

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07072

研究課題名(和文)新規抗真菌薬の創出を目指した病原性真菌の鉄代謝ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of iron homeostasis of pathogenic fungi to aim development of a novel antifungal

研究代表者

中山 浩伸 (Nakayama, Hironobu)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：40369989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の鉄濃度は、取り込みと消費、貯蔵の間で厳格に管理されているため、その制御の破綻因子は抗真菌薬となりうる。トランスクリプトーム解析により、*Candida glabrata*の鉄代謝制御に関与する遺伝子を特定し、欠損株を作成して表現型解析を行った。その結果から、細胞外からの鉄の取り込み因子(FET3/FTR1)、代謝制御の転写因子(SEF1)、転写後制御因子(CTH2)の機能欠損が、鉄不足環境下での細胞増殖に大きな影響を与えることが明らかになった。特にcth2欠損株は、病原性の低下が大きかったことから、Cth2の機能活性の抑制(標的核酸配列との結合抑制)が、抗真菌活性につながると予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進医療の発展や人口の高齢化に伴い、日和見感染症対策は重要な課題となっている。特に、侵襲性の真菌感染症は発症頻度、死亡率ともに高く、対策が喫緊の課題となっている。現在の抗真菌薬には、スペクトルの狭さや副作用の問題があるため、治療薬選択の余地は狭く、また、既存薬に抵抗性を示す株の出現もあり、有効な治療法の開発が急務である。今回、鉄代謝の転写および転写後制御の攪乱が、外部からの鉄の取り込みを阻害するより、真菌の病原性を低下させたことを明らかにした。この知見は、新規の抗真菌薬の標的として、転写および転写後制御因子の阻害が有望であることを示しており、抗真菌薬の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The concentration of intracellular iron is tightly regulated through iron homeostasis, indicating that disruption of iron homeostasis could exhibit antifungal effects. To verify this hypothesis, we conducted a phenotype study on genes involved in iron homeostasis. Utilizing *Candida glabrata*, we identified genes participating in iron homeostasis through transcriptome analyses. Subsequently, we generated null mutants to investigate the phenotypes of these mutants. The results revealed that dysfunction of the iron transporter (FET3/FTR1), the transcription factor of iron homeostasis (SEF1), or the post-transcriptional factor of iron homeostasis (CTH2) significantly hampered cell growth in iron-depleted environments, including an in vivo setting using a silkworm infection model. Among the null mutants tested, the cth2 null mutant showed the weakest pathogenicity in the silkworm infection model, suggesting that inhibiting CTH2 function could be an effective antifungal approach.

研究分野：微生物学

キーワード：鉄欠乏ストレス 真菌感染症 カンジダ 病原性発現 標的分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

深在性真菌症は免疫不全患者に発症する感染症として、医療の高度化や人口の高齢化などと関連して増加の一途をたどり重大な問題となっている。真菌は、細菌などと異なり真核生物であるため、薬の標的分子の設定が難しいことや感染メカニズムが未解明なことなどの理由から治療薬が限られている。現在使用されている真菌症の治療薬では、重篤な副作用や抗真菌スペクトラムの狭さ、耐性菌の出現などがしばしば問題になるため、新しい真菌感染症の治療薬の開発が急務となっている。有効な治療法を開発する方法として、宿主体内を想定した真菌のストレス環境下の応答機序の解明が挙げられ、種々の真菌を用いた多様な研究が進んでいる。真菌が宿主体内で感染、特に全身性の血流感染を引き起こしている状態では、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って真菌は利用できる遊離鉄の濃度が極めて低くなっており、真菌が宿主体内で増殖し病原性を発揮するには、鉄欠乏環境に適応した鉄代謝ネットワークを構築することが必須となる。そのため、このネットワークの破綻を引き起こす分子は有効な真菌感染の治療薬となるが、機構解明が十分に進んでおらず、治療薬の標的となる具体的な分子の発見には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、感染時におこる鉄欠乏ストレスに適応した鉄代謝ネットワークに焦点を当て、病原酵母カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*) を用いて、遺伝学的解析や生化学・細胞生物学的解析を行い、鉄欠乏時に構築されるネットワークの構成因子を同定し、それらの機能を解明することを目的とする。さらに、感染モデルを用いた実験を行うことで、同定した因子の宿主感染における役割を確認し、それら因子の中から、真菌感染症の治療薬の標的となる最適分子を提案し、その機能阻害分子を創出することを目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) トランスクリプトーム解析を行い、鉄欠乏ストレスによって発現が上昇する遺伝子群を同定する。その後、これら遺伝子の欠損株を作製し、増殖能力と培地中の鉄濃度の関連性を調べ、野生株と比較して高濃度の鉄が必要な株を選抜し、鉄欠乏ストレス応答因子の候補を同定する。
- (2) 同定した因子の中で転写因子に該当するものに着目し、tet-OFF 株を用い、RNA-seq を行う。これにより発現が ON および OFF の時のトランスクリプトーム解析を行い、鉄欠乏ストレスによって発現変動した遺伝子群と比較する。さらに、これら転写因子の上流の遺伝子群や支配下にある遺伝子群からの鉄の代謝ネットワークの構成因子を同定し、それらのネットワーク上で位置付けを試みる。
- (3) 鉄の代謝調節は、ミトコンドリアとバクテリオの機能に関連する。そこで、ミトコンドリアやバクテリオの機能を評価するための蛍光物質などのツールを使用し、同定因子の欠損がミトコンドリアやバクテリオに与える影響を調べる。また、候補因子の機能阻害分子検索のためのスクリーニング系の確立を画策する。
- (4) 同定した因子の変異株を用いて、カイコモデルを用いて感染実験を行い、抗真菌薬の標的分子としての妥当性を検討する。

