みにれびゅう

酵母における細胞外ステロール取り込みの役割

田辺　公一

1. *Saccharomyces cerevisiae* における細胞外ステロール取り込み調節

コレステロールは細胞膜の構成成分であり，哺乳類細胞の生育に必須の脂質である．出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は，実験培地中，好気条件では生育・増殖に必須であるエルゴステロール（哺乳類におけるコレステロールに相当する）を合成するが，このときコレステロールを細胞外から添加しても，細胞内にコレステロールは取り込まれない（aerobic sterol exclusion；好気的ステロール排除）．エルゴステロールは，多段階の酵素反応によって合成され，それに伴い ATP や NADPH などが消費されるため，細胞外ステロールを取り込んで資化しないのは一見非効率的であるようにみえる．一方で，好気的ステロール排除は，*S. cerevisiae* の生育に不適切な（あるいは毒性を持つ）ステロール様構造の物質が侵入するのを防いでいると考えることもできる．*S. cerevisiae* は，ステロール合成が可能な条件では「栄養」か「毒」かわからない細胞外ステロールを利用せずに，自身のステロール合成のみで生育し，ステロール恒常性を維持しているのであろう．

それでは，*S. cerevisiae* において細胞外ステロール取り込みはいつ観察されるのか？　現在までに *S. cerevisiae* において細胞外ステロールの取り込みが観察される生理的条件は，嫌気条件（低酸素）のみである．嫌気条件においては，酸素を必要とするエルゴステロール合成が抑制されるため，細胞外ステロール取り込みが活性化されるのは合目的であるが，当然ながらステロール以外の脂質代謝や呼吸，電子伝達系，エネルギー代謝などさまざまな生命活動にも多大な影響が及んでいると考えられる．このように，*S. cerevisiae* では細胞の代謝状態が劇的に変化し，複数の細胞内シグナル伝達系が活性化されたときにのみ，ステロール取り込みが「許可」されるものと考えられる．

国立感染症研究所真菌部（〒162-8640　東京都新宿区戸山 1-23-1）
The physiological role of exogenous sterol uptake in yeast
Koichi Tanabe（Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan）

2. *Saccharomyces cerevisiae* のステロール取り込みの分子メカニズム

細胞外ステロールの取り込みは，*S. cerevisiae* の遺伝子変異株を用いても観察される．これまでに，①ヘム合成に必須である *HEM1* 遺伝子破壊，②転写因子 *UPC2* の活性化型変異（*upc*2-1）においてステロール取り込みが好気条件でも検出されている．精力的な遺伝学的実験アプローチによって低酸素→ヘム量低下→Upc2p の活性化というスキームでステロール取り込みが活性化されることが明らかになり，関連するシグナル伝達に関係する因子が同定されつつあるが，全貌はまだ解明されていない（**図 1**）[1,2]．

近年，ステロールが細胞膜を通過する際に ATP-binding cassette（ABC）タンパク質 Aus1p または Pdr11p が必要であることが明らかにされた（図 1）．*AUS1* と *PDR11* の二重破壊株においては嫌気条件でのステロール取り込みが完全に消失した．精製タンパク質または変異タンパク質発現株の解析結果から，Aus1p および Pdr11p によるステロールの取り込みが ATP 加水分解依存的であることが示され，また，これらの ABC タンパク質はほかの基質排出型の ABC タンパク質（floppase）とは反対に，細胞外由来のステロールを細胞膜外葉から細胞膜内葉に能動的に移動させる（flippase）と推測された．細胞膜内葉まで到達した細胞外由来ステロールは，oxysterol binding protein homolog（Osh）タンパク質によって小胞体に輸送され，アセチル化，エステル化などの修飾を経て，その後の輸送経路が決定される．Osh については，ヒトの細胞内ステロール輸送との類似性から精力的に研究されたため，小胞体までのステロール輸送経路は解明されたが，小胞体以降のステロール輸送メカニズムについては未解明な部分が多い．

