

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	真菌Candida albicansの脂肪酸代謝機構とその病原性に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	手島健吾
Author(English)	Kengo Tejima
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10936号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:梶原 将,山本 直之,長田 俊哉,和地 正明,小島 英理
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10936号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	分子生命科学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（理学）
学生氏名： Student's Name	手島 健吾		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	梶原 将	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

カンジダ感染症を引き起こす *Candida albicans* は日和見感染菌である。現在、我が国で承認されている *C. albicans* への治療薬は 4 系統のみと少なく、また近年の薬剤耐性菌に頻出により十分な治療が行えない問題がある。それゆえ、昨今医療現場では新規系統の抗真菌剤が希求されている。新薬開発のため、これまでに多くの *C. albicans* の病原因子の研究が報告されてきた。脂肪酸代謝もその一つであり、脂肪酸が様々な形で *C. albicans* の病原性に関与していることが数多く報告されている。そのような中、本論文では *C. albicans* の脂肪酸代謝機構、とりわけその取込み機構に着目した。*C. albicans* は生体内で脂質分解酵素を分泌し、宿主の脂質に作用させて遊離脂肪酸を産生することが知られている。そして、この遊離した脂肪酸が *C. albicans* の病原性に関与しているといわれており、一説では *C. albicans* が遊離した長鎖脂肪酸を取込み・利用することで病原性を呈するとされている。そこで、本研究では *C. albicans* の長鎖脂肪酸の取込み機構とその病原性への関連の解析を行った。

C. albicans の細胞外の長鎖脂肪酸の取込み機構を解析するため、近縁種の出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の長鎖脂肪酸の取込み機構を参考に、細胞外の長鎖脂肪酸の利用（活性化）に関わる酵素 *CaFaa4p* および長鎖脂肪酸トランスポーター様タンパク質 *CaFat1p* を選出した。まず、*CaFaa4p* に関して機能解析を行った。*S. cerevisiae* の細胞外の長鎖脂肪酸活性化酵素遺伝子の欠損株 (*faa1Δfaa4Δ* 株) に *CaFAA4* 遺伝子を導入したところ、セルレニン（脂肪酸合成酵素阻害剤）-長鎖脂肪酸添加培地で生育できなかった *faa1Δfaa4Δ* 株の形質が回復し、*CaFaa4p* は *ScFaa1p* や *ScFaa4p* と同様の機能（長鎖脂肪酸の活性化機能）を有することが示唆された。次に、*C. albicans* *FAA4* 遺伝子欠損株を作成し、セルレニン-長鎖脂肪酸添加培地で培養したところ、*FAA4* 遺伝子欠損株は長鎖脂肪酸を取込まず、生育できなかった。また、蛍光長鎖脂肪酸 C_{11} -BODIPY- C_{12} を用いた顕微鏡下での長鎖脂肪酸の取込みの観察では *C. albicans* *FAA4* 遺伝子欠損株は蛍光長鎖脂肪酸の取込みが低下していた。以上から、*CaFaa4p* は *C. albicans* において細胞外の長鎖脂肪酸の取込み・利用に必要な唯一の酵素であることが示唆された。さらに、*CaFaa4p* が認識する基質を確認したところ、少なくともミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸といった長鎖脂肪酸を認識して取込むことが分かった。機能解析に加えて、*CaFAA4* 遺伝子欠損による多形性への影響も調べたところ、バイオフィーム形成において細胞代謝活性の低下が確認され、*CaFaa4p* はバイオフィーム形成時に細胞代謝活性維持に重要であることが示唆された。次に、*CaFat1p* の機能解析を行った。*C. albicans* *FATI* 遺伝子欠損株を作成し、セルレニン-長鎖脂肪酸添加培地で培養したところ、*FATI* 遺伝子欠損株は長鎖脂肪酸を取込み、生育できた。また、同様の培地での増殖経過も観察したが、増殖の遅延等は確認されなかった。加えて、蛍光長鎖脂肪酸 C_{11} -BODIPY- C_{12} を用いた顕微鏡下での長鎖脂肪酸の取込みの観察では、*FATI* 遺伝子欠損株は蛍光長鎖脂肪酸を取込むことが認められた。以上から、*CaFATI* 遺伝子の欠損は細胞外の長鎖脂肪酸の取込み・利用に影響しないことが示唆された。一方で、蛍光長鎖脂肪酸の取込みの観察実験において、*FATI* 遺伝子欠損株では取込まれた蛍光長鎖脂肪酸が細胞質全体に散在しており、その局在パターンが野生株と異なっていた。これより、*CaFat1p* は取込んだ長鎖脂肪酸を細胞内小胞（脂肪滴等）に輸送する役割を有する可能性が推測された。他方で、バイオフィーム形成の解析では細胞代謝活性には変化がない一方で、バイオマス量が低下していることが分かり、*CaFat1p* はバイオフィーム形成時に細胞外マトリクス形成に重要である可能性が推測された。最後に医学的観点からも重要度の高いバイオフィームに着目し、*CaFaa4p* および *CaFat1p* のバイオフィーム形成時の役割を解析した。*FAA4* 遺伝子欠損株のバイオフィーム形成において主要代謝系の代表遺伝子の発現量を確認したところ、解糖系/糖新生の酵素遺伝子 *TDH3* と TCA 回路の酵素遺伝子 *CIT1* の発現量の低下および脂肪酸合成酵素遺伝子 *FAS1* と β 酸化の酵素遺伝子 *FOX2* の発現量の上昇が確認された。このことから、*CaFaa4p* はバイオフィーム形成時の遺伝子発現制御に間接的に関与することが示唆された。さらに、*FAA4* 遺伝子欠損株のバイオフィームの脂肪酸解析では、ミリスチン酸、パルミチン酸およびステアリン酸の著しい蓄積が確認された。これより、*FAA4* 遺伝子欠損株のバイオフィームではシグナル伝達等に用いられるこれら長鎖脂肪酸の利用が一部不能になったために、遺伝子発現制御に異常が生じていることが推測された。また、薬剤耐性に関する解析では、*FAA4* 遺伝子欠損株は細胞壁合成阻害剤 *Micafungin* に対して高感受性になっていた。一方で、*FATI* 遺伝子欠損株のバイオフィームにおいてフェノール硫酸法にて炭水化物量を測定した結果、有意な差が確認されず、フェノール硫酸法で測定した炭水化物（中性糖）の量には変化がなく、その他の細胞外マトリクス成分の量の低下が推測された。

