

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07125

研究課題名(和文) *C. albicans*の宿主内生存戦略におけるオートファジーの生理的役割の解析研究課題名(英文) Physiological roles of autophagy in commensal and pathogenic *C. albicans* in host environments

研究代表者

堀江 哲郎 (Horie, Tetsuro)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10508675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：*C. albicans*の病原性とオートファジーの関連について解析するために、オートファジー関連遺伝子の破壊株を作製し解析を行った。その結果、培地中のグルコースが枯渇すると、オートファジーが顕著に誘導されることを見出した。この時、野生型とatg株では代謝物の著しい相違が見られた。またatg株と野生株を培養中に、経時的にサンプリングを行い、RNA-Seq解析に供した。maSigProソフトウェアで時系列比較を行い、atg株に特徴的な発現パターンを示す6つの遺伝子群に分類し、GO解析を行った。その結果、atg株では代謝関連遺伝子の他に、病原真菌特異的な転写因子群が顕著に変動していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では*C. albicans*におけるオートファジーの生理的機能について解析を行った。その結果、グルコースが枯渇するタイミングでオートファジーが強く誘導されることが分かった。栄養変動の大きい宿主内ではオートファジーが即座に誘導されて、増殖をサポートすることが強く示唆された。特に病原真菌特異的な転写因子がオートファジーと相補的な機能を持つことが明らかとなった。さらに詳細な研究を進めることで、宿主内での病原真菌の生存戦略の基礎を明らかとすることができると考える。

研究成果の概要(英文)：Candida albicans is a common commensal fungal pathogen of oral cavity, which causes opportunistic infection, which, in immunocompromised individuals, leads to systemic infection with mortality rates of more than 40%. Bulk autophagy is the process of recycling degraded cell compartments in response to various nutrient starvation. We found that upon glucose depletion, bulk autophagy was induced in *C. albicans* growing in yeast/extract/dextrose (YPD) medium. To elucidate the physiological roles of the autophagy, we conducted time course RNA-seq experiment of atg mutants and wild type cells growing in YPD. The results showed that a group of pathogenic fungus-specific transcription factors as well as metabolism-related genes were significantly altered in the atg strain.

研究分野：分子生物学

キーワード：*C. albicans* カンジダ症 オートファジー 代謝 メタボローム 遺伝子発現プロファイル

1. 研究開始当初の背景

Candida albicans は口腔内に高頻度で検出される常在性真菌で、宿主の健康状態の悪化により、日和見感染症を引き起す。特に加齢、長期の抗がん剤治療、また AIDS 患者のような免疫機能が低下した患者では、皮膚や粘膜に限局された表在性カンジダ症から、より重篤なカンジダ血症等の播種性カンジダ症および臓器侵襲性カンジダ症に移行する。その場合、致死率は高く 40% を超えていることから、カンジダ症に対する効果的な新治療薬の早期開発が期待されている。

C. albicans の近縁種である出芽酵母では、オートファジー (自食作用) により細胞内の不要成分を分解し、鉄や亜鉛などの微量栄養素をリサイクルすることで、細胞増殖に寄与している。同様に、*C. albicans* においても宿主内での鉄や亜鉛の獲得は必須であり、オートファジーを生存するために利用している可能性がある。

2. 研究の目的

オートファジーは一般に窒素飢餓により誘導され、タンパク質を分解し、生存に必要なアミノ酸プールを供することが知られている。しかし液胞 (リソソーム) 内での分解により様々な産物が細胞内に生じ、加えてオートファジーは窒素飢餓のみならず炭素源や硫黄飢餓など様々な栄養飢餓で誘導される。これらのことから細胞のおかれた環境により、オートファジーは生理的に様々な細胞内プロセスに関わっていると考えられている。本研究の目的は、生体内に近い培養条件を設定した上で、*C. albicans* のオートファジーの誘導およびその生理的役割について明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *C. albicans* ATG (autophagy related genes) 破壊株コレクションの作製とオートファジー活性検出システムの構築

