

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07475

研究課題名(和文) 病原真菌のミトコンドリアにおける宿主血清コレステロール利用機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism for utilizing host-cholesterol in the mitochondria of the pathogenic fungi

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：病原真菌カンジダ・グラブラータ(*Candida glabrata*)は、アゾール系抗真菌薬に対する感受性が低いため、症例数が年々増加し問題となっている。グラブラータは、宿主血中のコレステロールを取込み、自身のステロールとして利用する宿主コレステロール取込み機構をもつ。これまでに、ミトコンドリアと小胞体の接触部位に存在するERMES複合体が、宿主コレステロール取込み機構に欠損があることを見出した。さらに、ERMES複合体がグラブラータのアゾール耐性化において、非常に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原真菌において、抗真菌薬に対する耐性化機構の解明は、治療や抗真菌薬開発において非常に重要である。本研究では、汎用性の高いアゾール系抗真菌薬に対する*C. glabrata*の耐性化にミトコンドリアに存在するERMES複合体が関与することを明らかにした。これまで、*C. glabrata*において、ミトコンドリア異常が、アゾール耐性化と密接していることは示唆されていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究の成果は、ミトコンドリアを介したアゾール耐性機構の解明に大きく貢献したと考えている。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic yeast *Candida glabrata* has become a problem as the number of cases increases each year due to its low susceptibility to azole antifungal drugs. *C. glabrata* has a host-cholesterol uptake mechanism that allows it to uptake cholesterol from the host blood and use it as its own sterol. We have found that the ERMES complex, which exists at the site of contact between mitochondria and endoplasmic reticulum, is defective in the host-cholesterol uptake mechanism. Furthermore, we found that the ERMES complex plays a critical role in the azole resistance of *C. glabrata*.

研究分野：病原真菌

キーワード：アゾール耐性 *Candida glabrata* 活性酸素種

## 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が、免疫不全患者においては血流に侵襲し、重篤な全身感染を引き起こす。1990年代からカンジダ症の治療において、アゾール系抗真菌薬が頻用されるにつれ、アゾール系抗真菌薬に低感受性であるカンジダ種の患者からの分離頻度が増加し、治療現場で問題となっている。特に、カンジダ・グラブラータ (*Candida glabrata*、以下グラブラータ) は、出現頻度が高い種である。アゾール系抗真菌薬は、細胞膜成分であるエルゴステロール (哺乳類では、コレステロールに相当) の合成酵素 Erg11p の阻害剤である。グラブラータのアゾール低感受性の要因として、宿主血中からコレステロールを取り込み、エルゴステロールの代わりに利用する特有の宿主血清コレステロール取込み機構がある。これまでに、宿主血清コレステロールの取込み機構が、宿主生体内での生存において必須であることが報告されていることから、この機構の解明は、グラブラータの病原性を理解する上で非常に重要である。しかしながら、宿主血清コレステロール取込み機構において、グラブラータが取り込んだ宿主血清コレステロールを細胞内でどのように利用するかについては不明である。

## 2. 研究の目的

宿主血清コレステロール取込み機構の解明を目指して、グラブラータの各遺伝子 (約 3,500 個) を欠損させた破壊株ライブラリーを用い、血清含有フルコナゾール添加培地での生育を指標に、網羅的スクリーニングを行った結果、ミトコンドリアと小胞体の接触部位を形成する ERMES 複合体 (ER-Mitochondria Encounter Structure) の関与を見出した。本研究では、ERMES 複合体の宿主血清コレステロール取込み機構に対する作用機序を明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

ERMES 複合体の宿主血清コレステロール取込み機構への関与を調べるため、構成因子の各欠損株においてコレステロールの蛍光アナログを用い、コレステロールの細胞内分布を顕微鏡により観察する。今回、ERMES 複合体の制御因子として示唆される GTPase が、アゾール感受性に必要であることを見出したことから、*gem1* 破壊株が示すフルコナゾール耐性に着目し解析を進める。Gem1 は、二つの GTPase ドメインと EF-ハンドモチーフ ( $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質に存在) に加え、C 末側に膜貫通ドメインを持ちミトコンドリア外膜に存在する GTPase である。Gem1 に変異を導入し、アゾール感受性に必要なドメインの同定を行なった。また、他の ERMES 複合体構成因子との二重破壊株を作製し、アゾール耐性化における ERMES 複合体の関与について調べた。