3. 病原真菌 *Candida glabrata* における細胞外ステロール輸送と生理的意義

Candida 属は消化管内に常在する真菌（酵母）であり，臓器移植や抗がん剤治療に伴い免疫が低下すると消化管から血管へと移行して血行性の播種性感染を引き起こす．

我々が研究対象とする *Candida* 属の一種である *Candida*

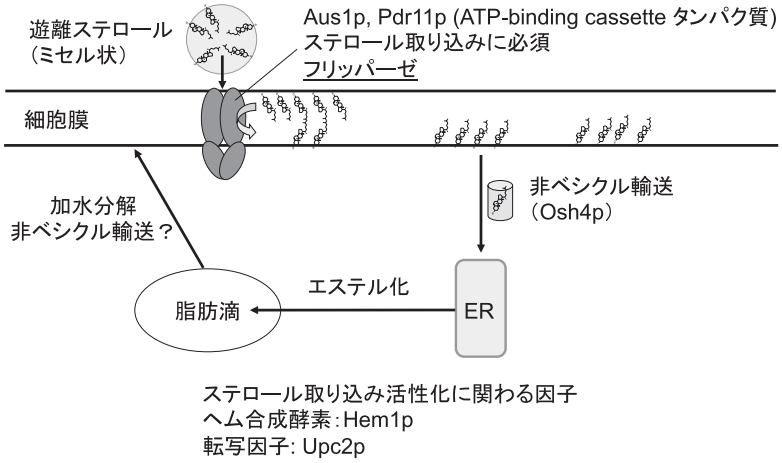

図 1　*Saccharomyces cerevisiae* で明らかにされたステロール取り込みに関連する因子

glabrata においては，感染患者の臨床検体からステロールを合成できないステロール要求性変異株が分離されること[3]や，マウス感染実験モデルにおいてエルゴステロール合成遺伝子のノックダウン株が野生型と同程度の臓器定着率を示す[4]ことが示されてきた．これらの結果は，*C. glabrata* が感染時にステロール合成を必要としない，すなわち宿主由来のコレステロールを利用して生存する可能性を強く示唆している．以上の考察より，*C. glabrata* のステロール取り込みの活性化機構および感染時の生理的役割を明らかにすることを目的に研究を行った．

S. cerevisiae の実験と同様に，合成培地に遊離コレステロールを添加し，*C. glabrata* へのコレステロール取り込みを検討したところ，嫌気条件においてステロール取り込みが確認され，好気条件ではステロールは取り込まれなかった（**図 2**）[5~7]．したがって酸素濃度によるステロール取り込み活性の調節に関して，*S. cerevisiae* と *C. glabrata* に相違はないと考えられた．また，*C. glabrata* の *AUS1* オルソログ遺伝子（Cg*AUS1*）を破壊した株（*aus1*Δ）は，*S. cerevisiae* における *AUS1* と *PDR11* の二重破壊株のように嫌気条件下のステロール取り込みが完全に消失したため，*C. glabrata* ではステロール取り込みに必須の ABC タンパク質遺伝子が *AUS1* だけであることが明らかになった．

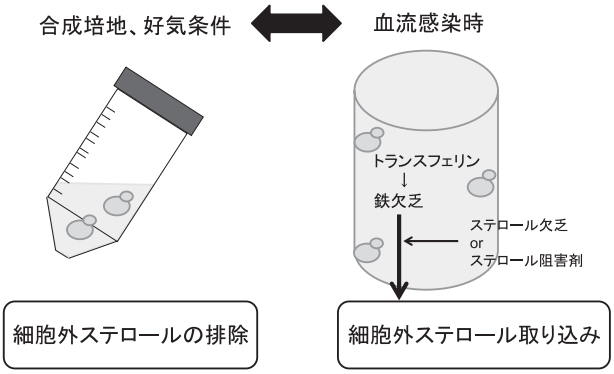

図 2　血流感染時のステロール取り込み活性化機構

次に，血流感染時を想定してウシ胎仔血清含有培地からコレステロール取り込みが観察されるかどうかを調べた．まず，ステロール合成阻害剤で生育が阻害された *C. glabrata* を血清添加がレスキューできるかどうかを調べ，コレステロール取り込みの有無を検討した．ステロール合成を阻害した野生型 *C. glabrata* を血清添加培地で嫌気培養すると，血清の濃度依存的に生育が回復した一方，*aus1*Δ株は同じ実験条件で生育の回復が完全に消失したことから，嫌気条件において *C. glabrata* が Aus1p を介して血清からコレステロールを取り込む可能性が示唆された．また，血清による生育回復は，リポタンパク質を除去した血清では観察されなかったことから，血清中の主要なステロール担体であるリポタンパク質が *C. glabrata* にとってのコレステロール源であると推測された．興味深いことに，血清による生育回復は好気条件でも嫌気条件下と同程度観察されること，また，この条件において *AUS1* の発現量が 10 倍以上に増加したことから，血清はステロール源であると同時に，好気条件でもステロール取り込みを活性化できるような因子を含む可能性が考えられた．

血清によるステロール取り込み活性化能を検証するために，好気条件下で血清と同時にコレステロールアナログである 7-dehydrocholesterol（7-DHC）を添加し，細胞から 7-DHC が検出されるかどうかを調べた．血清のみでステロール取り込みを活性化できると予想していたが，意外にも血清と 7-DHC を含む培地で培養した *C. glabrata* からは 7-DHC は検出されず，血清＋7-DHC＋ステロール合成阻害剤を含む培地においてのみ細胞から 7-DHC が検出された．これらの結果より，ステロール合成阻害状態の *C. glabrata* において血清がステロール取り込みを活性化できると考えられた．上記と同様の実験を *S. cerevisiae* においても行ったが，血清＋ステロール合成阻害による 7-DHC