C. albicans のゲノムデータベース (<http://www.candidagenome.org/>) を用いて、相同性解析を行い、オートファジー関連遺伝子 (ATG) を同定した。2 倍体である *C. albicans* の遺伝子破壊を行なうために、2 種類の栄養要求性遺伝子を用いて ATG を破壊し *atg* 変異体のコレクションを作製した。続いてオートファジーが誘導されたことを検出するために遺伝子工学的に GFP を融合した CaAtg8 タンパク質を発現する *C. albicans* 株を作製した。GFP 融合タンパク質は、オートファジーが誘導されると、分解を受けるが、GFP 自身は構造的に分解されにくいため断片化した GFP として残り、その GFP を検出することでオートファジー活性を検出する。

(2) オートファジーの誘導機構の解明

作製したオートファジー検出システムを用いて解析を行ったところ、グルコースを含む培地で *C. albicans* を増殖させるとグルコースが枯渇するタイミングでオートファジーが誘導されることを見出した。この現象に関してさらに解析を進めるために培養経時的に代謝産物の解析およびトランスクリプトーム解析を行った。

トランスクリプトーム解析: 次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法を用いてトランスクリプトーム解析を行った。野生型と *atgl* 欠損株を培養中、経時的に菌体のサンプリングを行い RNA-seq 解析に供した。データ取得は外部業者に依頼した。

メタボローム解析: トランスクリプトーム解析と同様に、野生型および *atgl* 欠損株をグルコース培地で培養中に経時的にサンプリングし、GC-MS を用いたメタボローム解析を行った。データ解析: 得られたトランスクリプトームデータとメタボロームデータは R ソフトウェア

を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) *C. albicans* における ATG 遺伝子とその破壊株の作製

データベース検索を行って *C. albicans* の ATG 遺伝子の探索を行った。その結果、出芽酵母で知られている ATG のほとんどが *C. albicans* においても進化的に保存されていることが分かった

(表 1)。さらに、これらの遺伝子について遺伝子破壊を行った。*C. albicans* のオートファジーを解析するために、保存されているオートファジー関連遺伝子群 (autophagy related genes: CaATGs) の網羅的な破壊株の作製を行った。破壊株については作製したオートファジー検出システムを用いてオートファジーが起こらないことを確認した。

表 1 出芽酵母、哺乳類、*C. albicans* の ATG 遺伝子

	<i>S. cerevisiae</i>	Mammalian	<i>C. albicans</i>
Atg1 kinase and its regulators	Atg1	ULK1/ULK2	CaAtg1
	Atg13	Atg13	CaAtg13
PtdIns (PI) 3-kinase complex I	Atg14	Atg14	CaAtg6
	Atg6/Vps30	Beclin-1	CaVps31
	Vps34 Vps15	Vps34 Vps15	CaVps15
Atg9 and Atg2-Atg18 complex	Atg9	Atg9L	CaAtg9
	Atg2	Atg2	CaAtg2
	Atg18	WIPI	CaAtg18
Ubiquitin-like conjugation system	Atg8	LC3	CaAtg8
	Atg7	Atg7	CaAtg7
	Atg3	Atg3	CaAtg3
	Atg4	Atg4	CaAtg4
	Atg12	Atg12	CaAtg12
	Atg5	Atg5	CaAtg5
	Atg10	Atg10	CaAtg10
	Atg16	Atg16L	CaAtg16

(2) グルコース枯渇によって誘導されるオートファジー

C. albicans のオートファジーについて解析を進める中で *C. albicans* ではグルコースを含む富栄養培地 (YPD) で増殖中、培地中のグルコースが枯渇すると、顕著にオートファジーが誘導されることを見出した (図 1)。

(3) メタボローム解析の結果

この時、野生型と *atg1* 株においてオートファジーの誘導の有無によって、代謝物の著しい相違が見られた。特にオートファジー誘導後に細胞内のアミノ酸量は野生型で顕著に高かった。しかし、それほど *atg1* 株の生育に大きな影響がないことが疑問であった (図 2)。