#### 4. 研究成果

(1) ERMES 複合体の欠損株におけるコレステロールの蛍光アナログの局在観察を行なった。ERMES 複合体の欠損株では、野生株とは異なるコレステロールの挙動が観察され、ERMES 複合体の宿主血清コレステロールの分布への関与が示唆された。

(2) *GEM1* と ERMES 複合体との二重欠損株を作製し、*gem1* 破壊株が示すアゾール耐性への影響を調べた (図 1)。ERMES 複合体の他の構成因子の欠損により、*gem1* 破壊株のアゾール耐性が抑制された。Gem1 以外の ERMES 構成因子は、小胞体とミトコンドリアの接触部位形成に必要であ

ることから、*gem1* 破壊株におけるアゾール耐性化には、小胞体とミトコンドリアの接触が重要であることが明らかとなった。

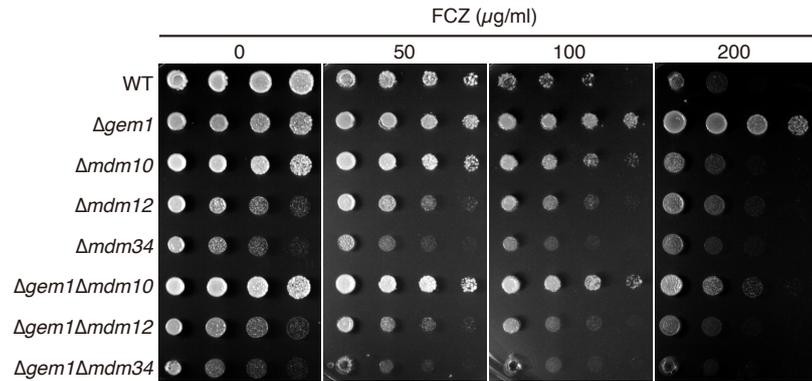


図 1. *gem1* 破壊株のアゾール耐性に対する各 ERMES 複合体因子欠損の影響

(3) *Gem1* の GTPase ドメインまたは EF-ハンドモチーフのアミノ酸置換を行ない、変異 *gem1* 株のアゾール耐性を調べたところ、アゾール耐性には *Gem1* の GTPase 活性が必要であることが示唆された。

(4) *gem1* 破壊株における薬剤排出ポンプ *CDR1* の転写量を定量 PCR により調べたところ、野生株に比べ増加していた。さらに、*cdr1* 破壊によって、*gem1* 破壊株のアゾール耐性が抑制された。また、*gem1* 破壊株では、ミトコンドリアからの活性酸素種 (mtROS) が増加しており、

mtROS を低下させる N-アセチルシシテインの添加により、*gem1* 破壊株での *CDR1* の転写量の増加が抑制された。これらのことから、*Gem1* の欠損は、mtROS の過度な発生を引き起こし、発生した mtROS により *Cdr1* の発現量が増加し、*gem1* 破壊株がアゾール耐性となることが明らかとなった (図 2)。