の取り込みは観察されなかったことから血清によるステロール取り込みの活性化は，*C. glabrata* に特異的な現象であると考えられた．

血清中のどのような因子が *C. glabrata* においてステロール取り込みを活性化するのかを明らかにするために，血清の代わりにステロール取り込みを活性化するようなさまざまなストレス条件（高温，高浸透圧，低 pH など）のスクリーニングを行った．その結果，ステロール合成を阻害した *C. glabrata* にアポトランスフェリンまたは鉄キレート剤を添加して鉄欠乏状態にすると，細胞外ステロール取り込みが活性化されることを見いだした．また，血清＋ステロール合成阻害によってステロール取り込みが活性化された状態に $FeCl_3$ を添加すると，*CgAUS1* の発現誘導および細胞外ステロール取り込みが抑制された．以上の結果より，*C. glabrata* は血流感染時にトランスフェリン等の鉄キレートタンパク質によって鉄欠乏状態になり，このシグナルとステロール合成阻害が引き金となって *AUS1* 遺伝子の発現量の上昇，ステロール取り込みの活性化が引き起こされるものと推測された（図 2）[5~7]．

C. glabrata におけるステロール取り込みの生理的意義を調べるために，*AUS1* 破壊株を用いたマウス感染実験を行った．野生型株および *aus1*Δ株をマウス尾静脈より接種し，1 週間後の臓器内菌数を測定した．*aus1*Δ株感染マウスでは腎臓内菌数が野生型株感染マウスよりも 10 倍近く低下したことから，ステロール取り込み活性は *C. glabrata* の感染宿主体内での生存に有利に働くと考えられた．

4. おわりに

本研究において，鉄欠乏シグナルが *C. glabrata* にのみステロール取り込みを活性化することを明らかにしたが，*S. cerevisiae* におけるステロール取り込みはヘム合成量によって調節されることから，両菌種のステロール取り込みはある程度共通した機構で調節されていると考えられる．*S. cerevisiae* は，自然環境という多様な条件で生存する必要があるため，細胞外のステロールの取り込み（侵入）をより厳しく制御する必要があるのだろう．一方，*C. glabrata* は宿主体内という限定された環境でだけ効率よく生存できるように，血流感染時に鉄欠乏シグナルを感知して，積極的に宿主由来のコレステロールを活用するのかもしれない．今後は，*C. glabrata* において鉄欠乏シグナルが，どの段階でステロール取り込み活性化シグナルフローと合流するのかについて検討を進めていきたい．

1）Li, Y. & Prinz, W.A.（2004）*J. Biol. Chem.*, **279**, 45226–45234.
2）Schulz, T.A., Choi, M.G., Raychaudhuri, S., Mears, J.A., Ghirlando, R., Hinshaw, J.E., & Prinz, W.A.（2009）*J. Cell Biol.*, **187**, 889–903.
3）Hazen, K.C., Stei, J., Darracott, C., Breathnach, A., May, J., & Howell, S.A.（2005）*Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **52**, 35–37.
4）Nakayama, H., Izuta, M., Nakayama, N., Arisawa, M., & Aoki, Y.（2000）*Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2411–2418.
5）Nakayama, H., Tanabe, K., Bard, M., Hodgson, W., Wu, S., Takemori, D., Aoyama, T., Kumaraswami, N.S., Metzler, L., Takano, Y., Chibana, H., & Niimi, M.（2007）*J. Antimicrob. Chemother.*, **60**, 1264–1272.
6）Nagi, M., Tanabe, K., Nakayama, H., Yamagoe, S., Umeyama, T., Oura, T., Ohno, H., Kajiwara, S., & Miyazaki, Y.（2013）*J. Infect. Chemother.*, **19**, 138–143.
7）Nagi, M., Tanabe, K., Ueno, K., Nakayama, H., Aoyama, T., Chibana, H., Yamagoe, S., Umeyama, T., Oura, T., Ohno, H., Kajiwara, S., & Miyazaki, Y.（2013）*Mol. Microbiol.*, **88**, 371–381.

著者寸描

●田辺公一（たなべ　こういち）

国立感染症研究所真菌部主任研究官．博士（農学）．

■略歴　1972 年香川県に生る．2001 年京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻博士課程修了．同年日本学術振興会特別研究員．03 年国立感染症研究所生物活性物質部研究員．08 年国立感染症研究所真菌部主任研究官（現職）．

■研究テーマ　病原真菌 *Candida* 属の疫学と薬剤耐性メカニズムの解明

■抱負　・生物に普遍的な現象を安価な酵母を使って解明する．

・研究者になってよかったと思えるような研究テーマを改めて見つける．

■趣味　ボート釣り（海）．