

称号及び氏名	博士(獣医学)	鵜飼 雄太
学位授与の日付	2021年8月31日	
論文名	真菌の転写因子 Yap1 活性化によるミトコンドリアの抗酸化および薬剤耐性の研究	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	堀江 真行

論文要旨

緒言

深在性真菌症は臓器移植や抗がん剤治療などにより免疫抑制状態にある患者に発症し得る致死性の高い難治性感染症である。健常人では感染、発症することが稀な日和見感染菌のカンジダ属菌やアスペルギルス属菌が主な起因菌となる。近年では、アスペルギルス症の第一選択薬であるアゾール系薬に対する耐性菌の出現と拡大が問題視されている。アゾール系薬の標的蛋白質をコードする *cyp51A* 遺伝子の変異により、アゾール系薬の結合力が低下すること、あるいは遺伝子発現が亢進することが主な耐性要因である。一方で、それらとは独立した転写因子の変異による耐性機序も報告されている。そこで、薬剤耐性真菌の克服に寄与するために、酸化ストレス応答のマスター転写因子 Yap1 と薬剤耐性の関連性の解明を目指した研究を行うこととした。その手掛かりとして、先行研究で提示されていた2つの知見に着目した。

1つ目は、アスペルギルスのミトコンドリア機能不全とアゾール耐性の関連性である。ミトコンドリアの機能不全がカルシウム伝達系やエルゴステロール合成系に影響を与えて、薬剤排出ポンプや *cyp51A* 遺伝子の発現が亢進することによりアゾール耐性が引き起こされる。すなわち、ミトコンドリアの機能不全を未然に防ぐことがアゾール耐性を抑制することになる。そこで、真菌のモデル生物であり、ミトコンドリア研究が進展している出芽酵母において、抗酸化酵素 Gpx2 に着目した。Gpx2 の遺伝子発現は、酸化ストレス下で転写因子 Yap1 により誘導される。また、Gpx2 遺伝子の欠損によってミトコンドリアの形態異常を引き起こすことが知られている。第1章において、Gpx2 のミトコンドリアにおける詳細な局在性を解明することにより、Yap1 により制御

される Gpx2 がミトコンドリアの恒常性維持に寄与し得るかを考察した。

2つ目は、アスペルギルスの Yap1 の C 末端切断体がアゾール耐性を引き起こす現象である。出芽酵母の先行研究から、この C 末端切断体は Yap1 の恒常的な活性化を引き起こすと考えられるが、この恒常的な活性化は *yap1* 遺伝子の突然変異でも起こり得ると推察した。そこで、第 2 章において、Yap1 の突然変異体がアゾール耐性株として出現され得るか検証し、その耐性機序を解析した。さらに、第 3 章では新たな *in vivo* 評価系を構築することにより、Yap1 の突然変異体が *in vivo* におけるアゾール系薬の治療効果に影響を与えるかを検証した。

第一章 *Saccharomyces cerevisiae* の Yap1 が制御する抗酸化酵素 Gpx2 の細胞内局在

細胞分画法により Gpx2 の細胞内局在の解明を試みた。出芽酵母細胞を破碎して細胞質画分と粗ミトコンドリア画分を遠心分離したところ、Gpx2 は両方の画分で検出された。粗ミトコンドリア画分について、ショ糖密度勾配法によりミトコンドリアと小胞体を超遠心分離したところ、Gpx2 はミトコンドリア画分に検出された。次に、ミトコンドリアの各画分における Gpx2 局在の解明を試みた。まず、ミトコンドリアの外膜表層のタンパク質をプロテイナーゼ K で消化したところ、Gpx2 の一部は消化されたが残存画分も確認された。これは Gpx2 がミトコンドリアの外膜表層と内部の両方に局在することを示している。次に、ミトコンドリア外膜を低浸透圧下で破碎し、内膜のみ保持したミトプラストを作製し、プロテイナーゼ K を作用させたところ、Gpx2 が消化されずに残存することが確認された。一方で、ミトプラストを Triton-X により可溶化した後にプロテイナーゼ K を作用させたところ、Gpx2 はほぼ全て消化された。これは Gpx2 がマトリックス内部に局在することを示している。さらに、ミトプラストを超音波処理により破碎して遠心分離したところ、Gpx2 は沈殿画分に検出された。これは Gpx2 がマトリックス内では膜表面に局在することを示唆している。以上の Gpx2 のミトコンドリア局在性により、Yap1 活性化は Gpx2 の抗酸化作用を介してミトコンドリア膜の恒常性を維持し、アゾール耐性化を抑制する可能性があることが示された。