### 4. 研究成果

- (1) トランスクリプトーム解析などの手法を用いて、鉄代謝の制御に関与すると考えらえる遺伝子を選択した。これら遺伝子の中から、鉄の取り込みや細胞内小器官への輸送に関与すると予想されたトランスポーターや、鉄の代謝制御に関与すると予想された因子を選び出し、それらの欠損株を約 30 株作製した。これらの欠損株のうち、培地中の鉄濃度が低いと増殖できない株を選抜した。結果として、鉄取り込みに関わる因子として高親和性鉄トランスポーター (*Fet3/Ftr1*) が、鉄代謝調節因子として転写因子 (*Sef1*) と転写後調節因子 (*Cth2*) が、他の遺伝子欠損株に比べて鉄キレーターに対する感受性が高いことが明らかとなった。次に、これらの株をカイコに感染させ、LD50 (50%のカイコが

死亡する *C. glabrata* の細胞数) を指標に病原性低下の有無を確認した。その結果、鉄キレーターに感受性が高い株 (*fet3*, *sef1*, *cth2*) は野生株よりも高い LD50 の値を示し、*fet3*, *sef1*, *cth2* の順に LD50 が高くなる傾向があった。これらの結果から、鉄の代謝制御の異常は、外部からの鉄の取り込みと細胞内の鉄貯蔵や消費を攪乱するため、外部からの鉄の取り込みを阻害するより、真菌の宿主体内生存に大きく影響を与えることが予想された。また、*cth2* のカイコ体内の生菌数の測定結果から、Cth2 の機能を阻害することが、有効な新規抗真菌薬の開発につながる可能性が示唆された。(第 31 回微生物シンポジウムで口頭発表、BIO Clinica 38 (6) 526-530, 2023.)

- (2) 遺伝学的解析や生化学・細胞生物学的解析を通して、セリントレオニンキナーゼである Elm1 が細胞形態や細胞壁成分の恒常性、キャンディン系抗真菌薬などの細胞壁ストレスへの抵抗性に重要な役割を担っていることを明らかにした。また、Elm1 の欠損株のトランスクリプトーム解析により、キチン合成酵素や接着関連タンパク質をコードする遺伝子群の発現が上昇することを突き止め、Elm1 の欠損株では接着能が高まり、病原性が高くなっていることを示した (Sci Rep 10.1038/s41598-020-66620-7)。さらに、Elm1 の欠損株では、鉄キレーターの感受性が高く、鉄恒常性維持機構との関連が示唆された。
- (3) *SEF1* や *CTH2* の tet-OFF 株を作製し、RNA-seq により発現が ON および OFF の時のトランスクリプトーム解析を行ったが、鉄欠乏ストレス時に構築される鉄代謝ネットワークに関連する新たな遺伝子の同定には至らなかった。また、遺伝子欠損株 (*fet3*, *sef1*, *cth2*) におけるミトコンドリアやバキューオルの機能変化を調べたが、現在まで実施した培養条件では、野生株と大きな差異を観察できていない。

以上のように抗真菌薬の新規標的因子は提案できたが、トランスクリプトーム解析が予想通りに進まず、鉄代謝ネットワークの全容解明には至らなかった。また、同定した因子がミトコンドリアやバキューオル機能にどのように関連しているかの解析も不十分であり、抗真菌活性を持つ化合物のスクリーニングのための測定系の確立が課題として残った。

以上

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yuya Ito, Taiga Miyazaki, Yutaka Tanaka, Takashi Suematsu, Hironobu Nakayama, Akihiro Morita, Tatsuro Hirayama, Masato Tashiro, Takahiro Takazono, Tomomi Saijo, Shintaro Shimamura, Kazuko Yamamoto, Yoshifumi Imamura, Koichi Izumikawa, Katsunori Yanagihara, Shigeru Kohno, Hiroshi Mukae	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of Elm1 in antifungal susceptibility and virulence in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 9789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66620-7	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 -

1. 著者名 中山 浩伸	4. 巻 38
2. 論文標題 病原真菌 <i>Candida glabrata</i> の鉄恒常性の制御に 基づいた真菌感染症の治療戦略	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 526-530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大西修平、森田昭広、松本靖彦、関水和久、中山浩伸
2. 発表標題 鉄代謝経路に着目した新規抗真菌薬のターゲットの探索
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019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	森田 明広  (Morita Akihiro)  (20382228)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授    (34104)	
研究分担者	田口 博明  (Taguchi Hiroaki)  (20549068)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授    (34104)	

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