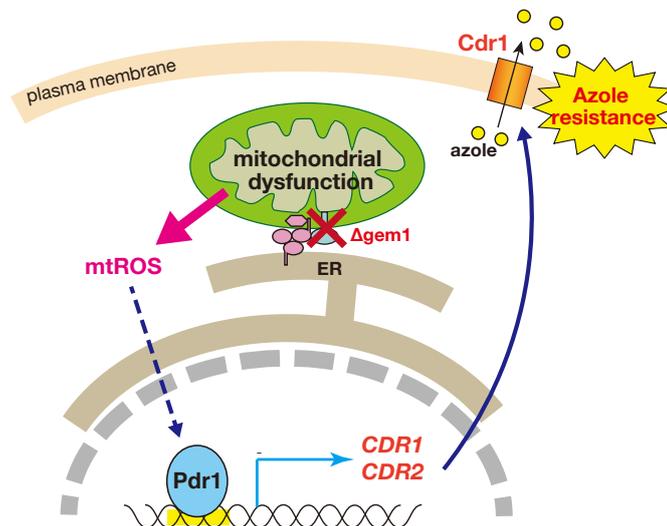


図 2. *gem1* 破壊株のアゾール耐性化のモデル図

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kiyohara Maiko, Miyazaki Taiga, Okamoto Michiyo, Hirayama Tatsuro, Makimura Koichi, Chibana Hiroji, Nakada Nana, Ito Yuya, Sumiyoshi Makoto, Ashizawa Nobuyuki, Takeda Kazuaki, Iwanaga Naoki, Takazono Takahiro, Izumikawa Koichi, Yanagihara Katsunori, Kohno Shigeru, Mukae Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of a Novel FKS1 R1354H Mutation Associated with Caspofungin Resistance in <i>Candida auris</i> Using the CRISPR-Cas9 System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 529 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof9050529	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 該当する
1. 著者名 Okamoto Michiyo, Nakano Keiko, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Sasamoto Kaname, Yamaguchi Masashi, Teixeira Miguel Cacho, Chibana Hiroji	4. 巻 9
2. 論文標題 In <i>Candida glabrata</i> , ERMES Component GEM1 Controls Mitochondrial Morphology, mtROS, and Drug Efflux Pump Expression, Resulting in Azole Susceptibility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 240 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof9020240	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 該当する
1. 著者名 Pais Pedro, Galocha Monica, California Raquel, Viana Romeu, Ola Mihaela, Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji, Butler Geraldine, Teixeira Miguel C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of the <i>Candida glabrata</i> Transcription Factor CgMar1: Role in Azole Susceptibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 61 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof8010061	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 該当する
1. 著者名 Okamoto Michiyo, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Tejima Kengo, Sasamoto Kaname, Yamaguchi Masashi, Aoyama Toshihiro, Nagi Minoru, Tanabe Kohichi, Miyazaki Yoshitsugu, Nakayama Hironobu, Sasakawa Chihiro, Kajiwaru Susumu, Brown Alistair J. P., Teixeira Miguel C., Chibana Hiroji	4. 巻 10
2. 論文標題 Erg25 Controls Host-Cholesterol Uptake Mediated by Aus1p-Associated Sterol-Rich Membrane Domains in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.820675	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 該当する

1. 著者名 Cavalheiro Mafalda, Pereira Diana, Formosa-Dague C?cile, Leit?o Carolina, Pais Pedro, Ndlovu Easter, Viana Romeu, Pimenta Andreia I., Santos Rui, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Okamoto Michiyo, Ola Mihaela, Chibana Hiroji, Fialho Ars?nio M., Butler Geraldine, Dague Etienne, Teixeira Miguel C.	4. 巻 4
2. 論文標題 From the first touch to biofilm establishment by the human pathogen <i>Candida glabrata</i> : a genome-wide to nanoscale view	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02412-7	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 該当する

1. 著者名 Jin Yifan, Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji, Liu Guoyu, Gao Xiao Dong, Nakanishi Hideki	4. 巻 37
2. 論文標題 Functional characteristics of Sv13 and Pam1 that are required for proper cell wall formation in yeast cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yeast	6. 最初と最後の頁 359 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/yea.3502	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 該当する

1. 著者名 Pais Pedro, Vagueiro Susana, Mil-Homens Dalila, Pimenta Andreia I., Viana Romeu, Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji, Fialho Ars?nio M., Teixeira Miguel C.	4. 巻 11
2. 論文標題 A new regulator in the crossroads of oxidative stress resistance and virulence in <i>Candida glabrata</i> : The transcription factor CgTog1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virulence	6. 最初と最後の頁 1522 ~ 1538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21505594.2020.1839231	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 該当する

1. 著者名 Yamaguchi Masashi, Taguchi Masaki, Uematsu Katsuyuki, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Sato-Okamoto Michiyo, Chibana Hiroji	4. 巻 70
2. 論文標題 Sandwich freezing device for rapid freezing of viruses, bacteria, yeast, cultured cells and animal and human tissues in electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 215 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa049	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Michiyo Sato-Okamoto, Keiko Nakano, Keiko Nakano, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Kaname Sasamoto, Masashi Yamaguchi, Hiroji Chibana
2. 発表標題 In <i>Candida glabrata</i> , ERMES component GEM1 controls mitochondrial morphology, mtROS, and drug efflux pump expression, resulting in azole susceptibility
3. 学会等名 感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2022
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤(岡本) 美智代、高橋 梓、笹本 要、山口 正視、手島 健吾、梶原 将、知花 博治
2. 発表標題 病原性酵母 <i>Candida glabrata</i> におけるErg25pの脂質ドメインへの関与
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤(岡本) 美智代、高橋 梓、笹本 要、山口 正視、手島 健吾、青山 俊弘、名木 稔、田辺 公一、中山 浩伸、宮崎 義満、梶原 将、知花 博治
2. 発表標題 Erg25pは病原性酵母 <i>Candida glabrata</i> コレステロール取込み機構に必要である
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤(岡本) 美智代
2. 発表標題 エルゴステロール合成酵素Erg25pは病原性酵母 <i>Candida glabrata</i> の宿主コレステロール取り込み機構に必要である
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------