第二章 *Aspergillus flavus* の Yap1 変異による voriconazole 耐性機序

実験室にてアゾール系薬曝露下でアゾール耐性アスペルギルスを分離し、Yap1 突然変異株が出現し得るか検証した。Voriconazole (VRCZ) 及び itraconazole (ITCZ) の曝露下において *Aspergillus fumigatus* 及び *A. flavus* を継代培養したところ、いずれの薬剤においても感受性が低下した株が分離された。そのうち、*A. flavus* の VRCZ 継代株では、アゾール標的の *cyp51A* 遺伝子に点変異が認められなかった。変異箇所を特定するために全ゲノム配列解析を行ったところ、転写因子の *yap1* 遺伝子に点変異 (T1673G) が認められた。この *yap1* 点変異が VRCZ 耐性の責任変異かを検証するために、*yap1* 点変異の導入株を作製したところ、*yap1* 変異株は VRCZ への耐性化が認められた。さらに、この変異株に野生型の *yap1* 遺伝子を復帰させたところ、VRCZ 感受性は回復し、*yap1* 変異が VRCZ 耐性の責任変異であることが立証された。

この *yap1* 変異により Yap1 蛋白質の Leu558 が Trp に置換されていた。*S. cerevisiae* の先行研究から、Leu558Trp 置換は Yap1 の核外輸送を妨げると推察された。そこで、

Yap1 の恒常的な核局在により発現誘導される遺伝子群の一部が VRCZ 耐性に寄与すると考えた。アゾール耐性との関連性が報告されている薬剤排出ポンプと、プロモーター領域に Yap1 結合配列を有する酸化ストレス応答因子に着目し、リアルタイム定量 PCR により遺伝子発現の変動を解析した。その結果、*yap1* 変異株において、薬剤排出ポンプの *atrF* 遺伝子 (Yap1 結合配列を有する) に 100 倍以上の、酸化ストレス応答因子の *dsba* 遺伝子と *gst* 遺伝子に 10 倍以上の発現亢進が認められた。発現誘導が特に顕著であった *atrF* に着目し、*yap1* 変異株の *atrF* 遺伝子を欠損させたところ、VRCZ への感受性がほぼ回復した。以上の結果から、*atrF* の発現亢進が VRCZ 耐性の主な要因であることが示された。つまり、Yap1 活性化は薬剤排出ポンプの AtrF を介してアゾール耐性化を促進していると考えられた。