以上より、本研究では *C. albicans* における細胞外の長鎖脂肪酸の取込み機構の一端を解明した。また、その取込み機構に関わる酵素がバイオフィーム形成などの病原的性質にも何らかの役割を担っていることも分かった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	分子生命科学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	手島 健吾		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	梶原 将	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

The opportunistic fungal pathogen, *Candida albicans* is the major species in Candidiasis. Now the frequent appearance of drug-resistant strains makes it difficult to treat Candidiasis, thus leading to high demand for a new class antifungal drug in medical field. To date, many studies on the pathogenic factors in *C. albicans* have been reported to develop a new antifungal-drug. Then, this study focused on long-chain fatty acid (LCFA) uptake mechanism as a new antifungal-drug target. Therefore, this study tried to elucidate the mechanism and the importance of the related enzymes in the putatively pathogenic phenotypes known as polymorphism. First, *CaFaa4p* and *CaFat1p* were selected as the candidate-enzymes related to exogenous LCFA uptake by referring to the *C. albicans* relative, *Saccharomyces cerevisiae*. Then, the constructed mutants, *C. albicans faa4Δ/faa4Δ* and *fat1Δ/fat1Δ* strains were tested on cerulenin-LCFA containing media. As the result, *faa4Δ/faa4Δ* strain was unable to grow, whereas *fat1Δ/fat1Δ* strain was not affected in growth. These suggested that *CaFaa4p* is required to take up and utilize exogenous fatty acid, while *CaFat1p* is not necessarily required to do so. On the other hand, when adding fluorescent LCFA to observe LCFA uptake, as above, *faa4Δ/faa4Δ* strain reduced the uptake, but *fat1Δ/fat1Δ* could take up it. However, the localization of fluorescent LCFA taken up in *fat1Δ/fat1Δ* strain was scattered in cytosol, differing from the wild type strain, suggesting that *CaFat1p* putatively plays a role to transport exogenous LCFA to appropriate organelle. Beside the enzymatic function, the medically important phenotype, biofilm formation was also analyzed. The *faa4Δ/faa4Δ* strain showed reduction in metabolic activity, while *fat1Δ/fat1Δ* strain showed reduction in biomass, suggesting that *CaFaa4p* plays a role to maintain cell activity in biofilm formation, whereas *CaFat1p* plays a role to properly form extracellular matrix. In conclusion, this study elucidated the part of LCFA uptake mechanism in *C. albicans* and the related enzymes play some roles in biofilm formation.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).