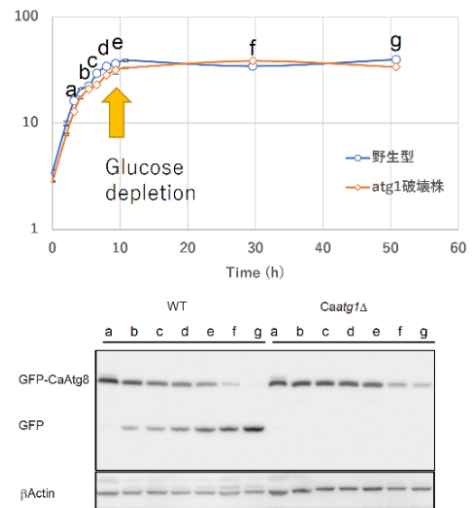


図 1 グルコース枯渇で誘導されるオートファジー

上: 野生型および *atg1* 株の生育曲線。下: オートファジー検出アッセイ。切断された GFP がオートファジーの誘導を示す。

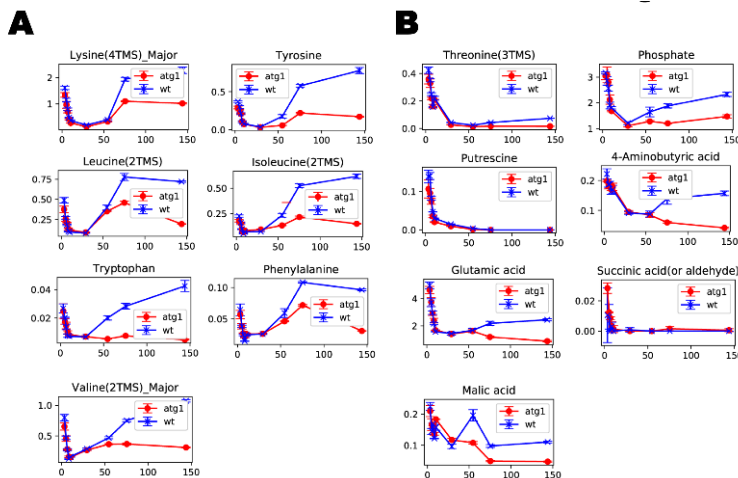


図 2 野生型と *atg1* 株のメタボローム解析

青: 野生型の代謝物変動、赤: *atg1* 株の代謝物変動

(4) 培養経時的トランスクリプトーム解析

野生株と *atg1* 株を YPD で培養し、経時的にサンプリングを行い、RNA-Seq 解析に供した。maSigPro ソフトウェアで時系列比較を行い、*atg1* 株に特徴的な発現パターンを示す 6 つの遺伝子群に分類し、GO 解析を行った。その結果、*atg1* 株では代謝関連遺伝子の他に、病原真菌特異的な転写因子群が顕著に変動していることが分かった (図 3)。これは病原真菌が栄養変動の大きい環境で、生存するためにオートファジー欠損を相補するような、複数のフェイルセーフ機能の存在を示唆している。

