個) について、各種遺伝子欠損株もしくは発現制御株を作製する。これら

の株を用いてマウスへの口腔接種を行い、食道、大腸、盲腸等の腸管への付着率が低下した株をスクリーニングする。次に、宿主細胞側で付着に必要な因子を同定するため、スクリーニングで同定したマンナンタンパク質との共沈殿による受容体タンパク質の探索を行う。最後にそれらマンナンタンパク質の分子機能と生理機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 宿主細胞への付着に必要な因子のスクリーニング

宿主細胞への付着に必要な因子のスクリーニングとして、①マウスへの口腔摂取、②腸管からの菌体の回収、③腸管への付着率低下株の次世代シーケンサーによる同定、の 3 つの工程からなる系を構築した。本スクリーニングによって、付着因子の同定までには至らなかったが、その過程で抗真菌剤の標的となりうる病原因子として、エルゴステロール合成系の酵素 A を同定した。

(2) 抗真菌剤の標的となりうる病原因子の同定

グラブラータのアゾール耐性の要因として、アゾール系薬剤により欠失したエルゴステロールの代わりに宿主コレステロールを取り込み、利用する機構が知られている。他のエルゴステロール合成系の必須遺伝子の発現抑制株の致死性が血清の添加により抑制されるのに対し、同定因子 A の発現抑制株の致死性は抑圧されなかったことから、同定因子 A が宿主内での血流感染時に必須であることが示唆された。また、蚕を用いた感染実験評価法によっても、同定因子 A が宿主内でのグラブラータの生育において必須であることが明らかとなった。

(3) 同定因子の解析

同定因子 A 発現抑制株において、ステロールのトランスポーター Aus1p の細胞内局在を調べたところ、発現抑制時は Aus1p が細胞膜に局在せず、主に液胞に局在していた。また、同定因子 A 発現抑制時には、コレステロール取り込み活性が低下することから、同定因子 A 発現抑制株では、Aus1p の局在異常により、血清中のコレステロール取り込みに欠損が生じることが明らかとなった。

生化学的解析の結果、Aus1p は、detergent resistant membrane domains (DRMs) に会合する

膜タンパク質であったことから、同定因子A発現抑制時についてAus1pのDRMsへの会合性を調べたところ、発現抑制株ではAus1pの会合性が著しく低下していた。DRMsは、ステロールとスフィンゴ脂質に富む画分であること、同定因子Aがエルゴステロール合成系の酵素であることから、ステロールの構造変化により、Aus1pのDRMsへの会合性が低下したことが示唆された。

以上のことから、同定因子Aは、Aus1pのDRMsを介した細胞膜の局在化に重要であることが明らかとなった。DRMsを介して、シグナル伝達因子や病原因子が細胞膜上に局在していることが知られている。よって、同定因子Aは、Aus1pの局在化に必要なだけでなく、DRMs会合性の病原因子の局在化にも関与する可能性が予想されることから、抗真菌剤の標的として有用であると考えられる。現在、論文投稿準備中である。

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6件) 全て査読あり

- ① Salazar S, Wang C, Münsterkötter M, Okamoto Michiyo, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Lopes M, Güldener U, Butler G, Mira N. Comparative genomic and transcriptomic analyses unveil novel features of azole resistance and adaptation to the human host in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 18 (1), 2018
- ② Tanaka Y, Sasaki M, Ito F, Aoyama T, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Shibata N. Cooperation between ER stress and calcineurin signaling contributes to the maintenance of cell wall integrity in *Candida glabrata*. *Fungal Biology*, 122(1), 19-33, 2018
- ③ Yamaguchi M, Takahashi-Nakaguchi A, Aida Y, Sato-Okamoto M, Chibana H. Convenient method for better preservation of fine structures of cultured macrophages and engulfed yeast cells by freeze-substitution fixation. *Microscopy*, 66(3), 209-211, 2017

④ Bernardo RT, Cunha DV, Wang C, Pereira L, Silva S, Salazar SB, Schröder MS, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Aoyama T, Sá-Correia I, Azeredo J, Butler G, Mira NP. The CgHaa1-Regulon Mediates Response and Tolerance to Acetic Acid Stress in the Human Pathogen *Candida glabrata*. *G3: GENES, GENOMES, GENETICS*, 7(1), 1-18, 2017

⑤ Tanaka Y, Sasaki M, Ito F, Aoyama T, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Shibata N. *KRE5* Suppression Induces Cell Wall Stress and Alternative ER Stress Response Required for Maintaining Cell Wall Integrity in *Candida glabrata*. *PLoS One*, 11(8), e0161371, 2016

⑥ Pais P, Pires C, Costa C, Okamoto M, Chibana H, Teixeira MC. Membrane Proteomics Analysis of the *Candida glabrata* Response to 5-Flucytosine: Unveiling the Role and Regulation of the Drug Efflux Transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2045, 2016

[学会発表] (計3件)

- ① 知花博治、高橋(中口)梓、佐藤美智代、渡辺亮、倉石貴秀、倉田祥一郎、宇野潤：*Candida glabrata*の体系的かつ網羅的遺伝子組換え体を用いた病原性研究と抗真菌の開発。関東医真菌懇話会，2016，京王プラザホテル(東京)
- ② 知花博治、佐藤(岡本)美智代、高橋(中口)梓、宇野潤 *Candida glabrata* 全必須遺伝子の同定と千葉大学化合物ライブラリーを用いた抗真菌活性物質：第60回日本医真菌学会総会，2016，東京都立産業貿易センター(東京)
- ③ 高橋(中口)梓、佐藤美智代、亀井克彦、知花博治：第60回日本医真菌学会総会，2016，東京都立産業貿易センター(東京)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 美智代 (SATO, michiyo)
千葉大学・真菌医学研究センター・特任助教
研究者番号：70525386

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

知花 博治 (CHIBANA, hiroji)
千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

高橋 梓 (TAKAHASHI, azusa)
千葉大学・真菌医学研究センター・技術職員