第三章 *Aspergillus Yap1* 変異株に対する *in vivo* 治療効果の検証

第二章で分離したアスペルギルスの Yap1 変異株の *in vivo* におけるアゾール系薬の治療効果を検証するために、薬剤応答性が良好な *in vivo* 評価系の新規構築を試みた。菌糸伸長するアスペルギルス属菌は colony forming unit (CFU) による菌数測定法では正確に菌量を測定できないことから、18S rDNA 等の DNA コピー数をリアルタイム PCR で定量し、菌量測定することが一般的になりつつある。しかしながら、*in vivo* サンプルの菌量測定では定量感度が充分でなかった。それにより感染モデル作製に高菌量接種が必要となり、抗真菌薬の応答性が悪いことが問題であった。そこで、検出感度を上げるべく 18S rDNA よりコピー数が多い 18S rRNA を定量する系を構築した。その結果、マウス感染モデルにおいて、アスペルギルスの 18S rRNA 定量法は 18S rDNA 定量法よりも 1000 倍ほど感度が高いことが示された。この定量法により、アゾール感性株の低菌量接種のマウス感染モデルにおいて、posaconazole (PSCZ) の治療効果を検証したところ、3 mg/kg では静真菌的效果を示し、10 mg/kg では 2- \log_{10} kill の強力な殺真菌効果を示した。次に、PSCZ の *in vitro* 抗真菌活性が 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に低下した *cyp51A* 変異株に対する治療効果を検証した。その結果、低菌量接種のマウス感染モデルにおいて、PSCZ の 10 mg/kg では増殖抑制効果に留まった。以上より、アゾール耐性アスペルギルスに対する治療効果の低減を判定可能な評価系であることが示された。

最後に、VRCZ の *in vitro* 活性が 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に低下した *yap1* 変異株について、VRCZ の *in vivo* 治療効果を検証した。その結果、親株および *yap1* 変異株の両方のマウス感染モデルにおいて、VRCZ は 10 mg/kg 以上で増殖抑制、30 mg/kg 以上で殺真菌効果を示し、*in vitro* の感受性差が *in vivo* に反映されなかった。この結果の 1 つの可能性として、*in vivo* の感染成立過程の宿主防御系あるいは菌自身が産生する活性酸素種により、親株においても Yap1 が活性化し、*yap1* 変異株との差異が小さくなったことが考えられる。

【総括】

Yap1 活性化はミトコンドリア局在性の抗酸化酵素を発現誘導してミトコンドリアの恒常性を維持し、その結果としてアゾール耐性化を抑制すると考えられる。一方で、

Yap1 活性化は薬剤排出ポンプの発現を亢進することにより、アゾール耐性を促進する側面を持つ。つまり、Yap1 活性化はアゾール耐性の抑制機構と促進機構を併存していることが明らかとなった。このような Yap1 活性化体がアゾール系薬の治療で問題となるかは *in vivo* での正確な評価が必要であり、本論文ではそれに適した評価系を提示することができた。一方で、Yap1 活性化と薬剤耐性の関連性の真の理解には、*in vivo* 環境における詳細な解析が必要であることも示された。

審査結果の要旨

深在性真菌症は臓器移植や抗がん剤治療などにより免疫抑制状態にある患者に発症し得る致死性の高い難治性感染症である。近年では、アスペルギルス症の第一選択薬であるアゾール系薬に対する耐性菌の出現と拡大が問題視されている。標的遺伝子 *cyp51A* の変異によるアゾール系薬の結合力の低下や遺伝子発現亢進が主な耐性機序であるが、それとは独立した転写因子の変異による耐性機序も報告されている。申請者は、真菌の酸化ストレス応答のマスター転写因子 Yap1 について、先行研究で提示されていた2つの知見に着目し、薬剤耐性との関連性を明らかにすることを目的とした。1つ目の知見は、ミトコンドリア機能不全とアゾール耐性の関連性である。2つ目の知見は、アスペルギルスの Yap1 の C 末端切断体がアゾール耐性を引き起こす現象である。出芽酵母の先行研究からこの C 末端切断体は Yap1 の恒常的な活性化を引き起こすと考えられるが、この恒常的な活性体は *yap1* 遺伝子の突然変異でも起こり得ると推察し、以下の研究を行った。