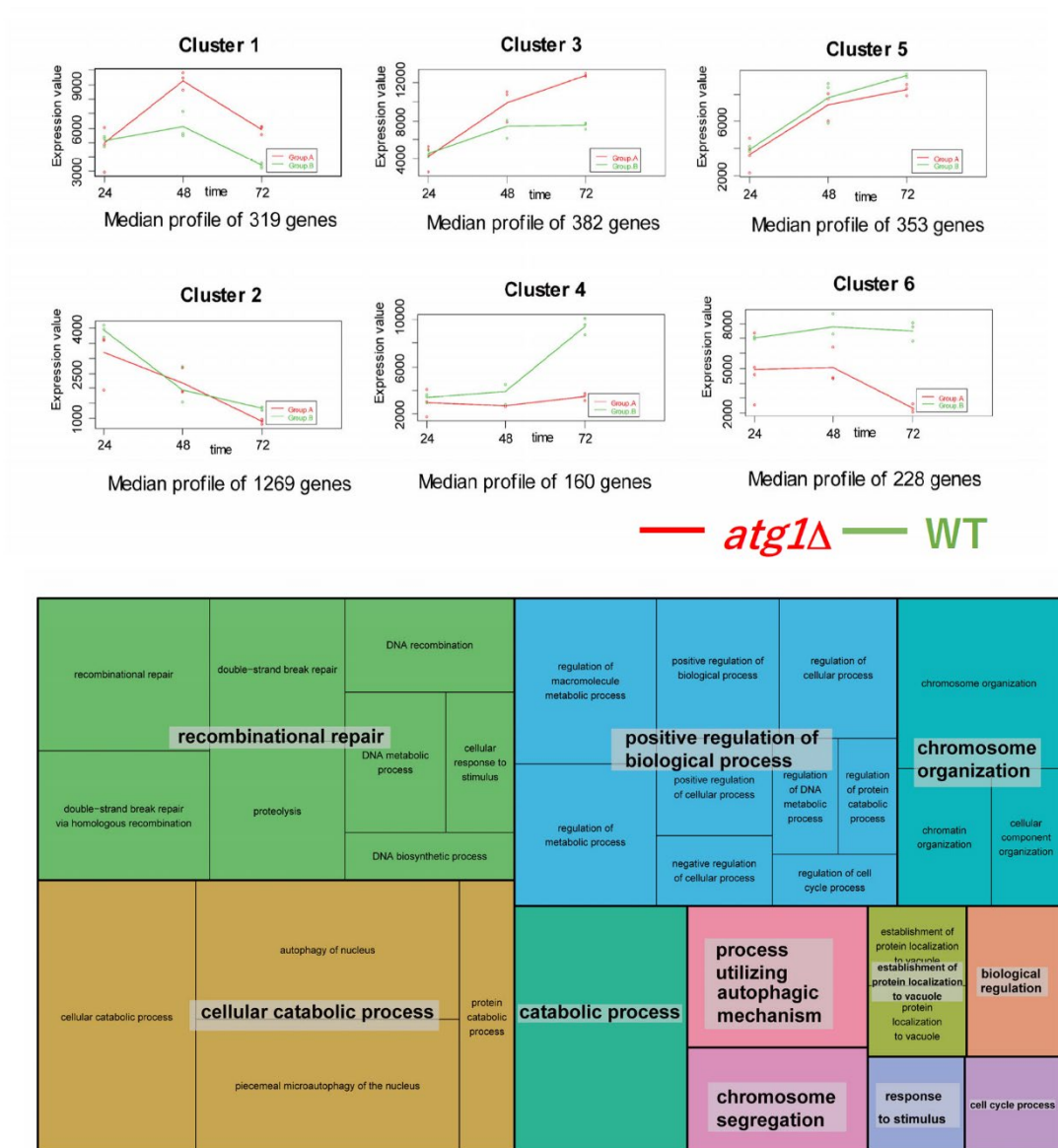


図 3 野生型と *atg1* 株の RNA-seq 解析およびその解析

上: 野生株および *atg1* 株のトランスクリプトームプロファイル。下: クラスター 3 の遺伝子の GO 解析の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashida Naoto, Urano-Tashiro Yumiko, Horie Tetsuro, Saiki Keitarou, Yamanaka Yuki, Takahashi Yukihiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Transcriptome and metabolome analyses of <i>Streptococcus gordonii</i> DL1 under acidic conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 112 ~ 118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2023.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江 哲郎
2. 発表標題 Candida albicans のバルクオートファジーの代謝制御における役割の解明
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江 哲郎, 那須 優則
2. 発表標題 Candida albicans の宿主内生存戦略におけるオートファジーの生理機能の解析
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀江 哲郎, 川俣（堀江） 朋子, 大隅良典, 那須優則
2. 発表標題 Candida albicansの宿主内生存戦略におけるオートファジーの生理機能の解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀江 朋子 (川俣朋子) (Horie Tomoko) (70435527)	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教 (12608)	
研究分担者	那須 優則 (Nasu Masanori) (50130688)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	小池 麻里 (Mari Koike) (00234667)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------