第1章では、病原真菌のモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、Yap1 により発現制御を受ける抗酸化酵素 Gpx2 に着目した。Gpx2 の欠損はミトコンドリアの形態に異常をきたすことから、Gpx2 はミトコンドリアの機能維持にどのように寄与しているかを検証した。まず、細胞分画法により細胞内局在性を検証したところ、Gpx2 は細胞質に加えてミトコンドリア画分にも存在することを明らかにした。さらに、種々の処理をしたミトコンドリアに proteinase K を作用させて、ミトコンドリアにおける Gpx2 の詳細な分布を検証したところ、Gpx2 はミトコンドリアの外膜表層と内膜のマトリックス側表層に局在することが立証された。すなわち、Yap1 活性化は Gpx2 の抗酸化作用を介してミトコンドリア外膜と内膜の恒常性を維持し、アゾール耐性を抑制できる可能性があることが示唆された。

第2章では、実験室にてアゾール系薬曝露下でアゾール耐性アスペルギルスを分離し、Yap1 突然変異体がアゾール耐性株として出現され得るか検証した。voriconazole 曝露下で *Aspergillus flavus* を継代培養したところ、標的遺伝子 *cyp51A* に変異を有さない voriconazole 耐性株が分離された。変異箇所を特定するために全ゲノム配列を解析したところ、転写因子の *yap1* 遺伝子に点変異が認められた。この *yap1* 点変異が voriconazole 耐性の責任変異かを検証するために、*yap1* 点変異の導入株を作製したところ、*yap1* 変

異株は voriconazole への耐性化が認められた。さらに、この変異株に野生型の *yap1* 遺伝子を復帰させたところ、voriconazole 感受性は回復し、*yap1* 変異が voriconazole 耐性の責任変異であることが立証された。この *yap1* 変異により Yap1 蛋白質の Leu558 が Trp に置換され、Leu558Trp 置換は Yap1 の核外輸送を妨げると推察された。そこで、Yap1 の恒常的な核局在により発現誘導される何らかの遺伝子が voriconazole 耐性に寄与するとの仮説を立てた。薬剤排出ポンプと酸化ストレス応答因子にも注目し、リアルタイム定量 PCR により遺伝子発現の変動を解析したところ、*yap1* 変異株において、薬剤排出ポンプの *atrF* 遺伝子に 100 倍以上の、酸化ストレス応答因子の *dsba* 遺伝子と *gst* 遺伝子に 10 倍以上の発現亢進が認められた。発現誘導が特に顕著であった *atrF* に着目し、*yap1* 変異株の *atrF* 遺伝子を欠損させたところ、voriconazole への感受性がほぼ回復した。つまり、Yap1 活性化は薬剤排出ポンプの AtrF を介してアゾール耐性化を促進していると考えられた。

第 3 章では、新たな *in vivo* 薬効評価系を構築することにより、Yap1 突然変異による活性化体が *in vivo* におけるアゾール系薬の治療効果に影響を与えるかを検証した。薬剤応答性が良好な *in vivo* 評価系で検証するために、アスペルギルスの 18S rRNA を定量する系の新規構築を試みた。その結果、18S rRNA 定量法は 18S rDNA よりも 1,000 倍ほど感度が高いことが示され、低菌量接種条件といった薬剤応答性が良好な系を設定できた。この系において、アゾール感性の *A. fumigatus* に対しては posaconazole の強い殺真菌効果を確認でき、標的変異のアゾール耐性株に対しては posaconazole 治療効果の顕著な減弱を確認した。最後に、*A. flavus yap1* 変異株について、voriconazole の治療効果を評価したところ、標的変異の場合とは異なり親株に対する治療効果と同程度となった。親株においても、感染成立過程の宿主防御系あるいは菌自身が産生する活性酸素種により Yap1 が活性化し、*yap1* 変異株との差異が小さくなったことが要因と考えられた。

以上の結果は、真菌 Yap1 の活性化がアゾール耐性化の抑制機構と促進機構の両方を併せ持つこと、並びに *in vivo* でのより高感度な評価系として確立した 18S rRNA 定量法を用いてアスペルギルス Yap1 の突然変異による活性化体に対してはアゾール系薬の *in vivo* 治療効果が減弱しないことを明らかにした。本研究成果は医学のみならず獣医学の分野においても多大な貢献をすると考えられる。従って、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。